

Université de Montréal

Rôle du facteur de transcription NR4A3 dans la réponse des lymphocytes T CD8

Par

Livia Odagiu

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de doctorat

en microbiologie et immunologie

Avril 2023

© Livia Odagiu, 2023

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et doctorales

Cette thèse intitulée

Rôle du facteur de transcription NR4A3 dans la réponse des lymphocytes T CD8

Présenté par

Livia Odagiu

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Dr Etienne Gagnon
Président-rapporteur

Dre Nathalie Labrecque
Directrice de recherche

Dre Nathalie Arbour
Membre du jury

Dr Martin J. Richer
Examineur externe

Résumé

Les lymphocytes T (LT) CD8 sont un sous-type de cellules immunitaires qui participent à l'élimination des certains agents infectieux et de cellules tumorales. La capacité de réponse des LT CD8 est dépendante de leur état de différenciation. Lors d'une réponse immunitaire, les LT CD8 spécifiques à l'agent infectieux sont activés, se différencient et prolifèrent en LT effecteurs (LTE) qui participent à l'élimination de l'agent pathogène. Les LTE peuvent être distingués en effecteurs de courte durée de vie (SLEC), terminalement différenciés et éliminés par apoptose après l'infection, et en précurseurs des cellules mémoires (MPEC) qui survivent et génèrent les LT mémoires (LTM). Par contre, lors d'une infection chronique ou d'une réponse antitumorale, la persistance antigénique et inflammatoire induisent l'épuisement des LT CD8, soit un état de différenciation caractérisé par des fonctions effectrices et prolifératives diminuées ainsi qu'une forte expression de récepteurs inhibiteurs (RI). Afin d'améliorer les thérapies vaccinales, les traitements antitumoraux et les thérapies lors des infections chroniques, il est important de mieux comprendre la différenciation des LT CD8.

Nous avons étudié le rôle de NR4A3 dans la différenciation des LT CD8 chez la souris. NR4A3 est un récepteur nucléaire et un facteur de transcription (FT) dont l'expression est rapidement induite par une stimulation antigénique, mais dont le rôle dans les LT CD8 n'a pas été encore déterminé. Nous avons émis l'hypothèse que l'expression de NR4A3 dans ces cellules suite à une stimulation antigénique contrôle leur différenciation.

Premièrement nous avons étudié le rôle du NR4A3 dans la différenciation des LT CD8 lors d'une infection aiguë et avons déterminé que la délétion de NR4A3 dans les LT CD8 augmente la différenciation MPEC, la génération des LTM et la production de cytokines. La régulation de la différenciation des LT CD8 par NR4A3 est transcriptionnelle et, lors des premiers jours postinfection, sa délétion induit un programme transcriptionnel associé avec la différenciation des LTM. De plus, dès les premières heures postactivation, la délétion de NR4A3 favorise l'induction d'un état de chromatine plus ouvert avec une prédiction d'activité augmentée des FT bZIP.

Deuxièmement, nous avons étudié le rôle de NR4A3 lors d'une réponse immunitaire antitumorale au cours d'une thérapie cellulaire adoptive (ACT) sous traitement d'anti-PD-L1

(ligand d'un RI) où la meilleure fonctionnalité et persistance des LT CD8 NR4A3 déficients ont été mises à l'épreuve. Ainsi, l'ACT avec des LT CD8 NR4A3 déficients augmente la survie de souris porteuses de tumeurs et les lymphocytes T infiltrants les tumeurs (TIL) NR4A3 déficients sont moins finalement épuisés et présentent des plus fortes proportions et nombres cellulaires intra-tumoraux. Le profil transcriptomique au niveau de cellules uniques a révélé que les TIL NR4A3 déficients favorisent la génération de progéniteurs distincts et des populations fonctionnelles associées avec le traitement anti-PD-L1.

En conclusion, NR4A3 est un régulateur de la fonction et la différenciation des LT CD8 dont l'activité pourrait être modulée afin d'améliorer les stratégies de vaccination ou les thérapies cellulaires.

Mots-clés : Lymphocyte T CD8, NR4A3, différenciation cellulaire, cytokines, mémoire immunitaire, thérapie cellulaire adoptive, infection aiguë, réponse antitumorale.

Abstract

CD8 T cells are an immune cell population involved in the clearance of different types of infections and the elimination of tumor cells. The response capacity of CD8 T cells depends on their differentiation state. During an immune response, antigen-specific CD8 T cells are activated, differentiate and proliferate into effectors that participate in elimination of the pathogen. Among the pool effectors, there are short-lived effector cells (SLEC) that are terminally differentiated and die by apoptosis after the infection clearance, and the memory precursors effector cells (MPEC) that survive to give rise to memory CD8 T cells. However, during chronic infection or an anti-tumor immune response, antigen persistence and inflammation induce CD8 T cell exhaustion, which is a differentiation state characterized by decreased effector functions and proliferative capacity and an increased expression of inhibitory receptors (IR). Thus, to be able to increase the efficiency of CD8 T cells following vaccination, in the context of antitumoral or during treatment against chronic viral infections, it is important to better understand CD8 T cell differentiation.

We studied the role of NR4A3 in CD8 T cell differentiation in mice. NR4A3 is a nuclear receptor and transcription factor (TF), which expression is rapidly induced following antigenic stimulation, but the role of its induction in CD8 T cells was not yet identified. We propose that NR4A3 expression in CD8 T cells following antigenic stimulation controls their differentiation.

First, we studied the role of NR4A3 in CD8 T cell differentiation during acute infection and determined that its deletion increases MPEC differentiation, memory generation, and cytokines production. NR4A3 regulates CD8 T cell differentiation at the transcriptional level, and its deletion induces a memory-related transcriptional program early during the immune response (day three post-infection). Moreover, a few hours following the CD8 T cell activation, NR4A3 deletion increased chromatin accessibility, particularly to bZIP TF.

Secondly, we studied the role of NR4A3 during the antitumoral response in the context of adoptive cell therapy (ACT) and cotreatment with anti-PD-L1 (ligand of an IR), during which we tested the increased functionality and persistence of NR4A3 deficient cells. ACT with NR4A3-deficient cells increases the survival of tumor-bearing mice. In addition, NR4A3 deficiency increased the frequency of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and decreased T cell exhaustion.

Single-cell transcriptional profile of TILs revealed that NR4A3 deficiency induces the generation of a transcriptionally distinct progenitor population and an increase in functional populations associated with the anti-PD-L1 treatment.

To conclude, NR4A3 is a new regulator of CD8 T cell differentiation and function whose activity regulation could increase the efficiency of vaccinations and cell therapy treatments.

Keywords : CD8 T cell, NR4A3, cell differentiation, cytokines, immune memory, adoptive cell therapy, acute infection, antitumor response.

Table des matières

Résumé	3
Abstract	5
Table des matières	7
Liste des tableaux	12
Liste des figures	13
Liste des sigles et abréviations	14
Remerciements	29
Chapitre 1 – Introduction	32
1.1. Généralités	32
1.1.1. Généralités sur le système immunitaire	32
1.1.2. Généralités sur les lymphocytes T CD4 et CD8	33
1.2. Les lymphocytes T CD8	36
1.2.1. Le développement des lymphocytes T CD8 dans le thymus	38
1.2.2. L'homéostasie et l'activation des LT CD8 en périphérie	39
1.2.2.1. Homéostasie des LT CD8 naïfs	40
1.2.2.2. Maintien de la quiescence des LT CD8 naïfs	40
1.2.2.3. Activation des LT CD8 naïfs	41
1.2.2.3.1. Signal d'activation 1 – la stimulation TCR	42
1.2.2.3.2. Signal d'activation 2 – signal de co-stimulation	45
1.2.2.3.3. Signal d'activation 3 – signal provenant de cytokines	46
1.2.2.3.4. L'aide CD4 lors de l'activation des LT CD8	48
1.2.2.3.5. Différenciation effectrice précoce des LT CD8	49
1.2.3. Prolifération et adaptation métabolique des LT CD8	51
1.2.3.1. La première division des LT CD8	51
1.2.3.2. Adaptation métabolique	53
1.2.3.3. L'expansion clonale des LT CD8	54
1.2.4. Différenciation des LT CD8 effecteurs	54
1.2.4.1. Sous-populations d'effecteurs au pic de la réponse des LT CD8	54
1.2.4.2. Régulateurs transcriptionnels et facteurs de transcription régulant la différenciation des LT CD8 effecteurs	55
1.2.4.2.1. T-bet	55
1.2.4.2.2. Blimp-1	56
1.2.4.2.3. Zeb-2	56
1.2.4.2.4. ID2	56
1.2.4.2.5. NOTCH	56

1.2.4.2.6. IRF4.....	57
1.2.4.3. La migration des LT CD8 effecteurs	58
1.2.4.4. Fonctions effectrices des LT CD8.....	58
1.2.5. La contraction des LT CD8 effecteurs.....	61
1.2.6. La différenciation des LT CD8 mémoires	62
1.2.6.1. Les sous-types des LT CD8 mémoires.....	62
1.2.6.1.1. LT _{EM}	63
1.2.6.1.2. LT _{CM}	63
1.2.6.1.3. LT _{RM}	63
1.2.6.1.4. LT _{PM}	64
1.2.6.1.5. LT _{VM}	64
1.2.6.1.6. LLEC.....	64
1.2.6.2. Régulateurs transcriptionnels et facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des LT CD8 mémoires.....	65
1.2.6.2.1. Différenciation des LT _{EM}	65
1.2.6.2.2. Différenciation des LT _{CM}	65
1.2.6.2.3. Différenciation des LT _{RM}	66
1.2.6.3. Homéostasie et survie des LT CD8 mémoires.....	67
1.2.6.3.1. IL-7.....	68
1.2.6.3.2. IL-15.....	68
1.2.6.4. Réponse secondaire des LT CD8 mémoires	68
1.2.7. Différenciation des LT CD8 épuisés	70
1.2.7.1. Les récepteurs inhibiteurs	71
1.2.7.1.1. PD-1.....	71
1.2.7.1.2. Lag-3	71
1.2.7.1.3. Tim-3	72
1.2.7.1.4. CTLA-4	72
1.2.7.2. Sous-populations de LT CD8 épuisés.....	72
1.2.7.2.1. Les LT terminalement épuisés (LT _{TEX}).....	72
1.2.7.2.2. Les LT épuisés progéniteurs (LT _{PEX}).....	73
1.2.7.2.3. Les LT épuisés transitoires (LT _{EX-CX3CR1}).....	73
1.2.7.3. Cytokines impliquées lors d'une réponse immunitaire chronique.....	74
1.2.7.3.1. Interféron de type I.....	74
1.2.7.3.2. IL-10.....	75
1.2.7.3.3. IL-27.....	75
1.2.7.3.4. IL-21.....	75
1.2.7.4. Facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des LT CD8 épuisés	76
1.2.7.4.1. TCF-1	76
1.2.7.4.2. BACH2.....	77
1.2.7.4.3. Myb	77
1.2.7.4.4. AP-1.....	77
1.2.7.4.5. NFAT.....	78
1.2.7.4.6. IRF4.....	78
1.2.7.4.7. Eomes	78
1.2.7.4.8. Blimp-1.....	79
1.2.7.4.9. Tox.....	79

1.2.7.4.10. BATF	80
1.2.7.4.11. T-bet	80
1.2.7.5. Régulateurs épigénétiques impliqués dans la différenciation des LT CD8 épuisés	80
1.2.7.5.1. Ezh2	81
1.2.7.5.2. Suv39h1	81
1.2.7.5.3. Dnmt3a	81
1.2.7.6. Divergences des signatures transcriptionnelles et épigénétiques à partir des temps précoces lors de la réponse immunitaire chronique	81
1.2.7.7. L'aide CD4 lors d'une réponse immunitaire chronique	82
1.2.7.8. Particularités de la réponse antitumorale des LT CD8	83
1.2.7.8.1. Treg	83
1.2.7.8.2. MDSC	84
1.2.7.8.3. Cellules tumorales	84
1.2.7.9. Les immunothérapies visant les LT CD8 lors d'une réponse immune chronique	84
1.2.7.9.1. IL-2	84
1.2.7.9.2. Ac monoclonaux visant les RI ou leurs ligands lors d'une réponse antitumorale	85
Anti-CTLA-4	86
Anti-PD-L1	86
Anti-PD-1	87
1.2.7.9.3. Les thérapies antitumorales basées sur l'utilisation des LT	88
LT périphériques activés <i>in vitro</i>	88
LT tumoraux activés <i>in vitro</i>	88
CAR-T	88
1.2.7.10. Revitalisation des LT _{EX}	90
1.3. Le récepteur nucléaire NR4A3	92
1.3.1. Les récepteurs nucléaires	92
1.3.1.1. Généralités	92
1.3.1.2. Classification des récepteurs nucléaires	93
1.3.1.3. Structure des récepteurs nucléaires	95
1.3.1.4. Modes d'activation des récepteurs nucléaires	96
1.3.1.5. Ligands des récepteurs nucléaires	98
1.3.1.6. Rôles des récepteurs nucléaires	98
1.3.2. Les récepteurs nucléaires orphelins	100
1.3.3. La famille des récepteurs nucléaires orphelins NR4A	100
1.3.3.1. Motifs de liaison à l'ADN	100
1.3.3.2. Induction de l'expression des NR4A	100
1.3.3.3. Ligands des NR4A	101
1.3.4. Rôle des NR4A dans d'autres types cellulaires	102
1.3.4.1. Lymphocytes T CD4	102
1.3.4.2. Lymphocytes B	104
1.3.5. La régulation des Treg et de la différenciation thymique par les NR4A	105
1.3.6. Les récepteurs nucléaires orphelins NR4A dans les LT CD8	107
1.3.6.1. Cinétique d'expression des <i>Nr4a</i>	107

1.3.6.2. Induction de l'expression des NR4A	108
1.3.6.3. Induction rapide des <i>Nr4a</i> dans les LT CD8 lors d'une réponse immunitaire aiguë	109
1.3.6.4. Les NR4A dans la différenciation des LT CD8 lors d'une réponse immunitaire aiguë	109
1.3.6.5. Les NR4A dans la différenciation des LT CD8 mémoires	110
1.3.6.6. Rôle des membres de la famille NR4A dans la régulation des LT CD8 lors d'une réponse immunitaire chronique.....	112
1.3.6.7. Mode de fonctionnement des membres de la famille NR4A dans les LT CD8	115
1.3.7. NR4A3 chez l'humain	116
Chapitre 2 – Raisonnement et hypothèse	118
Chapitre 3 – Résultats	121
Article 1: Early programming of CD8+ T cell response by the orphan nuclear receptor NR4A3	121
Abstract.....	123
Introduction.....	124
Results.....	126
Discussion.....	132
Materials and methods	136
References and notes	146
Supplementary material	163
Article 2: NR4A3 deficiency in CD8+ T cells improves adoptive T cell therapy of cancer	182
Abstract.....	184
Introduction.....	185
Results.....	187
Discussion.....	200
Materials and methods	203
Supplementary material	209
References.....	211
Supplementary material	226
Chapitre 4 – Discussion.....	237
4.1. NR4A3 est un régulateur précoce de la différenciation des LT CD8 lors d'une réponse immunitaire aiguë.....	237
4.1.1. NR4A3 régule le choix de différenciation SLEC/MPEC des LT CD8	237
4.1.2. NR4A3 régule la fonction des LT CD8	246
4.1.3. NR4A3 régule la différenciation mémoire des LT CD8.....	248
4.1.4. Pertinence du modèle d'étude.....	253
4.1.5. Limites dans notre étude	254
4.1.6. Modèle d'action de NR4A3 dans les LT CD8 lors d'une réponse immunitaire aiguë	257
4.1.7. Perspectives	259

4.2 Les LT CD8 NR4A3-déficients améliorent la thérapie cellulaire adoptive du cancer	261
4.2.1. La déficience des LT CD8 en NR4A3 augmente le contrôle tumoral.....	262
4.2.2. Pertinence du modèle d'étude.....	274
4.2.3. Limites de notre modèle	275
4.2.4. Modèle d'action de NR4A3 dans les LT CD8 lors d'une réponse antitumorale	279
4.2.5. Perspectives	281
Chapitre 5 – Conclusion	284
Références bibliographiques	286
Annexes	367
Annexe 1 : Role of the Orphan Nuclear Receptor NR4A Family in T-Cell Biology.	367
Annexe 2 : Expression précoce de CD71 et de CD98 par les LT CD8 <i>Nr4a3</i> ^{-/-} lors d'une infection Lm-OVA	368
Annexe 3 : Les lymphocytes T infiltrant les tumeurs <i>Nr4a3</i> ^{+/+} et <i>Nr4a3</i> ^{-/-} produisent le même niveau d'IFN- γ , d'IL-2 et de TNF- α	369
Annexe 4 : Les lymphocytes T infiltrant les tumeurs <i>Nr4a3</i> ^{+/+} et <i>Nr4a3</i> ^{-/-} expriment des niveaux similaires de PD-L1	370

Liste des tableaux

Tableau 1. –	Récepteurs nucléaires.....	93
---------------------	----------------------------	----

Liste des figures

Figure 1. – Réponse des LT CD8 lors d’une infection aiguë ou chronique.....	37
Figure 2. – Signaux d’activation d’un LT CD8 naïf.	42
Figure 3. – Signalisation du TCR suite à une stimulation antigénique.....	44
Figure 4. – Représentation schématique de la structure d’un RN et de ses domaines moléculaires sous forme linéaire et repliée.	96
Figure 5. – Modes de régulation des RN par le ligand.....	97
Figure 6. – Régulation de la différenciation des LT CD8 par les NR4A lors d’une réponse immunitaire aiguë.....	112
Figure 7. – Rôle des membres de la famille NR4A lors de l’épuisement des LT CD8.	115
Figure 8. – Schéma de la régulation de la différenciation des LT CD8 par NR4A3 lors d’une réponse immunitaire aiguë.	258
Figure 9. – Schéma de la régulation de la différenciation des LT CD8 par NR4A3 lors d’une réponse antitumorale.	280

Liste des sigles et abréviations

2B4 : *Natural Killer Cell Receptor 2B4* (CD244)

4-1BB : *tumor necrosis factor receptor superfamily 9* (CD137)

41T : adénocarcinome 41T

Ac : anticorps

ACT : *adoptive cell therapy*

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique codant

AF-1 : domaine d'activation 1

AF-2 : domaine d'activation 2

Ag : antigène

AIRE : *autoimmune regulator*

AKT : protéine kinase B

ALL : leucémie lymphoblastique aiguë

ALR : *Absent in melanoma 2 (AIM2)-like receptor*

AMP : adénosine monophosphate

AP-1 : *activator protein 1*

Apaf-1 : *Apoptotic protease activating factor-1*

AQP9 : aquaporine 9

AR : *androgen receptor*

Arm : *Armstrong*

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATAC-seq: *Assay for Transposase-Accessible Chromatin and sequencing*

ATG5 : *autophagy related 5 protein*

ATG7 : *autophagy related 7 protein*

ATP : *adénosine triphosphate*

B16 : *B16 melanoma cell line*

B16-hCD19 : *B16 melanoma cell line expressing CD19*

B16-OVA : *B16 melanoma cell line expressing OVA*

B16-OVA-hCD19 : *B16 melanoma cell line expressing OVA and human CD19*

BACH2 : *BTB cnd CNC homolog 2*

BAK : *Bcl-2 Homologous antagonist killer*

Bat3 : *human leukocyte antigen B-associated transcript 3*

BATF: *basic leucine zipper transcription factor*

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

BAX: *Bcl2 associated X protein*

Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*

Bcl6: *B-cell lymphoma 6*

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

BCR: *B cell receptor*

BH3 : *BCL2 Homology domain 3*

Bhlhe40 : *basic-helix-loop-helix (BHLH) protein E40*

BID : *BH3 Interacting Domain Death Agonist*

Bim: *Bcl2-like protein 11*

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

Bmal1 : *brain and muscle Arnt-like protein-1*

BTLA : *B and T lymphocyte attenuator*

bZIP : *Basic leucine-zipper*

C : *cluster*

CA-RIT-NFAT1 : forme mutée de NFAT incapable d'interagir avec l'AP-1

CAR : récepteur antigénique chimérique

CAR-T : cellule T portant un récepteur antigénique chimérique

CCL : *C-C chemokine ligand*

CCR : *C-C chemokine receptor*

CD : cluster de différenciation

CD40L : ligand du CD40

CEACAM1 : *carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1*

ChIP : *chromatin immunoprecipitation*

ChIP-qPCR : *chromatin immunoprecipitation and qPCR*

ChIP-seq : *chromatin immunoprecipitation and sequencing*

Cl13 : *clone 13*

CLOCK : *Circadian Locomotor Output Cycles Protein Kaput*

CLR : *C-type lectin receptor*

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CoREST : *co-repressor of repressor element 1 silencing transcription factor*

CPA : cellule présentatrice d'antigènes

CPT1a : carnitine palmitoyl transférase

CTCF : *CCCTC-binding factor*

CTLA-4 : *cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4*

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

CXCR : *C-X-C chemokine receptor*

CXCL12 : *CXC motif chemokine ligand 12*

DAG : diacylglycerol

DAMP : *Damage Associated Molecular Pattern*

DAR : *differentially accessible chromatin regions*

DBD : domaine de liaison à l'ADN (*DNA binding domain*)

DC : cellule dendritique

DFF45 : *DNA fragmentation factor 45 kDa subunit*

DLL-4 : *Delta Like Canonical Notch Ligand 4*

DN : thymocyte double négatif (CD4⁻ CD8⁻)

DNase : désoxyribonucléase

DNA-PK : *DNA-dependent protein kinase*

DNMT3a : *DNA methyltransferase 3a*

DP : thymocyte double positif (CD4⁺ CD8⁺)

DPEC : *double positive effector cells*

EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale

EAR2 : récepteur nucléaire NR2F6

EEC : *early effector cell*

EG7 : cellules de lymphome de souris EG7

Egr2 : *early growth response protein 2*

Eomes : *Eomesodermin*

ER : *estrogen receptor*

ERK : *extracellular signal-regulated kinase*

ERR : *estrogen-related receptor*

ESW : chondrosarcome myxoïde extrasquelettique

ETP : *early thymic progenitor*

Ezh2 : *Enhancer of zeste homolog 2*

FAO : oxydation des acides gras

FasL : *Fas ligand*

FC : *fold change*

FGL-1 : *fibrinogen-like protein 1*

FLAG : séquence d'acides aminés DYKDDDDK

FOXO1 : *forkhead box 1*

FoxP3 : *forkhead box P3*

FT : facteur de transcription

FTY-720 : 2-Amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl]propane-1,3-diol hydrochloride

Fyn : *Src family tyrosine-protein kinase*

Fzf2 : *FEZ family zinc finger 2*

GADS: *GRB2-related adaptor protein 2*

Gal-3: galectine 3

GATA-3 : *GATA-binding protein 3 to DNA sequence [A/T]GATA[A/G]*

GCNF : *germ cell nuclear factor*

GFP : *green fluorescent protein*

GL: ganglion lymphatique

gp130 : *glycoprotein 130*

GR : récepteur aux glucocorticoïdes

GRB2: *growth factor receptor-bound protein 2*

GSEA : *gene set enrichment analysis*

Gzmb : granzyme b

H3K9 : lysine 9 de l'histone 3

H3K27 : lysine 27 de l'histone 3

HA : séquence d'acides aminés YPYDVPDYA

Hobit : *homolog of bimp-1 in T Cells*

HNF4α : *hepatocyte nuclear factor 4 alpha*

HSP : *heat shock protein*

HVEM : *herpesvirus entry mediator*

ICAD : *Inhibitor of Caspase-activated DNase*

ICAM : *intercellular adhesion molecule*

ICB : *immune checkpoint blockade*

ICOS : *inducible T-cell costimulator*

ID2 : *inhibitor of DNA binding 2*

ID3 : *inhibitor of DNA binding 3*

IDO : indoleamine-2,3-dioxygénase

IFN : interféron

IFN-γ : interféron gamma

IFNAR1: *interferon alpha receptor 1*

IFNAR2: *interferon alpha receptor 2*

IFN γ R1 : *interferon gamma receptor 1*

IFN γ R2 : *interferon gamma receptor 2*

IL : *interleukine*

IL-2R α : *interleukin 2 receptor alpha (CD25)*

IL-2R β : *interleukin 2 receptor beta (CD122)*

IL-10R : *interleukin 10 receptor*

IL-12R α : *interleukin 12 receptor alpha*

IL-12R β : *interleukin 12 receptor beta*

IL-15R α : *interleukin 15 receptor alpha*

IL-23R : *interleukin 23 receptor*

IP3 : *inositol 1,4,5-trisphosphate*

IR : *inhibitory receptors*

IRF : *interferon regulator factor*

IRCM : *Institut de Recherches Cliniques de Montréal*

IRIC : *Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie*

ISO : *isotype*

ISG : *gènes de réponse à l'IFN*

ITAM: *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

ITK : *IL-2-inducible tyrosine kinase*

J : *jour*

JAK : *Janus-family tyrosine kinase*

JNK: *Jun N-terminal kinase*

Ki-67 : *Kiel clone 67*

KLF2 : *Krüppel-like Factor 2*

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

LAL : lipase lysosomale acide

Lag-3 : *lymphocyte-activation gene 3*

LAT: *linker for activation of T cells*

LB : lymphocyte B

LBD : *ligand binding domain*

Lck: *leukocyte C-terminal Src kinase*

LCMV : virus de la chorioméningite lymphocytaire

LEF1 : *lymphoid enhancer binding factor 1*

LFA1 : *lymphocyte function-associated antigen 1*

LLEC : *long lived effector cells*

Lm: *Listeria monocytogenes*

Lm-OVA: *Listeria monocytogenes* expressing OVA

Lm-V4-OVA : *Listeria monocytogenes* expressing V4 (SIIVFEKL)

LRH-1 : *liver receptor homolog-1*

LSEctine : *liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin*

LT : lymphocyte T

LT $\gamma\delta$: lymphocyte gamma-delta

LTE : lymphocyte T effecteur

LT_{CM} : lymphocyte T central mémoire

LT_{EM} : lymphocyte T effecteur mémoire

LT_{EX} : lymphocyte T épuisé

LT_{EX-CX3CR1} : lymphocyte T épuisé transitoire CX3CR1

LT_{PEX} : lymphocyte T précurseur épuisé

LT_{PM} : lymphocyte T périphérique mémoire

LT_{RM} : lymphocyte T résident mémoire

LT_{T-EM} : lymphocyte T effecteur mémoire terminal

LT_{TEX} : lymphocyte T terminalement épuisé

LT_{VM} : lymphocyte T virtuel mémoire

LTM : lymphocyte T mémoire

LXR : *liver x receptor*

Ly6C : *lymphocyte antigen 6 complex*

MAPK : *mitogen activated protein kinase*

Mcl-1 : *myeloid cell leukemia-1*

MDSC : cellules suppressives dérivées de cellules myéloïdes

Mgat5 : alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase

miR-155 : *microRNA 155*

miR-200 : *microRNA 200*

MPEC: *memory precursor effector cell*

MR : récepteur aux minéralocorticoïdes

mTEC : cellule épithéliale thymiques médullaire

mTOR: *mammalian target of rapamycin*

Myc : *myelocytomatosis oncogene cellular homolog*

Myb : *myeloblastosis virus oncogene cellular homolog*

MC38-hCD19 : carcinome colorectal murin qui exprime CD19 humain

NBRE : *NGFI-B response element (5'- AAAAGGTCA-3')*

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

NFAT : *nuclear factor of activated-T cell*

NICD: *NOTCH intracellular domain*

NK : *natural killer cells*

NKT : *natural T killer cells*

NLR : *Nod-like receptors*

NLRP3 : *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*

Nor-1 : *neuron-derived orphan receptor-1*

NOTCH : *neurogenic locus notch homolog protein*

NR4A1 : *nuclear receptor subfamily 4 group A member 1*

NR4A2 : *nuclear receptor subfamily 4 group A member 2*

NR4A3 : *nuclear receptor subfamily 4 group A member 3*

NR-X-Y-Z : *nuclear receptor subfamily X group Y member Z*

Nur77 : *neuron-derived clone 77*

Nurr1 : *nuclear receptor-related factor 1*

NurRE : *Nur-responsive element ('5-TGATATTTX₆AAATGCCCA-3')*

NSCLC : *non-small cell lung cancer*

OT-I : TCR transgénique spécifique au peptide OVA présenté par CMH I (H-2K^b)

OVA: peptide de l'ovalbumine (SIINFEKL)

P : valeur de probabilité

p-S6 : *ribosomal protein S6*

P14 : TCR transgénique spécifique au peptide gp33 présenté par CMH I (H-2D^b)

p38 : *p38 mitogen-activated protein kinase*

PAMP : *Pathogen Associated Molecular Patterns*

PD-1 : *programmed cell death 1*

PD-L1 : *programmed cell death 1 ligand*

PD-L2 : *programmed cell death 2 ligand*

PDK1 : *phosphoinositide-dependent kinase 1*

PGA1 : prostaglandine A1

PGA2 : prostaglandine A2

PGC-1a : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha*

PGE1 : prostaglandine E1

PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PIP3 : phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PKC θ : *protein kinase C θ*

PKC ζ : *protein kinase C atypique ζ*

PKC λ/ι : *protein kinase C atypique λ/ι*

PLC γ 1 : phospholipase C γ 1

PMA : *phorbol-12-myristate-13-acetate*

pMIG : *modified pMSCV (murine stem cell virus) plasmid*

PPAR : *peroxisome proliferator-activated receptor*

PR : *progesteron receptor*

PRDM1 : *PR domain zinc finger protein 1*

PRR : recepteurs associés à la reconnaissance des motifs moléculaires

PSGL-1 : *P-selectin glycoprotein ligand-1*

qPCR : *quantitative polymerase chain reaction*

RAC : *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*

RAG: *Recombination-activating gene*

RAR : *retinoic acid receptor*

RAS : *rat sarcoma*

RASGRP1 : *RAS guanyl-releasing protein 1*

RBPJ : *recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region*

Rel : *reticuloendotheliosis oncogene cellular homolog*

Rev-erb : *nuclear heme receptor reverse erythroblastosis virus*

RHO : *Ras homolog*

RI : récepteurs inhibiteurs

RLR : *RIG-I-like receptor*

RMN : résonance magnétique nucléaires

RN : récepteur nucléaire

RNA-seq : séquençage d'ARN

ROS : espèces réactives d'oxygène

ROR : *RAR-related orphan receptors*

ROR γ t : *RAR-related orphan receptor gamma*

Runx3 : *RUNX family transcription factor 3*

RXR : *retinoid X receptor*

S1P : *sphingosine-1-phosphate*

S1PR1 : *sphingosine-1-phosphate receptor 1*

SARS-CoV-2 : *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

SATB1 : *special AT-rich sequence-binding protein-1*

scFv : *single chain variable fragments*

scRNA-seq : *single cell ribonucleic acid sequencing*

SF-1 : *steroidogenic factor 1*

SHP2 : *SH2 containing protein tyrosine phosphatase-2*

shRNA : *short hairpin ribonucleic acid*

SI : *système immunitaire*

siRNA : *small interfering RNA*

SLAMF-6 : *signaling lymphocyte activation molecule 6*

SLEC : *short lived effector cell*

SLP76: *SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa*

SM1 : *lignée cellulaire cancéreuse murine SM1*

SMAC : *supramolecular activation complex*

SOCS : *suppressor of cytokine signaling proteins*

SOS1: *son of sevenless homologue 1*

SP : : *thymocyte simple positif*

SP4 : *thymocyte simple positif pour l'expression de CD4*

SP8 : *thymocyte simple positif pour l'expression de CD8*

STAT : *signal transducer and activator of transcription*

Suv39h1 : *suppressor of variegation 3-9 homolog 1*

SV40 Ag: *Simian Virus 40 (SV40) Large Tumor Antigen*

T-bet : *T-box 21*

TA : transfert adoptif

Tc1 : lymphocyte T cytotoxique de type 1

Tc2 : lymphocyte T cytotoxique de type 2

Tc9 : lymphocyte T cytotoxique de type 9

Tc17 : lymphocyte T cytotoxique de type 17

TCF-1 : *T cell factor 1*

TCR : *T cell receptor*

Tcreg : lymphocyte T cytotoxique régulateur

TEC : cellule thymique épithéliale

TET : *ten eleven translocation*

TF : *transcription factor*

Tfh : *follicular helper T*

TGF- β : *transforming growth factor beta*

Th1 : *T helper 1*

Th2 : *T helper 2*

Th17 : *T helper 17*

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

TIL : *tumor infiltrating lymphocyte*

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

TKO : *triple knock-out (Nr4a1^{-/-}, Nr4a2^{-/-}, Nr4a3^{-/-})*

TLR : *Toll-like receptors*

TNF- α : *tumor necrosis factor alpha*

Tocky : protéine fluorescente

Tox : *thymocyte selection-associated HMG BOX*

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

Treg : LT CD4 régulateurs

UMAP : *Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction*

VAV1 : *vav guanine nucleotide exchange factor 1*

VCAM : *vascular cell adhesion molecule*

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VISTA : *V-domain Ig suppressor of T cell activation*

VLA : *very late antigen*

WSX1 : *interleukin 27 receptor subunit alpha*

x : facteur de multiplication

XCR1 : *X-C Motif Chemokine Receptor 1*

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

Zeb : *zinc finger E-box binding homeobox*

Remerciements

Merci à Dre Nathalie Labrecque pour tout.

Pour son énergie qu'elle a mise en moi en tant qu'étudiante, sa rigueur scientifique qu'elle nous a toujours enseignée et son temps qu'elle a investi en moi, malgré les hauts et les bas que j'ai eus tout au long de mon parcours. Merci pour son savoir, son exigence et les encouragements qui m'ont motivée à continuer mon parcours.

Merci à tous les organismes de subvention qui ont soutenu mon parcours étudiant.

Un grand merci aux Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS) qui m'ont octroyé des bourses d'études de maîtrise et de doctorat ainsi qu'à la Fondation Cole qui m'a soutenue dans les dernières années de doctorat.

Merci à tous les membres de laboratoire de Dre Nathalie Labrecque (présents et anciens).

Merci à Salix Boulet, sous l'égide de qui j'ai commencé mes premiers pas dans ce laboratoire en tant que stagiaire. Merci pour son exemple d'organisation et de savoir-faire dans le laboratoire qu'il a toujours été prêt à partager avec les étudiants. Merci pour son raisonnement scientifique et les discussions enrichissantes qui m'ont aidée à regarder plus loin. Merci pour son esprit de curiosité positive.

Merci à Jean-François Daudelin d'avoir été toujours là et de m'aider dans mes expériences lorsque j'en avais besoin, même si parfois la question « est-ce que tu es sûre ? » suivie de « est-ce que tu es vraiment sûre ? » me donnait des frissons froids.

Merci à Dave De Sousa pour son optimisme, son énergie de vie et son aide dans mes expériences lorsque j'en avais besoin.

Merci à Sarah Mezrag et Laure Le Corre pour leurs discussions, leurs rires et leur vision positive de la vie. Merci à Lorne et Moustafa.

Merci à Mélissa, Fréd et Cindy qui ont longtemps été l'exemple d'étudiants gradués dans le laboratoire et qui m'ont appris beaucoup de savoir-faire de laboratoire de recherche. Merci aux anciens étudiant du laboratoire, Chloé, Marion, Myriam, qui ont enrichi notre vie de laboratoire et avec qui on a partagé des bons moments. Merci à Sandrine qui a choisi d'étudier le rôle de NR4A3 dans les LT CD8 pendant son stage d'été et qui m'a aidée dans certaines expériences.

Merci à la communauté scientifique du CRHMR qui était là pendant mes présentations orales et par affiche et qui m'a permis d'enrichir ma culture générale dans d'autres domaines. Merci à Martine Dupuis qui a passé plusieurs heures de tri avec moi et à Julie Dubeau qui a toujours pris soin de mes souris d'expérience. Merci au laboratoire de Dre Sylvie Lesage dont j'ai appris beaucoup.

Merci aux responsables de la plateforme génomique de l'IRCM (Odyle Neyret et Sarah Boissel) qui m'ont soutenue dans mes démarches afin d'effectuer les expériences d'ATAC-seq et de scRNA-seq.

Merci aux bioinformaticiens (Patrick Gendron, Virginie Calderon et Caroline Grou) qui nous ont aidés et guidés dans les analyses de nos données de séquençage.

Merci à mes anciens superviseurs de stage qui ont participé à ma formation de laboratoire et recherche. Merci à Paul Heron (laboratoire de Dr Jurgen Sygusch) qui m'a guidée lors de mes premiers pas dans un laboratoire de recherche en biochimie où j'ai appris l'amour pour les enzymes et les cristaux protéiques. Merci à Emma van der Westhuizen (laboratoire de Dr Michel Bouvier) qui m'a appris l'amour pour la signalisation et la culture cellulaire.

Merci aux membres de mon comité de suivi et du comité de thèse, à Dr Etienne Gagnon, à Dr Martin Richer et à Dre Nathalie Arbour, qui ont dédié leur temps au suivi de mon parcours et à l'évaluation de mon travail

Un énorme merci à ma famille sans qui je ne pourrais même pas m'imaginer !

Merci à mes parents Maxim et Tatiana qui m'ont encouragée à poursuivre mes projets de vie, malgré le fait que cela m'a éloigné d'eux, et m'ont soutenu dans toutes mes décisions.

Merci à ma sœur Laura et à mon beau-frère Michael qui m'ont accueillie et guidée au Canada ainsi que soutenue dans mes études.

Merci à mes neveux Marc-Antoine, Maxim et Alexandre dont l'esprit jeune et curieux m'encourage à regarder toujours vers l'avenir.

Chapitre 1 – Introduction

1.1. Généralités

1.1.1. Généralités sur le système immunitaire

L'organisme humain possède différents niveaux de protection envers les agressions extérieures. En premier lieu, il y a les différents types de barrières (physiques, chimiques et biologiques) qui empêchent les pathogènes de pénétrer à l'intérieur de l'organisme. En deuxième lieu, il y a le système immunitaire (SI) qui assure l'élimination du pathogène invasif une fois que celui-ci a pénétré l'organisme.

Le SI est composé de différents types de cellules qui circulent ou ont établi leur résidence dans des organes lymphoïdes ou non lymphoïdes, afin de constamment détecter la présence de particules étrangères, d'empêcher les invasions des pathogènes ou des cellules du soi modifiées (cellules tumorales), ainsi que de détecter les signaux de danger. Nous pouvons distinguer deux catégories de cellules du SI, soit les cellules du SI inné et les cellules du SI adaptatif. Parmi les cellules du SI inné, il y a les cellules granulocytaires (les neutrophiles, les basophiles, les éosinophiles), les mastocytes, les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques (DC), ainsi que les cellules cytotoxiques naturelles (NK). Parmi les cellules du SI adaptatif, on retrouve les lymphocytes T (LT) CD4 et CD8, les lymphocytes B (LB), les cellules NK de type T (NKT), ainsi que les LT gamma-delta (LT $\gamma\delta$). Une des capacités essentielles du SI est celle de reconnaissance des perturbations de l'organisme, définie par la capacité de distinction des motifs moléculaires (PRR) associés avec les pathogènes ou le danger, ce qui permet d'initier une réponse immunitaire¹. Par exemple, lorsqu'un microorganisme pénètre le corps, celui-ci est rapidement reconnu par les cellules immunitaires via les PRR^{2,3}, soit via les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) ou via les motifs associés aux signaux de danger (DAMP⁴⁻⁶) qui sont exposés à cause des dommages induits par le microorganisme invasif. Cette reconnaissance permet d'induire l'activation de la cellule immunitaire ayant reconnu le PRR et la production et sécrétion de cytokines et de chimiokines inflammatoires qui vont induire le recrutement d'autres cellules immunitaires (les neutrophiles, les monocytes, les macrophages, les DC) au site de la

reconnaissance des PAMP ou des DAMP. Il existe différents types de PRR, notamment les récepteurs de type Toll-like (TLR), les récepteurs de liaison nucléotidique et d'oligomérisation de type NOD (NLR), les récepteurs RIG I (RLR), les récepteurs de type lectine C (CLR), les récepteurs absents en melanome-2 (ALR)^{3,7,8}. Tout dépendamment du PRR reconnu par la cellule immunitaire, il y aura l'activation de différentes voies de signalisation qui vont favoriser la production de cytokines inflammatoires qui, à leur tour, vont soutenir et coordonner la réponse immunitaire via le recrutement continu des cellules du SI qui vont prendre en charge l'élimination de l'agent pathogène^{9,10}. Lorsque l'infection n'est pas rapidement éliminée par le SI inné, il y a l'activation de l'immunité adaptative dont les cellules (LT et LB) vont participer à l'élimination spécifique de l'agent infectieux ainsi que l'amplification de la réponse immunitaire et la génération de la mémoire immunologique envers le pathogène. Si l'agent infectieux persiste, cela cause une infection chronique. Dans certains cas, l'activation du SI inné ou du SI adaptatif peut être induite dans un contexte non pathogénique, ce qui cause des maladies autoinflammatoires ou auto-immunes, ou dans un contexte tumoral. Dans ce cas, l'activation accrue du SI inné via la reconnaissance des DAMP mène à l'inflammation stérile et parfois aux maladies autoinflammatoires, alors que l'activation du SI adaptatif par des Ag non présentés lors de la sélection thymique aux LT ou de la maturation des LB dans la moelle osseuse mène à l'apparition des maladies autoimmunes. Ainsi, la reconnaissance du soi ou du non-soi par le SI est possible grâce aux récepteurs PAMP des cellules du SI inné et aux récepteurs des LT et des LB qui reconnaissent des Ag pathogéniques et qui, ensemble, maintiennent l'immunité de l'organisme tout en conservant la tolérance centrale et périphérique envers le soi¹¹⁻¹⁴.

1.1.2. Généralités sur les lymphocytes T CD4 et CD8

Les LT CD4 et les LT CD8 sont des cellules du SI adaptatif qui participent à l'élimination des infections et des cellules tumorales. Le rôle principal des LT CD8 est de reconnaître et d'éliminer, par une activité cytotoxique directe, les cellules infectées de l'organisme ainsi que les cellules tumorales, tout en activant les autres cellules du SI via la production de cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-2, etc.). Le rôle principal des LT CD4 est de coordonner la réponse immunitaire grâce à l'activité «d'aide CD4»¹⁵. La capacité de reconnaissance des cellules infectées ou des cellules tumorales est basée sur la propriété des LT de reconnaître, via leur récepteur de cellules T (TCR), des antigènes

(Ag) présentés dans le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) par la cellule présentatrice d'Ag (CPA). Cette reconnaissance antigénique est nécessaire afin qu'un LT soit activé, ce qui lui permet de se différencier en cellule effectrice.

La population des LT (CD4 et CD8), est constituée de multiples clones générés dans le thymus. Ces clones se distinguent par la spécificité de leur TCR¹⁶ qui peut aussi avoir une capacité de réactivité croisée, soit la propriété de reconnaissance de plus d'un Ag¹⁷. Lors de leur développement thymique, les LT sont premièrement sélectionnés positivement afin qu'ils puissent reconnaître des Ag présentés par le CMH. Ainsi, les LT CD8 sont restreints à la reconnaissance de leur Ag spécifique lié au CMH I alors que les LT CD4 sont restreints à la reconnaissance de leur Ag spécifique lié au CMH II, et cette propriété de restriction aux CMH distingue les LT des LB qui peuvent reconnaître des Ag solubles. Par exemple, les LT CD8 reconnaissent leur Ag spécifique présenté par le CMH I lors d'une présentation antigénique directe (Ag intracellulaires) ou lors d'une présentation antigénique croisée (Ag extracellulaires présentés par des DC spécialisées, XCR1⁺). Après la sélection positive des LT a lieu leur sélection négative, ce qui permet d'éliminer la majorité des LT auto-réactifs¹⁶. Une fois le développement thymique passé, les LT sortent du thymus et se retrouvent dans la circulation sanguine, soit la périphérie, où ils circulent dans les vaisseaux sanguins et les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques (GL)) à la recherche de leur Ag spécifique présenté par une CPA¹⁸. Il faut noter que, parfois, l'éducation thymique des LT échoue et certains clones de LT auto-réactifs s'échappent dans la périphérie, ce qui peut causer des maladies auto-immunes si ces clones ne sont pas inactivés par des mécanismes de tolérisation périphérique (anergie, Treg).

Tout dépendamment du type d'infection et de cytokines produites par le SI, la différenciation des LT CD4 activés peut être polarisée en LT CD4 Th1, Th2, Th9, Th17, Tfh, Treg¹⁹. Ainsi, lors d'une infection virale et suite à l'exposition du LT CD4 à l'IFN- γ et à l'IL-12 (activation de STAT-4 et de T-bet), celui-ci se différencie en Th1 afin de produire de l'IFN- γ et de soutenir l'immunité cytotoxique^{20,21}. Dans le cas des infections parasitaires ou des allergies, il y a la différenciation des LT CD4 en Th2 et en Th9. Ainsi, lorsque le LT CD4 est exposé à l'IL-4, ce signal active STAT-6 et GATA-3, ce qui favorise la différenciation des Th2, alors qu'IL-4 combiné à l'IL-1, l'IL-2 ou le TGF- β favorisent la différenciation des Th9 via l'activation d'IRF4 et de Pu.1^{22,23}. La polarisation du LT CD4 avec l'IL-6, l'IL-23 et le TGF- β mène à la différenciation des Th17, dépendants de

l'activité transcriptionnelle de STAT3 et de ROR γ t, ce qui permet la production d'IL-17 et d'IL-22²⁴⁻²⁶. Les Th17 participent aux réponses immunitaires envers des pathogènes extracellulaires ainsi qu'aux réactions inflammatoires^{27,28}. L'exposition des LT CD4 à du TGF- β active STAT5 et FoxP3, ce qui mène à la génération des Treg et à la production d'IL-10 et de TGF- β afin de diminuer l'activation immunitaire^{29,30}. La présence d'IL-6 et d'IL-21 dans le milieu inflammatoire active STAT3 et Bcl-6, qui induisent la différenciation des Tfh³¹⁻³³, importants à l'immunité humorale et à l'aide aux cellules B folliculaire.

Tout comme les LT CD4, les LT CD8 peuvent être divisés en plusieurs populations effectrices en fonction de leur capacité de production de cytokines (Tc1, Tc2, Tc9, Tc17, Tcreg)³⁴. Notamment, il existe les LT CD8 effecteurs cytotoxiques (Tc1), dont la différenciation est dépendante de T-bet, ID-2, Blimp-1 et IRF4^{35,36}. Les Tc1 sont induits en présence d'IL-12 et d'IL-2, et ces LTE se caractérisent par leur production d'IFN- γ . Les LT CD8 Tc1 sont importants lors des réponses immunitaires contre les infection virales, bactériennes et lors des réponses anti-tumorales³⁶. La culture des LT CD8 en présence d'IL-4 mène à la polarisation des LT CD8 en Tc2, caractérisés par l'activation de GATA-3 ainsi qu'une augmentation de la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13^{37,38}. Les Tc2 ont été caractérisés dans différents contextes pathologiques, notamment lors de l'arthrite rhumatoïde³⁹, du diabète⁴⁰ et de l'influenza⁴¹, où ces cellules se distinguent par une moindre activité cytotoxique lorsque comparé aux Tc1. Les cellules Tc9 ont été détectées dans l'épithélium des intestins et elles ont été caractérisées en tant que productrices d'IL-9 et d'IL-10. Les Tc9 peuvent être générées *in vitro* suite à une stimulation avec des DC CX3CR1⁺ qui provient des intestins, ainsi que lors d'une culture en présence d'IL-4 et de TGF- β ³⁴. D'ailleurs, les Tc9 ont été montrées efficaces lors d'une thérapie cellulaire de tumeurs B16⁴². Les Tc17 se distinguent par leur production d'IL-17 et d'IL-22 et par une activité augmentée de ROR γ t³⁴. Ces cellules peuvent être induites *in vitro* suite à une culture des LT CD8 avec le TGF- β et l'IL-6 ou l'IL-21, ainsi qu'une culture en présence d'IL-23³⁴. Les Tc17 participent aux réponses immunitaires antivirales, antibactériennes, antitumorales, ainsi qu'à l'induction de l'inflammation. Les Tcreg peuvent être induites *in vitro* par une culture supplémentée de TGF- β ⁴³. Les Tcreg ont été décrites dans le contexte de la maladie inflammatoire des intestins⁴⁴ et sont réputées pour diminuer la réponse immunitaire^{45,46}. Dans la section qui suit, je vais principalement présenter la littérature qui porte sur les LT CD8 cytotoxiques (Tc1).

1.2. Les lymphocytes T CD8

Lors d'une réponse immunitaire, par exemple lors d'une infection aiguë, le LT CD8 naïf est activé par une CPA via 3 signaux d'activation, soit la signalisation du TCR, la co-stimulation et l'inflammation, qui assurent l'activation complète des LT CD8 lors d'une réponse immunitaire où la co-stimulation est effectuée par une CPA dans un contexte inflammatoire et limite ainsi l'activation partielle et le potentiel autoréactif des LT CD8. Une fois activé, le LT CD8 prolifère et se différencie en même temps, afin de générer une population de LT CD8 effecteurs (LTE) qui participeront à l'élimination de l'agent infectieux via leur activité cytotoxique directe et par la production de cytokines.

La fréquence des LT CD8 naïfs qui sont spécifiques à un Ag d'un agent pathogène est très faible, c'est pourquoi l'expansion clonale des LT CD8 est importante et permet une amplification jusqu'à 50000 fois de la population des LT CD8 naïfs qui ont été activés afin de soutenir la réponse immunitaire⁴⁷ (Figure 1). Lorsque les LT CD8 prolifèrent, ils se différencient en même temps, ce qui permet la génération d'une population de LTE composée de différents sous-types cellulaires qui se distinguent par leur niveau de différenciation terminale et par leur capacité de survie à long terme. Après l'élimination de l'agent infectieux, la majorité des LTE terminalement différenciés meurent par apoptose lors de la phase de contraction de la réponse immunitaire, tandis que les LTE moins différenciés survivent et se différencient en LT mémoires (LTM) qui protègent l'organisme à long terme contre une réinfection.

Les LTM sont les lymphocytes spécifiques à un antigène donné qui ont été générés lors d'une réponse immunitaire, qui ont passé le stade d'activation et de différenciation effectrice et ont survécu la phase de contraction suite à l'élimination du pathogène. Il existe plusieurs types de LTM selon leur phénotype, fonction, capacités de prolifération, de circulation ou de résidence, ainsi qu'un profil transcriptionnel et épigénétique distinct⁴⁸. La diversité des LTM permet d'assurer une meilleure surveillance des pathogènes déjà rencontrés en fonction de sites infectés, tant dans la circulation sanguine que dans les tissus. Toutefois, dans certains cas, les LTM peuvent être activés en absence de la rencontre de leur Ag spécifique lors d'un fort état inflammatoire (en présence d'IFN-I, IL-18, IL-15)⁴⁹⁻⁵¹.

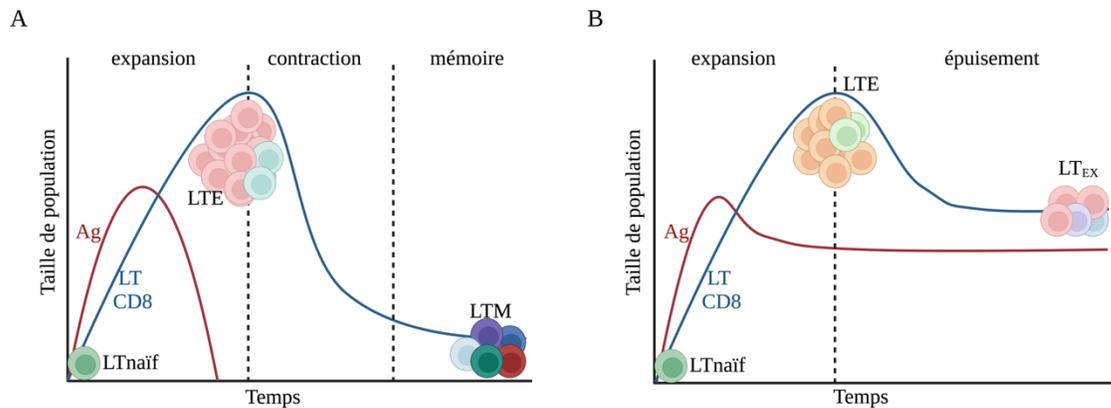


Figure 1. – Réponse des LT CD8 lors d'une infection aiguë ou chronique.

A. Lors d'une réponse immunitaire aiguë, l'activation d'un LT CD8 naïf par une CPA présentant son Ag spécifique au sein du CMH I mène à l'activation du LT, ce qui lui permet d'induire un programme de différenciation effecteur et d'expansion clonale. Suite à l'élimination de l'agent pathogène exprimant son Ag spécifique, la population de LTE subit une contraction et l'élimination de 90% de cellules terminalement différenciés. Une faible partie de LTE, soit les précurseurs de LTM, survivent et donnent naissance aux LTM afin de protéger l'organisme contre une réinfection. **B.** Lors d'une réponse immunitaire chronique, la différenciation des LT CD8 est biaisée et la persistance de l'Ag et du milieu inflammatoire force la différenciation de ces cellules en LT_{EX}. Figure créée avec BioRender.

Lors d'une infection chronique ou d'une réponse antitumorale, la différenciation des LT CD8 est biaisée (Figure 1). Ceci est dû à la persistance de l'antigène et de l'inflammation qui induisent l'épuisement des LT CD8, afin de limiter leur activité effectrice et de préserver l'homéostasie de l'organisme⁵²⁻⁵⁴. L'épuisement des LT CD8 est caractérisé par une augmentation de l'expression des récepteurs inhibiteurs (RI), une diminution de l'autorenouvellement, une diminution ou une perte de la capacité de prolifération lors d'une restimulation antigénique, ainsi qu'une diminution de la production de cytokines et des capacités cytotoxiques. Au sein de la population des LT CD8 épuisés (LT_{EX}), le niveau d'épuisement de ces cellules peut varier. Ainsi, on peut distinguer différentes sous-populations de LT_{EX} en fonction de l'expression de RI (PD-1, Lag-3, Tim-3, etc.), de FT (TCF-1, T-bet, Eomes, etc.), de marqueurs de différenciation et de

migration (CX3CR1, CD69, KLRG1, etc.), ainsi que leur capacité de produire des cytokines (IL-2, IFN- γ , TNF- α) et des granzymes^{54,55}.

L'arrivée de nouvelles technologies a permis de souligner que la différenciation des LT CD8 est dirigée par un programme très complexe qui affecte le transcriptome, le protéome, l'épigénome et le métabolome de ces cellules⁵⁶⁻⁶¹. La différenciation du LT CD8 est ainsi dirigée par un programme intrinsèque qui, avec les signaux de l'environnement (signaux extrinsèques), calibreront le devenir du LT CD8 en cellule effectrice, mémoire ou épuisée. Ainsi, un LT CD8 naïf est capable de générer une population monoclonale de LTE où l'on peut distinguer des effecteurs à demi-vie courte (SLEC) et des précurseurs de cellules mémoires (MPEC) lors d'une infection aiguë, ou dans le cas d'une infection chronique, des LT_{EX} à différents niveaux d'épuisement.

1.2.1. Le développement des lymphocytes T CD8 dans le thymus

Le développement des LT CD8 est un processus complexe qui a lieu dans le thymus⁶². Cette complexité est due à la génération d'une population de LT CD8 naïfs capables de reconnaître des Ag exogènes et du « soi modifié » tout en discriminant ces Ag de ceux du « soi » ou « soi normal ». Ce processus est possible grâce à l'éducation thymique qui permet la génération de LT CD8 ou de LT CD4 avec un TCR fonctionnel capable de lier le CMH I ou le CMH II respectivement, mais qui ne reconnaît pas les Ag du soi. L'éducation thymique est un processus de différenciation dirigé des LT auquel participent des cellules épithéliales du cortex et de la médulla, des macrophages et des DC, qui ensemble soutiennent l'éducation des LT non réactifs envers le « soi »⁶³.

La différenciation thymique des LT commence par l'entrée dans le thymus via la circulation sanguine d'un précurseur thymique provenant de la moelle osseuse⁶⁴. À son entrée dans le thymus, cette cellule va recevoir un signal de son récepteur NOTCH via la liaison de DLL-4 à partir de cellules thymiques épithéliales du cortex, ce qui engage la différenciation en cellules T⁶⁵. Au tout début de sa différenciation, cette cellule n'exprime pas les co-récepteurs CD4 ou CD8, d'où son nom de cellule double négative (DN). La DN subit ensuite plusieurs étapes de différenciation, durant lesquels il y a le réarrangement des segments des gènes δ , γ et β du TCR ce qui permet la génération ultérieure des cellules T exprimant un TCR $\alpha:\beta$ ou $\gamma:\delta$. Suite au réarrangement productif des segments géniques codant pour la chaîne β du TCR, il y a expression d'un pré-TCR (composé

de la chaîne β du TCR et de la chaîne pré-T α) à la surface de ces cellules. L'expression du pré-TCR permet aux DN d'arrêter le réarrangement des segments géniques codant pour la chaîne β du TCR et de subir une prolifération massive et l'acquisition de l'expression de co-récepteurs CD4 et CD8 afin de donner naissance aux cellules doubles positives ou DP (CD4⁺ CD8⁺). La cellule DP dans le cortex du thymus réarrange les segments géniques codants pour la chaîne α du TCR et, une fois que le TCR exprimant cette chaîne alpha est capable d'interagir avec le CMH, celui-ci donnera des signaux de survie, ce qui constitue le processus de sélection positive du LT et assure la restriction d'interaction du TCR avec le CMH. Les DP possédant un TCR incapable d'interagir avec le CMH subiront une mort par négligence via l'apoptose⁶⁶. Les DP perdront ensuite l'expression du CD4 ou du CD8 afin de générer des cellules simples positives CD8 (SP8) ou simples positives CD4 (SP4). Ces cellules SP4 et SP8 vont ensuite interagir avec les cellules médullaires épithéliales thymiques (mTEC), les DC médullaires et les DC de la jonction cortico-médullaire, qui expriment des Ag du soi, incluant les Ag spécifiques aux tissus dont l'expression dans le thymus est médiée par AIRE et Fzf2⁶⁷⁻⁶⁹. Cette interaction permettra d'éliminer par apoptose les SP4 et les SP8 qui interagissent trop fortement avec les CMH de ces cellules présentant des Ag du « soi », ce qui constitue la sélection négative des LT dans le thymus¹¹. Ainsi, la majorité des SP4 et des SP8 qui interagissent avec une affinité élevée ou intermédiaire sont éliminés par la sélection négative dans le thymus. Toutefois, malgré l'activité d'AIRE et de Fzf2⁶⁷⁻⁶⁹, tous les Ag de tissus ne sont présentés dans le thymus, ce qui cause la génération de certains LT ayant un potentiel autoréactif. De plus, le processus de sélection négative n'est pas parfait et certains clones de LT peuvent y échapper et sortir dans la circulation sanguine où leur activité doit être régulée par l'activité des Treg ou par des mécanismes d'anergie afin d'empêcher l'auto-immunité. Suite à l'éducation thymique via la sélection positive et négative, les SP8 et SP4 induisent l'expression de S1PR1 et de CD62L, ce qui leur permettent de sortir du thymus dans la circulation sanguine vers un plus fort gradient de S1P et de devenir des LT CD8 et LT CD4 naïfs de la périphérie⁷⁰⁻⁷³.

1.2.2. L'homéostasie et l'activation des LT CD8 en périphérie

L'état homéostatique est un état d'équilibre de l'organisme caractérisé par le maintien de l'intégrité de toutes ses structures et fonctions au cours de la vie. L'état homéostatique de différents types de cellules immunitaires est régulé par leur niche et par des signaux trophiques ou de survie

qui sont des facteurs limitants et qui permettent le maintien d'un nombre optimal de cellules immunitaires sans excéder les capacités de leur maintien par l'organisme.

En cas de perturbation de ce nombre de cellules, lors d'une lymphopénie par exemple, il y a induction d'une prolifération homéostatique des LT CD8 en absence d'Ag⁷⁴⁻⁷⁷, alors que dans le cas d'une réponse immunitaire, l'homéostasie de l'organisme est perturbée afin d'accommoder et d'assurer l'élimination de l'agent invasif détecté par le SI.

1.2.2.1. Homéostasie des LT CD8 naïfs

Suite à la différenciation thymique, les LT CD8 naïfs matures entrent dans la circulation sanguine où, en quête de leur Ag spécifique, ils recirculent entre le sang et les organes lymphoïdes secondaires. Les chimiokines CCL19 et CCL21 (lient le récepteur CCR7)^{78,79} ainsi que CXCL12 (lie CXCR4)⁸⁰⁻⁸³ guident la migration de ces cellules dans les organes lymphoïdes afin de favoriser leur interaction avec des CPA.

Dans le but de persister à long terme dans l'organisme, les LT CD8 naïfs ont besoin de recevoir des signaux de survie. Notamment, les LT CD8 ont besoin de recevoir un signal de survie donné par l'interaction du TCR avec le CMH I présentant un Ag du « soi », ce qui représente un signal TCR tonique ou « *tickling* »⁸⁴⁻⁸⁹, ainsi qu'un signal cytokinique donné par l'IL-7 qui permet de maintenir la survie et l'activité métabolique des LT⁹⁰⁻⁹⁶. Une autre cytokine qui peut exercer une influence sur les LT CD8 naïfs est l'IL-15, qui permet la survie de ces cellules via l'induction de l'expression de Bcl-2⁹⁷, tout comme l'IL-7, qui induit l'expression de Bcl-2 et de Mcl-1^{91,93,98,99}.

1.2.2.2. Maintien de la quiescence des LT CD8 naïfs

À l'état naïf, la quiescence des LT est maintenue grâce à des facteurs de transcription (FT) et des modifications de la chromatine qui maintiennent les LT CD8 inactifs^{100,101}. Ainsi, la quiescence des LT CD8 est maintenue par FOXO1, BACH2, TCF-1 et des marques répressives de la chromatine qui diminuent la transcription génique des gènes associés à l'activation et la différenciation effectrice des LT CD8¹⁰².

FOXO1 participe au maintien de la quiescence des LT CD8. À l'état naïf des LT CD8, FOXO1 est actif et se retrouve dans le noyau. Lors de l'activation du LT, FOXO1 est phosphorylé, ce qui l'exclut du noyau et empêche son activité transcriptionnelle. FOXO1 induit l'expression de *Klf2*, qui à son tour restreint l'activation des LT CD8 via une diminution de l'expression de c-Myc au niveau du transcrite et de la protéine¹⁰³. Aussi, FOXO1 participe à la régulation de l'expression de *Sell* et d'*Il7r*, soit des gènes codants pour CD62L et CD127 (récepteur à IL-7), importants pour la migration et la survie des LT CD8 naïfs¹⁰⁴. L'activité de FOXO1 mène à une plus forte expression de *Bach2* et de *Tcf7* et diminue celle de *Junb*, *Fos*, *Fosb*, l'ensemble de ces signaux diminuant l'activation globale des LT CD8¹⁰⁵ et les maintenant dans un état moins différencié.

BACH2 est un FT qui contribue au maintien de l'état naïf des LT CD8 en se liant aux motifs de liaison à l'ADN ciblés par AP-1, ce qui empêche l'activité de ce dernier¹⁰⁶. Lors de l'activation des LT, l'activité de BACH2 est diminuée via une inactivation par phosphorylation, ce qui permet la liaison d'AP-1 à ses motifs sur l'ADN et l'induction du programme transcriptionnel d'activation des LT CD8¹⁰⁶.

TCF-1, fortement exprimé par les LT CD8 naïfs, participe au maintien de l'identité des LT CD8 matures et de leur capacité à ouvrir la chromatine lors de la prolifération homéostatique via le recrutement de l'organisateur de la chromatine CTCF¹⁰⁷. Lors de l'activation des LT CD8, l'expression du gène codant TCF-1 (*Tcf7*) peut être réprimée par l'inflammation (IL-12)¹⁰⁸ ou la méthylation du promoteur de *Tcf7* par DNMT3a¹⁰⁹. TCF-1¹¹⁰ et LEF-1¹¹¹ régulent la structure de la chromatine des LT CD8 afin de maintenir leur identité et de réguler leur fonction¹¹². Lors d'une réponse immunitaire aiguë des LT CD8, TCF-1 réprime leur différenciation effectrice et la production de cytokines¹¹³.

1.2.2.3. Activation des LT CD8 naïfs

L'activation du LT CD8, suite à une stimulation antigénique et à une co-stimulation, est un processus moléculaire qui permet au LT de sortir de son état naïf par l'induction d'un programme épigénétique, transcriptionnel et métabolique. Il existe trois signaux d'activation d'un LT CD8 naïf. Le signal 1 est fourni par la signalisation TCR lors de la reconnaissance antigénique, le signal 2, par la co-stimulation, et le signal 3, par l'inflammation (Figure 2). Ces signaux d'activation sont fournis par la CPA ainsi que par le milieu inflammatoire, auquel contribue l'aide des LT CD4.

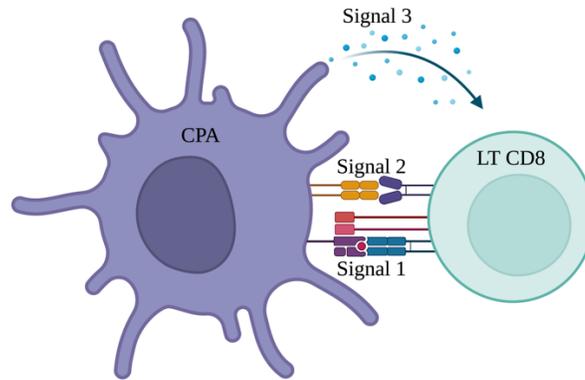


Figure 2. – Signaux d’activation d’un LT CD8 naïf. Afin d’être activé, un LT CD8 naïf doit recevoir trois signaux d’activation. Le signal 1 est fourni par l’interaction du TCR avec son Ag présenté dans le contexte du CMH I par la CPA. Le signal 2 est fourni par la co-stimulation entre CD28 et CD80/CD86, et le signal 3, par le milieu inflammatoire. Figure créée avec BioRender.

Lors d’une réponse immunitaire, un agent pathogène peut être reconnu par différents clones de LT CD8. Ces clones lient les Ag de ce pathogène présentés par la CPA avec une force et durée d’interaction différente. Le milieu inflammatoire qui entoure chacun des clones de LT CD8 peut différer en fonction de la quantité limitante ou non de cytokines inflammatoires ou de la proximité de ces cellules productrices de cytokines. Cette variabilité de signaux d’activation qu’un LT CD8 peut recevoir pendant sa différenciation mène à la génération d’une population des LT CD8 dont les clones et leur progénie peuvent s’engager dans différentes trajectoires de différenciation, soit vers une différenciation terminale ou mémoire des LT CD8¹¹⁴.

1.2.2.3.1. Signal d’activation 1 – la stimulation TCR

L’engagement du récepteur de cellule T CD8 lors de la reconnaissance de son Ag spécifique, présenté par le CMH I d’une CPA, constitue le premier signal d’activation du LT CD8.

Le TCR du LT CD8 est composé de deux sous-unités de chaînes protéiques associées aux molécules de signalisation CD3. Notamment, les domaines extracellulaires des chaînes TCR α et

TCR β participent à la reconnaissance de l'Ag présenté dans le contexte du CMH I, tandis que les chaînes CD3 participent à la transduction de la signalisation du signal TCR. Les molécules de signalisation CD3 (CD3 $\epsilon\delta$, CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\zeta\zeta$) transduisent le signal TCR¹¹⁵ via les domaines d'activation ITAM (« *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*») qui seront phosphorylés. Chaque chaîne CD3 ζ contient trois ITAM, alors que les chaînes CD3 ϵ , δ ou γ n'en contiennent qu'un. Ainsi, chaque TCR transduit son signal via dix ITAM¹¹⁶. La phosphorylation de ces ITAM permet l'activation de la signalisation intracellulaire en aval, ce qui mène à un programme transcriptionnel qui permet au LT CD8 de sortir de sa quiescence et de poursuivre son activation^{117,118}.

Lors de l'interaction du TCR du LT CD8 avec son Ag spécifique présenté par le CMH I de la CPA, il y a rapprochement de ces deux cellules et interaction TCR-Ag-CMH-I simultanément avec une interaction entre le domaine extracellulaire du corécepteur CD8 du LT avec la région non-polymorphique de la molécule de CMH I. Cette interaction permet le recrutement de Lck^{119,120} à proximité du complexe TCR, où elle phosphoryle les motifs d'activation ITAM du complexe TCR-CD3 (CD3 $\zeta\zeta$, CD3 $\epsilon\delta$ et CD3 $\epsilon\gamma$), ce qui permet le recrutement de ZAP70, elle aussi phosphorylée^{121,122} à son tour par Lck. (Figure 3). Lck phosphoryle aussi ITK¹²³ et VAV1¹²⁴, qui participent à la transduction de la signalisation TCR en aval. Une fois phosphorylée, ZAP70 lie les ITAM et phosphoryle à son tour la protéine LAT, qui joue un rôle de plateforme de recrutement de molécules de signalisation au TCR, notamment de PLC γ 1 (qui induit l'activation de la voie calcique en aval), de RAS/MAPK (qui induit l'activation d'ERK1/2 en aval) ainsi que de GRB2 et de GADS (qui eux-mêmes recrutent les protéines SOS1 et SLP-76, ce qui mène à l'activation en aval de RAS, RHO et RAC)¹²⁵. Une fois recrutée sur la protéine LAT, PLC γ 1 hydrolyse le phospholipide phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) en inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). IP3, relâché dans le cytoplasme, lie son récepteur sur le réticulum endoplasmique et cause la relâche du flux calcique intracellulaire, ce qui va entraîner l'entrée du calcium (Ca²⁺) extracellulaire. Le calcium permet d'induire l'activation de NFAT via une déphosphorylation par la calcineurine, et pourra être ensuite recrutée dans le noyau afin de réguler la transcription génique. DAG, quant à lui, permet l'activation de la protéine kinase C (PKC- θ) et de RASGRP1, qui pourra activer la protéine RAS. L'activation de RAS par RASGRP1 et SOS1 induit la signalisation ERK1/2¹²⁶ et permet la transcription de *Fos*, codant pour c-Fos (Figure 3),

qui formera le complexe AP-1 avec Jun¹²⁷. L'activation de PKC- θ par DAG, permet aussi d'activer en aval NF- κ B, qui, tout comme NFAT et AP-1, induit l'expression de gènes impliqués dans l'activation du LT CD8¹²⁸. Ainsi, la signalisation TCR induit l'activation d'AP-1, de NFAT et de NF- κ B, qui ensemble contribuent à l'induction d'un programme transcriptionnel d'activation des LT CD8.

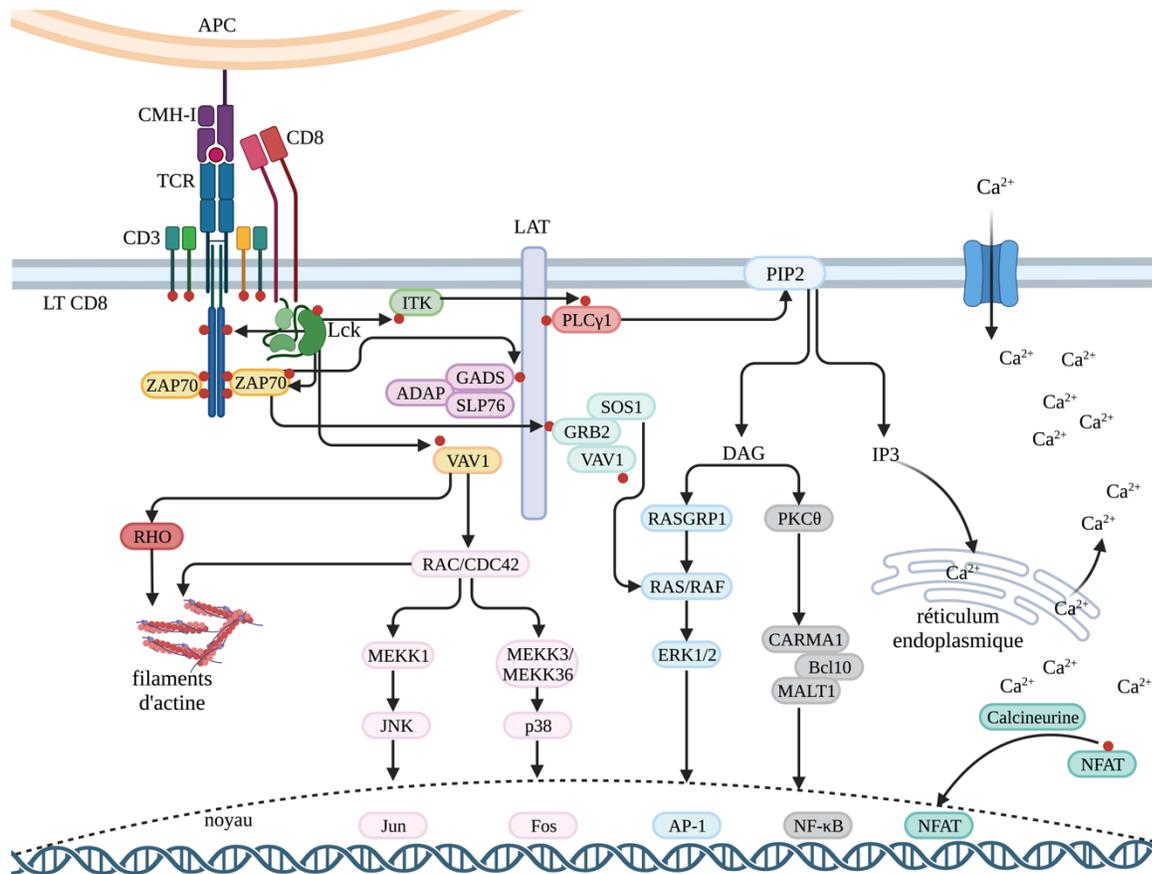


Figure 3. – Signalisation du TCR suite à une stimulation antigénique.

L'interaction du TCR avec le CMH I présentant son Ag spécifique mène à l'activation de la signalisation en aval menant aux fonctions transcriptionnelles d'AP-1, de NF- κ B et de NFAT. Figure inspirée de Gaud *et al.*¹¹⁶ et créée avec BioRender.

1.2.2.3.2. Signal d'activation 2 – signal de co-stimulation

Le deuxième signal d'activation du LT CD8 est fourni via la molécule de co-stimulation CD28 et assure une régulation de l'activation complète du LT CD8 par une CPA exprimant des molécules de co-stimulation. La stimulation TCR en absence de co-stimulation induit une activation incomplète du LT CD8 et mène à l'anergie de cette cellule qui est un état de non-réponse du LT¹²⁹. Le rôle de la co-stimulation dans les LT CD8 est ainsi de limiter l'activation de ces cellules par des CPA lors d'une réponse immunitaire afin de diminuer le potentiel auto-immun des LT CD8¹²⁹. Au niveau moléculaire, la co-stimulation permet la sortie de la quiescence des LT CD8 ainsi que leur adaptation métabolique qui soutient la différenciation, la prolifération et l'activité effectrice de ces cellules.

L'engagement du CD28, exprimé par le LT CD8, avec les molécules co-stimulatrices CD80 ou CD86 exprimées par la CPA, constitue le deuxième signal d'activation du LT CD8. Au niveau moléculaire, la co-stimulation via la molécule CD28 permet la phosphorylation du domaine intracellulaire de CD28, ce qui permet le recrutement de PI3K et de GRB2¹³⁰. Ainsi, la signalisation via CD28 active PI3K, qui phosphoryle le phospholipide PIP2 en phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate (PIP3), ce qui permet de recruter ITK à la membrane plasmique et d'activer SLP-76 et PLC γ 1. PI3K active PDK1, qui à son tour active AKT et PKC- θ . AKT est responsable de l'activation de la voie mTOR, de la croissance cellulaire et du maintien de la survie de la cellule co-stimulée, ce qui permet une adaptation métabolique qui favorise l'activation du LT CD8. AKT est aussi responsable d'inhiber l'activité de FOXO1, qui maintient la quiescence des LT CD8, tandis que PKC- θ mène à l'activation de la voie NF- κ B^{131,132}. GRB2, quant à elle, contribue à la production d'IL-2 suite à la co-stimulation via CD28^{133,134}, ainsi qu'à l'activation d'autres molécules de signalisation¹³⁵.

La co-stimulation lors de l'activation d'un LT CD8 naïf se déroule principalement via la signalisation de la molécule CD28. Toutefois, il existe d'autres molécules de co-stimulation ou de co-inhibition dont la somme d'action se traduit par une modulation de l'activation du LT CD8 lors de la réponse immunitaire¹³⁰. Parmi les récepteurs coactivateurs, on compte notamment CD27, ICOS et 4-1BB¹³⁰. Parmi les récepteurs co-inhibiteurs, on distingue par exemple PD-1, CTLA-4, Lag-3, Tim-3, 2B4 et TIGIT¹³⁰.

L'interaction du TCR avec le CMH I présentant son Ag spécifique ainsi que la liaison de molécules de co-stimulation CD28 avec CD80/CD86 contribuent à l'interaction entre le LT CD8 et la CPA et la formation d'une synapse immunologique entre ces deux cellules. Cette synapse immunologique est une structure moléculaire organisée entre le LT et la CPA dont le rôle est de stabiliser l'interaction entre ces deux cellules et de concentrer les molécules de signalisation du complexe TCR et de co-stimulation, tout en excluant les grosses molécules qui empêchent cette dernière¹³⁶. La synapse immunologique, aussi appelée « cluster d'activation supramoléculaire (SMAC) », peut être divisée entre le SMAC central, périphérique et distal¹³⁷. Le SMAC central est constitué des complexes TCR et des molécules CD28 dont la signalisation et la colocalisation se déroulent dans des microclusters^{138,139} favorisent la formation de radeaux lipidique et le recrutement des molécules de signalisation intracellulaire, notamment PKC θ ¹⁴⁰, Lck¹⁴¹ et ZAP70¹⁴². Le SMAC périphérique entoure le SMAC central et concentre des molécules d'adhésion cellulaire (LFA-1)¹⁴³ afin de mieux stabiliser l'interaction entre le LT et l'APC. Finalement, le SMAC distal comprend de grosses molécules exclues de l'interaction entre les deux cellules, par exemple CD45¹⁴⁴.

1.2.2.3.3. Signal d'activation 3 – signal provenant de cytokines

Le signal 3 d'activation d'un LT CD8 est fourni par différentes cytokines inflammatoires¹⁴⁵. Ce signal est important afin de soutenir l'activation complète des LT CD8, leur prolifération clonale, leur activité effectrice et leur capacité de réponse secondaire¹⁴⁶. Les principales cytokines qui agissent en tant que signal 3 sont l'IFN-I, l'IL-12 et l'IL-2. Ces cytokines peuvent être secrétées par les CPA, les NK, les LT CD4, les DC, ou d'autres types cellulaires.

L'IFN-I est rapidement produit lors d'une infection virale et cette cytokine peut agir comme le signal 3 d'activation du LT CD8¹⁴⁷. Chez la souris les IFN-I sont présents sous forme de 14 types d'IFN- α , de l'IFN- β , de l'IFN- ϵ , de l'IFN- κ et de l'IFN- ζ ^{148,149}. Lors d'une infection, l'IFN-I relâché dans la circulation sanguine lie son récepteur (composé des chaînes IFNAR1 et IFNAR2) sur la cellule cible et active la signalisation intracellulaire, ce qui mène à l'activation de STAT1 et STAT2 en aval, à l'activation de facteurs activés par l'interféron (IRF) et à l'induction de l'expression de gènes de réponse à l'IFN (ISG)^{150,151}. Toutefois, l'IFN-I est connu pour activer d'autres protéines STAT, notamment STAT3, STAT4 et STAT5¹⁵². La signalisation de l'IFN-I via

STAT1 induit un signal anti-prolifératif chez les LT CD8¹⁵³, alors que celle via STAT4 favorise la survie cellulaire¹⁵⁴.

Le signal donné par l'IFN-I lors de l'activation du LT CD8 protège ces cellules de la mort cellulaire par apoptose¹⁵⁵ lors de leur prolifération clonale et favorise leur différenciation effectrice^{154,156-158}. Les LT CD8 déficients pour l'expression du récepteur à l'IFN-I ne se différencient pas en SLEC lors d'une infection LCMV¹⁵⁸. La signalisation de l'IFN-I dans les LT CD8 est aussi importante afin de protéger ces cellules de l'activité cytotoxique des cellules NK^{159,160}.

L'IL-12 est une cytokine produite principalement par les CPA (les DC, les monocytes et macrophages, les neutrophiles)¹⁶¹⁻¹⁶³. Son rôle est de soutenir l'activation, la prolifération et la différenciation effectrice des LT CD8. L'IL-12 lie son récepteur sur le LT CD8, composé de l'IL-12R β 1 et de l'IL-12R β 2, ce qui permet d'activer la signalisation de STAT4¹⁵¹. L'IL-12 soutient l'expansion clonale des LT CD8¹⁶⁴, ainsi que leur différenciation effectrice¹⁶⁵ via une diminution de l'expression de *Tcf7*¹⁰⁸ et une augmentation de l'expression d'*Il2ra* (codant pour CD25) et de *Tbx21* (codant pour T-bet)^{166,167}. Tout dépendamment du type d'infection, l'IFN-I ou l'IL-12 peuvent agir en tant que signal 3 d'activation des LT CD8, l'IL-12 étant important pour leur différenciation effectrice lors d'une infection *Listeria monocytogenes*, et l'IFN-I, lors d'une infection virale LCMV^{168,169}.

L'IL-2 peut agir en tant que signal 3 d'activation lorsque sécrété par le LT CD8 lui-même ou par les autres cellules avoisinantes^{170,171}, comme les LT CD4, les DC, les cellules NK et les cellules NKT¹⁷²⁻¹⁷⁴. Le récepteur à IL-2 est formé d'une combinaison de CD25 (IL2-R α), de CD122 (IL2-R β) et de CD132 (chaîne γ c). Ces chaînes peuvent former deux types de récepteurs à l'IL-2, soit un récepteur d'affinité intermédiaire composé de CD122 et de CD132, ou un récepteur de forte affinité composé de CD122, de CD132 et de CD25¹⁷³. L'expression de CD132 est partagée avec les autres récepteurs de cytokines γ c. CD122 est exprimé par les LTM, les NK, tandis que l'expression de CD25 est davantage restreinte aux LT CD4 régulateurs (Treg) et aux LT activés. Ainsi, lors de l'activation, le LT CD8 induit l'expression de CD25, de CD122 et de CD132, ce qui lui permet de répondre plus fortement à l'IL-2^{175,176}.

Une signalisation prolongée d'IL-2 mène à la différenciation effectrice terminale des LT CD8¹⁷⁶ via l'induction d'un programme transcriptionnel spécifique¹⁶⁶. Ainsi, l'IL-2 induit l'expression d'*Eomes* et de *Prfl*, mais réprime celle de *Bcl6* et d'*Il7ra*¹⁶⁶. L'IL-2 favorise la différenciation des effecteurs de courte durée de vie (SLEC) via l'induction de l'expression de Blimp-1 (codé par le *Prdm1*)^{166,177,178}. Une fois exprimé, Blimp-1 diminue la production d'IL-2, tout en augmentant l'expression de granzymes et de CD25¹⁷⁹. Une forte expression de CD25 par les LT CD8 favorise leur différenciation effectrice terminale (LTE KLRG1⁺), tandis qu'une faible expression favorise la différenciation mémoire^{176,180}. Les cellules CD25⁺ ont été caractérisées comme en étant plus prolifératives, apoptotiques et effectrices, ce qui suggère qu'un signal prolongé d'IL-2 via CD25 augmente la différenciation terminale des LT CD8 en LTE KLRG1⁺¹⁷⁶. La déficience en expression de CD25 diminue la proportion de SLEC et les LTM ainsi générés ont une réponse secondaire déficiente¹⁸⁰.

L'IFN- γ est une cytokine produite par les LT, LB, NK, NKT et les CPA. L'IFN- γ lie son récepteur composé de l'IFN γ R1 et l'IFN γ R2 afin d'induire la signalisation intracellulaire via STAT1 et STAT3¹⁸¹, ou peut agir de façon non-canonique en co-stimulant l'intégrine LFA-1, ce qui mène à l'activation de STAT1¹⁸².

L'IFN- γ peut agir sur les LT CD8 dès les premiers moments de leur activation en activant STAT1 et en diminuant l'expression de CD25, ce qui soutient la différenciation mémoire des LT CD8 lors d'une infection *Listeria monocytogenes*¹⁸². Lors d'une infection virale, l'IFN- γ augmente la réponse des LT CD8¹⁸³, leur motilité ainsi que les capacités cytotoxiques des LTE¹⁸⁴. Lors d'une stimulation *in vitro*, l'IFN- γ est capable d'induire l'expression de T-bet et de la granzyme B et peut agir en synergie avec l'IFN-I afin d'induire les fonctions effectrices des LT CD8¹⁸⁵.

1.2.2.3.4. L'aide CD4 lors de l'activation des LT CD8

Outre les 3 signaux nécessaires à l'activation des LT CD8, l'aide des LT CD4 contribue aussi à leur activation et différenciation. Les LT CD4 appuient l'activation des LT CD8 via leur interaction avec la CPA en augmentant leur potentiel activateur, ou alors via la production de cytokines qui affectent les CPA et les LT CD8^{186,187}. L'aide CD4 est particulièrement importante lors d'une infection chronique afin de soutenir l'activité cytotoxique des LT CD8 ainsi que pour la génération de LTM capables de générer une réponse secondaire¹⁸⁶.

Lors de l'activation immunitaire, les LT CD4 donnent un signal aux DC via l'interaction de CD40 avec CD40L¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Cette stimulation permet à la DC de produire plus de cytokines (IL-12, IL-15), de chimiokines (CCL3, CCL4), et d'exprimer plus de molécules costimulatrices afin de mieux guider et activer les LT CD8¹⁹¹⁻¹⁹⁴.

Hormis leur action sur les DC, les LT CD4 produisent des cytokines qui agissent directement sur les LT CD8. Par exemple, les LT CD4 produisent de l'IL-2 qui soutient l'activation des LT CD8 et la génération de LTM capables d'effectuer une expansion secondaire¹⁹⁵⁻¹⁹⁸. Les LT CD4 produisent de l'IFN- γ , qui soutient les capacités cytotoxiques des LT CD8¹⁹⁹, ainsi que de l'IL-21, qui soutient la réponse chronique de ces cellules²⁰⁰⁻²⁰². En absence d'aide CD4 lors de l'activation du LT CD8, ces cellules expriment moins de CD25²⁰³ et les LTM ainsi générés sont plus susceptibles à l'apoptose induite par TRAIL lors d'une réponse secondaire²⁰⁴. L'aide CD4 lors de la réponse primaire des LT CD8 contribue à la génération des LTM, dont la fonction est indépendante de cette aide lors d'une réponse secondaire, ces cellules étant plus sensibles à l'activation inflammatoire par l'IL-12 et l'IL-18²⁰⁵.

1.2.2.3.5. Différenciation effectrice précoce des LT CD8

La différenciation effectrice des LT CD8 débute immédiatement après leur activation. Ce processus précoce est dirigé par des FT, notamment Runx3, BATF et AP-1, ou par des modulateurs de marques épigénétiques, par exemple TET2, SATB1, DNMT3a.

Runx3 est un FT important dans la régulation de l'accessibilité à la chromatine des FT qui lient les motifs de liaison à l'ADN bZIP, IRF et PRDM1 suite à une stimulation TCR²⁰⁶. Lors de l'activation du LT CD8, il y a ouverture de régions de la chromatine enrichies en motifs de liaison des FT Runx²⁰⁶. Des études de ChIP-seq et d'ATAC-seq ont permis de déterminer que Runx3 est responsable du maintien de l'accessibilité de la chromatine d'IRF4 et de BATF aux gènes codant pour *Irf4* et *Prdm1*²⁰⁶. Runx3 participe ainsi à l'induction de l'expression d'*Irf4* (code pour IRF4) et de *Prdm1* (code pour Blimp-1), mais limite celle de *Tbx21* (code pour T-bet), ce qui ralentit la différenciation effectrice du LT activé, lui donnant du temps pour une activation transcriptionnelle et épigénétique lors des premières heures suite à son activation²⁰⁶. Plus tardivement lors de la différenciation effectrice, Runx3 coopère avec T-bet afin d'augmenter le potentiel effecteur et de soutenir la fonction des LT CD8²⁰⁷ tout en participant à l'induction de l'expression d'Eomes, d'IFN- γ , de perforine et de granzyme B²⁰⁷. Ainsi, au cours de la différenciation effectrice, ce FT

active le programme cytotoxique des LT CD8 (*Prfl*, *Gzmb*, *Prdm1*, etc.) tout en diminuant l'expression de *Bcl6*, *Tcf7* et *Cxcr5* dans les LTE²⁰⁸.

BATF, tout comme Runx3, régule les étapes précoces de la différenciation du LT CD8. BATF, avec Jun et IRF4, induit la transcription de *Tbx21*, *Prdm1* et *Runx3* (codant pour T-bet, Blimp-1 et Runx3 respectivement), qui sont des FT dirigeant la différenciation effectrice des LT CD8²⁰⁹. BATF régule l'expression de récepteurs aux cytokines (*Ifnar1*, *Irnar2*, *Il2ra*, *Il2rb*, *Il12rb2*, *Il21r*, *Il18rap*, etc.) tout en inhibant la production de molécules effectrices (IFN- γ et granzyme B)²⁰⁹. Cette régulation transcriptionnelle permet aux LT CD8 de recevoir des signaux inflammatoires et de leur laisser le temps d'adapter leur métabolisme, d'augmenter leur capacité de survie et d'induire leur programme de prolifération avant de dépenser leurs ressources énergétiques sur des fonctions effectrices. Plus tardivement, BATF agit avec IRF4, T-bet et Runx3 afin d'induire un programme de différenciation effecteur des LT CD8²¹⁰. L'expression ectopique de ces FT dans des fibroblastes est capable d'induire un programme épigénétique et transcriptionnel qui ressemble à celui des LT CD8, ce qui souligne leur importance et leur coopération dans la régulation de la différenciation des LT CD8²¹⁰.

AP-1 fait partie de la famille des FT bZIP. Ce FT est composé d'un homodimère (Jun) ou d'un hétérodimère (Jun lié à Fos ou à BATF), la forme conventionnelle de cette molécule étant composée de Fos et de Jun²¹¹. La transcription de *Fos* et de *Jun* est induite en aval de la signalisation du TCR via l'activation d'ERK, de p38 et de JNK²¹². AP-1 induit un programme d'activation des LT CD8^{213,214} et participe à leur production d'IL-2²¹⁵⁻²¹⁷.

L'activité d'AP-1, sous sa forme conventionnelle, peut être régulée par le FT BATF, qui lie Jun et occupe les motifs de liaison de l'ADN spécifiques à AP-1^{218,219}. AP-1 peut aussi être régulé par le FT BACH2, qui, lors d'une infection virale, limite l'accès d'AP-1 aux gènes induits par le signal TCR, et ainsi freine la différenciation effectrice des LT CD8 et favorise la génération de LTM¹⁰⁶. De plus, l'activité d'AP-1 peut être diminuée via une répression transcriptionnelle de *Fos* par Blimp-1²²⁰, ou par une diminution de l'expression de *Fosl2*, qui peut être ciblé par miR-155²²¹. Au contraire, l'activité d'AP-1 peut être augmentée par les molécules *Egr2* et *Egr3*, qui lient BATF et le séquestrent, permettant à l'AP-1 conventionnel d'induire un programme transcriptionnel d'activation des LT CD8²²².

Certains *modulateurs épigénétiques* participent aussi à la régulation de la différenciation précoce des LT CD8. Ainsi, une fois le LT CD8 activé, certaines marques épigénétiques suppressives de méthylation de l'ADN sont enlevées par les protéines TET²²³, parmi lesquels on retrouve TET2, dont l'expression est induite par le signal TCR. TET2 permet la déméthylation de l'ADN des gènes codants pour des FT impliqués dans la différenciation effectrice des LT CD8 (*Tbx21*, *Prdm1*, *Irf4*, *Runx3*), ce qui permet l'induction d'un programme transcriptionnel d'activation et de différenciation effectrice²²⁴. L'organisateur de la structure de la chromatine SATB1 participe à la régulation de l'activation du LT CD8, entre autres par la répression de l'expression de *Pdcd1* via le recrutement du complexe de nucléosome de désacétylation, l'expression de SATB1 étant augmentée suite à la stimulation TCR²²⁵. DNMT3a participe à la répression transcriptionnelle de gènes cibles par l'ajout de marques de méthylation *de novo*, notamment sur le gène *Tcf7*, ce qui favorise la différenciation et l'activité effectrice des LT CD8¹⁰⁹.

1.2.3. Prolifération et adaptation métabolique des LT CD8

Lors d'une réponse immunitaire, le LT CD8 activé doit proliférer tout en se différenciant en LTE afin de générer un nombre suffisant d'effecteurs qui vont prendre en charge ou contribuer à l'élimination de l'agent pathogène ou de cellules tumorales. La prolifération du LT CD8 activé débute avec une première division asymétrique et continue avec une expansion clonale et une différenciation régulées par plusieurs FT et cytokines inflammatoires.

1.2.3.1. La première division des LT CD8

La prolifération du LT CD8 commence à la première division de ces cellules, qui est considérée comme une première étape du choix de différenciation effecteur ou mémoire²²⁶. Ainsi, lors de l'activation du LT CD8 par la CPA, il y aura interaction entre ces deux cellules via la synapse immunologique. La forte interaction entre le LT CD8 et la CPA cause une polarisation de différents compartiments intracellulaires du LT CD8 dans un positionnement proximal de la CPA, tandis que le compartiment distal en sera plus pauvre^{226,227}. Lors de la première division du LT CD8 la distribution inégale (ou asymétrique) des différentes composantes intracellulaires et extracellulaires va ensuite soutenir des activités anaboliques ou cataboliques du LT CD8²²⁸ et

favoriser la différenciation effectrice ou mémoire de deux cellules filles. Ainsi, la cellule proximale à la CPA sera biaisée vers une différenciation effectrice terminale, alors que la cellule distale sera biaisée vers une différenciation mémoire^{226,228-230}.

La division asymétrique du LT CD8 suite à son activation par la CPA mène à une distribution différentielle de certaines molécules de signalisation, notamment PI3K/AKT/mTOR, qui se retrouvent polarisés dans la cellule proximale à la CPA. La signalisation de la voie PI3K/AKT/mTOR inhibe l'expression de TCF-1^{231,232} et augmente celle de Myc²³³, ce qui soutient la différenciation effectrice du LT CD8. Lors de cette première division asymétrique, il y a aussi une distribution différentielle de composantes intracellulaires qui soutiennent l'activité métabolique (mTORC1, le FT Myc, la protéine ribosomale p-S6)²²⁸, la production de nouvelles protéines (réticulum endoplasmique) ou le recyclage de celles-ci via la machinerie de protéasome, ainsi qu'une distribution différentielle du FT T-bet^{229,234}.

Une analyse transcriptomique sur cellules individuelles (scRNA-seq) a permis de prédire deux types cellulaires à la première division des LT CD8 lors d'une réponse *in vivo*, qui correspondraient à la cellule proximale et distale²³⁵. En comparant les transcriptomes des MPEC et des SLEC avec les transcriptomes des cellules proximales et distales de la première division des LT CD8, les auteurs ont défini *Il2ra* (codant pour CD25) et *Sell* (codant pour CD62L) en tant que marqueurs des cellules proximales (CD25⁺ CD62L⁻) et des cellules distales (CD25⁻ CD62L⁺), avec un potentiel de différenciation effecteur ou mémoire²³⁵. Lors d'une analyse plus approfondie de ces données transcriptomiques²³⁵, la prédiction d'une stricte différenciation des LT CD8 CD25⁺ CD62L⁻ ou CD25⁻ CD62L⁺ vers un destin effecteur ou mémoire n'a pas été soutenue²³⁶. Toutefois, une autre étude portant sur les LT CD8 issus de la première division asymétrique *in vivo* a encore une fois mis en évidence leur forte hétérogénéité et la présence de sous-populations enrichies en gènes associés avec la différenciation mémoire et effectrice²³⁷. Ces résultats suggèrent que, à partir de la première division asymétrique, il y a génération de LT CD8 ayant un potentiel de différenciation effecteur ou mémoire, mais ne démontrent pas que ces cellules suivent cette stricte différenciation lors de la réponse immunitaire.

Des études axées sur le mécanisme de la division asymétrique ont permis de déterminer que la perte de la protéine kinase C atypique (PKC ζ ou PKC $\lambda/1$) diminue le taux de division asymétrique des LT CD8 et diverge la différenciation de ceux-ci en LTE de longue durée de vie à

la place de la différenciation mémoire^{230,238}. De façon surprenante, la division asymétrique agit non seulement lors de la première division, mais peut soutenir la diversification d'une réponse secondaire des LTM où l'augmentation de la division asymétrique peut être utilisée comme stratégie d'amélioration du contrôle de l'infection^{239,240}.

Pour conclure, la division asymétrique lors de l'activation des LT CD8 constitue une des premières étapes où le LT CD8 choisit un chemin de différenciation préférentiel vers un destin effecteur ou mémoire. Ainsi, la cellule proximale a un plus fort potentiel de différenciation effectrice alors que la cellule distale un plus fort potentiel de différenciation mémoire. Toutefois, ces deux cellules issues de division asymétrique du LT CD8 continuent à recevoir des signaux de différenciation après leur activation et leur première division ce qui module leur devenir. Effectivement, au cours de la réponse immunitaire, les LT CD8 maintiennent leur capacité de réponse à l'environnement et peuvent subir une différenciation biaisée en SLEC ou MPEC après la division asymétrique³⁶.

1.2.3.2. Adaptation métabolique

L'adaptation métabolique est un processus très important lors de la différenciation du LT CD8 naïf en LTE ou LTM. Ainsi, afin de soutenir la prolifération et l'expansion clonale suite à son activation, le LT CD8 doit sortir de sa quiescence et s'adapter métaboliquement afin de pouvoir soutenir toutes les activités de croissance cellulaire, de division, de différenciation et de fonctions effectrices^{241,242}. Suite à la stimulation du LT CD8 naïf, celui-ci doit grossir, incorporer plus de nutriments, changer de métabolisme catabolique vers l'anabolisme et reprogrammer la fonction mitochondriale afin de pouvoir commencer à proliférer¹⁰⁰.

Plusieurs FT participent à l'adaptation métabolique et à l'induction de la différenciation effectrice de façon très précoce suite à l'activation du LT CD8. Un des FT importants dans la régulation métabolique des LT CD8 est Myc, qui permet d'activer le programme transcriptionnel qui soutient la glycolyse, l'activité de mTOR, la biosynthèse protéique et la prolifération^{243,244}.

1.2.3.3. L'expansion clonale des LT CD8

L'expansion clonale permet la génération d'une population de LTE spécifiques à l'agent pathogène invasif et capables de soutenir la réponse immunitaire. Cette expansion est dépendante de plusieurs facteurs, notamment de la durée du signal TCR²⁴⁵, de son affinité et de son avidité dictée par les niveaux d'expression de l'Ag spécifique²⁴⁶. D'autres facteurs affectant l'expansion clonale sont le signal de co-stimulation CD28, qui, avec l'IL-2, vont réguler le cycle cellulaire du LT CD8^{247,248}, la présence d'IL-2 dans le milieu et sa production autocrine²⁴⁹.

L'expansion clonale est aussi affectée par l'IFN de type I^{156,250} et l'IL-33, une alarmine produite par les cellules nécrotiques qui soutient la réponse des LT CD8²⁵¹. Ce processus peut aussi être régulé par des FT qui augmentent l'activité métabolique des LT CD8, notamment IRF4, qui induit l'expression de molécules impliquées dans la régulation du cycle cellulaire²⁵²⁻²⁵⁴, et Myc, qui soutient l'activité métabolique nécessaire à la prolifération cellulaire²⁴³.

1.2.4. Différenciation des LT CD8 effecteurs

Les LT effecteurs (LTE) sont une sous-population de LT CD8 au grand potentiel fonctionnel grâce à leur production de cytokines (IL-2, IFN- γ , TNF- α) et de protéines cytolitiques (granzymes, Fas). Comme mentionné dans les sections préalables, la différenciation effectrice des LT CD8 débute suite à leur activation et permet la génération d'une population de LTE ayant des états de différenciation distincts, soit plus ou moins différenciées, leur permettant de se maintenir à long terme ou de mourir par apoptose suite à l'élimination de l'agent pathogène. La différenciation des LT CD8 est dirigée par l'activité de différents FT et, une fois les propriétés effectrices acquises, ces cellules vont migrer vers des sites inflammés et participer à l'élimination de l'agent infectieux via la production de molécules effectrices et l'activité cytotoxique directe.

1.2.4.1. Sous-populations d'effecteurs au pic de la réponse des LT CD8

Les LTE sont composés de différentes sous-populations effectrices ayant des fonctions et des destins moléculaires distincts. Ainsi, au pic de la réponse, les LTE sont classifiés en quatre différentes populations en fonction de leur niveau de différenciation terminal et leur potentiel mémoire, et définis par l'expression de KLRG1 et de CD127^{95,167,255,256}. Les LTE de courte durée

de vie, ou SLEC (« *short lived effector cells* »), expriment KLRG1, mais pas CD127, et ces cellules meurent par apoptose suite à l'élimination de l'agent pathogène; c'est pourquoi elles ont été définies comme terminalement différenciées^{256,257}. Les précurseurs de cellules mémoires, ou MPEC (« *memory precursor effector cells* ») expriment CD127, mais pas KLRG1, et ces cellules sont caractérisées par leur grand potentiel à devenir des cellules mémoires²⁵⁵⁻²⁵⁷. On distingue aussi les EEC (« *early effector cells* »), qui sont les LTE les moins différenciés et négatifs pour l'expression de CD127 et de KLRG1. Les EEC ont le potentiel de se différencier en SLEC ou en MPEC lors de la réponse immunitaire^{256,257}. Les EEC et les MPEC représentent la population de progéniteurs des LT_{RM}²⁵⁸⁻²⁶¹. Les DPEC (« *double-positive effector cells* »), positives pour l'expression de CD127 et KLRG1, ont la capacité de diminuer l'expression de KLRG1 afin de se différencier en cellules mémoires²⁶² ou alors générer des effecteurs de longue durée de vie²⁶³. Toutefois, la différenciation des LT CD8 ne se résume pas qu'aux populations définies par les marqueurs CD127 et KLRG1, plusieurs autres sous-populations de LTE étant définies par l'expression de CXCR3 et de CD127²⁶⁴ ou alors de CX3CR1 et de CD27²⁶⁵.

1.2.4.2. Régulateurs transcriptionnels et facteurs de transcription régulant la différenciation des LT CD8 effecteurs

Plusieurs FT dirigent la différenciation effectrice des LT CD8, notamment T-bet, Blimp-1, Zeb-2, ID2, NOTCH, IRF4, Runx3 (voir section 1.2.2.3.5), BATF (voir section 1.2.2.3.5), AP-1 (voir section 1.2.2.3.5). Ces FT permettent aux LT CD8 d'acquérir un potentiel effecteur afin de contribuer à l'élimination du pathogène lors d'une réponse immunitaire.

1.2.4.2.1. T-bet

T-bet, codé par le gène *Tbx21*, est un FT induit par le signal TCR ou l'inflammation, notamment l'IL-12^{167,207,266}. Ce FT est requis pour la différenciation des LT CD8 en SLEC^{167,267}. Ainsi, la délétion de l'expression de T-bet supprime la différenciation des SLEC, alors que sa surexpression est suffisante afin de l'induire¹⁶⁷. T-bet collabore avec Eomes et régule l'expression d'IFN- γ , de granzyme B, de perforine et de CD122^{267,268}. Ainsi, la simple délétion de T-bet ou d'Eomes n'affecte pas l'expression de ces molécules effectrices, alors que la délétion concomitante de ces FT diminue fortement celle-ci^{267,268}. Ce FT peut collaborer avec Zeb2 afin d'induire la

différenciation SLEC des LT CD8^{207,269,270}, ainsi qu'avec Runx3, BATF et IRF4 afin d'induire la différenciation effectrice des LT CD8^{207,210}.

1.2.4.2.2. *Blimp-1*

Blimp-1, codé par *Prdm1*, favorise la différenciation des SLEC et réprime celle des MPEC, la déficience en *Prdm1* menant à une abolition complète des SLEC^{178,271,272}. Ce FT est important pour l'acquisition de capacités cytotoxiques et migratoires par les LTE ainsi que la capacité de réponse secondaire des LTM¹⁷⁸. En absence de l'expression de ce FT, il y a une moindre expression de T-bet et une plus forte expression d'Eomes, de Bcl-6 et d'ID3, ce qui favorise la génération de LTM^{178,271}, mais dont la réponse secondaire est déficiente¹⁷⁸. Aussi, la déficience en Blimp-1 mène à l'acquisition rapide des propriétés mémoires par les LTE et une différenciation en LTM centraux mémoires (LT_{CM}) exprimant CD62L et produisant de l'IL-2¹⁷⁷.

1.2.4.2.3. *Zeb-2*

Zeb-2 favorise la différenciation effectrice des LT CD8 et son expression est enrichie dans les LTE KLRG1⁺ ^{269,270}. L'expression de Zeb2 est importante lors de la réponse primaire et secondaire des LT CD8, un défaut de son expression menant à une forte diminution de SLEC²⁷⁰. TGF- β et miR-200 inhibent l'expression de Zeb-2²⁷³. Ce FT inhibe l'expression d'*Il7r* et d'*Il2*²⁷⁰ et agit en aval de T-bet²⁷⁰ afin de réguler l'expression de gènes associés à la différenciation effectrice des LT CD8^{269,270}.

1.2.4.2.4. *ID2*

ID2 est un régulateur transcriptionnel qui favorise la différenciation effectrice des LT CD8 via un mécanisme dépendant de l'activité d'ID3²⁷⁴. L'expression d'ID2 et d'ID3 corrèle avec les sous-types SLEC et MPEC, ID2 étant plus exprimé dans les SLEC et ID3, dans les MPEC. La déficience en ID3 mène à une perte de LTM, tandis que la déficience en ID2 mène à une augmentation de l'expression d'ID3 et empêche la différenciation en SLEC²⁷⁴.

1.2.4.2.5. *NOTCH*

Le signal NOTCH favorise la différenciation des SLEC^{275,276}. Chez les LT CD8, l'expression des récepteurs NOTCH est induite par les signaux inflammatoires et par l'IL-2²⁷⁵. Suite à la liaison de ses ligands, le domaine intracellulaire du récepteur NOTCH (NICD) est clivé et transloqué au noyau où il lie RBPJ et, avec d'autres activateurs de la transcription, va induire

l'expression des gènes cibles de la voie de signalisation NOTCH²⁷⁷. Ce FT contribue à la différenciation SLEC par l'induction d'un programme transcriptionnel associé avec la différenciation effectrice, ainsi qu'une plus forte activité d'AKT et de mTOR^{275,278}. NOTCH est important dans l'induction de l'expression de CD25, l'acquisition de fonctions effectrices par les LT CD8, mais n'est pas essentiel pour la génération des LTM²⁷⁶.

1.2.4.2.6. IRF4

IRF4 soutient la différenciation effectrice des LT CD8. La déficience en IRF4 diminue la génération des SLEC et des MPEC, les proportions et les nombres cellulaires des SLEC étant plus fortement diminués que ceux des MPEC²⁵⁴. Induit suite au signal TCR, ce FT soutient l'expansion clonale et le potentiel effecteur des LTE grâce à l'induction d'un programme transcriptionnel qui induit l'adaptation métabolique nécessaire au soutien de la biosynthèse lors de la prolifération et de la production de cytokines des LT CD8^{252-254,279,280}. Le niveau d'expression d'IRF4 est dépendant de l'affinité du TCR pour son Ag et ce FT agit comme régulateur qui relie le programme métabolique et la production de molécules effectrices à l'affinité du signal TCR²⁵². IRF4 induit l'expression de Blimp-1, T-bet et ID2 tout en diminuant celle des inhibiteurs du cycle cellulaire et de molécules pro-apoptotiques²⁵³, ce qui soutient la différenciation effectrice des LT CD8 et protège ces cellules de l'apoptose²⁵².

En conclusion, le niveau de différenciation des LT CD8 ainsi que leur réponse, soit leur capacité à générer une population de LTE possédant de bonnes fonctions effectrices, sont médiés par plusieurs FT. L'activité de chacun de ces FT comprend un réseau complexe de molécules qui, ensemble, dirigent le devenir des LT CD8. Ainsi, la collaboration de plusieurs FT permet l'induction d'un programme transcriptionnel qui soutient la différenciation effectrice, la production de cytokines ainsi que l'activité cytotoxique des LT CD8. Les LTE ainsi générés pourront ensuite migrer vers des sites inflammatoires et produire des cytokines afin de soutenir la réponse immunitaire ainsi que cibler les cellules présentant leur Ag spécifique afin de les éliminer via une activité cytotoxique directe.

1.2.4.3. La migration des LT CD8 effecteurs

Suite à leur activation, les LT CD8 perdent l'expression de CD62L²⁸¹, ce qui limite leur entrée dans les GL²⁸² et induisent l'expression de récepteurs aux chimiokines et des intégrines qui leur permettent de migrer vers des tissus inflammés afin de combattre l'infection²⁸³. Lors d'une inflammation induite par la réponse immunitaire, l'endothélium des vaisseaux sanguins exprime une variété de molécules adhérentes (ICAM, VCAM, E et P sélectines) et des chimiokines qui permettent de recruter des cellules immunitaires, parmi lesquelles on compte les LTE^{284,285}.

Afin d'infiltrer les tissus inflammés via l'endothélium des vaisseaux sanguins, les LTE acquièrent l'expression de protéines glycosylées telles que PSGL-1, CD43 et CD44, qui lient la P et la E sélectine²⁸⁶. Ces cellules peuvent aussi exprimer les intégrines $\alpha 1\beta 1$ (VLA-1), $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) et $\alpha 4\beta 7$, dont le rôle est de guider la migration du LTE vers des tissus spécifiques, par exemple le poumon ou les intestins^{287,288}. La migration de LTE est aussi dirigée par les récepteurs de chimiokines CXCR3, CCR3, CCR6, CCR9, CCR10 et CX3CR1. CCR9 guide la migration des LTE vers les intestins, et CCR4, vers la peau^{289,290}. Ainsi, lors d'une réponse immunitaire, la migration des LTE est guidée par l'expression de protéines glycosylées, des intégrines et des récepteurs de chimiokines via leurs ligands exprimés aux sites inflammatoires.

1.2.4.4. Fonctions effectrices des LT CD8

Les principaux médiateurs de la fonction des LT CD8 sont les cytokines (INF- γ , TNF- α , IL-2, etc.) et les molécules cytotoxiques (granzymes, perforine, Fas/FasL)^{291,292}. La production de cytokines par les LTE est très rapide suite à une stimulation antigénique et ces cytokines agissent de façon autocrine sur le LT CD8 ainsi que paracrine ou endocrine sur les autres cellules du SI^{293,294}. L'expression et la production des molécules effectrices sont régulées par des FT ainsi que des régulateurs épigénétiques et métaboliques^{36,210,252,295-298}.

L'IL-2 est une cytokine produite par les LT CD8 activés, ainsi que les LT CD4, les NK, les NKT et les DC¹⁷²⁻¹⁷⁴. Il faut noter que l'IL-2 produit par les LT CD8 peut être lié par les LT CD8 eux-mêmes afin d'amplifier leur propre réponse ainsi que par les Treg (CD25⁺) qui, à l'inverse des LT CD8, diminuent l'activation du SI. Les Treg compétitionnent avec les LT CD8 pour la liaison de l'IL-2 et de molécules costimulatrices, ces cellules produisant des cytokines anti-inflammatoires

(IL-10, TGF- β)²⁹⁹⁻³⁰². Il faut noter que l'effet de l'IL-2 sur le LT CD8 dépend de son état de différenciation³⁰³. Ainsi, il a été montré que la culture *in vitro* de LT CD8 naïfs en absence de stimulation TCR mène à leur prolifération rapide avec une induction de l'expression du FT Eomes sans celle de T-bet, ce qui augmente leur potentiel à se différencier en LT_{CM} lors de leur transfert adoptif *in vivo*³⁰⁴. L'IL-2 a un effet d'induction de la différenciation effectrice via l'activité de Blimp-1^{166,176-178} lorsqu'il agit sur les LTE. Par contre, les LTE producteurs d'IL-2 ont un moindre potentiel de différenciation terminale que ceux qui n'en produisent pas à cause de leur moindre capacité d'activation de la voie de signalisation STAT5 dépendante d'IL-2³⁰⁵. Aussi, la signalisation autocrine d'IL-2 dans les LT CD8 lors de leur réponse primaire programme leur capacité d'expansion secondaire au stade mémoire^{170,306}, ce qui souligne l'importance de cette cytokine tout au long de la vie d'un LT CD8.

L'IL-2 favorise la différenciation des effecteurs de courte durée de vie (SLEC) via l'induction de l'expression de Blimp-1 (codé par le *Prdm1*)^{166,177,178}. Une fois exprimé, Blimp-1 diminue la production d'IL-2, tout en augmentant l'expression de granzymes et de CD25¹⁷⁹. Une forte expression de CD25 par les LT CD8 favorise leur différenciation effectrice terminale (LTE KLRG1⁺), tandis qu'une faible expression favorise la différenciation mémoire^{176,180}. Les cellules CD25⁺ ont été caractérisées comme en étant plus prolifératives, apoptotiques et effectrices, ce qui suggère qu'un signal prolongé d'IL-2 via CD25 augmente la différenciation terminale des LT CD8 en LTE KLRG1⁺¹⁷⁶. La déficience en expression de CD25 diminue la proportion de SLEC et les LTM ainsi générés ont une réponse secondaire déficiente¹⁸⁰.

L'IFN- γ produit par les LT CD8 stimule la présentation antigénique via une augmentation du processus de l'apprêtement des Ag par les CPA, ainsi qu'une augmentation de l'expression du CMH I^{307,308} via l'activité du FT IRF-1 suite à l'activation de la voie de signalisation JAK1/JAK2 et STAT1³⁰⁷. L'IFN- γ agit sur le LT CD8 lui-même, ainsi que les autres cellules de l'organisme, incluant les cellules du SI inné et adaptatif^{309,310}. L'IFN- γ contribue à l'activation immunitaire via une augmentation du niveau d'inflammation et le soutien de l'activation et différenciation des cellules qui contribuent à l'élimination de l'agent pathogène. Par exemple, l'IFN- γ peut agir sur l'activation des macrophages, sur leur potentiel de présentation antigénique ainsi que sur leur polarisation en macrophages pro-inflammatoires de type « M1 »³¹¹, connus pour leur production d'IL-1 β , de TNF- α , d'IL-12, d'IL-18, et leur participation à l'élimination de l'agent infectieux via

leur activité phagocytaire³¹². Aussi, un rôle important de l'IFN- γ est de soutenir l'induction de la différenciation des LT CD4 en Th1, dont l'activité facilite l'élimination des pathogènes intracellulaires, et de diminuer celle de Th2, dont l'activité aide l'élimination des parasites extracellulaires³¹³.

Le TNF- α est une cytokine pléiotropique qui participe à l'augmentation du niveau d'inflammation et de l'activation des LT CD8 via l'induction de la voie de signalisation NF- κ B^{314,315}. L'effet du TNF- α sur les différents types cellulaires dépend du contexte de la réponse immunologique^{316,317}.

Les LT CD8 produisent différents types de granzymes, qui sont des sérines protéases stockées dans des granules cytotoxiques. Ainsi, chez la souris, il existe les granzymes A, B, C, K, M, ainsi que les granzymes D, E, F, G, L, N³¹⁸. Ces différents types de granzymes se distinguent principalement par leur site de clivage protéique. Parmi celles-ci, les plus abondantes sont les granzymes A, B et C^{319,320}. Les LT CD8 produisent aussi la perforine et le Fas/FasL qui, avec les granzymes, participent au processus d'élimination spécifique des cellules cibles via l'induction de leur apoptose^{291,292,318}. Lors d'une reconnaissance antigénique par le LT CD8 de sa cellule cible qui exprime le CMH I présentant son Ag spécifique, il y aura formation d'une synapse immunologique entre ces deux cellules³²¹. À travers cette synapse, le LT CD8 dirige des vésicules cytotoxiques contenant des perforines et des granzymes vers la cellule cible afin d'induire son apoptose³²². Ainsi, une fois dans la cellule cible, les granzymes induisent le clivage d'une multitude de protéines, dont les caspases 3 et 7^{323,324}, qui induisent la cascade d'activation d'autres caspases en aval et la protéolyse des composantes intracellulaires, menant ultimement à l'apoptose³²⁵⁻³²⁷. Les granzymes peuvent aussi cliver la molécule BID^{318,328} afin de lui permettre d'être recrutée dans la membrane plasmique de la mitochondrie, où il favorise l'oligomérisation des protéines BAX et BAK et la relâche du cytochrome C au cytosol³²⁹. Le cytochrome C cytosolique cause l'assemblage de l'apoptosome (complexe protéique entre l'Apaf-1 et la caspase 9)^{330,331} et l'activation de la caspase 9 qui active la caspase 3. Les granzymes ciblent aussi d'autres molécules, notamment l'inhibiteur de la DNase DFF45/ICAD^{332,333}, des constituants structuraux du noyau (lamine B)³³⁴, de protéines de réparation d'ADN (DNA-PK)³³⁵, ce qui soutient la progression de l'apoptose et favorise la fragmentation du noyau³³⁶. Une autre voie d'induction de l'apoptose des cellules cibles par les LT CD8 est la reconnaissance de Fas de la cellule cible par le FasL exprimé par les LT

CD8^{337,338}. Cette dernière induit une signalisation d'apoptose qui se résume à l'activation des caspase 8 et 10, qui clivent les molécules mitochondriales à domaine BH3³³⁷, ou des caspases 3 et 7, qui activent l'apoptose en aval^{337,339}.

1.2.5. La contraction des LT CD8 effecteurs

Suite à l'élimination de l'agent infectieux a lieu la phase de la contraction des LTE. Cette étape permet l'élimination par apoptose de la grande majorité des LTE terminalement différenciées (SLEC) spécifiques à l'agent infectieux, ce qui permet à l'organisme de revenir dans un état d'homéostasie après une réponse immunitaire. Ainsi, après la phase d'expansion clonale, seulement 5 à 10 % de la population LTE survivent, soit les précurseurs de LTM, tandis que 90 à 95 % de ces cellules meurent par apoptose³⁴⁰.

La contraction des LTE a lieu par un mécanisme d'apoptose dont la régulation est basée sur la somme des signaux pro et anti-apoptotiques. Bim est une molécule pro-apoptotique qui, avec la signalisation Fas/FasL, participe à la contraction des LTE^{341,342}. La déficience en Bim permet la survie d'une grande partie des LTE suite à la phase de contraction^{343,344}. Des études sur la contraction des LTE utilisant des souris rapportrices de la caspase-3 ont permis de déterminer que ce processus survient dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes et qu'il dépend de la présence de l'Ag au début de la phase de contraction³⁴⁵. Ainsi, l'ajout de l'Ag à cette étape peut protéger des LTE engagés dans la contraction via l'induction de la molécule anti-apoptotique Bcl-X_L^{345,346}. Parmi les FT importants pour la régulation de la phase de contraction, nous comptons BATF3, dont la déficience n'affecte pas l'expansion clonale, mais induit une contraction drastique des LTE via la régulation de l'expression de Bim³⁴⁷. L'autophagie, soit le processus qui permet le recyclage de composantes cellulaires par une cellule, est aussi importante pour la phase de contraction des LTE. Les LTE déficients pour ATG5 ou ATG7 (molécules requises pour l'autophagie)³⁴⁸, subissent une plus forte contraction que leur contrôle sauvage³⁴⁹. La présence d'IL-7 ou d'IL-15 peut aussi affecter la phase de contraction. Ainsi, le traitement avec IL-7 pendant la phase de contraction des LT CD8 augmente la génération de LTM³⁵⁰, tout comme l'administration d'IL-15 qui induit l'expression de la molécule de prosurvie Bcl-2³⁵¹.

1.2.6. La différenciation des LT CD8 mémoires

La fonction principale des LTM est de protéger l'organisme contre une réinfection et d'assurer une élimination plus rapide et plus efficace de l'agent pathogène auquel le LTM est spécifique. Ces cellules ont développé certaines propriétés qui les rendent plus performantes que les LT CD8 naïfs ; les LTM sont notamment capables de répondre plus rapidement à une réinfection. Cette réponse rapide est due au plus grand nombre de précurseurs capables de reconnaître un même Ag³⁵² qui forment un réservoir de LTM capables de rapidement reconnaître et de prendre en charge le pathogène déjà rencontré. Aussi, les LTM sont plus sensibles à la stimulation TCR et ont besoin d'une moindre quantité d'Ag afin d'être activés grâce à leur capacité de former des oligomères de TCR plus larges et plus nombreux que les LT CD8 naïfs^{353,354}. Les LTM ont des propriétés intrinsèques qui les avantagent lors de leur réponse. Ces cellules ont un profil transcriptionnel et épigénétique distinct des LT CD8 naïfs qui leur permet de rapidement entrer en prolifération³⁵⁵ et d'induire leurs activités effectrices³⁵⁶⁻³⁵⁸. La chromatine des LTM est plus ouverte lorsque comparée à celle des LT CD8 naïfs, ce qui favorise une transcription génique plus rapide des gènes cibles associés à la fonction effectrice des LT CD8 lors d'une réponse secondaire³⁵⁹⁻³⁶¹. Les LTM expriment plusieurs récepteurs de cytokines, ce qui leur permet de répondre aux signaux inflammatoires même en absence de stimulation antigénique^{362,363}. La présence de ces signaux inflammatoires augmente la sensibilité des LTM à la stimulation antigénique³⁶⁴ ainsi que leurs capacités prolifératives lors d'une réponse immunitaire³⁶⁵.

1.2.6.1. Les sous-types des LT CD8 mémoires

En fonction de leurs phénotype, localisation et fonctionnalité, les LTM peuvent être divisés en plusieurs sous-types. Aussi, on distingue les LTM générés suite à une réponse immunitaire (LT_{EM}, LT_{CM}, LT_{RM}, LT_{PM}), les LT CD8 avec un phénotype mémoire qui ont été générés suite à une prolifération induite par les cytokines (LT_{VM}) et les effecteurs de longue durée de vie (LLEC). Le statut LTM des LLEC a longtemps été débattu ; toutefois, les dernières études transcriptomiques et fonctionnelles suggèrent que ces cellules ont des propriétés partagées entre les LTM et les LTE (présenté plus bas).

1.2.6.1.1. LT_{EM}

Les LT CD8 effecteurs mémoires (LT_{EM}) sont des LTM qui circulent dans le sang et dans les organes lymphoïdes secondaires et dont la caractéristique principale est la production rapide de cytokines et de molécules cytotoxiques suite à la rencontre de leur Ag spécifique. Les LT_{EM} sont des LTM avec un fort potentiel cytotoxique qui prolifèrent moins bien que les LT_{CM}^{366,367}. Ces cellules ont été définies par le manque d'expression de CD62L, de CCR7³⁶⁸ et de CD69^{369,370}. La circulation de ces cellules a été initialement définie comme étant plus spécialisée dans l'infiltration des tissus³⁵². Toutefois, il a plus récemment été montré que ces cellules sont plutôt spécialisées à circuler entre le sang, la lymphe et les organes lymphoïdes secondaires^{265,368,371}.

1.2.6.1.2. LT_{CM}

Les LT CD8 centraux mémoires (LT_{CM}) sont un sous-type de LTM dont la marque distinctive est la forte capacité proliférative³⁷². Premièrement, ces cellules ont été définies par l'expression de CD62L et de CCR7³⁶⁸, qui leur permet une migration privilégiée vers les GL. Ces cellules ont de faibles capacités cytotoxiques ; par contre, elles sont de bonnes productrices d'IL-2. La forte capacité proliférative des LT_{CM} soutient la réponse secondaire^{265,352,372,373}. Aussi, ces cellules sont capables de proliférer afin de se maintenir à long terme³⁷² et de donner naissance à d'autres populations de LTM (LT_{EM}, LT_{PM}, LT_{RM})^{265,373,374}. Lors d'une réponse immunitaire, où a lieu une augmentation du niveau d'inflammation, ces cellules sont capables d'infiltrer des tissus inflammés via la migration dirigée par les O-glycans qui lient les E et les P sélectines³⁷¹.

1.2.6.1.3. LT_{RM}

Les LT CD8 résidents mémoires (LT_{RM}) sont un sous-type de LTM qui résident dans les tissus barrière (peau, intestins, tract génital, etc.) ou non-barrières (poumons, foie, reins, etc.) où ces LTM ont été générés lors de la primo-infection³⁷⁵⁻³⁷⁷. Ces LTM ne recirculent pas à l'état homéostatique, mais restent en tant que sentinelles dans le tissu où a eu lieu l'infection. Ces LTM n'expriment pas KLRG1, CCR7, ou CD62L, mais sont positifs pour l'expression de CD69 et, dans certains tissus barrières (peau, intestins), pour CD103^{258,259}. Le maintien des LT_{RM} est indépendant de l'Ag²⁵⁸ ou du signal TCR³⁷⁸, et cette population de LTM représente une grande réserve de cellules mémoires qui peuvent répondre en cas de réinfection locale ou systémique³⁷⁸.

1.2.6.1.4. *LT_{PM}*

Les LT CD8 périphériques mémoires (*LT_{PM}*) sont une sous-population de LTM qui expriment des niveaux intermédiaires de CX3CR1^{265,379}. Ce type de LTM, dont la prolifération homéostatique est plus rapide que celle des *LT_{EM}*, a la fonction de patrouiller des tissus non-lymphoïdes et, contrairement aux *LT_{EM}*, ces cellules ont la propriété de ré-exprimer CD62L²⁶⁵. Toutefois, une autre étude soutient que les *LT_{EM}* sont aussi capables d'induire l'expression de CD62L³⁶⁷, ce qui soulève un questionnement quant à la différence de ces deux sous-types de LTM.

1.2.6.1.5. *LT_{VM}*

Les LT CD8 virtuels mémoires (*LT_{VM}*) sont une sous-population des LTM qui n'ont pas été générés suite à une stimulation antigénique³⁸⁰, c'est pourquoi ils ne sont pas nécessairement considérés de véritables LTM^{381,382}. Cette population de LTM se développe dès la naissance³⁸³ et le nombre de ces cellules s'accumule avec l'âge³⁸⁴. Les LTM virtuels sont induits suite à une stimulation avec des cytokines comme l'IL-7³⁸⁵, l'IL-15^{386,387} ou l'IL-4³⁸⁸⁻³⁹⁰ suite à une prolifération homéostatique ou prolifération homéostatique induite par la lymphopénie. La formation de LTM virtuels peut aussi avoir lieu lors de l'induction de la prolifération des LT CD8 naïfs Ly6C^{HI} en présence d'IFN-I lors d'une infection³⁹¹. Ces cellules peuvent être distinguées des autres LTM par leur faible niveau d'expression de CD49d^{381,386,392}.

1.2.6.1.6. *LLEC*

La population de type LLEC (« long lived effector cells ») est une population d'effecteurs de longue durée de vie qui se différencie principalement à partir des LTE KLRG1⁺, dont les SLEC²⁶³. Ces cellules se distinguent par une forte expression de KLRG1 et de granzyme B, elles expriment peu CD127 et sont négatives pour l'expression de CD62L, CD27 et CD43²⁶³. Ces LTM sont caractérisés par une expression de gènes associés à la fonction effectrice et à la différenciation mémoire et elles sont capables de se maintenir grâce à la prolifération homéostatique²⁶³. Un groupe de recherche a défini les LLEC en tant que *LT_{EM}* terminalement différenciés (*LT_{T-EM}*)³⁶⁷. Dans cette étude, les LLEC/ *LT_{T-EM}* ont été définis comme CD127^{low} et CD62L^{low}, ce qui les distingue des autres sous-populations de LTM et des *LT_{EM}* qui expriment fortement CD127³⁶⁷. Les *LT_{T-EM}* sont transcriptionnellement distinctes des LTE, des *LT_{CM}* et des *LT_{EM}*, mais sont plus proches des LTM que des LTE. Les *LT_{T-EM}* expriment de faibles niveaux de CD122 et de Bcl-2 et ont une prolifération homéostatique plus lente que les autres LTM³⁶⁷. Ces cellules ont une moindre

polyfonctionnalité, mais produisent plus de granzymes A et B comparativement aux LT_{CM} et aux LT_{EM} , ce qui leur donne un avantage lors d'une réponse secondaire³⁶⁷.

1.2.6.2. Régulateurs transcriptionnels et facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des LT CD8 mémoires

Plusieurs FT sont impliqués dans la différenciation des LTM. Il est important de noter que différents sous-types de LTM dépendent de FT spécialisés dans leur génération ou maintien^{36,48}. Ainsi, on distingue des FT importants pour la différenciation en LTM, des FT importants pour l'autorenouvellement et la survie des LTM, ainsi que des FT importants pour la spécialisation des LTM en LT_{CM} , LT_{EM} ou LT_{RM} . Les FT importants dans la différenciation de LT_{PM} ne sont pas encore définis.

1.2.6.2.1. Différenciation des LT_{EM}

Les FT impliqués dans la différenciation de LT_{EM} sont T-bet^{167,393}, STAT-4¹⁶⁷, Blimp-1^{177,178} et ID2^{274,394}. L'expression de T-bet est induite dans les LT CD8 activés et dépend de l'inflammation, notamment de l'IL-12, qui signale via STAT4¹⁶⁷. T-bet favorise la différenciation des LT_{EM} , son fort niveau d'induction étant aussi associé avec les LTM qui se sont différenciés en absence d'aide CD4^{167,393}. Blimp-1 favorise la différenciation des LT_{EM} via une répression de FT favorisant la différenciation LT_{CM} (comme ID3, Bcl6 et Eomes^{178,271}) et via une induction d'un programme transcriptionnel effecteur associé à un grand potentiel d'infiltration des tissus non lymphoïdes et à des capacités cytotoxiques augmentées^{177,178}. ID2, avec ID3, régulent la balance de LT_{EM} et LT_{CM} ²⁷⁴, ID2 étant important dans la différenciation des LTM, et particulièrement de LT_{EM} via le maintien de la survie de ces cellules³⁹⁴.

1.2.6.2.2. Différenciation des LT_{CM}

Plusieurs FT sont impliqués dans la différenciation des LT_{CM} , notamment TCF-1^{395,396}, Eomes³⁹⁷, Bcl-6³⁹⁸, ID3^{271,274} et STAT3³⁹⁹ qui, ensemble, dirigent la différenciation, la survie et le maintien des LT_{CM} . TCF-1 est important dans la différenciation LTM et la déficience de son expression diminue la différenciation mémoire des LT CD8³⁹⁵, tout particulièrement celle des LT_{CM} ^{395,396}. Cette perte de différenciation en LT_{CM} est associée à une diminution de l'expression de Bcl-2, de CD122 (la chaîne β du récepteur à l'IL-2 et l'IL-15), de la prolifération homéostatique

induite par l'IL-15, ainsi qu'une diminution de l'expression d'Eomes³⁹⁶. La déficience en Eomes empêche la survie des LTM à très long terme, surtout celle des LT_{CM}, ainsi que la capacité des LTM à subir une expansion secondaire³⁹⁷. Eomes régule l'expression d'*Il2rb* (codant pour CD122), important pour la capacité de réponse à l'IL-15 et pour la survie à long terme des LT mémoires²⁶⁷. La déficience combinée de l'expression d'Eomes et de T-bet mène à une perte de différenciation de LTM²⁶⁷. Le FT Bcl-6 est important pour la génération et le maintien des LT_{CM} via un mécanisme de maintien de leurs capacités prolifératives³⁹⁸. Un autre FT qui affecte la différenciation des LT_{CM} est ID3, qui agit en tant que répresseur transcriptionnel et favorise la différenciation mémoire, les cellules ID3⁺ ayant un potentiel de différenciation LT_{CM} aussitôt qu'avant le pic de la réponse des LT CD8^{271,274}. La délétion de l'expression d'ID3 diminue la proportion de LT_{CM} CD62L⁺, mais sa surexpression favorise la survie des SLEC et la différenciation des LTM KLRG1⁺^{271,274}. STAT3, dont l'activité est induite par la signalisation de l'IL-10 ou de l'IL-21, est aussi très important dans la différenciation des LT_{CM}. Ainsi, STAT3 et SOCS3 diminuent la sensibilité des LT CD8 aux signaux inflammatoires lors d'une infection et favorisent la différenciation LTM, particulièrement celle des LT_{CM}³⁹⁹. Zeb-1 est un FT qui favorise la survie des LTM en diminuant leur apoptose et en augmentant le ratio entre Bcl-2 et Bim²⁷³. Zeb-1 peut être induit par TGF- β et son expression est augmentée par celle de miR-200, qui cible Zeb-2 et favorise son expression préférentielle²⁷³. La déficience en miR-200 diminue la différenciation LTM, plus particulièrement celle des LT_{CM}²⁷³.

1.2.6.2.3. Différenciation des LTRM

Les FT importants pour la différenciation des LTRM sont Blimp, Hobit et Runx3^{260,400,401}, et cette population de LTM exprime peu KLF2⁴⁰², TCF-1⁴⁰⁰, Eomes et T-bet⁴⁰³. Dans la peau, la diminution de l'expression de T-bet et d'Eomes est importante dans la génération des LTRM afin de permettre la signalisation TGF- β , le maintien d'un faible niveau de T-bet permettant l'expression de CD122, qui est important pour la signalisation à l'IL-15 et pour la survie de ces cellules⁴⁰³. La diminution de l'expression de KLF2 diminue l'expression de S1PR1 et de CD62L, ce qui diminue le potentiel migratoire de ces cellules^{404,405} et leur permet d'infiltrer les tissus où ces cellules établissent leur résidence et deviennent des LTRM⁴⁰². Hobit et Blimp1 induisent un programme transcriptionnel de différenciation LTRM tout en diminuant l'expression de TCF-1⁴⁰⁰, Blimp1 étant essentiel à la différenciation des LTRM dans les poumons suite à une infection avec influenza⁴⁰⁶. Hobit, codé par *Zfp683*, favorise l'induction d'un programme transcriptionnel associé à la différenciation des LTRM⁴⁰⁷. L'expression de Hobit est inhibée par Eomes, ce qui empêche la

différenciation des LT_{RM} et la délétion de l'expression de Hobit lors de la phase effectrice des LT CD8 diminue la différenciation des LT_{RM} , mais pas celles des LTM circulants⁴⁰⁷. T-bet, quant à lui, augmente l'expression de Hobit, ce qui favorise la différenciation des LT_{RM} ⁴⁰⁷. Lors d'une infection LCMV, Hobit et Blimp-1 sont requis pour l'induction de l'expression de CD69 et pour la diminution de l'expression de S1PR1 et CCR7, ce qui soutient la différenciation des LT_{RM} ⁴⁰⁸. Un autre FT impliqué dans la différenciation et le maintien des LT_{RM} est Runx3²⁶⁰.

En conclusion, la différenciation et la diversification des LTM en différentes sous-populations (LT_{EM} , LT_{CM} , LT_{RM}) ayant des propriétés distinctes est un processus immunologique très important qui permet à l'organisme de générer une réserve de LTM spécifiques à un pathogène rencontré et dont l'activation rapide lors d'une réinfection permet la résolution de l'infection. La différenciation des différents sous-types de LTM est importante afin de soutenir une réponse mémoire adaptée au pathogène initialement rencontré. Ainsi, certains FT soutiennent la différenciation des LT_{CM} , qui résident surtout dans les organes lymphoïdes secondaires et protègent l'organisme contre des infections systémiques, tout comme les LT_{EM} , qui circulent dans le sang et présentent une activité effectrice immédiate afin d'éliminer le plus rapidement possible l'agent infectieux du sang. Les LT_{RM} résident dans les tissus infectés lors de l'infection primaire et participent à la surveillance des agents infectieux à ces sites. Ainsi, les différents FT dirigeant la différenciation LTM participent non seulement à la génération d'une mémoire immunologique, mais aussi à une mémoire immunologique adaptée au type de l'infection déjà rencontrée.

1.2.6.3. Homéostasie et survie des LT CD8 mémoires

La survie et le maintien des LTM ont lieu grâce aux cytokines IL-7 et IL-15. Ces dernières induisent l'expression de la molécule de prosurvie Bcl-2 et des changements métaboliques vers un état catabolique basé sur l'oxydation des acides gras et la respiration cellulaire. Aussi, l'IL-7 et l'IL-15 soutiennent l'autorenouvellement des LTM via une prolifération homéostatique. Celles-ci sont produites en quantité limitante par des cellules des organes lymphoïdes secondaires ou de la moelle osseuse, et ces sites constituent ainsi des niches de survie des LTM^{409,410}, sauf dans le cas des LT_{RM} , qui se trouvent dans des tissus non lymphoïdes.

1.2.6.3.1. IL-7

L'IL-7 lie le récepteur IL-7R composé de CD127 (IL-7R α) et de CD132 (chaîne γ c). Les LT CD8 naïfs expriment un fort niveau de CD127 et, lors de l'activation celui-ci, diminue pour augmenter ensuite préférentiellement chez les MPEC^{167,255,411,412}. Le signal à l'IL-7 soutient la survie des LT CD8, l'expression de CD127 étant nécessaire, mais pas suffisante à la formation des LTM⁴¹³. De point de vue mécanistique, l'IL-7 induit l'aquaporine 9 (AQP9), qui est importante dans le métabolisme des LTM afin de maintenir leur survie et leur renouvellement⁴¹⁴. Cette molécule permet l'importation du glycérol dans la cellule, ce qui soutient la production de triglycérides et, par conséquent, l'oxydation des acides gras^{415,416}.

1.2.6.3.2. IL-15

L'IL-15 soutient la survie des LTM via l'induction de Bcl-2^{97,417}. Aussi, l'IL-15 est essentiel à la prolifération homéostatique des LTM et à leur maintien à long terme^{97,418,419}. L'IL-15 agit sur l'activité métabolique de ces cellules via une augmentation de leur capacité respiratoire et via l'oxydation des acides gras (FAO)⁴¹⁵. Notamment, l'IL-15 induit la biogenèse mitochondriale et augmente la FAO par l'induction de l'enzyme limitante de cette voie métabolique, qui est la carnitine palmitoyl transférase α (CPT1 α)⁴¹⁵. Le maintien de l'activité de FAO des LTM est soutenu par un apport de glucose extracellulaire qui est utilisé dans la synthèse des acides gras libres par la lipase lysosomale acide (LAL)⁴¹⁶.

1.2.6.4. Réponse secondaire des LT CD8 mémoires

Lors d'une infection par un pathogène déjà rencontré, soit une réponse immunitaire secondaire, les LTM qui circulent dans les vaisseaux sanguins ou résident dans des tissus seront activés suite à la reconnaissance de leur Ag spécifique. Cette activation permet de rapidement prendre en charge l'élimination de l'agent pathogène ainsi que d'alarmer le SI de la présence du pathogène déjà rencontré afin d'assurer son élimination plus rapide et plus efficace que lors d'une infection primaire⁴²⁰. Cette efficacité est possible grâce aux propriétés des LTM qui les distinguent des LT CD8 naïfs discutés au début de la section 1.2.6 et qui se résument à la présence d'un réservoir de LTM, à leurs fonctions effectrices immédiates, à leur capacité d'activation facilitée en présence de moindres quantités d'Ag, à leur chromatine plus ouverte ainsi qu'à une sensibilité plus forte envers les signaux inflammatoires.

Lors d'une réponse secondaire, les LT_{CM}, qui résident normalement dans les GL^{421,422}, sont activés, ce qui induit leur prolifération⁴²³ et la production d'IL-2 afin de donner naissance à une population de LTE secondaires qui pourront rapidement prendre en charge l'élimination du pathogène déjà rencontré. Lors d'un défi antigénique, les LT_{CM} peuvent se différencier en LT_{PM} ou en LT_{EM}²⁶⁵. Dans le cas des LT_{EM}, ces cellules qui circulent dans le sang vont rapidement reconnaître leur Ag spécifique et vont produire de l'IFN- γ , du TNF- α et surtout des molécules cytotoxiques qui vont permettre l'élimination rapide des cellules infectées^{366,424}. Lors d'une réinfection, les LT_{RM} vont eux aussi rapidement s'activer et produire de cytokines afin d'alerter les cellules du SI et participer directement à l'élimination de l'agent infectieux *in situ*⁴²⁵⁻⁴²⁹. Ainsi, dans le cas de LT_{RM} de la peau, cette population demeure dans le tissu lors d'une réponse secondaire et exerce une protection locale sans recirculation⁴³⁰. Ces cellules, lors d'une réinfection, peuvent aussi migrer de leur lieu de résidence vers le GL drainant afin de produire des cytokines, proliférer et effectuer l'immunosurveillance des organes lymphoïdes secondaires⁴³¹ ou entrer en circulation sanguine, se dé-différencier en LT_{CM} ou en LT_{EM} et soutenir la réponse immunitaire systémique⁴³². Les LT_{RM} des poumons, quant à elles, sont peu persistantes et ont besoin d'un soutien continu de la part des autres populations de LTM, notamment des LT_{EM}, afin de maintenir une population de LT_{RM} stable et d'induire une réponse secondaire efficace⁴³³. Dans le cas des LT_{PM}, ces cellules sont spécialisées dans le patrouillage des tissus et de la vasculature. Lors d'une réponse secondaire, les LT_{PM} sont rapidement activés et peuvent se différencier en LT_{EM} CX3CR1⁺ qui ont de meilleures capacités cytotoxiques et un transcriptome associés à des fonctions effectrices augmentées^{265,434}.

La réponse secondaire des LT CD8 dépend aussi de la qualité des LTM générés lors de l'infection primaire. Ainsi, il a été montré que l'IL-2 est important pour l'expansion secondaire des LTM¹⁹⁸. La production paracrine d'IL-2 est suffisante pour l'expansion primaire des LT CD8 en LTE et la formation de LTM, alors que la production autocrine d'IL-2 est importante afin de soutenir l'expansion secondaire de ces cellules^{170,306}. La déficience de l'expression de la chaîne de haute affinité du récepteur à l'IL-2, CD25, mène à une réponse secondaire déficiente des LTM, et ces cellules prolifèrent et survivent moins lors d'une infection LCMV ou de *Listeria monocytogenes*^{180,198,435}.

La différenciation des LT CD8 lors d'une réponse aiguë permet la génération d'une population de LTE afin d'éliminer l'agent pathogène lors de l'infection primaire et ensuite la génération d'une population des LTM, afin de protéger l'organisme à long terme contre un pathogène déjà rencontré. Toutefois, certains pathogènes ont trouvé des mécanismes qui leur permet d'échapper à l'élimination par le SI, ce qui cause des infections chroniques ou, dans le cas des transformations malignes des cellules du soi, la persistance et la progression tumorale. Dans les deux cas, la persistance de l'Ag ainsi que l'inflammation induite lors de la réponse immunitaire chronique induisent un programme de différenciation d'épuisement des LT CD8 afin de diminuer l'activité de ces cellules et de protéger l'organisme contre une activation trop forte et soutenue des LT CD8.

1.2.7. Différenciation des LT CD8 épuisés

Lors d'une réponse immunitaire chronique, notamment lors d'une infection chronique ou d'une réponse antitumorale, la différenciation des LT CD8 est biaisée. La persistance de l'Ag pour lequel le LT CD8 est spécifique ainsi que le fort niveau d'inflammation vont diriger la différenciation des LT CD8 en LT épuisés (LT_{EX}). Ce type de différenciation se caractérise par l'acquisition progressive de l'expression de récepteurs inhibiteurs (RI), la perte de la fonctionnalité, la diminution des capacités prolifératives et de l'autorenouvellement, ce qui mène à un moindre contrôle antiviral ou antitumoral. L'épuisement des LT CD8 est un mécanisme physiologique qui, lors d'une réponse immunitaire chronique, limite la fonction de ces cellules afin de diminuer leur potentiel pathologique médié par leur activité cytotoxique ainsi que la production de cytokines inflammatoires (IFN- γ , IL-2, TNF- α) et préserver ainsi l'homéostasie de l'organisme.

Parmi les LT_{EX}, il existe plusieurs sous-populations ayant un niveau d'épuisement plus ou moins fort. Les précurseurs des LT CD8 épuisés (LT_{PEX}) sont les LT épuisés les moins différenciés, alors que les LT_{TEX} sont les LT CD8 les plus épuisés ou terminalement épuisés. Afin de mieux caractériser les différents états de différenciation des LT CD8 lors d'une réponse immunitaire chronique, les populations intermédiaires entre les LT_{PEX} et LT_{TEX} continuent d'être explorées et parmi, ces populations, on compte les LT_{EX} intermédiaires (LT_{EX-CX3CR1}).

Les LT_{PEX} sont particulièrement intéressants de par leur capacité à maintenir la réponse des LT CD8 via un processus d'autorenouvellement et de différenciation en LT_{EX-CX3CR1} ayant des

fonctions effectrices et prolifératives augmentées qui participent à l'élimination de l'agent pathogène avant de se différencier en LT_{TEX}. Les LT_{PEX} sont la population capable de répondre aux thérapies visant les récepteurs inhibiteurs (RI), tandis que les LT_{TEX} sont des cellules terminalement différenciées qui ne répondent plus à une stimulation antigénique.

1.2.7.1. Les récepteurs inhibiteurs

Une des caractéristiques principales des LT_{EX} est leur expression de RI, comme PD-1, Lag-3, Tim-3, CTLA-4, 2B4, TIGIT, etc. Les RI participent à la diminution de l'activation du LT CD8 via différents mécanismes et la co-expression de multiples RI mène à un état plus dysfonctionnel de ces cellules⁴³⁶.

1.2.7.1.1. PD-1

PD-1 peut lier PD-L1 ou PD-L2. Ce RI est exprimé tôt lors de l'épuisement du LT CD8. Sa fonction principale est de diminuer la signalisation du TCR via l'activité de la phosphatase SHP2, ce qui mène à l'inhibition du signal proximal du TCR^{437,438}, à une diminution du temps d'interaction du TCR avec son Ag présenté par le CMH I⁴³⁹ et à une diminution de l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT et du cycle cellulaire⁴⁴⁰⁻⁴⁴³. La signalisation via PD-1 mène à une diminution de l'activation des LT_{EX} et à une plus forte activité de FOXO1, qui augmente la survie de ces cellules⁴⁴⁴. D'autres rôles de PD-1 sont de diminuer le métabolisme glycolytique, le métabolisme mitochondrial ainsi que l'activité de PGC-1 α des LT_{EX}^{443,445} afin de réduire l'activité effectrice et proliférative de ces cellules.

1.2.7.1.2. Lag-3

Le RI Lag-3 est induit plus tardivement sur les LT_{EX} lors d'une réponse immunitaire chronique. Chez les LT, Lag-3 agit via sa liaison avec la protéine FGL-1 sécrétée par le foie⁴⁴⁶ ou via la liaison de la galectine 3 (Gal-3)⁴⁴⁷, les deux interactions ayant un effet inhibiteur sur l'activation du LT. Parmi les autres ligands de Lag-3, on peut noter la LSECtine^{448,449} ainsi que l' α -synucléine⁴⁵⁰.

1.2.7.1.3. Tim-3

Tim-3 est un RI associé à l'épuisement terminal des LT CD8. Son expression est induite plus tardivement lors de la réponse immunitaire chronique. Tim-3 lie la galectine-9, les phosphatidylsérines et le CEACAM1⁴⁵¹⁻⁴⁵³. En absence de stimulation, Tim-3 lie sa protéine adaptatrice Bat3, ce qui permet une stimulation normale du TCR. Toutefois, lors de la stimulation du Tim-3 par ses ligands, Bat3 est relâchée et Fyn est recruté aux sites de liaison libérés, ce qui mène à une déstabilisation de la signalisation TCR et de la synapse immunologique⁴⁵⁴⁻⁴⁵⁶.

1.2.7.1.4. CTLA-4

CTLA-4 est induit sur les LT CD8 suite à une stimulation Ag chronique et il est constitutivement exprimé par les Treg. Ce RI diminue la prolifération, la production d'IL-2 ainsi que l'induction de l'expression de CD69 et de CD25 par les LT CD8, ce qui diminue leur activation^{457,458}. CTLA-4 agit en compétition de liaison avec le récepteur co-activateur CD28 pour la liaison de CD80/CD86, exprimés par les CPA, CTLA-4 ayant une plus forte affinité et avidité de liaison que CD28⁴⁵⁹. De plus, une seule molécule du RI CTLA-4 est capable de lier simultanément deux molécules co-stimulatrices CD80/CD86 exprimés par la CPA, alors que CD28 n'en lie qu'une à la fois^{460,461}. Cet avantage de reconnaissance stœchiométrique de molécules CD80/CD86 par CTLA-4 limite la disponibilité de ces dernières pour l'interaction avec CD28. CTLA-4 peut aussi perturber la formation de la synapse immunologique^{462,463} et favoriser la transendocytose de ses ligands CD80/CD86, ce qui limite le potentiel d'activation des CPA^{464,465}.

1.2.7.2. Sous-populations de LT CD8 épuisés

Lors d'une réponse immunitaire chronique, les LT CD8 se différencient en LT_{TEX}. Toutefois, il s'agit d'une population hétérogène divisée selon le niveau d'épuisement et la capacité de réponse immunitaire des LT_{TEX}. On distingue principalement les LT_{TEX}, les LT_{PEX} et les LT_{TEX-CX3CR1}.

1.2.7.2.1. Les LT terminalement épuisés (LT_{TEX})

La population terminalement épuisée des LT CD8, soit les LT_{TEX}, exprime de forts niveaux de CD101 et des RI PD-1 et Tim-3⁴⁶⁶⁻⁴⁶⁹, et elle est négative pour l'expression de TCF-1 et de SLAMF-6⁴⁷⁰⁻⁴⁷². Cette population n'est pas capable de répondre lors d'une réstimulation antigénique et les thérapies visant les RI n'inversent pas leur épuisement^{470,472,473}. L'épuisement

terminal des LT_{TEX} n'est pas seulement au niveau transcriptionnel, mais aussi épigénétique⁴⁷⁴⁻⁴⁷⁶, ce qui ne permet pas à ces cellules d'induire un programme transcriptionnel associé à la réponse des $LT\ CD8$ ⁴⁷⁷. Lors d'une réponse antitumorale, les $LT_{EX}\ CD101^+\ CD38^+$ ont été caractérisés en tant que cellules ayant un état dysfonctionnel de la chromatine et un potentiel non-reprogrammable⁴⁶⁶. Les LT_{TEX} sont aussi caractérisés par l'expression de forts niveaux de Tox et d'autres FT induisant l'épuisement des $LT\ CD8$.

1.2.7.2.2. Les LT épuisés progéniteurs (LT_{PEX})

La population la moins épuisée et différenciée d'une réponse chronique des $LT\ CD8$ est la population de LT_{EX} progéniteurs ou « stem-like » (LT_{PEX}). Cette population est définie par l'expression de TCF-1^{470,472}, de CXCR5⁴⁷⁸ et de SLAMF6^{471,479}, mais pas de Tim-3 ni de CD101^{470,472,473}. Les LT_{PEX} se retrouvent au site de la réponse immunitaire (par exemple dans la tumeur lors d'une réponse antitumorale ou dans l'organe infecté lors d'une infection chronique) ou dans les organes lymphoïdes secondaires^{480,481} afin de constituer une source de cellules qui se maintient et se différencie en $LT_{EX-CX3CR1}$ et en LT_{TEX} . Lors d'une infection chronique avec LCMV Cl13, il a été observé que la population de LT_{PEX} peut être divisée en $LT_{PEX}\ SLAMF6^+CD69^+$ (progéniteurs de type 1) et $SLAMF6^+CD69^-$ (progéniteurs de type 2), les $SLAMF6^+CD69^+$ étant surtout des cellules résidentes des organes lymphoïdes secondaires, tandis que les $SLAMF6^+CD69^-$ peuvent se retrouver dans la circulation sanguine⁴⁶⁹.

1.2.7.2.3. Les LT épuisés transitoires ($LT_{EX-CX3CR1}$)

On distingue aussi la population des $LT\ CD8$ épuisés transitoires ($LT_{EX-CX3CR1}$), qui provient des LT_{PEX} et qui sont $CX3CR1^+$, tout en exprimant plus de Ki-67⁺ que les autres sous-populations de LT_{EX} ^{202,468}. Les $LT_{EX-CX3CR1}$ expriment aussi plus des molécules effectrices et présentent de fortes capacités cytolytiques qui contribuent au contrôle viral ou tumoral, leur nombre augmentant suite à une thérapie anti-PD-1^{202,468}. Les $LT_{EX-CX3CR1}$ exercent leurs fonctions effectrices et se différencient ensuite en LT_{TEX} . La différenciation des $LT_{EX-CX3CR1}$ est dépendante de T-bet, de Zeb2 et d'IL-21^{202,468}. Les $LT_{EX-CX3CR1}$ ont aussi été définis par un autre groupe de recherche en tant que « LT_{EX} intermédiaires »⁴⁶⁹, où les marqueurs utilisés afin de les identifier sont $SLAMF6^-CD69^-$ ⁴⁶⁹. Dans ce cas aussi, les LT_{EX} intermédiaires se différencient à partir d'un sous-type des LT_{PEX} ($SLAMF6^+CD69^-$), afin de soutenir la réponse immunitaire via leur plus forte

prolifération et activité effectrice, et, suite à l'activité effectrice soutenue, les LT_{EX} intermédiaires se différencient en LT_{EX} terminaux (SLAMF6⁺CD69⁺)⁴⁶⁹.

1.2.7.3. Cytokines impliquées lors d'une réponse immunitaire chronique

Lors d'une réponse chronique, les cellules du SI vont produire une panoplie de cytokines pro et ensuite anti-inflammatoires afin de soutenir et ensuite de diminuer la réponse immunitaire pour préserver l'intégrité de l'organisme contre une trop forte toxicité de ses médiateurs cytotoxiques (cytokines, granzymes, etc.). Les principales cytokines qui dirigent la réponse et la différenciation des LT CD8 lors d'une réponse immunitaire chronique sont l'IFN-I, l'IL-10, l'IL-27 et l'IL-21.

1.2.7.3.1. Interféron de type I

Au début de la réponse immunitaire chronique lors d'une infection LCMV C113, l'IFN de type I soutient la réponse des LT CD8. Toutefois, la signalisation soutenue de ce type d'IFN contribue à leur épuisement⁴⁸². Lors d'une réponse antitumorale, l'IFN-I agit aussi sur les CPA, qui activent les LT CD8. Notamment, il contribue à l'accumulation des DC intra-tumorales ainsi qu'à leur capacité de présentation antigénique croisée, ce qui augmente la réponse des LT CD8 et leur capacité de contrôle tumoral^{483,484}.

L'IFN-I peut aussi jouer des rôles négatifs lors de la réponse immunitaire. Dans les premières phases de l'infection LCMV C113, les LT CD8 éliminent les LB spécifiques à LCMV via une activité cytotoxique directe dépendante de l'IFN-I, ce qui diminue l'immunité humorale précoce envers LCMV⁴⁸⁵. Le blocage de la signalisation IFN-I avant ou au début de l'infection LCMV C113 à l'aide d'Ac ciblant IFNAR1 permet de diminuer l'activation du SI, de restaurer l'architecture des organes lymphoïdes secondaires, de diminuer l'expression des RI ainsi que d'augmenter le contrôle de l'infection chronique avec l'aide des LT CD4^{486,487}. Le blocage d'IFNAR1 diminue aussi l'épuisement des LT CD8 tout en augmentant l'expansion des LT_{EX} TCF-1⁺ (LT_{PEX}) responsables du maintien de la réponse des LT CD8 lors d'une infection chronique⁴⁷⁰.

1.2.7.3.2. IL-10

Lors d'une infection chronique, les CPA (DC et macrophages), les lymphocytes B, les NK, les LT CD8 et les Treg produisent de l'IL-10^{488,489}. L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire dont le rôle est de diminuer l'activation immunitaire, incluant celle des LT CD8^{488,490}.

Lors d'une infection chronique LCMV C113, la déficience en l'expression d'IL-10 ou sa neutralisation avec des Ac bloquants permet le maintien de l'activité effectrice des LT CD8 et l'élimination du virus⁴⁹¹. Le traitement de souris avec des Ac neutralisant le récepteur à l'IL-10 (IL-10R) permet la résolution de l'infection chronique et une augmentation de la production d'IFN- γ par les LT CD8^{491,492}.

Mécanistiquement, l'IL-10 diminue la sensibilité des LT CD8 envers son Ag via une augmentation de son état de glycosylation⁴⁹³. Ainsi, la signalisation à IL-10 induit *Mgat5* qui, une fois exprimée, ajoute des N-glycans sur le LT CD8⁴⁹³. L'expression de ces N-glycans diminue l'efficacité d'interaction du LT avec ses cellules cibles, ainsi que l'efficacité de la transduction du signal TCR⁴⁹³.

1.2.7.3.3. IL-27

L'IL-27 est une cytokine pléiotropique qui lie son récepteur composé de WSX1 et de gp130. Le signal de cette cytokine est transduit via l'activation de STAT1 et de STAT3, et il régule la fonction des LT CD8 lors d'une réponse immunitaire chronique⁴⁹⁴⁻⁴⁹⁷.

Lors d'une infection chronique avec LCMV C113, l'IL-27 contribue au contrôle viral tôt lors de la réponse immunitaire⁴⁹⁸. L'IL-27 produit par les LB favorise l'accumulation des LT CD4 et leur production d'IL-21 et d'IFN- γ ^{495,499}, qui soutiennent la réponse des LT CD8. Le blocage d'IFN-I et l'administration concomitante d'IL-27 permettent l'amplification des LT_{PEX} (TCF1⁺CXCR5⁺)⁵⁰⁰, soit la population cible des thérapies visant le blocage de récepteurs inhibiteurs (ICB). Toutefois, l'IL-27 peut avoir un rôle immunosuppresseur lors d'une réponse antitumorale. Il peut induire l'expression de CD39 (ectonucléase qui hydrolyse l'ATP) sur les Treg, ce qui diminue l'activité antitumorale des LT CD8⁵⁰¹.

1.2.7.3.4. IL-21

L'IL-21 est une cytokine qui agit via son récepteur, composé de sa chaîne spécifique Il-21R et de la chaîne commune des récepteurs de cytokines γ c²⁰⁰. L'expression du récepteur à l'IL-21 sur

les LT CD8 est essentielle au maintien de leur prolifération et fonctionnalité lors d'une infection chronique LCMV Cl13⁵⁰². L'IL-21 permet la génération de LT CD8 polyfonctionaux et soutient l'activité antivirale des LT CD8⁵⁰³. Lors d'une infection chronique, cette cytokine est produite majoritairement par les LT CD4 et elle constitue le médiateur d'aide CD4 qui soutient la réponse de LT CD8 essentielle au contrôle viral chronique⁵⁰⁴. L'ajout d'IL-21 lors d'une thérapie cellulaire de cancer seul ou en combinaison avec l'anti-PD-1 augmente le contrôle tumoral et favorise une différenciation de LT CD8 moins épuisés^{505,506}.

1.2.7.4. Facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des LT CD8 épuisés

La différenciation des LT_{EX} est dirigée par un réseau complexe de FT, dont le mode de fonctionnement et l'interrelation ne font que commencer à être élucidés. Les FT clés qui régulent la différenciation des LT_{PEX} sont TCF-1, BACH2, Myb et AP-1, alors que les FT favorisant la différenciation LT_{TEX} sont NFAT, Eomes, Blimp-1, Tox et IRF4. Le sous-type de LT_{EX-CX3CR1} est quant à lui dépendant de BATF, T-bet et Zeb2.

1.2.7.4.1. TCF-1

TCF-1 est un FT clé qui maintient l'état de différenciation le moins épuisé des LT_{PEX} lors d'une réponse immune chronique, les cellules TCF-1⁺ étant celles qui répondent à la thérapie ciblant les points de contrôle du SI (ICB)^{470,472,473}. Effectivement, la chromatine des LT_{EX} TCF-1⁺ est plus ouverte et permissive à l'expression génique de molécules associées à l'activité proliférative et effectrice lorsque comparée à celle des LT CD8 TCF-1⁻⁵⁰⁷.

L'expression ectopique de TCF-1 dans les LT CD8 favorise la différenciation de LT_{PEX} via une diminution de l'expression de *Prdm1* (codant pour Blimp-1) et de *Bcl2l11* (codant pour Bim), tandis que la délétion de son expression diminue celle de *Foxo1*, *Eomes*, *Zeb2* et *Id3*^{508,509}. Ces résultats mettent en évidence le rôle de TCF-1 dans le maintien d'un état moins différencié de LT_{EX}, tout en augmentant leur capacité fonctionnelle et leur survie. Effectivement, la délétion de TCF-1 lors d'une infection chronique LCMV Cl13 mène à une expansion clonale normale des LT CD8 sans affecter l'expression des RI (PD-1, Lag-3)⁴⁷². Toutefois, ces cellules perdent leur

capacité de maintien à long terme ainsi que celle de réponse envers un traitement anti-PD-1 à cause de la perte des LT_{PEX} qui préservent les capacités prolifératives des LT_{EX}⁴⁷².

Des études à des temps précoces lors de la différenciation des LT_{EX} (jour cinq post-infection) ont permis de déterminer que, tôt lors de la réponse chronique, on distingue deux sous-types de précurseurs TCF-1⁺ : dépendants de BATF, qui favorise la différenciation terminale LT_{TEX}, ou dépendants de BACH2, qui soutient la différenciation de précurseurs LT_{PEX}⁵¹⁰. Une étude au cours de la phase effectrice d'une infection chronique LCMV C113 a permis de déterminer que TCF-1 dirige la différenciation de cellules moins différenciées (KLRG1⁻) et inhibe celle de cellules plus différenciées (KLRG1⁺) via l'induction d'Eomes et de c-Myb, qui induisent l'expression de Bcl-2 et la différenciation en LT_{PEX}⁴⁷⁹. Aussi, l'association TCF-1–Bcl-6 soutient la survie et le maintien des LT_{PEX} tout en diminuant la différenciation terminale des LT_{EX} induite par l'IFN- γ ⁴⁷⁰.

1.2.7.4.2. BACH2

BACH2 est exprimé par les LT_{PEX} et il soutient la différenciation des LT CD8 en LT_{PEX} via une programmation transcriptionnelle et épigénétique à partir des temps précoces lors de la réponse chronique de ces cellules^{510,511}. Aussi, la surexpression de BACH2 est suffisante afin d'induire la différenciation des LT CD8 en LT_{PEX}, alors que sa délétion la diminue fortement^{510,511}.

1.2.7.4.3. Myb

Myb favorise la différenciation en LT_{PEX} et soutient le potentiel progéniteur des LT CD8 au cours de la réponse immunitaire chronique⁵¹². Myb augmente la transcription de *Tcf7* et de *Bcl2* et diminue celle de *Zeb2* afin de maintenir le potentiel progéniteur des LT_{EX} et de diminuer leur différenciation effectrice⁵¹². La surexpression de Myb dans les LT CD8 augmente leur contrôle tumoral lors d'une thérapie cellulaire adoptive (ACT)⁵¹². Ce FT favorise aussi la différenciation d'un sous-type de LT_{PEX} identifiés CD62L⁺, qui contribuent à la réponse aux thérapies anti-PD-1⁵¹³.

1.2.7.4.4. AP-1

Le FT AP-1 est important dans la régulation de l'épuisement des LT CD8. Ainsi, lors d'une réponse antitumorale, il survient un enrichissement de motifs de liaison à l'ADN AP-1 et NFAT-AP-1 dans la chromatine ouverte des LT CD8 spécifiques aux Ag tumoraux⁵¹⁴. Cet enrichissement

suggère une activité accrue d'AP-1 lors de la réponse antitumorale des LT CD8. Effectivement, dans une étude utilisant des CAR-T, qui sont des LT exprimant un récepteur antigénique chimérique, la surexpression de Jun mène à une plus forte prolifération, fonction et à une différenciation terminale réduite des CAR-T ainsi qu'à leur plus forte réponse antitumorale lors d'une réponse anti-leucémique⁵¹⁵.

1.2.7.4.5. NFAT

NFAT est un FT associé à l'épuisement des LT CD8^{514,516}. Ainsi, lorsque NFAT agit seul, soit en absence de sa liaison avec AP-1, il induit l'épuisement des LT CD8⁵¹⁶. Ce fait a été illustré grâce à une forme mutée de NFAT incapable d'interagir avec AP-1 (CA-RIT-NFAT1) qui, une fois liée à l'ADN, induit un programme transcriptionnel associé à l'épuisement des LT CD8⁵¹⁶. Cette forme mutée de NFAT est capable de lier directement les promoteurs de *Lag3*, *Pdcd1* et *Havcr2* (codant pour Lag-3, PD-1 et Tim-3)⁵¹⁶. Ainsi, lors d'une infection LCMV Cl13, les LT CD8 NFAT (*Nfat1*^{-/-} et *Nfat2*^{-/-}) déficients expriment un moindre niveau de PD-1, Lag-3 et Tim-3⁵¹⁶. Lors d'une réponse antitumorale, les LT CD8 spécifiques aux Ag tumoraux présentent un enrichissement de l'ouverture de la chromatine avec des motifs de liaison à l'ADN lié par NFAT et associés avec l'épuisement des LT CD8⁵¹⁴, ce qui suggère une activité accrue de ce FT lors de la réponse antitumorale.

1.2.7.4.6. IRF4

IRF4, en collaboration avec NFAT et BATF, soutient l'épuisement des LT CD8⁵¹⁷. La forte expression d'IRF4 favorise une plus forte expression de RI et diminue la fonction et les capacités métaboliques (glycolyse et respiration cellulaire) des LT CD8 via une activité transcriptionnelle⁵¹⁷.

1.2.7.4.7. Eomes

Initialement, les LT CD8 exprimant de forts niveaux d'Eomes (LT_{EX} Eomes^{high}) ont été caractérisés en tant que terminalement épuisés et se différenciant à partir de LT_{EX} T-bet^{high}⁵¹⁸. Toutefois, malgré son association avec l'épuisement^{518,519}, l'expression d'Eomes a été montrée essentielle au maintien des LT_{EX} et leur capacité de répondre lors d'une infection chronique et d'une réponse antitumorale^{518,520}. Effectivement, cette expression n'est pas exclusive aux LT_{EX}, Eomes étant aussi exprimé dans une sous-population de LT_{PEX}⁴⁶⁹. Lors de l'épuisement des LT CD8, l'activité d'Eomes peut être régulée par la compétition de liaison aux mêmes gènes cibles que T-bet, le ratio de ces deux FT dans le noyau étant déterminant pour le niveau d'épuisement des

LT_{EX}⁵²¹. Aussi, il a été montré que la perte de l'expression d'Eomes diminue la réponse antitumorale des LT CD8, alors que la suppression d'un seul allèle de ce FT diminue l'épuisement et augmente le contrôle tumoral⁵²².

1.2.7.4.8. *Blimp-1*

Blimp-1 est un FT qui favorise l'épuisement des LT CD8. Lors d'une infection chronique avec LCMV Cl13, l'activité de Blimp-1 soutient l'expression de plusieurs RI, parmi lesquels on compte PD-1, Lag-3, CD160 et 2B4⁵²³. La délétion complète de l'expression de Blimp-1 mène à une diminution du niveau d'expression de ces RI ainsi qu'à une diminution du nombre des cellules qui expriment plusieurs RI, tout en diminuant la capacité de contrôle viral de ces cellules⁵²³. Par contre, la déficience d'un seul allèle du gène *Prdm1*, codant pour Blimp-1, augmente la cytotoxicité de ces cellules ainsi que leur capacité de contrôle viral⁵²³. Ces résultats suggèrent que, lors d'une infection chronique, Blimp-1 participe non seulement à l'induction de l'épuisement des LT CD8, mais aussi au maintien de leurs fonctions effectrices⁵²³. Dans un modèle de leucémie, Blimp-1 contribue à l'établissement de l'épuisement des LT CD8 via l'induction de l'expression de PD-1 et de TIGIT⁵²⁴.

1.2.7.4.9. *Tox*

L'expression de Tox a été associée à l'épuisement des LT CD8. Toutefois, son expression n'est pas exclusive aux LT_{TEX}, celle-ci pouvant être détectée aussi dans les LT_{PEX}⁴⁶⁹. Tox est induit suite à une stimulation TCR par la calcineurine et NFAT2, et, une fois exprimé, ce FT renforce sa propre expression^{525,526}.

L'activité transcriptionnelle de Tox est responsable d'induire de forts niveaux d'expression de *Pdcd1* et de diminuer celle de cytokines^{527,528}. Lors d'une infection LCMV Cl13, la délétion de Tox dans les LT CD8 mène à une diminution de la virémie au début de l'infection (jour 7), ces cellules étant incapables de se maintenir au cours du temps⁵²⁷. Ainsi, Tox est essentiel à l'épuisement des LT CD8 tout en contrôlant la persistance de ces cellules^{525,527,529}. Ce FT est enrichi dans les LT_{EX} lors d'une réponse virale chronique ou antitumorale et son expression ectopique dans des LTE *in vitro* induit leur épuisement⁵²⁶. Lors d'une réponse antitumorale, la délétion de l'expression de Tox dans les LT CD8 maintient un fort niveau d'expression de *Tcf7*, mais ne permet pas l'induction de *Pdcd1*, *Havcr2*, *Tigit*, *Cd244* ou *Entpd1* à cause de l'inaccessibilité de leur chromatine⁵²⁶.

1.2.7.4.10. BATF

BATF induit l'épuisement des LT_{EX}. La surexpression de BATF dans les LT CD8 de patients VIH en virémie chronique diminue la fonctionnalité et les capacités prolifératives de ces cellules, tandis que la délétion de l'expression de ce FT augmente la fonction des LT CD8²¹⁹. Aussi, la délétion de *Batf* dans des CAR-T diminue leur épuisement et augmente le contrôle tumoral⁵³⁰. Lors d'une infection chronique LCMV C113, l'activité d'IRF4, avec celles de BATF et de NFAT, favorise l'épuisement des LT CD8 via une diminution de la fonction, de l'activité métabolique et une augmentation de l'expression des RI⁵¹⁷.

Lors d'une réponse à une infection chronique, BATF peut être induit dans les LT CD8 par l'IL-21, dérivé de l'aide CD4^{202,531}. BATF lie directement les promoteurs de *Tbx21* et de *Klf2* (codant pour T-bet et KLF2) et maintient un état ouvert de la chromatine lors de la transition de LT_{PEX} à LT_{EX-CX3CR1} afin de faciliter l'expression de ces gènes et, avec l'IL-21, de favoriser l'activité effectrice des LT_{EX}⁵³². Cette activité effectrice des LT_{EX-CX3CR1} sera ensuite soutenue par Blimp-1, dont l'expression est aussi induite par BATF et IRF4 suite à l'aide CD4 via l'IL-21^{202,531}.

1.2.7.4.11. T-bet

L'expression de T-bet est associée à une activité effectrice des LT_{EX}^{469,518,521}. Ce FT diminue l'expression de *Pdcd1* plus fortement qu'Eomes^{521,533}, et les LT_{EX} T-bet^{high} sont encore capables de répondre à une stimulation antigénique lorsque comparés aux Eomes^{high}, qui sont terminalement différenciés⁵¹⁸. Les niveaux d'expression de T-bet et d'Eomes constituent une balance qui permet de réguler le potentiel de LT_{EX} effecteur et terminal^{519,521,534}. Les fonctions effectrices des LT_{EX-CX3CR1} sont dépendantes de l'expression de T-bet^{468,469,535}, capable de soutenir la fonction des LTE et d'induire l'expression de *Zeb2*^{202,269}. T-bet coopère ensuite avec *Zeb2* afin d'induire l'expression de gènes associés avec la différenciation effectrice²⁶⁹.

1.2.7.5. Régulateurs épigénétiques impliqués dans la différenciation des LT CD8 épuisés

La différenciation et l'épuisement des LT CD8 sont régulés non seulement au niveau transcriptionnel, mais aussi épigénétique. Notamment, lors de l'épuisement, certaines régions de la chromatine associées à la fonction des LT_{EX} sont modifiées par une méthylation *de novo* afin de

rendre ces régions non-permissives à la transcription génique. Ces modifications épigénétiques installent les L_TEX dans un état de non-réponse et limitent les thérapies visant les RI⁴⁷⁵. Parmi les modificateurs de la chromatine impliqués dans la régulation de l'épuisement des LT CD8, on retrouve Ezh2, Suv39h1 et Dnmt3a.

1.2.7.5.1. Ezh2

Ezh2 participe à la di- et tri-méthylation de l'histone H3K27, ce qui rend l'ADN qui y est associé non-accessible à la transcription génique⁵³⁶. L'activité d'Ezh2 est diminuée par la phosphorylation d'AKT et, lors d'une réponse antitumorale, une forme mutée d'Ezh2 (insensible à la phosphorylation par l'AKT) favorise le contrôle tumoral par les LT CD8 lors d'une thérapie cellulaire adoptive⁵³⁷. Son activité rend l'expression d'*Id3* plus permissive, tout en diminuant celle d'*Id2*, *Prdm1* et *Eomes*⁵³⁷.

1.2.7.5.2. Suv39h1

L'histone méthyltransférase Suv39h1 induit la tri-méthylation de l'histone H3K9. Lors d'une réponse antitumorale, Suv39h1 participe à la répression de la chromatine dont les gènes soutiennent l'activité cytotoxique des LT CD8. L'inhibition pharmacologique de Suv39h1 permet d'améliorer le contrôle antitumoral et d'augmenter l'efficacité de la thérapie anti-PD-1⁵³⁸.

1.2.7.5.3. Dnmt3a

Lors d'une réponse chronique, Dnmt3a participe à l'établissement d'un programme de méthylation d'ADN *de novo* associé à l'épuisement des LT CD8 qui empêche la réussite du traitement avec la thérapie anti-PD-L1⁴⁷⁷. La délétion de l'expression de Dnmt3a dans des CAR-T permet d'améliorer le contrôle tumoral via une diminution de l'épuisement et une augmentation de la fonction de ces cellules⁵³⁹. Le traitement de souris porteuses de tumeurs avec des inhibiteurs de DNMT augmente le contrôle tumoral via une plus forte activité cytotoxique des LT CD8, des cellules NK et une diminution de l'environnement immunosuppresseur de la tumeur⁵⁴⁰.

1.2.7.6. Divergences des signatures transcriptionnelles et épigénétiques à partir des temps précoces lors de la réponse immunitaire chronique

Des expériences de transfert adoptif de L_TEX générés lors d'une infection chronique (LCMV Cl13) dans des souris non-infectées ont montré que l'épuisement et la plasticité de

différenciation des LT CD8 diffèrent au cours du temps. Les LT_{EX} isolés à des temps précoces de l'infection chronique (jour 8) sont capables de se maintenir et se différencier en LTM dans une souris non-infectée, alors que les LT_{EX} isolés lors de l'établissement de l'épuisement (J30) n'ont plus cette capacité⁵⁴¹. Cette expérience, combinée aux études transcriptionnelles et épigénétiques, suggère que, lors d'une infection chronique, les LT CD8 subissent des changements moléculaires qui affectent la plasticité de ces cellules. Il est important de savoir à partir de quel moment les LT_{EX} commencent à diverger dans leur différenciation afin de mieux comprendre la biologie de ces cellules et d'adapter les traitements lors des réponses immunes chroniques.

Une expérience de scRNA-seq a permis de déterminer que les LT CD8 isolés lors d'une infection LCMV C113 ou d'une infection LCMV Arm divergent dans leur signature transcriptomique entre le jour 4, 5 et 7⁵²⁹, suggérant une régulation transcriptionnelle différente des LT_{EX} avant le pic de la réponse immunitaire. Le profil d'acétylation de H3K27 des LT_{PEX} (définis par Tim-3^{lo} Blimp-1^{lo}) est distinct de celui des LT_{TEX} (définis par Tim-3^{hi} Blimp-1^{hi}) aussitôt qu'à J7 post infection LCMV C113, et ce profil épigénétique est très différent de celui des LTE (jour 7) générés lors d'une infection LCMV Arm⁵²⁹. Ainsi, la régulation de la différenciation des LT CD8 a lieu tôt lors d'une réponse immunitaire aiguë ou chronique, la signature transcriptionnelle et l'empreinte épigénétique étant imposées avant le pic de la réponse de ces cellules.

1.2.7.7. L'aide CD4 lors d'une réponse immunitaire chronique

Pendant l'infection chronique ou la réponse antitumorale, l'aide CD4 est très importante dans la différenciation des LT CD8. Ainsi, l'aide CD4 permet l'acquisition d'un programme cytotoxique par les LT CD8, augmente les capacités migratoires et diminue leur expression de RI, ce qui augmente leur activité antitumorale^{187,542}. Lors d'une infection virale LCMV C113, l'IL-21 produit par les LT CD4 soutient la différenciation de LT_{PEX} en LT_{EX} transitoires CX3CR1⁺, ces cellules exprimant aussi des niveaux intermédiaires de CXCR6²⁰². Ces LT_{EX-CX3CR1} ont des capacités cytotoxiques accrues et sont essentielles au contrôle de l'infection chronique par les LT CD8²⁰².

1.2.7.8. Particularités de la réponse antitumorale des LT CD8

Le SI participe à l'élimination de cellules tumorales via un système de reconnaissance du soi versus du soi-modifié médiée par les LT CD8 ainsi que par d'autres cellules du SI, ce processus étant défini aussi en tant qu'immunosurveillance du cancer. Dans le cas de la réponse antitumorale, la reconnaissance du soi versus le soi-modifié est basée sur la capacité des LT CD8 à reconnaître via leur TCR des Ag du soi mutés ou altérés présentés dans le contexte de CMH I de cellules tumorales⁵⁴³⁻⁵⁴⁵, ainsi que la détection des altérations de l'expression de certaines molécules du soi dont la présence est surveillée par les cellules NK⁵⁴³. Toutefois, les tumeurs peuvent échapper à cette immunosurveillance via plusieurs stratégies de diminution de l'activation immunitaire⁵⁴⁶. Parmi ces stratégies, il y a la diminution du processus d'apprêtement et de présentation des Ag immunogéniques, la diminution ou la perte de l'expression des molécules de CMH I, ce qui diminue la reconnaissance antitumorale par les LT CD8, l'exclusion des LT CD8 de la tumeur ainsi que l'expression des ligands de RI par les cellules tumorales, ce qui, dans l'ensemble, diminue l'activation des LT CD8⁵⁴⁷⁻⁵⁴⁸. À part ces stratégies d'évasion immunitaires, les cellules tumorales diminuent l'activité des LT CD8 via l'induction de leur épuisement par la persistance antigénique des Ag tumoraux et le milieu inflammatoire intra-tumoral médié par des cellules immunosuppressives infiltrantes des tumeurs. Ainsi, les principales cellules immunosuppressives de la tumeur sont les Treg⁵⁴⁹, les cellules suppressives dérivées des cellules myéloïdes (MDSC)⁵⁵⁰, ainsi que les cellules tumorales elles-mêmes^{551,552}.

1.2.7.8.1. Treg

Dans le milieu tumoral, les Treg exercent principalement leur activité immunosuppressive sur les LT CD8 via une compétition de liaison pour l'IL-2, une compétition de liaison de molécules co-stimulatrices CD80/CD86 par CTLA-4 exprimé par les Treg et CD28 exprimé par les LT CD8^{460,553,554}, ainsi qu'une production d'IL-10 et de TGF- β ⁵⁵⁵. Parmi les autres mécanismes immunosuppressifs des Treg, il y a la conversion de l'ATP en AMP par les ectoenzymes CD39 et CD73⁵⁵⁶, dont le métabolite (AMP) agit comme immunosuppresseur des LT CD8⁵⁵⁷ et diminue leur capacité à être activés par les DC⁵⁵⁸. Dans le milieu tumoral, les Treg peuvent être recrutés par la chimiokine CCL1⁵⁵⁹. CCL1 lie CCR8 sur les Treg⁵⁶⁰ et augmente ensuite leur activité immunosuppressive via l'activation de STAT3 et via une augmentation de l'expression de FoxP3, IL-10 et CD39⁵⁶¹.

1.2.7.8.2. MDSC

Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) sont un groupe de cellules hétérogènes dérivées de cellules myéloïdes qui contribuent à la progression tumorale via l'expression de ligands des RI (PD-L1/2, VISTA)^{562,563}, leur production d'IL-10⁵⁶⁴ et de TGF- β ⁵⁶⁵. Ces cellules participent aussi à la déplétion des acides aminés (L-arginine⁵⁶⁶⁻⁵⁶⁸, cystéine⁵⁶⁹, tryptophane^{570,571}) importants dans le métabolisme des LT CD8, à la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS)⁵⁷², ainsi qu'à plusieurs autres mécanismes immunosuppresseurs qui continuent d'être élucidés⁵⁷³⁻⁵⁷⁵.

1.2.7.8.3. Cellules tumorales

Les cellules tumorales elles-mêmes peuvent exprimer et sécréter des molécules immunosuppresseurs afin de diminuer l'activité du SI et la reconnaissance par celui-ci via une diminution du processus de la présentation antigénique ainsi que via la perte de l'expression du CMH I^{576,577}. Les cellules tumorales peuvent exprimer PD-L1/PD-L2 (ligands de PD-1), la galectine-9 (ligand de Tim-3), HVEM (ligand de BTLA et de CD160)⁵⁷⁸, l'indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO), qui participe au métabolisme du tryptophane et à la génération de produits métaboliques toxiques pour les LT CD8⁵⁷⁹⁻⁵⁸¹, ainsi que TGF- β , qui agit en tant que médiateur immunosuppresseur⁵⁸². Tous ces médiateurs, ensemble, diminuent l'activité des LT CD8 et leur capacité d'élimination tumorale.

1.2.7.9. Les immunothérapies visant les LT CD8 lors d'une réponse immune chronique

Les immunothérapies sont utilisées en tant que stratégies d'augmentation de l'activité du SI lors d'une infection chronique ou d'une réponse antitumorale. Parmi les immunothérapies courantes, on retrouve l'utilisation de cytokines pro-inflammatoires (IL-2), l'utilisation des Ac monoclonaux ciblant les RI et leurs ligands, ainsi que les thérapies cellulaires adoptives de LT, de TIL ou de LT avec un récepteur antigénique chimérique (CAR).

1.2.7.9.1. IL-2

L'effet de l'IL-2 a largement été étudié lors d'infections chroniques ou de réponses antitumorales, car cette cytokine est reconnue pour sa capacité à soutenir la survie, la prolifération et la fonction effectrice des LT CD8³⁰³. Lors d'une infection LCMV Cl13, le traitement avec de

faibles doses d'IL-2 augmente la réponse des LT CD8, diminue leur niveau d'expression de RI et augmente celui de CD44 et de CD127 sans toutefois diminuer la charge virale⁵⁸³. Cette dernière peut néanmoins être diminuée en co-traitement d'IL-2 et d'anti-PD-L1, qui agissent en synergie⁵⁸³. Cette synergie modifie le programme d'épuisement des LT_{EX} au niveau transcriptionnel et épigénétique, favorisant la différenciation de LT_{PEX} en cellules au grand potentiel effecteur⁵⁸⁴. Cet effet est dépendant de la signalisation de l'IL-2 via CD25 spécifiquement, car les formes mutantes d'IL-2 qui ne lient pas CD25, mais plutôt CD122 ou CD132, et le blocage de CD25 avec des Ac, neutralisent l'effet de synergie du traitement⁵⁸⁴.

Toutefois, lors d'une réponse immunitaire, l'IL-2 n'agit pas seulement sur les LT CD8, mais aussi sur les Treg⁵⁸⁵⁻⁵⁸⁷ qui, une fois amplifiées par l'IL-2, peuvent ensuite diminuer l'activation des LT CD8. C'est pourquoi plusieurs stratégies visant à livrer l'IL-2 spécifiquement aux LT CD8 et non aux Treg ont été mises en place. Dans certains cas, une stratégie de diminution de l'affinité de l'IL-2 envers CD25 tout en augmentant celle pour CD122 a permis l'élaboration d'une forme modifiée d'IL-2 (IL2v ou sum-IL-2) qui lie préférentiellement les LT CD8 et augmente la réponse antitumorale⁵⁸⁸⁻⁵⁹⁰. Il y a aussi eu élaboration d'une forme d'IL-2 de faible affinité pour CD25, couplée avec l'anti-PD-1, qui lie peu les Treg et augmente le contrôle tumoral via l'augmentation de l'activité effectrice des LT_{EX} tumoraux sans besoin de lier CD25^{591,592}.

1.2.7.9.2. Ac monoclonaux visant les RI ou leurs ligands lors d'une réponse antitumorale

L'utilisation des Ac monoclonaux ciblant les RI ou leurs ligands permettent d'augmenter l'activité antitumorale du SI et sont utilisés dans le traitement de cancers humains. Ainsi, il existe des Ac ciblant PD-1 (nivolumab, pembrolizumab, etc), PD-L1 (atezolizumab, avelumab), CTLA-4 (ipilimumab, tremelimumab), etc. Ces Ac anti-RI sont utilisés seuls ou en combinaison à de multiples anti-RI afin d'augmenter l'efficacité du traitement⁵⁹³. L'efficacité variable de ces cibles thérapeutiques en fonction de l'Ac utilisé ou du type de cancer traité reste à élucider⁵⁹⁴. Dans le cas des Ac anti-PD-1 ou anti-CTLA-4, il a été déterminé que ces deux types de traitements agissent de façon différente. L'anti-PD-1 agit surtout sur une sous-population de LT CD8, tandis que l'anti-CTLA-4 module l'activité de sous-populations de LT CD8, de Treg et de LT CD4 effecteurs (Th1 ICOS⁺)⁵⁹⁵. Excluant l'activation du SI, les Ac monoclonaux visant les RI causent des effets

secondaires, parmi lesquels on peut nommer l'activation de réactions auto-immunes, la production systémique de cytokines inflammatoires ainsi que des problèmes du système gastro-intestinal⁵⁹⁶.

Anti-CTLA-4

La neutralisation de CTLA-4 chez la souris porteuse de carcinomes ou de fibrosarcomes augmente la réponse immunitaire antitumorale et contribue à une mémoire immunologique envers les tumeurs rejetées⁵⁹⁷. La même stratégie de traitement, utilisée dans d'autres modèles de tumeurs, a eu un moindre succès, spécifiquement dans les modèles de tumeurs moins immunogéniques (mélanome B16⁵⁹⁸, carcinome mammaire SM1⁵⁹⁹).

L'anti-CTLA-4 a été le premier Ac monoclonal visant un RI à avoir été approuvé pour l'utilisation chez l'humain dans le traitement du mélanome avancé^{600,601}. L'anti-CTLA-4 ipilimumab est utilisé pour le traitement contre des mélanomes avancés (stades III/IV) non opérables chez l'humain^{601,602}, ce traitement ayant des effets bénéfiques sur la survie de certains patients à long terme⁶⁰³. L'anti-CTLA-4 tremelimumab a une faible efficacité dans les traitements de mélanome⁶⁰⁴, mais il est efficace dans d'autres types de cancers⁶⁰⁵ ou en co-traitement avec le durvalumab (anti-PD-L1) dans le cas de carcinome hépatocellulaire⁶⁰⁶. L'ipilimumab cause plusieurs effets secondaires à cause de sa forte capacité d'activation du SI. Parmi ces effets secondaires, il y a notamment une aggravation des maladies auto-immunes (sclérose en plaques, colite ulcéreuse, arthrite rhumatoïde, etc.), des problèmes liés au système gastro-intestinal (ulcères, œsophagite, colite, gastrite, diarrhée, etc.), de la toxicité au foie et de la dermatite⁶⁰⁷.

Anti-PD-L1

L'expression de PD-L1 par les cellules tumorales constitue un de leurs mécanismes d'évasion immunitaire^{608,609} et cette expression est associée à une faible activité des LT CD8 envers les tumeurs *in vitro* ou *in vivo*^{608,610}. PD-L1 peut aussi être exprimé par les LT⁶¹¹, ainsi que les cellules myéloïdes infiltrant les tumeurs⁶¹² et son expression est associée à un faible pronostic pour les patients atteints de mélanome, de cancer du sein ou des ovaires⁶¹³⁻⁶¹⁵. La signalisation de PD-L1 dans les LT effecteurs diminue leur activation et favorise la tolérance envers les cellules tumorales⁶¹¹. Particulièrement, dans les LT CD4, PD-L1 diminue l'activation et la capacité de différenciation des Th1 tout en favorisant celle des Th17, alors que dans les LT CD8, PD-L1 favorise l'apparition d'un état dysfonctionnel caractérisé par la perte de l'expression de T-bet et

d'IFN- γ ⁶¹¹. Aussi, la liaison de PD-1 par PD-L1 exprimé par les LT est suffisante afin de diminuer la fonction de LT PD-1⁺ ainsi que de moduler l'activité de macrophages PD-1⁺⁶¹¹. Les thérapies anti-PD-L1 visent ainsi non seulement l'effet immunosuppresseur de cellules tumorales PD-L1⁺, mais aussi celui de cellules PD-L1⁺ du SI, parmi lesquels il y a les LT CD8.

L'anti-PD-L1 atezolizumab est utilisé dans le traitement de carcinome urothélial humain, son efficacité étant dépendante de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales⁶¹⁶. Son efficacité a aussi été démontrée dans le cas de traitement du cancer de poumon NSCLC⁶¹⁷. Les anti-PD-L1 avelumab ou durvalumab sont non seulement utilisés dans le cas du carcinome urothélial, mais aussi dans le carcinome du rein pour l'avelumab⁶¹⁸ ou le cancer de poumon NSCLC pour le durvalumab⁶¹⁹. Tout comme dans le cas d'autres Ac visant les RI, l'efficacité de ces Ac varie et seulement une partie des patients y répondent. Pour cette raison, beaucoup d'efforts sont fournis pour développer des thérapies combinées d'anti-RI afin d'augmenter l'efficacité du traitement, mais cette stratégie n'est pas toujours efficace. Par exemple, le traitement du cancer NSCLC avec une thérapie combinée de durvalumab et d'anti-CTLA-4 (tremelimumab) a causé chez un patient de la myopathie inflammatoire⁶²⁰, ce qui illustre la puissance et en même temps le danger de ce type de thérapie combinée. Parmi les effets secondaires de l'anti-PD-L1, les plus courants sont les problèmes du système gastro-intestinal, les réactions cutanées, la fatigue et la nausée⁶²¹.

Anti-PD-1

La neutralisation de PD-1, exprimé par les TIL⁶²², vise à diminuer l'épuisement et ainsi à revitaliser les LT CD8 PD-1⁺. Toutefois, cette stratégie de traitement a une efficacité limitée⁶²³, car celle-ci est corrélée à l'expression de PD-L1/PD-L2 dans la tumeur⁶²⁴, à la charge tumorale à traiter⁶²⁵ et à l'infiltration tumorale des LT⁶²⁶.

L'anti-PD-1 pembrolizumab⁶²⁷ et le nivolumab^{628,629} sont utilisés surtout dans le traitement de mélanome humain non-opérable. Le pembrolizumab est efficace dans le traitement du NSCLC⁶³⁰, du carcinome épidermoïde de la tête et du cou⁶³¹ et du lymphome de Hodgkin⁶³². Les effets secondaires induits par l'anti-PD-1 sont relativement faibles, surtout au niveau du système gastro-intestinal, et sont bien tolérés par les patients^{633,634}.

1.2.7.9.3. Les thérapies antitumorales basées sur l'utilisation des LT

Les thérapies cellulaires adoptives (ACT) de LT sont basées sur le traitement du patient en utilisant ses propres LT préalablement extraits de son sang ou de sa tumeur afin d'être activés et amplifiés *in vitro*. Plusieurs types d'ACT existent ; d'une part, il y a l'utilisation de LT isolés à partir du sang ou de la tumeur du patient et leur activation *in vitro* avec des cytokines et des collections des peptides associés aux Ag exprimés par les cellules tumorales. D'autre part, il existe des thérapies basées sur l'utilisation des cellules T exprimant des CAR.

LT périphériques activés *in vitro*

Parmi les LT CD8 du sang, il y a un faible nombre de cellules spécifiques antitumorales. Afin d'activer ces cellules et les amplifier *in vitro*, les LT CD8 sont extraits à partir du sang de patients et activés *in vitro* en présence d'une collection de peptides associés à des Ag exprimés par les cellules tumorales⁶³⁵ et de cytokines (IL-2, IL-12, IL-7, IL-15⁶³⁶ et IL-21^{636,637}). Toutefois, lorsque transférés chez le patient, les LTE ainsi générés *in vitro* s'épuisent et déclinent, ce qui limite leur efficacité thérapeutique^{638,639}. La recherche actuelle vise à modifier les conditions d'activation et d'expansion des LT CD8 du sang *in vitro* afin de générer des LTE fonctionnels avec des capacités de persistance à long terme⁶³⁹.

LT tumoraux activés *in vitro*

L'ACT basée sur l'utilisation de TIL vise à isoler les LT_{EX} à partir d'une biopsie tumorale, à les réactiver *in vitro* (stimulation anti-CD3 et IL-2) et à les infuser par la suite aux patients⁶⁴⁰⁻⁶⁴³. Ainsi, parmi les TIL extraits d'une tumeur solide, il y a les LT_{EX} spécifiques aux Ag tumoraux⁶⁴⁴ qui seront stimulés et amplifiés *in vitro*. Cette thérapie est prometteuse par son principe, mais difficile à rendre efficace à cause de l'épuisement des TIL et de la difficulté à les revitaliser⁶⁴⁵.

CAR-T

Les CAR-T sont des LT du patient génétiquement modifiées afin d'exprimer un CAR qui reconnaît un Ag tumoral et de permettre l'élimination de la cellule qui l'exprime. L'efficacité d'un CAR-T dépend de sa capacité à activer la signalisation intracellulaire du LT et à moduler son activité et sa différenciation.

Le récepteur CAR est composé d'une chaîne extracellulaire variable d'un Ac (scFv) couplée aux domaines de signalisation du TCR intracellulaires. La première génération de CAR-T était constituée du scFv et de la chaîne CD3 ζ ⁶⁴⁶. Dans la deuxième génération, un domaine intracellulaire de signalisation d'une molécule de co-stimulation (CD28, ICOS, etc.) a été ajouté. Dans la troisième génération, un deuxième domaine intracellulaire de signalisation d'une molécule de co-stimulation (4-1BB) a été inclus. La quatrième génération incorpore d'autres transgènes immunomodulateurs comme l'IL-12 ou l'IL-18⁶⁴⁷⁻⁶⁴⁹. Les nouvelles générations de CAR-T visent ainsi à augmenter l'activité de ces cellules et leur potentiel LTM tout en diminuant leur niveau d'épuisement.

Les CAR-T sont généralement efficaces contre les cancers du sang, tout particulièrement dans le cas de la leucémie lymphoblastique aiguë (ALL) où les cellules leucémiques expriment CD19 ou CD20 et peuvent facilement être ciblées par des CAR-T dans la circulation sanguine⁶⁵⁰⁻⁶⁵³. Parmi les effets secondaires des CAR-T lors du traitement de l'ALL, il y a le syndrome de la libération de cytokines, la neurotoxicité ainsi que l'aplasie des cellules B, qui peuvent être déplétées du sang des patients traités avec des CAR-T ciblant CD19 ou CD20 pendant des années⁶⁵⁴. Malgré le succès de traitement de l'ALL avec des CAR-T, une partie des patients rechute (10 à 30 % selon les études cliniques), l'une des principales causes étant la faible persistance des CAR-T *in vivo*^{655,656}, ce qui représente une des grandes limites de ces cellules^{657,658}. Il a été observé que la lymphodéplétion effectuée lors du traitement de l'ALL avec des CAR-T améliore leur persistance et l'efficacité du traitement anti-leucémique⁶⁵⁹.

Une autre grande limite des CAR-T est leur faible efficacité dans le cas de traitements des cancers solides^{660,661} à cause de la nécessité de l'infiltration tumorale par les CAR-T ainsi que leur épuisement induit par l'environnement tumoral^{658,662}. Aussi, l'activité de ces cellules est limitée par l'hétérogénéité des cellules tumorales et par la perte de l'expression de l'Ag pour lequel les CAR-T sont spécifiques^{658,663}. Une autre limite des CAR-T est la nécessité de leur imposer la reconnaissance d'un Ag très précis pour lequel le récepteur CAR-T est spécifique, et la capacité de ces cellules à avoir une réactivité croisée envers d'autres Ag endogènes, qui peuvent induire une forte cytotoxicité^{657,658,663-665}. Ainsi, ces cellules peuvent induire des effets secondaires, en commençant par le syndrome de relargage de cytokines inflammatoires, la neurotoxicité et même le décès dans des cas d'immunotoxicité sévère⁶⁶⁶. À long terme, les CAR-T peuvent aussi entraîner

une cytopénie des cellules exprimant des Ag ciblés par leur récepteur CAR (par exemple dans le cas d'ALL à cellules B, où les CAR-T ciblent les LB qui expriment CD19), ce qui augmente le risque d'infections opportunistes⁶⁶⁷.

1.2.7.10. Revitalisation des LT_{EX}

La découverte du mode de fonctionnement des RI a ouvert de nouveaux horizons quant aux possibilités de régulation de l'activation des LT CD8^{597,668} qui impliquent l'utilisation d'Ac bloquants les RI ou leurs ligands. Ainsi, le ciblage de ces RI permettent de restaurer la réponse immunitaire lors d'une infection chronique ou d'une réponse antitumorale. Toutefois, il a été déterminé que tous les LT_{EX} ne répondent pas lors d'une thérapie anti-RI, l'efficacité de ces thérapies étant dépendante du profil transcriptionnel et épigénétique de ces cellules.

Initialement, il a été montré que le traitement à l'anti-PD-L1 lors d'une réponse immunitaire chronique induit la réponse d'une sous-population de LT_{EX} exprimant un niveau intermédiaire de PD-1 sans avoir d'impact sur les LT_{EX} qui expriment de forts niveaux de ce RI⁶⁶⁹. Des études plus avancées ont permis de restreindre le phénotype des LT_{EX} qui répondent aux thérapies visant l'axe PD-1/PD-L1. Ainsi, ces cellules expriment le FT TCF-1⁴⁷², CXCR5^{473,478} et SLAMF-6⁴⁷¹, soit les marqueurs qui définissent les LT_{PEX}. Lors d'une réponse antitumorale, il y a encore un débat sur la localisation des LT_{PEX} qui soutiennent la réponse des LT CD8 aux thérapies anti-RI. Certaines études ont montré une nécessité d'un afflux continu de ces cellules à partir de GL drainants⁴⁸⁰, tandis que d'autres soutiennent que les LT_{PEX} résidents des tumeurs sont suffisants au contrôle tumoral^{644,670}. Une autre étude soutient que les deux sites sont importants lors de la réponse antitumorale, les GL drainants soutenant l'activation initiale des LT CD8, alors que dans les tumeurs a lieu la co-stimulation et l'acquisition du programme effecteur et cytotoxique de ces LT CD8 activés⁶⁷¹.

Les thérapies d'anti-RI agissent non seulement sur les LT_{PEX} spécifiques aux tumeurs (PD-1⁺), mais aussi sur les précurseurs de ces cellules (PD-1⁻) infiltrant les tumeurs⁶⁷², ainsi que sur les autres cellules de l'environnement tumoral (Treg⁶⁷³, MDSC⁶⁷⁴, cellules tumorales⁶⁷⁵, etc.). Par exemple, la neutralisation de PD-L1 sur les cellules tumorales diminue l'activité de mTOR et de la glycolyse, ce qui rend le glucose plus disponible dans l'environnement tumoral⁶⁷⁵ et augmente l'activité métabolique et effectrice des LT CD8^{675,676}.

Une des limites des thérapies anti-RI est basée sur le programme épigénétique des LT_{EX}⁴⁷⁵, qui est distinct des autres populations de LT CD8 (LTE, LTM)⁴⁷⁶. Parmi ces modifications épigénétiques, il y a la méthylation *de novo* des LT_{EX}⁴⁷⁷. La Dnmt3a participe à la méthylation *de novo* de *Tbx21*, de *Tcf7* (codant respectivement pour T-bet et TCF-1) et d'*Ifng*, ce qui diminue la capacité de réponse de ces cellules et limite l'efficacité d'une thérapie anti-PD-L1⁴⁷⁷. L'efficacité du traitement anti-RI est aussi dépendant de substrats métaboliques impliqués dans la modification de la chromatine. Ainsi, l'activité du FT Bhlhe40 soutient la production de métabolites (acétyl coenzyme-A) qui maintiennent un état épigénétique fonctionnel des LT CD8 et est critique à l'efficacité du traitement anti-PD-L1⁶⁷⁷.

1.3. Le récepteur nucléaire NR4A3

1.3.1. Les récepteurs nucléaires

1.3.1.1. Généralités

Les récepteurs nucléaires (RN) sont des molécules intracellulaires et facteurs de transcription (FT) dont l'activité ou l'expression sont dépendantes de ligands ou de stimuli extracellulaires. Ces molécules ont une structure relativement conservée, ce qui a permis la découverte de plusieurs RN en se basant sur leur séquence nucléique uniquement. Chez l'humain, il y a 48 RN, et 49 chez la souris⁶⁷⁸. Les RN ont pour fonction de réguler le développement, la croissance cellulaire, le métabolisme, l'inflammation, la différenciation, les rythmes circadiens ainsi que la reproduction de l'organisme⁶⁷⁹⁻⁶⁸³.

Les RN agissent en tant que récepteurs intracellulaires qui permettent la transduction d'un signal reçu sous forme d'un ligand ou d'une stimulation extracellulaire vers un changement de programme transcriptionnel de la cellule. Ainsi, les RN participent à la communication cellulaire où les ligands de ces récepteurs peuvent être produits et sécrétés par des cellules avoisinantes ou éloignées. Ces ligands peuvent être des hormones, des molécules lipophiles qui traversent la membrane cellulaire ou sont transportées de façon active⁶⁸⁴, ou même des métabolites cellulaires dans le cas de certaines RN orphelins⁶⁸⁵.

Un exemple classique d'une réponse à une stimulation par un RN est le mode d'action du récepteur aux glucocorticoïdes, GR (NR3C1). En absence de son ligand, ce RN se trouve dans le cytoplasme de la cellule sous forme inactive en raison de sa liaison à une protéine de choc thermique (HSP, « *heat shock protein* »). Lorsque son ligand spécifique s'y lie, un changement de conformation structurelle du GR cause le relâchement de la HSP et l'exposition du signal de localisation au noyau. Une fois transloqué dans le noyau, ce RN dimérise et lie ses motifs de liaison à l'ADN afin d'induire un programme transcriptionnel qui lui est spécifique⁶⁸⁵⁻⁶⁸⁷. Toutefois, cette vision classique du mode de fonctionnement des RN n'est pas nécessairement applicable à tous ses récepteurs. Certains RN n'ont pas de ligands et sont nommés « RN orphelins ». L'activité de ces RN orphelins est régulée via l'induction de leur expression (voir plus en détail à la section 1.3.1.4).

Ainsi, parmi les RN, certains ont des ligands biologiques connus, d'autres sont orphelins et même suspectés de ne lier aucun ligand naturel, et plusieurs RN finissent par être adoptés lorsque leur ligand est identifié. Dans tous les cas, le mode de fonctionnement des RN, basé sur le type cellulaire qui les exprime ainsi que le contexte moléculaire dans lequel chaque RN agit, complexifie la compréhension du mécanisme d'action de ces molécules. C'est pourquoi l'étude des RN est encore un champ ouvert pour la recherche. De plus, le fait que les ligands de ces récepteurs sont souvent des petites molécules lipophiles capables de facilement traverser la membrane plasmique augmente leur intérêt en tant que cibles pharmacologiques où la modulation de leur activité par des composés chimiques pourrait être exploitée dans un contexte pathologique.

1.3.1.2. Classification des récepteurs nucléaires

Il existe plusieurs types de classification des RN. La première classification a été basée sur leur capacité à lier un ligand naturel, tandis que la deuxième a été plutôt basée sur les études phylogéniques de ces FT. Ainsi, selon la première classification, on distingue les RN ayant un ligand biologique connu, les RN orphelins (sans ligand biologique connu ou dont la fonction est indépendante d'un ligand biologique) et les RN adoptés, soit les RN dont les ligands ont été identifiés par la suite de leur étude (par exemple PPAR α , PPAR β , PPAR γ , LXR α , LXR β , ROR, RXR). La deuxième classification a permis de regrouper les RN en 7 familles (de NR0 à NR6) selon l'analyse de leur séquence nucléique (Tableau 1). Cette dernière classification est recommandée pour l'usage actuel.

Tableau 1. – Récepteurs nucléaires. Adapté d'Ian Mitchell S. de Vera *et al.*⁶⁸⁸

Nom du récepteur	Abréviation usuelle	Nom commun	Ligands ou inducteurs
NR1A1	THR α	récepteur bêta des hormones thyroïdiennes	hormones thyroïdiennes
NR1A2	THR β	récepteur alpha des hormones thyroïdiennes	hormones thyroïdiennes
NR1B1	RAR α	récepteur de l'acide rétinoïque alpha	acide rétinoïque

NR1B2	RAR β	récepteur de l'acide rétinolique bêta	acide rétinolique
NR1B3	RAR γ	récepteur de l'acide rétinolique gamma	acide rétinolique
NR1C1	PPAR α	récepteur alpha activé par les proliférateurs de peroxyosomes	acides gras et prostanoides
NR1C2	PPAR β	récepteur bêta activé par les proliférateurs de peroxyosomes	acides gras et prostanoides
NR1C3	PPAR γ	récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes	acides gras et prostanoides
NR1D1	Rev-erb- α	REV-ERB alpha	hème
NR1D2	Rev-erb- β	REV-ERB beta	hème
NR1F1	ROR α	récepteur alpha orphelin de type RAR alpha	dérivés de stérols SR1001; mélatonine; CGP52608
NR1F2	ROR β	récepteur alpha orphelin de type RAR bêta	acides rétinoliques tout-trans; mélatonine
NR1F3	ROR γ	récepteur alpha orphelin de type RAR gamma	dérivés de stérols SR1001; mélatonine; 3CI-AHPC; CGP 52608
NR1H2	LXR β	récepteur bêta X du foie	oxystérols
NR1H3	LXR α	récepteur alpha X du foie	oxystérols
NR1H4	FXR α	récepteur alpha farnésolide	acides biliaires
NR1H5	FXR β	récepteur bêta farnésolide	acides biliaires
NR1I1	VDR	récepteur de vitamine D	vitamine D
NR1I2	PXR	récepteurs prégnane X	xénobiotiques
NR1I3	CAR	récepteur constitutif des androstanes	xénobiotiques
NR2A1	HNF4 α	facteur nucléaire 4 du récepteur alpha des hépatocytes	inconnu
NR2A2	HNF4 γ	facteur nucléaire 4 du récepteur gamma des hépatocytes	inconnu
NR2B1	RXR α	récepteur X rétinolide alpha	acide rétinolique 9-cis
NR2B2	RXR β	récepteur X rétinolide bêta	acide rétinolique 9-cis
NR2B3	RXR γ	récepteur X rétinolide gamma	acide rétinolique 9-cis
NR2C1	TR2	récepteur testiculaire 2	inconnu
NR2C2	TR4	récepteur testiculaire 4	inconnu
NR2E1	TLX	homologue du Tailless	inconnu
NR2E3	PNR	récepteur nucléaire spécifique au photorécepteur	inconnu

NR2F1	COUP-TFI	Facteur de transcription I COUP	inconnu
NR2F2	COUP-TFII	Facteur de transcription II COUP	inconnu
NR2F6	EAR2	Facteur de transcription III COUP	inconnu
NR3A1	ER α	récepteur d'œstrogène alpha	œstrogènes
NR3A2	ER β	récepteur d'œstrogène bêta	œstrogènes
NR3B1	ERR α	récepteur alpha relié à l'œstrogène	isoflavones, octochlorocamphene; chlordane; XCT790 diethylstilbestrol
NR3B2	ERR β	récepteur bêta relié à l'œstrogène	isoflavones, 4- hydroxytamoxifène; diethylstilbestrol; GSK4716
NR3B3	ERR γ	récepteur gamma relié à l'œstrogène	isoflavones, 4- hydroxytamoxifène; diethylstilbestrol; GSK4716
NR3C1	GR	récepteur glucocorticoïde	glucocorticoïdes
NR3C2	MR	récepteur de minéralocorticoïdes	minéralocorticoïdes
NR3C3	PR	récepteur de progestérone	progestérone
NR3C4	AR	récepteur d'androgènes	androgènes
NR4A1	NUR77	récepteur nucléaire orphelin Nur77	6-mercaptopurine; cytosporone B; acides gras insaturés; lipopolysaccharide, ADN mitochondrial
NR4A2	NURR1	récepteur nucléaire orphelin Nurr1	6-mercaptopurine; cytosporone B; acides gras insaturés
NR4A3	NOR1	récepteur nucléaire orphelin Nor-1	6-mercaptopurine; cytosporone B; acides gras insaturés
NR5A1	SF1	facteur stéroïdogénique 1	phosphatidylinositols
NR5A2	LRH-1	homologue 1 du récepteur du foie	phosphatidylinositols; phospholipides; GSK8470
NR6A1	GCNF	facteur nucléaire 1 de cellules germinales	inconnu
NR0B1	DAX-1	récepteur nucléaire DAX-1	inconnu
NR0B2	SHP	petit partenaire hétérodimérique	inconnu

1.3.1.3. Structure des récepteurs nucléaires

La structure des RN est très conservée. Elle est formée de plusieurs domaines moléculaires, notamment le domaine N-terminal non-structuré qui est nommé le domaine d'activation 1 (AF-1),

le domaine de liaison à l'ADN (DBD ou « *DNA binding domain* »), le domaine de liaison au ligand situé dans la portion C-terminale (LBD), où dans certains cas se trouve un deuxième domaine d'activation (AF-2), ainsi qu'une charnière moléculaire (« *hinge* ») qui relie le DBD au LBD (Figure 4)⁶⁸⁹.

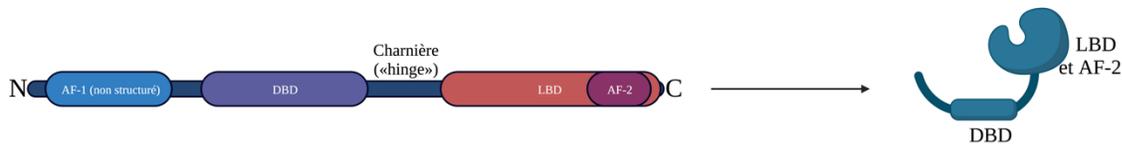


Figure 4. – Représentation schématique de la structure d'un RN et de ses domaines moléculaires sous forme linéaire et repliée. À gauche, on observe la structure linéaire d'un RN qui est formé d'un domaine non-structuré de transactivation AF-1 dans le N-terminal, un domaine hautement conservé de liaison à l'ADN (DBD), suivi par une charnière moléculaire non-structurée qui fait la liaison du DBD avec le domaine de liaison au ligand (LBD) et un deuxième domaine de transactivation (AF-2) en C-terminal. À droite, on observe la structure schématisée d'un repliement du RN, avec ses domaines structurés (DBD et LBD avec AF-2) et non-structurés (AF-1 et la charnière moléculaire). Figure créée avec BioRender.

1.3.1.4. Modes d'activation des récepteurs nucléaires

Les RN peuvent lier l'ADN sous forme de monomères, d'homodimères ou d'hétérodimères en se liant aux motifs de liaison à l'ADN (aussi appelés éléments de réponse au RN) qui leur sont spécifiques. L'activation du RN peut être dépendante de la liaison du ligand au RN (par exemple ER α , ER β , GR, etc.), de modifications post-traductionnelles (phosphorylation, sumoylation)⁶⁹⁰ ou, dans le cas des RN orphelins, cette régulation peut être médiée par la transcription rapide du gène codant le RN menant à sa fonction immédiate.

Les modes de régulation de l'activité des RN par leur ligand peuvent être via la transactivation dépendante du ligand (par exemple les RN stéroïdiens), la répression indépendante du ligand (par exemple RXR, LXR, PPAR), ou la transrépression dépendante du ligand (par exemple PPAR, LXR) (Figure 5). Certains RN, notamment les RAR⁶⁹¹, PPAR^{692,693} et LXR⁶⁹⁴, peuvent lier l'ADN et réguler la transcription génique en présence et en absence de leur ligand, et,

tout dépendamment de la présence de celui-ci, ces RN vont lier des coactivateurs ou des corépresseurs de la transcription génique^{695,696}. Dans le cas de la répression indépendante du ligand, le domaine AF-2 du RN régule l'interaction avec le ligand ou le corépresseur. En absence du ligand, le domaine AF-2 (en C-terminal) lie le corépresseur et diminue l'expression génique de gènes cibles, alors qu'en présence du ligand, la structure du domaine AF-2 change et empêche l'interaction avec le corépresseur, ce qui permet l'augmentation de l'expression de gènes cibles. La transrépression dépendante du ligand régule l'activité de différents FT : la liaison du ligand au RN induit son effet inhibiteur sur l'activité transcriptionnelle du FT cible (Figure 5). Un exemple de transrépression dépendante du ligand est la régulation de l'activité de NF- κ B par le récepteur aux glucocorticoïdes (GR ou NR3C1)^{697,698}.

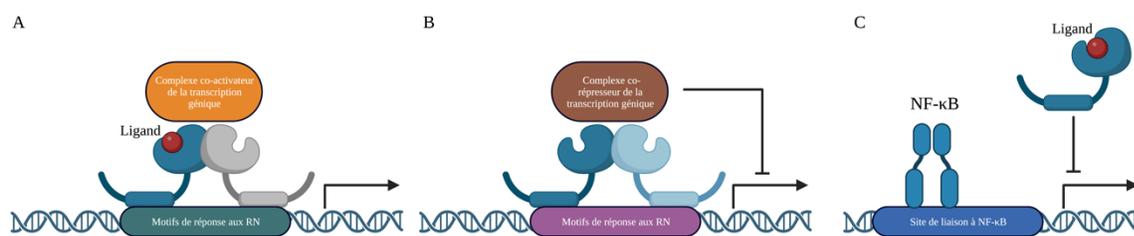


Figure 5. – Modes de régulation des RN par le ligand.

A. Activation de la transcription génique dépendante de la liaison du ligand. La liaison du ligand au RN permet le recrutement de celui-ci à l'ADN, où le RN lie ses motifs de liaison et recrute le complexe de co-activation transcriptionnelle. **B.** Répression de la transcription génique indépendante de la liaison du ligand. Certains RN sont capables de lier l'ADN en absence du ligand et de recruter de complexes de co-répression transcriptionnelle, ce qui empêche la transcription de gènes cibles. **C.** La transrépression dépendante du ligand. Certains RN sont capables de diminuer l'activité d'autres FT suite à la liaison de leur ligand. Figure inspirée de Glass *et al.*⁶⁹⁹ et créée avec BioRender.

1.3.1.5. Ligands des récepteurs nucléaires

Contrairement aux ligands qui lient les récepteurs extracellulaires, les ligands des RN doivent pénétrer la cellule afin d'interagir avec ceux-ci, c'est pourquoi ils ont souvent des propriétés lipophiles (voir Tableau 1). Certains médicaments exploitent les propriétés des RN afin de moduler leur activité. Par exemple, la dexaméthasone et la prednisolone ciblent le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) et sont largement utilisés afin de diminuer l'inflammation^{700,701}. Le défi pharmacologique des médicaments qui ciblent les RN est de développer des molécules capables de cibler un seul RN de façon spécifique.

1.3.1.6. Rôles des récepteurs nucléaires

Le rôle de différents RN dans une cellule peut être varié et dépend du type cellulaire ainsi que de son stade de développement ou de différenciation. HNF4 α (NR2A1) est impliqué dans la régulation du développement du foie⁷⁰², GCNF (NR6A1), dans le développement embryonnaire^{703,704}, LRH-1 (NR5A2) participe à la régulation du métabolisme du cholestérol^{705,706}, alors que SF-1 (NR5A1), dans la stéroïdogénèse^{707,708}. Les récepteurs aux stéroïdes, notamment aux androgènes (NR3C4 ou AR), aux estrogènes (NR3A1 et NR3A2 ou ER1 et ER2) et aux progestérones (NR3C3 ou PR), participent au développement et à la fonction du système reproductif. Le récepteur aux glucocorticoïdes (NR3C1 ou GR) participe à la régulation du métabolisme et de l'inflammation, alors que celui aux minéralocorticoïdes (NR3C2 ou MR), au maintien de l'équilibre de l'eau et des sels minéraux de l'organisme. D'autres RN ont des rôles dans la régulation du rythme circadien. Ainsi, les Rev-erb et les ROR participent à la régulation de l'expression de gènes qui régulent le rythme circadien (CLOCK/Bmal1)^{682,709}.

Certains RN peuvent réguler la fonction et la différenciation de plusieurs types de cellules du SI inné et adaptatif, incluant les LT CD4 et les LT CD8. Ainsi, LXR β (NR1H2), qui est un régulateur du cholestérol, régule le maintien, l'homéostasie et l'activité des Treg⁷¹⁰. LRH-1 (NR5A2), connu pour réguler le métabolisme de glucose et des lipides ainsi que de la synthèse des glucocorticoïdes intestinaux, est important dans le soutien de la prolifération induite par une stimulation antigénique des LT CD4 et dans le maintien du contrôle viral par les LT CD8⁷¹¹. NR2F6 (EAR2) diminue la réponse et la production de cytokines par les LT CD4 et CD8 lors d'une réponse antitumorale^{712,713}, ce qui a permis d'identifier ce RN en tant que cible dans les thérapies

cellulaires. En effet, dans le cas de NR2F6, ce RN agit en tant que régulateur négatif de la capacité de production de cytokines par les LT, et sa délétion permet d'améliorer le contrôle tumoral et d'augmenter l'efficacité du traitement avec des Ac ciblant les RI chez la souris^{712,714}. Il est important de mentionner que les LT répondent aussi aux hormones sexuelles (estrogènes, androgènes, progestérones^{715,716}) via l'expression de leur récepteurs respectifs, ainsi que dans des cas exceptionnels, via le GR^{715,716}. L'effet des hormones sexuelles sur les LT a lieu dès leur développement thymique et jusqu'à leur différenciation dans la périphérie⁷¹⁷⁻⁷²⁰. Par exemple, l'expression du FT Aire, qui régule l'expression ectopique des Ag de tissus dans les cellules mTEC du thymus et qui soutient la sélection négative des LT, est dépendante des hormones sexuelles⁷²¹. Il a été déterminé que l'androgène augmente⁷²¹ l'expression d'*Aire* dans le thymus, alors que l'estrogène la diminue⁷²². De plus, les LT eux-mêmes expriment les récepteurs à ces hormones⁷²³⁻⁷²⁵, leur effet n'étant toutefois pas toujours clair, surtout dans le cas de l'effet de l'estrogène, dont la production chez les femmes est dépendante du cycle menstruel. Certaines études ont montré que les récepteurs aux estrogènes favorisent la réponse cytotoxique des LT CD8⁷²⁶ et la différenciation des LT CD4 en Th1 plutôt qu'en Th2⁷²⁷⁻⁷²⁹. La progestérone, quant à elle, a plutôt une action anti-inflammatoire, de diminution de la production de cytokines et de chimiokines par les LT CD8^{730,731}, alors que l'androgène diminue leur fonction et capacité de prolifération⁷³² tout en favorisant la différenciation des Treg^{719,733} et des Th2 aux dépens des Th1⁷³⁴. Lors d'une réponse anti-tumorale il a été montré que l'androgène favorise l'épuisement des LT CD8 et induit une résistance envers les thérapies ICB via la régulation de l'expression de *Tcf7* (codant pour TCF-1) ainsi que des molécules effectrices⁷³⁵⁻⁷³⁸.

En conclusion, les RN représentent une famille de FT qui participent à la régulation du développement, de la différenciation et de la fonction de différents types cellulaires, incluant celle du SI. Une exploration des rôles des différents RN lors d'une réponse immunitaire ainsi que des processus pathologiques dans lesquels ces RN sont impliqués peut ouvrir de nouvelles perspectives sur la modulation de la réponse immunitaire ainsi que des nouvelles stratégies de traitement de pathologies.

1.3.2. Les récepteurs nucléaires orphelins

Mis à part l'absence de ligand naturel défini, les RN orphelins ont quelques caractéristiques communes. Notamment, la fonction biologique de ces RN n'est pas complètement définie, car l'absence du ligand ne permet pas d'identifier leur fonction physiologique ou pathophysiologique. La structure du RN orphelin diffère de celle d'un RN classique. Ainsi, la poche du domaine de liaison de ligand (LBD) est plus large, ce qui permet la liaison de différents ligands, ou alors la structure de celle-ci est trop petite ou stringente pour en accueillir⁷³⁹. Habituellement, les RN orphelins se lient à l'ADN sous forme de monomère^{681,739} et leur activité est régulée de façon transcriptionnelle ou post-traductionnelle (phosphorylation ou sumoylation)^{690,698}.

1.3.3. La famille des récepteurs nucléaires orphelins NR4A

Les récepteurs NR4A constituent une famille de RN orphelins composée de trois membres : NR4A1 (Nur77), NR4A2 (Nurr1) et NR4A3 (Nor-1). Les NR4A agissent en tant que FT et participent à la régulation de différents processus de la cellule, comme l'apoptose, la survie, la prolifération, la réparation de l'ADN, le métabolisme, ainsi que la différenciation cellulaire, l'inflammation et l'angiogenèse^{740,741}.

1.3.3.1. Motifs de liaison à l'ADN

Les NR4A lient le motif de liaison à l'ADN NBRE ('5-AAAAGGTCA-3') en tant que monomère et le motif NurRE ('5-TGATATTTX₆AAATGCCCA-3') en tant qu'homodimère^{742,743}. Dans certains cas, NR4A1 et NR4A2 peuvent former des hétérodimères avec les RN RXR⁷⁴⁴⁻⁷⁴⁶.

1.3.3.2. Induction de l'expression des NR4A

Les NR4A sont des gènes de réponse immédiate et leur expression est rapidement induite suite à une variété de stimuli. Notamment, elle peut être induite par les signaux d'inflammation, les acides gras, les facteurs de croissance ou le stress mécanique⁷⁴⁷⁻⁷⁴⁹. Parmi les composés chimiques qui induisent l'expression des NR4A, on rapporte le 6-mercaptopurine et la cytosporone

B⁷⁵⁰⁻⁷⁵³ (voir Tableau 1). Chez les LT CD8, la transcription des gènes codant pour les NR4A est induite suite à une stimulation TCR^{61,748,754-756}.

1.3.3.3. Ligands des NR4A

Les NR4A sont considérés comme des RN orphelins. Toutefois, plusieurs ligands chimiques qui peuvent lier ces FT ont été découverts dernièrement, mais dans la majorité des cas, l'action biologique de la liaison de ces ligands sur l'activité des NR4A n'a pas été définie.

Le statut orphelin des NR4A a initialement été défini par des études de leur structure cristallographique. Celles-ci ont mis en évidence que la structure de la poche de liaison du ligand de ces RN est très hydrophobe, ce qui ne permettrait pas d'accommoder un ligand^{757,758}. Toutefois, une étude plus récente par résonance magnétique nucléaire (RMN), technique qui permet l'observation dynamique d'une structure protéique, a permis d'observer des changements de conformation de la poche de liaison du ligand de NR4A2, ce qui ouvre la possibilité de liaison d'un ligand⁷⁵⁹. De plus, des études structurales de la liaison de la prostaglandine A2 (PGA2) à NR4A1 ont permis d'observer la liaison de PGA2 à son domaine de liaison du ligand⁷⁶⁰. Ensemble, ces études remettent en question l'impossibilité de liaison des ligands par les membres de la famille NR4A.

La prostaglandine E1 et A1 (PGE1, PGA1)⁷⁶¹, l'amodiaquine, la chloroquine, la cytosporone B⁷⁶² et le 5,6-dihydroxyindole^{763,764} lient NR4A2, alors que PGA2 lie NR4A1 et NR4A3^{760,765}. Une étude de criblage de ligands du lipopolysaccharide a permis d'identifier NR4A1 en tant que RN qui, dans le cytosol de macrophages, est capable de lier l'ADN mitochondrial double brin ainsi que le lipopolysaccharide afin d'activer l'inflammasome NLRP3 en aval⁷⁴⁹. Malgré la découverte de ces différents ligands des NR4A, il n'existe pas encore de consensus sur l'état orphelin ou adopté de ces RN. Effectivement, l'effet physiologique ou pathophysiologique de la liaison de ces différents ligands n'ont pas encore été démontré, à l'exception des ligands naturels PGE1 et PGA1, qui lient NR4A2 et dont le rôle physiologique de protection des neurones a été défini⁷⁶¹.

La découverte de potentiels ligands des NR4A a ouvert de nouvelles possibilités d'étude de la régulation de leur activité. Ainsi, un composé bis-indole (1,1-bis(30 indolyl)-1-(3-chloro-4-

hydroxy-5-methoxyphenyl)méthane) lie NR4A1 et diminue son expression et celle de PD-L1 dans des lignées cellulaires cancéreuses⁷⁶⁶⁻⁷⁶⁸. Dans un modèle de souris porteuses de tumeurs d'adénocarcinome du sein (41T), le traitement de souris avec ce composé augmente le contrôle tumoral et diminue les capacités métastatiques des tumeurs⁷⁶⁸. L'action de ce composé permet la diminution de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales, ainsi qu'une diminution de la proportion des Treg au sein de la tumeur sans effet sur la proportion de LT CD8, ce qui augmente la réponse immunitaire antitumorale⁷⁶⁸. Cet exemple d'activité antitumorale suite à l'inhibition de l'activité de NR4A1 illustre bien l'intérêt de cibler des molécules NR4A dans un contexte pathologique et souligne la nécessité de l'étude du mode d'action de chaque NR4A dans les différents types cellulaires.

1.3.4. Rôle des NR4A dans d'autres types cellulaires

Les NR4A régulent la biologie de différents types cellulaires. Ces FT sont impliqués dans la régulation du développement de neurones⁷⁶⁹, dans la régulation du métabolisme des fibres musculaires^{770,771} et des cellules hépatiques⁷⁷² et adipeuses⁷⁷³. Les NR4A sont aussi impliqués dans la régulation du métabolisme⁷⁷⁴ et de la prolifération des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins⁷⁷⁵.

Les NR4A régulent la différenciation, la fonction et les capacités de migration de différents types de cellules immunitaires, parmi lesquelles on retrouve les cellules myéloïdes^{776,777} et lymphoïdes^{778,779}. Le rôle des différents NR4A dans la régulation des cellules myéloïdes ne sera pas abordé, puisque mes travaux de recherche se sont concentrés sur le rôle de NR4A3 dans les LT CD8. Les sections suivantes décrivent l'état des connaissances sur le rôle de NR4A3 dans les LT CD4 et les LB.

1.3.4.1. Lymphocytes T CD4

À l'état naïf, les niveaux de transcription de *Nr4a1*, *Nr4a2* et *Nr4a3* sont faibles, mais rapidement induits suite à une stimulation TCR^{755,756,780-784}. Le rôle précis des différents NR4A n'a pas été encore clairement défini dans les LT CD4, mais il est connu que leur expression est relativement faible dans les populations Th1, Th2 et Th17⁷⁸⁵, les transcrits *Nr4a1* et *Nr4a2* étant

enrichis dans les Tfh^{784,785}. Il a été aussi déterminé que tous les transcrits *Nr4a* sont enrichis dans les Treg⁷⁸⁵ (discuté dans la section 1.3.5) et dans les LT CD4 dysfonctionnels^{516,783}, qui sont les LT CD4 dont la fonction a été diminuée via l'induction de la tolérisation⁷⁸³ ou via l'expression de la forme mutée de NFAT, constitutivement active et incapable d'interagir avec AP-1 (CA-RIT-NFAT1), ce qui induit la perte de la fonction de ces cellules⁵¹⁶. Il a été déterminé que les NR4A ne sont pas essentiels à la différenciation des Tfh, car la délétion de tous les membres de la famille *Nr4a* n'affecte pas la différenciation de ces cellules⁷⁸⁴. Toutefois, l'expression de NR4A2 est importante pour la différenciation des Th17⁷⁸⁶. Ainsi, NR4A2 participe à la régulation de la production d'IL-21, qui induit l'expression d'IL-23R afin de soutenir le phénotype Th17 des LT CD4⁷⁸⁶.

NR4A1 est impliqué dans la régulation du métabolisme et de l'activation des LT CD4 ainsi que dans leur potentiel d'autoimmunité ou de tolérance^{781,783}. Ainsi, la délétion de NR4A1 dans les LT CD4 augmente leur capacité proliférative via la régulation de l'expression de gènes du cycle cellulaire⁷⁸¹. Cette délétion augmente aussi les capacités de respiration cellulaire, de glycolyse ainsi que de production de cytokines⁷⁸¹. NR4A1 régule le métabolisme des LT CD4 via la régulation de l'expression de NR0B1, de NR2F1, d'ERR α , d'ERR β et d'ERR γ ⁷⁸¹. Dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), la délétion de NR4A1 dans les LT CD4 mène à une plus forte production d'IL-17 et d'IFN- γ dans le système nerveux central⁷⁸¹. La délétion de l'expression d'*Erra* inverse partiellement le phénotype des LT CD4 *Nr4a1*^{-/-} et diminue leur production de cytokines ainsi que la sévérité de la pathologie d'EAE. Dans une autre étude utilisant le modèle de transfert adoptif des LT CD4 naïfs dans des souris RAG déficientes afin d'induire la colite, les LT CD4 *Nr4a1*^{-/-} sont aussi plus pathologiques⁷⁸³, ce qui suggère que la fonction de NR4A1 est de limiter l'action effectrice des LT CD4 ; la fonction des NR4A dans les Treg sera abordée dans la section 1.3.5.

Effectivement, NR4A1 est impliqué dans la réduction de l'autoimmunité via l'induction de la tolérance des LT CD4⁷⁸³. Le transcrit *Nr4a1* est enrichi chez les LT CD4 tolérants, et la délétion de son expression augmente leur production d'IL-2 et d'IFN- γ ⁷⁸³. Une expérience de CHIP-seq dans un modèle de surexpression de NR4A1 dans les LT CD4 a permis de déterminer que ce FT participe à l'induction de gènes impliqués dans la tolérance et diminue ceux impliqués dans l'activité effectrice des LT CD4 via un mécanisme de compétition de liaison à l'ADN de NR4A1 et des FT

de la famille bZIP, plus spécifiquement AP-1⁷⁸³. Cette évidence n'est pas la première où NR4A1 agit en compétition avec d'autres FT pour la liaison à l'ADN, NR4A1 étant capable de compétitionner avec NF-κB pour la liaison à l'ADN afin de diminuer l'expression de l'IL-2 dans la lignée cellulaire Jurkat (LT CD4 humains)⁷⁸⁷.

Le transcrit *Nr4a2* est enrichi dans les LT CD4 du sang de patients atteints de sclérose en plaque et dans les LT CD4 lors d'une EAE, plus particulièrement dans les LT CD4 IL-17⁺ et IL-17⁺IFN-γ⁺ (cytokines impliquées dans la pathogenèse de l'EAE)^{786,788,789}. Des expériences d'induction de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur spécifique ont permis de déterminer que NR4A2 régule directement le promoteur d'*Ifng* et d'*Il17*⁷⁸⁸, la surexpression du NR4A2 étant capable d'augmenter la production de ces cytokines alors que sa suppression avec des siRNA diminue celle-ci⁷⁸⁸. Les LT CD4 *Nr4a2*^{-/-} ont aussi un moindre potentiel d'induction d'EAE⁷⁸⁸. Ainsi, contrairement à NR4A1, connu pour diminuer la production de cytokines par les LT, NR4A2 augmente celle-ci. Le rôle de NR4A3 dans la différenciation et la fonction des LT CD4 reste à définir (voir annexe 1).

1.3.4.2. Lymphocytes B

Les membres de la famille NR4A sont aussi impliqués dans la régulation de la réponse des LB⁷⁹⁰. L'expression des *Nr4a* s'est trouvée enrichie chez les LB de la zone marginale et chez les précurseurs de ces cellules⁷⁹¹. Tout comme pour les LT, les *Nr4a1-3* sont induits dans les LB suite au signal BCR⁷⁹². *Nr4a1* et *Nr4a3* jouent des rôles redondants afin de limiter la réponse des LB suite à la signalisation BCR en absence de co-stimulation via une restriction de la survie et de la prolifération⁷⁹². Mécanistiquement, NR4A1 réprime l'expression de *Batf* et de *Myc*, ainsi que celle de *Ccl3*, de *Ccl4*, d'*Icam1* et de *Cd86*⁷⁹², molécules importantes pour le recrutement et l'engagement de l'aide CD4 aux LB⁷⁹³⁻⁷⁹⁵, ce qui diminue la capacité d'activation et de prolifération de ces cellules.

L'étude par scRNA-seq de LB ectopiques extraits du liquide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde a permis de déterminer que l'expression des *Nr4a* par les LB corrèle avec une perte de l'état naïf de ces cellules et avec leur expression d'IL-6 et de lymphotoxines α et β, capables d'induire la formation de structures lymphoïdes ectopiques⁷⁹⁶. Ces résultats suggèrent

un rôle important des NR4A dans la régulation d'une réponse adaptative *in situ* lors d'une pathologie.

1.3.5. La régulation des Treg et de la différenciation thymique par les NR4A

La différenciation thymique est un processus complexe où, à partir d'un précurseur thymique précoce, a lieu la différenciation de LT dont le TCR est réactif envers des Ag du non-soi et tolérant envers les Ag du soi. Les FT NR4A ont longtemps été étudiés dans le thymus, où leur importance a été mise en évidence lors de la sélection négative^{797,798} et de la différenciation des Treg^{782,798-800}. Ainsi, les *Nr4a* sont exprimés dans les LT qui subissent la sélection thymique, leur expression étant détectée lors de la sélection positive et négative des LT⁸⁰¹. La surexpression de NR4A1 et de NR4A3 induit l'apoptose des LT dans le thymus^{797,802-804}, cette mort cellulaire pouvant être induite par un programme transcriptionnel⁸⁰⁴ ou par une activité mitochondriale des NR4A. Le mécanisme transcriptionnel a été découvert suite à l'utilisation d'un mutant dominant négatif de NR4A1 (mutant qui empêche la liaison à l'ADN de la protéine native), qui protège de la mort cellulaire les cellules ainsi transduites^{797,802,804}. Le mécanisme mitochondrial de l'induction de l'apoptose a été mis en évidence par la capacité de NR4A1 à lier la molécule pro-survie Bcl-2 et à la rendre pro-apoptotique via l'exposition du domaine BH3 de Bcl-2 dans la mitochondrie^{805,806}. Lors de la différenciation thymique, l'activité des différents membres de la famille NR4A a longtemps été considérée redondante^{797,799}, car la cinétique d'expression de ces FT est très semblable^{61,741,797} et ils lient le même motif de liaison à l'ADN^{742,743}. Toutefois, de nouvelles études suggèrent que ces FT ont une certaine spécificité lors de la différenciation thymique des LT^{798,807,808} (voir annexe 1).

Ainsi, NR4A1 est important dans la différenciation des LT CD8 : la délétion de l'expression de *Nr4a1* n'affecte pas les nombres cellulaires ou la fréquence des LT CD4, mais augmente ceux des LT CD8 tant dans le thymus que la périphérie⁸⁰⁹. Il a été montré que NR4A1 régule l'expression de *Runx3*, un FT qui joue un rôle déterminant dans le développement des LT CD8⁸⁰⁹. NR4A1 recrute le complexe CoREST au promoteur de *Runx3* afin de diminuer l'expression de celui-ci⁸⁰⁹. NR4A1 régule aussi l'expression de *Pdcd1*, *Helios*, *Cd69* et *Bim* lors de la sélection thymique négative^{798,807}. NR4A3, quant à lui, limite l'accumulation des thymocytes autoréactifs dans le thymus⁸⁰⁸. Ainsi, la délétion de NR4A3 dans le thymus mène au développement des SP CD8 plus résistantes à l'élimination par la sélection négative, et ces cellules ont un fort potentiel autoréactif

lorsque transférées dans des souris susceptibles à l'auto-immunité⁸⁰⁸. NR4A1 et NR4A3 peuvent donc avoir des rôles distincts dans le thymus malgré leur induction rapide suite au signal TCR et leur capacité de liaison des mêmes motifs d'ADN (NBRE). Il a aussi été montré que l'expression de ces FT est sensible à la durée et à la force du signal TCR, ce qui pourrait avoir un rôle déterminant dans leur induction et dévoiler une fonction spécifique dans le thymus^{810,811}.

Les NR4A sont des FT très importants dans la différenciation des Treg^{782,798-800,812}. L'absence d'expression de tous les membres de la famille NR4A mène à un défaut complet de la différenciation des Treg thymiques et à une forte auto-immunité⁷⁹⁹. Les NR4A sont impliqués dans la régulation de l'expression de *Foxp3*^{800,813}, un FT clé pour la différenciation des LT régulateurs. La délétion de *Nr4a1*, *Nr4a2* et *Nr4a3* dans le thymus entraîne une perte complète des Treg et une auto-immunité systémique sévère, la délétion de *Nr4a1* et *Nr4a3* ayant un phénotype proche de la triple délétion des *Nr4a*⁷⁹⁹. Toutefois, la délétion concomitante de l'expression de *Nr4a1* et *Nr4a3* peut mener à de l'auto-immunité non-dépendante des Treg thymiques. Cette auto-immunité est due à une brèche du maintien de la tolérance périphérique causée par l'échappement de cellules autoréactives du thymus et par une augmentation du niveau inflammatoire et de la production d'auto-anticorps^{778,814}.

L'expression des *Nr4a* est aussi enrichie dans les Treg de la périphérie^{748,785}, où ces FT maintiennent l'identité des cellules T régulatrices via l'induction de *Foxp3*⁷⁸². La délétion spécifique des trois NR4A dans les Treg diminue le niveau d'expression de *Foxp3* et les capacités immunosuppressives des Treg, ces cellules présentant une augmentation de l'expression de gènes associés à la différenciation Tfh et Th2⁷⁸⁵. Des expériences de CHIP ont permis de déterminer que, dans les LT CD4, NR4A1 augmente l'expression de *Foxp3*, d'*Il2ra* et d'*Ikzf4*⁷⁸⁵. Dans la même étude, il a été montré que NR4A1 diminue l'expression d'*Il4* et d'*Il21* dans les Treg, et NR4A2 diminue celle d'*Il4*⁷⁸⁵. Aussi, lors de la délétion de *Nr4a1* et/ou *Nr4a2*, il n'y a pas de différenciation des Treg inductibles *in vitro*^{782,785}. Lors d'une réponse antitumorale, la délétion de l'expression de ces deux FT dans les Treg augmente le contrôle tumoral⁸¹⁵.

1.3.6. Les récepteurs nucléaires orphelins NR4A dans les LT CD8

L'induction de NR4A dans les LT CD8 suite à la stimulation du TCR^{748,755,810,811} a longtemps suggéré un rôle important de ces molécules. Toutefois, l'implication des NR4A dans la régulation biologique des LT CD8 ne commence qu'à être définie. Des études sur l'expression des *Nr4a* lors d'une stimulation *in vitro* ou *in vivo* ou lors d'une réponse immunitaire aiguë ou chronique ont permis de souligner leur importance dans l'activation des LT CD8, dans leur différenciation effectrice ou mémoire ainsi que dans leur épuisement (voir annexe 1).

1.3.6.1. Cinétique d'expression des *Nr4a*

À l'état de base, l'expression de *Nr4a3* est faible dans les LT naïfs. Toutefois, les LT CD4 expriment 1,54⁶¹ fois plus de *Nr4a3* que les LT CD8 chez la souris (rate), alors que chez l'humain (sang périphérique), ce sont les LT CD8 qui expriment 2,14⁸¹⁶ à 3,20⁸¹⁷ fois plus de *NR4A3* que les LT CD4⁸¹⁸. Des études transcriptomiques dans les LT CD8 suite à une infection avec *Listeria monocytogenes* ont mis en évidence que les transcrits *Nr4a1*, *Nr4a2* et *Nr4a3* sont rapidement induits lors d'une réponse *in vivo*⁶¹. Cette induction est rapide et transitoire, le pic de l'expression de *Nr4a1*, *Nr4a2* et *Nr4a3* étant atteint à 12h et étant revenu au niveau basal après 48h⁶¹. Toutefois, dans le cas d'une stimulation antigénique soutenue lors d'une infection chronique ou d'une réponse antitumorale par exemple, l'expression des *Nr4a* est maintenue, surtout dans les LT CD8 terminalement épuisés^{514,783,819}. Des études sur puces d'ARNm ont aussi mis en évidence l'expression des *Nr4a* dans différentes sous-populations de LT CD8. Notamment, les *Nr4a* sont enrichis dans les LT_{RM} de la peau, du poumon et des intestins, alors que cette expression est faible dans les LT_{EM} et les LT_{CM} de la rate²⁵⁹.

Une étude par scRNA-seq a mis en évidence l'expression rapide des *Nr4a* dans les LT CD8 stimulés *in vitro*, où le pic d'expression de ces molécules a été atteint de 1 à 3h, et où le niveau basal a été retrouvé à 6h⁷⁵⁴. Une cinétique d'induction des *Nr4a* très semblable a aussi été obtenue par Jennings *et al.*⁸¹⁰.

1.3.6.2. Induction de l'expression des NR4A

Les premières études sur l'induction de l'expression des NR4A dans les LT CD8 ont été effectuées avec la souris rapportrice NR4A1-GFP, qui a permis de mettre en évidence que l'expression de NR4A1 est rapidement induite suite à une stimulation TCR et dépendante de la force de cette stimulation. Il a été aussi observé que NR4A1 n'est pas induit suite à l'ajout de stimuli inflammatoires⁷⁴⁸, ce qui a ensuite été confirmé chez l'humain⁷⁵⁵.

L'expression de NR4A2 ou de NR4A3 a été moins étudiée, puisque la fonction moléculaire de ces FT a longtemps été considérée comme redondante. De plus, il n'y a pas eu de développement d'outils moléculaires pouvant servir à étudier la cinétique d'expression de ces molécules *in vivo*, mis à part l'étude des niveaux de leurs transcrits par séquençage. Dans les dernières années, une nouvelle souris rapportrice de l'expression de NR4A3 a été développée, soit la souris Nr4a3-Tocky^{756,811}. Cette souris tire l'avantage de la protéine fluorescente Tocky, dont la fluorescence est modifiée en fonction de sa durée d'expression. Tocky produit initialement une fluorescence dans le spectre bleu avant de devenir rouge. Ainsi, le changement de fluorescence de la protéine Tocky permet de mesurer à quel moment cette protéine a été induite et de distinguer un signal TCR soutenu versus intermittent⁷⁵⁶. Les études de LT CD8 issus de souris Nr4a3-Tocky et NR4A1-GFP ont permis de mettre en évidence l'expression différentielle de ces molécules suite à une stimulation *in vitro*⁸¹⁰. Ainsi, l'expression de *Nr4a3*, mais pas de *Nr4a1*, est dépendante de la signalisation NFAT, l'induction de l'expression de *Nr4a3* nécessitant une stimulation TCR plus forte et soutenue que *Nr4a1*⁸¹⁰. L'induction d'un niveau maximal de tous les transcrits de *Nr4a* est dépendante de l'activation de la voie de signalisation ERK, et la surexpression de la protéine NFAT au cours d'une stimulation *in vitro* induit une forte augmentation de l'expression de *Nr4a2* et *Nr4a3* chez les LT CD8⁸¹⁰. La cinétique de l'expression des protéines NR4A suite à une stimulation antigénique ainsi que leur demi-vie dans différents contextes biologiques n'a pas été clairement définie dans les LT CD8. Il est toutefois connu que l'expression des NR4A est très rapide dans les thymocytes, où ces FT sont rapidement induits 1 à 2h suite à une stimulation PMA/ionomycine, et cette expression diminue 2 à 4h post-stimulation⁷⁹⁷.

1.3.6.3. Induction rapide des *Nr4a* dans les LT CD8 lors d'une réponse immunitaire aiguë

La régulation transcriptionnelle ainsi que l'induction rapide des NR4A suite à une stimulation antigénique^{748,755,810,811} suggère un rôle biologique précoce de ces molécules dans les LT CD8 de la périphérie lors d'une réponse immunitaire aiguë.

La venue de nouvelles technologies de RNA-seq et de scRNA-seq a permis de mettre en évidence plusieurs contextes biologiques où l'expression de *Nr4a1*, *Nr4a2* et *Nr4a3* est induite simultanément ou de façon différentielle dans les LT CD8 (voir section 1.3.6.1 et 1.3.6.2). Mis à part des études transcriptomiques de LT CD8, un rôle important des NR4A est aussi suggéré par des études d'accessibilité de la chromatine^{206,514}. Ainsi, une augmentation des régions différentiellement ouvertes de la chromatine (DAR) contenant des motifs de liaison à l'ADN NBRE a été identifiée aussitôt qu'à 2h poststimulation des LT CD8, et cette ouverture de la chromatine est maintenue au moins jusqu'à 24h poststimulation, ce qui suggère un rôle de ces molécules dans l'activation et dans la différenciation précoce des LT CD8. En revanche, les DAR enrichis en NBRE identifiés lors de l'activation des LT CD8 sont moins présents dans les LTE et les LTM²⁰⁶.

1.3.6.4. Les NR4A dans la différenciation des LT CD8 lors d'une réponse immunitaire aiguë

NR4A1 régule la prolifération *in vitro* et *in vivo* des LT CD8 matures suite à une stimulation antigénique⁸²⁰. Ainsi, les LT CD8 *Nr4a1*^{-/-} prolifèrent plus lors d'une stimulation anti-CD3 *in vitro*, lors d'une stimulation antigénique *in vivo* ou d'une prolifération dans une souris lymphopénique⁸²⁰. Les LT CD8 *Nr4a1*^{-/-} sont aussi plus fonctionnels, car ils produisent plus d'IFN- γ lors d'une restimulation antigénique⁸²⁰. Lors d'une infection *Listeria monocytogenes* des souris *Nr4a1*^{-/-}, les LT CD8 *Nr4a1*^{-/-} subissent une plus forte expansion clonale, présentent une augmentation de la différenciation SLEC et produisent davantage de granzyme B⁸²⁰. Une autre étude dans un modèle de transfert adoptif (TA) de LT CD8 *Nr4a1*^{-/-} P14 transgéniques suivi d'une infection avec le virus LCMV a permis d'observer les mêmes résultats, soit une plus forte expansion clonale et une meilleure fonctionnalité des LT CD8 *Nr4a1*^{-/-783}. Toutefois, cette étude n'a révélé aucune

différence dans la différenciation SLEC/MPEC des LT CD8 *Nr4a1*^{-/-} lorsque comparé aux *Nr4a1*^{+/-}⁷⁸³.

En résumé, NR4A1 diminue la fonctionnalité et la capacité de prolifération des LT CD8^{783,820}. Son rôle dans la différenciation SLEC/MPEC des LT CD8 n'a pas été défini de façon concluante, une étude ne montrant aucun effet sur cette différenciation et une autre, l'augmentation de la différenciation des SLEC en absence de NR4A1. Ces différences relèvent probablement des modèles d'étude utilisés, soit la souris *Nr4a1*^{-/-}⁸²⁰ versus un TA de LT CD8 P14 *Nr4a1*^{-/-} dans des souris sauvages⁷⁸³. Par ailleurs, les deux études ci-nommées ont basé leurs conclusions sur un faible nombre de souris (les données SLEC/MPEC d'une⁸²⁰ ou de quatre souris ont été présentées⁷⁸³), ainsi que sur la comparaison de la souris NR4A1-déficiente à un contrôle hémizygote à la place d'un contrôle homozygote sauvage⁷⁸³, la délétion d'un seul allèle de *Nr4a1* pouvant en théorie affecter les proportions de SLEC/MPEC. La contribution de NR4A2 et de NR4A3 lors de la réponse des LT CD8 lors d'une infection aiguë n'a pas été encore définie.

1.3.6.5. Les NR4A dans la différenciation des LT CD8 mémoires

Des études de caractérisation des LTM ont mis en évidence une corrélation entre l'expression des transcrits *Nr4a* et le potentiel des LT CD4 et CD8 de se différencier en LTM^{821,822}. Ainsi, dans le cas des LT CD4, il a été montré que les effecteurs générés lors d'une infection *Listeria monocytogenes* exprimant un Ag d'une faible avidité pour les LT CD4 expriment de forts niveaux de transcrits *Nr4a3* et ont un faible potentiel de différenciation en LT CD4 mémoires⁸²¹. Dans le cas des LT CD8, leur stimulation avec des cellules dendritiques présentant de fortes densités d'épitopes antigéniques diminue la transcription de *Nr4a3* et augmente leur potentiel de différenciation en LTM⁸²².

Des études transcriptomiques plus récentes ont permis de mettre en évidence une expression enrichie des transcrits *Nr4a* dans les LTRM^{259-261,431}, ce qui suggère un rôle biologique des NR4A dans ce type de LTM. Effectivement, une étude utilisant des shRNA qui ciblent *Nr4a1*, *Nr4a2* ou *Nr4a3* a identifié ces FT en tant que de potentiels régulateurs de la différenciation de LTRM²⁶⁰. Une autre étude par scRNA-seq a identifié une expression enrichie de *Nr4a1*, *Nr4a2* et *Nr4a3* dans les LTRM, plus particulièrement dans les LTRM CD28⁺²⁶¹. Ces LTRM CD28⁺ se distinguent par leur grand potentiel effecteur, et leur différenciation est dépendante de NR4A2, dont la suppression par

shRNA diminue drastiquement leur proportions²⁶¹. L'effet de la suppression des autres membres de la famille *Nr4a* sur la différenciation de ce sous-type de LT_{RM} $CD28^+$ n'a pas été évalué dans cette étude²⁶¹.

L'importance de NR4A1 dans la différenciation des LTM, et particulièrement des LT_{RM} , a été étudiée lors d'une infection par influenza. Une étude a montré que la délétion de l'expression de *Nr4a1* diminue le nombre de LT_{RM} du foie, de l'épithélium des intestins et des plaques de Peyer, sans affecter les LT_{RM} des poumons ou de la moelle osseuse⁸²³, ce qui souligne un effet tissu-spécifique de NR4A1 dans les LT_{RM} . Cet effet tissu-spécifique est aussi suggéré par l'expression différentielle des transcrits *Nr4a* dans les LT_{RM} où ces cellules ont été générées. Ces transcrits sont enrichis dans les LT_{RM} des reins, de la peau, des cellules intraépithéliales des intestins et de l'appareil reproducteur féminin, mais peu enrichis dans les LT_{RM} de la rate^{259,260,431}. Dans le même modèle d'infection par influenza, il a été montré que la déficience en NR4A1 n'affecte pas les LT_{EM} ni les LT_{CM} , où le transcrit de *Nr4a1* n'est pas détecté⁸²³.

Ainsi, NR4A1 et NR4A2 sont impliqués dans la différenciation des LT_{RM} , le rôle de NR4A3 n'ayant pas encore été déterminé dans ces cellules. NR4A1 ne semble pas affecter les LT_{EM} ni les LT_{CM} , et le rôle des autres NR4A dans la génération de ces LTM n'est pas encore défini. Il reste aussi à déterminer la contribution de chaque NR4A dans la différenciation LT_{RM} des différents tissus où l'expression de ces molécules est enrichie, ainsi que leur mécanisme d'action (Figure 6).

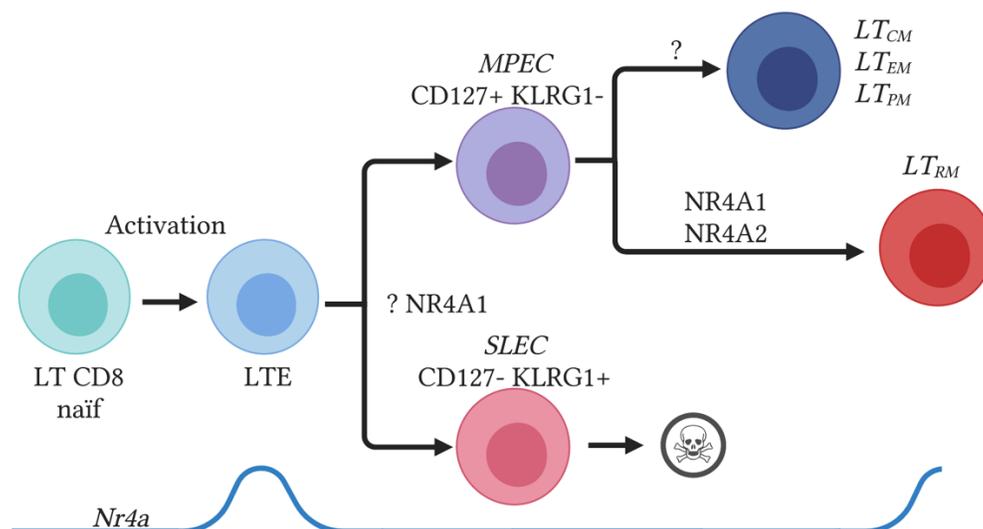


Figure 6. – Régulation de la différenciation des LT CD8 par les NR4A lors d'une réponse immunitaire aiguë.

En haut. Suite à une stimulation antigénique, un LT CD8 naïf est activé et se différencie en LTE. Parmi les LTE, on distingue les LTE terminalement différenciés (SLEC), qui meurent par apoptose suite à l'élimination de l'Ag, et les LTE précurseurs de cellules mémoires (MPEC) qui survivent et donnent naissance aux LTM. Parmi les LTM, il existe plusieurs sous-types de cellules spécialisées : les LTRM, les LTCM, les LTEM et les LTPM. Deux études ont montré que NR4A1 diminue ou n'a pas d'effet sur la différenciation SLEC, l'effet de NR4A2 et NR4A3 dans la différenciation SLEC/MPEC n'étant pas encore défini. NR4A1 et NR4A2 favorisent la différenciation en LTRM. NR4A1 n'a pas d'effet sur la différenciation LTCM ou LTEM, le rôle de NR4A2 et NR4A3 n'étant pas défini dans ces populations. **En bas.** Enrichissement de l'expression des transcrits *Nr4a* au cours d'une réponse immunitaire aiguë. Figure inspirée d'Odagiu *et al.*⁷⁷⁹ et créée avec BioRender.

1.3.6.6. Rôle des membres de la famille NR4A dans la régulation des LT CD8 lors d'une réponse immunitaire chronique

La persistance de l'Ag et de l'inflammation lors d'une réponse immunitaire chronique mène à l'induction et à l'épuisement des LT CD8, qui concordent aussi avec une augmentation de l'expression de *Nr4a1*, *Nr4a2* et *Nr4a3*^{516,819}, ces molécules étant induites suite à une stimulation TCR. Une des premières évidences de l'expression des *Nr4a* dans les LT CD8 épuisés a été dévoilée par une étude sur la forme mutée de NFAT (CA-RIT-NFAT1) incapable d'interagir avec AP-1, ce qui induit l'épuisement de ces cellules⁵¹⁶. L'activité de la forme mutée de NFAT augmente l'expression des gènes associés à l'épuisement des LT CD8 ainsi que de *Nr4a2* et de *Nr4a3*. Des études sur la chromatine ouverte de l'ADN (ATAC-seq) ont montré une augmentation des motifs de liaison à l'ADN NBRE dans les régions associées à l'épuisement des LT CD8 lors d'une infection LCMV Cl13³⁵⁹ ou lors d'une réponse antitumorale⁵¹⁴, ce qui suggère un rôle des NR4A lors de l'épuisement des LT CD8.

La participation des NR4A à la régulation des LT CD8 lors d'une réponse chronique antitumorale a été montrée dans des travaux de Chen *et al.*⁸¹⁹. Premièrement, les auteurs ont utilisé des données déjà disponibles dans la littérature et ont mis en évidence un enrichissement des motifs

de liaison à l'ADN des FT NR4A (NBRE) dans les LT CD8 PD-1⁺ Tim-3⁺ lorsque comparés aux PD-1⁺ Tim-3⁻ ⁸¹⁹. Aussi, ils ont montré que le niveau d'expression de transcrits *Nr4a* est en corrélation directe avec l'expression des gènes codant pour PD-1 et Tim-3 (*Pdcd1* et *Havcr2*) dans les TIL d'un mélanome humain, ce qui suggère qu'un fort niveau d'épuisement corrèle avec une forte expression des *Nr4a*⁸¹⁹. La délétion des trois membres de la famille NR4A (TKO) dans des CAR-T thérapeutiques augmente le contrôle tumoral et la survie de souris *Rag1*^{-/-} porteuse de tumeurs B16-hCD19, avec un moindre effet dans le traitement de souris immunocompétentes porteuses de tumeurs B16-OVA-hCD19 ou MC38-hCD19⁸¹⁹. Les TIL CAR-T TKO ont de meilleures fonctions effectrices (IFN- γ , TNF- α) et expriment moins PD-1 et Tim-3, ce qui suggère une meilleure fonctionnalité et un moindre état d'épuisement⁸¹⁹. Dans la même étude, en utilisant un ChIP-qPCR et un système de surexpression des molécules NR4A, Chen *et al.*⁸¹⁹ ont montré un enrichissement de la liaison de NR4A au promoteur *Pdcd1*. En conclusion, cette étude suggère un rôle important des NR4A lors de l'épuisement des LT CD8.

Le rôle de NR4A1 lors d'une réponse antitumorale des LT CD8 a été étudié dans des souris porteuses de tumeurs EG7 et traitées avec des LT CD8 OT-I transgéniques⁷⁸³. Le traitement de ces souris avec des LT CD8 *Nr4a1*^{-/-} augmente leur survie par rapport à des LT CD8 *Nr4a1*^{+/+}. Ce meilleur contrôle a été associé à une plus forte proportion de TIL *Nr4a1*^{-/-}, à une meilleure fonctionnalité (IFN- γ , TNF- α , cytotoxicité), ainsi qu'à un moindre niveau d'épuisement (PD-1, Tim-3)⁷⁸³. Ces résultats ont été ensuite confirmés dans le modèle de réponse chronique LCMV Cl13⁷⁸³. De plus, il a été déterminé que le niveau d'expression de *Nr4a1* diminue suite à un traitement anti-PD-1, tout comme l'ouverture de la chromatine à des motifs NBRE⁷⁸³. Cette étude a mis en évidence que la délétion de seulement un membre de la famille NR4A est capable d'améliorer le contrôle tumoral par des LT CD8 lors d'une thérapie cellulaire adoptive. Ces données sont en concordance avec celles de Chen *et al.*⁸¹⁹, qui ont montré que la meilleure efficacité d'une thérapie cellulaire adoptive avec des CAR-T dans des souris *Rag1*^{-/-} porteuse de tumeurs B16-hCD19 est observée lors de la délétion des trois membres de la famille NR4A, mais celle-ci est aussi améliorée lors des délétions simples des NR4A dans les CAR-T⁸¹⁹.

Une autre étude a établi une corrélation directe entre l'expression de Tox et des NR4A. Pour ce faire, Seo *et al.*⁵²⁸ ont effectué une surexpression de Tox ou Tox2 dans des LT CD8 lors d'une stimulation *in vitro* et, 5 jours plus tard, ont évalué l'expression de différents RI et des

protéines NR4A en fonction du niveau de surexpression de *Tox* et *Tox2*⁵²⁸. Ils ont aussi quantifié un moindre niveau d'expression de *Tox* dans les LT CD8 TKO (délétion des trois membres de la famille NR4A). Pris ensemble, ces résultats suggèrent une corrélation entre l'expression de *Tox* et des NR4A, qui pourraient coopérer dans l'induction de l'épuisement des LT CD8 pendant une réponse immunitaire chronique⁵²⁸. Aussi, Seo *et al.*⁵²⁸ ont montré que *Tox*, tout comme les NR4A⁸¹⁹, régule l'expression de *Pdcd1*, ce qui suggère qu'ils peuvent jouer des rôles convergents dans la régulation et l'établissement de l'épuisement des LT CD8.

Une autre étude sur des CAR-T *Prdm1*^{-/-} (Blimp-1-déficientes) a permis d'établir que la déficience en Blimp-1 n'améliore pas l'élimination tumorale, malgré l'induction de l'expression de gènes associés à la différenciation des précurseurs de LT CD8 épuisés LT_{PEX} (*Tcf7*, *Myb*, *Bcl6*, *Id3*)⁸²⁴. Par contre, la délétion concomitante de *Nr4a3* et de *Prdm1* a été capable de rétablir le potentiel effecteur des CAR-T et d'augmenter l'élimination tumorale⁸²⁴. Cette étude a souligné l'importance de NR4A3 dans la régulation de fonctions effectrices des LT CD8 lors d'une réponse antitumorale.

En conclusion, l'expression de tous les transcrits *Nr4a* est augmentée dans les LT CD8 épuisés et leur niveau d'expression corrèle à celui de *Tox* et au niveau d'épuisement de ces cellules (Figure 7). L'étude de Chen *et al.*⁸¹⁹ a montré que la délétion de tous les NR4A dans les LT CD8 augmente le contrôle tumoral via une diminution de l'épuisement des LT CD8 et une augmentation de leur fonctionnalité. Liu *et al.*⁷⁸³ ont montré que la délétion de seulement NR4A1 est suffisante pour augmenter le contrôle tumoral tout comme Jung *et al.*⁸²⁴, qui a montré que la délétion de *Nr4a3* dans les CAR-T *Prdm1*-déficientes est suffisante pour augmenter la fonctionnalité et l'efficacité thérapeutique de ces LT CD8. Ces études suggèrent un rôle important de chaque NR4A dans la régulation de l'épuisement des LT CD8 lors d'une réponse antitumorale. De plus, Liu *et al.*⁷⁸³ ont montré que les motifs de liaison à l'ADN NBRE ainsi que l'expression de *Nr4a1* diminuent lors d'un traitement avec anti-PD-1⁷⁸³, ce qui, combiné au fait que l'expression de *Nr4a* est enrichie dans les LT CD8 épuisés, suggère que ces FT peuvent jouer des rôles importants lors d'une thérapie ICB.

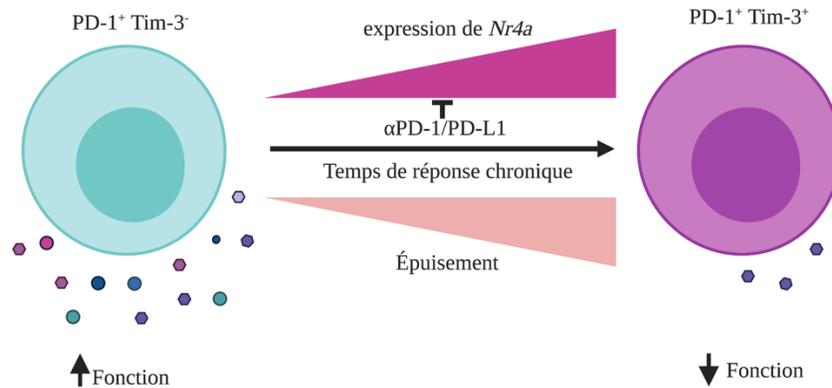


Figure 7. – Rôle des membres de la famille NR4A lors de l'épuisement des LT CD8.

Au cours d'une réponse immunitaire chronique, il y a deux sous-populations principales de LT_{EX} : les LT_{EX} peu épuisés ($PD-1^+ Tim-3^-$), qui retiennent leur fonctionnalité, et les LT_{EX} finalement épuisés ($PD-1^+ Tim-3^+$), dont la fonction est fortement diminuée. Les NR4A contribuent à l'induction de l'épuisement des LT CD8. L'expression de ces FT augmente au cours de l'épuisement des LT_{EX} et est enrichie dans les $LT_{EX} PD-1^+ Tim-3^+$. L'expression des *Nr4a* peut être diminuée lors de l'inhibition de l'axe PD-1/PD-L1. Figure inspirée d'Odagiu *et al.*⁷⁷⁹ et créée avec BioRender.

1.3.6.7. Mode de fonctionnement des membres de la famille NR4A dans les LT CD8

Le mécanisme moléculaire d'action de NR4A dans les LT CD8 n'a pas encore été défini. Nowyhed *et al.*⁸²⁰ ont montré que NR4A1 lie le promoteur d'*Irf4* et inhibe son expression. Cette répression transcriptionnelle pourrait avoir lieu par une compétition de liaison avec des FT de la famille bZIP, comme chez les LT CD4⁷⁸³, ou par le recrutement de CoREST et l'inhibition de la transcription génique, comme dans le développement des LT CD8 thymiques ou dans les astrocytes et microglies^{809,825}. Par ailleurs, les plus hauts niveaux d'expression d'IRF4 en absence de NR4A1 peuvent suggérer qu'il pourrait être impliqué dans la différenciation des LTE en SLEC, dans leur plus forte expansion clonale et dans la production de cytokines, IRF4 étant connu pour soutenir ces processus de façon dose-dépendante^{252-254,279,280}.

Lors d'une réponse immunitaire chronique des LT CD8, il a été montré que les NR4A participent à l'induction de l'épuisement, entre autres via l'induction de *Pdcd1*, et que l'expression

des NR4A corrèle avec celle de TOX^{528,783,819,824}. Aussi, la délétion de tous les *Nr4a* dans les LT CD8 lors d'une réponse antitumorale mène à l'induction d'un programme transcriptionnel associé à leur différenciation effectrice et à une diminution de l'expression de gènes associés à leur épuisement ou différenciation en LTM⁸¹⁹. Les régions de la chromatine ouverte du TKO (*Nr4a1*^{-/-}, *Nr4a2*^{-/-}, *Nr4a3*^{-/-}) sont plus enrichies que les LT CD8 sauvages pour les motifs de liaison à l'ADN des membres de la famille bZIP et Rel/NFκB, qui sont associés à la régulation de la fonction des LT CD8⁸¹⁹. Ces mêmes TKO présentent un moindre enrichissement des motifs de liaison à l'ADN NBRE, qui sont semblables à ceux identifiés lors de l'épuisement des LT CD8 lorsque ceux-ci expriment la forme mutée et constitutivement active de NFAT (CA-RIT-NFAT1)^{359,516,819}. Ces résultats suggèrent que, dans les TKO, il y aurait une plus forte activité d'AP-1 et de NF-κB et une moindre activité des NR4A. Chez les LT CD4, NR4A1 compétitionne avec AP-1 (FT de la famille bZIP) pour la liaison à l'ADN et la régulation de l'expression des gènes cibles⁷⁸³. De la même manière, les NR4A pourraient compétitionner avec AP-1 afin de réguler la différenciation et la fonction des LT CD8 lors d'une réponse antitumorale.

En résumé, plusieurs études ont montré que les NR4A participent à la régulation de l'épuisement des LT CD8 et que ces FT régulent l'expression de *Pdcd1*, déterminé par une expérience de CHIP-qPCR⁸¹⁹. Toutefois, il reste à déterminer quelles sont les cibles directes de chaque NR4A, ainsi que l'interrelation de ces molécules avec les autres FT impliqués dans l'épuisement des LT CD8.

1.3.7. NR4A3 chez l'humain

L'homologie entre le NR4A3 humain et murin est assez forte, l'alignement de ces deux protéines donnant 91,8% d'identité d'acides aminés, ce qui suggère que leur mode de fonctionnement pourrait être très conservé entre les deux organismes. Chez l'humain, tout comme chez la souris, l'expression de *NR4A3* n'est pas tissu-spécifique, celle-ci étant détectée dans plusieurs organes (vésicule biliaire, vessie urinaire, ovaires, glandes surrénales et pituitaire, etc.), tissus (muscles cardiaque et squelettique, gras, etc.)⁸²⁶⁻⁸²⁹, ainsi que plusieurs types de cellules du SI (DC, monocytes, macrophages, granulocytes, LT, LB, etc.)⁸¹⁸.

Plusieurs polymorphismes de NR4A3 ont été rapportés chez l'humain, mais aucune corrélation pathologique n'y a été détectée. Toutefois, certaines anomalies cytogénétiques ont mis en liaison NR4A3 et l'apparition du chondrosarcome myxoïde extrasquelettique (ESW). Ainsi, la fusion génique de NR4A3 avec le gène *ESW* (t(9;22)(q22-31;q11-12)) mène à l'apparition de la pathologie ESW⁸³⁰⁻⁸³², qui peut aussi être induite suite aux fusions géniques de NR4A3 et de *RBP56* (t(9;17)(q22;q11))⁸³³, ou de NR4A3 et de *TCF12* (t(9;15)(q22;q21))⁸³⁴. Une autre translocation génique de NR4A3 avec le gène *SCPP* (t(4;9)(q13;q31)) favorise l'apparition du carcinome de cellules acineuses de glandes salivaires, où l'expression de NR4A3 favorise la progression tumorale⁸³⁵. Son expression a aussi été trouvée enrichie dans le cas de carcinome du sinus nasal⁸³⁶, mais pas dans le cas du carcinome de cellules acineuses du cancer du sein, où son expression est absente⁸³⁷. Une diminution de l'expression de NR4A1 et de NR4A3 a été détectée dans le cas de plusieurs types de leucémies myéloïdes^{776,838}, la moindre expression de NR4A3 étant associée à un moindre niveau de différenciation de cellules leucémiques⁸³⁹. Malgré l'expression enrichie de NR4A3 dans les TIL d'un mélanome métastatique chez l'humain et l'association de son expression à un fort niveau d'épuisement des LT CD8 (PD-1⁺ Tim-3⁺)^{819,840}, l'enrichissement de son expression dans les LT CD8 spécifiquement n'a pas été encore associée à une condition pathologique. Contrairement à NR4A3, le transcrit NR4A2 a récemment été identifié en tant que biomarqueur de sévérité de réponse de patients lors d'une infection SARS-CoV-2⁸⁴¹.

Chapitre 2 – Raisonnement et hypothèse

La différenciation des LT CD8 est un processus hautement régulé qui permet, à partir d'un faible nombre de LT CD8 naïfs, de générer une population de LTE qui participent à l'élimination des agents pathogènes intracellulaires et des cellules tumorales. Ainsi, lors d'une réponse immunitaire aiguë et suite aux trois signaux d'activation (signal TCR, co-stimulation et inflammation), un programme transcriptionnel et épigénétique permet l'activation du LT CD8 naïf. Ce LT CD8 subit ensuite une différenciation effectrice en même temps qu'une expansion clonale afin de générer un nombre suffisant de LTE qui élimineront l'agent infectieux. La différenciation des LTE en effecteurs de courte durée de vie (SLEC), qui seront éliminés par apoptose suite à l'élimination de l'agent infectieux, ou en précurseurs de cellules mémoires (MPEC), qui vont survivre et générer des LTM afin de protéger l'organisme à long terme, est dirigée par des FT. Notamment, Blimp-1^{178,271}, RunX3^{207,208}, T-bet^{167,267}, Id-2²⁷⁴, Zeb-2^{269,270} et Stat4¹⁶⁷ favorisent la différenciation SLEC, alors qu'*Eomes*^{267,397}, Bcl6^{398,842}, Id3²⁷⁴, Foxo1^{843,844}, TCF-1^{395,396} et Stat3³⁹⁹ favorisent la différenciation MPEC. Toutefois, lors d'une réponse immunitaire chronique, la persistance antigénique et inflammatoire induisent l'épuisement des LT CD8⁵⁴ afin de limiter les dommages causés par l'activité effectrice soutenue de ces cellules. L'épuisement des LT CD8 est un état de différenciation caractérisé par de faibles capacités effectrices et prolifératives, ce qui corrèle avec une augmentation de l'expression des RI (PD-1, Tim-3, Lag-3, etc.) et l'induction d'un programme transcriptionnel et épigénétique distinct^{845,846}. Ainsi, la différenciation des LT CD8 est un processus clé qui régule la capacité de protection de l'organisme et lui permet d'adapter sa réponse immunitaire. Ce processus est finement dirigé dès l'activation du LT CD8 et jusqu'au maintien des LTM ou leur épuisement terminal dans le cas des réponses immunitaires chroniques. Il est alors essentiel de mieux comprendre comment la différenciation des LT CD8 est régulée lors d'une réponse immunitaire aiguë et chronique afin de pouvoir moduler celle-ci et de favoriser la génération de plus de LTM lors de la vaccination, ainsi que de soutenir la réponse et la fonction des LT CD8 lors des infections chroniques et des thérapies cellulaires adoptives à base de LT.

NR4A3 est un FT membre de la famille de récepteurs nucléaires orphelins NR4A. Ce FT joue un rôle dans la régulation de la prolifération, de l'apoptose, de l'activation métabolique ainsi que la différenciation de plusieurs types cellulaires^{776,792,814,847-849}. L'expression de *Nr4a3* a été

associée avec un faible potentiel de différenciation mémoire des LT CD4 et des LT CD8^{821,822} et, dans les LT CD8, *Nr4a3* est rapidement induit suite à une stimulation antigénique^{61,754,756}. Toutefois, le rôle de cette induction lors d'une réponse immunitaire aiguë n'a pas encore été défini.

Étant donné le rôle de NR4A3 dans la régulation de la différenciation de plusieurs types cellulaires, ainsi que son induction rapide suite à la stimulation TCR, nous avons émis l'hypothèse que NR4A3 puisse réguler la différenciation SLEC/MPEC et la génération de LTM des LT CD8 lors d'une réponse immunitaire aiguë. L'objectif de ma première partie de thèse de doctorat a été de déterminer le rôle de NR4A3 dans la différenciation SLEC/MPEC et la différenciation mémoire des LT CD8 lors d'une réponse immunitaire aiguë, ainsi que le mode d'action de ce FT dans les LT CD8.

De plus, la transcription de *Nr4a3* est enrichie dans les LT CD8 épuisés^{359,514,516,819} et cette expression corrèle avec celle des gènes codant pour PD-1⁸¹⁹, Tim-3⁸¹⁹ et TOX⁵²⁸, soit des RI ou FT impliqués dans l'épuisement des LT CD8^{845,850}. La délétion simultanée de tous les membres de la famille NR4A favorise un meilleur contrôle antitumoral lors d'une ACT de souris porteuses de tumeurs⁸¹⁹. Au niveau moléculaire, il a été montré que les trois membres de la famille de récepteurs NR4A régulent l'expression de *Pdcd1* (codant pour PD-1) et qu'il y a un enrichissement de l'ouverture de la chromatine de motifs de liaison à l'ADN NBRE (reconnu par les NR4A) lors de l'épuisement des LT CD8^{359,514,819}. L'accessibilité de ces motifs de liaison à l'ADN est plus faible sous traitement avec des Ac bloquant l'axe PD-1/PD-L1^{475,783}, et ce traitement diminue aussi le niveau des transcrits *Nr4a*, ce qui suggère une importance fonctionnelle de la régulation de l'activité des NR4A lors de ce type de thérapie. Toutefois, le rôle individuel de chaque membre NR4A dans la réponse chronique des LT CD8 ainsi que l'importance fonctionnelle de la diminution de leur expression sur l'efficacité d'une thérapie ICB visant l'axe PD-1/PD-L1 n'ont pas été définis. Dans le cadre de mon premier objectif de doctorat, présenté ci-haut, nous avons déterminé que la délétion de l'expression de NR4A3 dans les LT CD8 augmente leur capacité de différenciation mémoire et leur fonction effectrice, deux facteurs limitants dans les ACT antitumorales. C'est pourquoi nous nous sommes concentrés sur l'étude du rôle spécifique de NR4A3 dans la différenciation des LT CD8 lors d'une ACT sous traitement anti-PD-L1.

Nous avons émis l'hypothèse que NR4A3 à lui seul puisse jouer un rôle dans la régulation de l'épuisement des LT CD8 lors d'une réponse antitumorale et que la diminution de son

expression lors d'un traitement anti-PD-L1 puisse améliorer son efficacité. L'objectif de ma deuxième partie de doctorat a été de déterminer le rôle de NR4A3 dans la réponse antitumorale et l'épuisement des LT CD8 lors d'une thérapie cellulaire adoptive sous traitement anti-PD-L1.

Chapitre 3 – Résultats

Article 1: Early programming of CD8+ T cell response by the orphan nuclear receptor NR4A3

Auteurs : *Livia Odagiu, Salix Boulet, Dave Maurice De Sousa, Jean-François Daudelin, Sandrine Nicolas, Nathalie Labrecque*

Journal : *PNAS (The Proceedings of the National Academy of Sciences)*

Volume : *117*

Numéro : *39*

Date de parution : *10 septembre 2020*

Pages : *24392-24402*

Les résultats publiés dans l'article 1 visent à élucider le rôle de NR4A3 dans les LT CD8 lors d'une infection aiguë et résumant les travaux de mon premier objectif de thèse.

Voici les contributions détaillées des auteurs : les expériences ont majoritairement été faites par moi (80%), Salix Boulet (10%), Jean-François Daudelin (5%), Dave Maurice De Sousa (4%) et Sandrine Nicolas (1%). J'ai effectué la majorité des analyses des données, sauf les analyses transcriptomiques brutes (RNA-seq, ATAC-seq), pour lesquelles nous avons fait appel à des bio-informaticiens (IRIC). La contribution conceptuelle a été faite par moi, Nathalie Labrecque et Salix Boulet. L'écriture du papier a été effectuée par Nathalie Labrecque, moi et Salix Boulet. J'ai préparé toutes les figures du manuscrit et ensuite soumis l'article avec l'aide de Salix Boulet.

Early programming of CD8⁺ T cell response by the orphan nuclear receptor NR4A3

Livia Odagiu^{1,2}, Salix Boulet¹, Dave Maurice De Sousa^{1,2}, Jean-François Daudelin¹, Sandrine
Nicolas¹, Nathalie Labrecque^{1,2,3}.

Affiliations :

¹ Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Montreal, Qc, Canada, H1T 2M4

² Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Qc, Canada, H3C 3J7.

³ Département de médecine, Université de Montréal, Qc, Canada, H3C 3J7.

*Corresponding author: Nathalie Labrecque, nathalie.labrecque@umontreal.ca

5415 boulevard de l'Assomption

Montréal (Québec) H1T 2M4

Canada

orcid.org/0000-0001-7563-1542

Classification: Biological sciences/Immunology and inflammation

Keywords: Early CD8 T cell response; nuclear receptors; T cell memory; NR4A3; T cell function

One sentence summary: NR4A3 influences CD8⁺ T cell differentiation

Abstract

Enhancing long-term persistence while simultaneously potentiating the effector response of CD8⁺ T cells has been a long-standing goal in immunology to produce better vaccines and adoptive cell therapy products. NR4A3 is a transcription factor of the orphan nuclear receptor family. While it is rapidly and transiently expressed following T cell activation, its role in the early stages of T cell response is unknown. We show that NR4A3-deficient murine CD8⁺ T cells differentiate preferentially into memory precursor and central memory cells, but also produce more cytokines. This is explained by an early influence of NR4A3 deficiency on the memory transcriptional program and on accessibility of chromatin regions with motifs for bZIP transcription factors, which impacts the transcription of Fos/Jun target genes. Our results reveal a unique and early role for NR4A3 in programming CD8⁺ T cell differentiation and function. Manipulating NR4A3 activity may represent a promising strategy to improve vaccination and T cell therapy.

Significance statement

The CD8 T cell response is crucial in protecting the organism against infections and cancer. This protective response relies on the production of effector molecules and the generation of long-lived memory cells. Understanding the processes governing CD8 T cell responses is essential for the development of better vaccine strategies and immune cell therapies. Here, we show that deletion of the transcription factor NR4A3 leads to increased memory generation and effector functions. This results from an early impact on the CD8 T cell transcriptional memory program and on chromatin accessibility for bZIP transcription factors. Thus, we identify NR4A3 as a key regulator of CD8 T cell function and differentiation, which could have therapeutic implications.

Introduction

CD8⁺ T lymphocytes undergo massive expansion and differentiation following T cell receptor (TCR) recognition of foreign antigens presented as peptide fragments on MHC class I molecules. At the peak of the CD8⁺ T cell response to acute infection, two main populations of effectors are generated: short-lived effector cells (SLECs; KLRG1^{hi}CD127^{lo}) and memory precursor effector cells (MPECs; KLRG1^{lo}CD127^{hi}) (1-3). Both populations have effector functions but most of the SLECs will die during the contraction phase while MPECs will further differentiate into long-lived CD8⁺ memory T cells to confer long-term protection. The SLEC and MPEC differentiation choice is influenced by inflammatory signals perceived by the T cells and requires the induction of a complex transcriptional program (2, 3). As such, several transcription factors were shown to contribute to this differentiation event. SLEC differentiation is dependent on T-bet, Blimp-1, Id2, Rbpjk and Zeb2 while Eomes, Bcl-6, Id3, Bach2 and TCF-1 are involved in MPEC and memory T cell differentiation (2, 4-15). Evidence supports that this differentiation choice is determined very early in the response, as early as the first T cell division (16). Furthermore, the chromatin landscape changes rapidly following naive CD8⁺ T cell activation with massive opening of chromatin regions. Interestingly, the differentially accessible regions (DARs) of chromatin between naive and recently activated CD8⁺ T cells contain regions that are later preferentially found in either MPECs or SLECs (17-19). This suggests that early events of T cell activation poise the cells for differentiation and that further events fix the cellular differentiation choice. The DARs associated with early CD8⁺ T cell activation are enriched for motifs recognized by several transcription factors, including some that are known to influence CD8⁺ T cell differentiation (17-19).

Among early events that occur following TCR stimulation of naive CD8⁺ T cells is the rapid expression of the nuclear orphan receptor NR4A family members (NR4A1, NR4A2 and NR4A3) (20). These orphan nuclear receptors act as transcription factors by binding to the NBRE consensus sequence motif on DNA (reviewed in (21)). Their activity is regulated at the level of their expression and they are induced very rapidly by a variety of extracellular signals. They are thus considered immediate early genes. They control proliferation, differentiation, survival and metabolism in several cell types (21). In the immune system, they play crucial roles in the differentiation and response of myeloid cells (22-26). In T cells, the deletion of the three members during thymocyte differentiation abrogates regulatory T cell differentiation while single deletion results in an increase in these cells (27-29). Their roles in the peripheral mature T cell compartment have not been extensively studied but NR4As are highly expressed by exhausted T cells (30-34) and recent studies have found roles for these in contexts of recurrent antigen stimulation (33, 35). However, very little is known about the role of these members during CD8⁺ T cell response to acute infection and on the specific action of NR4A3 in CD8⁺ T cells. The rapid and transient upregulation of NR4A1-3 expression following CD8⁺ T cell activation suggests that these transcription factors will have an early transcriptional influence on CD8⁺ T cell response to acute infection. This possibility is further supported by the enrichment of the NBRE motif in DARs that are more open at 2 to 24h post naive CD8⁺ T cell activation while they are not enriched in more differentiated effector CD8⁺ T cells (17-19).

In this study, we have found an important and unique role for NR4A3 in the early stages of an acute CD8⁺ T cell response. We demonstrate that NR4A3 limits the generation of MPECs and memory CD8⁺ T cells, particularly central memory CD8⁺ T cells, while restraining cytokine production. Early in the CD8⁺ T cell response, NR4A3 decreases chromatin accessibility of regions

containing bZIP transcription factor motifs and reduces the expression of transcription factors involved in memory differentiation while enhancing expression of transcription factors controlling SLEC differentiation. This highlights the crucial early role for the NR4A3 family member in acute CD8⁺ T cell responses.

Results

NR4A3 deficiency promotes MPEC differentiation and enhances effector functions

To evaluate the intrinsic role of NR4A3 during CD8⁺ T cell response, we crossed *Nr4a3*^{-/-} mice with OT-I mice, expressing a transgenic TCR specific for the ovalbumin (OVA) peptide 257-264 in the context of the MHC class I molecules K^b (36). 5 x 10³ *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells were adoptively transferred into wild-type (WT) congenic B6.SJL mice one-day prior to infection with a sublethal dose of *Listeria monocytogenes* encoding OVA (Lm-OVA). As shown in Fig. 1A, NR4A3 deficiency did not affect CD8⁺ T cell expansion at the peak of the response (day 7) or the kinetic of the CD8⁺ T cell response (SI Appendix, Fig. S1A). We did, however, consistently observe the generation of 2-fold more memory CD8⁺ T cells in the absence of NR4A3 (Fig. 1A and SI Appendix, Fig. S1A). This increased memory generation was also observed following lymphocytic choriomeningitis virus encoding OVA (LCMV-OVA) infection when OT-I *Nr4a3*^{-/-} T cells were adoptively transferred in competition with *Nr4a3*^{+/+} OT-I T cells (SI Appendix, Fig. S1B). The enhanced generation of memory CD8⁺ T cells in absence of NR4A3 led us to evaluate whether the proportion of SLECs and MPECs was affected. At day 7 post-infection, we observed an increased proportion of MPECs while fewer SLECs were present in the spleen (Fig. 1B) and blood (SI Appendix, Fig. S1C). Similar effects on MPEC/SLEC differentiation were obtained following dendritic cell vaccination, LCMV-OVA infection and polyclonal CD8⁺ T cell response

(SI Appendix, Fig. S1D-F). Although, we did not observe differences in thymic differentiation and peripheral OT-I T cells (SI Appendix, Fig. S2A-E), we confirmed our results using sorted CD44^{lo} naive OT-I T cells (SI Appendix, Fig. S2F). Finally, to test whether overexpression of NR4A3 promoted the generation of SLECs, we stimulated *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I CD8⁺ T cells with OVA-pulsed splenocytes *in vitro* for 24h, spin transduced them with defective retrovirus encoding *Nr4a3* and adoptively transferred the transduced OT-I cells into B6.SJL mice infected with Lm-OVA the day before. As shown in Fig. 1C, overexpression of NR4A3 in *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells led to increased SLEC differentiation while MPEC generation was decreased. Therefore, NR4A3 modulates the generation of CD8⁺ memory T cells by influencing the generation of MPECs at the peak of the CD8⁺ T cell response.

The generation of fewer SLECs in absence of NR4A3 raises the possibility that effectors are less differentiated and as such might be less functional. However, after a short *in vitro* restimulation with the OVA peptide, more *Nr4a3*^{-/-} effectors produced cytokines (IFN- γ , TNF- α and IL-2) than their WT counterpart and they produced them in higher amount (Fig. 2A). The effect of NR4A3 deficiency on cytokine production was also observed in the polyclonal T cell repertoire setting (SI Appendix, Fig. S3A). This enhanced cytokine production is observed in both MPECs and SLECs (SI Appendix, Fig. S3B). Overexpression of NR4A3 in *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells led to a reduction of cytokine production (Fig. 2B). Therefore, NR4A3 deficiency promotes both memory generation and functional capacity of CD8⁺ T cells, two processes that are usually not co-regulated.

NR4A3 deficiency promotes the differentiation of central memory CD8⁺ T cells

To test whether enhanced memory generation was a consequence of an increased proportion of MPECs at the peak of the T cell response, we sorted *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I MPECs from the spleen of mice infected with Lm-OVA (day 5) and adoptively transferred the same numbers in competition in WT recipients (Fig. 3A). The rate of memory generation from *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} MPECs was slightly higher for NR4A3-deficient MPECs indicating that increased memory CD8⁺ T cell generation was the consequence of both an increased MPEC generation and enhanced differentiation into memory T cells (Fig. 3A). Greater differentiation of MPECs into long-lived memory CD8⁺ T cells is probably not the consequence of improved survival during the contraction phase but may result from enhanced sensitivity of *Nr4a3*^{-/-} OT-I memory T cells to IL-15 (SI Appendix, Fig. S4A-B).

The characterization of CD8⁺ memory T cell generation shows that the number of memory CD8⁺ T cells is increased in the spleen (Fig. 1A), lymph nodes and bone marrow in the absence of NR4A3 (Fig. 3B) with a higher proportion of cells bearing a CD62L^{hi} central memory phenotype (Fig. 3C). As a consequence, a greater proportion of *Nr4a3*^{-/-} OT-I CD8⁺ memory T cells co-produce IL-2 and IFN- γ (Fig. 3D). Similar results were obtained using LCMV-OVA infection in a competitive setting (SI Appendix, Fig. S4C,D). Finally, we did not observe any differences in homeostatic proliferation of *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I memory T cells (SI Appendix, Fig. S4E,F)

Following adoptive transfer and challenge with a high dose of Lm-OVA, *Nr4a3*^{-/-} OT-I memory T cells expand as efficiently as *Nr4a3*^{+/+} OT-I memory cells (Fig. 3E,F) and the generated secondary CD8⁺ T effectors were still more polyfunctional after rechallenge (Fig. 3G) and differentiate more into MPECs and CD62L^{hi} cells (SI Appendix, Fig. S4G). To analyze the capacity of *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I memory T cells to control a bacterial challenge, we generated OT-I

memory CD8⁺ T cells following LCMV-OVA infection and challenge the recipient mice with 5 x 10⁵ CFUs of Lm-OVA. We did not observe a better control of bacterial burdens in mice containing *Nr4a3*^{-/-} OT-I memory T cells (SI Appendix, Fig. S4H). This might be the consequence of a very potent control of bacteria in the WT setting or may reflect a lack of better control of Lm-OVA by central memory T cells. The enrichment for memory T cells with a central memory phenotype and the enhanced functionality of *Nr4a3*^{-/-} CD8⁺ T cells led us to evaluate whether they would better control tumor growth. To do so, 2 x 10⁵ *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} memory OT-I T cells generated following Lm-OVA infection were adoptively transferred into mice bearing B16-OVA melanomas. In this setting, only NR4A3-deficient memory CD8⁺ T cells were able to provide prolonged mice survival and reduced tumor growth (Fig. 3H and SI Appendix, Fig. S4I). Therefore, NR4A3 deficiency favours the generation of more central memory CD8⁺ T cells that are endowed with enhanced functions and ability to control tumor growth.

NR4A3 deficiency influences early expression of transcription factors important for MPEC and memory CD8⁺ T cell generation

To understand how NR4A3 deficiency promotes enhanced MPEC and memory CD8⁺ T cell generation while at the same time enhancing effector functions, we performed the analysis of the transcriptome of *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells early after *in vivo* T cell activation, before MPEC/SLEC differentiation (SI Appendix, Fig. S5A), as *Nr4a3* expression is induced early and transiently following T cell stimulation *in vivo* (peak at 24h post-infection with Lm-OVA; SI Appendix, Fig. S5B). At early time points, day 2 and day 3 post-infection, we did not observe any defect in proliferation and acquisition of the activation markers CD69 and CD44 by *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells (SI Appendix, Fig. S5C and D) further validating the choice of day 3 for the

RNA-seq analysis. At day 3 post-infection with Lm-OVA, 355 genes were differentially expressed in *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells (fold change >|1.5| and *P* adj <0.05), among them 274 genes show higher expression in absence of NR4A3 while 81 genes were downregulated (Fig. 4A and Dataset S1). Gene set enrichment analysis (GSEA) showed enrichment for several gene signatures associated with immune memory (Fig. 4B). In agreement with this, at day 3 of the response, the expression of transcription factors controlling MPEC and memory generation (*Tcf7*, *Eomes*, *Id3*, *Bcl6*, *Bach2*, *Zeb2*) was increased while the expression of many transcription factors controlling SLEC differentiation (*Id2*, *Prdm1*, *Rbpj*) was downregulated in the absence of NR4A3 (Fig. 4C). We validated by FACS and RT-qPCR analysis that the expression of these transcription factors was modulated by NR4A3 in OT-I effector T cells at day 3 post-infection with Lm-OVA (SI Appendix, Fig. S5E,F) and the changes in the expression of these transcription factors were maintained in day 7 effectors (Fig. 4D,E), except for T-bet. Our data also reveal a role for NR4A3 in promoting SLEC differentiation via the regulation of the *Il2ra* gene (37, 38). *Il2ra* gene transcription and CD25 protein expression are significantly downregulated in day 3 *Nr4a3*^{-/-} OT-I effector T cells (Fig. 4A,F,G). Moreover, *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells at day 3 post-infection are enriched for the CD25^{lo}CD62L^{hi} subset when compared to *Nr4a3*^{+/+} OT-I T cells (SI Appendix, Fig. S5G), a subset identified by others to be committed to differentiate into memory cells (39) further supporting the idea that NR4A3 deficiency has an early impact on the acquisition of the memory program. Altogether, these data show that NR4A3 deficiency has an immediate impact on the central molecular events that regulate CD8⁺ T cell fate.

NR4A3 influences chromatin accessibility early during T cell activation

As NR4A3 is rapidly and transiently induced in antigen stimulated CD8⁺ T cells and because it has an early impact on the programming of effector differentiation, we decided to determine the effect of NR4A3 deficiency on chromatin accessibility using ATAC-seq. To do so, we first validated that *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells stimulated *in vitro* for three days showed similar changes in expression of selected transcription factors and enhanced cytokine production (SI Appendix, Fig. S6A). In this *in vitro* setting, *Nr4a3* transcription peaks at 12h post-stimulation (SI Appendix, Fig. S6B). Therefore, we extracted nuclei from *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells stimulated for 12h to perform the ATAC-seq. As shown in Fig. 5A and Dataset S2, a total of 1572 DARs of chromatin were identified (P adj<0.05) with 1010 having a fold change of >|1.5| and a P adj<0.05 with most of them (922; 91%) being more open in the absence of NR4A3. The more opened DARs in *Nr4a3*^{-/-} cells were enriched for regions containing consensus binding sites for the bZIP family of transcription factors (AP-1, Jun, Fos, BATF) while the less opened DARs were enriched for NR4A3 and its family members consensus site (NBRE; identified as Nur77 in the figure) and Fli1 (Fig. 5B). Among the DARs (with a cut-off of P adj<0.05), 105 of them contained NBRE motifs (Dataset S3) and 25% of them show differential transcription by *Nr4a3*^{-/-} OT-I day 3 effectors (Fig. 5C). Among all the DARs (P adj <0.05) at 12h post-stimulation of *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells, 20% of the genes associated with them are differentially transcribed by day 3 *in vivo* effectors (P adj <0.05; Fig. S6C). This demonstrates that NR4A3 has an early influence on the transcriptional program of CD8⁺ T cells with a major impact on genes that are regulated by bZIP transcription factors, which share a similar consensus binding sequence on DNA. The enhanced opening of chromatin regions containing bZIP consensus binding sites is in line with recent reports suggesting that NR4A family members affect the binding of Jun to target genes (33, 35).

Analysis of our RNA-seq data using the GeneXplain platform (40) identifies Fos and Jun as the top upstream master regulators of the differentially expressed genes (Fig. 5D) further supporting a role for NR4A3 in modulating the action of the AP-1 transcription factor. Altogether this indicates that the absence of NR4A3 favours the binding of AP-1 and/or other bZIP transcription factors to chromatin to promote the transcription of target genes. Interestingly, AP-1 and Jun are known to promote the transcription of effector genes (14, 41), thus providing a possible explanation for the enhanced effector functions of *Nr4a3*^{-/-} CD8⁺ T cells.

Discussion

Our results identify that NR4A3 restrains memory potential and effector functions of CD8⁺ T cells in acute infection. In this context, NR4A3-deficient CD8⁺ T cells generate more MPECs and central memory CD8⁺ T cells while having enhanced capacity to produce cytokines.

At the molecular level, our results demonstrate that NR4A3 influences CD8⁺ T cell differentiation by affecting the chromatin accessibility of certain genes early following CD8⁺ T cell activation, which then leads to a transcriptional program that favors SLEC generation while repressing effector functions. In the absence of NR4A3, most of the DARs are more open and these are significantly enriched for the bZIP (Jun, Fos, AP-1...) family transcription factor motif. This is similar to what has been recently reported for NR4A1 in CD4⁺ T cells and for NR4A triple-deficient CD8⁺ TILs (33, 35). Interestingly, NR4A1 deficient CD4⁺ T cells and NR4A triple-deficient CD8⁺ TILs are also more functional than their WT counterpart. This suggests that all three NR4A family members have the ability to influence effector functions and that they do so using a similar molecular mechanism. It is therefore intriguing that loss of only one member is sufficient to affect T cell functionality. Further studies should reveal whether each member affects

a different set of genes controlling T cell functions and that these are possibly regulated by different bZIP transcription factors.

Our molecular analysis also reveals that NR4A3 affects MPEC/SLEC differentiation by controlling the early induction of the SLEC molecular program. It could be considered surprising that NR4A3 restrains both effector functions and memory generation. There are several members of the bZIP transcription factors family and their individual expression varies at different stages of the immune response (17). In the course of an immune response, bZIP transcription factor binding motif is enriched in open chromatin regions of SLECs, MPECs and memory CD8⁺ T cells when compared to naive cells (17-19). Also, members of this family have been shown to target pro-memory genes, such as *Bcl6*, *Tcf7* and *Eomes*, as well as genes more traditionally associated with effector functions (41). Finally, it is possible that some bZIPs contribute to the acquisition of effector function while others promote memory generation. As a whole, these elements underline the complexity of this family of transcription factors and suggest that, while perhaps counterintuitive at face value, the fact that we observed an enrichment for bZIP motifs in opened chromatin regions of *Nr4a3*^{-/-} CD8⁺ T cells early in the response is compatible with both an increase in effector function and in memory potential. This interpretation is supported by a recent report demonstrating that CAR T cells overexpressing c-Jun are more functional and undergo less terminal differentiation (42).

Intriguingly, NR4A1, which does compete with c-Jun, was reported to have either no effect on MPEC/SLEC differentiation or to limit SLEC formation, which would be the opposite effect of NR4A3 (35, 43). These observations strengthen the notion that the different NR4A family members have non-overlapping functions during the CD8⁺ T cell response. While NR4A3 could have a dominant effect over NR4A1 in affecting the binding of bZIP transcription factors to their target

genes or could selectively affect the binding of certain bZIP transcription factor family members, it is also possible that the increased MPEC formation in *Nr4a3*^{-/-} mice was not solely the consequence of enhanced accessibility of bZIP transcription factors to DNA. NR4A3's transcriptional effects could be mediated by a direct regulation of NR4A3 via binding on genes containing an NBRE motif in conjunction with the reported ability of NR4As to modulate chromatin remodeling (44). Among the differentially accessible chromatin regions between *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} activated OT-I T cells, 105 of them contain a putative NBRE motif (Dataset S3). Very few of these regions are in proximity of genes known to influence SLEC/MPEC differentiation and effector functions. These include *Rbpj* and *Bach2* (8, 9, 14). While we found DARs in proximity to genes related to CD8 T cell differentiation or function, such as *Il2ra*, *Irf4* and *Myc*, these regions did not contain classical NBRE motifs (37, 45-48). In other studies looking at early *in vitro* T cell activation or in TILs, NBRE motifs were found close to *Foxo1*, *Havcr2*, *Kit*, *Tcf7*, *Tbx21*, *Id3* and *Bcl6*, but we did not detect a difference in chromatin opening at these sites in our study (19, 33). Because the expression of some of these genes was differential in our RNA-seq, NR4A3 could regulate their expression, but not by influencing the accessibility of chromatin. Alternatively, we might have missed these important sites because we elected to perform our ATAC-seq study at 12h post-stimulation. This decision was motivated by the desire to uncover the early events mediated by NR4A3 whose peak of TCR-induced mRNA expression was identified at 12h. However, NR4A3 protein expression could be maintained for a longer period of time and there could be NR4A3-regulated targets of importance at later time points. Another possibility is the reported ability of NR4A family members to regulate transcription without directly binding to DNA. This process of transrepression was shown in myeloid cells and is the result of interaction of NR4A2 with the p65 subunit of NFκB, which favors the recruitment of CoREST that actively

removes p65 from the promoters of inflammatory genes (49). Relevant to this, note that NFκB binding motif is also enriched in our ATAC-seq data. Overall, this highlights the complexity of the NR4A family and underlies the need for further mechanistic studies.

The NR4A family members are induced by TCR signaling, and may thus be important during thymic T cell differentiation or play a role in the maintenance of memory cells following tonic signaling. Lack of NR4A3 expression during thymic differentiation could impact the response of peripheral mature CD8⁺ T cells. We think that this is an unlikely possibility as overexpression of NR4A3 after activation of naive *Nr4a3*^{-/-} CD8⁺ T cells was able to recapitulate the WT phenotype for MPEC/SLEC differentiation and cytokine production. In support of this, thymic differentiation and peripheral T cell phenotype was not affected by NR4A3 deficiency. We have also not formally excluded a role for NR4A3 in regulating CD8 T cell memory in response to tonic signaling. However, as expected for an immediate early gene, during an acute response *Nr4a3* transcription is already abolished at day 2 *in vivo* (see SI Appendix, Fig. S5 and (20)). In addition, data suggests that in both T cells and B cells, NR4A3 is not induced following tonic signaling, contrary to what was observed for NR4A1 (50, 51). This, coupled to our sequencing data obtained early following TCR stimulation support that the impact of NR4A3 on CD8 T cell differentiation is not likely to be via a role in the response of memory T cells to tonic signaling. It would be of interest to confirm this using an inducible cre/lox system. However, growing evidence demonstrate that in tertiary tissue, NR4A family members are re-expressed and important for resident memory T cells, suggesting that the biological role of NR4As could be dependent on tissue microenvironment (52-55).

Altogether, our results suggest that the modulation of NR4A3 activity represents a promising avenue for enhancing the generation of memory CD8⁺ T cell following vaccination and for the production of better T-cells for adoptive cell therapy of cancer patients.

Materials and methods

Mice

B6.SJL, C57BL/6, CD45.1.2 (F1 of B6.SJLxC57BL/6), *Nr4a3*^{-/-} and *Nr4a3*^{+/+}, OT-I (36) (*Rag1*^{-/-} CD45.2) mice were all bred at the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center facility. *Nr4a3*^{-/-} mice were a kind gift from Dr. Orla M. Conneely (56). OT-I/B6.SJL mice were obtained by crossing OT-I (*Rag1*^{-/-} CD45.2) mouse with B6.SJL (CD45.1). *Nr4a3*^{-/-} were backcrossed for at least 10 generations to C57BL/6 and then crossed to OT-I mouse to obtain OT-I *Nr4a3*^{+/+} (*Rag1*^{-/-} CD45.2) and OT-I *Nr4a3*^{-/-} (*Rag1*^{-/-} CD45.2) mice. Mice were housed in a pathogen-free environment and treated in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

Cell lines

B16-OVA cells were kindly provided by A. Lamarre (INRS-Institut Armand-Frappier). B16-OVA cells were cultured in DMEM supplemented with 10% of *Nu* serum, sodium pyruvate (1mM), penicillin/streptomycin in presence of 5 mg/ml G418 to select for OVA expressing cells. HEK293T cells were kindly provided by H. Melichar (University of Montreal) and were cultured in DMEM supplemented with 10% of *Nu* serum and penicillin/streptomycin.

Adoptive transfer and immune responses

For the study of effector and memory CD8⁺ T cell generation, 5 x 10³ to 10⁴ *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I CD8⁺ T cells (CD45.2⁺) isolated from lymph nodes (LN) were adoptively transferred into recipients by i.v. injection. The following day, mice were infected or vaccinated as described below. For the study of the early *in vivo* immune response (day 1 to 3), 2 x 10⁶ OT-I T cells were adoptively transferred. For competitive experiment, 10⁴ *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells (CD45.2⁺) were co-transferred with 10⁴ WT B6.SJL OT-I T cells (CD45.1⁺) into CD45.1.2 recipients.

Lm-OVA infection

2 x 10³ CFU of *Listeria monocytogenes* genetically modified to express OVA (Lm-OVA) (grown as previously described (57, 58) was injected i.v. For analysis of secondary response, 10⁴ *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} (CD45.2⁺), generated *in vivo* following Lm-OVA infection, were adoptively transferred into a B6.SJL (CD45.1⁺). On the following day, mice were infected with 10⁴ CFUs of Lm-OVA. The secondary response was evaluated at day 7 post-infection.

LCMV-OVA infection

The strain of LCMV Armstrong encoding OVA (LCMV-OVA) was kindly provided by Juan C. de la Torre (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA (59)). The virus was produced by infection of the L929 fibroblast cell line, cultured in MEM containing 5% heat inactivated *Nu* serum, followed by harvesting of the produced virus in the supernatant. The virus titer was determined using MC57G fibroblasts as previously described (60). Mice were infected with 2 x 10⁴ PFUs of LCMV-OVA by i.v. injection.

DC immunization

DC immunization was performed as previously described (38). Bone marrow cells were cultured at 0.25×10^6 cells/ml in 6-well plate in complete media supplemented with rGM-CSF (25 ng/ml) and IL-4 (from P815-IL-4 cell culture supernatant). On day 2 and 3 of the differentiation culture, half of the media was removed and replaced with a fresh IL-4 and rGM-CSF supplemented complete media. On day 6, LPS (0.1 μ g/ml) was added to mature DCs and OVA peptide was loaded overnight (2 μ g/ml). For immunization, 5×10^5 OVA peptide loaded DCs were injected i.v.

Analysis of polyclonal CD8⁺ T cell response following Lm-OVA infection

At day 7 post-infection with Lm-OVA (2×10^3 CFUs, i.v.), the response of OVA-specific CD8⁺ T cells in the spleen was evaluated using K^b-OVA tetramer staining as previously described (9).

Retroviral supernatant production

pMSCV IRES GFP (pMIG) was a kind gift from Guy Sauvageau (61) and pMIG-*Nr4a3* has been previously described (23). Retroviral supernatants were produced by collecting the cell culture media at day 2 and 3 after transfection of HEK293T cells with pMIG or pMIG-*Nr4a3*.

***Nr4a3* retroviral overexpression**

Nr4a3^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells (CD45.2⁺) were isolated from LNs and mixed with B6.SJL spleen (CD45.1⁺) cells in a 2:3 ratio. Cells were cultured at 5×10^6 cells/ml in the presence of 0.1 μ g/ml of OVA peptide. 24h post-stimulation, cells were harvested and spin transduced with retroviral supernatant (pMIG retrovirus (RV) or pMIG *Nr4a3* containing RV) in the presence of polybrene (8 μ g/ml) for 1h at 2500 rpm and 37°C. The cells were incubated for an additional 1 to 2h at 37°C

and then injected (3×10^5 OT-I cells) in mice infected 24h earlier with Lm-OVA (2×10^3 CFU/mouse).

MPEC competitive transfer

10^6 *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells (CD45.2⁺) were adoptively transferred in competition with 10^6 OT-I T cells (CD45.1⁺) from B6.SJL mice into CD45.1⁺CD45.2⁺ mice. The following day, recipient mice were infected with 2×10^3 CFUs of Lm-OVA. At day 5 post-infection, spleens were harvested to sort *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I MPECs (CD8⁺CD45.2⁺CD127⁺KLRG1⁻) and WT OT-I MPECs (CD8⁺CD45.1⁺ CD127⁺ KLRG1⁻). 1 to 2×10^5 MPECs of each genotype were mixed in a 1:1 ratio and transferred into CD45.1⁺CD45.2⁺ recipient mice. 20 days later, spleens and LNs were harvested to track OT-I T cell differentiation.

Stimulation of memory T cells with rhIL-15

Splenocytes (10^6 /mL) from mice containing OT-I memory T cells were labeled with CTV and cultured with 50 ng/mL of rhIL-15 (R&D) for three days.

ACT with *in vivo* generated memory T cells

B6.SJL mice were injected sub-cutaneous with 5×10^5 B16-OVA cells into the right flank. Seven days post tumor implantation, tumor bearing mice were treated with 1.35 to 2×10^5 *in vivo* generated *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I memory T cells obtained following Lm-OVA infection. Tumor growth was followed until experimental endpoint (200 mm^2 or tumor ulceration) was reached.

Samples preparation for flow cytometry analysis

Blood was collected in PBS containing 2mM EDTA and lymphocytes were isolated with *Lymphocyte Separation Medium*. Spleens and LNs were dissociated using frosted glass slides. Red blood cell lysis was performed on spleens and bone marrow using 0.83% NH₄Cl 5 min at room temperature (RT). Extracellular staining was performed 20 min at 4°C as in a previously described FACS WASH (FW) buffer (62). Intranuclear staining for different transcription factors was performed using the *Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set* according to manufacturer (Invitrogen) instructions.

Lm-OVA challenge

Mice that were previously adoptively transferred with OT-I T cells and infected with LCMV-OVA (as described above) were challenged at day 43 with 5 x 10⁵ CFUs of Lm-OVA. On day 3 post challenge, spleen and liver were collected for analysis of bacterial burdens as previously described (57).

Flow cytometry and cell sorting

Flow cytometry was performed on cellular suspensions of spleen, LN, bone marrow and blood. Extracellular and intranuclear stainings were performed as previously described (57, 62, 63). *CellTraceViolet*[®] (CTV) staining was performed according to the manufacturer (ThermoFisher) recommendations. Apoptosis was quantified using AnnexinV and 7-AAD staining as previously described (38). Ki67 staining was performed by using *FoxP3 transcription factor staining kit* following manufacturer recommendations. 2 weeks following BrdU treatment (64), BrdU staining was performed as previously described (38). Cell sorting of OT-I *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} cells was

performed on *in vitro* stimulated or *ex vivo* splenocytes. Briefly, cell suspensions were incubated with viability dye and Fc-block antibodies for 10 min at RT. Cells suspensions were then stained with extracellular antibodies 20 min at 4°C in sorting buffer (PBS, 1% *Nu* serum, 1mM EDTA, 25mM HEPES). Viable cells (Zombie-dye^{neg}CD8⁺CD45.2⁺) were then sorted (BD FACSAria III) directly in TRIzol (Life Technologies) reagent and stored at -80°C until RNA extraction or sorted in serum containing media (20% *Nu* serum containing RPMI) for subsequent use. For cytokine production by retrovirally transduced OT-I T cells, CD8⁺CD45.2⁺GFP⁺ or CD8⁺CD45.2⁺GFP⁻ cells were sorted and then re-stimulated as described below. Flow cytometry analysis was performed on BD LSR II or BD LSRFortessa X-20 from BD Biosciences and data were analyzed using FlowJo software (Tree Star). List of antibodies and flow cytometry reagents is provided in SI Appendix Table S1.

Analysis of cytokine production

Ex vivo splenocytes were collected and stimulated with the OVA peptide (2 µg/ml) in the presence of brefeldin A (BFA, 10 µg/ml) for 5h at 37°C while *in vitro* activated OT-I effectors were restimulated with OVA loaded splenocytes. Following stimulation cells were fixed, permeabilized and stained as previously described (63). Briefly, restimulated cells were fixed 20 min with 2% paraformaldehyde at RT. Fixed cells were permeabilized with saponin (0.5 %) FW for 10 min at RT. Permeabilized cells were stained with anti-cytokine antibodies followed by cell surface staining.

Anti-CD3/CD28 stimulation

10⁶ cells/ml from LNs of OT-I mice were stimulated in 24-well plates with 1 µg of plate bound anti-CD3 (clone 145-2C11) antibody and 5 µg/ml soluble anti-CD28 (clone 37.51) antibody for 72h.

Quantitative real-time PCR

Total RNA from cells sorted in TRIzol was extracted using manufacturer recommendations. RNA was reverse-transcribed into cDNA and then used for the qPCR reaction with Power SYBR Green reagents (Life Technologies) on a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Each sample was normalized to a reference gene expression (*Hprt*) and a calibrator (reference sample) as previously described (57). ΔC_T was calculated as the difference between the C_T value of the target gene and the C_T value of the reference gene (*Hprt*). The $\Delta\Delta C_T$ was then calculated by subtracting the mean of ΔC_T value of the sample from the ΔC_T value of a reference sample. The relative level of target gene expression was calculated using $2^{-\Delta\Delta C_T}$. The sequence of the *Id2*, *Id3*, *Tcf7*, *Prdm1*, *Il2*, *Tnfa*, *Ifng* primers are listed in SI Appendix Table S1.

RNA-seq analysis

Mice were adoptively transferred with naive OT-I T cells purified with the EasySep isolation kit and infected with Lm-OVA. 72h post-infection, viable and activated (Zombie-dye^{neg} CD44^{hi}) *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells were sorted directly into TRIzol reagent. 5 to 6 individual biological samples (2 to 3 mice per group of 2 independent experiments) were collected for each genotype with 10⁵ cells per sample. RNA extraction, library preparation, sequencing and

bioinformatical analysis were done at the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) Genomics Platform (University of Montreal). Briefly, for cDNA libraries preparation 100 ng of RNA were used and the cDNA library sequencing was performed on Illumina Nextseq500 (75 cycles Single-End reads). Sequenced reads were trimmed for sequencing adapters and low quality 3' bases using Trimmomatic version 0.35 (65) and then aligned to the reference mouse genome version GRCh38 (gene annotation from Gencode version M13, based on Ensembl 88) using STAR version 2.5.1b (66). Gene expressions were obtained both as readcount directly from STAR as well as computed using RSEM (67) in order to obtain gene and transcript level expression, either in TPM or FPKM values, for these stranded RNA libraries. DESeq2 version 1.22.2 (68) was then used to normalize gene readcounts and compute differential expression between the different experimental conditions.

ATAC-seq analysis

Nr4a3^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells were isolated from LNs and purified using the naive CD8⁺ T cell isolation kit of EasySep accordingly to the manufacturer instructions. Isolated naive OT-I T cells were stimulated as described in the main material and methods with anti-CD3/CD28 antibodies. 12h post-stimulation, cells were harvested, and nuclei isolated as previously described (69). Briefly, the stimulated OT-I were harvested on ice by washing the stimulation plates with ice cold PBS. The collected cells were centrifuged 5 min at 1300 rpm and then resuspended to 20 x 10⁶ cells per ml with ice cold PBS. The cell lysis was performed 10 min on ice by adding to one volume of ice-cold PBS resuspended cells 4 volumes of lysis buffer (12.5 mM Tris, pH 7.4, 45 mM KCl, 6.25 mM MgCl₂, 375 mM sucrose, 0.125% nonidet P-40, and tablet of complete (EDTA free) protease inhibitor cocktail (Roche)/50 ml). Lysed cells were then centrifuged at 500g 7 min at 4°C

in a pre-cooled centrifuge with swinging buckets. Obtained nuclei pellet was resuspended by pipetting in 1/10 of the original lysis volume in wash buffer (10 mM Tris, pH 7.4, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 300 mM sucrose) and then the wash buffer was added to 1/2 of the lysis volume. The resuspended nuclei were centrifuged at 500g 7 min at 4°C in a pre-cooled centrifuge with swinging buckets and the washed nuclei were counted and used for the transposase reaction. ATAC-seq was performed as previously described (70) with some modifications (Tn5 tagmentation, DNA purification, library preparation, sequencing and bioinformatical analysis were performed at the Montreal Clinical Research Institute Genomics Platform (University of Montreal)). Briefly, 5 x 10⁴ nuclei were directly treated with *Tn5* transposase at 37°C for 30 min. After the enzymatic reaction, the DNA was purified by *Mini-Elute PCR Purification columns* (*Qiagen*) and enriched by 12 cycles of PCR. The library was recovered from PCR reaction by *GeneRead Purification columns* (*Qiagen*) and then it was double strand sequenced on Illumina (HiSeq4000 PE50). 47.3 to 75 x 10⁶ reads/sample was obtained. These reads were assessed for quality control with *FASTQC* (0.11.8) and combined with *MultiQC*. The adapters were removed with *TRIMMOMATIC* (0.36) (71) and aligned with *Bowtie2* (2.2.6) (72) to *mm10* mouse genome. Mitochondrial reads and PCR duplicates were removed with *Picard's MarkDuplicates* tools (2.4.1) and shift reads of Tn5 insertion were determined with *Deeptools* (73). Peaks calling was done with *MACS2* (2.0.10) (74) and their filtering with *ENCODE blacklisted regions*. Comparison of differently accessible regions (DARs) between 12h stimulated OT-I *Nr4a3*^{-/-} and *Nr4a3*^{+/+} samples were performed with *DESeq2* (1.22.2) (75). The log₂FC was calculated between *Nr4a3*^{-/-} and *Nr4a3*^{+/+} conditions, a positive DAR value means that the chromatin is more open in *Nr4a3*^{-/-} sample and a negative DAR value means that the chromatin is more open in *Nr4a3*^{+/+} sample. DARs were annotated and different transcription binding motifs identified with *HOMER* (4.8.0). Tn5 tagmentation, DNA purification, library preparation, sequencing and bioinformatical analysis

were performed at the Montreal Clinical Research Institute (IRCM) Genomics Platform (University of Montreal).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using an unpaired (two-tailed) Student's t-test, with a Welch's correction when applied, or using a Mann Whitney test when a low number of samples (lower than 7 samples) were available. For multiple groups comparisons the one way ANOVA (Kruskal-Wallis) analysis with Dunn's multiple comparisons was performed. For survival curve comparison a log-rank Mantel–Cox test was used. The statistical analysis was performed using Prism software (GraphPad Software). Data are presented as individual samples with mean and * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ were considered statistically significant.

Acknowledgements: We thank all laboratory members for helpful discussion. We thank S. Lesage, J.-S. Delisle and H. Melichar for critical reading of the manuscript. We thank Dr O. Conneely for providing *Nr4a3*^{-/-} mice, A. Lamarre for the B16-OVA cell line, J. C. de la Torre for LCMV-OVA, S. P. Schoenberger for Lm-OVA and M.-È. Lebel for advice on the B16-OVA tumor model. We thank M. Dupuis for cell sorting and the animal care technicians for mice husbandry. We are grateful to S. Boissel and P. Gendron from the IRIC genomic platform for help with the RNA-seq experiment and bio-informatical analysis and to V. Calderon, C. Grou and O. Neyret from IRCM for help with the ATAC-seq experiment. **Funding:** This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP 142333) and by a discovery grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2015-06645) to N. Labrecque. L. Odagiu was supported by a studentship from the Fonds de la recherche Québec-Santé. **Author**

contribution: L.O., S.B., N.L. designed and analysed the experiments. L.O., S.B., D.M.D.S., J.-F.D., S.N. performed the experiments. N.L., S.B., L.O. wrote the paper. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** The raw RNA-seq and ATAC-seq data are available in the Gene Expression Omnibus (GSE143513) and the analysed results are presented in the supplemental materials. All other data needed to evaluate the conclusions of this paper are presented in the figures or the Supplementary materials.

References and notes

1. S. M. Kaech, *et al.*, Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* **4**, 1191–1198 (2003).
2. N. S. Joshi, *et al.*, Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8⁺ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity* **27**, 281–295 (2007).
3. S. Sarkar, *et al.*, Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J Exp Med* **205**, 625–640 (2008).
4. R. L. Rutishauser, *et al.*, Transcriptional Repressor Blimp-1 Promotes CD8⁺ T Cell Terminal Differentiation and Represses the Acquisition of Central Memory T Cell Properties. *Immunity* **31**, 296–308 (2009).
5. A. Kallies, A. Xin, G. T. Belz, S. L. Nutt, Blimp-1 Transcription Factor Is Required for the Differentiation of Effector CD8⁺ T Cells and Memory Responses. *Immunity* **31**, 283–295 (2009).
6. C. Y. Yang, *et al.*, The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8⁺ T cell subsets. *Nat Immunol* **12**, 1221–1229 (2011).
7. Y. Ji, *et al.*, Repression of the DNA-binding inhibitor Id3 by Blimp-1 limits the formation

- of memory CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* **12**, 1230–1237 (2011).
8. R. A. Backer, *et al.*, A central role for Notch in effector CD8(+) T cell differentiation. *Nat Immunol* **15**, 1143–1151 (2014).
 9. M. Mathieu, F. Duval, J. F. Daudelin, N. Labrecque, The Notch Signaling Pathway Controls Short-Lived Effector CD8⁺ T Cell Differentiation but Is Dispensable for Memory Generation. *J. Immunol.* **194**, 5654–5662 (2015).
 10. K. D. Omilusik, *et al.*, Transcriptional repressor ZEB2 promotes terminal differentiation of CD8⁺ effector and memory T cell populations during infection. *J Exp Med* **212**, 2027–2039 (2015).
 11. C. X. Dominguez, *et al.*, The transcription factors ZEB2 and T-bet cooperate to program cytotoxic T cell terminal differentiation in response to LCMV viral infection. *J Exp Med* **212**, 2041–2056 (2015).
 12. A. M. Intlekofer, *et al.*, Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol* **6**, 1236–1244 (2005).
 13. H. Ichii, *et al.*, Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* **3**, 558–563 (2002).
 14. R. Roychoudhuri, *et al.*, BACH2 regulates CD8(+) T cell differentiation by controlling access of AP-1 factors to enhancers. *Nat Immunol* **17**, 851–860 (2016).
 15. X. Zhou, *et al.*, Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity* **33**, 229–240 (2010).
 16. J. T. Chang, *et al.*, Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* **315**, 1687–1691 (2007).
 17. J. P. Scott-Browne, *et al.*, Dynamic Changes in Chromatin Accessibility Occur in CD8⁺ T Cells Responding to Viral Infection. *Immunity* **45**, 1327–1340 (2016).
 18. B. Yu, *et al.*, Epigenetic landscapes reveal transcription factors that regulate CD8⁺ T cell

- differentiation. *Nat Immunol* **18**, 573–582 (2017).
19. D. Wang, *et al.*, The Transcription Factor Runx3 Establishes Chromatin Accessibility of cis-Regulatory Landscapes that Drive Memory Cytotoxic T Lymphocyte Formation. *Immunity* **48**, 659–674. (2018).
 20. J. A. Best, *et al.*, Transcriptional insights into the CD8(+) T cell response to infection and memory T cell formation. *Nat Immunol* **14**, 404–412 (2013).
 21. M. A. Pearen, G. E. O. Muscat, Minireview: Nuclear hormone receptor 4A signaling: implications for metabolic disease. *Mol. Endocrinol.* **24**, 1891–1903 (2010).
 22. R. N. Hanna, *et al.*, The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C⁻ monocytes. *Nat Immunol* **12**, 778–785 (2011).
 23. S. Boulet, *et al.*, The orphan nuclear receptor NR4A3 controls the differentiation of monocyte-derived dendritic cells following microbial stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**, 15150–15159 (2019).
 24. S. E. Mullican, *et al.*, Abrogation of nuclear receptors Nr4a3 and Nr4a1 leads to development of acute myeloid leukemia. *Nat Med* **13**, 730–735 (2007).
 25. L. M. Carlin, *et al.*, Nr4a1-Dependent Ly6Clow Monocytes Monitor Endothelial Cells and Orchestrate Their Disposal. *Cell* **153**, 362–375 (2013).
 26. R. N. Hanna, *et al.*, NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis. *Circ. Res.* **110**, 416–427 (2012).
 27. T. Sekiya, *et al.*, Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nat Immunol* **14**, 230–237 (2013).
 28. M. S. Fassett, W. Jiang, A. M. D'Alise, D. Mathis, C. Benoist, Nuclear receptor Nr4a1 modulates both regulatory T-cell (Treg) differentiation and clonal deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 3891–3896 (2012).
 29. Q. N. Hu, A. Y. W. Suen, L. M. Henao Caviedes, T. A. Baldwin, Nur77 Regulates

Nondeletional Mechanisms of Tolerance in T Cells. *J. Immunol.* **199**, 3147–3157 (2017).

30. G. P. Mognol, *et al.*, Exhaustion-associated regulatory regions in CD8⁺ tumor-infiltrating T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**, E2776–E2785 (2017).
31. K. E. Pauken, *et al.*, Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science* **354**, 1160–1165 (2016).
32. G. J. Martinez, *et al.*, The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8⁺ T cells. *Immunity* **42**, 265–278 (2015).
33. J. Chen, *et al.*, NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours. *Nature* **567**, 530–534 (2019).
34. H. Seo, *et al.*, TOX and TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8⁺ T cell exhaustion. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**, 12410–12415 (2019).
35. X. Liu, *et al.*, Genome-wide analysis identifies NR4A1 as a key mediator of T cell dysfunction. *Nature* **567**, 525–529 (2019).
36. K. A. Hogquist, *et al.*, T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **76**, 17–27 (1994).
37. V. Kalia, *et al.*, Prolonged interleukin-2Ralpha expression on virus-specific CD8⁺ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* **32**, 91–103 (2010).
38. S. Boulet, J.-F. Daudelin, N. Labrecque, IL-2 induction of Blimp-1 is a key in vivo signal for CD8⁺ short-lived effector T cell differentiation. *J. Immunol.* **193**, 1847–1854 (2014).
39. J. Arsenio, *et al.*, Early specification of CD8⁺ T lymphocyte fates during adaptive immunity revealed by single-cell gene-expression analyses. *Nat Immunol* **15**, 365–372 (2014).
40. E. Wingender, A. Kel, geneXplain — eine integrierte Bioinformatik-Plattform. *Biospektrum* **18**, 554–556 (2012).

41. M. Kurachi, *et al.*, The transcription factor BATF operates as an essential differentiation checkpoint in early effector CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* **15**, 373–383 (2014).
42. R. C. Lynn, *et al.*, c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance. *Nature* **576**, 293-300 (2019).
43. H. N. Nowyhed, T. R. Huynh, G. D. Thomas, A. Blatchley, C. C. Hedrick, Cutting Edge: The Orphan Nuclear Receptor Nr4a1 Regulates CD8⁺ T Cell Expansion and Effector Function through Direct Repression of Irf4. *J. Immunol.* **195**, 3515–3519 (2015).
44. R. P. Duren, S. P. Boudreaux, O. M. Conneely, Genome Wide Mapping of NR4A Binding Reveals Cooperativity with ETS Factors to Promote Epigenetic Activation of Distal Enhancers in Acute Myeloid Leukemia Cells. *PLoS ONE* **11**, e0150450 (2016).
45. K. Man, *et al.*, The transcription factor IRF4 is essential for TCR affinity-mediated metabolic programming and clonal expansion of T cells. *Nat Immunol* **14**, 1155–1165 (2013).
46. F. Raczkowski, *et al.*, The transcription factor Interferon Regulatory Factor 4 is required for the generation of protective effector CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1–14 (2013).
47. R. Wang, *et al.*, The Transcription Factor Myc Controls Metabolic Reprogramming upon T Lymphocyte Activation. *Immunity* **35**, 871–882 (2011).
48. C. Chou, *et al.*, c-Myc-induced transcription factor AP4 is required for host protection mediated by CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* **15**, 884-893 (2014).
49. K. Saijo, *et al.*, A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* **137**, 47–59 (2009).
50. A. E. Moran, *et al.*, T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J Exp Med* **208**, 1279–1289 (2011).
51. E. Jennings, *et al.*, Differential Nr4a1 and Nr4a3 expression discriminates tonic from activated TCR signalling events in vivo. *bioRxiv:10.1101/767566v2*, Posted January 15–

2020. (2020).

52. J. J. Milner, *et al.*, Runx3 programs CD8⁺ T cell residency in non-lymphoid tissues and tumours. *Nature* **552**, 253–257 (2017).
53. L. K. Beura, *et al.*, T Cells in Nonlymphoid Tissues Give Rise to Lymph-Node-Resident Memory T Cells. *Immunity* **48**, 327–338.e5 (2018).
54. C. S. Boddupalli, *et al.*, ABC transporters and NR4A1 identify a quiescent subset of tissue-resident memory T cells. *J. Clin. Invest.* **126**, 3905–3916 (2016).
55. N. S. Kurd, *et al.*, Early precursors and molecular determinants of tissue-resident memory CD8⁺ T lymphocytes revealed by single-cell RNA sequencing. *Sci Immunol* **5**, eaaz6894 (2020).
56. T. Ponnio, Q. Burton, F. A. Pereira, D. K. Wu, O. M. Conneely, The nuclear receptor Nor-1 is essential for proliferation of the semicircular canals of the mouse inner ear. *Mol Cell Biol* **22**, 935–945 (2002).
57. M. Mathieu, *et al.*, CD40-Activated B Cells Can Efficiently Prime Antigen-Specific Naïve CD8 T Cells to Generate Effector but Not Memory T cells. *PLoS ONE* **7**, e30139 (2012).
58. K. S. Bahjat, *et al.*, Cytosolic entry controls CD8⁺-T-cell potency during bacterial infection. *Infect Immun* **74**, 6387–6397 (2006).
59. C. Gerlach, *et al.*, The Chemokine Receptor CX3CR1 Defines Three Antigen-Experienced CD8 T Cell Subsets with Distinct Roles in Immune Surveillance and Homeostasis. *Immunity* **45**, 1270–1284 (2016).
60. M. Battegay, *et al.*, Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates. *J. Virol. Methods* **33**, 191–198 (1991).
61. J. Antonchuk, G. Sauvageau, R. K. Humphries, HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. *Exp. Hematol.* **29**, 1125–1134 (2001).

62. V. Ostiguy, E.-L. Allard, M. Marquis, J. Leignadier, N. Labrecque, IL-21 promotes T lymphocyte survival by activating the phosphatidylinositol-3 kinase signaling cascade. *J Leuk Biol* **82**, 645–656 (2007).
63. M.-H. Lacombe, M.-P. Hardy, J. Rooney, N. Labrecque, IL-7 receptor expression levels do not identify CD8⁺ memory T lymphocyte precursors following peptide immunization. *J Immunol* **175**, 4400–4407 (2005).
64. J. Chaix, *et al.*, Cutting Edge: CXCR4 Is Critical for CD8⁺ Memory T Cell Homeostatic Self-Renewal but Not Rechallenge Self-Renewal. *J. Immunol* **193**, 1013-1016 (2014).
65. A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel, Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120 (2014).
66. A. Dobin, *et al.*, STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
67. B. Li, C. N. Dewey, RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **12**, 323 (2011).
68. M. I. Love, W. Huber, S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550 (2014).
69. M. E. Pipkin, M. G. Lichtenheld, A reliable method to display authentic DNase I hypersensitive sites at long-ranges in single-copy genes from large genomes. *Nucleic Acids Res* **34**, e34 (2006).
70. J. D. Buenrostro, P. G. Giresi, L. C. Zaba, H. Y. Chang, W. J. Greenleaf, Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nature Methods* **10**, 1213–1218 (2013).
71. M. Lohse, *et al.*, RobiNA: a user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. *Nucleic Acids Res* **40**, W622–7 (2012).
72. B. Langmead, S. L. Salzberg, Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*

9, 357–359 (2012).

73. F. Ramírez, *et al.*, deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res* **44**, W160–5 (2016).
74. Y. Zhang, *et al.*, Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* **9**, R137 (2008).
75. S. Anders, W. Huber, Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* **11**, R106 (2010).

FIGURE

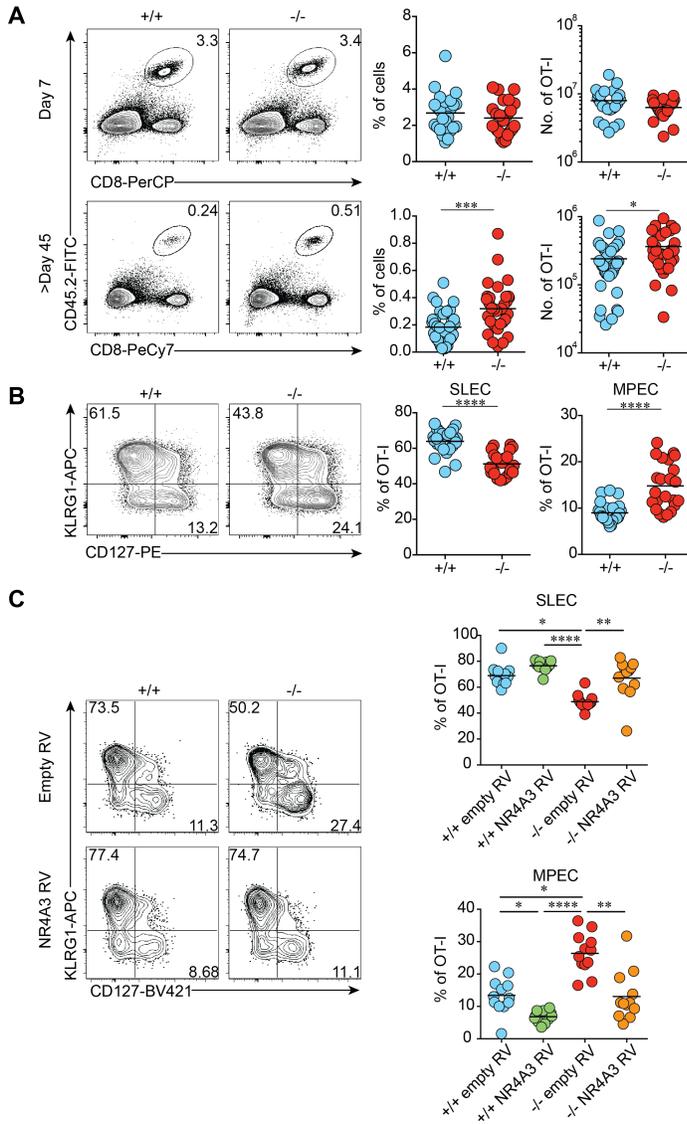


Figure 1. NR4A3 restrains CD8⁺ T cell memory generation. **A.** Effector and memory responses in the spleen of mice adoptively transferred with CD45.2⁺ *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I cells prior to Lm-OVA infection. **B.** Proportions of MPECs (CD127⁺KLRG1⁻) and SLECs (CD127⁻KLRG1⁺) within OT-I effectors at day 7 post-infection. **C.** *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I cells transduced with empty- or *Nr4a3*- encoding retrovirus (RV) were transferred into Lm-OVA infected mice. At day 7 post-infection, MPEC and SLEC distribution in GFP⁺-transduced cells was evaluated. +/+:

Nr4a3^{+/+} cells. -/-: *Nr4a3*^{-/-} cells. Each dot represents one mouse. Data are from at least 3 independent experiments. Unpaired Student's t-test, with a Welch's correction when applied, was used for 2 group comparison and Kruskal-Wallis ANOVA with Dunn's multiple comparison for multiple groups comparison: **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.0001.

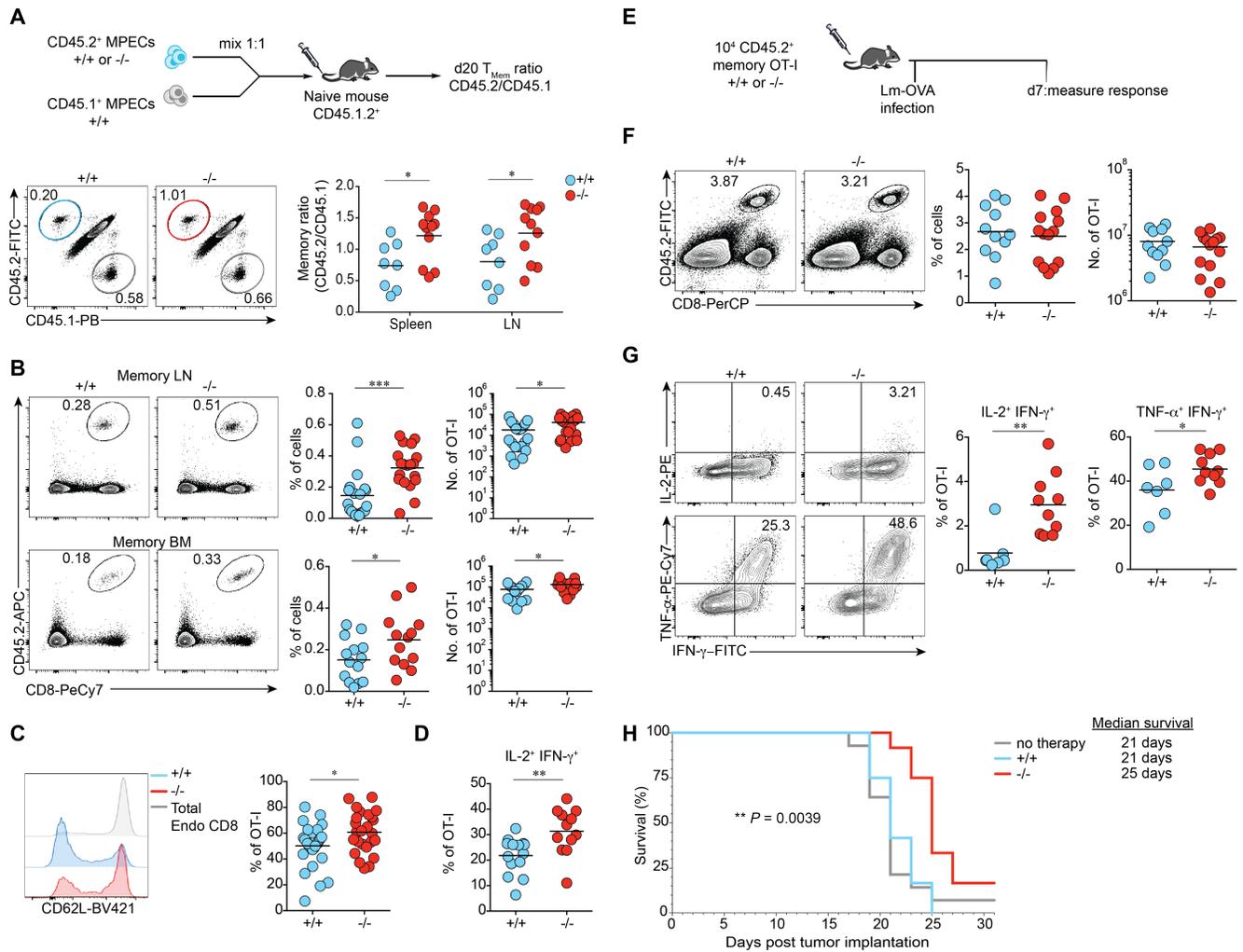


Figure 3. NR4A3-deficiency promotes MPEC differentiation into memory cells and increases central memory T cell generation. **A.** Top: Experimental design assessing the potential of *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I MPECs for the formation of memory cells. Bottom: The percentage of adoptively transferred CD45.2⁺ memory cells, either +/+ or -/-, from spleen and lymph nodes (LN) 20 days post-transfer was normalized to the percentage of CD45.1⁺ cells in order to obtain a ratio of memory generation (representative flow plots are from spleen). **B.** Memory responses in the LN and bone marrow (BM) of mice adoptively transferred with CD45.2⁺ *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I cells prior to Lm-OVA infection. CD62L expression (**C**) and proportion of IL-2 and IFN-γ co-producing (**D**) OT-I memory *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} cells in the spleen. **E.** Experimental design to

test the secondary response of *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} memory cells. Quantitation in the spleen of the response (**F**) and cytokine production (**G**) of secondary effectors *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-}. **H**. *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I memory cells were generated in response to Lm-OVA infection. At least 40 days post-infection, approximately 2×10^5 *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I memory cells were adoptively transferred into B16-OVA bearing mice (7 days post-implantation). Mouse survival and tumor growth were monitored every two days. Each dot represents one mouse. Endo: total endogenous CD8⁺CD45.2⁻ cells. Survival curves were compared using log-rank Mantel–Cox test (**H**). Data are from 2 (**A** - +/+/*CD45.1*⁺ competitive group and **H**), or at least 3 independent experiments. Unpaired Student's t-test, with a Welch's correction when applied, was used: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

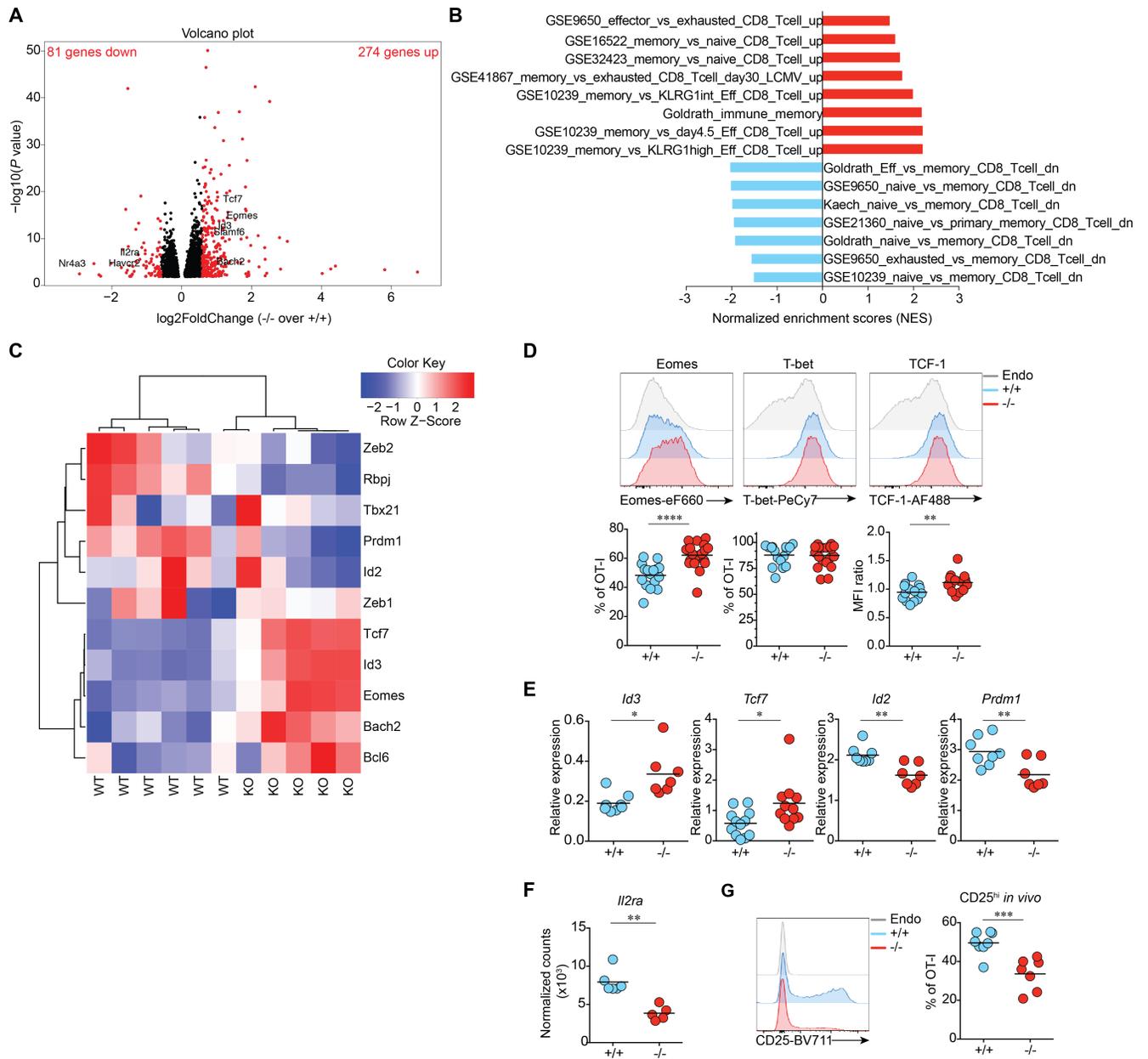


Figure 4. NR4A3 is an early regulator of the CD8⁺ T cell memory gene signature. A. Volcano plot of genes differentially expressed in *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I cells assessed by RNA-seq at day 3 post-infection with Lm-OVA. Indicated in black, genes $P_{adj} < 0.05$. Indicated in red, genes $P_{adj} < 0.05$ and $|FC| > 1.5$. **B.** Gene set enrichment analysis (GSEA) of the NR4A3-regulated transcriptome reveals enrichment of memory signatures. **C.** Heat map illustrating the relative

expression in *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I cells of genes encoding for selected transcription factors controlling CD8⁺ T cell differentiation. At day 7 post Lm-OVA infection, the expression of transcription factors known to be involved in CD8⁺ T cell memory generation was measured by FACS (**D**) or by qRT-PCR (**E**) in spleens. **F.** *Il2ra* transcription by day 3 OT-I effectors (data from RNA-seq). **G.** At day 3 post-Lm-OVA infection, expression of CD25 on *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I cells was measured by flow cytometry. Endo: total CD8⁺CD45.2⁻ endogenous cells. Each dot represents one mouse. Data are from 2 (**A-C**, **E-G**), or at least 3 independent experiments (**D**). A Mann-Whitney unpaired t-test (**F**), when a low number of experimental samples were available, was used and an unpaired Student's t-test, with a Welch's correction when applied, was used for the other 2 groups comparison: **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.0001.

analysis of DARs that are more open in *Nr4a3*^{-/-} cells (red bars) or less open in *Nr4a3*^{-/-} cells (blue bars). **C.** Analysis of the genes found to be regulated by *Nr4a3* at day 3 post-infection by RNA-seq analysis and linked to NR4A-motif containing DARs between *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} T cells determined by ATAC-seq. **D.** RNA-seq data comparing *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} T cells expression profiles were submitted to upstream master regulator analysis in the GeneXplain platform. Top-ranked upstream regulators have the lowest Ranksum value, obtained by adding the Score and Score Rank. The top five results are highlighted in red. ATAC-seq experiment was performed once on 2 biological samples of each genotype.

Supplementary material

Fig. S1. NR4A3 restrains MPEC generation across several models.

Fig. S2. Normal differentiation of OT-I T cells in absence of NR4A3.

Fig. S3. NR4A3 decreases cytokine production by CD8⁺ effector cells.

Fig. S4. NR4A3 deficiency favors polyfunctional central memory formation and restrains terminal differentiation of secondary effectors.

Fig. S5. *In vivo* transcription kinetics of *Nr4a3*, characterization of early response of NR4A3-deficient OT-I T cells and validation of RNA-seq results.

Fig. S6. Characterization of *in vitro* generated NR4A3-deficient OT-I effector cells and overlap between ATAC-seq and RNA-seq datasets.

Dataset S1. RNA-seq dataset.

Dataset S2. ATAC-seq dataset.

Dataset S3. ATAC-seq dataset with NBRE motifs annotation.

Table S1. Antibodies and reagents.

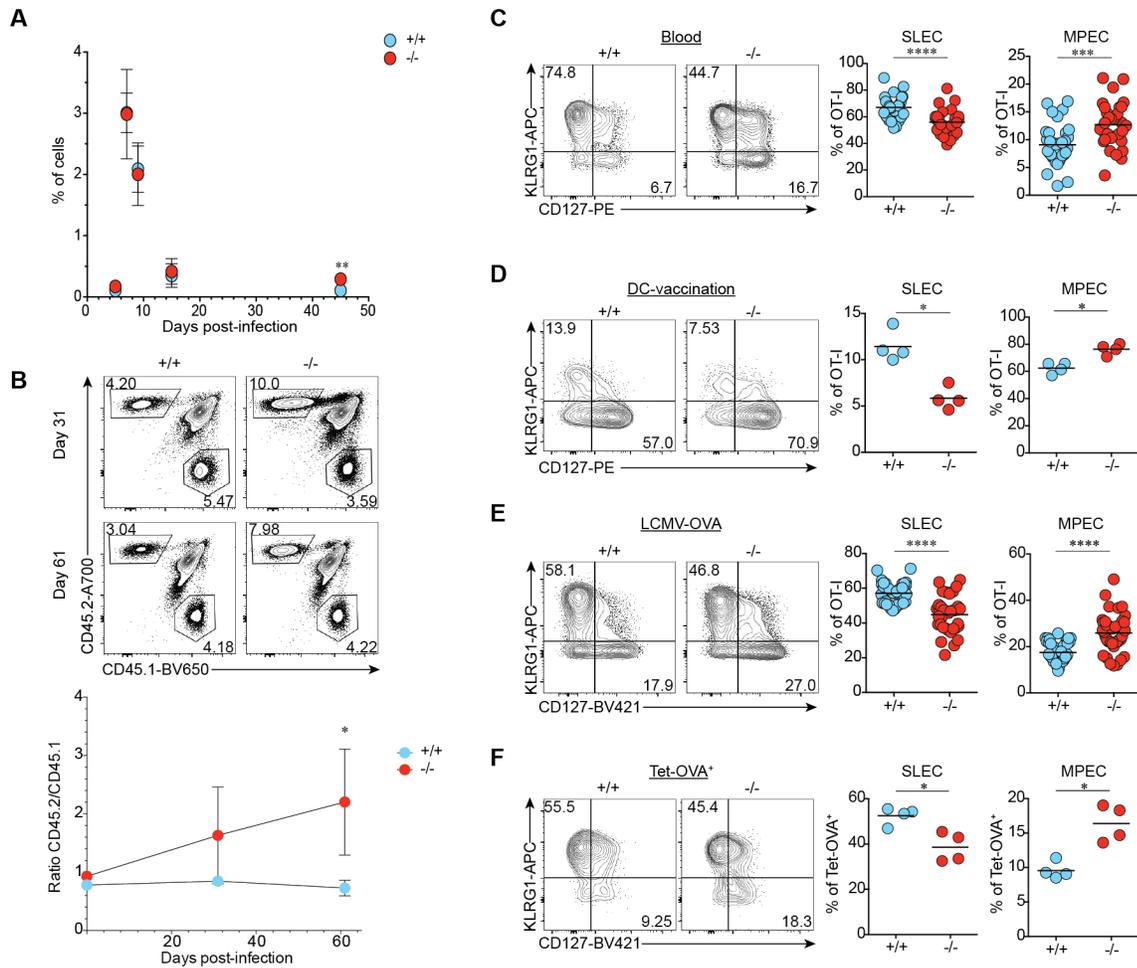


Figure S1. NR4A3 restrains MPEC generation across several models. A. Kinetic response in the spleen of $Nr4a3^{+/+}$ and $Nr4a3^{-/-}$ OT-I T cells after adoptive transfer and Lm-OVA infection. **B.** Generation of $Nr4a3^{+/+}$ and $Nr4a3^{-/-}$ OT-I memory T cells ($CD45.2^+$) when in competition with WT B6.SJL OT-I T cells ($CD45.1^+$) following LCMV-OVA infection. Representative $CD45.1$ vs $CD45.2$ dot plots gated on $CD8^+$ T cells and ratios of $CD45.2^+$ OT-I T cells on $CD45.1^+$ OT-I T cells are shown over time. **C.** Proportion of SLECs and MPECs within OT-I T cells in the blood at day 7 post Lm-OVA infection. **D-E.** SLEC and MPEC differentiation of $Nr4a3^{+/+}$ and $Nr4a3^{-/-}$ OT-I cells following DC-OVA vaccination (**D** – day 6 of the response in the spleen) or LCMV-OVA infection (**E** – day 8 of the response in the blood in the OT-I competitive model; as in **B**). **F.** Polyclonal $CD8^+$ T cell responses of $Nr4a3^{+/+}$ and $Nr4a3^{-/-}$ mice were measured at day 7 post-

infection with Lm-OVA. MPEC/SLEC differentiation was evaluated *ex vivo* on K^b-OVA tetramer⁺ cells. Data are from 1 (A, B, D, F) or at least 3 independent experiments (C, E). A Mann-Whitney unpaired t-test (A, B, D, F) was used with a low number of samples and the unpaired Student's t-test (C, E), with a Welch's correction when applied, was used for the other comparisons: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

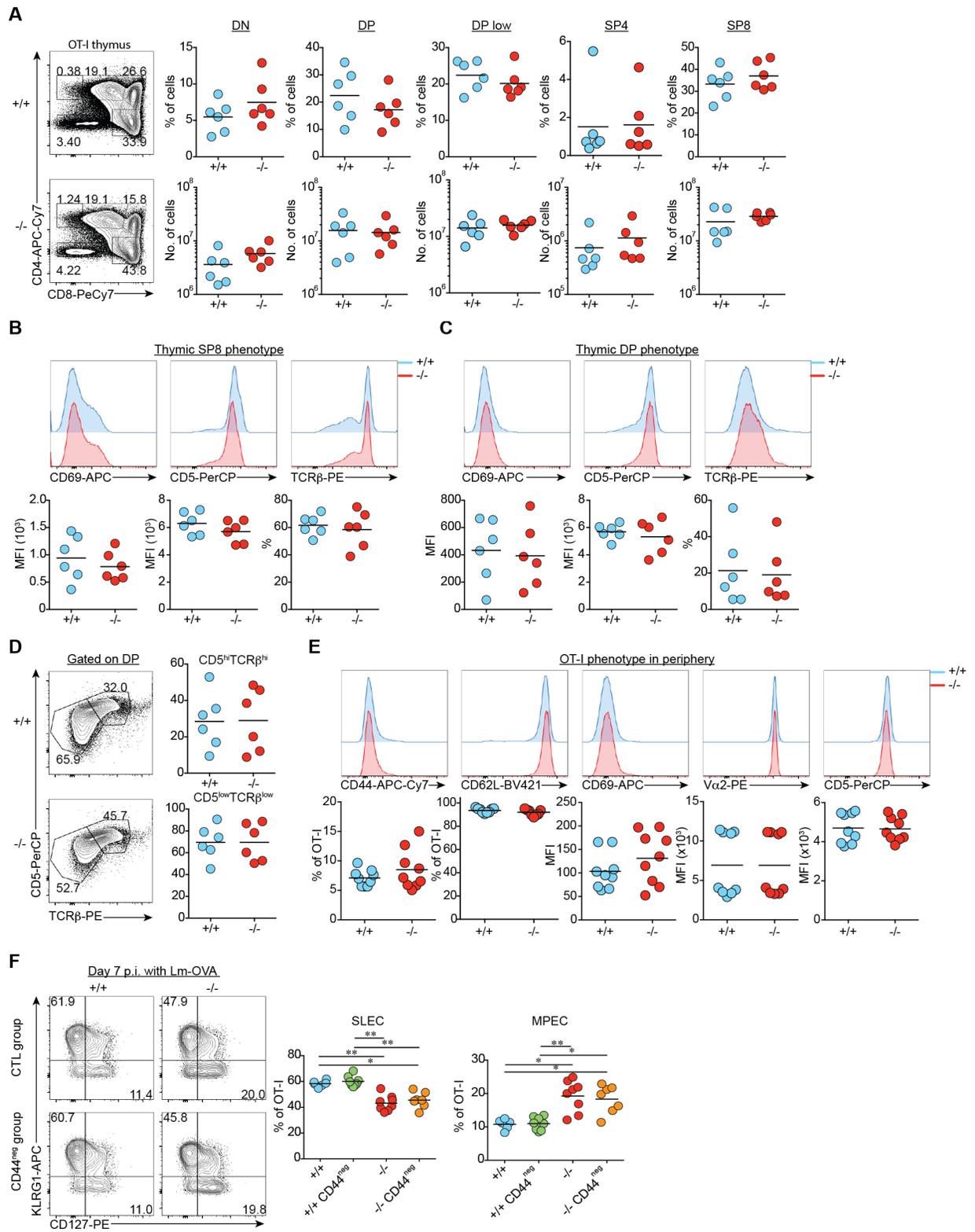


Figure S2. Normal differentiation of OT-I T cells in absence of NR4A3. **A.** Analysis of the different thymic subsets in OT-I *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} mice. Representative CD4 vs CD8 profiles and compilation of the percentage and number of the different thymic subsets; DN (CD4⁻CD8⁻), DP (CD4⁺CD8⁺), DP^{low} (CD4⁺CD8^{lo}), SP4 (CD4⁺CD8⁻) and SP8 (CD4⁻CD8⁺). **B-C.** Expression of CD69, CD5 and TCR β by SP8 (**B**) and DP (**C**) thymocytes. **D.** NR4A3 deficiency does not affect positive selection. FACS profiles of the expression of the TCR β versus CD5 gated on DP thymocytes and compilation of the percentage of pre-selection (TCR β ⁻CD5^{lo}) and positively selected thymocytes (TCR β ⁺CD5^{hi}). **E.** Phenotype of OT-I CD8⁺ T cells from the lymph nodes of *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} mice. Representative FACS profiles and data compilation are shown. **F.** Proportion of MPECs (CD127⁺KLRG1⁻) and SLECs (CD127⁻KLRG1⁺) within *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I effectors at day 7 post-infection with Lm-OVA when the adoptive transfer prior infection was done with sorted CD44^{neg} OT-I CD8⁺ T cells. Data are from 2 (**F**), 3 (**E**) or 4 (**A-D**) independent experiments. A Mann-Whitney unpaired t-test (**A-D**) was used with a low number of samples and the unpaired Student's t-test (**E**), with a Welch's correction when applied, was used for 2 group comparison and Kruskal-Wallis ANOVA with Dunn's multiple comparison for multiple groups comparison (**F**): **P*<0.05, ***P*<0.01.

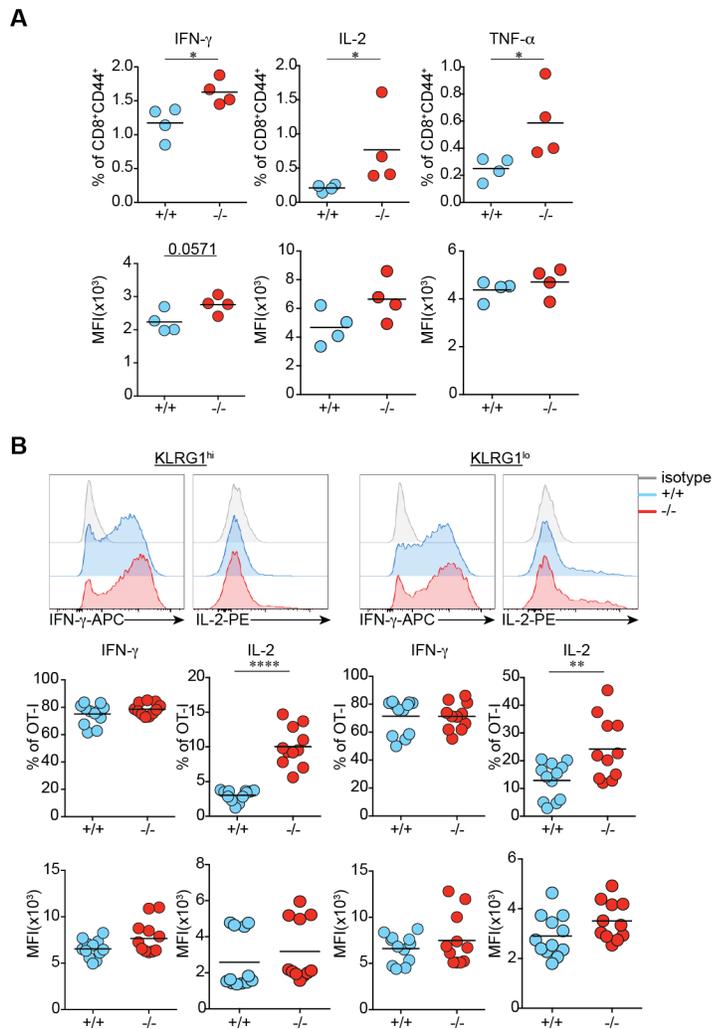


Figure S3. NR4A3 decreases cytokine production by effector CD8⁺ T cells. **A.** Polyclonal CD8⁺ T cell responses of *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} mice were measured at day 7 post-infection with Lm-OVA. Cytokine production was measured following a brief OVA peptide restimulation. Mean Fluorescence Intensity (MFI) on cells positive for the measured cytokines are shown. **B.** At the peak of the Lm-OVA response, splenocytes were restimulated with OVA peptide to measure cytokine production by *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} KLRG1^{hi} or KLRG1^{lo} OT-I cells. The percentage of positive OT-I cells for each cytokine and the MFI of cells positive for the measured cytokines are shown. Data are from 1 (**A**) or 2 (**B**) independent experiments. A Mann-Whitney unpaired t-test

(A) was used with a low number of samples and the unpaired Student's t-test (B), with a Welch's correction when applied, was used for the other comparisons: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

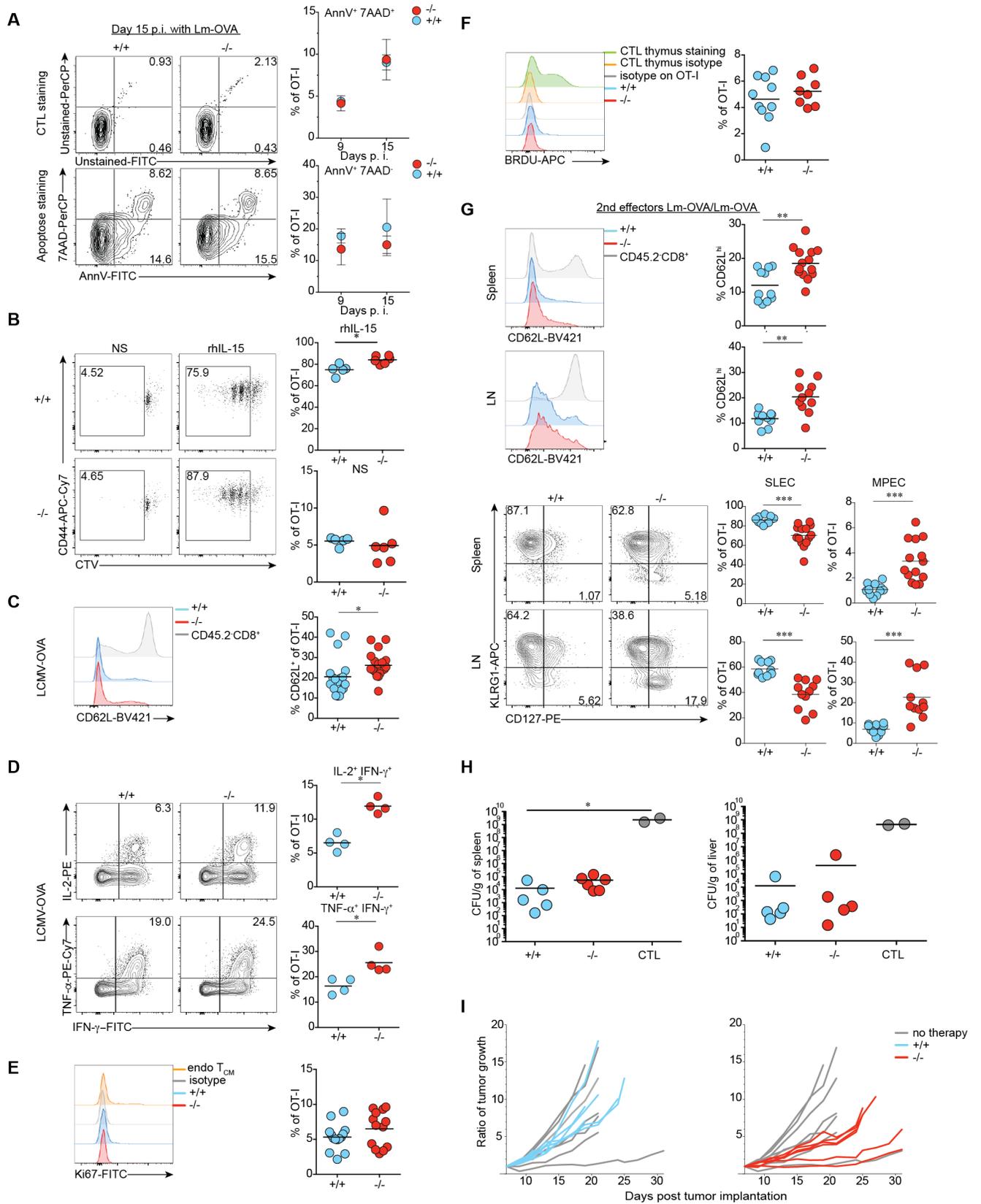


Figure S4. NR4A3 deficiency favors polyfunctional central memory formation and restrains terminal differentiation of secondary effectors. **A.** Apoptosis of *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells during the contraction phase of the T cell response to Lm-OVA. At day 9 and 15 post-infection, apoptosis was measured using Annexin V (AnnV) and 7-AAD staining. Representative dot plots of AnnV versus 7-AAD staining for day 15 effectors and quantification of apoptotic (AnnV⁺7-AAD⁻) and dead (AnnV⁺7-AAD⁺) cells at day 9 and day 15 post-infection are shown. **B.** Proliferation of *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I memory T cells from Lm-OVA infected mice following *in vitro* stimulation with rhIL-15. Representative FACS profile of CTV dilution and compilation of the percentage of cells that have divided once or more. **C-D.** CD62L expression (**C**) and cytokine production (**D**) measured on memory *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I cells (>30 days post LCMV-OVA-infection in a competitive setting) **E-F.** Homeostatic proliferation of Lm-OVA generated *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I memory cells measured using Ki67 (**E**) and anti-BrdU (**F**) staining. For BrdU staining mice were treated with BrdU for 14 days before sacrifice. **G.** Phenotype of secondary effectors at day 7 post-infection. 10⁴ *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} memory OT-I T cells produced in response to Lm-OVA infection were adoptively transferred into naive B6.SJL mice. These recipients were then subsequently infected with Lm-OVA. **H.** Lm-OVA challenge. Mice previously adoptively transferred with *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells and infected with LCMV-OVA were challenged with Lm-OVA at the memory stage (CTL: non immunized mice). Bacterial burdens in the spleen and liver are shown. **I.** *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} memory OT-I cells were generated in response to Lm-OVA infection. At least 40 days post-infection, approximately 2 x 10⁵ *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I memory cells were adoptively transferred into B16-OVA bearing mice (7 days post-implantation) and the ratio of tumor growth (tumor area at each time point of observation reported to tumor area at day 7 - the time of ACT administration) was followed over time (same experiments as Fig. 3H). Each line represents one mouse. Data are from 1 (**A, D, H**), 2

(F) or 3 and more independent experiments (C, E, G); B and I shows one of 2 representative experiments. Mann-Whitney unpaired t-test (A, B, D), when a low number of experimental samples were available, was used. Unpaired Student's t-test (C, E, F, G), with a Welch's correction when applied, was used for 2 group comparison and Kruskal-Wallis ANOVA with Dunn's multiple comparison for multiple groups comparison (H): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

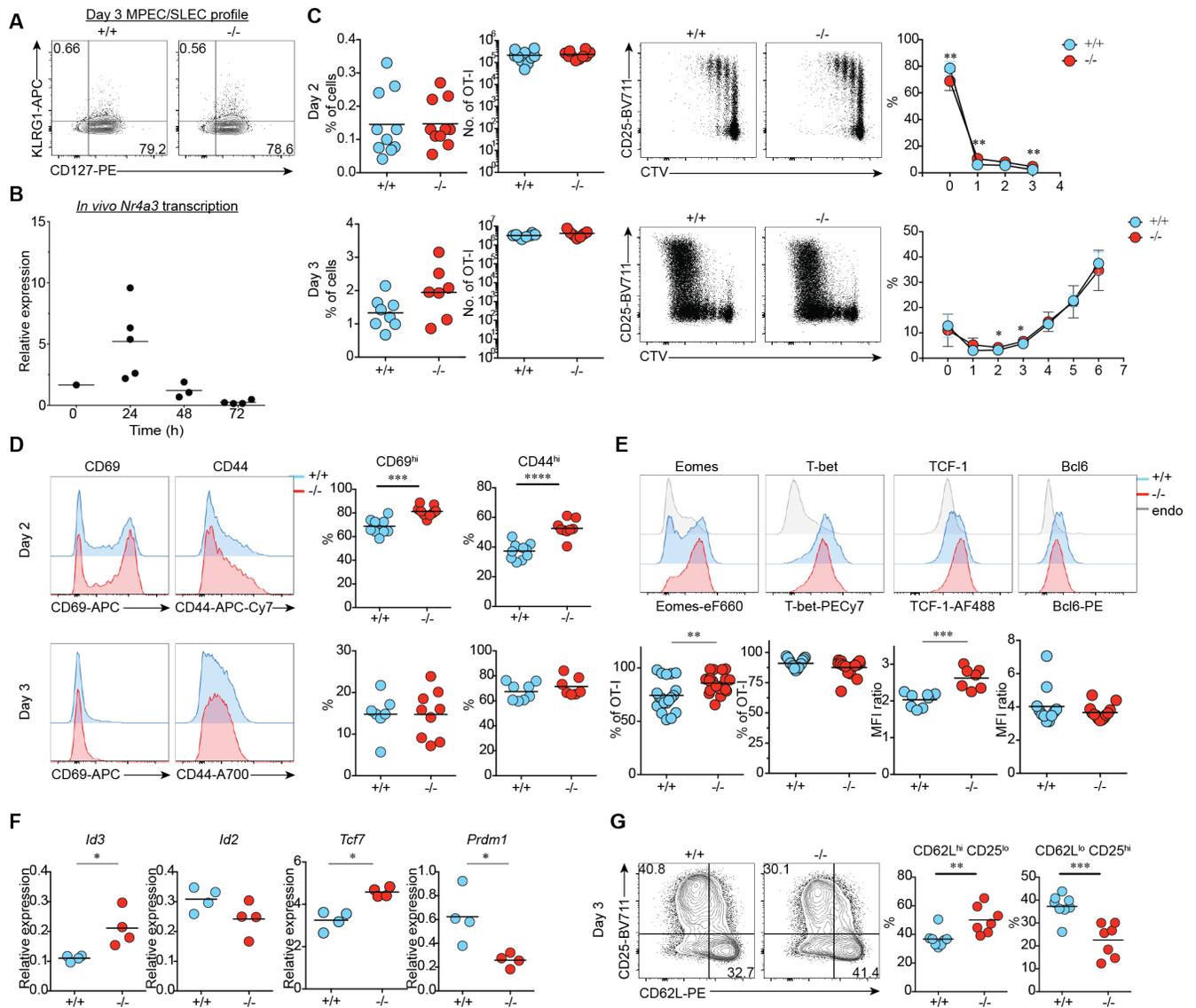


Figure S5. *In vivo* transcription kinetics of *Nr4a3*, characterization of early response of NR4A3-deficient OT-I T cells and validation of RNA-seq results. A. SLEC/MPEC profile at day 3 post Lm-OVA infection. **B.** At indicated time-points post-Lm-OVA infection, OT-I T cells were sorted and *Nr4a3* transcription was measured by qRT-PCR. **C-D.** Proliferation (**C**) and activation (**D**) of *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells *in vivo*. CTV-labeled OT-I T cells were adoptively transferred into B6.SJL recipients followed by Lm-OVA infection. The percentage of OT-I T cells recovered, FACS profiles of CTV versus CD25 gated on OT-I T cells and

quantification of the number of divisions at day 2 (top) and 3 (bottom) are shown in **C**. The expression of the activation markers CD69 and CD44 are shown in **D** at day 2 (top) and day 3 (bottom) post-infection. **E-F**. At day 3 post Lm-OVA infection, the expression of transcription factors important for memory CD8⁺ T cells differentiation was assessed by cytometry after gating on CD44^{hi} OT-I (CD45.2⁺) cells (**E**) or by qRT-PCR on sorted *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I cells (**F**). **G**. CD62L and CD25 FACS profiles and quantification of the CD25^{lo}CD62L^{hi} and CD25^{hi}CD62L^{lo} subsets of OT-I effector T cells at day 3 post-infection with Lm-OVA. Each dot represents one mouse. Data are from 1 (**B, F**), 2 (**E** for TCF-1, day 3 of **C, D** and **G**) or 3 and more (**E**, day 2 of **C** and **D**) independent experiments. Data in (**A**) is representative of at least 3 experiments. A Mann-Whitney unpaired t-test (**F**), when a low number of experimental samples were available was used. Unpaired Student's t-test (**C-E, G**), with a Welch's correction when applied, was used for comparison of two groups: **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.0001.

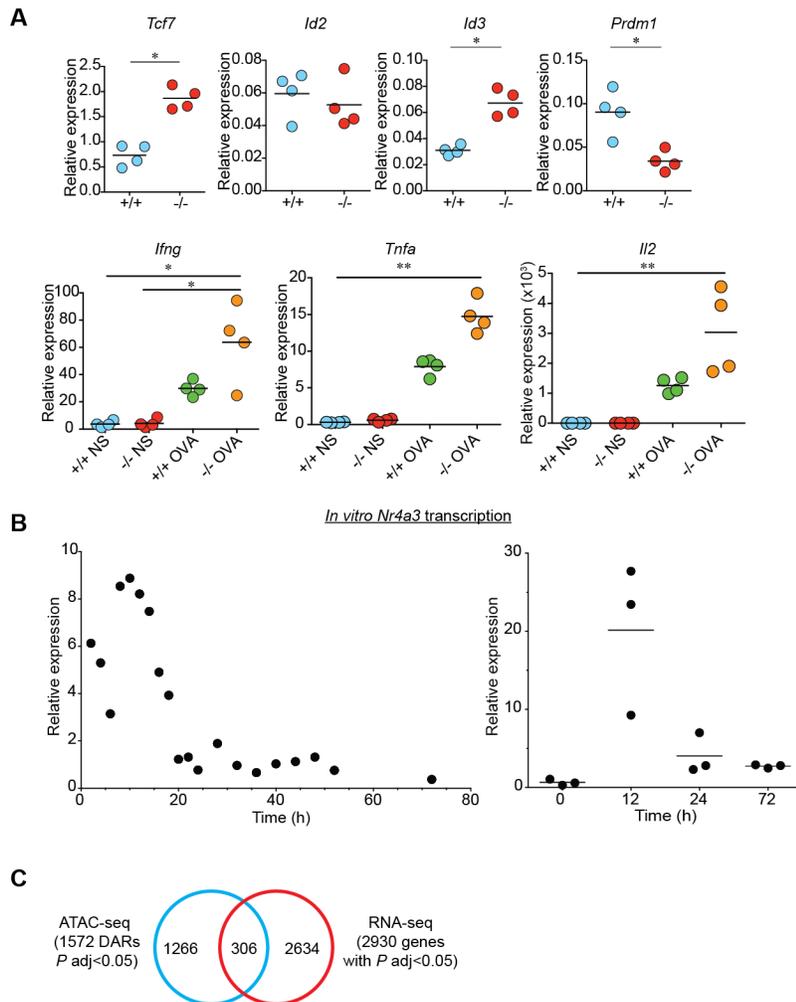


Figure S6. Characterization of *in vitro* generated NR4A3-deficient OT-I effector cells and overlap between ATAC-seq and RNA-seq datasets. **A.** *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I cells were stimulated for 3 days with anti-CD3/CD28. For transcription of cytokines, cells were not restimulated (NS) or seeded on antigen-loaded splenocytes (+OVA) for 5h prior being cell-sorted into TRIzol for RNA extraction. The expression of transcription factors was assessed on NS sorted *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I cells. **B.** *Nr4a3* expression kinetics measured by qRT-PCR following *in vitro* stimulation with anti-CD3/CD28. The left panel represents several time points from the same experiment. The right panel is from 1 experiment with independent samples (each point

represents an individual mouse). **C**. Overlap between RNA-seq and ATAC-seq datasets showing the number of genes that have a modulated expression and are associated to a DAR as a result of NR4A3-deficiency. Each dot represents one mouse. Data are from 1 (**A**, **B**, **C**: ATAC-seq) or 2 independent experiments (**C**: RNA-seq). A Mann-Whitney unpaired t-test (**A**) was used with a low number of experimental samples for 2 group comparison and Kruskal-Wallis ANOVA with Dunn's multiple comparison was used for multiple groups comparison: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Table S1. Antibodies and reagents.

Reagent	Company	Product information
G418 sulfate powder	CORNING	CAS#108321-42-2; Potency 716µg/mg
RPMI 1640	CORNING	REF: 10-040-CV
HEPES	CORNING	REF: 25-060-CI
L-glutamine	CORNING	REF: 25-005-CI
Penicillin-Streptomycin	CORNING	REF: 30-002-CI
MEM Non-essential amino acids	Gibco Life Technologies	REF: 11140-050
Sodium pyruvate	CORNING	REF: 25-000-CI
2-mercaptoethanol 1000x (55mM)	Gibco Life Technologies	REF: 21985-023
PBS	Sigma Life Science	REF: P3813-10PAK
Sodium azide	Sigma Aldrich	REF: S2002-100G
formaldehyde solution (PFA)	Sigma Aldrich	CAS #50-00-0
BHI-Agar	BD	REF: 211065
Streptomycine sulfate	Bio Basic	REF: SB0494; CAS#3810-74-0
rhIL-2	Novartis	PROLEUKIN® (aldesleukine); DIN 02130181
NH4Cl	Bio Basic	CAS #12125-02-9
eBioscience FOXP3/Transcription Factor Staining Buffer Set	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	REF: 00-5523-00
Cytofix cytoperm BD Kit	BD	554714
TRIzol	ambion by Life Technologies	REF: 15596026
DMEM powder	Sigma Life Science	REF: D2902-10I
Saponine	Sigma Life Science	REF: S-7900-100g; CAS #8047-15-2
PowerSYBR Green	appliedbiosystems by Thermo Fisher Scientific	REF: 4367659
SuperScript II Reverse Transcriptase	invitrogen by Thermo Fisher Scientific	REF: 18064014
DMEM	CORNING	REF: 10-017-CV
Mouse naive CD8 T cells EasySep KIT	STEMCELL Technologies	REF: 19858
Nu Serum	Corning	REF: 355104

EDTA	CORNING	46-034-CI
<i>Lymphocyte Separation Medium</i>	CORNING	25-072-CV
Fc-block (Anti mCD16/32 Fc Receptor clone 2.4G2)	Leinco Technologies	C381-1.0mg
Zombie Aqua	Biologend	423102
Zombie NIR	Biologend	423106
CTV (CellTrace Violet)	ThermoFisher	C34557
Annexin V-FITC	Biologend	640906
7-AAD	Biologend	420404
pMIG	kind Gift from Guy Sauvageau	pMSCV IRES GFP
frosted glass slides	Fisher	125523
24 well plates	Sarstedt	500004003 (83.3922.500)
6 well plates	Fisher	08 772 1B
96 well plates	Fisher	07200760
Cell strainer 70µm	Fisher	08 771 2
Cell strainer 100µm	Fisher	08 771 19
Brefeldin A	Fisher	AAJ62340MB
cComplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Sigma (Roche)	11873580001
rhIL15	R&D	247-ILB
BRDU	Sigma	B5002-1G
DNase I	Sigma	D5025-150KU
Brain Heart Infusion (BHI)	Fisher	B11065
NP-40Octyl		
Phenoxypolyethoxyethanol (NP-40)	Bio-Basic	NDB0385-100
Stimulation reagents	Company	Product information
anti mouse CD3ε	BioXcell	clone 145-2C11; cat # BE0001-1
anti mouse CD28	BioXcell	clone 37-51; cat # BE0015-1
OVA peptide (SIINFEKL)	Midwest Biotech	

Staining antibody	Company	Product information
CD8-PerCP anti mouse	BioLegend	clone 53-6.7; cat # 100732
CD8-PeCY7 anti mouse	BioLegend	clone 53-6.7; cat # 100722
KLRG1-APC	BioLegend	clone MAFA; cat #138412
CD127-Biotin	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	clone A7R34; cat #13-1271-85
CD127-BV421 anti mouse	BioLegend	clone A7R34; cat #135027
Streptavidin-PE	BioLegend	cat # 405204
Isotype of IFN-gamma-FITC (Rat IgG1 FITC)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	IgG gamma 1 ; cat #R101
Isotype of IFN-gamma-APC (Rat IgG1 APC)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	clone eBRG1; cat #17-4301-83
Isotype of IL-2-PE (Rat IgG2β-PE)	BioLegend	clone RTK4530; cat #400608
Isotype of TNFa-PeCY7 (Rat IgG1 PeCY7)	BioLegend	clone RTK2071; cat #400415
Isotype of GranzymeB- PB (Rat IgG1 PB)	BioLegend	clone MOPC-21; cat #400151
IFN-gamma-FITC anti mouse	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	clone XMG1.2; cat #RM9001
IFN-gamma-APC anti mouse	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	clone XMG1.2; cat #17-7311-82
IL-2-PE anti mouse	BioLegend	clone JES6-5H4; cat #503808
TNFa-PeCY7 anti mouse	BioLegend	clone MP6-XT22; cat #506324
GranzymeB- PB anti Hu/Mo	BioLegend	clone GB11; cat #515408
CD45.1-BV650	BioLegend	clone A20; cat #110736
CD45.1-PB	BioLegend	clone A20; cat #110722
CD45.2-FITC	BioLegend	clone 104; cat #109806
CD45.2-A700	BioLegend	clone 104; cat #109822
CD45.2-APC	BioLegend	clone 104; cat #109814
CD62L-BV421 anti mouse	BioLegend	clone MEL-14; cat #104436
CD62L-PerCP anti mouse	BioLegend	clone MEL-14; cat #104430
CD62L-PE anti mouse	BioLegend	clone MEL-14; cat #104407
Eomes-eF660 anti mouse	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	clone Dan11mag; cat #50-4875-82

Tbet-PeCy7 anti Hu/Mo	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	clone 4B10; cat #25-5825-82
TCF1-AF488 anti Hu/Mo	Cell Signaling Technologies	clone C63D9 ; cat #6444S
CD69-APC	BioLegend	clone H1.2F3; cat #104513
CD44-APC-Cy7	BioLegend	clone IM7; cat #103028
CD44-AF700	BioLegend	clone IM7; cat #103026
CD25-APC	BioLegend	clone PC61; cat #102012
CD25-BV711 anti mouse	BioLegend	clone PC61; cat #102049
TCRβ-PE	BioLegend	clone H57-597; cat #109207
Vα2-PE	BioLegend	clone B20.1; cat #127808
CD5-PerCP	BioLegend	clone 53-7.3; cat #100616
Ki67-FITC	BD Biosciences	clone B56; kit cat # 556026; cat # 51-36524X
isotype of Ki67-FITC (Mouse		MOPC-21; kit cat # 556026; cat # 51-35404X
IgG1k FITC)	BD Biosciences	clone BU20A; cat # 17-5071-41
BRDU-APC (Mouse IgG1k APC)	Fisher/eBiosciences	clone P3.6.2.8.1; cat #17-4714-42
isotype of BRDU-APC	Fisher/eBiosciences	

qPCR Primers

Sequences of primers

<i>Id3</i>	F: GGAGAGAGGGTCCCAGAGTC; R: GAGGAGCTTTGGCCACTGAC
<i>Tcf7</i>	F: GCGGATATAGACAGCACTTC; R: TACACCAGATCCCAGCAT
<i>Id2</i>	F: ACCAGAGACCTGGACAGAAC; R: AAGTCAGAAAGGGAATTCAG
<i>Prdm1</i>	F: ACACACAGGAGAGAAGCCACATGA; R: TCGAAGGTGGGTCTTGAGATTGCT
<i>Nr4a3</i>	F: GATCACAGAGGCACATGGGTTA; R: GAGCCTGTCCCTTCCTCTGG
<i>Irfng</i>	F: GAAAGCCTAGAAAGTCTGAATAAC; R: TGCCAGTTCTCCAGATA
<i>Il2</i>	F: CAGCAATATCAGAGTAACTGTTG; R: GCTATCCATCTCCTCAGAAAAG
<i>Th1a</i>	F: TCTTCTCATTCCTGCTTGTG; R: GAGGCCATTTGGGAACCTT
<i>Hprt</i>	F: CTCCTCAGACCGCTTTTGGC; R: TAACTGGTTCATCATCGCTAATC

Cell lines	Origin
L929	kind gift from A. Lamarre (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, Canada)
MC57G	kind gift from A. Lamarre (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, Canada)
B16-OVA	kind gift from A. Lamarre (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, Canada)
HEK293T	kind gift from H. Melichar (CRHMR, Montreal, Quebec, Canada)

MEM containing with 5% heat inactivated FBS or Nu serum

MEM containing with 5% heat inactivated FBS or Nu serum

DMEM supplemented with 10% FBS (or Nu serum), sodium pyruvate (1mM) in presence of 5mg/ml G418 (Corning)

DMEM containing with 10% heat inactivated FBS or Nu serum

Infection agents	Origin
Lm-OVA	kind gift from S. P. Schoenberger
LCMV-OVA	kind gift from J. C. de la Torre

Article 2: NR4A3 deficiency in CD8+ T cells improves adoptive T cell therapy of cancer

Auteurs : Livia Odagiu, Dave Maurice De Sousa, Salix Boulet, Nathalie Labrecque

Cet article a été soumis sur bio-archives (bioRxiv) sous le numéro de manuscrit «MS ID#: BIORXIV/2023/537841»

Les résultats de l'article 2 visent à déterminer le rôle de NR4A3 dans les LT CD8 lors d'une thérapie cellulaire adoptive de souris porteuses de tumeurs sous traitement d'anti-PD-L1. Les résultats de l'article 2 résument les travaux de mon deuxième objectif de thèse.

Voici les contributions détaillées des auteurs : les expériences ont majoritairement été faites par moi (90%), Dave Maurice De Sousa (5%), Salix Boulet (5%). J'ai effectué la majorité des analyses des données, sauf les analyses transcriptomiques brutes (scRNA-seq), pour lesquelles nous avons fait appel à des bio-informaticiens (IRCM), ainsi que l'analyse pseudotime des données scRNA-seq, qui a été effectuée par Salix Boulet. La contribution conceptuelle a été faite par moi, Nathalie Labrecque et Salix Boulet. L'écriture du papier a été effectuée par moi et Nathalie Labrecque. J'ai préparé toutes les figures du manuscrit.

NR4A3 deficiency in CD8⁺ T cells improves adoptive T cell therapy of cancer

Livia Odagiu^{1,2}, Dave Maurice De Sousa^{1,2}, Salix Boulet¹,
Nathalie Labrecque^{1,2,3}.

Affiliations :

¹ Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Montreal, Qc, Canada, H1T 2M4

² Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Qc, Canada, H3C 3J7.

³ Département de médecine, Université de Montréal, Qc, Canada, H3C 3J7.

*Corresponding author: Nathalie Labrecque, nathalie.labrecque@umontreal.ca

5415, boulevard de l'Assomption

Montréal (Québec) H1T 2M4

Canada

orcid.org/0000-0001-7563-1542

One sentence summary: NR4A3 deficiency improves anti-tumor CD8⁺ T cell response

Abstract

NR4A3 is a transcription factor that is rapidly induced in CD8⁺ T cells following antigenic recognition. We have previously shown that NR4A3 deficiency induces an early molecular program that promotes memory generation and enhances effector functions, which are two essential attributes for the success of adoptive cell therapy (ACT). Therefore, we tested the hypothesis that *Nr4a3*^{-/-} CD8⁺ T cells would have outstanding efficacy in ACT of cancer. Our results show that ACT of melanoma-bearing mice with *Nr4a3*^{-/-} effector CD8⁺ T cells provides a better tumor control than their wild-type counterpart. The therapeutic effect observed with *Nr4a3*^{-/-} effector CD8⁺ T cells is even better than the one observed with ACT of *Nr4a3*^{+/+} effector CD8⁺ T cells in combination with anti-PD-L1 treatment. scRNA-seq analysis reveals a huge heterogeneity of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) states following ACT. The better tumor control observed with ACT of *Nr4a3*^{-/-} CD8⁺ effectors without anti-PD-L1 treatment correlates with an enrichment of TILs within the clusters that are associated with the anti-PD-L1 response of wild-type TILs. Moreover, the clusters that are enriched in *Nr4a3*^{-/-} TILs are the ones that are enriched for effector functions. Furthermore, *Nr4a3*^{-/-} and *Nr4a3*^{+/+} effectors generate distinct progenitor populations. Pseudotime analysis suggests that these progenitors have different differentiation trajectories, which may explain why ACT with *Nr4a3*^{-/-} effectors is more efficient. Therefore, modulation of NR4A3 activity may represent a new strategy to generate long-lived and highly functional T cells for ACT.

Introduction

During cancer, the persistence of the antigenic and inflammatory signals leads to progressive acquisition of the expression of inhibitory receptors (IRs) (PD-1, CD160, Lag-3, 2B4, etc.) by antigen-specific CD8⁺ T cells and loss of T cell functionality. Exhausted CD8⁺ T cells can regain functionality by blocking the interaction of IRs, such as PD-1, with their ligands. Recent studies have shown heterogeneity of CD8⁺ exhausted T cells in both chronic infection and cancer. Different states of tumor-specific CD8⁺ T cells have been identified in tumors. Among them are the less differentiated and exhausted progenitor (stem-like; TCF-1⁺ or SLAMF6^{hi}Tim-3^{lo}) and the terminally (TCF-1⁻ or SLAMF6^{lo}Tim-3^{hi}) exhausted subsets. The progenitor subset is dependent on the transcription factor TCF-1 (encoded by *Tcf7*) and will give rise to terminally Tex cells. The progenitor subset is required for successful responses to anti-PD-1/PD-L1 therapy. The importance of the progenitor subset is illustrated by the longer duration of response of melanoma patients to checkpoint blockade therapy (anti-PD-1/anti-PD-L1) when they have a larger pool of progenitor exhausted CD8⁺ T cells^{1,2}.

NR4As (NR4A1, NR4A2, NR4A3) are orphan nuclear receptors that act as transcription factors to regulate the differentiation and responses of multiple immune cell types, including CD8⁺ T cells³⁻⁶. We have shown that NR4A3 acts as an early regulator of CD8⁺ T cell differentiation during acute response⁷. Indeed, NR4A3 deficiency in CD8⁺ T cells favors the generation of memory precursor effector cells and central memory CD8⁺ T cells while at the same time enhancing effector functions⁷. Several studies have shown that NR4As also influence CD8⁺ T cell responses during chronic responses⁸⁻¹¹. It was reported that the deletion of the three members of the NR4A family (TKO) enhances the anti-tumor response of CAR-T cells used for adoptive cell therapy (ACT) of tumor-bearing mice⁸. This enhanced response is correlated with reduced CAR-T cell

exhaustion and better effector functions. On the other hand, in this model, the deletion of individual NR4A had little impact on mice survival and tumor control⁸. In another study, the deletion of NR4A1 was shown to reduce CD8⁺ T cell exhaustion following chronic infection with LCMV clone 13 and following ACT of tumor-bearing mice⁹. More recently, it was shown that combined inactivation of *Nr4a3* and *Prdm1* by CRISPR in CAR-T cells increases their functionality and ability to control tumor growth in mouse pre-clinical models¹¹. At the molecular level, NR4As directly contribute to the *Pdcd1* (coding for PD-1) gene transcription⁸ and restrain the accessibility of the chromatin for bZIP transcription factors⁸. Furthermore, NR4As cooperate with the transcription factor Tox, the master regulator of CD8⁺ T cell exhaustion, to induce the exhaustion program¹⁰.

The transcription of the three *Nr4a* genes is increased in terminally exhausted CD8 T cells and decreased following immune checkpoint blockade (ICB)^{8-10,12}. Moreover, the accessibility of the chromatin containing NR4A DNA binding motif (NBRE) is lost following anti-PD-1 or anti-PD-L1 treatment^{9,12}. This suggests a role for NR4A family members during the ICB response of CD8⁺ T cells. However, this was never tested experimentally.

The promotion of the memory program combined with enhanced functionality endowed *Nr4a3*^{-/-} CD8⁺ T cells⁷ with the desired attributes required for their use in ACT for the treatment of cancer. The decreased expression of *Nr4a* transcripts and DNA accessibility of NBRE motifs following ICB treatment^{9,12} further suggest that ACT with NR4A3-deficient effector CD8⁺ T cells would improve the efficacy of ACT with or without anti-PD-L1 blockade. Our results show that ACT of melanoma-bearing mice with *Nr4a3*^{-/-} effector CD8⁺ T cells provides a better tumor control than their wild-type counterpart. Moreover, the therapeutic effect observed with *Nr4a3*^{-/-} effector CD8⁺ T cells is even better than when ACT of *Nr4a3*^{+/+} effector CD8⁺ T cells is combined with

anti-PD-L1 treatment. To understand how NR4A3 deficiency promotes better anti-tumor response, we have performed a scRNA-seq analysis of CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes (TILs). This analysis reveals a huge heterogeneity of TIL states following ACT. The better tumor control observed with ACT of *Nr4a3*^{-/-} CD8⁺ effectors without anti-PD-L1 treatment correlates with an enrichment of TILs within the clusters that are associated with the anti-PD-L1 response of wild-type TILs. Furthermore, *Nr4a3*^{-/-} and *Nr4a3*^{+/+} effectors generate distinct progenitor populations. Monocle analysis suggests that these progenitors have different differentiation trajectories, which may explain why ACT with *Nr4a3*^{-/-} effectors is more efficient. Therefore, modulation of NR4A3 activity may represent a new strategy to generate long-lived and highly functional T cells for ACT.

Results

ACT with NR4A3-deficient effector CD8⁺ T cells improve tumor control

Our previous report of the enhanced generation of central memory T cells, the early induction of the memory transcriptional program associated with the reduced expression of the gene signature associated with exhaustion and the increased production of cytokines by NR4A3-deficient CD8⁺ T cells⁷ led us to evaluate whether NR4A3-deficient CD8⁺ T cells will perform better in ACT to treat tumors. To test this, we decided to use *in vitro* generated effectors as our transcriptomic and ATAC-seq study have shown that NR4A3 has an early influence on the transcriptional program of CD8⁺ T cells⁷. *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells were stimulated *in vitro* with OVA peptide-pulsed splenocytes for 48h and were then cultured with IL-2 for another 24h. These *in vitro* effectors (10⁶ cells) were adoptively transferred into mice that were previously implanted with B16-OVA tumor cells subcutaneously. A group of mice was also treated with anti-PD-L1 (Fig. 1A). ACT with NR4A3-deficient OT-I effectors was able to improve the survival of

mice, while ACT with WT OT-I effectors had a smaller effect (Fig. 1B; median of survival of 32 days compared to 21). The addition of anti-PD-L1 treatment to the ACT increased the survival of mice treated with *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} effectors (Fig. 1B; median of survival of 29 and 48 days respectively). Interestingly, ACT of *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells without anti-PD-L1 is even more efficient than ACT of *Nr4a3*^{+/+} OT-I T cells combined with anti-PD-L1 treatment (Fig. 1B). The therapeutic effect of PD-L1 blockade is sustained for a prolonged period after the anti-PD-L1 treatment is stopped when mice were adoptively transferred with NR4A3-deficient CD8⁺ T cells.

In this setting, the combined treatment with anti-PD-L1 and *Nr4a3*^{-/-} effectors was too efficient for TIL characterization. To circumvent this, we performed ACT at day 12 post-tumor implantation, treated with anti-PD-L1 at day 15 and 18, and analyzed TILs at day 21 (Fig. 1C). This allowed to obtain measurable tumor in all experimental groups, although tumor growth was slightly reduced in mice receiving *Nr4a3*^{-/-} OT-I ACT compared to their WT counterpart (Fig. S1A and B). Furthermore, in this more aggressive model, ACT with *Nr4a3*^{-/-} effectors performed better than their WT counterparts, as seen by a higher proportion of mice in which tumors regressed between day 15 to 21 (Fig. S1C). TILs analysis of these tumors revealed increased proportion and cell numbers per gram of tumor following ACT with *Nr4a3*^{-/-} OT-I effectors compared to their wild-type counterpart (Fig. 1D). However, the anti-PD-L1 treatment did not have a strong effect on the response of both *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I TILs (Fig. 1D). Phenotypic analysis showed that *Nr4a3*^{-/-} TILs are less exhausted than their WT counterparts as illustrated by lower level of expression of the inhibitory receptors (IRs) PD-1 and Tim-3 while no difference was observed for Lag-3 (Fig. 1E). The expression level of the PD-1 IR was increased in both *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I TIL following treatment with anti-PD-L1 but was still lower in NR4A3-deficient OT-I TILs.

(Fig. 1E). The Tim-3⁺ population significantly increased only in *Nr4a3*^{+/+} OT-I TILs following anti-PD-L1 treatment (Fig. 1E).

ACT of OT-I *Nr4a3*^{+/+} effectors in combination with anti-PD-L1 led to an increase in the proportion of more terminally differentiated cells as shown by the increase in proportion of the SLAMF6^{lo}Tim-3^{hi}, PD1⁺Tim-3⁺ and CD38⁺CD101⁺ subsets (Fig. 1F and S1D-E). However, this was not observed when *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells were used in combination with anti-PD-L1 treatment (Fig. 1F and S1D-E). This suggests that anti-PD-L1 treatment acts by promoting the differentiation of WT progenitor/stem-like cells (SLAMF6^{hi}Tim-3^{lo}) into terminally differentiated effectors with a concomitant loss of progenitor/stem-like cells (Fig. 1F). However, in absence of NR4A3 expression by CD8⁺ T cells, the anti-PD-L1 treatment did not promote terminal differentiation although it enhances tumor control (Fig. 1F and S1D-E). The lack of differentiation of *Nr4a3*^{-/-} OT-I TILs into a terminally differentiated state is further illustrated by a higher proportion of SLAMF6^{hi}Tim-3^{lo} OT-I TILs and by the maintenance of a PD-1⁺Tim-3⁻ phenotype with anti-PD-L1 treatment (Fig. 1F and S1E) and may explain the long-lasting beneficial effect of anti-PD-L1 blockade that is observed even after the treatment was stopped.

The transcription factors T-bet, Eomes, and TCF-1 are known to be involved in the regulation of the CD8⁺ T cell differentiation during a chronic immune response, and we previously showed that the expression of TCF-1 and Eomes are higher in NR4A3-deficient antigen-specific CD8⁺ T cells responding to an acute infection⁷. The expression of these transcription factors was similar in all experimental groups. (Fig. S1F).

Altogether, these results suggest that in absence of NR4A3, CD8⁺ T cells treated with anti-PD-L1 are less prone to terminal differentiation but are still able to efficiently control tumor growth.

NR4A3 deficient TILs produce more TNF- α and are more polyfunctional

To determine if the increased tumor control is due to better functionality of the OT-I effectors used in the ACT, we have measured cytokine and granzyme B production following a short *ex-vivo* restimulation. The majority of OT-I TILs expressed IFN- γ with no significant differences among groups (Fig. 2A). *Nr4a3*^{-/-} OT-I TILs from mice not treated with anti-PD-L1 produced more IL-2 and TNF- α compared to the *Nr4a3*^{+/+} OT-I TILs from tumors treated with anti-PD-L1 (Fig. 2A). The proportion of cells co-producing IFN- γ and TNF- α was increased in *Nr4a3*^{-/-} OT-I TILs from mice treated or not with anti-PD-L1 treatment when compared to *Nr4a3*^{+/+} OT-I TILs with anti-PD-L1 (Fig. 2B). However, no difference was observed for IFN- γ and IL-2 co-producing cells (Fig. S2). Furthermore, anti-PD-L1 treatment did not increase the production of cytokines by both *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I TILs (Fig. 2A-B). Intriguingly, we also observed that *Nr4a3*^{+/+} OT-I TILs under anti-PD-L1 treatment produced more granzyme B compared to the *Nr4a3*^{-/-} OT-I TILs treated or not with anti-PD-L1 (Fig. 2C). Overall, *Nr4a3*^{-/-} OT-I TILs were more polyfunctional, based on IFN- γ and TNF- α production, and the cytotoxicity of these cells did not increase under anti-PD-L1 treatment as it did for *Nr4a3*^{+/+} OT-I TILs. These results suggest that the increased cytokine production and the increased proportions and numbers of *Nr4a3*^{-/-} TILs in the tumor contribute to enhanced tumor control but may not be the only factors that explain the strong impact on mice survival observed in Fig. 1B.

NR4A3 deficiency confers a competitive advantage during ACT and reduces PD-1 and Lag-3 expression by WT TILs

To determine whether the reduced exhaustion and the enhanced anti-tumor efficacy of *Nr4a3*^{-/-} OT-I TILs are cell-intrinsic and whether the presence of *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells within the tumor will impact the differentiation of WT TILs, we performed competitive ACT. We treated tumor-bearing mice with a 1:1 mix of OT-I effectors (*Nr4a3*^{-/-} or *Nr4a3*^{+/+}) and WT OT-I/B6.SJL competitors in combination or not with anti-PD-L1 treatment (Fig. 3A). We observed a 3 to 4-fold increased accumulation of *Nr4a3*^{-/-} OT-I TILs compared to their WT competitors with or without anti-PD-L1 therapy (Fig. 3B). The level of expression of the IRs, PD-1 and Lag-3 was reduced on the WT competitors when co-transferred with *Nr4a3*^{-/-} OT-I effectors but not with *Nr4a3*^{+/+} OT-I effectors (Fig. 3C). On the other hand, the *Nr4a3*^{-/-} OT-I TILs did not affect the expression of Tim-3 on the competitor WT cells (Fig. 3C). When the ACT was done with a mix of *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells, we observed preferential differentiation of *Nr4a3*^{-/-} OT-I TILs into progenitor/stem-like cells (SLAMF6^{hi}Tim-3^{lo}) while the competitor *Nr4a3*^{+/+} OT-I TILs were enriched for terminally exhausted cells (SLAMF6^{lo}Tim-3^{hi}) (Fig. 3D). We further evaluated whether the presence of NR4A3 deficient TILs had an impact on other immune cells within the tumor microenvironment. As shown in Fig. S3, ACT with *Nr4a3*^{-/-} OT-I effectors had minimal impact on the proportion of CD4⁺, CD8⁺, Treg, B, NK, dendritic and myeloid suppressor cells. These results suggest that the effect of the deficiency of NR4A3 acts intrinsically within the OT-I TILs to improve tumor control.

TIL heterogeneity following ACT with NR4A3 deficient effector CD8⁺ T cells

To define how NR4A3 deficiency enhances ACT with effector CD8⁺ T cells and to determine its impact during anti-PD-L1 treatment, we performed a single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) analysis on sorted *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I TILs with or without anti-PD-L1 therapy on day 21 (as done for TIL characterization (Fig. 1C-F)). Sequenced TILs transcriptomes were grouped in 15 clusters (C0 to C14) and we observed a different cell distribution of *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} TILs with or without anti-PD-L1 treatment on their UMAP projection (Fig. 4A).

The identity of the 15 clusters was defined based on gene expression (markers), gene signatures from published studies^{2,13-16} as well as gene ontology (GO) and GSEA gene enrichments (Fig. 4A). We defined clusters 2 and 4 as progenitors as these cells are enriched for transcription of *Tcf7*, *Slamf6*, and *Id3* combined with a low level of *Havcr2* (Fig. 4B). These two clusters are enriched for multiple gene signatures of progenitor/stem-like CD8⁺ T cells isolated from tumors (Fig. S4A) or chronic LCMV infection (Fig. 4C). As expected for progenitors, clusters 2 and 4 do not show enrichment for terminally exhausted gene signatures (Fig. 4C *Giles et al.*¹³ and Fig. S4A *Siddiqui et al.*²). These two progenitor clusters are almost exclusively distributed within *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I TILs, with cluster 2 being enriched in the former and cluster 4 in the latter (Fig. 4A and Table I).

Cluster 12 contains TILs with the characteristic of circulating cells and recent tumor immigrants. Although the TILs within cluster 12 are enriched for the expression of the progenitor-associated genes *Tcf7* and *Slamf6*, their expression of *Klf2* and *Slpr1* suggests that they represent TILs that are circulating and have recently entered into the tumors (Fig. 4B). This is reinforced by their low level of transcription of exhaustion-associated genes (*Tox*, *Pdcd1*, *Lag3*, *Cd160*, *Havcr2*, *Cd101*) (Fig. 4B). Cluster 12 cells are also enriched for the gene signature of naïve versus

exhausted CD8⁺ T cells (GSE9650; $P_{adj} = 5.85 \times 10^{-6}$ and NES = 2.85) and for the gene signature of central memory compared to effector memory CD8⁺ T cells (Fig. S4A). Altogether, this indicates that cluster 12 contains OT-I effector cells that have recently entered in the tumors and as such are less exhausted.

Clusters 6 and 9 are both enriched for TCR signaling gene signature. Cluster 6 is enriched for the GO pathway associated with TCR binding (GO: 0042608; FDR = 5.00×10^{-3}) and KEGG TCR signaling pathway (KEGG:04660; FDR = 2.83×10^{-6}). Similarly, cluster 9 is enriched for the GO pathway associated with the TCR signaling pathway (GO: 0050852; FDR = 1.82×10^{-8}), KEGG TCR signaling pathway (KEGG:04660; FDR = 2.11×10^{-7}) and regulation of the TCR signaling pathway (GO: 0050856; FDR = 1.33×10^{-2}). TILs within both clusters are not enriched for exhaustion-associated genes (Fig. 4B). Although both clusters contain non-exhausted TCR-activated cells, only cluster 9 showed enrichment for effector, memory and residency gene signatures (Fig. 4C). Cluster 6 probably represents TCR-activated recent tumor immigrants as they do not transcribe genes associated with effector functions (*Tbx21*, *Zeb2*, *Batf*, *Prdm1*), early activation markers (*Cd69*, *Il25ra*) and TCR induced genes (*Nr4a1*, *Nr4a2*, *Irf4*) (Fig. S4B). On the other hand, cluster 9 can be defined as TCR-activated memory-like cells as these TILs are enriched in memory and residency gene signatures (Fig. 4C) and actively transcribes early activation (*Cd69*, *Il25ra*) and TCR-induced (*Nr4a1*, *Nr4a2*, *Irf4*) genes (Fig. S4B). Interestingly, these two clusters are overrepresented in *Nr4a3*^{-/-} TILs (Fig. 4A and Table I).

Clusters 0 and 1 are defined as cytotoxic effectors. These TILs are enriched for the gene signature of effectors and cytotoxic cells (Fig. 4C; *Giles et al.*¹³). The clusters 0 and 1 are also enriched for gene signature from effectors compared to exhausted CD8⁺ T cells (GSE9650; Cluster 0: $P_{adj} = 1.66 \times 10^{-8}$ and NES = 3.58; Cluster 1: $P_{adj} = 1.01 \times 10^{-12}$ and NES = 4.19). These two

clusters also transcribed genes encoding effector molecules (*Gzmb*, *Gzma*, *Prfl* and *Ifng*; Fig. 4B)) and transcription factors associated with effector differentiation (*Tbx21* and *Zeb2*; Fig. S4B). The TILs within these clusters also express some exhaustion-associated genes (*Tox*, *Pdcd1*, *Lag3*, *Cd160*, *Havcr2*) (Fig. 4B) and show enrichment for exhausted CD8⁺ T cells gene signature (Fig. 4B *Giles et al.*¹³ and Fig. S4A *Siddiqui et al.*²) which suggests that these cells may start to be exhausted but have still potent effector functions.

Cluster 8 is also an effector cluster highly enriched for cytokine and chemokine production. This cluster contains TILs transcribing high levels of genes encoding for cytokines (*Il2*, *Tnf*, *Ifng*), chemokines (*Xcl1*, *Ccl3*, *Ccl4*), and cytotoxicity-associated molecules (*Prfl*, *Gzma*, *Gzmb*) (Fig. 4B). These cells are also enriched in GO pathways associated with chemokine activity (GO:0008009; FDR = 3.09×10^{-3}), regulation of cytokine production (GO:0001817; FDR = 7.07×10^{-14}), positive regulation of cytokine production (GO:0001819; FDR = 6.19×10^{-12}), cytokine production involved in immune response (GO:0002367; FDR = 7.50×10^{-4}) as well as the negative regulation of cytokine production (GO:0001818; FDR = 1.89×10^{-3}). Although this cluster contains cells that produced high levels of effector molecules, it shows less enrichment for the effector and cytotoxic gene signature than clusters 0 and 1 (Fig. 4B). Cluster 8 is also enriched with TILs expressing transcription factors associated with effector functions such as *Tbx21* and *Zeb2* (Fig. S4B) while not expressing the exhaustion transcription factor *Tox* (Fig. 4B).

Clusters 3, 5, 7, 10, and 14 are defined as proliferating cells as they show enrichment in cell proliferation-associated GO pathways. The most significantly enriched GO pathways within these clusters are: mitotic cell cycle (GO:0000278 and GO:1903047), cell cycle (GO:0007049), cell cycle process (GO:0022402), cell division (GO:0051301) and DNA replication (GO:0006260). The TILs in these clusters show a high level of transcription of *Mki67* (Fig. 4B), as well as

enrichment of the gene signature of proliferating cells (Fig. 4C) and cell cycle (Fig. S4A). These different clusters of proliferating cells can be distinguished into proliferating progenitors (cluster 10) and effectors (clusters 3, 5, 7 and 14) (Fig. 4B-C). The heterogeneity among the proliferating cell populations illustrates the complexity of TIL populations during an anti-tumor immune response.

Cluster 11 contained TILs responding to IFN as illustrated by their enrichment for the expression of *Stat1*, *Stat2*, *Irf1*, *Irf2*, *Irf7*, and *Bst2* (Fig. S4B) and the interferon-stimulated genes (ISG) signature (Fig. 4C). Cluster 13 shows enrichment for the effector and cytotoxic CD8⁺ T gene signatures but to a lesser extent than other clusters (Fig. 4C). This observation combined with the expression of *Lag3* and *Cd160* but not of *Havcr2* (Fig. 4B) suggests that the TILs within cluster 13 are at an early stage of T cell exhaustion.

NR4A3 deficiency induces a transcriptional program of anti-PD-L1 responding TILs

The distribution of TILs within the 15 clusters is very different depending on their genotypes (Fig. 5A and Table I). The *Nr4a3*^{-/-} TILs are more abundant on the right side of the scRNA-seq UMAP (C0, C1, C4, C6, C8, C9, C11, C12) when compared to the *Nr4a3*^{+/+} TILs that are more distributed on the left side (C1, C2, C3, C5, C7, C10, C14) (Fig. 5A). The anti-PD-L1 treatment shifted the *Nr4a3*^{+/+} TILs distribution to the right side of the UMAP where *Nr4a3*^{-/-} TILs without anti-PD-L1 treatment are already more prevalent (Fig. 5A). This suggests that ACT with NR4A3-deficient effectors allows for better tumor control due to a transcriptomic signature similar to the one induced by anti-PD-L1 treatment. Another striking difference within *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} TILs, with and without anti-PD-L1 treatment, is the observation that the *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-}

TILs with a progenitor signature are found in different cluster according to their genotype (Fig. 5A and Table I).

To explain the increased tumor control induced by ACT with *Nr4a3*^{-/-} effectors CD8⁺ T cells, we studied TIL population dynamics associated with the different ACT regimens. Following ACT with *Nr4a3*^{+/+} effectors, the anti-PD-L1 treatment induces an increase in effectors (3.7x C0), cytokine and chemokine producers (1.6x C8), TCR-activated memory-like effectors (2.6x C9), IFN responding TILs (2.0x C11) and circulating or recent tumor immigrants (1.6x C12) (Fig. 5B and Table I). These same clusters are also more abundant following ACT with *Nr4a3*^{-/-} effectors in the absence of anti-PD-L1 treatment (Fig. 5A-B). Indeed, when we compare the *Nr4a3*^{-/-} TILs to *Nr4a3*^{+/+} TILs treated with the isotype control antibody, we observe increased proportions of effectors (4.6x C0), cytokine and chemokine producers (2.9x C8), TCR activated memory-like effectors (16.3x C9), IFN responding TILs (2.4x C11) and circulating or recent tumor immigrants (3.4x C12) (Fig. 5B and Table I). Overall, the populations that are induced by the anti-PD-L1 treatment in the wild-type setting are already enriched in NR4A3 deficient TILs without PD-1/PD-L1 blockade, and these clusters are the ones containing TILs with effector functions. This helps to explain why ACT with *Nr4a3*^{-/-} effectors is as efficient as ACT with *Nr4a3*^{+/+} effectors combined with PD-L1 blockade to control tumor growth. The *Nr4a3*^{-/-} TILs under the anti-PD-L1 treatment undergo different cluster dynamics, where the anti-PD-L1 treatment mainly induces an increase in cycling cells (2.6x C3; 7.1x C5; 3.4x C7; 3.8x C10; 5.8x C14) and some effectors (Fig. 5B and Table I). The increase in the proliferation rate of TILs may explain how anti-PD-L1 treatment enhanced the efficacy of ACT with *Nr4a3*^{-/-} effector CD8⁺ T cells.

To study the impact of NR4A3 and anti-PD-L1 treatment on the TIL transcriptional changes, we evaluated the transcriptional differences among the different treatment conditions between

cells of the same cluster. The highest number of differentially expressed genes was observed when comparing *Nr4a3*^{+/+} with *Nr4a3*^{-/-} TILs under isotype control treatment, with a similar trend, although at a lower level, for these TILs comparison under the PD-L1 blockade (Fig. S5). The lowest number of differentially expressed genes within each cluster was observed when comparing *Nr4a3*^{-/-} TILs treated or not with anti-PD-L1 (Fig. S5). *Nr4a3*^{+/+} TILs also undergo greater changes under anti-PD-L1 treatment than *Nr4a3*^{-/-} TILs. Moreover, the number of differentially expressed genes decreased between *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} TILs under the anti-PD-L1 treatment, which suggest that PD-L1 blockade reduces transcriptional differences among *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} TILs (Fig. S5).

To illustrate the changes that occur under the anti-PD-L1 treatment, we projected on our UMAP an available gene signature of TILs following anti-PD-L1 treatment¹² (Fig. 5C). This gene signature is highly enriched on the right side of the UMAP, where we mainly found *Nr4a3*^{-/-} TILs (Fig. 5C). The most enriched populations for this gene signature are IFN responding TILs (C11) and circulating or recent tumor immigrants (C12) which proportions are increased under anti-PD-L1 treatment in *Nr4a3*^{+/+} TILs and in *Nr4a3*^{-/-} TILs without treatment (Fig. 5C and Table I).

To determine if the transcriptional landscape of *Nr4a3*^{-/-} TILs could explain why they are better at controlling tumor growth, we projected an immune checkpoint blockade (ICB) responder gene signature¹⁷ on our data (Fig. 5D and S5B). Overall, we observed an enriched responder gene signature on the right side of the UMAP in the progenitor clusters (C2 and C4) and in clusters where *Nr4a3*^{-/-} TILs are enriched (Fig. 5D). This responder gene signature is more abundant in *Nr4a3*^{-/-} TILs with or without anti-PD-L1 treatment (Fig. 5D) when compared to the *Nr4a3*^{+/+} conditions.

In conclusion, *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} TILs functional populations with or without the anti-PD-L1 treatment are distinct in their proportions and transcriptional profile inside each cluster. *Nr4a3*^{-/-} TILs are transcriptionally predicted to be better responders during an anti-tumor response and already have an anti-PD-L1-treated like transcriptional profile without PD-L1 blockade.

NR4A3 expression influences the differentiation and transcriptional profile of TILs

Our scRNA-seq identified two different clusters for *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} progenitors. These clusters were enriched in gene signatures of progenitors (Fig. 4C and S4A) and in *Tcf7* expression (Fig. S6). Cluster 2 contains mainly *Nr4a3*^{+/+} TILs, while cluster 4 is associated with *Nr4a3*^{-/-} TILs (Fig. 5A and Table I). The different clustering of *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} progenitors suggests different biological proprieties. To illustrate this, we performed a pseudotime analysis to predict the differentiation trajectory of the two progenitor populations during the anti-tumor response with and without anti-PD-L1 treatment (Fig. 6A). To initiate the predicted pathway of differentiation in the pseudotime analysis, we used as starting point the cluster 2 for the *Nr4a3*^{+/+} TILs and cluster 4 for the *Nr4a3*^{-/-} TILs. This analysis allowed us to observe that the predicted pathways of differentiation of *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} progenitors are distinct (Fig. 6A). The *Nr4a3*^{+/+} progenitors differentiate into cycling cells (C3, C5, C7, C10, C14) before giving rise to cells with effector functions. Under anti-PD-L1 treatment, the differentiation pathway of the *Nr4a3*^{+/+} progenitors (C2) is changed, they first become effectors (C1) before differentiating into cycling cells (C3, C5, C7, C10, C14) that differentiate further into cells with effector functions. Furthermore, under anti-PD-L1 treatment *Nr4a3*^{+/+} TILs further differentiate into TCR-activated memory-like effectors (C9) and IFN-responding cells (C11). The *Nr4a3*^{-/-} progenitors have a different pathway of differentiation, from progenitors (C4), they directly differentiate into

effectors (C0, C1) and into TCR-activated recent tumor immigrants (C6), TCR-activated memory-like effectors (C9) and cytokine/chemokine producers (C8). Under anti-PD-L1 treatment, the *Nr4a3*^{-/-} progenitors differentiation change, progenitors (C4) give rise to cycling cells (C3, C5, C7, C10, C14) that are very rare without PD-L1 blockade. Another striking difference is that under anti-PD-L1 treatment, the proportion of *Nr4a3*^{-/-} progenitors does not change while their wild-type counterpart decreased (Fig. 6B and Table I). This is reminiscent of what we have observed by flow cytometry using SLAMF6/Tim-3 stainings (Fig. 1F). Altogether, this suggests that the different properties of *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} progenitors impact their differentiation path and suggests that *Nr4a3*^{-/-} progenitors are able to directly differentiate into effectors and cells populations that are enriched under the anti-PD-L1 treatment more rapidly than *Nr4a3*^{+/+} progenitors, which need to proliferate before differentiating into effectors.

To better characterize the *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} progenitors, we compared their gene expression profiles. We identified 273 differentially expressed genes (*P*_{adj} < 0.05) between the *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} TIL progenitors. Among them, 22 show more than 1.5-fold enrichment in *Nr4a3*^{-/-} progenitors and 12 in *Nr4a3*^{+/+} progenitors (Fig. 6C). Among these genes, we searched for extracellular molecules coding genes to be able to find markers that will allow us to distinguish *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} progenitors. *Ifngr1*, *Cxcr6*, *Emb*, *Il7r*, and *Jaml* gene expression is higher in *Nr4a3*^{-/-} progenitors, while *Dapl1*, *Sell*, *Nrgn*, *Itga4* expression is increased in *Nr4a3*^{+/+} progenitors. We then evaluated whether these markers allow us to distinguish by flow cytometry the wild-type progenitors from the NR4A3-deficient ones. The only two markers for which we observed different levels of protein expression between *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} progenitors are CD62L (encoded by *Sell*) and CXCR6 (Fig. 6D-E and data not shown). CD62L expression is higher on *Nr4a3*^{+/+} progenitors (Fig. 6D) and CXCR6 on *Nr4a3*^{-/-} progenitors (Fig. 6E).

We defined *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} progenitors as cells with a distinct transcriptome that could differentiate by different predicted pathways in order to sustain the anti-tumor immune response. Furthermore, *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} progenitors are transcriptionally distinct, the *Nr4a3*^{+/+} expressing higher *Sell* gene and CD62L protein, whereas *Nr4a3*^{-/-} progenitors express higher *Cxcr6* gene and CXCR6 protein.

Discussion

Our results show that NR4A3-deficient CD8⁺ T cells have enhanced ability to control tumor growth in an ACT mouse model of melanoma and that this therapeutic effect is further enhanced by PD-L1 blockade. This better tumor control following ACT with *Nr4a3*^{-/-} effector CD8⁺ T cells is associated with an increased proportion of *Nr4a3*^{-/-} CD8⁺ TILs within the tumors and a decrease in their exhaustion and terminal differentiation. scRNA-seq analysis of TILs further reveals: i) the presence of distinct subsets of progenitors following ACT with *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} effector CD8⁺ T cells; ii) the enrichment of *Nr4a3*^{-/-} TILs within the clusters that are associated with the anti-PDL-1 response of wild-type TILs. Altogether, this suggests that following ACT, *Nr4a3*^{-/-} effectors differentiate into TILs with a transcriptional profile of ICB-treated cells even without PD-L1 blockade.

One striking observation that we have made, is that ACT with *Nr4a3*^{-/-} effector CD8⁺ T cells is better than ACT with *Nr4a3*^{+/+} effectors combined with anti-PD-L1 therapy. This is probably explained by the differentiation of *Nr4a3*^{-/-} effector CD8⁺ T cells into TIL subsets having the transcriptional characteristics of wild-type TILs under PD-L1 blockade. Indeed, *Nr4a3*^{-/-} TILs are enriched in clusters associated with effector functions and these clusters are the ones that increased following anti-PD-L1 treatment of wild-type cells. At the molecular level, the reduced

exhaustion and enhanced effector functions of *Nr4a3*^{-/-} TILs could be a direct consequence of the reported ability of NR4As to reduce the accessibility of chromatin containing binding motifs for bZIP transcription factors⁹, as bZIP transcription factors are known to control T cell activation and effector functions¹⁸⁻²². Furthermore, c-Jun, a bZIP transcription factor overexpression was shown to reduce T cell exhaustion and to enhance effector functions of CAR T cells²³. Further studies are required to define whether the better anti-tumor activity of *Nr4a3*^{-/-} effector CD8⁺ T cells is the result of enhanced binding of bZIP transcription factors to DNA.

The better tumor control following ACT with *Nr4a3*^{-/-} effectors compared to *Nr4a3*^{+/+} effectors combined with anti-PD-L1 treatment is in line with previous observations that have shown that anti-PD-L1 treatment decreases transcription of the *Nr4a* genes and the chromatin accessibility of NR4As. Therefore, we would like to suggest that one of the main mechanisms of action of anti-PD-L1 treatment is via the regulation of NR4A activity. However, anti-PD-L1 treatment does not solely acts through the modulation of NR4A3 activity as PD-L1 blockade enhances the therapeutic efficacy of ACT with *Nr4a3*^{-/-} effector CD8⁺ T cells.

Although anti-PD-L1 promotes better tumor control following ACT with *Nr4a3*^{-/-} effectors, the mechanism by which it does so seems to be very different than ACT with wild-type cells. Indeed, PD-L1 blockade induces the differentiation of *Nr4a3*^{+/+} TIL progenitors (SLAMF6^{hi} Tim-3^{lo}) into more exhausted TILs (SLAMF6^{lo}Tim-3^{hi}), while this is not observed with *Nr4a3*^{-/-} TILs. Furthermore, most TIL subsets identified with the scRNA-seq do not change in proportion in absence of NR4A3, while they change significantly in the wild-type setting. Furthermore, anti-PD-L1 treatment induces significant changes in the transcriptome of the different *Nr4a3*^{+/+} TIL clusters, while changes are minimal in absence of NR4A3. In agreement with our flow cytometry data, the proportion of cells in the cluster of *Nr4a3*^{-/-} progenitors does not change with PD-L1 blockade,

while it decreases for *Nr4a3*^{+/+} TILs. This raised the question of how NR4A3-deficient TILs control better the tumor growth under anti-PD-L1 treatment. It is likely that maintenance of stemness in *Nr4a3*^{-/-} progenitor TILs promotes better tumor control by allowing constant fueling of effectors while maintaining themselves. On the other hand, it is possible that following anti-PD-L1 treatment, *Nr4a3*^{-/-} progenitors are constantly recruited from secondary lymphoid organs. This fits with our previous observation that NR4A3-deficient CD8⁺ T cells generated more central memory CD8⁺ T cells during acute infection⁷. The different behavior of *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} progenitors following anti-PD-L1 treatment probably reflects the fact that these progenitors have a distinct transcriptional profile. Indeed, *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} progenitors are enriched within different clusters. We have identified some cell surface molecules that distinguish the *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} progenitors; CD62L is expressed at higher level on wild-type progenitors, while CXCR6 is higher on NR4A3-deficient progenitors. The differential expression of these molecules could have functional importance as CD62L is known to define stem-like TILs²⁴ while CXCR6⁺ TILs are recruited by IL-15 presented by CCR7⁺ DCs to promote long-term survival²⁵. Further studies should reveal the functional difference and differentiation pathway associated with these distinct progenitor subsets.

Our results on ACT of cancer also highlight that deficiency in only one member of the NR4A family is sufficient to provide better therapeutic efficacy of CD8⁺ effectors. Interestingly, another group recently reported that ACT with *Nr4a1*^{-/-} CD8⁺ T cells led to better tumor control than their WT counterpart⁹. This suggests that the different NR4A family members can have dominant effect in the context of anti-tumor response. Further studies should reveal whether they do so via a similar mechanism. In contrast, another group recently reported that the deletion of the three NR4A family members was required to enhance the action of chimeric-antigen receptor

(CAR) expressing CD8⁺ T cells⁸. Furthermore, a recent study showed that NR4A3 deletion in human CAR-T cells was not sufficient to enhance tumor control but that the co-deletion of *Nr4a3* and *Prdm1* (coding for Blimp-1) is required to decrease exhaustion and improve tumor control¹¹. One possible explanation for these differences could relate to the stronger antigenic signal that may lead to more severe exhaustion of CAR-expressing TILs, which might not be overcome by the deletion of only one NR4A member in CD8⁺ TILs.

Altogether, our results suggest that the modulation of NR4A3 activity represents a promising avenue for the generation of better T-cell products for ACT of cancer patients and improving the efficacy of anti-PD-1/PD-L1 treatment of cancer patients.

Materials and methods

Mice

Nr4a3^{-/-} and *Nr4a3*^{+/+}, OT-I (*Rag1*^{-/-})²⁶, B6.SJL, C57BL/6 and CD45.1.2 (F1 of B6.SJL x C57BL/6) mice were all bred at the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center facility. *Nr4a3*^{-/-} mice were kindly provided by Dr. Orla M. Conneely²⁷ and were backcrossed for at least 10 generations to C57BL/6 mice. These mice were then crossed to the OT-I mouse strain to obtain OT-I *Nr4a3*^{+/+} (*Rag1*^{-/-}) and OT-I *Nr4a3*^{-/-} (*Rag1*^{-/-}) mice. OT-I/B6.SJL mice were obtained by crossing OT-I (*Rag1*^{-/-}) mice with B6.SJL (CD45.1) mice. Mice were housed in a pathogen-free environment and treated in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

Cell lines

B16-OVA cells were kindly provided by A. Lamarre (INRS-Institut Armand-Frappier). B16-OVA cells were cultured in DMEM (Corning; REF: 10-017-CV) supplemented with 10% of *Nu* serum (Corning; ref # 355104), 1mM of sodium pyruvate (Corning; REF: 25-000-Cl), penicillin/streptomycin (Corning; REF: 30-002-Cl) in presence of 5 mg/ml of G418 (Corning; CAS#108321-42-2) to select for OVA expressing cells.

***In vitro* generation of OT-I CD8⁺ effector T cells for anti-tumor ACT**

Nr4a3^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I T cells (CD45.2⁺) were isolated from lymph nodes and mixed with B6.SJL splenocytes (CD45.1⁺) cells in 4:6 ratio. Stimulation was performed on 6-well plate at 5 x 10⁶ cells per ml in the presence of 0.1 µg/ml of OVA peptide (Midwest Biotech) in complete RPMI media (Corning; ref # 10-040-CV) that is a RPMI supplemented with 10% of *Nu* serum (Corning; ref # 355104), 1mM of sodium pyruvate (Corning; ref # 25-000-Cl), 10mM of HEPES (Corning; ref # 25-060-Cl), 0,1 mM of MEM non-essential amino acids (Gibco Life Technologies; ref # 11140-050), 2mM of glutamine (Corning; ref # 25-005-Cl), 10µM of 2-mercaptoethanol (Gibco Life Technologies; ref # 21985-023) and penicillin/streptomycin (Corning; ref # 30-002-Cl). 24h post stimulation, culture media was removed, and the stimulated cells were gently washed without disrupting their adherence to the plate. New media was added, and the culture continued for an additional 24h. At 48h post stimulation cells were harvested, washed, and resuspended at 1 x 10⁶ cells/ml. Recombinant rhIL-2 (Novartis; PROLEUKIN®) was added to the cell suspension at 100U/ml and the culture was continued for an additional day before the adoptive transfer.

ACT and anti-PD-L1 treatment

10^6 *in vitro* *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I effectors were adoptively transferred i.v. into B6.SJL mice injected sub-cutaneously with 5×10^5 B16-OVA cells into the right flank seven days before. The anti-PD-L1 treatment was then added by injecting the anti-PD-L1 antibody (BioXcell; clone 10F.9G2) or its isotype (BioXcell or Leinco; Rat IgG2b) control at day 7, 10, 13, 16 post-tumor implantation by intraperitoneal injection of 200 μ g of antibody per mouse. The tumor measurement was performed by measuring of the 2-perpendicular axis and the area was calculated by multiplying the 2 axes⁸. For survival curve experiments, the tumor growth was followed every 2 days until the experimental endpoint (200 mm² or tumor ulceration). For TILs phenotyping experiments, at day 12-post-tumor implementation, tumor-bearing mice were treated with 10^6 *in vitro* generated *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I effectors. These mice were then treated with anti-PD-L1 at day 15 and 18 post-tumor implantation (200 μ g i.p. per mouse) and the tumors were harvested at day 21 post-tumor injection for TIL characterization. For the TIL phenotyping experiments tumors with an area lower than 30mm² were excluded from the analysis to compare the immune response to a well-established tumor burden.

TILs preparation for flow cytometry analysis

Tumors were extracted, disrupted (between 2 frosted glass slides) and digested with 1mg/ml of collagenase D (Sigma Life Science; ref # 11088882001) and 100 μ g/ml of DNase I (Sigma Life Science; ref # D5025-375KU) for 15 min at 37°C²⁸. The tumor cell suspension was filtered (100 μ m) and red blood cells were lysed using 0.83% NH₄Cl (Bio Basic; CAS #12125-02-9) for 5 min at RT. Prior to antibody stainings, tumor cell suspensions were incubated 10 min at RT with Fc block (Leico; C381) and a viability dye (Biolegend; Zombie Aqua (ref # 423102) or Zombie

NIR (ref # 423106)) to exclude dead cells. Extracellular staining was performed 20 min at 4°C in FACS WASH (FW) buffer as previously described²⁹. Transcription factors intranuclear staining was performed using *Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set* (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific; ref # 00-5523-00) according to manufacturer instructions. Flow cytometry analysis was performed on BD LSR II, BD LSRFortessa X-20 and HTS BD LSRFortessa X-20 from BD Biosciences. Data were analyzed using FlowJo software (Tree Star). List of antibodies and flow cytometry reagents is provided in the supplementary materials.

TILs restimulation for cytokine production analysis

Tumor suspensions were stimulated with 50ng/ml of phorbol 12-myristate13-acetate (Sigma; ref # P8139) and 500ng/ml of ionomycin (Sigma; ref # I0634) in the presence of 10 µg/ml of brefeldin A (Fisher; ref # AAJ62340MB) for 5h at 37°C and 5% CO₂. Cells were fixed 20 min with 2% paraformaldehyde at RT. Fixed cells were permeabilized with 0.5 % of saponin (Sigma Life Science; ref # S-7900) in FW for 10 min at RT. Permeabilized cells were stained with anti-cytokine antibodies followed by cell surface staining as previously described^{29,30}.

Cell sorting

OT-I *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} TILs were sorted from freshly prepared day 21 tumor cells suspensions obtained from mice that were treated or not with anti-PDL-1 antibodies. Briefly, tumor cell suspensions were incubated with viability dye and Fc-block antibodies (Leico; C381) for 10 min at RT. Tumor cells suspensions were then stained with extracellular antibodies 20 min at 4°C in sorting buffer (PBS, 1% *Nu* serum, 1mM EDTA, 25mM HEPES). Viable OT-I TILs (Zombie-dye^{neg}CD8⁺ CD45.1⁻CD45.2⁺) were sorted in complete RPMI media.

sc-RNAseq sample preparation and library generation

Tumors from mice that were treated with *in vitro* generated *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} OT-I effectors at day 12 and followed by treatment with anti-PD-L1 or isotype control antibodies on day 15 and 18 were collected at day 21. TIL extraction were performed on each collected tumor and then three tumors from each experimental condition were pooled. Tumor cell suspensions were stained with viability dye and Abs as described above. Viable TILs (ZombieAqua⁻ CD8⁺ CD45.1⁻ CD45.2⁺) were sorted in complete RPMI media and kept on ice. Sorted TILs were then washed in sorting buffer and then blocked with Fc-block for 10 min at 4°C before TotalSeq-HashTag Ab staining 30 min on ice. *Nr4a3*^{+/+} were stained with HashTag2 (GGTCGAGAGCATTCA) and *Nr4a3*^{-/-} with HashTag3 (CTTGCCGCATGTCAT). After the HashTag staining, TILs were washed once with sorting buffer and twice with 0.04 % of unacetylated BSA containing PBS. TILs were then counted and mixed in a 1:1 ratio (*Nr4a3*^{+/+} with *Nr4a3*^{-/-} OT-I TILs from mice treated with the isotype control; and *Nr4a3*^{+/+} with *Nr4a3*^{-/-} OT-I TILs from mice treated with anti-PD-L1). Each TILs mix were diluted at 1 x 10⁶ cells /ml and about 5000 cells of each TILs mix were loaded into the 10x Chromium controller for the individual cell sequencing. For each cell mix a scRNA-seq libraries was generated using the Chromium Next GEM Single Cell 3' Kit v3.1 (with dual index and 3' Feature barcoding technology). All library preparation steps were performed according to the manufacturer's instructions. Each cell was sequenced with 50000 reads per cell and 1000 reads for the HashTag. We obtained the individual transcriptome of a total of 10830 OT-I TILs (3148 and 2723 *Nr4a3*^{+/+} cells treated or not with anti-PDL-1; 2215 and 2744 *Nr4a3*^{-/-} cells treated or not with anti-PD-L1).

Single cell RNAseq data analysis

Cellranger-6.1.1's multi pipeline was used to analyze 10x 3' Cell Multiplexing data of *Nr4a3*^{+/+} and *Nr4a3*^{-/-} reads from both isotype control and anti-PD-L1 conditions. The resulting gene expression matrices for each sample were then imported in R package Seurat (v4.1) for quality control and downstream analyses. Each sample was first examined individually to identify and filter out empty/dead cells or doublets based on the number of transcripts and number of unique genes present in each cell and on the percentage of mitochondrial reads. All 4 samples were then merged, and the percentage of mitochondrial reads regressed out. Data was log normalized and highly variable genes identified. The expression level of highly variable genes in the cells was scaled and centered along each gene, and linear dimensionality reduction performed by principal component analysis (PCA). Only the first 20 PCs were selected for subsequent analyses. Clusters were identified using Louvain's algorithm with a resolution of 0.8, yielding a total of 15 clusters. Differential expression analysis on the resulting clusters was conducted using the Wilcoxon rank-sum test for genes expressed at least in 10% cells within the cluster and with a fold change more than 0.10 (log scale). P-values were adjusted for multiple testing using the Bonferroni correction. Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) was applied for visualization purposes. DEGs were calculated using the functions FindAllMarkers or FindMarkers (Seurat) for two experimental condition or clusters pairwise comparisons using the adjusted *P value* of less than 0.05 as significant and a log2 fold-change threshold of 0.584963 (FC>1.5) as an enriched gene expression value. Gene-set enrichments were calculated using the *AddModuleScore* function (Seurat). *Gene Ontology* analysis of the upregulated genes was done with *G:Profiler* (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>). Gene set enrichment analysis was performed using *Fast Gene Set Enrichment Analysis* (fgsea 1.20.1) package. *Pseudotime* analysis was done using Monocle.

Statistical analyses

For multiple groups comparisons one way ANOVA (Kruskal-Wallis) analysis with Dunn's multiple comparisons was performed. For survival curve comparison a log-rank Mantel–Cox test was used. Paired samples (OT-I and OT-I/B6.SJL comparisons) were analyzed using a paired nonparametric paired T test. Unpaired two groups comparison (with a low number of samples) was performed using a Mann Whitney test. Statistical analyses were performed using Prism software (GraphPad Software). Data were presented as individual samples with mean where each dot represent one mouse on scatter plots and also each line represent one mouse on tumor growth follow-up curves. P values of $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$ were considered statistically significant.

Supplementary material

Fig. S1. ACT with NR4A3-deficient CD8⁺ T cells increases tumor control and decreases T cell exhaustion.

Fig. S2. NR4A3 deficiency does not impact the proportion of IL-2⁺IFN- γ ⁺ TILs.

Fig. S3. NR4A3 deficiency does not affect tumor infiltration by other immune cell types.

Fig. S4. *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} TILs transcriptional profile under anti-PD-L1 treatment.

Fig. S5. *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} TILs differentially expressed genes by clusters.

Fig. S6. *Tcf7* expression by *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I TILs.

Table SI. Antibodies and reagents list

Acknowledgements: We thank all laboratory members for helpful discussion. We thank Dr O. Conneely for providing *Nr4a3*^{-/-} mice and M.-È. Lebel for advice on the B16-OVA tumor model. We thank Frédéric Duval for cell sorting and the animal care technicians for mice husbandry. We are grateful to S. Boissel, V. Calderon, C. Grou from IRCM for help with the scRNA-seq experiment and bioinformatical analysis. **Funding:** This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (PJT 168910) to N. Labrecque. L. Odagiu was supported by a studentship from the Fonds de la recherche Québec-Santé and the Cole Foundation. **Author contribution:** L.O., S.B., N.L. designed and analysed the experiments. L.O., D.M.D.S., S.B., performed the experiments. N.L., L.O. wrote the paper. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** The raw scRNA-seq will be deposited at Gene Expression Omnibus.

References

1. Miller, B.C., Sen, D.R., Abosy, R.A., Bi, K., Virkud, Y.V., LaFleur, M.W., Yates, K.B., Lako, A., Felt, K., Naik, G.S., et al. (2019). Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat Immunol* *20*, 326–336. 10.1038/s41590-019-0312-6.
2. Siddiqui, I., Schaeuble, K., Chennupati, V., Marraco, S.A.F., Calderon-Copete, S., Ferreira, D.P., Carmona, S.J., Scarpellino, L., Gfeller, D., Pradervand, S., et al. (2019). Intratumoral Tcf1+PD-1+CD8+ T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Immunity* *50*, 195-211.e10. 10.1016/j.immuni.2018.12.021.
3. Boulet, S., Corre, L.L., Odagiu, L., and Labrecque, N. (2022). Role of NR4A family members in myeloid cells and leukemia. *Curr Res Immunol* *3*, 23–36. 10.1016/j.crimmu.2022.02.001.
4. Odagiu, L., May, J., Boulet, S., Baldwin, T.A., and Labrecque, N. (2021). Role of the Orphan Nuclear Receptor NR4A Family in T-Cell Biology. *Front Endocrinol* *11*, 624122. 10.3389/fendo.2020.624122.
5. Pearen, M.A., and Muscat, G.E.O. (2010). Minireview: Nuclear Hormone Receptor 4A Signaling: Implications for Metabolic Disease. *Mol Endocrinol* *24*, 1891–1903. 10.1210/me.2010-0015.
6. Hiwa, R., Brooks, J.F., Mueller, J.L., Nielsen, H.V., and Zikherman, J. (2022). NR4A nuclear receptors in T and B lymphocytes: Gatekeepers of immune tolerance*. *Immunol Rev* *307*, 116–133. 10.1111/imr.13072.
7. Odagiu, L., Boulet, S., Sousa, D.M.D., Daudelin, J.-F., Nicolas, S., and Labrecque, N. (2020). Early programming of CD8+ T cell response by the orphan nuclear receptor NR4A3. *Proc National Acad Sci* *117*, 24392–24402. 10.1073/pnas.2007224117.
8. Chen, J., López-Moyado, I.F., Seo, H., Lio, C.-W.J., Hempleman, L.J., Sekiya, T., Yoshimura, A., Scott-Browne, J.P., and Rao, A. (2019). NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours. *Nature* *567*, 530–534. 10.1038/s41586-019-0985-x.
9. Liu, X., Wang, Y., Lu, H., Li, J., Yan, X., Xiao, M., Hao, J., Alekseev, A., Khong, H., Chen, T., et al. (2019). Genome-wide analysis identifies NR4A1 as a key mediator of T cell dysfunction. *Nature* *567*, 525–529. 10.1038/s41586-019-0979-8.
10. Seo, H., Chen, J., González-Avalos, E., Samaniego-Castruita, D., Das, A., Wang, Y.H., López-Moyado, I.F., Georges, R.O., Zhang, W., Onodera, A., et al. (2019). TOX and

TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8⁺ T cell exhaustion. *Proc National Acad Sci* 116, 12410–12415. 10.1073/pnas.1905675116.

11. Jung, I.-Y., Narayan, V., McDonald, S., Rech, A.J., Bartoszek, R., Hong, G., Davis, M.M., Xu, J., Boesteanu, A.C., Barber-Rotenberg, J.S., et al. (2022). BLIMP1 and NR4A3 transcription factors reciprocally regulate antitumor CAR T cell stemness and exhaustion. *Sci Transl Med* 14, eabn7336. 10.1126/scitranslmed.abn7336.

12. Pauken, K.E., Sammons, M.A., Odorizzi, P.M., Manne, S., Godec, J., Khan, O., Drake, A.M., Chen, Z., Sen, D.R., Kurachi, M., et al. (2016). Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science* 354, 1160–1165. 10.1126/science.aaf2807.

13. Giles, J.R., Ngiow, S.F., Manne, S., Baxter, A.E., Khan, O., Wang, P., Staupe, R., Abdel-Hakeem, M.S., Huang, H., Mathew, D., et al. (2022). Shared and distinct biological circuits in effector, memory and exhausted CD8⁺ T cells revealed by temporal single-cell transcriptomics and epigenetics. *Nat Immunol* 23, 1600–1613. 10.1038/s41590-022-01338-4.

14. Miller, B.C., Sen, D.R., Abosy, R.A., Bi, K., Virkud, Y.V., LaFleur, M.W., Yates, K.B., Lako, A., Felt, K., Naik, G.S., et al. (2019). Subsets of exhausted CD8⁺ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat Immunol* 20, 326–336. 10.1038/s41590-019-0312-6.

15. Crowl, J.T., Heeg, M., Ferry, A., Milner, J.J., Omilusik, K.D., Toma, C., He, Z., Chang, J.T., and Goldrath, A.W. (2022). Tissue-resident memory CD8⁺ T cells possess unique transcriptional, epigenetic and functional adaptations to different tissue environments. *Nat Immunol* 23, 1121–1131. 10.1038/s41590-022-01229-8.

16. Carmona, S.J., Siddiqui, I., Bilous, M., Held, W., and Gfeller, D. (2020). Deciphering the transcriptomic landscape of tumor-infiltrating CD8 lymphocytes in B16 melanoma tumors with single-cell RNA-Seq. *Oncoimmunology* 9, 1737369. 10.1080/2162402x.2020.1737369.

17. Chen, I.X., Newcomer, K., Pauken, K.E., Juneja, V.R., Naxerova, K., Wu, M.W., Pinter, M., Sen, D.R., Singer, M., Sharpe, A.H., et al. (2020). A bilateral tumor model identifies transcriptional programs associated with patient response to immune checkpoint blockade. *Proc National Acad Sci* 117, 23684–23694. 10.1073/pnas.2002806117.

18. Scott-Browne, J.P., López-Moyado, I.F., Trifari, S., Wong, V., Chavez, L., Rao, A., and Pereira, R.M. (2016). Dynamic Changes in Chromatin Accessibility Occur in CD8⁺ T Cells Responding to Viral Infection. *Immunity* 45, 1327–1340. 10.1016/j.immuni.2016.10.028.

19. Yu, B., Zhang, K., Milner, J.J., Toma, C., Chen, R., Scott-Browne, J.P., Pereira, R.M., Crotty, S., Chang, J.T., Pipkin, M.E., et al. (2017). Epigenetic landscapes reveal transcription factors that regulate CD8⁺ T cell differentiation. *Nat Immunol* 18, 573–582. 10.1038/ni.3706.

20. Wang, D., Diao, H., Getzler, A.J., Rogal, W., Frederick, M.A., Milner, J., Yu, B., Crotty, S., Goldrath, A.W., and Pipkin, M.E. (2018). The Transcription Factor Runx3 Establishes Chromatin Accessibility of cis-Regulatory Landscapes that Drive Memory Cytotoxic T Lymphocyte Formation. *Immunity* 48, 659-674.e6. 10.1016/j.immuni.2018.03.028.
21. Yukawa, M., Jagannathan, S., Vallabh, S., Kartashov, A.V., Chen, X., Weirauch, M.T., and Barski, A. (2019). AP-1 activity induced by co-stimulation is required for chromatin opening during T cell activation. *J Exp Med* 217, e20182009. 10.1084/jem.20182009.
22. Papavassiliou, A.G., and Musti, A.M. (2020). The Multifaceted Output of c-Jun Biological Activity: Focus at the Junction of CD8 T Cell Activation and Exhaustion. *Cells* 9, 2470. 10.3390/cells9112470.
23. Lynn, R.C., Weber, E.W., Sotillo, E., Gennert, D., Xu, P., Good, Z., Anbunathan, H., Lattin, J., Jones, R., Tieu, V., et al. (2019). c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance. *Nature* 576, 293–300. 10.1038/s41586-019-1805-z.
24. Gautam, S., Fioravanti, J., Zhu, W., Gall, J.B.L., Brohawn, P., Lacey, N.E., Hu, J., Hocker, J.D., Hawk, N.V., Kapoor, V., et al. (2019). The transcription factor c-Myb regulates CD8+ T cell stemness and antitumor immunity. *Nat Immunol* 20, 337–349. 10.1038/s41590-018-0311-z.
25. Pilato, M.D., Kfuri-Rubens, R., Pruessmann, J.N., Ozga, A.J., Messemaker, M., Cadilha, B.L., Sivakumar, R., Cianciaruso, C., Warner, R.D., Marangoni, F., et al. (2021). CXCR6 positions cytotoxic T cells to receive critical survival signals in the tumor microenvironment. *Cell* 184, 4512-4530.e22. 10.1016/j.cell.2021.07.015.
26. Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., and Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17–27. 10.1016/0092-8674(94)90169-4.
27. Ponnio, T., Burton, Q., Pereira, F.A., Wu, D.K., and Conneely, O.M. (2002). The nuclear receptor Nor-1 is essential for proliferation of the semicircular canals of the mouse inner ear. *Molecular and Cellular Biology* 22, 935–945. 10.1128/mcb.22.3.935-945.2002.
28. Lebel, M.-E., Chartrand, K., Tarrab, E., Savard, P., Leclerc, D., and Lamarre, A. (2016). Potentiating Cancer Immunotherapy Using Papaya Mosaic Virus-Derived Nanoparticles. *Nano Lett* 16, 1826–1832. 10.1021/acs.nanolett.5b04877.
29. Ostiguy, V., Allard, E.-L., Marquis, M., Leignadier, J., and Labrecque, N. (2007). IL-21 promotes T lymphocyte survival by activating the phosphatidylinositol-3 kinase signaling cascade. *J. Leukoc. Biol.* 82, 645–656. 10.1189/jlb.0806494.
30. Lacombe, M.-H., Hardy, M.-P., Rooney, J., and Labrecque, N. (2005). IL-7 Receptor Expression Levels Do Not Identify CD8+ Memory T Lymphocyte Precursors following Peptide Immunization. *J Immunol* 175, 4400–4407. 10.4049/jimmunol.175.7.4400.

FIGURE

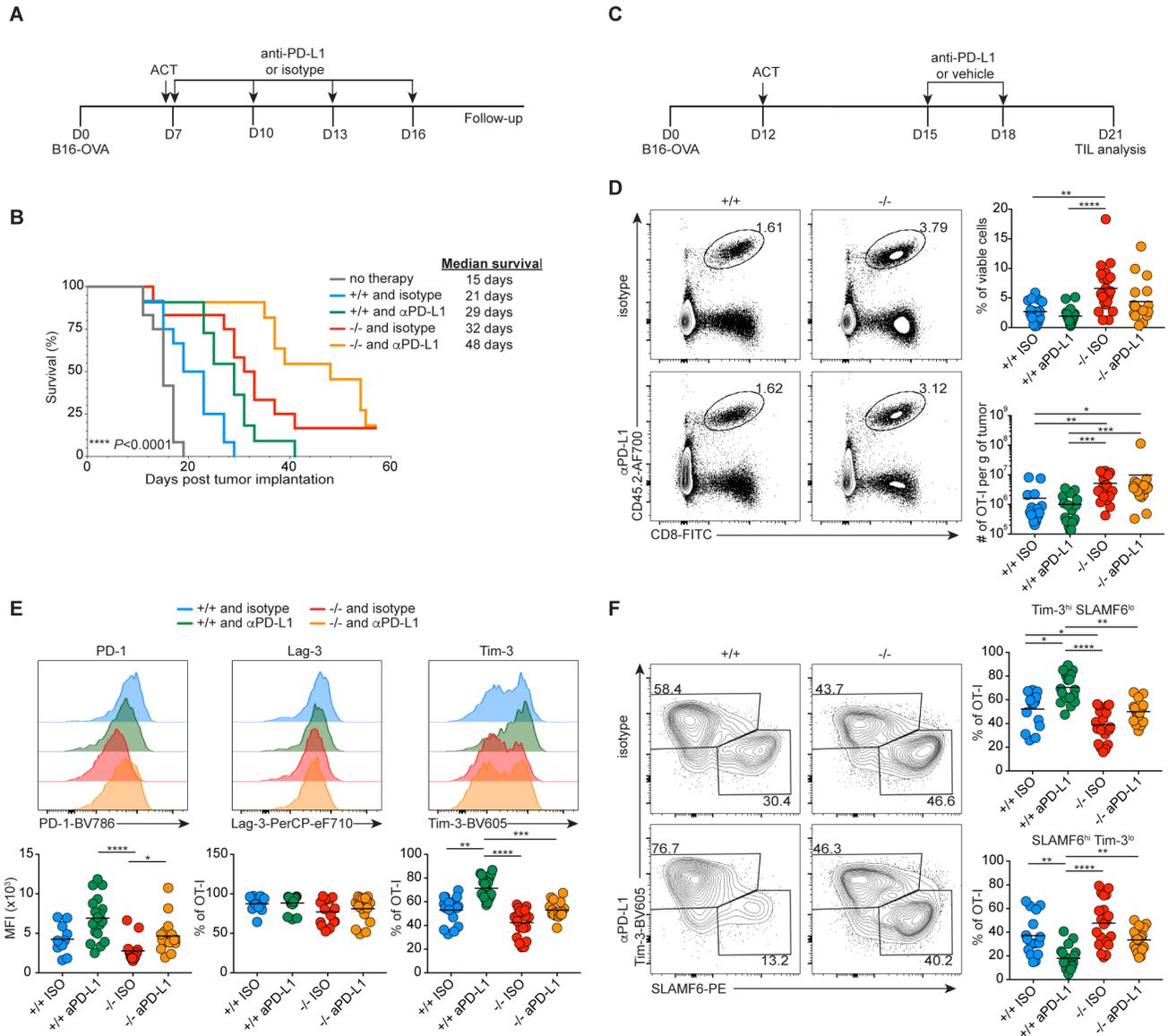


Figure 1. ACT with NR4A3-deficient CD8⁺ T cells improves tumor control with and without anti-PD-L1 treatment. **A.** Experimental design for combined ACT and anti-PD-L1 treatment of mice implanted with B16-OVA tumor cells. A group of mice was treated with the isotype control

antibody (ISO). **B.** Survival curve of mice implanted with B16-OVA melanoma cells under the different ACT treatments. **C.** Experimental design for TILs phenotyping after ACT combined with anti-PD-L1 treatment. At day 21 post-tumor implantation, TILs were isolated and analyzed by flow cytometry to measure OT-I cell proportion and number (**D**), inhibitory receptors expression by OT-I TILs (**E**) and progenitor (SLAMF6^{hi}Tim-3^{lo}) and terminal (SLAMF6^{lo}Tim-3^{hi}) OT-I TILs (**F**). Data are from 3 (**A, B**), or 3 to 4 (**C-F**) independent experiments. Each dot represents one mouse. Survival curves were compared using log-rank Mantel–Cox test. Kruskal-Wallis ANOVA with Dunn’s multiple comparisons was used for multiple groups comparison: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

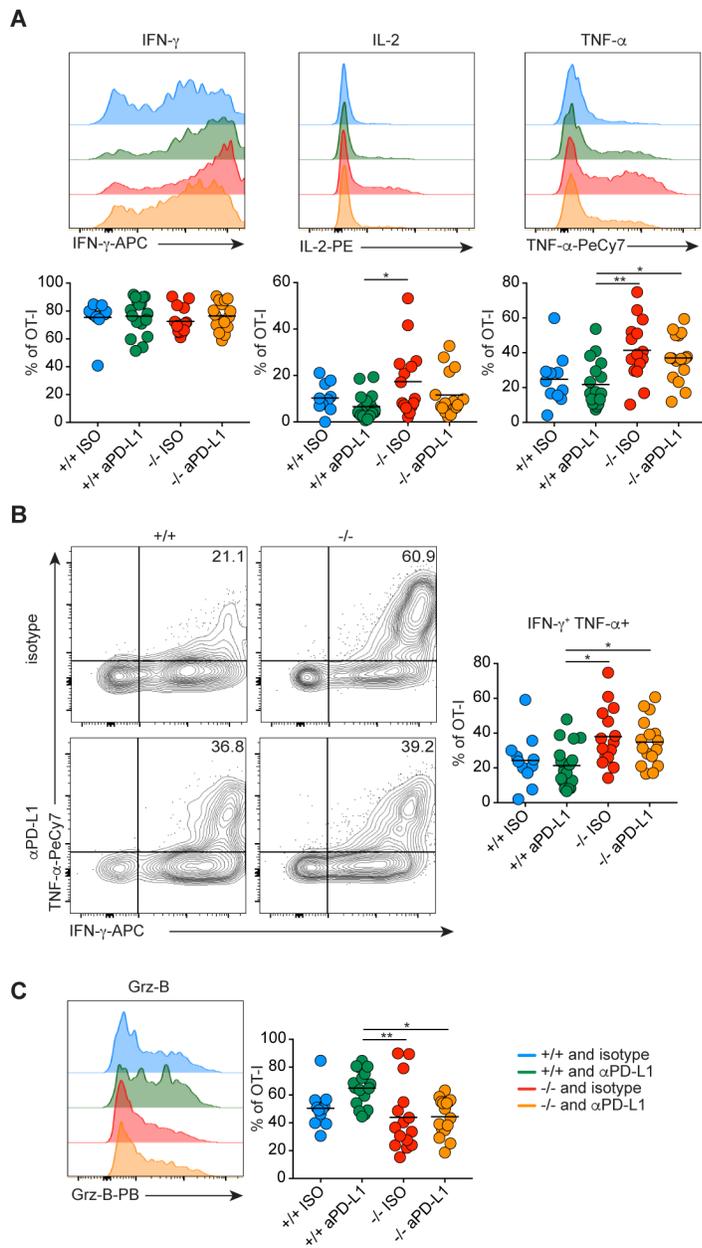


Figure 2. *Nr4a3*^{-/-} OT-I TILs produce more TNF- α and are more polyfunctional than *Nr4a3*^{+/+} OT-I TILs. Mice were implanted with B16-OVA melanoma cells and treated 12 days later with *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} *in vitro* generated OT-I effectors. Mice were treated with isotype control (ISO) or anti-PD-L1 at days 15 and 18. At day 21, tumor cell suspensions were restimulated for 5h with PMA/ionomycin for cytokine production quantification. **A-C.** Proportions of OT-I TILs producing IFN- γ^+ , IL-2 $^+$, or TNF- α^+ (**A**), co-producing IFN- γ^+ TNF- α^+ (**B**) and granzyme-B $^+$ (**C**).

Data are from 3 independent experiments. Each dot represents one mouse. Kruskal-Wallis ANOVA with Dunn's multiple comparisons was used for multiple groups comparison: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

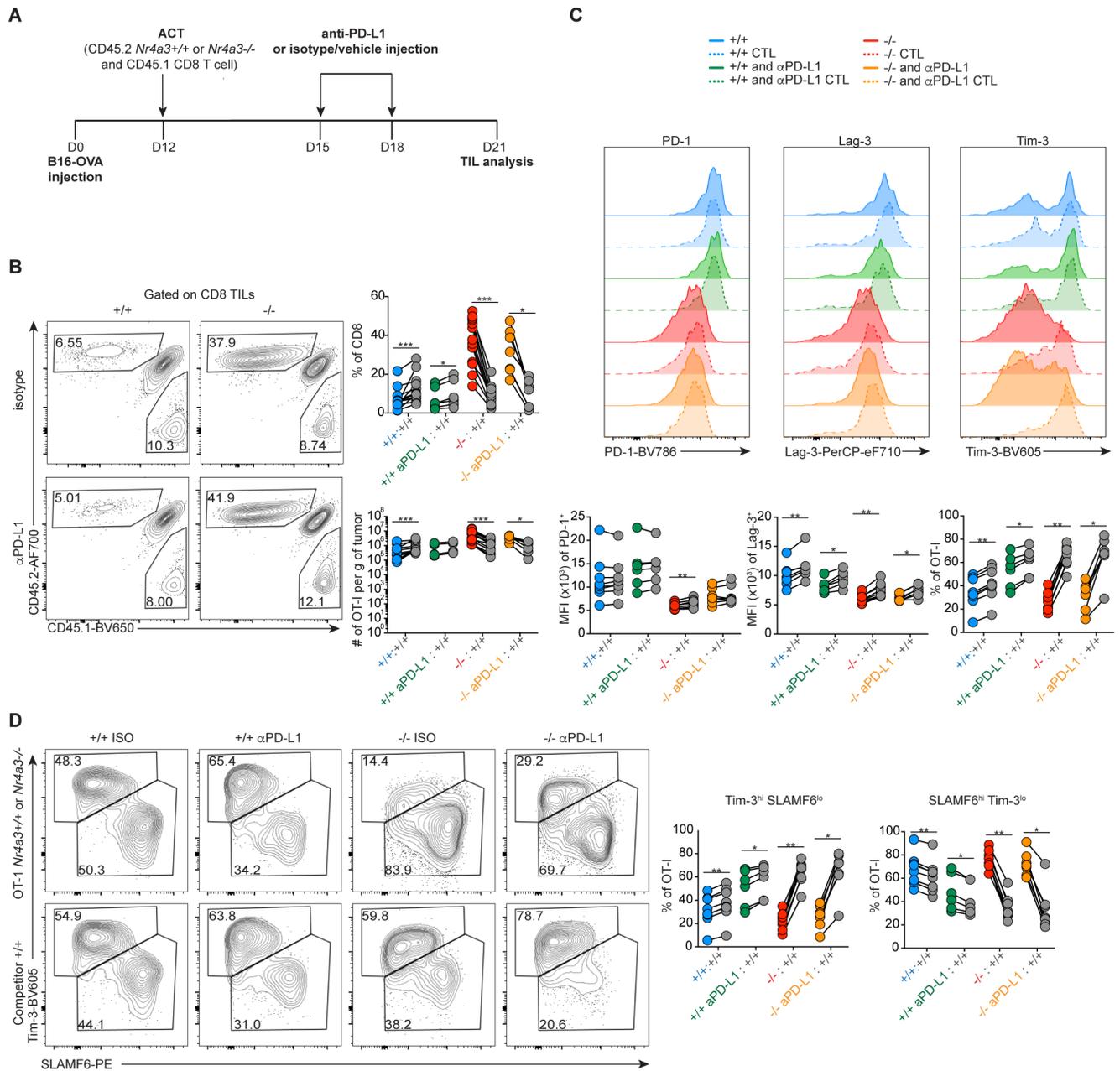


Figure 3. NR4A3 deficient TILs undergo less terminal exhaustion under competitive condition. A. Experimental design for phenotyping OT-I TILs when ACT is done in a competitive setting. At day 21 post-tumor implantation, TILs were isolated for analysis of *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I TILs (CD45.2⁺) and their wild-type competitors OT-I/B6.SJL TILs (CD45.1⁺). **B.** Percentage and number of OT-I TILs. **C.** Inhibitory receptor expression by OT-I TILs. **D.** Proportion of

SLAMF6^{lo}Tim-3^{hi} and SLAMF6^{hi}Tim-3^{lo} OT-I TILs. Wild-type OT-I competitors (+/+) are shown in grey in the compilation and with dotted lines in the flow cytometry profiles. Data are from 1 experiment with 6 to 8 mice per group. Each dot represents one mouse. Paired Student's t-test was used to compare each competitor group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

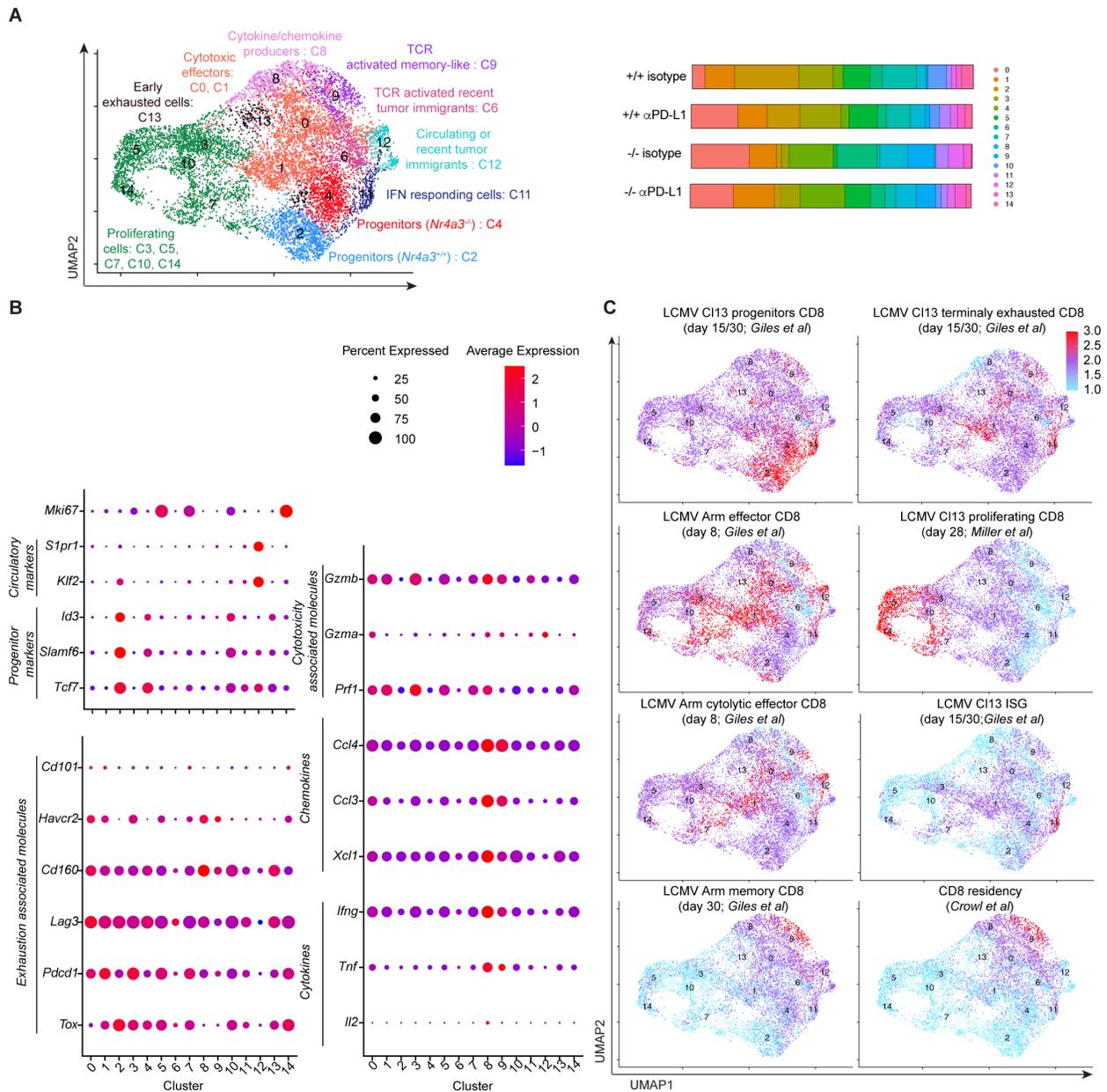


Figure 4. TIL heterogeneity following ACT with effector CD8⁺ T cells. Mice were implanted with B16-OVA melanoma cells and treated 12 days later with *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} *in vitro* generated OT-I effectors. Anti-PD-L1 or isotype control antibody treatment was done on days 15 and 18. At day 21, OT-I TILs were isolated to perform scRNA-seq analysis. **A.** UMAP from scRNA-seq with annotation of functional clusters (left) and *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} TILs distribution among the clusters (right). **B.** Level of expression of selected genes by cluster. **C.** Gene signature

projections of different CD8⁺ T cell subsets on the UMAP. Data are from one scRNA-seq experiment where 3 independent biological samples were pooled for each treatment condition.

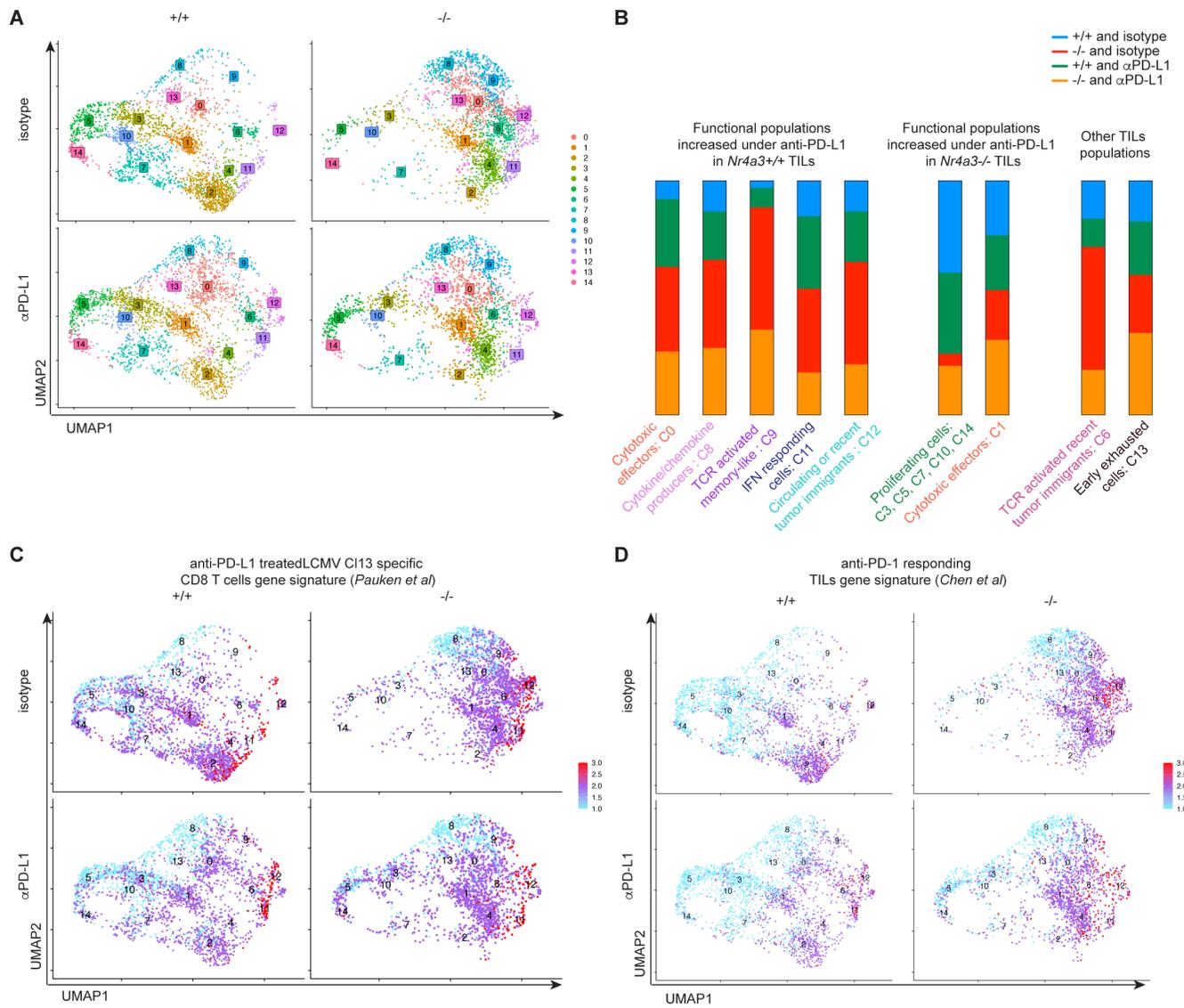
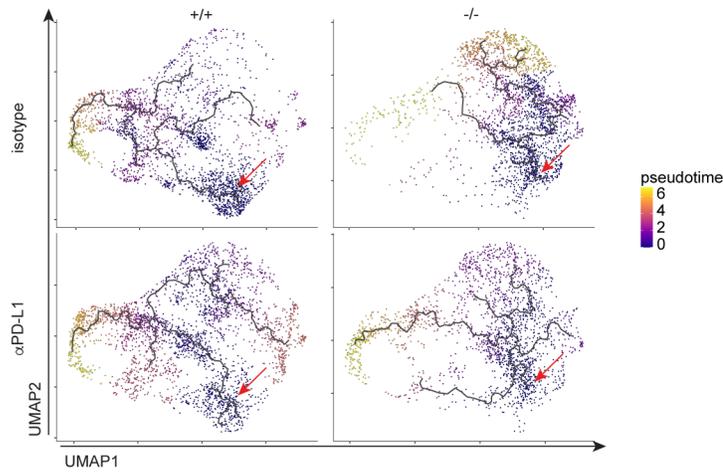
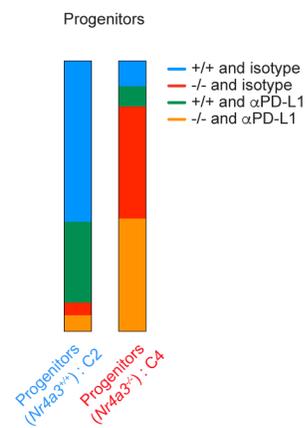


Figure 5. NR4A3 deficiency induces a transcriptional program of anti-PD-L1 responding TILs. **A.** UMAP distribution of the 15 scRNA-seq clusters in function of TILs genotype and treatment conditions. **B.** TILs distribution in functional clusters by treatment condition. **C.** Gene signature projection of anti-PD-L1 treated CD8⁺ T cells on the scRNA-seq UMAP of *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} TILs under the anti-PD-L1 or the isotype control treatment. **D.** Immune checkpoint blockade (ICB) responder gene signature projection on the UMAP of *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} TILs under the anti-PD-L1 or the isotype control treatment.

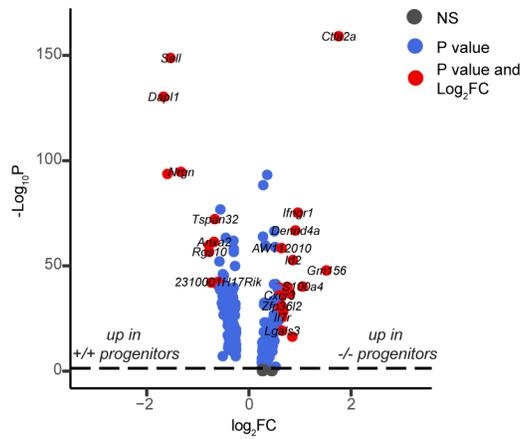
A



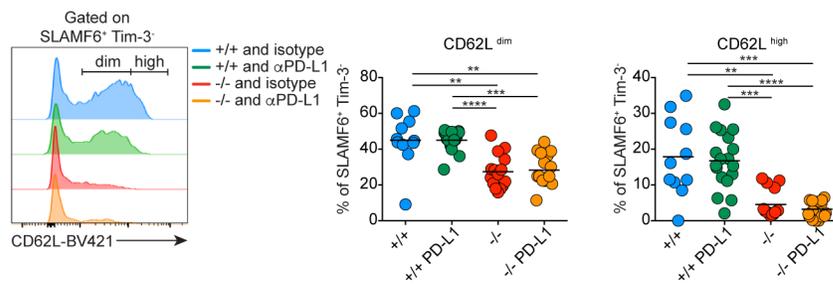
B



C



D



E

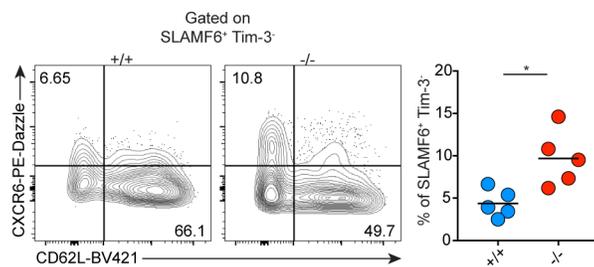


Figure 6. NR4A3-deficiency in CD8⁺ T cells induces the differentiation of distinct progenitor population. **A.** Pseudotime analysis of the differentiation trajectory of *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} TILs under anti-PD-L1 or isotype control treatment. **B.** Progenitor cell distributions in clusters 2 and 4 by treatment condition. **C.** Differentially expressed genes among *Nr4a3*^{-/-} (cluster 4) or *Nr4a3*^{+/+} (cluster 2) progenitors. **D-E.** CD62L (**D**) and CXCR6 (**E**) expression by OT-I by *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} TIL progenitors (SLAMF6^{hi}Tim-3^{lo}). Data are from 3 (**D**) or one (**E**) phenotyping TILs experiment (day 21) where each point represents one mouse.

Table I. scRNA-seq TILs distribution (%) among the 15 clusters.

Cluster	<i>Nr4a3</i> ^{+/+} ISO	<i>Nr4a3</i> ^{+/+} αPD-L1	<i>Nr4a3</i> ^{-/-} ISO	<i>Nr4a3</i> ^{-/-} αPD-L1
0	4,5	16,5	20,7	15,4
1	10,6	10,5	9,6	14,5
2	22,9	11,5	1,8	2,3
3	12,2	14,7	2,7	7,0
4	3,6	2,9	15,8	15,9
5	9,5	10,1	1,3	9,1
6	4,4	3,2	14,2	5,2
7	12,3	8,5	1,1	3,7
8	3,4	5,4	9,8	7,4
9	0,6	1,5	9,6	6,7
10	6,6	3,5	0,5	2,1
11	1,9	3,8	4,4	2,2
12	1,6	2,6	5,3	2,6
13	2,0	2,6	2,8	3,9
14	4,1	2,6	0,3	1,9

Supplementary material

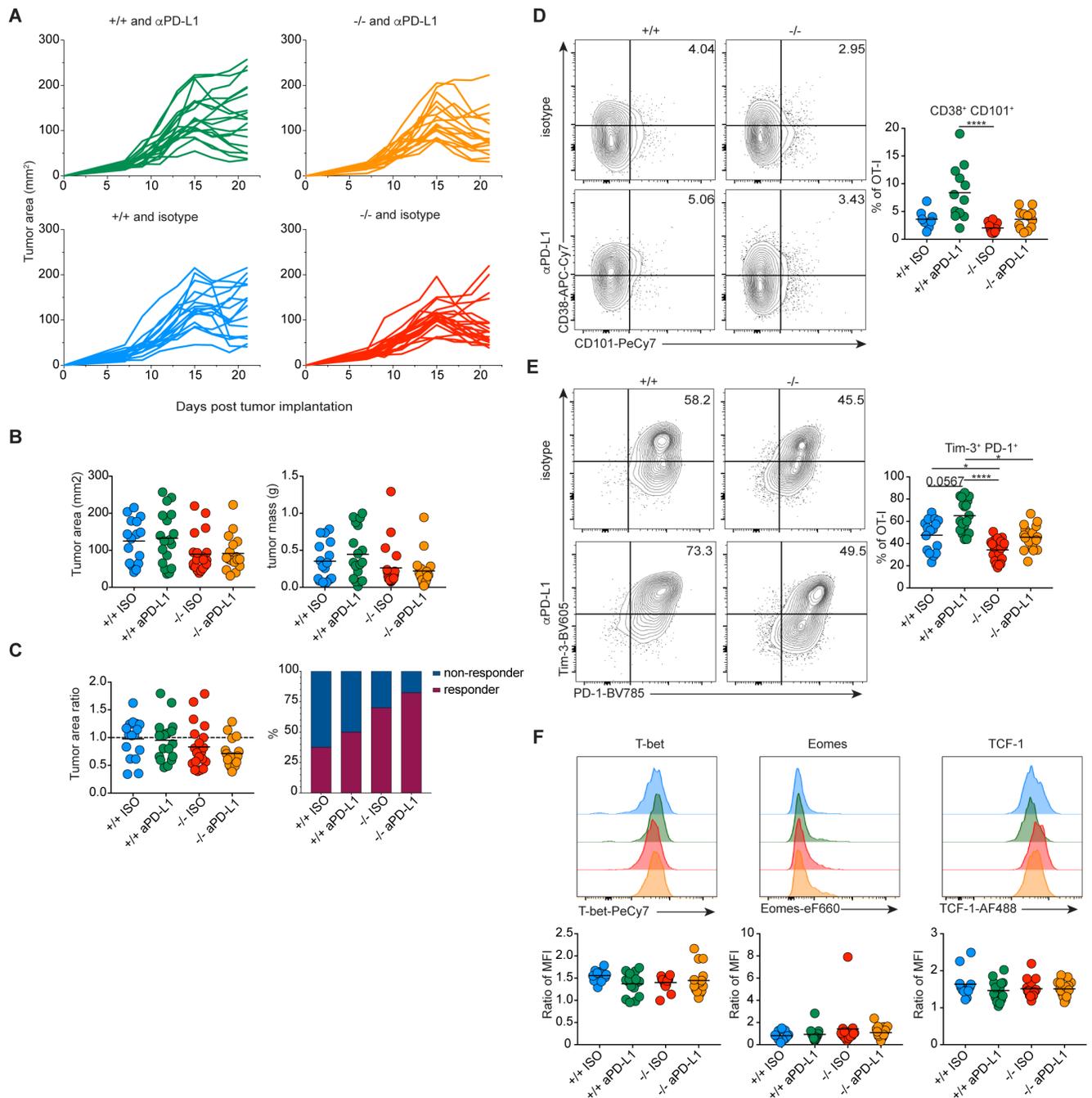


Figure. S1. ACT with NR4A3-deficient CD8⁺ T cells increases tumor control and decreases T cell exhaustion. A. Tumor growth curves of mice implanted with B16-OVA melanoma cells and treated 12 days later with *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} *in vitro* generated OT-I effectors and cotreated on day 15 and 18 with anti-PD-L1 or isotype control (ISO). **B.** Tumor area and tumor mass of tumors

extracted on day 21. **C.** The proportion of mice responding to the therapy was evaluated by the ratio of the tumor area on day 21 compared to the tumor area on day 15. Co-expression of CD38 and CD101 (**D**) or PD-1 and Tim-3 (**E**) by *Nr4a3^{+/+}* or *Nr4a3^{-/-}* OT-I TILs at day 21. **F.** T-bet, Eomes, and TCF-1 expression by *Nr4a3^{+/+}* or *Nr4a3^{-/-}* TILs at day 21. Data are from 3 to 4 independent experiments. Each dot represents one mouse. In the tumor growth curves, each line represents one mouse. Kruskal-Wallis ANOVA with Dunn's multiple comparisons was used for multiple groups comparison: * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

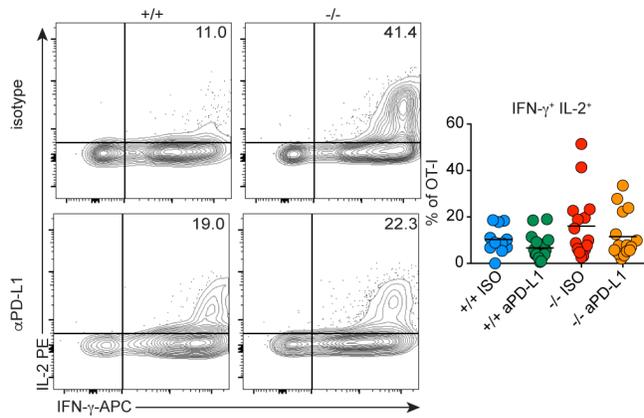


Figure. S2. NR4A3 deficiency does not impact the proportion of IL-2⁺IFN-γ⁺ TILs. Mice were implanted with B16-OVA melanoma cells and treated 12 days later with *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} *in vitro* generated OT-I effectors followed by anti-PD-L1 or isotype control treatment on day 15 and 18. At day 21, tumor cell suspensions were restimulated for 5h with PMA/ionomycin for cytokine production quantification. Proportions of IL-2⁺IFN-γ⁺ producing OT-I TILs. Each dot represents one mouse. Kruskal-Wallis ANOVA with Dunn's multiple comparisons was used for multiple groups comparison.

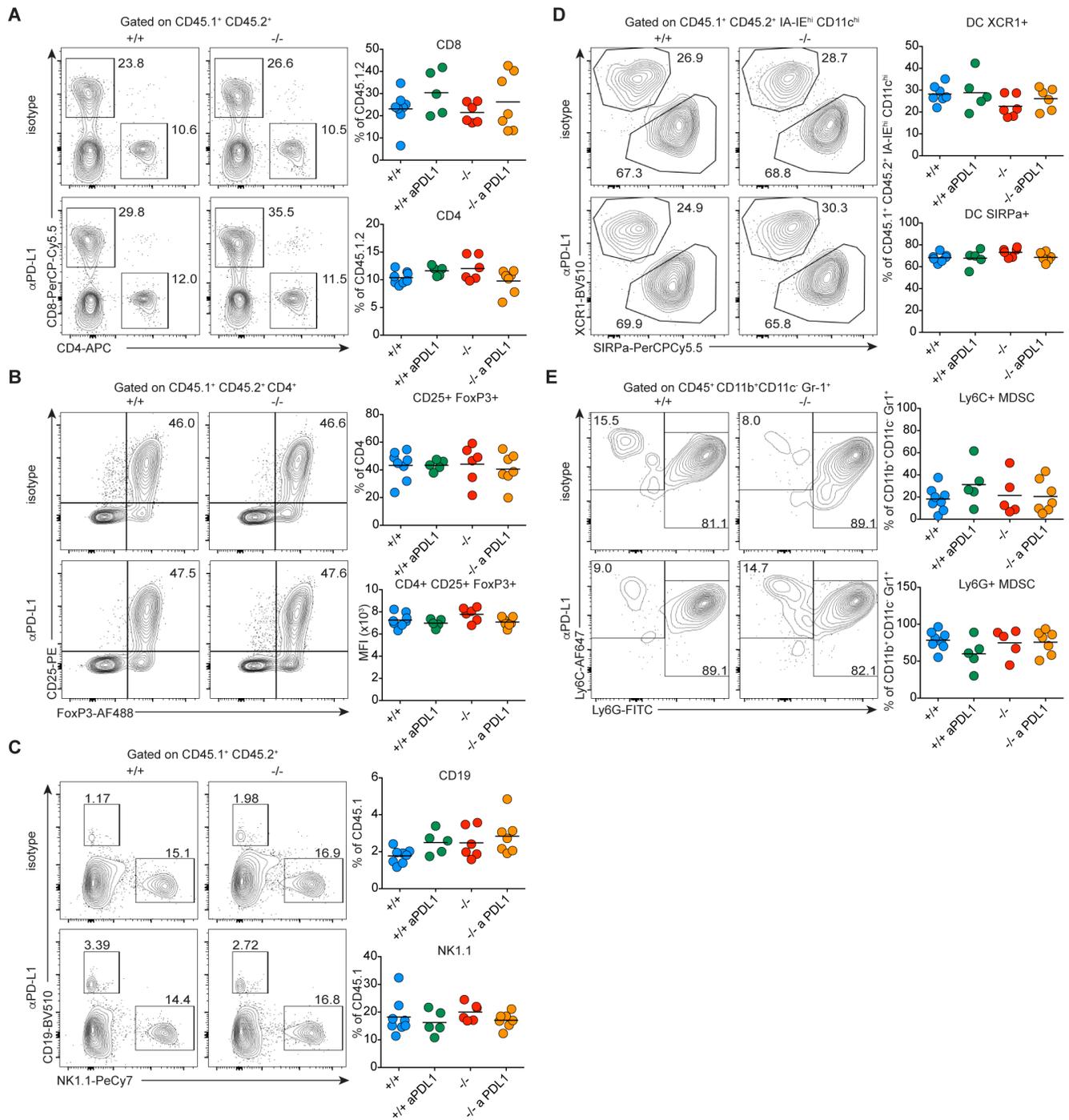


Figure. S3. NR4A3 deficiency does not affect tumor infiltration by other immune cell types.

At day 21 post-tumor implantation, the proportions of endogenous tumor infiltrating of CD8⁺ and CD4⁺ T cells (A), regulatory T cells (B), B and NK cells (C), dendritic cells (DCs) (D), and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) (E) were analyzed by cytometry. Data are from 1

experiment, and each dot represents one mouse. Kruskal-Wallis ANOVA with Dunn's multiple comparisons was used for multiple groups comparison.

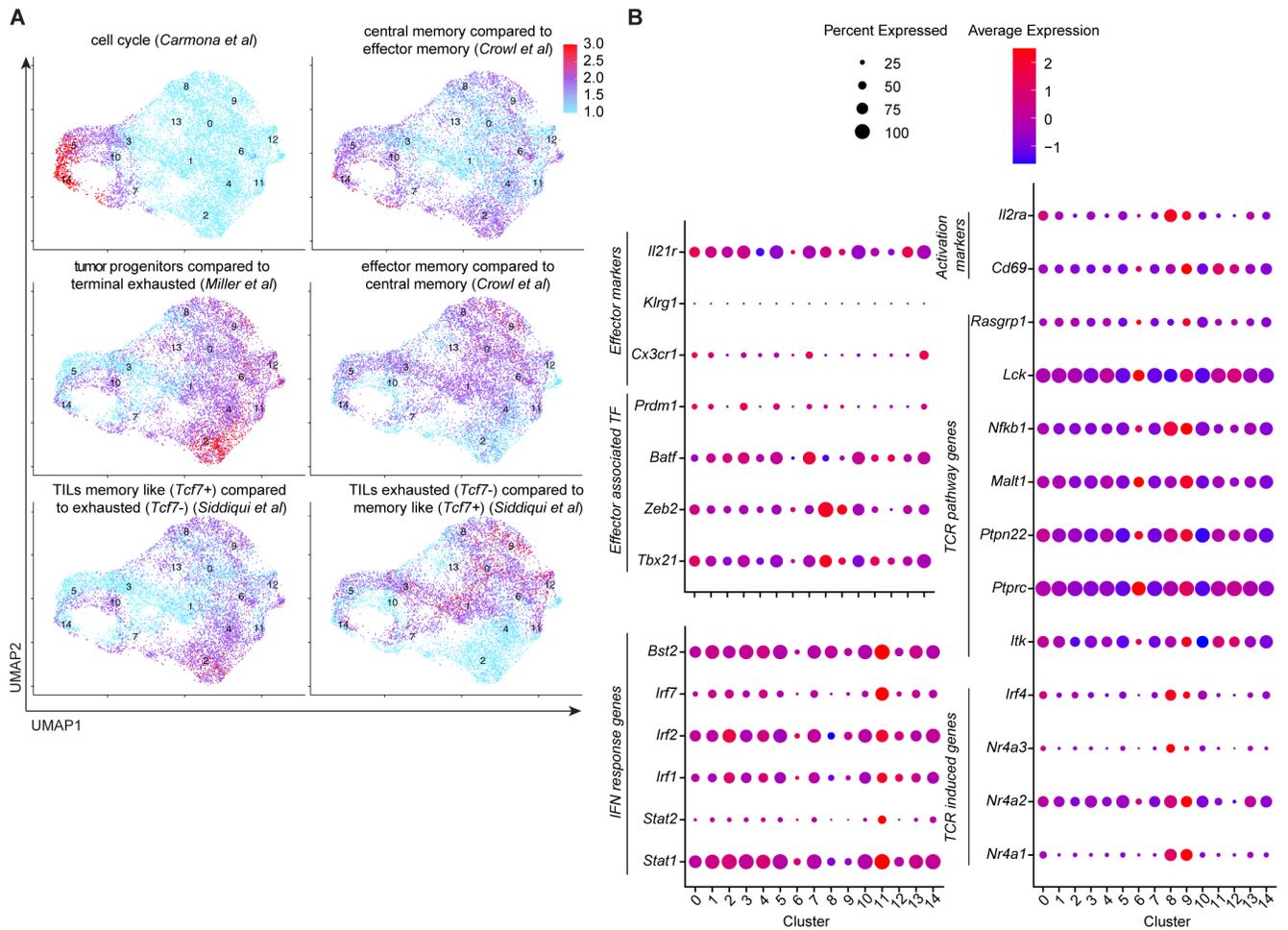


Figure. S4. *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} TILs transcriptional profile under anti-PD-L1 treatment.

Mice were implanted with B16-OVA melanoma cells and treated 12 days later with *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} *in vitro* generated OT-I effectors, as well as with anti-PD-L1 or isotype control on day 15 and 18. At day 21, OT-I TILs were isolated for scRNA-seq analysis. **A.** Gene signature projection of different CD8⁺ T cell subsets on the scRNA-seq UMAP. **B.** Dot plot quantification of selected gene expression by the different scRNA-seq clusters. Data are from one scRNA-seq experiment where 3 independent biological samples were pooled for each treatment condition.

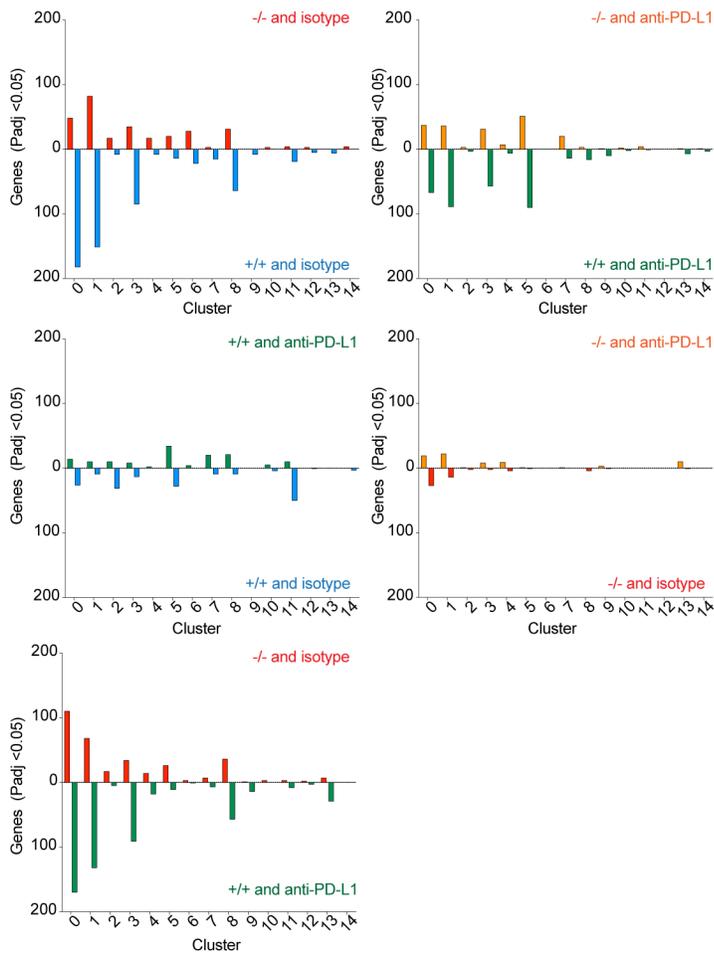


Figure. S5. *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} TILs differentially expressed genes by clusters. Mice were implanted with B16-OVA melanoma cells and 12 days later treated with *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} *in vitro* generated OT-I effectors, as well as with anti-PD-L1 or isotype control on day 15 and 18. At day 21, OT-I TILs were isolated for scRNA-seq analysis. Numbers of differentially expressed genes (*Padj*<0.05) in each cluster in function of the type of treatment (genotype and PD-L1 blockade). Data are from one scRNA-seq experiment where 3 independent biological samples were pooled for each treatment condition.

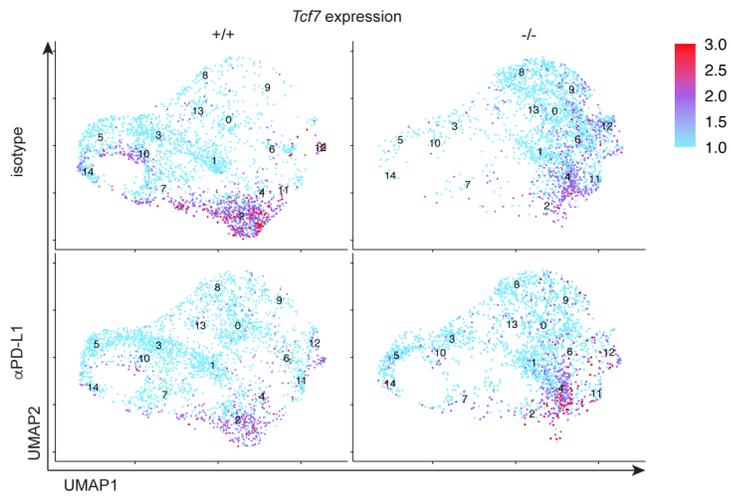


Figure. S6. *Tcf7* expression by *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} OT-I TILs. *Tcf7* gene expression projection on the UMAP of *Nr4a3*^{+/+} or *Nr4a3*^{-/-} TILs under anti-PD-L1 or isotype control treatment. Data are from one scRNA-seq experiment where 3 independent biological samples were pooled for each treatment condition.

Table SI. Antibodies and reagents list

Reagent	Company	Product information
2-mercaptoethanol 1000x (55mM)	Gibco Life Technologies	REF: 21985-023
Brefeldin A	Fisher	AAJ62340MB
Collagenase D	Sigma Life Science	REF: 11088882001
DMEM	CORNING	REF: 10-017-CV
DMEM powder	Sigma Life Science	REF: D2902-10I
DNaseI	Sigma Life Science	REF: D5025-375KU; CAS #9003-98-9
eBioscience FOXP3/Transcription Factor Staining Buffer Set	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	REF: 00-5523-00
EDTA	CORNING	46-034-CI
Fc-block (Anti mCD16/32 Fc Receptor clone 2.4G2)	Leinco Technologies	C381-1.0mg
formaldehyde solution (PFA)	Sigma Aldrich	CAS #50-00-0
G418 sulfate powder	CORNING	CAS#108321-42-2; Potency 716µg/mg
HEPES	CORNING	REF: 25-060-CI
IONOMYCIN CALCIUM SALT	Sigma	I0634-1mg
L-glutamine	CORNING	REF: 25-005-CI
MEM Non-essential amino acids	Gibco Life Technologies	REF: 11140-050
NH4Cl	Bio Basic	CAS #12125-02-9
Nu Serum	Corning	REF: 355104
PBS	Sigma Life Science	REF: P3813-10PAK
Penicillin-Streptomycin	CORNING	REF: 30-002-CI
PHORBOL 12-MYRISTATE 13-ACETATE	Sigma	P8139-5MG
rhIL-2	Novartis	PROLEUKIN® (aldesleukine); DIN 02130181
RPMI 1640	CORNING	REF: 10-040-CV
Saponine	Sigma Life Science	REF: S-7900-100g; CAS #8047-15-2
Sodium azide	Sigma Aldrich	REF: S2002-100G
Sodium pyruvate	CORNING	REF: 25-000-CI
Zombie Aqua	Biolegend	423102
Zombie NIR	Biolegend	423106

Treatment antibody	Company	Product information
anti-mouse anti-PD-L1	BioXcell	clone 10F-9G2; CAT# BE0101
anti-mouse isotype control of anti-PD-L1 (Rat IgG2b)	BioXcell	clone LTF-2; CAT# BE0090
anti-mouse isotype control of anti-PD-L1 (Rat IgG2b)	Leinco	clone 1-2; CAT# I-1034
Stimulation peptide	Company	Product information
OVA peptide (SIINFEKL)	Midwest Biotech	
Staining antibody	Company	Product information
CD101-PeCy7	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	clone Moushi101; cat # 25-1011-80
CD11c-PeCy7	BioLegend	clone N418; cat # 117318
CD19-BV510	BioLegend	clone 6D5; cat # 115545
CD25-PE	BioLegend	clone PC61; cat # 102008
CD38-APC-Cy7	BioLegend	clone 90; cat # 102727
CD4-APC	BioLegend	clone RM4-5; cat # 100516
CD45.2-A700	BioLegend	clone 104; cat #109822
CD62L-BV421 anti-mouse	BioLegend	clone MEL-14; cat #104436
CD8-FITC	BioLegend	clone 53-6.7; cat #100706
CD8-PerCP-Cy5.5	BioLegend	clone 53-6.7; cat #100733
CXCR6-PeDazzle594	BioLegend	clone SA051D1; cat #151116
Eomes-eF660 anti-mouse	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	clone Dan11mag; cat #50-4875-82
FoxP3-AF488	ThermoFisher	clone FJK-16s; cat # 53-5773-82
GranzymeB- PB anti-Hu/Mo	BioLegend	clone GB11; cat #515408
I-A/I-E-AF700	BioLegend	clone M5/114.15.2; cat #107622
IFN-gamma-APC anti-mouse	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	clone XMGI.2; cat #17-7311-82
IL-2-PE anti-mouse	eBioscience	clone JES6-5H4; cat #503808
Isotype of GranzymeB- PB (Rat IgG1 PB)	BioLegend	clone MOPC-21; cat #400151
Isotype of IFN-gamma-APC (Rat IgG1 APC)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	clone eBRG1; cat #17-4301-83
Isotype of IL-2-PE (Rat IgG2b-PE)	eBioscience	clone RTK4530; cat #400608
	BioLegend	

Isotype of TNFalpha-PeCy7 (Rat IgG1 PeCY7)	BioLegend	clone RTK2071; cat #400415
Lag3-Percp-eF710	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific eBioscience	clone C9B7W; cat #46-2231-82
Ly6C-AF647	BioLegend	clone HK1.4; cat # 128037
Ly6G-FITC	BioLegend	clone 1A8; cat # 127606
NK1.1-PeCy7	BioLegend	clone PK136; cat # 108714
PDI- BV785	BioLegend	clone 29F.1A12; cat #135225
Slamf6-PE (Ly108) anti-mouse	BioLegend	clone 330-AJ; cat #134606
Tbet-PeCy7 anti Hu/Mo	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	clone 4B10; cat #25-5825-82
TCF1-AF488 anti-Hu/Mo	Cell Signaling Technologies	clone C63D9 ; cat #6444S
Tim3-BV605	BD Biosciences	clone 5D12/TIM-3; cat #747624
TNFalpha-PeCy7 anti-mouse	BioLegend	clone MP6-XT22; cat #506324
TotalSeqTM-B0302 anti-mouse Hashtag 2 Antibody (GGTCGAGAGCATTCAT)	BioLegend	clones M1/42 and 30-F11; cat # 155833
TotalSeqTM-B0303 anti-mouse Hashtag 3 Antibody (CTTGCCCGCATGTTCAT)	BioLegend	clones M1/42 and 30-F11; cat # 155835
Sirpa-PerCP-Cy5.5	BioLegend	clone P84; cat # 144009
XCRI-BV510	BioLegend	clone ZET; cat # 148218

Cell line	Origin
B16-OVA	DMEM supplemented with 10% FBS (or Nu serum), sodium pyruvate (1mM) in the presence of 5mg/ml G418 (Corning)

Chapitre 4 – Discussion

4.1. NR4A3 est un régulateur précoce de la différenciation des LT CD8 lors d'une réponse immunitaire aiguë

Afin de définir le rôle de NR4A3 dans la différenciation des LT CD8 suite à son induction lors de la stimulation TCR, nous avons principalement utilisé un modèle de transfert adoptif de LT CD8 (OT-I) *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} dans des souris sauvages suivi de leur infection avec un modèle d'infection aiguë *Listeria monocytogenes* exprimant l'antigène OVA (Lm-OVA). Ce modèle d'étude nous a permis d'étudier l'effet de la délétion de NR4A3 spécifiquement dans les LT CD8, où les cellules OT-I ont été activées suite à la reconnaissance de l'antigène OVA (SIINFEKL) présenté par le complexe H2-K^b. La présente étude nous a permis de déterminer que la délétion de l'expression de *Nr4a3* favorise la génération de davantage de MPEC et de LTM ayant un caractère LT_{CM}, ainsi qu'une plus forte production de cytokines par les LT CD8. Nous avons déterminé que NR4A3 régule le programme transcriptionnel ainsi que l'accessibilité à la chromatine d'autres FT lors des phases précoces de la réponse des LT CD8. NR4A3 peut ainsi être identifié en tant que nouveau FT et RN qui régule le choix de différenciation SLEC/MPEC, la différenciation mémoire et la fonction des LT CD8.

4.1.1. NR4A3 régule le choix de différenciation SLEC/MPEC des LT CD8

Afin de définir si NR4A3 joue un rôle dans la différenciation effectrice des LT CD8, nous avons initialement caractérisé leur différenciation SLEC/MPEC au pic de la réponse immunitaire (J7 post infection Lm-OVA). Une fois le phénotype SLEC/MPEC caractérisé et le rôle de NR4A3 dans ce choix de différenciation confirmé, nous avons cherché des mécanismes d'action de ce FT qui pourraient réguler la différenciation des LT CD8. Nous avons principalement étudié les pistes de régulation transcriptionnelle, épigénétique et métabolique.

NR4A3 régule transcriptionnellement la différenciation des LT CD8

Nous avons supposé que la régulation de la différenciation des LT CD8 par NR4A3 est transcriptionnelle, car NR4A3 est connu en tant que RN et FT. Afin de définir si NR4A3 régule l'expression génique des LT CD8, nous avons effectué un séquençage d'ARNm (RNA-seq) des effecteurs générés *in vivo* à J3 post infection Lm-OVA. Le temps d'étude choisi a été défini après le pic de transcription de *Nr4a3* dans les LT CD8 (détecté à 24h post-infection Lm-OVA dans le modèle d'étude utilisé (article 1 : Fig.S5B)) et avant la différenciation de ces cellules en SLEC/MPEC (article 1 : Fig.S5A) afin de déterminer le programme de transcription précoce responsable de la différenciation biaisée en MPEC des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-}.

Cette étude transcriptomique nous a permis de déterminer qu'en absence de NR4A3, il y a une augmentation de l'expression des FT associés avec la différenciation mémoire, notamment *Tcf7*^{395,396}, *Id3*^{271,274}, *Eomes*^{267,397} (article 1 : Fig.4A, Fig.4C). Nous supposons qu'un déséquilibre de l'expression de ces FT clés impliqués dans la différenciation mémoire pourrait favoriser la différenciation des MPEC dans les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} (article 1 : Fig.1A, Fig.1B). Les données du RNA-seq ont été confirmées par RT-qPCR, où les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} expriment plus de *Tcf7*^{395,396} (codant pour TCF-1), d'*Id3*^{271,274} (codant pour ID3) et moins de *Prdm1* (codant pour Blimp-1)^{177,178,271} (article 1 : Fig.S5F). Cette expression a aussi été confirmée au niveau protéique pour *Eomes*^{267,397} et TCF-1^{395,396} (article 1 : Fig.S5E). Cette différence d'expression de FT favorisant la différenciation mémoire est aussi observée plus tardivement à J7 post infection Lm-OVA (article 1 : Fig.4D), ce qui suggère que la différenciation biaisée des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} en précurseurs de cellules mémoires est induite précocement et maintenue au long de leur réponse effectrice (J3-J7). Il n'est pas clair si l'expression d'un seul de ces FT induit la différenciation préférentielle des MPEC, ou si leur effet combiné ou même synergique en est responsable. Par contre, dès J3, les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} expriment un programme transcriptionnel associé avec la différenciation mémoire défini par des signatures géniques GSEA (« gene set enrichment analysis ») (article 1 : Fig.4B), ce qui suggère une dérégulation transcriptionnelle non seulement de quelques gènes associés à la différenciation mémoire, mais de tout un programme transcriptionnel.

NR4A3 régule épigénétiquement la différenciation des LT CD8

La maintenance du programme transcriptionnel associé à la différenciation mémoire des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} du J3 à J7 post-infection Lm-OVA (article 1 : Fig.4A et Fig.4E) soutient la possibilité d'une régulation non seulement transcriptionnelle, mais aussi épigénétique de ces FT en absence de NR4A3. Effectivement, certaines molécules qui ont des fonctions régulatrices sur l'ouverture de la chromatine ou l'accessibilité à l'ADN sont différentiellement exprimées à J3 dans les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} lorsque comparé aux LT CD8 *Nr4a3*^{+/+}, notamment celle de *Tcf7*, *Dnmt3a*, *Tet2* et *Satb1*. TCF-1 (codé par *Tcf7*) a une activité HDAC qui maintient l'identité des LT CD8¹¹². Dnmt3a (codé par *Dnmt3a*) induit la méthylation *de novo* de l'ADN lors des phases précoces d'activation des LT CD8 afin de diminuer l'expression de *Tcf7* et favoriser la différenciation des SLEC¹⁰⁹. Tet2 (codé par *Tet2*) régule la méthylation de l'ADN des LT CD8 afin de favoriser leur différenciation effectrice²²⁴ et participe aussi à la déméthylation du locus d'*Ifng* dans les LT CD8⁸⁵¹. SATB1 (codé par *Satb1*) est connu pour son activité d'organisateur de la chromatine^{852,853} et il réprime l'expression de *Pdcd1* lors de l'activation des LT CD8²²⁵. Ces données suggèrent que NR4A3 pourrait être impliqué dans la régulation de l'accessibilité à l'ADN via une modulation de l'expression de régulateurs de l'accessibilité à la chromatine dès les temps précoces de l'activation des LT CD8.

À 12h post-activation, la chromatine des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} est plus ouverte que sa contrepartie sauvage, ce qui concorde à nos observations d'expression différentielle de modificateurs de la chromatine dans nos données de RNA-seq. La chromatine des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} est enrichie dans les motifs de liaison à l'ADN des FT de la famille bZIP, NFAT et NF-κB, ce qui suggère une activité accrue de ces FT en absence de NR4A3 (article 1 : Fig.5A, Fig.5B). De façon surprenante, les FT bZIP c-Fos et c-Jun, qui forment AP-1, ont été prédits comme étant les régulateurs maîtres du transcriptome des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} à J3 post-infection Lm-OVA. Le rôle précis de c-Fos et c-Jun dans la différenciation SLEC/MPEC n'est pas défini, mais les motifs de liaison à l'ADN des FT bZIP sont enrichis tant dans les SLEC que les MPEC³⁵⁹, ce qui suggère leur activité biologique dans les deux populations. L'importance de ces FT dans les LT CD8 est aussi soulignée par leur capacité à réguler l'activation²¹³ et la production des cytokines par les LT CD8. Sans données précises sur le rôle de AP-1 dans la différenciation SLEC/MPEC, nous pouvons quand même souligner que, lors d'une réponse antitumorale, la surexpression de c-Jun dans des CAR-T augmente la production de cytokines (IL-2, IFN-γ, TNF-α) et diminue l'épuisement des

LT CD8⁵¹⁵, ce qui suggère que ce FT soutient l'activation des LT CD8 tout en limitant leur différenciation terminale, et n'exclut pas un rôle de ce FT dans l'induction de la différenciation MPEC. D'autre part, BACH2, qui est un répresseur de AP-1, peut diminuer la différenciation des LT CD8 en SLEC¹⁰⁶, ce qui suggère un potentiel de soutien de la différenciation effectrice terminale des LT CD8 par AP-1. Dans notre étude, malgré que l'expression de *Bach2* soit augmentée dans les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-}, ce qui concorde avec le profil de différenciation MPEC, la chromatine ouverte de ces cellules est enrichie en motifs de liaison à l'ADN des FT bZIP, dont fait partie AP-1. Ces résultats suggèrent une activité accrue de AP-1 dans les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} et pourraient expliquer la production augmentée de cytokines en absence de NR4A3 (discutée plus bas), et cette activité de AP-1 pourrait être finement régulée par BACH2 afin de favoriser la différenciation des MPEC.

Potentiels gènes cibles de NR4A3

Nous avons défini que NR4A3 régule la différenciation des LT CD8 transcriptionnellement et, afin d'identifier les cibles de ce FT, nous nous sommes tournés vers une étude de l'ouverture de la chromatine (ATAC-seq), une expérience d'immunoprécipitation (ChIP-seq) n'étant pas possible faute d'Ac spécifique pour ce FT. NR4A3 est un gène de réponse immédiate dont l'expression est rapidement induite par la stimulation TCR, et ses motifs de liaison à l'ADN (NBRE) sont rapidement ouverts suite à l'activation des LT CD8, de 2 à 24h post-activation²⁰⁶, ce qui suggère que ce FT agit à ces temps précoces. Nous avons voulu étudier l'ouverture de la chromatine des LT CD8 *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} au pic de l'expression de NR4A3, où son activité serait potentiellement maximale. Afin de déterminer ce pic, nous avons effectué une étude de la cinétique d'induction de cette molécule *in vitro* au niveau du transcrit suite à l'activation des LT CD8 avec une stimulation anti-CD3/anti-CD28 (article 1 : Fig. S6B). En se basant sur ces résultats, nous avons effectué notre expérience d'étude de l'accessibilité de la chromatine 12h suite à l'activation des LT CD8, soit quelques heures après le pic de l'induction de *Nr4a3*, défini entre 8 et 10h post-activation des LT CD8, afin de laisser le temps de traduction de notre protéine.

En nous basant sur les données ATAC-seq, qui ont permis d'obtenir l'identité des gènes ayant des régions de chromatine différenciellement accessibles (DAR) au pic de l'expression de NR4A3, nous avons identifié 27 cibles potentielles de ce FT. Ainsi, parmi les DAR, certains gènes

contiennent des motifs de liaison à l'ADN NBRE monomériques et sont différentiellement exprimés dans le RNA-seq à J3 post-infection Lm-OVA (article 1 : Fig. 5C). Ces gènes pourraient être des cibles directes de NR4A3. Parmi ces 27 molécules (article 1 : Fig. 5C), seuls *Bach2*, *Wscd2* et *Dzip1* sont différentiellement exprimés plus que 1,5 fois. *Bach2* est un FT qui participe au contrôle de l'activation des LT CD8 via une régulation de l'accès des FT AP-1 à la chromatine¹⁰⁶. Ainsi, l'expression accrue de *Bach2* pourrait être responsable de la différenciation biaisée des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-}, mais celle-ci ne concorde pas avec leur production de cytokines plus soutenue, BACH2 inhibant la production de celles-ci¹⁰⁶. Les rôles de *Wscd2* et de *Dzip1* dans les LT CD8 ne sont pas connus, mais l'expression de *Dzip1* est enrichie dans la signature mémoire des LT CD8⁸⁵⁴, ce qui lui suggère un potentiel rôle biologique. Nous avons aussi observé une plus faible expression de *Rbpj*, cible potentielle de NR4A3, qui participe à la signalisation NOTCH et soutient la différenciation SLEC des LT CD8^{275,276}.

Afin de confirmer les potentiels gènes cibles de NR4A3, il sera possible d'effectuer leur surexpression dans des LT CD8 NR4A3-déficients et de déterminer les gènes parmi les 27 potentielles cibles qui présentent une expression inversée comparativement aux données transcriptomiques. Une fois la liste de gènes établie, nous pourrons construire des vecteurs ciblant leur délétion (shRNA) ou leur surexpression (vecteurs rétroviraux) afin de tester si l'inversion de l'expression de ces gènes restaure le phénotype sauvage des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} (évalué par l'augmentation de la différenciation SLEC et la diminution de la production de cytokines à J7 post infection Lm-OVA). L'expérience idéale afin de déterminer les cibles directes de NR4A3 reste toutefois l'immunoprécipitation de la chromatine, qui sera possible dans un système de surexpression de NR4A3 lié à une étiquette moléculaire (voir section 3.1.6).

L'analyse de régulateurs en amont du transcriptome du RNA-seq à J3 post-infection Lm-OVA, tout comme l'ATAC-seq effectué tôt lors de l'activation des LT CD8, prédisent une activité accrue du FT AP-1 dans les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} (article 1 : Fig.5B, Fig.5D), ce qui suggère une nécessité d'étude plus approfondie du mécanisme d'action de NR4A3 et de AP-1. En effet, il a été montré que NR4A1 peut agir en compétition avec AP-1 afin de lier les mêmes cibles d'ADN dans les LT CD4⁷⁸³ et, lors d'une réponse antitumorale, la délétion de tous les membres de la famille NR4A est suivie d'une activité accrue des FT de la famille bZIP⁸¹⁹. Il faut noter qu'*Ets1*, dont l'expression est augmentée dans les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} et qui est une cible potentielle de NR4A3,

est aussi une cible de JunD⁸⁵⁵, membre de la famille bZIP. ETS1 est un FT important pour l'activation et la survie des LT⁸⁵⁶ qui participent au maintien de l'expression de CD127 dans les LT CD8 matures⁸⁵⁷, ce qui concorde avec une plus forte proportion de CD127 dans les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} et soutient la nécessité d'une étude plus approfondie de ce FT.

Puisque NR4A3 est un récepteur nucléaire orphelin qui agit surtout en tant que monomère, nous nous sommes concentrés sur l'étude des motifs de liaison à l'ADN monomériques NBRE. Toutefois, il n'est pas exclu que NR4A3 puisse lier l'ADN sous forme d'homodimères en liant les motifs de liaison à l'ADN NurRE⁸⁵⁸. Ainsi, il sera pertinent d'étudier les motifs NurRE afin de définir s'il existe des gènes ayant des motifs NurRE et une expression différentielle dans notre RNA-seq à J3. Il sera aussi important de déterminer quand et comment NR4A3 agit en tant que monomère ou homodimère dans les LT CD8, et si ses différents types de liaison à l'ADN peuvent représenter une forme de régulation de la transcription génique. Il serait possible que NR4A3 régule la transcription de ses gènes cibles sous forme homodimérique ou monomérique et, en tant que monomère, qu'il agisse comme régulateur de l'activité d'autres FT, par exemple celle d'AP-1 ou de NF-κB, comme déterminé pour NR4A1 dans les LT CD4^{783,787}.

NR4A3 régule la différenciation des LT CD8 via la régulation de leur première division

L'expression rapide de NR4A3 suite au signal TCR suggère un rôle de ce FT dès les premiers instants d'activation du LT CD8. De plus, nous avons observé une expression différentielle de CD25 et de CD62L, dont l'expression à des temps précoces lors de l'activation du LT CD8 par la CPA a été associée à la première division asymétrique des LT CD8 et à leur potentiel de différenciation SLEC/MPEC²³⁵. Ainsi, tôt lors de la réponse immunitaire, les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} expriment moins de CD25 et plus de CD62L (article 1 : Fig.S5G), ce qui prédit leur plus fort potentiel de différenciation mémoire. Or, lors de l'activation, l'interaction du LT CD8 avec la CPA est longue, ce qui pourrait laisser le temps à NR4A3 d'être induit et pourrait alors réguler le transcriptome associé à l'activation précoce des LT CD8. Toutefois, la surexpression de NR4A3 24h post-activation, soit le moment où nous avons effectué la transduction rétrovirale, restaure la différenciation SLEC/MPEC, ce qui ne soutient pas nécessairement l'hypothèse du rôle de ce FT dans la régulation de la première division. De plus, lors d'une expérience scRNA-seq effectuée sur les cellules proximales et distales lors de la première division des LT CD8, il n'y a pas eu de

différences significatives d'expression de *Nr4a3*, ce qui suggère une activité semblable de ce FT dans les deux cellules filles lors de la première division²³⁷.

NR4A3 régule le métabolisme des LT CD8

Il est connu que NR4A3 peut réguler le métabolisme des différents types cellulaires⁸⁴⁸, ce qui pourrait aussi affecter la différenciation des LT CD8. Ainsi, nous avons étudié plus en détail les données transcriptomiques du RNA-seq afin d'étudier les gènes associés au métabolisme des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-}. Nous avons défini une expression augmentée d'*Aqp9*, qui code pour un transporteur de glycérol et dont l'expression est associée à une différenciation mémoire⁴¹⁴. Une plus forte expression d'*Aqp9* pourrait favoriser la différenciation des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} en MPEC, puis en LTM. Dans les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-}, nous avons aussi détecté une diminution de l'expression d'*Eno3*, qui code pour une enzyme glycolytique, et de *Myc*, qui code pour le FT Myc qui régule le métabolisme des LT CD8. Le moindre niveau d'expression de ces molécules est un prédicteur de leur faible activité anabolique et d'une diminution du potentiel de différenciation effectrice terminale^{243,303,859}. Effectivement, nous avons déterminé que, tôt lors de la réponse immunitaire (J3 post-infection Lm-OVA), les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} ont un plus faible état d'activation anabolique, évalué par la phosphorylation de la protéine S6 ribosomale, ainsi que le niveau d'expression de récepteurs de nutriments CD71 et CD98 (annexe 2). L'expression différentielle d'*Aqp9*, d'*Eno3* et de *Myc* pourrait contribuer à la différenciation biaisée en MPEC et ensuite en LTM des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-}. De futures expériences permettront de déterminer si la diminution de l'expression d'*Aqp9* ou l'augmentation de l'expression *Eno3* ou de *Myc* dans les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} inversent leur biais de différenciation. D'ailleurs, NR4A3 est connu pour induire l'expression d'*Eno3* dans les hépatocytes^{679,772}, ce qui soutient la validité de nos données de RNA-seq et soulève la question de la régulation directe d'*Eno3* par NR4A3 dans les LT CD8. Toutefois, dans les cellules leucémiques, NR4A3 est connu pour diminuer la transcription de *Myc*⁸⁶⁰, ce qui suggère une régulation plus complexe de la transcription de ce FT par NR4A3.

NR4A3 régule la capacité de réponse inflammatoire des LT CD8

La différenciation des LT CD8 peut aussi être dirigée par leur capacité à répondre aux signaux inflammatoires. Afin de déterminer si NR4A3 pourrait être impliqué dans ce processus, nous avons étudié les données transcriptomiques du RNA-seq et défini l'expression des récepteurs de cytokines qui pourraient contribuer à la différenciation biaisée des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-}. Ainsi, un plus faible signal via le récepteur à IL-2 (*Il2ra*) dans les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} pourraient diminuer leur différenciation en SLEC^{166,176-178,180}, ce qui résulterait en une diminution de l'expression de *Prdm1*¹⁷⁶ que nous observons dans les données transcriptomiques. Au contraire, la plus forte expression de CD127 (*Il7r*), soutiendrait la différenciation MPEC et LTM des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-}, un des marqueurs qui définissent les MPEC étant CD127^{167,255}. La signalisation à l'IL-21 est connue pour favoriser l'accumulation des LTM CD8^{506,861,862}, et les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} sont enrichis dans l'expression du récepteur de cette interleukine (*Il21r*). La signalisation à l'IL-4 est importante dans l'induction de l'expression d'*Eomes*⁸⁶³. Malgré que la délétion d'*Il4ra* soit associée à une augmentation de la différenciation des MPEC et une diminution des SLEC⁸⁶³, ces cellules génèrent moins de LTM lors d'une infection LCMV⁸⁶³. Ce phénotype ne concorde pas avec nos données ni avec la plus forte expression d'*Il4ra* dans les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-}, mais n'exclut pas la possibilité d'un rôle de l'IL-4 dans l'induction d'*Eomes* par exemple, qui ensuite pourrait soutenir la différenciation mémoire^{267,397}. Pris ensemble, ces résultats suggèrent une capacité différente de réponse aux signaux inflammatoires des LT CD8 en absence de NR4A3. Cette expression différentielle de récepteurs de cytokines pourrait favoriser la différenciation MPEC (plus forte expression d'*Il7r* et d'*Il21r*) ou fournir un moindre signal de différenciation SLEC (moindre expression d'*Il2ra*).

La plus forte production d'IFN- γ soutiendrait la différenciation MPEC

Quelques heures après leur activation, les LT CD8 peuvent produire des cytokines telles que l'IFN- γ ²⁹⁴ et l'IL-2^{170,306}. La plus forte production de cytokines par les LT CD8 NR4A3-déficients (article 1 : Fig.2A) pourrait affecter leur propre différenciation. Cette idée est renforcée par l'exemple d'un autre RN orphelin, NR2F6, qui, lorsque délété, augmente la génération des LTM via une plus forte production d'IFN- γ ⁸⁶⁴. L'IFN- γ peut agir par une voie de signalisation non-canonique via la costimulation des intégrines, qui mène à l'activation de STAT1 et résulte en une diminution de l'expression de CD25¹⁸². Cela favoriserait alors la différenciation mémoire des LT

CD8, puisqu'une signalisation prolongée de CD25 est associée à une plus forte différenciation des SLEC¹⁷⁶. Afin de tester le rôle de l'IFN- γ dans la différenciation des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-}, il serait possible de bloquer celui-ci 24h post-infection afin de déterminer si cela restaure leur phénotype MPEC/SLEC⁸⁶⁴.

La surexpression de NR4A3 renverse le biais de différenciation MPEC des LT CD8

Afin de déterminer si la régulation de la différenciation des LT CD8 par NR4A3 est intrinsèque aux cellules, nous avons effectué une expérience de surexpression de ce FT. Ainsi, nous avons déterminé que le biais de différenciation MPEC des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} est intrinsèque aux cellules (article 1 : Fig.1C). Le modèle d'étude utilisé, où la surexpression de NR4A3 a été effectuée sur des LT CD8 activés 24h *in vitro* puis transférés *in vivo*, suggère que l'expression de NR4A3 24h post-activation est suffisante pour diriger la différenciation effectrice de ces cellules et que cette expression n'est pas requise à des temps plus précoces lors des premières phases d'activation (0 à 24h) (article 1 : Fig.1C). Ainsi, même si l'activité de NR4A3 est prédite d'être à son pic à environ 10-12h post-activation *in vitro* des LT CD8 selon la cinétique de l'expression de l'ARNm (article 1 : Fig.S6B), et 24h suite à une infection Lm-OVA *in vivo* (article 1 : Fig. S5B), cette activité n'est pas essentielle à la différenciation effectrice lors des premières heures d'activation des LT CD8. La différence temporelle entre le pic de l'expression de l'ARNm et la traduction de la protéine ne devraient pas être importants puisque NR4A3 est un gène de réponse immédiate dont l'activité est régulée par l'induction de son expression. Ces résultats suggèrent qu'il sera pertinent d'effectuer des expériences d'études de cibles moléculaires directes de NR4A3 plus tardivement que 24h post-activation, et ce, malgré que son pic d'activité soit prédit à 12h post-activation des LT CD8.

NR4A3 et NR4A1 régulent la différenciation SLEC/MPEC des LT CD8

Nous avons déterminé que la délétion de NR4A3 augmente la différenciation MPEC des LT CD8, ce qui distingue ce FT de NR4A1, dont la délétion augmente la différenciation des SLEC ou n'a pas d'effet sur celle-ci. Ainsi, Nowyhed *et al.*⁸²⁰ ont montré que la déficience en NR4A1 favorise la différenciation SLEC lors d'une infection Lm-OVA des souris *Nr4a1*^{-/-}⁸²⁰. Dans cette

étude, la délétion de NR4A1 permet une dé-répression d'IRF4, ce qui induit une plus forte prolifération et réponse des LT CD8 et leur différenciation préférentielle en SLEC^{252-254,820}. L'étude de Liu *et al.*⁷⁸³ a montré, dans un modèle de TA des LT CD8 P14 *Nr4a1*^{+/-} ou *Nr4a1*^{-/-} suivie d'une infection avec LCMV-Arm, qu'il y a une plus forte réponse des LT CD8 *Nr4a1*^{-/-} sans effet significatif sur la différenciation SLEC/MPEC malgré la plus forte expression de T-bet dans les LT CD8 P14 *Nr4a1*^{-/-} par rapport au contrôle hétérozygote⁷⁸³. Dans notre laboratoire, nous avons aussi comparé la différenciation SLEC/MPEC des LT OT-I *Nr4a1*^{+/-} ou *Nr4a1*^{-/-} suite à un TA dans des souris sauvages et à l'infection Lm-OVA (données non publiées). Tout comme Liu *et al.*⁷⁸³, nous n'avons pas observé d'effet significatif sur la génération des SLEC/MPEC dans les LT CD8 *Nr4a1*^{-/-} lorsque comparé au contrôle hétérozygote. Toutefois, le contrôle utilisé dans notre étude et dans celle de Liu *et al.*⁷⁸³ ne permet pas de comparer la double délétion de *Nr4a1* et une condition sauvage, la délétion d'un seul allèle codant pour NR4A1 pouvant avoir un effet sur la différenciation des LT CD8. Ainsi, nos résultats de l'article 1 ainsi que les études publiées sur le rôle de NR4A1^{783,820} lors d'une réponse immunitaire aiguë suggèrent que ces deux FT pourraient avoir des rôles non-redondants. Il faut noter que, dans notre étude, nous avons déterminé que la déficience en NR4A3 mène à une diminution de l'expression d'IRF4, tant au niveau du transcrit qu'au niveau protéique (données non publiées), et pourtant, l'expression d'IRF4 est augmentée en absence de NR4A1. Ces résultats suggèrent que NR4A3 et NR4A1 agissent de façon différente dans les LT CD8 et dans leur capacité de différenciation des SLEC/MPEC. Le rôle de NR4A2 dans la différenciation de ces cellules n'a pas été encore déterminé.

4.1.2. NR4A3 régule la fonction des LT CD8

NR4A3 régule la fonction de différents types de cellules^{776,792,814,847-849}, nous avons donc évalué l'impact biologique de la délétion de NR4A3 sur la fonction des LT CD8. Nous avons ainsi déterminé que les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} produisent plus d'IL-2, d'IFN- γ et de TNF- α (article 1 : Fig.2A). Cette plus forte production de cytokines n'est pas due à un enrichissement d'un sous-type particulier d'effecteurs (KLRG1⁺ versus KLRG1⁻) dans les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-}, la plus forte production d'IL-2 étant observée dans ces deux sous-populations (article 1 : Fig.S3B). De plus, la régulation de production de cytokines est intrinsèque au niveau des cellules, car la surexpression de NR4A3 dans les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} permet de restaurer leur fonctionnalité au même niveau que

les LT CD8 *Nr4a3*^{+/+} (article 1 : Fig.2B). Par contre, nous avons aussi déterminé que les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} produisent moins de granzyme B que leur contrepartie sauvage (données non publiées). Mis ensemble, ces résultats suggèrent que NR4A3 régule le potentiel effecteur des LT CD8.

NR4A3 régulerait la fonction des LT CD8 via une compétition avec AP-1 pour la liaison de l'ADN

Nous avons défini que les LT CD8 NR4A3-déficients produisent davantage de cytokines, ce qui a aussi été observé par la délétion de l'expression de NR4A1 dans l'étude de Nowyhed *et al.* L'effet de NR4A2 sur la production de cytokines par les LT CD8 n'est pas connu, mais nous savons que NR4A1 et NR4A3 limitent la production d'IFN- γ . Il est probable que les membres de la famille NR4A agissent en tant que régulateurs de la fonction des LT CD8, tout comme NR2F6, qui est un RN orphelin et FT qui agit en tant que point de contrôle immunitaire (« *immune checkpoint* ») et dont l'expression limite la production de cytokines par les LT via une diminution de la liaison à l'ADN des FT NFAT et AP-1⁷¹³. Effectivement, dans les LT CD4, NR4A1 peut compétitionner avec AP-1 pour la liaison directe à l'ADN, ce qui régule la capacité de réponse et la fonction de ces cellules⁷⁸³ et suggère un mécanisme plausible de la régulation de la production de cytokines par NR4A3 dans les LT CD8.

NR4A3 régulerait la fonction des LT CD8 via une régulation de la sensibilité du TCR proximal

Afin de mieux comprendre le mécanisme de production de cytokines par les LT CD8 NR4A3-déficients, nous avons étudié la production de cytokines lors d'une restimulation avec la PMA/ionomycine, et avons perdu la différence de production de cytokines entre les LTE *Nr4a3*^{+/+} et *Nr4a3*^{-/-} (données non publiées). Ce résultat suggère que la production accrue de cytokines par les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} serait probablement due à une signalisation différentielle du TCR proximal, qui est activé lors d'une stimulation antigénique, mais contournée lors d'une stimulation PMA/ionomycine. Effectivement, certaines molécules jouant des rôles dans la transduction de la signalisation du TCR proximal sont différentiellement exprimées à J3 post-infection Lm-OVA (*Lck*, *Grb2*, *Dgka*, *Dgkz*) entre les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} et *Nr4a3*^{+/+}, ce qui pourrait affecter leur

sensibilité à une stimulation antigénique et leur production de cytokines. Toutefois, nous n'avons pas quantifié la forme protéique de ces molécules, dont l'activité est surtout régulée par des modifications post-traductionnelles. Parmi ces gènes, *Dgkz* est une cible potentielle de NR4A3 (article 1 : Fig. 5C). *Dgkz* code pour une isoforme de la diacylglycérol kinase (DGK) impliquée dans le métabolisme du diacylglycérol (DAG). Néanmoins, une activité accrue de cette DGK diminue l'activation de ERK et la production de cytokines^{865,866}, ce qui ne concorde pas avec l'augmentation de l'expression de *Dgkz* ni avec la plus forte production de cytokines par les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-}.

NR4A3 et NR4A1 régulent différemment la fonction des LT CD8

Nous voulons mettre en évidence que NR4A3 et NR4A1 régulent la fonction des LT CD8 de manière distincte. Le groupe de Nowyhed *et al.*⁸²⁰ a montré que la déficience en *Nr4a1* dans les LT CD8 augmente la production d'IFN- γ suite à une stimulation PMA/ionomycine⁸²⁰, ce qui concorde avec la plus forte production de cytokines par les LT CD8 NR4A3-déficients suite à une stimulation antigénique (article 1 : Fig. 2A), mais pas avec la stimulation PMA/ionomycine (données non publiées; discuté plus haut). Aussi, Nowyhed *et al.*⁸²⁰ ont observé une plus forte production de granzyme B par les SLEC⁸²⁰, en opposition à la déficience de NR4A3, qui mène à une diminution de sa production par les LTE (données non publiées). Ces résultats suggèrent que NR4A1 et NR4A3 régulent tous deux la fonction des LT CD8, mais différemment. La déficience en NR4A1 soutient la cytotoxicité des LT CD8, alors que celle en NR4A3 la diminue, et ces deux FT régulent la production d'IFN- γ .

4.1.3. NR4A3 régule la différenciation mémoire des LT CD8

Nous avons déterminé que la délétion de NR4A3 favorise la différenciation des LTM suite à une infection Lm-OVA (article 1 : Fig.1A) et LCMV-OVA (article 1 : Fig.S1B). Cette différenciation mémoire des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} est dirigée par un programme cellulaire intrinsèque, car, lors d'une expérience de compétition des LT CD8 OT-I *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} avec des OT-I B6.SJL *Nr4a3*^{+/+}, la déficience en NR4A3 favorise la différenciation de davantage de LTM (article 1 : Fig.S1B) lorsque comparés à leurs compétiteurs sauvages OT-I B6.SJL. Ainsi, cette

différenciation LTM n'est pas due à un contrôle différentiel du pathogène lors des phases précoces de la réponse immunitaire, qui diminuerait plus rapidement le niveau d'inflammation et favoriserait la différenciation mémoire^{167,257}.

La déficience en NR4A3 favorise la génération de LTM via une plus forte génération de MPEC ainsi que leur meilleure capacité de différenciation en LTM

Un premier paramètre qui peut augmenter la génération de LTM par les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} est la plus forte génération des MPEC au pic de la réponse immunitaire (article 1 : Fig.1B). Afin de tester si la capacité des MPEC *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} à générer des LTM est due seulement à un nombre différent de MPEC au pic de la réponse immunitaire, nous avons comparé la capacité d'un même nombre de MPEC *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} à se différencier en LTM (article 1 : Fig.3A). Nous avons effectué cette expérience en compétition d'un même nombre de MPEC OT-I *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} avec des MPEC OT-I B6.SJL *Nr4a3*^{+/+}. Cette expérience nous a permis de déterminer que le meilleur taux de différenciation LTM des MPEC *Nr4a3*^{-/-} est dû non seulement à leurs proportions et quantités accrues, mais aussi à leurs propriétés intrinsèques qui favoriseraient la différenciation de davantage de LTM (article 1 : Fig.3A). Cette expérience suggère que l'activité transcriptionnelle de NR4A3 régule la différenciation des LTM autant quantitativement (réponse mémoire accrue) que qualitativement (meilleurs MPEC qui génèrent des LTM). Puisque nous n'avons pas caractérisé en détail ces MPEC, il sera pertinent de trier cette population et de la séquencer afin de définir quel programme transcriptionnel est responsable d'une meilleure génération de LTM par les MPEC *Nr4a3*^{-/-} comparé aux *Nr4a3*^{+/+}.

NR4A3 régule le maintien de LTM via la régulation de leur réponse à l'IL-15

Afin de mieux caractériser la différenciation mémoire des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-}, nous avons aussi évalué leur apoptose et leur prolifération, soit des processus connus pour être régulés par NR4A3 dans d'autres types cellulaires^{740,741}. Ainsi, lors de la phase de contraction, nous n'avons pas observé de différences d'apoptose entre les LT CD8 *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} (article 1 : Fig.S4A), ce qui corrèle avec la meilleure génération de LTM à partir de MPEC *Nr4a3*^{-/-} (article 1 : Fig.3A). La plus forte proportion de LTM ne résulte pas non plus d'une différence de proportions de LTM

qui se trouvent dans le cycle cellulaire (Ki67⁺) ou qui sont en train de proliférer (BRDU⁺) (article 1 : Fig.S4E-F). Le meilleur maintien des LTM *Nr4a3*^{-/-} est probablement dû, du moins en partie, à la meilleure capacité de réponse de ces cellules à une stimulation avec l'IL-15, ce qui suggère un avantage de survie de ces cellules lors de la prolifération homéostatique (article 1 : Fig.S4B)^{97,418,419}.

NR4A3 limite la différenciation des LT_{CM} et favoriserait celle des LT_{RM}

Lors de notre étude, nous avons surtout caractérisé la réponse LTM dans les organes lymphoïdes (rate, GL, moelle osseuse) sans définir la réponse de ces cellules dans les tissus où se trouvent les LT_{RM}, notre modèle d'infection Lm-OVA n'étant pas idéal à leur étude. NR4A3 pourrait ainsi participer à la spécialisation des LTM, puisque, en absence de son expression, davantage de LTM sont générés avec un caractère central mémoire (article 1 : Fig.3C-D et Fig.S4C-D). Au contraire, l'expression fortement enrichie de *Nr4a3* dans les T_{RM} suggère son rôle dans la génération de ce type de LTM^{259-261,431}. Nous suggérons alors qu'il sera pertinent de caractériser l'impact de la délétion de l'expression de NR4A3 sur la génération et le maintien des LT_{RM}^{259-261,431}. Par exemple, NR4A3 pourrait réguler l'expression des gènes de résidence ou de recirculation. Effectivement, à J3 post-infection Lm-OVA, nous avons observé une plus forte expression de *Sell*, *Klf2* et *Slpr1*, codant respectivement pour CD62L, KLF2 et S1PR1, qui sont des molécules associées aux LT CD8 en recirculation et qui corrélerent avec une plus forte génération de LT_{CM} (article 1 : Fig.3C, Fig.S4C) par les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-}. Ainsi, lors d'une infection, NR4A3 pourrait diminuer le programme transcriptionnel de recirculation des LTM afin de permettre l'établissement de LT_{RM} dans les tissus. Il serait pertinent de déterminer si NR4A3 pourrait aussi réguler la capacité de différenciation et le maintien des LT_{RM}, par exemple via une régulation transcriptionnelle de FT qui diminuent (*Tcf7*, *Klf2*, *Eomes*, codant pour TCF-1, KLF2, Eomes) ou soutiennent (*Prdm1*, codant pour Blimp-1) la différenciation des LT_{RM}, via des récepteurs de cytokines importantes pour ces cellules (*Tgfb2* et *Il2rb*, codant pour les sous-unités des récepteurs de TGF- β ^{259,403,867} et d'IL-15^{259,403,868}) ou via leur métabolisme (*Fabp5*, codant pour un transporteur de lipides important pour les LT_{RM}⁸⁶⁹).

Mis à part le rôle potentiellement spécifique de NR4A3 sur l'expression de gènes de recirculation, les membres de la famille NR4A pourraient agir en tant que frein de la production de

cytokines par les LT_{RM} et ne permettre leur activation qu'en présence de leur Ag spécifique, limitant leur activation par l'inflammation^{870,871}.

NR4A3 agit à des temps spécifiques et dans des populations distinctes de LT CD8

Nous avons défini que la délétion de NR4A3 dans les LT CD8 naïfs augmente la génération des MPEC et des LTM au cours de la différenciation des LT CD8. Ainsi, au début de la réponse immunitaire, NR4A3 pourrait agir en tant que frein de la différenciation mémoire afin de permettre la génération d'une quantité optimale des LTM qui vont protéger l'organisme contre une réinfection sans excéder les capacités de maintien de ces cellules. Toutefois, il n'est pas connu si la délétion plus tardive de *Nr4a3* pourrait avoir un impact sur cette différenciation des LTM et sur leur maintien. Il sera important de déterminer ce fait en supprimant l'expression de NR4A3 au stade LTE ou LTM des LT CD8 *Nr4a3*^{+/+}. Il faut noter que l'expression du transcrit *Nr4a3* dans les LTE est faible⁶¹, mais est enrichie dans certaines populations de LT_{RM}, notamment dans les LT_{RM} de cellules intraépithéliales des intestins, des reins, des poumons, de la peau et de l'appareil reproducteur féminin^{259-261,431}, ce qui suggère une activité cellule-spécifique de NR4A3 dans les différentes sous-populations de LT CD8.

La déficience en NR4A3 n'affecte pas la capacité de réponse secondaire des LTM

La génération d'une plus forte réponse mémoire suggère un avantage biologique de la délétion de NR4A3 lors d'une réponse immunitaire. Afin de le confirmer, il faut montrer que les LTM ainsi générés sont fonctionnels et capables de répondre lors d'un défi antigénique. Nous avons ainsi testé la fonctionnalité des LTM *Nr4a3*^{-/-} et avons caractérisé que ces cellules sont capables d'effectuer une expansion secondaire et de produire des cytokines, les effecteurs secondaires générés étant plus polyfonctionnels (article 1 : Fig.3E-G). De plus, lors d'un défi antigénique antibactérien, les LTM *Nr4a3*^{-/-} contrôlent la charge bactérienne au même niveau que les WT (article 1 : Fig.S4H), ce qui suggère que ces LTM sont fonctionnels et, lors d'un défi antitumoral (cellules B16-OVA) (article 1 : Fig.4H), l'ACT avec des LTM *Nr4a3*^{-/-} augmente la survie de souris porteuses de tumeurs lorsque comparé avec des souris non-traitées ou traitées avec des LTM *Nr4a3*^{+/+}. Ces résultats suggèrent une programmation à long terme des LT CD8 par

NR4A3 qui permet la génération de LTM fonctionnels capables de mieux éliminer les cellules tumorales lors d'une ACT. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que, lors d'une réponse secondaire, l'induction de NR4A3 suite à la stimulation antigénique puisse réguler le programme transcriptionnel des LTM et diriger la différenciation des LTE secondaires tout comme NR4A3 régule la différenciation des LTE lors d'une réponse primaire. Afin de déterminer le rôle de NR4A3 lors d'une réponse secondaire, il faudra supprimer l'expression de NR4A3 dans les LTM. Toutefois, mis à part la différente capacité de réponse à IL-15 (article 1 : Fig.S4B) et aux défis antigéniques (article 1 : Fig.4H, Fig.S4H-I), nous n'avons pas caractérisé les LTM *Nr4a3*^{+/+} et *Nr4a3*^{-/-} en profondeur, notamment au niveau transcriptionnel et épigénétique. Nous ne pouvons donc pas dire si ces LTM ont des empreintes de différenciation induite lors de la réponse primaire qui sont maintenues lors d'une réponse secondaire, ou alors si c'est lors d'une réponse secondaire que l'absence de NR4A3 induit un biais de différenciation des LTE secondaires en MPEC (article 1 : Fig.S4G), une plus forte expression de CD62L (article 1 : Fig.S4G) et une plus grande polyfonctionnalité (article 1 : Fig.3G). L'effet de cette délétion sur la capacité des LTM à générer des réponses subséquentes à long terme reste aussi à déterminer (réponses tertiaires, quaternaires, etc.)⁸⁷².

NR4A3 et NR4A1 ont des rôles distincts dans la différenciation des LTM

Nous avons montré que la délétion de NR4A3 favorise la différenciation des LTM dans la rate lors d'une infection Lm-OVA, où celle-ci favorise la génération de davantage de LT_{CM} (article 1 : Fig.1A, Fig.3C-D et Fig. S1B), ce qui diffère de l'effet de délétion de NR4A1, qui n'a pas d'impact sur la différenciation des LT_{EM} ou des LT_{CM} dans la rate lors d'une infection avec influenza⁸²³. Ce résultat suggère une non-redondance de ces FT dans la différenciation LTM lors d'une réponse immunitaire aiguë. Par contre, NR4A1 régule la génération des LT_{RM} lors d'une infection avec influenza, où sa délétion diminue le nombre de LT_{RM} dans certains organes (foie, épithélium des intestins, plaques de Peyer)⁸²³. Une étude plus tardive utilisant le scRNA-seq a montré un enrichissement des transcrits *Nr4a1*, *Nr4a2* et *Nr4a3* dans les LT_{RM}, et un rôle particulièrement important de NR4A2 dans la génération des LT_{RM} CD28⁺, le rôle des autres NR4A dans leur différenciation n'ayant pas été étudié²⁶¹. L'importance globale de tous les NR4A dans les LT_{RM} a été montrée par une étude qui prédit ces FT comme étant des régulateurs de leur

différenciation, la délétion individuelle des NR4A par des shRNA menant à une moindre génération de LT_{RM}^{260} . Ainsi, les NR4A, et particulièrement NR4A1 et NR4A2, sont impliqués dans la régulation de la différenciation des LT_{RM} , le rôle de NR4A3 dans leur génération n'étant pas encore bien élucidé, mais son expression enrichie dans ce sous-type de LTM lui suggérant une fonction.

4.1.4. Pertinence du modèle d'étude

Afin d'étudier le rôle de NR4A3 dans la différenciation des LT CD8 lors d'une infection aiguë, nous avons opté pour un système de TA des LT CD8 transgéniques pour l'expression du TCR OT-I spécifiques au peptide OVA (SIINFEKL) présenté dans le H2-K^b. Ainsi le TA d'un type de cellules avec une spécificité connue nous a donné l'avantage de pouvoir les activer spécifiquement dans différents types de réponse immunitaires, soit suite à un modèle d'infection aiguë (Lm-OVA, LCMV-OVA) ou de vaccination (DC-OVA), permettant de tester l'effet de différents milieux inflammatoires sur la différenciation des LT CD8 en absence de l'expression de NR4A3. Ce modèle d'étude nous a ainsi permis de déterminer que ce FT régule la différenciation des LT CD8 tant dans des modèles de vaccination (modèle de faible niveau d'inflammation), que lors des infections bactériennes (Lm-OVA) et virales (LCMV-OVA), où il y a une forte production d'IL-12 et d'IFN-I. De plus, l'utilisation des LT CD8 OT-I lors du TA nous a permis de varier le nombre de précurseurs transférés afin de pouvoir étudier la réponse des LT CD8 à des temps précoces suite à leur activation. Dans le cas d'étude de NR4A3, cela est très important puisque l'expression de ce FT est rapide et transitoire suite à l'activation du LT, suggérant son importance biologique à ces temps précoces. L'utilisation d'un faible nombre de précurseurs d'OT-I nous a permis d'étudier la réponse effectrice et mémoire des LT CD8, ainsi que leur capacité de différenciation SLEC/MPEC ou LT_{CM}/LT_{EM} . En général, les modèles utilisés nous ont permis d'explorer le rôle de NR4A3 tout au long de la différenciation des LT CD8 lors d'une réponse immunitaire aiguë.

4.1.5. Limites dans notre étude

Effet thymique de NR4A3 sur le développement des LT CD8 OT-I

Nous avons basé notre étude sur des LT CD8 OT-I *Nr4a3*^{-/-}, où la délétion de *Nr4a3* est germinale et présente lors du développement thymique des OT-I. Afin de diminuer la possibilité d'un biais de différenciation des LT CD8 OT-I *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} lors du développement thymique, nous avons évalué les différentes sous-populations thymiques des souris OT-I *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} (article 1 : Fig. S2A-D) et n'avons pas détecté de différences dans les populations étudiées. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la délétion de *Nr4a3* dans les LT CD8 lors du développement thymique ait un impact sur leur différenciation. Afin d'exclure cette possibilité, il serait possible de séquencer les différentes populations thymiques afin de comparer leur transcriptome et de définir s'il existe une différence au niveau de l'expression génique. Une autre possibilité serait de supprimer l'expression de *Nr4a3* seulement au stade mature des LT CD8 lorsqu'ils sortent du thymus et se retrouvent dans la périphérie en utilisant le système de délétion génique Cre-Lox et le modèle de souris E8I-Cre (le promoteur E18 de *Cd8a* n'étant exprimé que dans les LT CD8 périphériques)⁸⁷³ ou en utilisant des shRNA ciblant l'expression de *Nr4a3*.

Utilisation d'un modèle de LT CD8 à unique spécificité et affinité (OT-I)

La spécificité et l'affinité uniques du TCR transgénique OT-I pourraient cacher certaines facettes du mode de fonctionnement de NR4A3 dans les LT CD8. Ainsi, le TCR OT-I est connu pour donner un fort signal TCR, ce qui induit une signalisation cellulaire et un programme transcriptionnel distinct comparativement aux clones de LT CD8 dont la signalisation du TCR est faible²⁵³. Le plus fort signal TCR induit un plus important niveau d'IRF-4²⁵³, responsable de l'adaptation de la transcription génique en fonction de la force du signal TCR, qui conjointement avec d'autres FT (Blimp-1, T-bet, etc.), régule la fonction et la différenciation effectrice des LT CD8. Ainsi, en utilisant les OT-I, nous avons limité notre étude à un seul clone de LT CD8, mais son utilisation nous a permis de facilement suivre l'activation précoce des LT CD8, leur réponse effectrice et mémoire ainsi que leur fonction (production de cytokines et granzymes). Une plus

faible affinité du TCR peut diminuer l'intensité de ces paramètres, ce qui risque de diminuer la résolution des résultats entre la condition *Nr4a3* sauvage et déficiente. Ainsi, l'étude d'une population polyclonale aurait pu s'ensuivre avec un phénotype moins fort entre nos deux conditions. Toutefois, les données sur la différenciation SLEC/MPEC d'une réponse polyclonale chez la souris *Nr4a3*^{-/-} ont confirmé les résultats obtenus dans de transfert adoptif (manuscrit 1 : Figure S1F).

Afin d'étudier l'effet de la délétion de *Nr4a3* sur la différenciation des LT CD8 avec des TCR d'autre spécificité et affinité, il serait possible d'utiliser des types de LT CD8 où l'expression de *Nr4a3* serait délétée, comme les P14⁸⁷⁴ et les H-Y⁸⁷⁵, dont la signalisation TCR est moins forte que celles des LT OT-I⁸⁷⁶. Une autre possibilité de changer la spécificité et l'affinité du TCR serait tout simplement d'utiliser un système de délétion génique Cre-Lox et le modèle de souris E8I-Cre (le promoteur EI8 de *Cd8a* n'étant exprimé que dans les LT CD8 périphériques)⁸⁷³ ou en utilisant des shRNA ciblant l'expression de *Nr4a3* à leur stade mature. Afin d'étudier l'effet de l'affinité plus en détail lors des étapes précoces de la réponse immunitaire, où il est nécessaire d'utiliser un grand nombre de précurseurs afin de pouvoir suivre la réponse de LT CD8, il serait possible d'utiliser les mêmes OT-I (*Nr4a3*^{+/+} et *Nr4a3*^{-/-}) en combinaison avec l'infection Lm qui exprime des ligands peptidiques altérés de la protéine OVA²⁴⁶. Ainsi, par exemple, la souche Lm-V4-OVA, qui exprime un de ces peptides altérés, est 700 fois moins efficace à activer les OT-I que la souche de référence (Lm-OVA)²⁴⁶.

Effet périphérique de NR4A3 sur les LT CD8 OT-I matures

Nous avons observé que les souris OT-I *Nr4a3*^{-/-} ont un phénotype spécifique caractérisé par une faible augmentation de la proportion de cellules CD44⁺ (5 à 10%) parmi les LT CD8 OT-I naïfs (article 1 : Fig S2E), ce qui suggère une différence au stade mature de ces cellules. Toutefois, la présence de ces OT-I CD44⁺ n'affecte pas le choix de différenciation SLEC/MPEC, car lorsque nous les avons exclus lors d'un TA en ne triant que des OT-I *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} CD44⁻, cela n'a pas affecté la différenciation SLEC/MPEC lorsque comparé avec les cellules non-triées, où les OT-I CD44⁺ étaient présentes (article 1 : Fig S2F).

Il se peut toutefois que l'absence de NR4A3 dans les LT CD8 naïfs (CD44⁻) puisse affecter le phénotype SLEC/MPEC lors d'une réponse immunitaire. Effectivement, au cours de leur vie, les LT CD8 reçoivent un signal TCR tonique qui pourrait induire une expression transitoire de NR4A3 et causer des différences transcriptionnelles entre les LT CD8 OT-I *Nr4a3*^{-/-} et *Nr4a3*^{+/+}. Effectivement, le RNA-seq des LT CD8 OT-I *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} naïfs a mis en évidence 189 gènes différentiellement exprimés (FC>1,5), ce qui suggère que, même au stade naïf, les LT CD8 *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} sont différents. Toutefois, malgré cette différence au niveau du programme transcriptionnel, la surexpression de NR4A3 peut inverser le biais de différenciation MPEC des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-}, ce qui suggère son action spécifique sur cette différenciation.

Effet compensatoire des NR4A

Une autre limite de notre étude et qu'elle s'est concentrée sur NR4A3 ; or, tous les NR4A sont induits par le même signal (signalisation TCR) et lient le même motif de liaison à l'ADN, ce qui souligne le besoin d'étudier ces FT en comparaison. Ainsi, lorsque comparés côte à côte, la délétion de NR4A3 n'affecte pas le pic de la réponse des LT CD8 (article 1 : Fig. 1A) et ces cellules ont une moindre expression d'IRF4 (données non publiées), tandis que la délétion de NR4A1 augmente fortement la réponse des LT CD8 et induit une plus forte expression d'IRF4⁸²⁰. Il est alors possible qu'il y ait une plus forte activité de NR4A3 en absence de NR4A1, et vice-versa, puisque les deux FT lient les mêmes motifs de liaison à l'ADN et que la délétion d'un de ces FT peut donner accès à l'ADN aux autres NR4A qui lient les NBRE. Afin de le déterminer, il est important de comparer les cibles transcriptionnelles de chaque FT avec une expérience de ChIP-seq afin de définir leurs cibles communes et individuelles.

4.1.6. Modèle d'action de NR4A3 dans les LT CD8 lors d'une réponse immunitaire aiguë

Nous avons déterminé que NR4A3 agit principalement en tant que régulateur du potentiel effecteur et de la différenciation mémoire des LT CD8. NR4A3 régule précocement la transcription des LT CD8 et favorise l'expression d'un programme transcriptionnel associé à la différenciation effectrice (SLEC) tout en limitant la production de cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-2). Il est alors envisageable que, tôt suite à l'activation des LT CD8, l'induction de NR4A3 diminue la transcription de FT associés à la différenciation mémoire (*Tcf7*, *Eomes*, *Id3*), dont *Bach2* (cible potentielle de NR4A3), permettant une plus forte activation des LT CD8 et leur différenciation préférentielle en SLEC. De plus, NR4A3 soutiendrait l'activation anabolique des LT CD8 en augmentant l'expression de l'enzyme glycolytique *Eno3* et des FT *Myc* et *Irf4* tout en diminuant celle d'*Aqp9*, ce qui soutiendrait une plus forte différenciation effectrice de ces cellules. NR4A3 agirait aussi sur la sensibilité des LT C8 aux signaux inflammatoires en régulant l'expression d'*Il2ra*, d'*Il7r*, d'*Il4ra* et d'*Il21r*. Cette régulation transcriptionnelle pourrait avoir lieu via la liaison de NR4A3 à ses gènes cibles pour induire leur expression ou la réprimer. Par exemple, dans le cas de *Tcf7* et d'*Id3*, dont les régions régulatrices contiennent des motifs de liaison à l'ADN NBRE^{206,819}, NR4A3 se lierait à l'ADN de ces gènes afin de recruter le complexe co-inhibiteur CoREST⁸²⁵ et de diminuer leur expression, alors que, dans le cas d'*Eno3* par exemple, NR4A3 induirait son expression directe. Il se peut aussi que la transcription de ces gènes soit régulée par d'autres FT, par exemple AP-1, avec qui NR4A3 agirait en compétition pour la liaison à l'ADN⁷⁸³. De surcroît, l'activité transcriptionnelle de NR4A3 sur des modificateurs de la chromatine (*Dnmt3a*, *Tet2*, *Satb1*) cause une ouverture différentielle de celle-ci et une accessibilité différente aux motifs de liaison à l'ADN des FT de la famille bZIP, dont l'activité seraient finement régulée et potentiellement réprimée par NR4A3 afin de favoriser la différenciation des SLEC en limitant la production de cytokines et le potentiel mémoire des LT CD8.

Lors d'une restimulation antigénique, NR4A3 limiterait la production de cytokines via un mécanisme de régulation transcriptionnelle ou de compétition de liaison à l'ADN avec d'autres FT (AP-1 ou NF- κ B), comme il a été déterminé pour un autre RN, NR2F6, dans les LT CD8⁷¹³ ou pour NR4A1 dans les LT CD4^{783,787}.

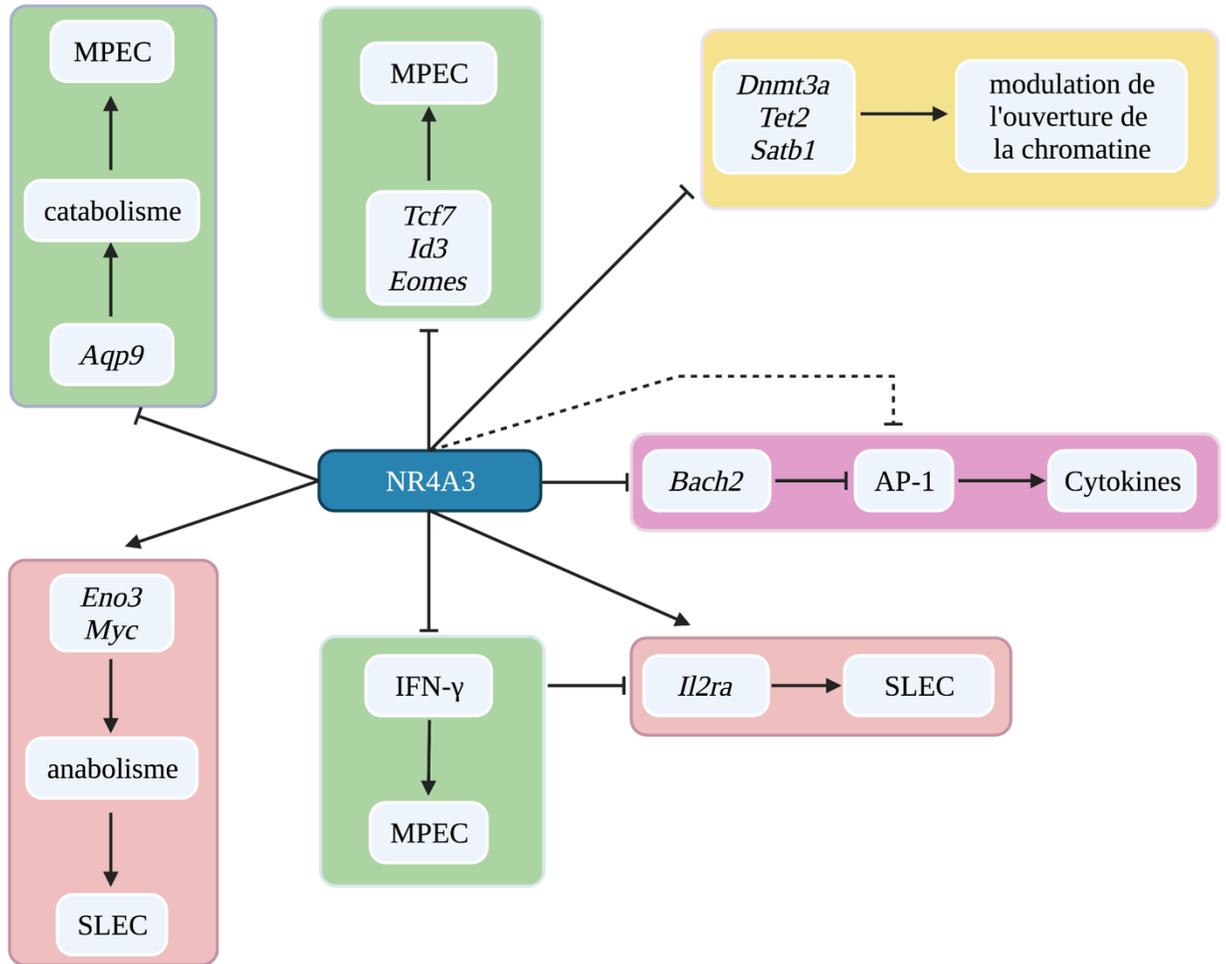


Figure 8. – Schéma de la régulation de la différenciation des LT CD8 par NR4A3 lors d'une réponse immunitaire aiguë.

Lors d'une réponse immunitaire aiguë, NR4A3 diminue l'expression de FT dont l'expression est associée à la différenciation mémoire (*Tcf7*, *Id3*, *Eomes*) ainsi que l'ouverture de la chromatine, potentiellement via la régulation de l'expression de modulateurs de l'accessibilité de l'ADN (*Dnmt3a*, *Tet2*, *Satb1*). NR4A3 agirait aussi sur le métabolisme des LT CD8 en augmentant leur activité anabolique via l'induction de l'expression d'*Eno3* et de *Myc* et en diminuant celle d'*Aqp9*. NR4A3 restreindrait la production de cytokines par les LT CD8 via une compétition de liaison à l'ADN avec AP-1. Ainsi, NR4A3 diminuerait la production d'IFN- γ qui, à son tour, limiterait la différenciation des SLEC via une diminution de l'expression de CD25.

4.1.7. Perspectives

NR4A3 est un régulateur de la différenciation mémoire et de la fonction des LT CD8. Il est alors important de définir les cibles directes et indirectes de ce FT afin de mieux comprendre son mode de fonctionnement. Ensuite, afin de définir le réseau d'activité transcriptionnelle de NR4A3, il sera pertinent de comparer ces cibles avec celles de NR4A1 et de NR4A2 afin de délimiter le mode d'action de ces FT et les comparer avec celles de AP-1 et NF- κ B, qui seraient des compétiteurs de liaison de l'ADN des NR4A lors d'une réponse immunitaire aiguë.

Il n'est pas connu si NR4A3 se lie sur l'ADN seul, comme attendu d'un RN orphelin, ou si celui-ci peut collaborer ou compétitionner avec d'autres FT. Il sera alors pertinent d'effectuer des immunoprécipitations de la chromatine liée par NR4A3 et de séquencer les protéines ainsi immunoprécipitées afin de définir ses partenaires d'interaction. Il sera aussi possible d'effectuer des essais de *supershift* avec les FT de la famille AP-1, NFAT et NF- κ B⁷¹³ afin de déterminer si NR4A3 diminue leur capacité de liaison à l'ADN lors de la régulation de la production de cytokines, et ainsi déterminer le mécanisme de régulation de la fonctionnalité des LT CD8 par NR4A3. Faute de disponibilité d'un Ac spécifique à NR4A3, il est possible d'effectuer une surexpression rétrovirale de NR4A3 marqué avec une étiquette moléculaire (par exemple HA, FLAG, etc.) dans des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-}. Les expériences de Cut&Run ou de Cut&Tag permettent de définir les gènes cibles d'un FT à partir d'un faible nombre de cellules (milliers ou dizaines de milliers de cellules). Il sera ainsi possible de surexprimer NR4A3 couplé à une étiquette moléculaire (HA, FLAG, etc.) dans des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} lors d'une réponse immunitaire, et ensuite de trier ces LT CD8 tôt lors de la réponse des LT CD8 (J3), au pic de leur réponse immunitaire (J7), ou suite à une restimulation antigénique des LTE *ex vivo* afin d'effectuer une expérience de type Cut&Run ou Cut&Tag et d'identifier les gènes cibles de NR4A3 dans les différentes sous-populations de LT CD8 générés lors d'une réponse *in vivo*. Si NR4A3 joue un rôle dans la différenciation des LT_{RM}, ce qui reste à déterminer, mais qui est fortement suggéré par l'étude de Miller *et al.*²⁶⁰, il sera aussi pertinent de déterminer les gènes cibles de NR4A3 dans les LT_{RM}. Dans la même perspective, il sera alors possible d'étudier la redondance ou la non-redondance de NR4A3 avec les autres membres de la famille NR4A lors d'une réponse immunitaire aiguë en étudiant les cibles de NR4A1 et de NR4A2 dans le même système d'étude de cibles transcriptionnelles lors d'une réponse *in vivo* (Cut&Run ou Cut&Tag).

La régulation de la fonction des LT CD8 par NR4A3, directe ou via l'activité d'autres FT, concentre l'intérêt de recherche sur les inhibiteurs ou les inducteurs spécifiques de NR4A3, qui n'ont pas encore été développés. Ainsi, ces molécules modulatrices de l'activité de NR4A3 permettraient, lors d'une infection ou réponse antitumorale, d'augmenter la fonction et la réponse mémoire des LT CD8 et, dans le cas d'une maladie auto-immune, limiterait ces propriétés. La délétion de l'expression de NR4A3 augmente la production de cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-2), alors que sa surexpression dans les LT CD8 *Nr4a3*^{+/+} induisent une tendance de diminution de leur production. Il sera alors pertinent de déterminer si l'induction de l'expression de NR4A3 dans les LTE, à des temps plus tardifs que 24h post-activation, peut diminuer la production de cytokines et réduire le niveau inflammatoire lors de maladies auto-immunes.

La régulation de la génération des LTM par NR4A3 ouvre des opportunités d'inhibition de cette molécule lors d'une vaccination afin de favoriser la génération des LTM ayant un caractère LT_{CM} pour favoriser la protection immunitaire à long terme. Toutefois, il est connu que l'expression de cette molécule est accrue dans les LT_{RM}, où le rôle de NR4A3 n'a pas encore été défini. Si NR4A3 participe à la génération de LT_{RM} ainsi qu'à leur maintien à long terme, il sera pertinent d'envisager la modulation de l'expression de NR4A3 lors de la vaccination topique (par exemple intranasale) afin d'augmenter la quantité de ces cellules au site d'immunisation ciblé.

4.2 Les LT CD8 NR4A3-déficients améliorent la thérapie cellulaire adoptive du cancer

L'augmentation de la génération de LTM et de la production de cytokines par les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} lors d'une réponse immunitaire aiguë (article 1 : Fig.1A et Fig.2A), ainsi que la capacité des LTM *Nr4a3*^{-/-} à mieux contrôler la croissance tumorale (article 1 : Fig.3H), nous ont encouragé à étudier le rôle de NR4A3 dans les LT CD8 lors d'une thérapie cellulaire adoptive antitumorale. Alors que nous débutions notre étude décrite dans l'article 2, Chen *et al.*⁸¹⁹ ont montré que la délétion de tous les membres de la famille NR4A est nécessaire pour augmenter le contrôle tumoral lors d'une ACT avec des CAR-T⁸¹⁹. Par contre, Liu *et al.*⁷⁸³ ont montré en même temps que la délétion de seulement *Nr4a1* est suffisante afin d'améliorer cette ACT par les LT CD8 et, plus récemment, Jung *et al.*⁸²⁴ ont montré que la délétion de *Nr4a3* dans les CAR-T humains améliore leur fonction⁸²⁴, sans toutefois affecter leur épuisement. Les données sur l'épuisement de Jung *et al.*⁸²⁴ sont à l'encontre des autres publications sur les NR4A, où l'activité et l'expression de ces FT sont corrélées à l'épuisement des LT CD8^{514,516,528,783,819}. Ces résultats soulèvent la nécessité d'une meilleure compréhension du mode de fonctionnement des NR4A, et tout particulièrement celui de NR4A3.

Nos principaux résultats de l'article 2 peuvent être résumés par l'amélioration de la survie de souris porteuses de tumeurs B16-OVA suite à l'ACT avec des LT OT-I *Nr4a3*^{-/-}, tant en ACT simple que combinée avec l'anti-PD-L1. Aussi, nous avons observé de plus fortes proportions et nombres cellulaires de TIL *Nr4a3*^{-/-}, et ces TIL sont moins épuisés et plus polyfonctionnels que les TIL *Nr4a3*^{+/+}. Le séquençage d'ARNm au niveau de cellules uniques (scRNA-seq) des TIL *Nr4a3*^{-/-} a révélé un profil transcriptomique distinct très semblable à celui des LT CD8 *Nr4a3*^{+/+} sous traitement d'anti-PD-L1. Le scRNA-seq nous a permis d'identifier les progéniteurs *Nr4a3*^{+/+} et *Nr4a3*^{-/-} en tant que populations distinctes et de définir les populations fonctionnelles enrichies suite au traitement anti-PD-L1 et dans les TIL *Nr4a3*^{-/-}. Ces populations fonctionnelles pourraient être responsables du meilleur contrôle tumoral lors de la délétion de NR4A3 ou du traitement anti-PD-L1. Ainsi, nos résultats de l'article 2 ont mis en avant le rôle de NR4A3, lors d'une ACT sous traitement anti-PD-L1, en tant que régulateur de l'épuisement et de la fonction de ces cellules.

4.2.1. La déficience des LT CD8 en NR4A3 augmente le contrôle tumoral

L'ACT antitumorale est un type de traitement dont l'efficacité est limitée par l'épuisement et la faible persistance des cellules thérapeutiques. Les résultats de l'article 1, où la délétion de NR4A3 améliore la production de cytokines et la génération de LTM, nous ont encouragé à étudier la différenciation des LT CD8 lors d'une réponse antitumorale au cours d'une ACT que nous avons combinée avec un traitement anti-PD-L1^{475,783}.

Afin de déterminer si la délétion de NR4A3 apporte des avantages thérapeutiques lors d'une ACT avec ou sans traitement d'anti-PD-L1, nous avons comparé les courbes de survie de souris sauvages porteuses de tumeurs B16-OVA qui ont été traitées avec des LTE *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} activés *in vitro*. Ainsi, nous avons déterminé que l'ACT avec des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} améliore la survie de souris traitées tant en ACT simple que combinée avec l'anti-PD-L1 (article 2 : Fig.1B). Ce résultat constitue une première évidence que le ciblage concomitant de NR4A3 et de l'axe PD-1/PD-L1 améliorent l'effet thérapeutique d'une ACT (article 2 : Fig.1B). En se basant sur ces observations, les questions subséquentes de notre étude de l'article 2 ont été axées sur la compréhension de la délétion de ce FT sur l'amélioration du contrôle tumoral.

La déficience en NR4A3 améliorerait le contrôle tumoral par les LT CD8 via une augmentation de leur fréquence et nombres intra-tumoraux

Un paramètre important dans le contrôle tumoral d'une tumeur solide par les LT CD8 lors d'une ACT est la capacité des cellules thérapeutiques à infiltrer la tumeur, ce qui permet d'établir et de maintenir la réponse antitumorale *in situ*. Dans le cas de l'ACT avec des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-}, nous avons observé des proportions et des nombres cellulaires accrus des TIL *Nr4a3*^{-/-} lorsque comparé avec leur contrôle sauvage (article 2 : Fig.1D), ce qui pourrait contribuer à un meilleur contrôle tumoral.

L'augmentation des proportions et nombres cellulaires des TIL thérapeutiques peut être le résultat d'une meilleure infiltration de ces cellules au sein de la tumeur ou de leur meilleur approvisionnement à partir des progéniteurs activés dans le GL drainant la tumeur. Aussi, ces cellules pourraient avoir de meilleures capacités de prolifération, de persistance ou de survie intratumorale. Afin d'évaluer ce qui cause l'augmentation de la fréquence et des nombres cellulaires intra-tumoraux des TIL *Nr4a3*^{-/-}, il sera possible d'effectuer une étude sur la capacité

d'infiltration tumorale des LTE *Nr4a3^{+/+}* ou *Nr4a3^{-/-}*, leur capacité de prolifération intratumorale ainsi que leur maintien et survie à long terme. La capacité d'infiltration tumorale pourrait être évaluée lors d'une expérience de compétition entre les LTE OT-I (CD45.2) *Nr4a3^{+/+}* ou *Nr4a3^{-/-}* avec des LT CD8 OT-I B6.SJL (CD45.1), où un mélange de ces LTE sera injecté dans des souris F1 de C57BL6 x B6.SJL (CD45.1 CD45.2) porteuses de tumeurs, et l'infiltration des LTE injectés sera évaluée rapidement après leur transfert adoptif. Afin de distinguer les cellules de la circulation sanguine de celles infiltrant les tumeurs, il sera possible d'injecter un anticorps fluorescent (anti-CD8 β), comme dans le cas d'une étude de LT_{RM}⁸⁷⁷. Toutefois, nous ne pensons pas que les LT CD8 *Nr4a3^{-/-}* auraient des meilleures capacités prolifératives que leur contrepartie sauvage, car l'expérience de scRNA-seq a montré un plus faible enrichissement de la signature génique associée avec la prolifération cellulaire dans les TIL *Nr4a3^{-/-}* lorsque comparé avec la condition sauvage. Par contre, l'expérience de scRNA-seq a été effectuée à un seul temps, sur des TIL du J21, alors que la différence en prolifération aurait pu avoir lieu à des temps plus précoces, lors des premiers jours post-ACT, ce qui devrait être vérifié. La prolifération des TIL *Nr4a3^{+/+}* ou *Nr4a3^{-/-}* pourrait être évaluée par un marquage avec un réactif de type CTV (Cell Trace Violet®). Ainsi, avant leur TA, les LTE pourraient être marqués au CTV et la dilution de ce colorant cellulaire pourrait être suivie dans le temps. Pour ce qui est de la capacité d'infiltration tumorale, celle-ci pourrait être plus forte pour les TIL *Nr4a3^{-/-}*, car ces cellules expriment un plus fort niveau de CXCR3 (données non publiées), dont l'expression sur les LT CD8 améliore la capacité d'infiltration tumorale des tumeurs B16^{878,879}. L'apport fonctionnel de l'expression de CXCR3 par les TIL *Nr4a3^{-/-}* devrait être testé avec des Ac bloquant ce récepteur. Il serait aussi possible d'étudier l'importance de l'infiltration tumorale en éliminant cette étape du traitement ACT, soit en traitant les souris porteuses de tumeurs par une injection intratumorale des LTE *Nr4a3^{+/+}* ou *Nr4a3^{-/-}*, ce qui élimine la nécessité de recrutement de ces cellules dans la tumeur. Une autre façon d'étudier l'apport des LT CD8 à partir des GL serait de traiter des souris porteuses de tumeur avec le réactif FTY720⁸⁸⁰⁻⁸⁸² ou le siponimod (plus forte spécificité aux LT)⁸⁸³ qui empêchent la sortie des LT des GL et limitent ainsi l'apport de nouveaux LT immigrants dans la tumeur.

Pour conclure, les fréquences et nombres cellulaires plus importants des TIL *Nr4a3^{-/-}* suggèrent un meilleur potentiel antitumoral de ces cellules, et il est important de disséquer l'origine de cette présence intra-tumorale bonifiée des LT CD8 *Nr4a3^{-/-}* afin de bien comprendre comment ce FT régule la réponse antitumorale des LT CD8.

La déficience en NR4A3 augmenterait le contrôle tumoral via une diminution de l'expression de PD-1

Une des hypothèses du meilleur contrôle tumoral par les LT CD8 NR4A3-déficients serait que les membres de la famille NR4A régulent la transcription génique de *Pdcd1*⁸¹⁹, qui code pour PD-1. PD-1 est un RI dont l'expression est rapidement induite sur les LT CD8 épuisés^{884,885}, et la régulation de son expression pourrait contribuer au meilleur contrôle tumoral. Effectivement, nous avons observé un plus faible niveau d'expression de PD-1 sur les TIL *Nr4a3*^{-/-} lorsque comparé aux TIL *Nr4a3*^{+/+} sous anti-PD-L1 (article 2 : Fig.1E). Toutefois, il n'est pas clair si cette diminution du niveau d'expression de PD-1 est suffisante afin de soutenir l'avantage de survie induit par la délétion de *Nr4a3* dans les LT CD8 (article 2 : Fig.1B). Ainsi, si l'augmentation du contrôle tumoral est seulement due à la régulation de l'expression du gène codant pour PD-1 par NR4A3, l'ACT avec des LT CD8 OT-I *Nr4a3*^{+/+} en combinaison avec des Ac bloquants l'axe PD-1/PD-L1 auraient dû avoir le même effet qu'une ACT avec des LT CD8 OT-I *Nr4a3*^{-/-} (article 2 : Fig.1B). Toutefois, la survie de souris traitées avec des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} est meilleure que celle de souris traitées avec des LT CD8 *Nr4a3*^{+/+} en combinaison avec l'anti-PD-L1, et l'ajout d'anti-PD-L1 a un effet additif sur la survie de ces souris (article 2 : Fig.1B). Ces résultats suggèrent que l'effet thérapeutique de la délétion de *Nr4a3* lors d'une ACT n'est pas seulement dû à la régulation de l'expression de PD-1 par NR4A3, mais que d'autres facteurs pourraient être impliqués. Il est connu que l'efficacité du traitement anti-PD-L1 est aussi dépendante de l'expression de PD-L1 par les LT CD8⁶¹¹. Toutefois, le niveau d'expression de ce ligand de RI ne diffère pas entre les TIL *Nr4a3*^{+/+} et *Nr4a3*^{-/-} à jour 21 (annexe 4), ce qui suggère que le traitement anti-PD-L1 aurait le même effet sur ces deux types de LT CD8. Par contre, l'expression de PD-L1 pourrait différer aux jours de traitements avec les Ac anti-PD-L1 (J15 et J18), ce qui reste encore à déterminer afin d'élucider si l'expression de ce ligand pourrait contribuer au meilleur contrôle tumoral des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} lors du traitement anti-PD-L1.

Parmi les facteurs qui pourraient augmenter le contrôle tumoral lors de l'ACT sous traitement d'anti-PD-L1, il y a les autres cellules immunitaires qui infiltrent la tumeur. Toutefois, les proportions de ces cellules ne sont pas nécessairement affectées lors de nos différents traitements (article 2 : Fig.S3A-E) ; notamment, nous observons les mêmes proportions de LT CD8 endogènes, de LT CD4, de Treg et leur potentiel immunosuppresseur (évaluée par l'intensité

d'expression de FoxP3), de LB (CD19⁺), de NK, de DC et de MDSC. Ainsi, l'absence de différence dans l'infiltration d'autres populations de cellules immunitaires suggère que le contrôle tumoral devrait être majoritairement dû aux LTE thérapeutiques. Toutefois, le potentiel fonctionnel des ces populations immunitaires, notamment leur potentiel effecteur (LT CD8, LT CD4, LB, NK, DC) ou immunosuppresseur (Treg, MDSC) n'a pas été évalué, ce qui ne nous permet pas de conclure sur leur apport au contrôle tumoral. Afin de l'évaluer, il faut effectuer leur analyse fonctionnelle et potentiellement leur profilage transcriptomique afin de prédire leur contribution au contrôle tumoral. Effectivement, l'analyse de scRNA-seq a révélé que les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} ont une plus forte proportion de TIL producteurs de cytokines et de chimiokines (groupe C8 (article 2 : Fig.5B)), ce qui prédit un plus grand potentiel inflammatoire de ces cellules. Par exemple, les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} produisent plus de *Xcl1* (groupe C8 (article 2 : Fig.5B)), participant au recrutement des DC XCR1⁺ qui, à leur tour, contribuent à l'activation des LT CD8^{507,886}. Toutefois, le mécanisme de cette production accrue de *Xcl1* ou d'autres molécules solubles qui contribue aux interactions entre les LT avec les DC doit être établi lors d'expériences de microscopie⁸⁸⁷.

La déficience en NR4A3 augmenterait le contrôle tumoral via une diminution de l'épuisement terminal des TIL

La participation de NR4A3 à l'épuisement des LT CD8 a été suggéré par plusieurs études. Notamment, il a été montré qu'une forme mutée de NFAT qui ne lie pas AP-1 (CA-RIT-NFAT1) induit l'épuisement des LT CD8 et mène à un plus fort niveau d'expression de *Nr4a3*⁵¹⁶. De plus, la chromatine ouverte des TIL spécifiques aux Ag tumoraux est enrichie en motifs de liaison à l'ADN liés par NBRE, NFAT, NFAT:AP-1 et AP-1, parmi lesquels une grande partie des motifs de liaison NBRE et NFAT sont associés à l'épuisement des LT⁵¹⁴. Dans l'article 1, nous avons montré que, lors d'une réponse immunitaire aiguë, la chromatine ouverte des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} est enrichie en motifs de liaison à l'ADN de la famille bZIP, dont AP-1 (article 1 : Fig. 5B), le même enrichissement étant observé dans les TIL TKO (*Nr4a1*^{-/-}, *Nr4a2*^{-/-}, *Nr4a3*^{-/-}) dans l'étude de Chen *et al.*⁸¹⁹. De plus, il a été suggéré que les FT NR4A et Tox soutiennent l'induction de l'épuisement des LT CD8⁵²⁸. Ainsi, toutes ces études suggèrent un rôle fonctionnel de NR4A3 dans l'épuisement des LT CD8. Nous avons effectivement déterminé que la délétion de NR4A3 diminue l'expression de PD-1 et de Tim-3 (article 2 : Fig.1E), un moindre niveau d'expression de PD-1 étant attendu⁸¹⁹

(voir discussion ci-haut). Toutefois, la moindre proportion de cellules Tim-3⁺ est intrigante (article 2 : Fig.1E-F), mais concorde avec les résultats publiés de CAR-T TKO qui, lors d'une réponse antitumorale, ont en proportion moins de cellules Tim-3⁺⁸¹⁹. De surcroît, les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} expriment moins de *Havcr2* (codant pour Tim-3) lors d'une réponse immunitaire aiguë (article 1 : Fig.4A). Mis ensemble, ces résultats suggèrent que les NR4A pourraient participer à la régulation du gène codant pour Tim-3, et que la délétion de seulement NR4A3 est suffisante pour diminuer l'expression de ce RI (article 2 : Fig.1E). Ce fait est particulièrement intéressant, car l'expression de Tim-3 caractérise les LT CD8 au niveau d'épuisement terminal et soulève l'importance des NR4A dans l'induction de cet état de différenciation. Une expérience de ChIP-seq ou de Cut&Run sur des TIL NR4A3-déficients surexprimant NR4A3 couplé à une étiquette moléculaire (HA, FLAG, etc.) devrait pouvoir déterminer si NR4A3 régule l'expression de *Havcr2* via son activité transcriptionnelle directe.

Les LT CD8 NR4A3-déficients augmenteraient le contrôle antitumoral via une plus forte production de cytokines

La production de cytokines par les LT CD8 est une propriété importante qui contribue au contrôle tumoral⁷¹³ et nous avons déjà déterminé que les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} produisent plus de cytokines lors d'une réponse immunitaire aiguë (article 1 : Fig.2A), c'est pourquoi nous avons évalué la fonctionnalité des TIL *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-}. Nous avons ainsi identifié que, lors d'une restimulation des TIL NR4A3-déficients, il y a une augmentation de la production de TNF- α , d'IL-2 et de la polyfonction (IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺) de ces cellules (article 2 : Fig.2A-B) en terme de pourcentage de cellules positives, sans différences au niveau de l'intensité de la production de cytokines (annexe 3). Les mêmes différences de production de cytokines (IFN- γ et TNF- α) ont été observées lors d'une restimulation des TIL TKO dans les études de Chen *et al.*⁸¹⁹ et de Liu *et al.*⁷⁸³, ce qui, avec nos résultats de l'article 2, suggère une régulation de la production de cytokines des LT CD8 par les NR4A lors d'une réponse antitumorale. Les données de scRNA-seq ont aussi confirmé la plus forte proportion de TIL *Nr4a3*^{-/-} producteurs de cytokines et de chimiokines (groupe C8) lorsque comparé aux TIL *Nr4a3*^{+/+} (article 2 : Fig.4A et Fig.5A-B). Ainsi, la meilleure polyfonction des TIL *Nr4a3*^{-/-} combinée à leur fréquence augmentée et leur moindre épuisement terminal (proportion de cellules Tim-3⁺) peuvent contribuer au meilleur contrôle tumoral. Afin d'évaluer quelle cytokine permet aux LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} de soutenir un meilleur contrôle tumoral, il

sera possible d'effectuer un traitement des souris porteuses de tumeurs et traitées avec les LTE $Nr4a3^{+/+}$ ou $Nr4a3^{-/-}$ avec des Ac anti-TNF- α , anti-IL-2, ou même anti-IFN- γ et d'évaluer la croissance tumorale suite à ces traitements⁷¹³.

Les progéniteurs NR4A3-déficients sont distincts de leur contrepartie sauvage

Les progéniteurs des LT CD8 épuisés sont la population qui soutient la réponse antitumorale des LT CD8 lors d'une thérapie ICB, et leur présence intra-tumorale corrèle avec un meilleur contrôle tumoral^{471,670}. Nous avons observé que la proportion de progéniteurs (SLAMF6⁺ Tim-3⁻) $Nr4a3^{-/-}$ ne diminue pas significativement sous le traitement anti-PD-L1, et il n'y a pas d'accumulation des LT CD8 terminalement épuisés (SLAMF6⁻ Tim-3⁺) lors de ce traitement, ce qui est observé dans les TIL $Nr4a3^{+/+}$ (article 2 : Fig.1F) et attendu lors d'un traitement anti-PD-L1⁴⁷¹. Le maintien de la proportion des progéniteurs $Nr4a3^{-/-}$ pourrait soutenir la réponse antitumorale et expliquer le meilleur contrôle tumoral lors de la délétion de NR4A3. Ce maintien peut être expliqué par les propriétés cellule-intrinsèques des progéniteurs (moindre capacité d'épuisement terminal, meilleure survie, meilleur autorenouvellement) ou par un afflux continu de ces cellules à partir des GL, ce qui conserverait cette population à des niveaux stables. Les résultats de scRNA-seq suggèrent que les deux apports pourraient être valides (article 2 : Fig.5B).

Effectivement, les progéniteurs $Nr4a3^{+/+}$ ou $Nr4a3^{-/-}$ ont un profil UMAP distinct (article 2 : Fig.4A), ce qui suggère des propriétés intrinsèques différentes de ces TIL, comme déterminé par l'expression des marqueurs *Sell* et *Cxcr6* (article 2 : Fig.6C-E), qui ont été définis en tant que marqueurs distinctifs des progéniteurs $Nr4a3^{+/+}$ et $Nr4a3^{-/-}$. L'impact fonctionnel de ces marqueurs sur les progéniteurs reste à déterminer et pourrait être effectué en triant les progéniteurs $Nr4a3^{+/+}$ et $Nr4a3^{-/-}$, respectivement CD62L⁺ ou CXCR6⁺, lors d'un défi antitumoral. L'expression de CD62L (codé par *Sell*) est associée au potentiel progéniteur des TIL⁵¹², alors que celle de CXCR6 (codé par *Cxcr6*), à la capacité des TIL à se positionner près des DC CCR7⁺ qui présentent l'IL-15, une cytokine importante pour la survie à long terme des LT CD8⁸⁸⁸. L'expression de CXCR6 est aussi enrichie sur les LT CD8 CX3CR1⁺ lors d'une infection LCMV C113²⁰², cette population de LT CD8 épuisés étant reconnue pour ses propriétés effectrices qui soutient la réponse immunitaire lors d'une infection chronique. Une plus forte proportion des cellules CX3CR1⁺ pourrait expliquer le meilleur contrôle tumoral par les LT CD8 $Nr4a3^{-/-}$; toutefois nous n'avons

pas observé de différences dans la fréquence des LT CD8 CX3CR1⁺, ni une augmentation de la prolifération des TIL *Nr4a3*^{-/-}, qui sont deux propriétés caractéristiques de cette population. En se basant sur le fait que CD62L et CXCR6 délimitent seulement une partie des progéniteurs *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-}, ainsi que leur rôle biologique discuté ci-haut, ces marqueurs ne semblent pas jouer un rôle dominant dans le contrôle tumoral par les LT CD8.

Il faut noter que nous n'avons pas observé d'accumulation des TIL terminalement différenciés lors d'une ACT avec des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} sous traitement anti-PD-L1 (SLAMF6⁻ Tim-3⁺). Ce résultat soutient l'hypothèse d'une différenciation distincte des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} plutôt qu'un apport continu de LT CD8 à partir des GL qui se différencient terminalement au fur et à mesure dans la tumeur. Cette hypothèse est aussi soutenue par notre analyse *pseudotime* des données du scRNA-seq. Cette analyse a mis en évidence que les progéniteurs *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} suivent un chemin de différenciation distinct sous traitement isotypique (ISO) ou anti-PD-L1 (article 2 : Fig.6A). Les TIL *Nr4a3*^{+/+} se caractérisent par des progéniteurs qui se différencient en effecteurs cytotoxiques C0 en suivant un chemin par les groupes des TIL en prolifération (bras gauche d'UMAP), et l'ajout du traitement anti-PD-L1 dévie cette différenciation en TIL fonctionnels du bras droit de l'UMAP. La même analyse des TIL *Nr4a3*^{-/-} a permis de mettre en évidence que, sous traitement ISO, les progéniteurs *Nr4a3*^{-/-} peuvent se différencier directement en effecteurs cytotoxiques C0 ou se diriger vers la prolifération. Sous traitement d'anti-PD-L1, le potentiel de différenciation des progéniteurs *Nr4a3*^{-/-} en effecteurs est maintenu, mais il y a une augmentation de la proportion de cellules qui s'engagent dans la prolifération (article 2 : Fig.6A). Ces données prédictives suggèrent un potentiel de différenciation distinct des progéniteurs *Nr4a3*^{+/+} et *Nr4a3*^{-/-}. Afin de tester si cette prédiction est véridique, il sera possible de trier les progéniteurs *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} et de les injecter par voie intraveineuse ou directement dans une tumeur préétablie afin de suivre leur différenciation lors d'une réponse antitumorale.

Les progéniteurs *Nr4a3*^{-/-} pourraient aussi mieux proliférer afin de maintenir stable la population SLAMF6⁺ Tim-3⁻, mais ceci est peu probable, car nous n'avons pas observé de différence de prolifération des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} dans notre étude précédente lors d'une réponse immunitaire aiguë (article 1 : Fig.S5C), et les données de scRNA-seq suggèrent même une moindre prolifération des TIL *Nr4a3*^{-/-} (article 2 : Fig.5B). Toutefois, afin de confirmer ces suppositions, il sera possible d'évaluer la prolifération des progéniteurs *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} avec une expérience

utilisant le marquage de type CTV (Cell Trace Violet®). Ainsi, les progéniteurs *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} devraient être extraits à partir des tumeurs lors d'une expérience de phénotypage de tumeur à J21. Une fois extraits, ces TIL pourront être marquées au CTV et leur prolifération sera suivie lors d'une stimulation *in vitro* par des Ac anti-CD3/anti-CD28, ou alors ces cellules pourraient être réinjectées dans des souris porteuses de tumeurs afin d'évaluer leur capacité de prolifération *in vivo*.

Une autre possibilité afin d'expliquer les différentes proportions de TIL SLAMF6⁺ Tim-3⁻ serait que les TIL terminalement épuisés (Tim-3⁺ SLAMF6⁻) pourraient être rapidement éliminés, ce qui ne permettrait pas l'observation de leur accumulation. Afin de déterminer si ce phénomène a lieu, une expérience de suivi de la différenciation des progéniteurs *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} peut être envisagée, préférablement dans un modèle de compétition afin d'avoir un contrôle interne. Ainsi, le TA des souris porteuses de tumeurs avec un même nombre de progéniteurs *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} marqués au CTV (Cell Trace Violet®) afin de suivre la progénie des TIL SLAMF6⁺ Tim-3⁻ et leur suivi dans le temps permettront de déterminer la capacité de ces cellules à se différencier sous traitement d'anti-PD-L1.

La population des progéniteurs *Nr4a3*^{-/-} pourrait aussi être maintenue à des niveaux stables grâce à l'apport de nouveaux immigrants de la tumeur (groupe C12) à partir des GL. Effectivement, les TIL *Nr4a3*^{-/-} sous traitement ISO présentent une plus forte proportion de nouveaux immigrants de la tumeur lorsque comparé à la condition sauvage (article 2 : Fig.5B), qui, en plus de maintenir la population de progéniteurs *Nr4a3*^{-/-} à un niveau stable, pourrait soutenir le contrôle tumoral. Surprenamment, le traitement anti-PD-L1 diminue la proportion du groupe C12 des TIL *Nr4a3*^{-/-} lorsque comparé au traitement ISO (article 2 : Fig.5B). Or, il est connu que le traitement ciblant l'axe de signalisation PD-1/PD-L1 induit un influx de nouveaux LT répondant aux Ag tumoraux^{889,890} et augmente la réponse antitumorale des LT CD8 progéniteurs (SLAMF6⁺ Tim-3⁻)⁴⁷¹. Toutefois, nous pensons que cette diminution du groupe C12 des TIL *Nr4a3*^{-/-} ne reflète qu'une redistribution des proportions entre les différents groupes fonctionnels des TIL. Ainsi, l'augmentation de la proportion des cellules en prolifération diminuerait les proportions des TIL dans les autres groupes (article 2 : Fig.5B).

Les populations fonctionnelles de réponse à l'anti-PD-L1 enrichies dans les TIL NR4A3-déficients seraient responsables de leur meilleur contrôle antitumoral

Tout en sachant que NR4A3 agit principalement en tant que FT dans les LT CD8 (article 1 : Fig. 4A), nous avons voulu étudier le programme transcriptionnel des TIL *Nr4a3*^{+/+} et *Nr4a3*^{-/-}. Afin de conserver la complexité des différentes sous-populations de TIL, nous avons effectué une expérience de scRNA-seq sur des TIL en ACT simple avec des LT CD8 *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} avec ou sans traitement d'anti-PD-L1 (article 2 : Fig.4A et Fig.5A). Cette expérience nous a permis de mettre en évidence des profils UMAP distincts et de définir les sous-populations fonctionnelles qui pourraient être responsables du meilleur contrôle tumoral lors du traitement anti-PD-L1 ou sous ACT avec des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-}. Le profil UMAP des TIL *Nr4a3*^{-/-} en ACT ressemble davantage à celui des TIL *Nr4a3*^{+/+} sous traitement anti-PD-L1 (article 2 : Fig.5A) que celui des TIL *Nr4a3*^{+/+} sous traitement ISO. Ce résultat soulève l'importance de NR4A3 dans le traitement anti-PD-L1 en tant que RN qui pourrait être une cible de thérapies ICB.

Le traitement avec l'anti-PD-L1 induit des changements distincts dans les conditions de traitement d'ACT *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} (article 2 : Fig.5B). Ainsi, ce traitement augmente la proportion d'effecteurs cytotoxiques (C0), de producteurs de cytokines et de chimiokines (C8), d'effecteurs de type mémoire (C9), de cellules qui répondent à l'IFN (C11) et d'immigrants récents de tumeurs (C12) dans les TIL *Nr4a3*^{+/+} (article 2 : Fig.4A et Fig.5B). Ces populations enrichies sous traitement anti-PD-L1 dans les TIL *Nr4a3*^{+/+} sont déjà omniprésentes chez les TIL *Nr4a3*^{-/-} sous traitement ISO. Nous pouvons donc supposer que ces populations puissent être responsables du meilleur contrôle tumoral lors de ces thérapies (article 2 : Fig.1B), potentiellement via leur plus fort potentiel effecteur. Par contre, dans la condition d'ACT *Nr4a3*^{-/-}, l'anti-PD-L1 induit d'autres changements que dans la condition sauvage. Notamment, ce traitement induit une augmentation de la proportion des TIL en prolifération (groupes C3, C5, C7, C10, C14) et d'une sous-population d'effecteurs cytotoxiques (C1) (article 2 : Fig.4A et Fig.5B) qui, ensemble, pourraient contribuer à l'avantage de survie additif de l'ACT avec des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} en combinaison avec l'anti-PD-L1 (article 2 : Fig.1B). La différence de l'effet du traitement anti-PD-L1 sur les TIL *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} met en évidence le caractère distinct de ces cellules et suggère quelles sont les populations participant au contrôle tumoral lors des différents types de traitement. L'importance de ces populations est aussi suggérée par l'enrichissement de la signature prédictive de souris qui

répondent à une thérapie visant l'axe PD-1/PD-L1 de Chen *et al.*⁸⁹¹ (article 2 : Fig.5D) dans les populations enrichies sous traitement d'anti-PD-L1 dans les TIL *Nr4a3*^{+/+} et sous traitement ISO dans les TIL *Nr4a3*^{-/-}, décrites plus haut (C0, C9, C11, C12). Cette signature génique est aussi présente dans une sous-poulation d'effecteurs cytotoxiques (C1, enrichis sous traitement anti-PD-L1 dans les TIL *Nr4a3*^{-/-}), de progéniteurs *Nr4a3*^{+/+} (C2) et *Nr4a3*^{-/-} (C4), ainsi que dans les immigrants récents de tumeurs activés (C6). Tous ces groupes, mis à part le groupe C2 (progéniteurs *Nr4a3*^{+/+}), sont enrichis dans les TIL *Nr4a3*^{-/-}, ce qui concorde avec nos observations de la meilleure survie de souris sous traitement ACT avec des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} avec ou sans traitement anti-PD-L1. Pour résumer, lors du traitement anti-PD-L1 avec l'ACT *Nr4a3*^{+/+}, l'amélioration de la survie des souris traitées (article 2 : Fig.1B) pourrait être expliquée par l'augmentation des proportions des populations fonctionnelles lors de la thérapie combinée. Au contraire, l'amélioration de la survie de souris sous traitement anti-PD-L1 avec l'ACT *Nr4a3*^{-/-} (article 2 : Fig.1B) serait due à la présence initiale de ces populations lors de l'ACT simple, et de l'augmentation de leur prolifération en thérapie combinée.

Les populations fonctionnelles des TIL dont la proportion augmente sous traitement d'anti-PD-L1 dans les TIL *Nr4a3*^{+/+} et qui sont enrichis dans les TIL *Nr4a3*^{-/-} sous traitement ISO représentent un intérêt particulier du point de vue fonctionnel. Ces cellules sont prédites pour mieux contrôler la croissance tumorale, et il sera pertinent de les isoler lors d'une réponse antitumorale afin de tester leur apport au contrôle tumoral. Afin de les isoler, nous pourrions les étudier au niveau bio-informatique afin d'identifier des marqueurs extracellulaires. Une fois ces marqueurs définis, nous pourrions les tester lors d'une réponse antitumorale pour déterminer s'ils nous permettent de discriminer les populations fonctionnelles détectées au niveau transcriptionnel. Dans le cas affirmatif, il sera ensuite possible de trier ces populations et les étudier lors d'une réponse antitumorale.

NR4A3 régule la différenciation des TIL au niveau de chaque population fonctionnelle

Nous avons défini que les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} se distinguent par leur capacité à se différencier en populations fonctionnelles distinctes, toutefois, la déficience en NR4A3 régule non seulement la proportion de ces populations fonctionnelles, mais aussi leurs propriétés. Nous avons comparé le profil transcriptomique des TIL *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} avec ou sans traitement d'anti-PD-L1 de

chaque groupe (C0 à C14) afin de déterminer si les TIL de nos quatre conditions de traitement se distinguent par leur programme transcriptionnel intrinsèque. Ainsi, nous avons déterminé qu'il existe des différences transcriptionnelles entre nos conditions expérimentales dans chaque groupe de TIL. Les plus grandes différences ont été identifiées lors de la comparaison des TIL *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} (article 2 : Fig.S5A), ce qui suggère que ces cellules ont des propriétés distinctes. Nous avons aussi observé que le traitement d'anti-PD-L1 induit des changements plus importants dans les TIL *Nr4a3*^{+/+} que dans les *Nr4a3*^{-/-}, et les différences entre les TIL *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} diminuent sous traitement d'anti-PD-L1. Ces résultats identifient la délétion de NR4A3 en tant que thérapie antitumorale distincte du traitement anti-PD-L1, car le profil transcriptomique des TIL *Nr4a3*^{-/-} ressemble, mais n'est pas identique à celui des TIL *Nr4a3*^{+/+} sous traitement d'anti-PD-L1 (article 2 : Fig.S5A).

Lors de la comparaison des TIL d'un même groupe, nous avons mis en évidence des différences transcriptionnelles qui suggèrent des propriétés distinctes de ces cellules. Par exemple, dans la populations des effecteurs cytotoxiques (C0), les TIL *Nr4a3*^{-/-} sous traitement ISO expriment plus de *Il7r*, *Bcl2*, *Tcf7*, *Icos*, *Cd28*, *Slamf6*, *Fosl2* et *Bhlhe40* (codant pour CD127, Bcl2, TCF-1, ICOS, CD28, SLAMF-6, Fosl2 et Bhlhe40) que les TIL *Nr4a3*^{+/+} sous traitement anti-PD-L1. L'enrichissement de l'expression de ces molécules suggère un plus fort potentiel progéniteur (TCF-1, SLAMF-6) des TIL *Nr4a3*^{-/-}, une meilleure survie (CD127, Bcl2), une meilleure capacité de co-stimulation (CD28, ICOS) ainsi qu'une plus forte activité métabolique mitochondriale qui soutient les modifications épigénétiques nécessaires lors d'une thérapie ICB grâce à l'activité de Bhlhe40^{677,892}. En comparaison, les TIL *Nr4a3*^{+/+} sous anti-PD-L1 expriment plus de *Gzma*, *Gzmb* et *Prfl* (codant pour la granzyme A et B ainsi que la perforine) que les TIL *Nr4a3*^{-/-} sous traitement ISO, ce qui suggère un meilleur potentiel cytotoxique de ces cellules. Effectivement, sous traitement anti-PD-L1, nous avons observé une augmentation de la production de granzyme B par les TIL *Nr4a3*^{+/+}, mais pas par les TIL *Nr4a3*^{-/-} (article 2 : Fig.2C). Toutefois, selon notre courbe de survie (article 2 : Fig.1B) ainsi que la proportion de souris qui répondent ou non aux différents traitements (article 2 : Fig.S1C), cette moindre production de granzyme B et de potentiel cytotoxique des TIL *Nr4a3*^{-/-} ne semble pas avoir un rôle majeur dans le contrôle tumoral. Lorsque nous avons effectué une comparaison des TIL *Nr4a3*^{-/-} sous traitement ISO avec les TIL *Nr4a3*^{+/+} sous anti-PD-L1 dans le groupe de producteurs de cytokines et chimiokines (C8), nous avons détecté une plus forte expression de *Fosb*, *Junb*, *Fosl2* (codant pour des FT bZIP qui

soutiennent l'activité des LT CD8) et *Bhlhe40* dans les TIL *Nr4a3*^{-/-} lorsque comparé aux TIL *Nr4a3*^{+/+} sous anti-PD-L1. Ces résultats suggèrent une plus forte activité des FT de la famille bZIP en absence de NR4A3, ce qui pourrait leur conférer une meilleure activité effectrice et un moindre potentiel d'épuisement terminal⁵¹⁵, et concorde avec nos résultats de l'article 1 où l'absence de NR4A3 induit une plus forte activité prédite de FT de la famille bZIP. Pris ensemble, ces résultats révèlent encore une fois l'intérêt d'une étude combinée de NR4A3 et des FT de la famille bZIP.

Le meilleur contrôle antitumoral des TIL NR4A3-déficients serait dû à leur meilleur potentiel mémoire et résident mémoire

Dans l'article 1, nous avons montré que la déficience en NR4A3 augmente la génération des LTM par les LT CD8 NR4A3-déficients. Afin de déterminer si les TIL NR4A3-déficients auraient des caractéristiques semblables aux LTM, nous avons projeté des signatures de cellules mémoires de LT CD8 sur notre profil UMAP et avons observé un enrichissement de ces signatures dans le bras droit de l'UMAP (article 2 : Fig.4C, Fig.S4A), où les LT CD8 NR4A3-déficients sont enrichis. Ces cellules présentent aussi un enrichissement du potentiel de résidence (article 2 : Fig.4C, Fig.S4A), qui pourrait contribuer au meilleur contrôle tumoral puisqu'il a été montré que les LTRM participent à l'élimination de cellules tumorales via leur production d'IFN- γ *in situ*. Toutefois, dans notre modèle, nous pouvons seulement suggérer un caractère LTM ou LTRM, la différenciation mémoire étant étudiée à des moments plus tardifs lors d'une réponse immunitaire aiguë^{893,894}. La signature des LTM dans le bras droit de l'UMAP (article 2 : Fig. 4C; Fig. S4A) pourrait aussi expliquer, du moins en partie, le meilleur potentiel des TIL *Nr4a3*^{-/-} à se différencier rapidement en effecteurs cytotoxiques C0 (article 2 : Fig.6A) et à potentiellement contrôler la tumeur lorsque comparés aux TIL *Nr4a3*^{+/+}, qui ont un chemin de différenciation distinct selon la prédiction de l'analyse bioinformatique *pseudotime*.

NR4A3 et les autres NR4A améliorent le contrôle tumoral des LT CD8

L'avantage de survie conféré par l'ACT de LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} (article 2 : Fig.1B) est surprenant à première vue lorsque comparé à l'étude de Chen *et al.*⁸¹⁹. Les auteurs soutiennent la nécessité de déléter tous les NR4A afin d'observer un effet thérapeutique sur la croissance tumorale

suite à une ACT de CAR-T dans des souris *Rag1^{-/-}* porteuses de tumeurs. Cependant, leurs données suggèrent que cette triple délétion n'est pas nécessaire, car, lorsque l'on compare les courbes de croissance tumorales de souris non-traitées, des souris avec ACT de CAR-T sauvages et avec ACT de CAR-T avec des simples délétions des *Nr4a*, les CAR-T *Nr4a3^{-/-}* sont les plus efficaces à améliorer la courbe de survie (voir Chen *et al.* «Extended data Fig.6») ⁸¹⁹. L'étude de Liu *et al.* ⁷⁸³ a souligné que la délétion de seulement NR4A1 améliore l'ACT de souris porteuses de tumeurs, la délétion des trois NR4A n'étant pas nécessaire afin d'observer un effet sur la survie. En conclusion, nos résultats dans l'article 2, ceux de Liu *et al.* ⁷⁸³ et même ceux de Chen *et al.* ⁸¹⁹ indiquent que la délétion d'un seul membre de la famille NR4A permet d'obtenir un meilleur contrôle antitumoral et un avantage de survie des souris ainsi traitées. Ces résultats suggèrent aussi un rôle non-redondant de ces FT, ou du moins une redondance partielle entre NR4A1 et NR4A3. Malgré que Chen *et al.* ⁸¹⁹ soutienne que la délétion de tous les *Nr4a* est nécessaire afin d'améliorer l'ACT antitumorale, il sera important de déterminer si la délétion de seulement un de ces NR4A pourrait remplacer la triple délétion pour obtenir des avantages biologiques suffisants tout en induisant le moins de modifications génétiques dans les LT CD8 thérapeutiques lors d'une ACT.

4.2.2. Pertinence du modèle d'étude

Afin d'étudier le rôle de NR4A3 dans les LT CD8 lors d'une réponse anti-tumorales, nous avons utilisé un modèle d'activation des LT CD8 OT-I *in vitro* et leur TA subséquent dans des souris porteuses de tumeurs, ce qui s'approche le plus d'un potentiel modèle thérapeutique chez l'humain où les patients ayant un cancer sont traités avec des LT CD8 activés *in vitro*. L'action biologique de NR4A3 lors d'une réponse anti-tumorale est suggérée par son enrichissement d'expression dans les LT CD8 épuisés, ainsi que les études portant sur la délétion concomitante des trois NR4A ⁸¹⁹, qui procure un avantage thérapeutique lors d'une réponse anti-tumorale. Ainsi l'utilisation d'un modèle d'ACT est pertinente, car elle permet la délétion spécifique de *Nr4a3* dans les LT CD8 activés *in vitro* ainsi que l'étude de la réponse anti-tumorale et l'épuisement de ces cellules dans des souris porteuses de tumeurs. L'utilisation de la thérapie anti-PD-L1 donne l'avantage d'une combinaison thérapeutique de la délétion de *Nr4a3* et la diminution de la signalisation PD-1/PD-L1, NR4A3 étant connu de moduler l'expression de PD-1, ce qui souligne l'importance de l'étude de cette voie de signalisation.

4.2.3. Limites de notre modèle

Modèle d'étude tumorale

Afin de pouvoir étudier des tumeurs analysables dans tous nos groupes de traitement, nous avons optimisé le protocole expérimental et traité des souris porteuses de tumeurs B16-OVA plus tardivement, soit lors d'une croissance tumorale avancée. Ce protocole, caractérisé par une croissance tumorale rapide, ne permet pas un suivi à long terme de souris porteuses de tumeurs, car les points limites sont rapidement atteints. Afin de suivre à plus long terme la croissance tumorale et l'épuisement des LT CD8, il sera possible d'implanter un moindre nombre de cellules B16-OVA, que nous pourrions ensuite traiter avec un plus faible nombre de LTE. Il sera aussi pertinent de déterminer le rôle de NR4A3 dans la réponse antitumorale d'autres types de cancers, notamment lors d'une ACT de leucémies, où les LT CD8 thérapeutiques n'ont pas besoin d'infiltrer la tumeur, ou lors de l'immunosurveillance de cancers endogènes de souris susceptibles de développer des tumeurs afin de définir si la délétion de NR4A3 pourrait contribuer à un meilleur contrôle tumoral endogène à long terme.

Utilisation d'un modèle de LT CD8 à unique spécificité et affinité (OT-I)

Il est important de souligner que lors d'une réponse anti-tumorale, une plus forte signalisation TCR augmente le niveau d'expression des RI et diminue la fonction des LT CD8⁸⁹⁵. Ainsi l'utilisation des OT-I lors de l'ACT a potentiellement mené à un plus fort niveau d'épuisement des TIL lorsque comparé aux LT CD8 dont le TCR a une moindre affinité⁸⁷⁶. Afin de tester l'effet de l'affinité du TCR sur la réponse anti-tumorale des LT CD8, il sera possible d'utiliser un système basé sur l'utilisation des LT CD8 (*Nr4a3*^{+/+} et *Nr4a3*^{-/-}) spécifiques à l'antigène SV40 large T lors du traitement de fibrosarcomes murines exprimant des peptides altérés de cet antigène⁸⁹⁵ afin de comparer l'effet de la force du signal TCR sur le mode d'action du NR4A3 lors d'une réponse anti-tumorale. Dans le même but, il sera aussi possible d'utiliser d'autres transgènes que les LT CD8 transgéniques pour l'expression du TCR, où l'expression de *Nr4a3* sera délétée, soit les P14⁸⁷⁴, dont la signalisation TCR est moins forte que celles des LT OT-I⁸⁷⁶, combiné à l'utilisation d'un système de thérapie cellulaire adoptive de souris sauvages porteuses de tumeurs B16 exprimant le peptide gp33.

Traitement avec des LTE et concordance des données transcriptomiques aux observations par cytométrie en flux

Dans nos expériences, nous avons traité des souris porteuses de tumeurs avec des LTE générés *in vitro*. L'utilisation de ces LTE ne permet pas une concordance absolue de la signature génique détectée dans notre étude et des données de la littérature de populations de LT CD8 activés et épuisés lors d'une réponse *in vivo*. Malgré l'utilisation de marqueurs clés (par exemple *Tcf7*, *Slamf6*, *Havcr2*, etc.) et de signatures géniques pour la définition de populations fonctionnelles (article 2 : Fig.4B-C, Fig. S4A-B), ces données n'ont pas été suffisantes pour effectuer une transposition exacte entre les données transcriptomiques et les observations par cytométrie en flux. Ainsi, la population de progéniteurs caractérisée par l'expression de SLAMF6 et de Tim-3 est présente à un taux d'environ 40% dans les TIL *Nr4a3* sauvages, tandis que l'expérience de scRNA-seq ne nous a permis d'identifier qu'une proportion de 23% dans le groupe C2. Ces différences peuvent être expliquées par la faible profondeur de séquençage du scRNA-seq (50 000 lectures par cellule) ainsi qu'une différence potentielle entre l'expression protéique et de l'ARNm. Il est possible que certaines cellules SLAMF6⁺ puissent commencer leur épuisement au niveau transcriptionnel, mais continuent d'exprimer le marqueur SLAMF6 pour un certain temps. Une meilleure concordance des données de cytométrie et transcriptomiques pourrait être obtenue en utilisant des marquages extracellulaires pour des molécules cibles (SLAMF-6, Tim-3, Lag-3, PD-1) avec des Ac couplés avec des nucléotides (de type TotalSeq®) qui peuvent être ensuite séquencés et définis dans le profil de scRNA-seq.

Modèle d'épuisement

Nous avons caractérisé l'épuisement des LT CD8 NR4A3-déficients lors d'une ACT avec des LTE. Toutefois, le modèle d'étude utilisé n'est pas parfait pour définir la manière dont la délétion de *Nr4a3* affecte l'épuisement des LT CD8 lors d'une réponse endogène *in vivo*. Ce modèle se rapproche d'un traitement anticancéreux de patients, mais ne reflète pas une différenciation de LT CD8 endogènes lors d'une réponse antitumorale, où la différenciation des LT CD8 épuisés commence avec l'étape de l'activation du LT CD8 naïf qui se différencie en LTE *in vivo* dans un microenvironnement tumoral et, lors d'une stimulation antigénique continue, subit une différenciation en LT CD8 épuisé. De plus, l'étude de l'épuisement des TIL a été effectuée à

J21, soit 9 jours post-TA, un temps précoce pour l'épuisement terminal des LT CD8 lorsque comparé aux modèles d'une réponse chronique LCMV C113 où l'épuisement de ces cellules a été établi à J30 post-infection. Ainsi, l'épuisement précoce au jour du phénotypage des TIL pourrait expliquer leurs forts niveaux d'expression de TCF-1 et de T-bet (article 2 : Fig.S1F), ainsi que la production soutenue de cytokines (article 2 : Fig.2A-B).

Étude de la production de cytokines

Une de limites de l'évaluation de la production de cytokines a été notre type de restimulation, où les suspensions de cellules tumorales ont été restimulées avec la PMA/ionomycine en présence de bréfeldine A. Ce type de stimulation permet l'induction de la production de cytokines par les LT CD8 épuisés en présence de cellules tumorales B16-OVA ainsi que d'autres cellules immunosuppressives intratumorales. Toutefois, la stimulation *in vitro* avec la PMA/ionomycine n'induit pas la restimulation physiologique du LT CD8, où l'interaction du TCR avec le CMH I présentant son peptide induit la signalisation du TCR. Une expérience plus fine d'évaluation de la fonction des LT CD8 *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} serait d'isoler les TIL à partir des suspensions tumorales et d'effectuer leur restimulation antigénique *in vitro* en présence de CPA présentant leur peptide spécifique (OVA). Cette expérience permettra d'évaluer la capacité des TIL *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} à produire des cytokines lors d'une stimulation par des CPA en absence de signaux immunosuppresseurs issus des cellules tumorales ou des cellules immunosuppressives infiltrantes de tumeur.

Population homogène de LT CD8

Les données obtenues chez la souris sont très encourageantes (nos données, celles de Chen *et al.*⁸¹⁹, Liu *et al.*⁷⁸³ ainsi que Seo *et al.*⁵²⁸), mais l'étude de Jung *et al.*⁸²⁴ ouvre une nouvelle perspective sur le mode de fonctionnement du NR4A3, où les auteurs soutiennent qu'il affecte seulement la fonction des LT humains, alors que nous proposons qu'il affecte tant la fonction que la différenciation de ces cellules. Nous proposons que l'effet de NR4A3 sur les LT CD8 humains soit dépendant de leur stade de différenciation, car, lorsque la délétion des NR4A est effectuée au stade naïf des LT CD8 (nos données, celles de Chen *et al.*⁸¹⁹, Liu *et al.*⁷⁸³ ainsi que Seo *et al.*⁵²⁸),

celle-ci affecte la différenciation, la fonction et le contrôle tumoral par les LT CD8. Par opposition, Jung *et al.*⁸²⁴ ont effectué la délétion de *Nr4a3* sur des LT humains hétérogènes activés *in vitro*. Ces LT ont été isolés à partir du sang périphérique humain où se retrouvent des LT CD4 et des LT CD8 à différents stades de différenciation (état naïf, effecteur, mémoire), avec de faibles proportions de LT CD8 naïfs⁸⁹⁶. De plus, la délétion de *Nr4a3* a été effectuée quatre jours post-activation *in vitro* ; or, dans l'article 1, nous avons montré que NR4A3 agit tôt lors de la réponse des LT CD8, sa délétion à ce temps pouvant être trop tardive afin d'affecter la différenciation des LT CD8. Ainsi, nous proposons que l'effet distinct observé soit dû au type cellulaire utilisé et au temps de délétion de *Nr4a3*, et proposons de déterminer l'effet de la délétion de NR4A3 dans différentes sous-populations de LT humains (LT CD4 et LT CD8 naïfs, effecteurs et mémoires) afin de définir le rôle de NR4A3 dans ces sous-populations. Nous n'excluons pas qu'il puisse y avoir une divergence dans la fonction de NR4A3 chez la souris et chez l'humain, et cela constitue un encouragement de plus à étudier ce FT.

Aussi, lors du traitement ACT, nous avons utilisé une population homogène de LT CD8 avec une spécificité connue (LT CD8 OT-I) activés *in vitro*, ce qui limite nos connaissances seulement par rapport à la fonction de NR4A3 dans les LT CD8 où la délétion de *Nr4a3* est présente dès leur état naïf. Or, selon nous, l'étude de Jung *et al.*⁸²⁴ a soulevé l'importance de l'étude de différentes sous-populations des LT CD8 où l'expression de NR4A3 pourrait être ciblée⁸²⁴. Aussi, notre modèle de LT CD8 exprime le TCR OT-I, dont la signalisation en aval est forte. Or, dans le cas de NR4A3, dont l'expression est induite suite au signal TCR, il sera pertinent d'étudier le rôle de *Nr4a3* sur l'épuisement des LT CD8 endogènes qui possèdent des clones exprimant des TCR distincts et qui engendrent une signalisation plus ou moins forte lors de la reconnaissance antigénique. Il sera donc possible d'étudier si la délétion de NR4A3 affecte la différenciation et l'épuisement des LT CD8 dans d'autres modèles transgéniques où la signalisation TCR est moins forte ou d'utiliser des cellules tumorales exprimant des peptides OVA altérés afin de diminuer la force d'interaction du TCR avec le CMH I. Ces étapes sont importantes afin de mieux comprendre comment la délétion de NR4A3 affecte les LT CD8 et de pouvoir transposer ces connaissances lors d'une réponse antitumorale chez l'humain.

4.2.4. Modèle d'action de NR4A3 dans les LT CD8 lors d'une réponse antitumorale

Lors d'une réponse antitumorale, la stimulation antigénique constante induit l'expression de *Nr4a3* qui, une fois traduit, module l'expression de gènes associés à l'épuisement des LT CD8. Notamment, NR4A3 induit directement l'expression de *Pdcd1*⁸¹⁹. Ensuite, NR4A3 pourrait potentiellement participer à l'induction de *Tox*, avec qui il pourrait renforcer l'épuisement des LT CD8⁵²⁸, et même à l'induction de l'expression de *Havcr2*, dont l'expression est réduite en absence de *Nr4a3*. NR4A3 limite aussi la production de cytokines par les TIL, potentiellement via un mécanisme suggéré par l'article 1, où ce FT compétitionnerait pour la liaison à l'ADN avec AP-1, le mécanisme exact de la régulation de la fonction des LT CD8 par NR4A3 lors d'une réponse antitumorale n'étant pas encore entièrement défini.

Au niveau global, l'expression de NR4A3 limiterait la différenciation de certains TIL à caractère effecteur, induits lors d'une ICB, parmi lesquels il y a les effecteurs cytotoxique (groupe C0), les producteurs de cytokines et de chimiokines (groupe C8), les effecteurs à caractère mémoire (C9), les cellules qui répondent à l'IFN (C11) ainsi que les immigrants récents des tumeurs (C12). NR4A3 participerait aussi à la modulation de la différenciation de progéniteurs, son expression rendant ces cellules plus sensibles à la différenciation induite par le traitement à l'anti-PD-L1. La restriction de la différenciation des populations fonctionnelles mentionnées ci-haut limiterait l'activité antitumorale des LT CD8. Lors du traitement anti-PD-L1, la diminution de l'expression des transcrits *Nr4a3* et la diminution de leur activité transcriptionnelle, prédite par la diminution de l'accessibilité sur la chromatine des motifs de liaison à l'ADN NBRE, permettraient l'augmentation de la différenciation de populations fonctionnelles induits lors d'une ICB (C0, C8, C9, C11, C12) qui soutiendraient le contrôle tumoral par les LT CD8.

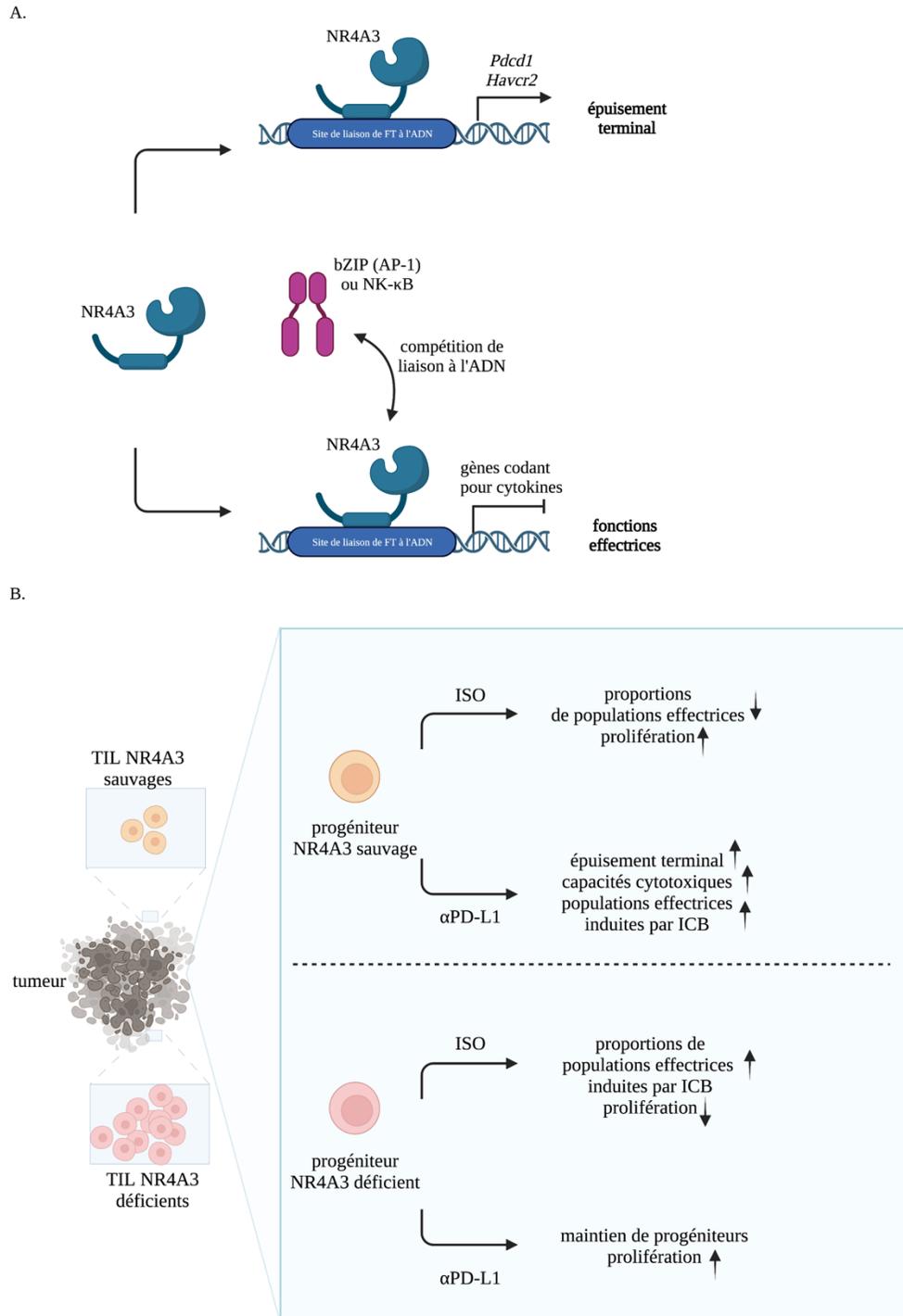


Figure 9. – Schéma de la régulation de la différenciation des LT CD8 par NR4A3 lors d'une réponse antitumorale.

A. Lors d'une réponse antitumorale, NR4A3 augmenterait l'épauement des LT CD8 via la régulation directe de l'expression de *Pcd1* et de *Havcr2* (codant pour PD-1 et Tim-3). En

même temps, NR4A3 diminuerait l'activité de FT de la famille bZIP (AP-1) ou de NF- κ B, ce qui limiterait la production de cytokines par les LT CD8. B. Lors d'une ACT, NR4A3 diminuerait la fréquence et les nombres cellulaires des TIL CD8⁺ et induirait la différenciation des progéniteurs distincts qui, à l'état de base (ISO), proliféreraient plus et généreraient peu de TIL effecteurs induits par le traitement ICB. Lors du traitement avec anti-PD-L1, la proportion de ces TIL effecteurs induits par le traitement ICB augmente, tout comme les capacités cytotoxiques et l'épuisement terminal de ces cellules. En absence de NR4A3, les proportions de cellules effectrices induites par le traitement ICB sont déjà enrichies et, lors du traitement d'anti-PD-L1, il y a une augmentation de la prolifération de ces cellules.

4.2.5. Perspectives

Études de NR4A3 lors d'une ACT chez l'humain

La délétion spécifique de NR4A3 dans les LT CD8 lors d'une ACT est une bonne stratégie d'amélioration de l'efficacité de ce type de traitement selon les résultats de l'article #2 ainsi que d'autres études portant sur les NR4A lors d'une réponse antitumorale chez la souris (délétion de NR4A1 ou triple délétion de tous les NR4A chez la souris)^{783,819}. Ainsi, il est envisageable de cibler ce FT dans les LT CD8 thérapeutiques chez l'humain lors d'une ACT antitumorale afin de diminuer l'expression de NR4A3 et d'augmenter le potentiel effecteur et mémoire de ces cellules (article 1) tout en diminuant leur épuisement lors de la réponse antitumorale. Toutefois, en nous basant sur l'étude de Jung *et al.*⁸²⁴, nous pensons qu'il est particulièrement important de définir le rôle de NR4A3 dans les autres sous-populations de LT CD8 avant de passer à une application thérapeutique. L'importance de la délétion de NR4A3 dans les LT CD8 naïfs lors d'une réponse antitumorale chez la souris a été montrée par notre étude, par Chen *et al.*⁸¹⁹ et par Liu *et al.*⁷⁸³, alors que l'effet de la délétion de ce FT sur les LTE et les LTM n'a pas été encore défini. Il n'est pas connu non plus si la différence observée pourrait être issue des différents modes de fonctionnement de NR4A3 chez la souris et l'humain.

Études de NR4A3 lors de l'épuisement des LT CD8 dans le cas d'une infection chronique

Une autre perspective pour ce projet sera l'étude du rôle de NR4A3 lors d'une réponse chronique avec un fort niveau d'inflammation, notamment lors d'une réponse LCMV C113 avec ou sans traitement anti-PD-L1. Il est important d'effectuer cette étude afin de déterminer si la délétion de l'expression de NR4A3 pourrait contribuer à un meilleur contrôle viral grâce à une meilleure production de cytokines et au moindre épuisement des LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} prédits par nos observations provenant de l'article 2. Il sera possible d'étudier la réponse antivirale des LT CD8 dans un modèle de TA de LT CD8 transgéniques P14 *Nr4a3*^{+/+} ou *Nr4a3*^{-/-} suivi par une infection LCMV C113. Il est connu que, lors d'une infection chronique LCMV C113, le fort milieu inflammatoire induit un état pathologique dans les souris. La délétion de NR4A3 dans les LT CD8 au cours d'une infection chronique pourrait améliorer le contrôle viral, mais aussi augmenter la pathologie de souris infectées via une plus forte production de cytokines (IFN- γ , TNF- α) qui pourraient induire des dommages aux tissus et même un choc cytokinique, ce qui a été observé dans le cas d'infections SARS-CoV-2⁸⁹⁷. Il est alors important de définir le rôle de NR4A3, qui agit en tant que régulateur de la production de cytokines des LT CD8, lors d'une infection chronique où la production de cytokines peut avoir un effet tant thérapeutique que pathologique.

Étude de cibles moléculaires de NR4A3 lors d'une réponse chronique des LT CD8

Nos résultats issus de l'article 2 ainsi que ceux publiés par d'autres équipes (Chen *et al.*⁸¹⁹, Liu *et al.*⁷⁸³, Seo *et al.*⁵²⁸ et Jung *et al.*⁸²⁴) ont défini un contexte biologique où les FT NR4A sont exprimés et exercent une activité. Dans ce contexte, il sera important de définir les cibles transcriptionnelles de NR4A1, NR4A2 et NR4A3, car ces FT sont tous induits suite à une stimulation TCR et reconnaissent les mêmes motifs de liaison à l'ADN (NBRE et NurRE). Dans ce but, nous proposons d'effectuer une expérience de Cut&Tag ou de Cut&Run lors d'une réponse antitumorale. Cette expérience sera possible dans un système de surexpression par transduction rétrovirale des molécules NR4A1, NR4A2 ou NR4A3, marquées avec des étiquettes moléculaires (HA, FLAG, etc.) dans des LT CD8 OT-I déficients pour chacun de ces FT. Ces cellules activées peuvent être ensuite transférées dans des souris porteuses de tumeurs B16-OVA (selon le protocole de phénotypage décrit dans l'article 2 : Fig.1C) et ensuite être récoltées à J21 pour l'étude moléculaire. L'étude de cibles directes ou indirectes de chaque FT devrait nous permettre de mieux

comprendre la fonction moléculaire de ces RN dans un contexte de réponse antitumorale. Nous proposons l'utilisation des conditions de surexpression à cause d'absence d'anticorps spécifiques pour NR4A2 et NR4A3. Par contre, un Ac spécifique pour NR4A1 existe et pourrait être utilisé en tant que contrôle pour comparer les cibles liées par NR4A1 endogène ou par NR4A1 surexprimé.

Recherche d'inhibiteurs de NR4A3 afin d'améliorer les thérapies ACT ou visant l'axe PD-1/PD-L1

Les études transcriptomique (RNA-seq) et d'accessibilité à la chromatine (ATAC-seq) ont permis de mettre en évidence une expression amoindrie des transcrits *Nr4a* ainsi qu'une accessibilité réduite des motifs de liaison à l'ADN NBRE lors d'une thérapie ICB qui vise l'axe PD-1/PD-L1^{475,783}. Ces données, en plus de nos résultats de l'article 2, suggèrent un rôle fonctionnel de NR4A3 dans la thérapie ICB visant l'axe PD-1/PD-L1 et soutient l'idée que l'utilisation d'inhibiteurs de NR4A3 lors d'un traitement antitumoral en combinaison avec des Ac visant l'axe de signalisation PD-1/PD-L1 devrait améliorer la réponse antitumorale et augmenter l'efficacité du traitement. Il a été montré qu'un inhibiteur de NR4A1, Cl-OCH3 (1,1-bis(3'-indolyl)-1-(3-chloro-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)methane), induit une diminution de l'expression de PD-L1 par les lignées de cellules cancéreuses murines du sein 41T et une diminution de la proportion de Treg⁷⁶⁸, suggérant que l'inhibition de l'activité d'un membre de la famille de NR4A peut améliorer la réponse antitumorale et agir sur d'autres types cellulaires que les LT CD8. Il reste alors à identifier un inhibiteur spécifique à NR4A3 et à tester son efficacité d'amélioration de la réponse antitumorale qui vise les LT CD8.

Chapitre 5 – Conclusion

La différenciation des LT CD8 est un processus complexe régulé par plusieurs facteurs, parmi lesquels les FT régulent la transcription génique, les modulateurs de la chromatine régulent l'accès à l'ADN, le milieu inflammatoire adapte la réponse des LT à leur environnement, ainsi que les régulateurs métaboliques. Tous ces facteurs dirigent la réponse des LT CD8 afin de soutenir l'élimination la plus rapide de l'agent infectieux sans affecter l'intégrité de l'organisme. Dans les deux articles de ma thèse, j'ai étudié le rôle du facteur de transcription NR4A3 dans la réponse des LT CD8. Dans le premier article, ce FT a été défini comme régulateur de la fonction et de la différenciation SLEC/MPEC et mémoire lors d'une réponse immunitaire aiguë des LT CD8, alors que, dans le deuxième article, NR4A3 a été défini en tant que régulateur de l'épuisement et de la réponse antitumorale des LT CD8 sous traitement d'ACT combiné à l'anti-PD-L1.

Le premier article nous a permis de définir NR4A3 en tant que régulateur précoce de la réponse des LT CD8. Ainsi, ce FT régule le transcriptome des LT CD8 très rapidement suite à une infection Lm-OVA et sa délétion favorise une plus forte activité des FT de la famille bZIP. La déficience en NR4A3 augmente la différenciation des MPEC et des LTM, tout comme les fonctions effectrices des LT CD8. Ce biais de différenciation en LTM est établi tôt lors d'une réponse des LT CD8 NR4A3-déficients, leur transcriptome étant biaisé vers la différenciation mémoire à partir de quelques jours après l'infection Lm-OVA. Cette régulation précoce des LT CD8 ouvre la possibilité de l'exploitation de la régulation de l'expression de NR4A3 dans les stratégies de vaccination ou de thérapies cellulaires adoptives, où l'inhibition précoce de l'activité de NR4A3 dans les LT CD8 augmenterait la différenciation mémoire et la production de cytokines par ces cellules.

Le deuxième article nous a permis de déterminer que NR4A3 agit en tant que régulateur de l'épuisement des LT CD8 lors d'une réponse antitumorale sous traitement d'anti-PD-L1. Ainsi, nous avons exploité les résultats du premier article et testé si la délétion de l'expression de NR4A3 peut conférer un avantage lors de thérapies cellulaires adoptives de souris porteuses de tumeurs en co-traitement avec l'anti-PD-L1. Nous avons déterminé que l'ACT avec des LT CD8 NR4A3-déficients augmente la survie de souris porteuses de tumeurs, tant en traitement simple que combiné avec l'anti-PD-L1. Les TIL NR4A3-déficients sont moins épuisés, plus polyfonctionnels,

et ont une moindre tendance de différenciation terminale sous traitement d'anti-PD-L1 que leur contrôle sauvage. L'analyse transcriptomique de cellules uniques a permis de mettre en évidence que les TIL NR4A3-déficients sont distincts des TIL NR4A3 sauvages, tant au niveau de l'enrichissement des différentes populations fonctionnelles qu'au niveau de la signature génique de ces populations. La simple déficience en NR4A3 induit un profil transcriptomique semblable au traitement anti-PD-L1 dans le contrôle sauvage, ce qui suggère un haut potentiel de la délétion de l'expression de NR4A3 dans les thérapies cellulaires. De plus, les TIL NR4A3 sauvages et déficients présentent des populations de progéniteurs distincts au niveau de leur transcriptome, qui, combiné avec les différentes populations fonctionnelles enrichies dans les TIL NR4A3-déficients et dans les TIL NR4A3 sauvages sous traitement d'anti-PD-L1, pourraient expliquer leur meilleur contrôle tumoral. Ainsi, nous avons défini NR4A3 en tant que nouveau régulateur de la réponse antitumorale sous traitement d'anti-PD-L1, son potentiel thérapeutique chez l'humain pouvant être exploité dans de futures études.

Nous sommes le premier groupe de recherche à définir le rôle de NR4A3 dans la différenciation effectrice et mémoire des LT CD8, ainsi que la fonction de ces cellules lors d'une réponse immunitaire aiguë. Notre équipe a aussi déterminé le rôle de NR4A3 dans l'épuisement des LT CD8 lors d'une réponse antitumorale sous traitement d'anti-PD-L1. Nous avons ainsi montré que l'induction de l'expression du NR4A3 suite à une stimulation antigénique procure un rôle régulateur sur la différenciation et la fonction des LT CD8.

Références bibliographiques

1. Colaço, H.G., and Moita, L.F. (2016). Initiation of innate immune responses by surveillance of homeostasis perturbations. *Febs J* 283, 2448–2457. 10.1111/febs.13730.
2. Sellge, G., and Kufer, T.A. (2015). PRR-signaling pathways: Learning from microbial tactics. *Semin Immunol* 27, 75–84. 10.1016/j.smim.2015.03.009.
3. Walsh, D., McCarthy, J., O’Driscoll, C., and Melgar, S. (2013). Pattern recognition receptors—Molecular orchestrators of inflammation in inflammatory bowel disease. *Cytokine Growth F R* 24, 91–104. 10.1016/j.cytogfr.2012.09.003.
4. Pradeu, T., and Cooper, E.L. (2012). The danger theory: 20 years later. *Front Immunol* 3, 287. 10.3389/fimmu.2012.00287.
5. Matzinger, P. (2002). The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science* 296, 301–305. 10.1126/science.1071059.
6. Seong, S.-Y., Matzinger, P., and Land, W.G. (2022). Editorial: DAMPs Across the Tree of Life. *Front Immunol* 12, 844315. 10.3389/fimmu.2021.844315.
7. Amarante-Mendes, G.P., Adjemian, S., Branco, L.M., Zanetti, L.C., Weinlich, R., and Bortoluci, K.R. (2018). Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Front Immunol* 9, 2379. 10.3389/fimmu.2018.02379.
8. Li, D., and Wu, M. (2021). Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther* 6, 291. 10.1038/s41392-021-00687-0.
9. Soehnlein, O. (2009). An elegant defense: how neutrophils shape the immune response. *Trends Immunol* 30, 511–512. 10.1016/j.it.2009.07.002.
10. Herrero-Cervera, A., Soehnlein, O., and Kenne, E. (2022). Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cell Mol Immunol* 19, 177–191. 10.1038/s41423-021-00832-3.
11. Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M., and Hogquist, K.A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don’t see). *Nat Rev Immunol* 14, 377–391. 10.1038/nri3667.
12. Geenen, V. (2021). The thymus and the science of self. *Semin Immunopathol* 43, 5–14. 10.1007/s00281-020-00831-y.

13. Kyewski, B., and Derbinski, J. (2004). Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat Rev Immunol* 4, 688–698. 10.1038/nri1436.
14. Nemazee, D. (2017). Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol* 17, 281–294. 10.1038/nri.2017.19.
15. Swain, S.L., McKinstry, K.K., and Strutt, T.M. (2012). Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 136–148. 10.1038/nri3152.
16. Chronister, W.D., Crinklaw, A., Mahajan, S., Vita, R., Koşaloğlu-Yalçın, Z., Yan, Z., Greenbaum, J.A., Jessen, L.E., Nielsen, M., Christley, S., et al. (2021). TCRMatch: Predicting T-Cell Receptor Specificity Based on Sequence Similarity to Previously Characterized Receptors. *Front Immunol* 12, 640725. 10.3389/fimmu.2021.640725.
17. Petrova, G., Ferrante, A., and Gorski, J. (2012). Cross-Reactivity of T Cells and Its Role in the Immune System. *Crit. Rev. Immunol.* 32, 349–372. 10.1615/critrevimmunol.v32.i4.50.
18. Takada, K., and Jameson, S.C. (2009). Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat Rev Immunol* 9, 823–832. 10.1038/nri2657.
19. Sun, L., Su, Y., Jiao, A., Wang, X., and Zhang, B. (2023). T cells in health and disease. *Signal Transduct. Target. Ther.* 8, 235. 10.1038/s41392-023-01471-y.
20. Jankovic, D., and Feng, C.G. (2015). CD4+ T Cell Differentiation in Infection: Amendments to the Th1/Th2 Axiom. *Front. Immunol.* 6, 198. 10.3389/fimmu.2015.00198.
21. Ruterbusch, M., Pruner, K.B., Shehata, L., and Pepper, M. (2020). In Vivo CD4+ T Cell Differentiation and Function: Revisiting the Th1/Th2 Paradigm. *Annu. Rev. Immunol.* 38, 705–725. 10.1146/annurev-immunol-103019-085803.
22. Lu, Y., Wang, Q., Xue, G., Bi, E., Ma, X., Wang, A., Qian, J., Dong, C., and Yi, Q. (2018). Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4+ T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors. *Cancer Cell* 33, 1048-1060.e7. 10.1016/j.ccell.2018.05.004.
23. Staudt, V., Bothur, E., Klein, M., Lingnau, K., Reuter, S., Grebe, N., Gerlitzki, B., Hoffmann, M., Ulges, A., Taube, C., et al. (2010). Interferon-Regulatory Factor 4 Is Essential for the Developmental Program of T Helper 9 Cells. *Immunity* 33, 192–202. 10.1016/j.immuni.2010.07.014.
24. Crawford, M.P., Sinha, S., Renavikar, P.S., Borcharding, N., and Karandikar, N.J. (2020). CD4 T cell-intrinsic role for the T helper 17 signature cytokine IL-17: Effector resistance to immune suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 19408–19414. 10.1073/pnas.2005010117.
25. Mickael, M.E., Bhaumik, S., and Basu, R. (2020). Retinoid-Related Orphan Receptor ROR γ t in CD4+ T-Cell-Mediated Intestinal Homeostasis and Inflammation. *Am. J. Pathol.* 190, 1984–1999. 10.1016/j.ajpath.2020.07.010.

26. Liu, X., Lee, Y.S., Yu, C.-R., and Egwuagu, C.E. (2008). Loss of STAT3 in CD4+ T Cells Prevents Development of Experimental Autoimmune Diseases. *J. Immunol.* *180*, 6070–6076. 10.4049/jimmunol.180.9.6070.
27. Tesmer, L.A., Lundy, S.K., Sarkar, S., and Fox, D.A. (2008). Th17 cells in human disease. *Immunol. Rev.* *223*, 87–113. 10.1111/j.1600-065x.2008.00628.x.
28. Curtis, M.M., and Way, S.S. (2009). Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* *126*, 177–185. 10.1111/j.1365-2567.2008.03017.x.
29. Mahmud, S.A., Manlove, L.S., and Farrar, M.A. (2013). Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function. *JAK-STAT* *2*, e23154. 10.4161/jkst.23154.
30. Passerini, L., Allan, S.E., Battaglia, M., Nunzio, S.D., Alstad, A.N., Levings, M.K., Roncarolo, M.G., and Bacchetta, R. (2008). STAT5-signaling cytokines regulate the expression of FOXP3 in CD4+CD25+ regulatory T cells and CD4+CD25- effector T cells. *Int. Immunol.* *20*, 421–431. 10.1093/intimm/dxn002.
31. Eto, D., Lao, C., DiToro, D., Barnett, B., Escobar, T.C., Kageyama, R., Yusuf, I., and Crotty, S. (2011). IL-21 and IL-6 Are Critical for Different Aspects of B Cell Immunity and Redundantly Induce Optimal Follicular Helper CD4 T Cell (Tfh) Differentiation. *PLoS ONE* *6*, e17739. 10.1371/journal.pone.0017739.
32. Wu, H., Xu, L.-L., Teuscher, P., Liu, H., Kaplan, M.H., and Dent, A.L. (2015). An Inhibitory Role for the Transcription Factor Stat3 in Controlling IL-4 and Bcl6 Expression in Follicular Helper T Cells. *J. Immunol.* *195*, 2080–2089. 10.4049/jimmunol.1500335.
33. Wu, H., Xie, M.M., Liu, H., and Dent, A.L. (2016). Stat3 Is Important for Follicular Regulatory T Cell Differentiation. *PLoS ONE* *11*, e0155040. 10.1371/journal.pone.0155040.
34. Mittrücker, H.-W., Visekruna, A., and Huber, M. (2014). Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* *62*, 449–458. 10.1007/s00005-014-0293-y.
35. Huber, M., and Lohoff, M. (2013). IRF4 Provides Rations for Cytotoxic CD8+ T Cell Soldiers. *Immunity* *39*, 797–799. 10.1016/j.immuni.2013.10.008.
36. Kaech, S.M., and Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* *12*, 749–761. 10.1038/nri3307.
37. Croft, M., Carter, L., Swain, S.L., and Dutton, R.W. (1994). Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J. Exp. Med.* *180*, 1715–1728. 10.1084/jem.180.5.1715.

38. Tang, Y., Guan, S.P., Chua, B.Y.L., Zhou, Q., Ho, A.W.S., Wong, K.H.S., Wong, K.L., Wong, W.S.F., and Kemeny, D.M. (2012). Antigen-specific effector CD8 T cells regulate allergic responses via IFN- γ and dendritic cell function. *J. Allergy Clin. Immunol.* *129*, 1611-1620.e4. 10.1016/j.jaci.2011.12.976.
39. Cho, B.-A., Sim, J.H., Park, J.A., Kim, H.W., Yoo, W.-H., Lee, S.-H., Lee, D.-S., Kang, J.S., Hwang, Y.-I., Lee, W.J., et al. (2012). Characterization of Effector Memory CD8⁺ T Cells in the Synovial Fluid of Rheumatoid Arthritis. *J. Clin. Immunol.* *32*, 709–720. 10.1007/s10875-012-9674-3.
40. Vizler, C., Bercovici, N., Heurtier, A., Pardigon, N., Goude, K., Bailly, K., Combadière, C., and Liblau, R.S. (2000). Relative Diabetogenic Properties of Islet-Specific Tc1 and Tc2 Cells in Immunocompetent Hosts. *J. Immunol.* *165*, 6314–6321. 10.4049/jimmunol.165.11.6314.
41. Cerwenka, A., Morgan, T.M., Harmsen, A.G., and Dutton, R.W. (1999). Migration Kinetics and Final Destination of Type 1 and Type 2 CD8 Effector Cells Predict Protection against Pulmonary Virus Infection. *J. Exp. Med.* *189*, 423–434. 10.1084/jem.189.2.423.
42. Lu, Y., Hong, B., Li, H., Zheng, Y., Zhang, M., Wang, S., Qian, J., and Yi, Q. (2014). Tumor-specific IL-9-producing CD8⁺ Tc9 cells are superior effector than type-I cytotoxic Tc1 cells for adoptive immunotherapy of cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 2265–2270. 10.1073/pnas.1317431111.
43. Mishra, S., Liao, W., Liu, Y., Yang, M., Ma, C., Wu, H., Zhao, M., Zhang, X., Qiu, Y., Lu, Q., et al. (2020). TGF- β and Eomes control the homeostasis of CD8⁺ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* *218*, e20200030. 10.1084/jem.20200030.
44. Brimnes, J., Allez, M., Dotan, I., Shao, L., Nakazawa, A., and Mayer, L. (2005). Defects in CD8⁺ Regulatory T Cells in the Lamina Propria of Patients with Inflammatory Bowel Disease. *J. Immunol.* *174*, 5814–5822. 10.4049/jimmunol.174.9.5814.
45. Gupta, S., Su, H., and Agrawal, S. (2020). CD8 Treg Cells Inhibit B-Cell Proliferation and Immunoglobulin Production. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *181*, 947–955. 10.1159/000509607.
46. Mishra, S., Srinivasan, S., Ma, C., and Zhang, N. (2021). CD8⁺ Regulatory T Cell – A Mystery to Be Revealed. *Front Immunol* *12*, 708874. 10.3389/fimmu.2021.708874.
47. Blattman, J.N., Antia, R., Sourdive, D.J.D., Wang, X., Kaech, S.M., Murali-Krishna, K., Altman, J.D., and Ahmed, R. (2002). Estimating the Precursor Frequency of Naive Antigen-specific CD8 T Cells. *J Exp Medicine* *195*, 657–664. 10.1084/jem.20001021.
48. Martin, M.D., and Badovinac, V.P. (2018). Defining Memory CD8 T Cell. *Front. Immunol.* *9*, 222–10. 10.3389/fimmu.2018.02692.
49. Chu, T., Tyznik, A.J., Roepke, S., Berkley, A.M., Woodward-Davis, A., Pattacini, L., Bevan, M.J., Zehn, D., and Prlic, M. (2013). Bystander-Activated Memory CD8 T Cells Control Early

Pathogen Load in an Innate-like, NKG2D-Dependent Manner. *Cell Reports* 3, 701–708. 10.1016/j.celrep.2013.02.020.

50. Kim, T.-S., and Shin, E.-C. (2019). The activation of bystander CD8⁺ T cells and their roles in viral infection. *Exp Mol Medicine* 51, 1–9. 10.1038/s12276-019-0316-1.

51. Lee, H., Jeong, S., and Shin, E.-C. (2022). Significance of bystander T cell activation in microbial infection. *Nat Immunol* 23, 13–22. 10.1038/s41590-021-00985-3.

52. Zajac, A.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D.J.D., Suresh, M., Altman, J.D., and Ahmed, R. (1998). Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells Without Effector Function. *J Exp Medicine* 188, 2205–2213. 10.1084/jem.188.12.2205.

53. Cornberg, M., Kenney, L.L., Chen, A.T., Waggoner, S.N., Kim, S.-K., Dienes, H.P., Welsh, R.M., and Selin, L.K. (2013). Clonal Exhaustion as a Mechanism to Protect Against Severe Immunopathology and Death from an Overwhelming CD8 T Cell Response. *Front Immunol* 4, 475. 10.3389/fimmu.2013.00475.

54. Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 15, 486–499. 10.1038/nri3862.

55. Kurachi, M. (2019). CD8⁺ T cell exhaustion. *Semin Immunopathol* 41, 327–337. 10.1007/s00281-019-00744-5.

56. Henning, A.N., Roychoudhuri, R., and Restifo, N.P. (2018). Epigenetic control of CD8⁺ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 18, 340–356. 10.1038/nri.2017.146.

57. Gupta, S.S., Wang, J., and Chen, M. (2020). Metabolic Reprogramming in CD8⁺ T Cells During Acute Viral Infections. *Front Immunol* 11, 1013. 10.3389/fimmu.2020.01013.

58. Aalderen, M.C. van, Biggelaar, M. van den, Remmerswaal, E.B.M., Alphen, F.P.J. van, Meijer, A.B., Berge, I.J.M. ten, and Lier, R.A.W. van (2017). Label-free Analysis of CD8⁺ T Cell Subset Proteomes Supports a Progressive Differentiation Model of Human-Virus-Specific T Cells. *Cell Reports* 19, 1068–1079. 10.1016/j.celrep.2017.04.014.

59. Lu, J., Ahmad, R., Nguyen, T., Cifello, J., Hemani, H., Li, J., Chen, J., Li, S., Wang, J., Achour, A., et al. (2022). Heterogeneity and transcriptome changes of human CD8⁺ T cells across nine decades of life. *Nat Commun* 13, 5128. 10.1038/s41467-022-32869-x.

60. Montacchiesi, G., and Pace, L. (2022). Epigenetics and CD8⁺ T cell memory*. *Immunol Rev* 305, 77–89. 10.1111/imr.13057.

61. Best, J.A., Blair, D.A., Knell, J., Yang, E., Mayya, V., Doedens, A., Dustin, M.L., Goldrath, A.W., Monach, P., Shinton, S.A., et al. (2013). Transcriptional insights into the CD8⁺ T cell response to infection and memory T cell formation. *Nat Immunol* 14, 404–412. 10.1038/ni.2536.

62. Miller, J.F.A.P. (2011). The golden anniversary of the thymus. *Nat Rev Immunol* *11*, 489–495. 10.1038/nri2993.
63. Wang, H., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2022). Thymic Microenvironment: Interactions Between Innate Immune Cells and Developing Thymocytes. *Front Immunol* *13*, 885280. 10.3389/fimmu.2022.885280.
64. Singh, J., Mohtashami, M., Anderson, G., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2020). Thymic Engraftment by in vitro-Derived Progenitor T Cells in Young and Aged Mice. *Front Immunol* *11*, 1850. 10.3389/fimmu.2020.01850.
65. Shah, D.K., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2014). An Overview of the Intrathymic Intricacies of T Cell Development. *J Immunol* *192*, 4017–4023. 10.4049/jimmunol.1302259.
66. Szondy, Z., Garabuczi, É., Tóth, K., Kiss, B., and Köröskényi, K. (2012). Thymocyte death by neglect: Contribution of engulfing macrophages. *Eur. J. Immunol.* *42*, 1662–1667. 10.1002/eji.201142338.
67. Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., Boehmer, H. von, Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., et al. (2002). Projection of an Immunological Self Shadow Within the Thymus by the Aire Protein. *Science* *298*, 1395–1401. 10.1126/science.1075958.
68. Takaba, H., Morishita, Y., Tomofuji, Y., Danks, L., Nitta, T., Komatsu, N., Kodama, T., and Takayanagi, H. (2015). Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell* *163*, 975–987. 10.1016/j.cell.2015.10.013.
69. Michelson, D.A., Hase, K., Kaisho, T., Benoist, C., and Mathis, D. (2022). Thymic epithelial cells co-opt lineage-defining transcription factors to eliminate autoreactive T cells. *Cell* *185*, 2542–2558.e18. 10.1016/j.cell.2022.05.018.
70. Allende, M.L., Dreier, J.L., Mandala, S., and Proia, R.L. (2004). Expression of the Sphingosine 1-Phosphate Receptor, S1P1, on T-cells Controls Thymic Emigration*. *J Biol Chem* *279*, 15396–15401. 10.1074/jbc.m314291200.
71. Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* *427*, 355–360. 10.1038/nature02284.
72. Weinreich, M.A., and Hogquist, K.A. (2008). Thymic Emigration: When and How T Cells Leave Home. *J Immunol* *181*, 2265–2270. 10.4049/jimmunol.181.4.2265.
73. Resop, R.S., Douaisi, M., Craft, J., Jachimowski, L.C.M., Blom, B., and Uittenbogaart, C.H. (2016). Sphingosine-1-phosphate/sphingosine-1-phosphate receptor 1 signaling is required for migration of naive human T cells from the thymus to the periphery. *J Allergy Clin Immun* *138*, 551–557.e8. 10.1016/j.jaci.2015.12.1339.

74. Cho, B.K., Rao, V.P., Ge, Q., Eisen, H.N., and Chen, J. (2000). Homeostasis-Stimulated Proliferation Drives Naive T Cells to Differentiate Directly into Memory T Cells. *J Exp Medicine* *192*, 549–556. 10.1084/jem.192.4.549.
75. Min, B. (2018). Spontaneous T Cell Proliferation: A Physiologic Process to Create and Maintain Homeostatic Balance and Diversity of the Immune System. *Front Immunol* *9*, 547. 10.3389/fimmu.2018.00547.
76. Goldrath, A.W., Bogatzki, L.Y., and Bevan, M.J. (2000). Naive T Cells Transiently Acquire a Memory-like Phenotype during Homeostasis-Driven Proliferation. *J Exp Medicine* *192*, 557–564. 10.1084/jem.192.4.557.
77. Tan, J.T., Ernst, B., Kieper, W.C., LeRoy, E., Sprent, J., and Surh, C.D. (2002). Interleukin (IL)-15 and IL-7 Jointly Regulate Homeostatic Proliferation of Memory Phenotype CD8⁺ Cells but Are Not Required for Memory Phenotype CD4⁺ Cells. *J Exp Medicine* *195*, 1523–1532. 10.1084/jem.20020066.
78. Braun, A., Worbs, T., Moschovakis, G.L., Halle, S., Hoffmann, K., Bölter, J., Münk, A., and Förster, R. (2011). Afferent lymph-derived T cells and DCs use different chemokine receptor CCR7-dependent routes for entry into the lymph node and intranodal migration. *Nat Immunol* *12*, 879–887. 10.1038/ni.2085.
79. Denton, A.E., Roberts, E.W., Linterman, M.A., and Fearon, D.T. (2014). Fibroblastic reticular cells of the lymph node are required for retention of resting but not activated CD8⁺ T cells. *Proc National Acad Sci* *111*, 12139–12144. 10.1073/pnas.1412910111.
80. Asperti-Boursin, F., Real, E., Bismuth, G., Trautmann, A., and Donnadieu, E. (2007). CCR7 ligands control basal T cell motility within lymph node slices in a phosphoinositide 3-kinase-independent manner. *J Exp Medicine* *204*, 1167–1179. 10.1084/jem.20062079.
81. Woolf, E., Grigorova, I., Sagiv, A., Grabovsky, V., Feigelson, S.W., Shulman, Z., Hartmann, T., Sixt, M., Cyster, J.G., and Alon, R. (2007). Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces. *Nat Immunol* *8*, 1076–1085. 10.1038/ni1499.
82. Krummel, M.F., Bartumeus, F., and Gérard, A. (2016). T cell migration, search strategies and mechanisms. *Nat Rev Immunol* *16*, 193–201. 10.1038/nri.2015.16.
83. Malhotra, D., Fletcher, A.L., Astarita, J., Lukacs-Kornek, V., Tayalia, P., Gonzalez, S.F., Elpek, K.G., Chang, S.K., Knoblich, K., Hemler, M.E., et al. (2012). Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks. *Nat Immunol* *13*, 499–510. 10.1038/ni.2262.
84. Kirberg, J., Berns, A., and Boehmer, H. von (1997). Peripheral T Cell Survival Requires Continual Ligation of the T Cell Receptor to Major Histocompatibility Complex-Encoded Molecules. *J Exp Medicine* *186*, 1269–1275. 10.1084/jem.186.8.1269.

85. Labrecque, N., Whitfield, L.S., Obst, R., Waltzinger, C., Benoist, C., and Mathis, D. (2001). How Much TCR Does a T Cell Need? *Immunity* *15*, 71–82. 10.1016/s1074-7613(01)00170-4.
86. Polic, B., Kunkel, D., Scheffold, A., and Rajewsky, K. (2001). How $\alpha\beta$ T cells deal with induced TCR α ablation. *Proc National Acad Sci* *98*, 8744–8749. 10.1073/pnas.141218898.
87. Nešić, D., and Vukmanović, S. (1998). MHC Class I Is Required for Peripheral Accumulation of CD8⁺ Thymic Emigrants. *J Immunol* *160*, 3705–3712. 10.4049/jimmunol.160.8.3705.
88. Takada, K., and Jameson, S.C. (2009). Self-class I MHC molecules support survival of naive CD8 T cells, but depress their functional sensitivity through regulation of CD8 expression levels. *J Exp Med* *206*, 2253–2269. 10.1084/jem.20082553.
89. Ernst, B., Lee, D.-S., Chang, J.M., Sprent, J., and Surh, C.D. (1999). The Peptide Ligands Mediating Positive Selection in the Thymus Control T Cell Survival and Homeostatic Proliferation in the Periphery. *Immunity* *11*, 173–181. 10.1016/s1074-7613(00)80092-8.
90. Tan, J.T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K.I., and Surh, C.D. (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naïve T cells. *Proc National Acad Sci* *98*, 8732–8737. 10.1073/pnas.161126098.
91. Rathmell, J.C., Farkash, E.A., Gao, W., and Thompson, C.B. (2001). IL-7 Enhances the Survival and Maintains the Size of Naïve T Cells. *J Immunol* *167*, 6869–6876. 10.4049/jimmunol.167.12.6869.
92. Vivien, L., Benoist, C., and Mathis, D. (2001). T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. *Int Immunol* *13*, 763–768. 10.1093/intimm/13.6.763.
93. Kimura, M.Y., Pobeziński, L.A., Guintier, T.I., Thomas, J., Adams, A., Park, J.-H., Tai, X., and Singer, A. (2012). IL-7 signaling must be intermittent, not continuous, during CD8⁺ T cell homeostasis to promote cell survival instead of cell death. *Nat Immunol* *14*, 143–151. 10.1038/ni.2494.
94. Jacobs, S.R., Michalek, R.D., and Rathmell, J.C. (2010). IL-7 Is Essential for Homeostatic Control of T Cell Metabolism In Vivo. *J Immunol* *184*, 3461–3469. 10.4049/jimmunol.0902593.
95. Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C., and Lefrançois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* *1*, 426–432. 10.1038/80868.
96. Wofford, J.A., Wieman, H.L., Jacobs, S.R., Zhao, Y., and Rathmell, J.C. (2008). IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood* *111*, 2101–2111. 10.1182/blood-2007-06-096297.

97. Berard, M., Brandt, K., Paus, S.B., and Tough, D.F. (2003). IL-15 Promotes the Survival of Naive and Memory Phenotype CD8⁺ T Cells. *J Immunol* *170*, 5018–5026. 10.4049/jimmunol.170.10.5018.
98. Freedden-Jeffry, U. von, Solvason, N., Howard, M., and Murray, R. (1997). The Earliest T Lineage–Committed Cells Depend on IL-7 for Bcl-2 Expression and Normal Cell Cycle Progression. *Immunity* *7*, 147–154. 10.1016/s1074-7613(00)80517-8.
99. Opferman, J.T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M.D., Ong, C.C., and Korsmeyer, S.J. (2003). Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* *426*, 671–676. 10.1038/nature02067.
100. Chapman, N.M., and Chi, H. (2018). Hallmarks of T-cell Exit from Quiescence. *Cancer Immunol Res* *6*, 502–508. 10.1158/2326-6066.cir-17-0605.
101. Bennett, T.J., Udupa, V.A.V., and Turner, S.J. (2020). Running to Stand Still: Naive CD8⁺ T Cells Actively Maintain a Program of Quiescence. *Int J Mol Sci* *21*, 9773. 10.3390/ijms21249773.
102. Scharer, C.D., Barwick, B.G., Youngblood, B.A., Ahmed, R., and Boss, J.M. (2013). Global DNA Methylation Remodeling Accompanies CD8 T Cell Effector Function. *J Immunol* *191*, 3419–3429. 10.4049/jimmunol.1301395.
103. Buckley, A.F., Kuo, C.T., and Leiden, J.M. (2001). Transcription factor LKLF is sufficient to program T cell quiescence via a c-Myc–dependent pathway. *Nat Immunol* *2*, 698–704. 10.1038/90633.
104. Kerdiles, Y.M., Beisner, D.R., Tinoco, R., Dejean, A.S., Castrillon, D.H., DePinho, R.A., and Hedrick, S.M. (2009). Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat Immunol* *10*, 176–184. 10.1038/ni.1689.
105. Delpoux, A., Marcel, N., Michelini, R.H., Katayama, C.D., Allison, K.A., Glass, C.K., Quiñones-Parra, S.M., Murre, C., Loh, L., Kedzierska, K., et al. (2021). FOXO1 constrains activation and regulates senescence in CD8 T cells. *Cell Reports* *34*, 108674. 10.1016/j.celrep.2020.108674.
106. Roychoudhuri, R., Clever, D., Li, P., Wakabayashi, Y., Quinn, K.M., Klebanoff, C.A., Ji, Y., Sukumar, M., Eil, R.L., Yu, Z., et al. (2016). BACH2 regulates CD8⁺ T cell differentiation by controlling access of AP-1 factors to enhancers. *Nat Immunol* *17*, 851–860. 10.1038/ni.3441.
107. Shan, Q., Zhu, S., Chen, X., Liu, J., Yuan, S., Li, X., Peng, W., and Xue, H.-H. (2022). Tcf1–CTCF cooperativity shapes genomic architecture to promote CD8⁺ T cell homeostasis. *Nat Immunol* *23*, 1222–1235. 10.1038/s41590-022-01263-6.
108. Danilo, M., Chennupati, V., Silva, J.G., Siegert, S., and Held, W. (2018). Suppression of Tcf1 by Inflammatory Cytokines Facilitates Effector CD8 T Cell Differentiation. *Cell Reports* *22*, 2107–2117. 10.1016/j.celrep.2018.01.072.

109. Ladle, B.H., Li, K.-P., Phillips, M.J., Pucsek, A.B., Haile, A., Powell, J.D., Jaffee, E.M., Hildeman, D.A., and Gamper, C.J. (2016). De novo DNA methylation by DNA methyltransferase 3a controls early effector CD8 +T-cell fate decisions following activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *113*, 10631–10636. 10.1073/pnas.1524490113.
110. Johnson, J.L., Georgakilas, G., Petrovic, J., Kurachi, M., Cai, S., Harly, C., Pear, W.S., Bhandoola, A., Wherry, E.J., and Vahedi, G. (2018). Lineage-Determining Transcription Factor TCF-1 Initiates the Epigenetic Identity of T Cells. *Immunity* *48*, 243-257.e10. 10.1016/j.immuni.2018.01.012.
111. Crompton, J.G., Narayanan, M., Cuddapah, S., Roychoudhuri, R., Ji, Y., Yang, W., Patel, S.J., Sukumar, M., Palmer, D.C., Peng, W., et al. (2016). Lineage relationship of CD8+ T cell subsets is revealed by progressive changes in the epigenetic landscape. *Cell Mol Immunol* *13*, 502–513. 10.1038/cmi.2015.32.
112. Xing, S., Li, F., Zeng, Z., Zhao, Y., Yu, S., Shan, Q., Li, Y., Phillips, F.C., Maina, P.K., Qi, H.H., et al. (2016). Tcf1 and Lef1 transcription factors establish CD8+ T cell identity through intrinsic HDAC activity. *Nat Immunol* *17*, 695–703. 10.1038/ni.3456.
113. Tiemessen, M.M., Baert, M.R.M., Kok, L., Eggermond, M.C.J.A. van, Elsen, P.J. van den, Arens, R., and Staal, F.J.T. (2014). T Cell Factor 1 Represses CD8 +Effector T Cell Formation and Function. *The Journal of Immunology* *193*, 5480–5487. 10.4049/jimmunol.1303417.
114. Gerlach, C., Heijst, J.W.J. van, Swart, E., Sie, D., Armstrong, N., Kerkhoven, R.M., Zehn, D., Bevan, M.J., Schepers, K., and Schumacher, T.N.M. (2010). One naive T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation. *J Exp Medicine* *207*, 1235–1246. 10.1084/jem.20091175.
115. Wu, L., Wei, Q., Brzostek, J., and Gascoigne, N.R.J. (2020). Signaling from T cell receptors (TCRs) and chimeric antigen receptors (CARs) on T cells. *Cell Mol Immunol* *17*, 600–612. 10.1038/s41423-020-0470-3.
116. Gaud, G., Lesourne, R., and Love, P.E. (2018). Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol* *18*, 485–497. 10.1038/s41577-018-0020-8.
117. Hwang, J.-R., Byeon, Y., Kim, D., and Park, S.-G. (2020). Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Exp Mol Medicine* *52*, 750–761. 10.1038/s12276-020-0435-8.
118. Mørch, A.M., Bálint, Š., Santos, A.M., Davis, S.J., and Dustin, M.L. (2020). Coreceptors and TCR Signaling – the Strong and the Weak of It. *Frontiers Cell Dev Biology* *8*, 597627. 10.3389/fcell.2020.597627.
119. Shaw, A.S., Chalupny, J., Whitney, J.A., Hammond, C., Amrein, K.E., Kavathas, P., Sefton, B.M., and Rose, J.K. (1990). Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the amino-terminal domain of the p56lck tyrosine protein kinase. *Mol Cell Biol* *10*, 1853–1862. 10.1128/mcb.10.5.1853-1862.1990.

120. Norment, A.M., Salter, R.D., Parham, P., Engelhard, V.H., and Littman, D.R. (1988). Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature* *336*, 79–81. 10.1038/336079a0.
121. Thill, P.A., Weiss, A., and Chakraborty, A.K. (2016). Phosphorylation of a Tyrosine Residue on Zap70 by Lck and Its Subsequent Binding via an SH2 Domain May Be a Key Gatekeeper of T Cell Receptor Signaling In Vivo. *Mol Cell Biol* *36*, 2396–2402. 10.1128/mcb.00165-16.
122. Chakraborty, A.K., and Weiss, A. (2014). Insights into the initiation of TCR signaling. *Nat Immunol* *15*, 798–807. 10.1038/ni.2940.
123. Heyeck, S.D., Wilcox, H.M., Bunnell, S.C., and Berg, L.J. (1997). Lck Phosphorylates the Activation Loop Tyrosine of the Itk Kinase Domain and Activates Itk Kinase Activity*. *J Biol Chem* *272*, 25401–25408. 10.1074/jbc.272.40.25401.
124. Han, J., Das, B., Wei, W., Aelst, L.V., Mosteller, R.D., Khosravi-Far, R., Westwick, J.K., Der, C.J., and Broek, D. (1997). Lck regulates Vav activation of members of the Rho family of GTPases. *Mol Cell Biol* *17*, 1346–1353. 10.1128/mcb.17.3.1346.
125. Courtney, A.H., Lo, W.-L., and Weiss, A. (2017). TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation. *Trends Biochem Sci* *43*, 108–123. 10.1016/j.tibs.2017.11.008.
126. Das, J., Ho, M., Zikherman, J., Govern, C., Yang, M., Weiss, A., Chakraborty, A.K., and Roose, J.P. (2009). Digital Signaling and Hysteresis Characterize Ras Activation in Lymphoid Cells. *Cell* *136*, 337–351. 10.1016/j.cell.2008.11.051.
127. Chalmers, C.J., Gilley, R., March, H.N., Balmanno, K., and Cook, S.J. (2007). The duration of ERK1/2 activity determines the activation of c-Fos and Fra-1 and the composition and quantitative transcriptional output of AP-1. *Cell Signal* *19*, 695–704. 10.1016/j.cellsig.2006.09.001.
128. Paul, S., and Schaefer, B.C. (2013). A new look at T cell receptor signaling to nuclear factor- κ B. *Trends Immunol* *34*, 269–281. 10.1016/j.it.2013.02.002.
129. Schwartz, R.H. (2003). T CELL ANERGY*. *Immunology* *21*, 305–334. 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141110.
130. Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 227–242. 10.1038/nri3405.
131. Kim, E.H., and Suresh, M. (2013). Role of PI3K/Akt signaling in memory CD8 T cell differentiation. *Front Immunol* *4*, 20. 10.3389/fimmu.2013.00020.
132. Porciello, N., and Tuosto, L. (2016). CD28 costimulatory signals in T lymphocyte activation: Emerging functions beyond a qualitative and quantitative support to TCR signalling. *Cytokine Growth F R* *28*, 11–19. 10.1016/j.cytogfr.2016.02.004.

133. Janardhan, S.V., Praveen, K., Marks, R., and Gajewski, T.F. (2011). Evidence Implicating the Ras Pathway in Multiple CD28 Costimulatory Functions in CD4⁺ T Cells. *Plos One* 6, e24931. 10.1371/journal.pone.0024931.
134. Harada, Y., Ohgai, D., Watanabe, R., Okano, K., Koiwai, O., Tanabe, K., Toma, H., Altman, A., and Abe, R. (2003). A Single Amino Acid Alteration in Cytoplasmic Domain Determines IL-2 Promoter Activation by Ligation of CD28 but Not Inducible Costimulator (ICOS). *J Exp Medicine* 197, 257–262. 10.1084/jem.20021305.
135. Boomer, J.S., and Green, J.M. (2010). An Enigmatic Tail of CD28 Signaling. *Csh Perspect Biol* 2, a002436. 10.1101/cshperspect.a002436.
136. Kumari, S., Colin-York, H., Irvine, D.J., and Fritzsche, M. (2019). Not All T Cell Synapses Are Built the Same Way. *Trends Immunol* 40, 977–980. 10.1016/j.it.2019.09.009.
137. Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation. *Science* 285, 221–227. 10.1126/science.285.5425.221.
138. Zumerle, S., Molon, B., and Viola, A. (2017). Membrane Rafts in T Cell Activation: A Spotlight on CD28 Costimulation. *Front. Immunol.* 8, 1467. 10.3389/fimmu.2017.01467.
139. Rossy, J., Williamson, D.J., Benzing, C., and Gaus, K. (2012). The integration of signaling and the spatial organization of the T cell synapse. *Front. Immunol.* 3, 352. 10.3389/fimmu.2012.00352.
140. Bi, K., Tanaka, Y., Coudronniere, N., Sugie, K., Hong, S., Stipdonk, M.J.B. van, and Altman, A. (2001). Antigen-induced translocation of PKC- θ to membrane rafts is required for T cell activation. *Nat. Immunol.* 2, 556–563. 10.1038/88765.
141. Tavano, R., Gri, G., Molon, B., Marinari, B., Rudd, C.E., Tuosto, L., and Viola, A. (2004). CD28 and Lipid Rafts Coordinate Recruitment of Lck to the Immunological Synapse of Human T Lymphocytes. *J. Immunol.* 173, 5392–5397. 10.4049/jimmunol.173.9.5392.
142. Capitani, N., and Baldari, C.T. (2022). The Immunological Synapse: An Emerging Target for Immune Evasion by Bacterial Pathogens. *Front. Immunol.* 13, 943344. 10.3389/fimmu.2022.943344.
143. Huppa, J.B., and Davis, M.M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 3, 973–983. 10.1038/nri1245.
144. Alarcón, B., Mestre, D., and Martínez-Martín, N. (2011). The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering? *Immunology* 133, 420–425. 10.1111/j.1365-2567.2011.03458.x.

145. Curtsinger, J.M., Schmidt, C.S., Mondino, A., Lins, D.C., Kedl, R.M., Jenkins, M.K., and Mescher, M.F. (1999). Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol Baltim Md 1950* *162*, 3256–3262.
146. Curtsinger, J.M., Lins, D.C., and Mescher, M.F. (2003). Signal 3 Determines Tolerance versus Full Activation of Naive CD8 T Cells. *J Exp Medicine* *197*, 1141–1151. 10.1084/jem.20021910.
147. Swiecki, M., and Colonna, M. (2011). Type I interferons: diversity of sources, production pathways and effects on immune responses. *Curr Opin Virol* *1*, 463–475. 10.1016/j.coviro.2011.10.026.
148. McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O’Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* *15*, 87–103. 10.1038/nri3787.
149. Mesev, E.V., LeDesma, R.A., and Ploss, A. (2019). Decoding type I and III interferon signalling during viral infection. *Nat. Microbiol.* *4*, 914–924. 10.1038/s41564-019-0421-x.
150. Plataniias, L.C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* *5*, 375–386. 10.1038/nri1604.
151. Lin, J.-X., and Leonard, W.J. (2019). Fine-Tuning Cytokine Signals. *Annu Rev Immunol* *37*, 1–30. 10.1146/annurev-immunol-042718-041447.
152. Crouse, J., Kalinke, U., and Oxenius, A. (2015). Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nat Rev Immunol* *15*, 231–242. 10.1038/nri3806.
153. Gil, M.P., Salomon, R., Louten, J., and Biron, C.A. (2006). Modulation of STAT1 protein levels: a mechanism shaping CD8 T-cell responses in vivo. *Blood* *107*, 987–993. 10.1182/blood-2005-07-2834.
154. Curtsinger, J.M., Valenzuela, J.O., Agarwal, P., Lins, D., and Mescher, M.F. (2005). Cutting Edge: Type I IFNs Provide a Third Signal to CD8 T Cells to Stimulate Clonal Expansion and Differentiation. *J Immunol* *174*, 4465–4469. 10.4049/jimmunol.174.8.4465.
155. Marrack, P., Kappler, J., and Mitchell, T. (1999). Type I Interferons Keep Activated T Cells Alive. *J Exp Medicine* *189*, 521–530. 10.1084/jem.189.3.521.
156. Kolumam, G.A., Thomas, S., Thompson, L.J., Sprent, J., and Murali-Krishna, K. (2005). Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Medicine* *202*, 637–650. 10.1084/jem.20050821.
157. Thompson, L.J., Kolumam, G.A., Thomas, S., and Murali-Krishna, K. (2006). Innate Inflammatory Signals Induced by Various Pathogens Differentially Dictate the IFN-I Dependence of CD8 T Cells for Clonal Expansion and Memory Formation. *J Immunol* *177*, 1746–1754. 10.4049/jimmunol.177.3.1746.

158. Wiesel, M., Crouse, J., Bedenikovic, G., Sutherland, A., Joller, N., and Oxenius, A. (2012). Type-I IFN drives the differentiation of short-lived effector CD8⁺ T cells in vivo. *Eur. J. Immunol.* *42*, 320–329. 10.1002/eji.201142091.
159. Xu, H.C., Grusdat, M., Pandyra, A.A., Polz, R., Huang, J., Sharma, P., Deenen, R., Köhrer, K., Rahbar, R., Diefenbach, A., et al. (2014). Type I Interferon Protects Antiviral CD8⁺ T Cells from NK Cell Cytotoxicity. *Immunity* *40*, 949–960. 10.1016/j.immuni.2014.05.004.
160. Crouse, J., Bedenikovic, G., Wiesel, M., Ibberson, M., Xenarios, I., Laer, D.V., Kalinke, U., Vivier, E., Jonjic, S., and Oxenius, A. (2014). Type I Interferons Protect T Cells against NK Cell Attack Mediated by the Activating Receptor NCR1. *Immunity* *40*, 961–973. 10.1016/j.immuni.2014.05.003.
161. Hamza, T., Barnett, J.B., and Li, B. (2010). Interleukin 12 a Key Immunoregulatory Cytokine in Infection Applications. *Int J Mol Sci* *11*, 789–806. 10.3390/ijms11030789.
162. Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* *3*, 133–146. 10.1038/nri1001.
163. Cheng, E.M., Tsarovsky, N.W., Sondel, P.M., and Rakhmievich, A.L. (2022). Interleukin-12 as an in situ cancer vaccine component: a review. *Cancer Immunol Immunother* *71*, 2057–2065. 10.1007/s00262-022-03144-1.
164. Valenzuela, J., Schmidt, C., and Mescher, M. (2002). The Roles of IL-12 in Providing a Third Signal for Clonal Expansion of Naive CD8 T Cells. *J Immunol* *169*, 6842–6849. 10.4049/jimmunol.169.12.6842.
165. Keppler, S.J., Rosenits, K., Koegl, T., Vucikujja, S., and Aichele, P. (2012). Signal 3 Cytokines as Modulators of Primary Immune Responses during Infections: The Interplay of Type I IFN and IL-12 in CD8 T Cell Responses. *Plos One* *7*, e40865. 10.1371/journal.pone.0040865.
166. Pipkin, M.E., Sacks, J.A., Cruz-Guilloty, F., Lichtenheld, M.G., Bevan, M.J., and Rao, A. (2010). Interleukin-2 and Inflammation Induce Distinct Transcriptional Programs that Promote the Differentiation of Effector Cytolytic T Cells. *Immunity* *32*, 79–90. 10.1016/j.immuni.2009.11.012.
167. Joshi, N.S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H.K., Urso, D.R., Hagman, J., Gapin, L., and Kaech, S.M. (2007). Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8⁺ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity* *27*, 281–295. 10.1016/j.immuni.2007.07.010.
168. Keppler, S.J., Theil, K., Vucikujja, S., and Aichele, P. (2009). Effector T-cell differentiation during viral and bacterial infections: Role of direct IL-12 signals for cell fate decision of CD8⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* *39*, 1774–1783. 10.1002/eji.200839093.
169. Chang, J., Cho, J.-H., Lee, S.-W., Choi, S.-Y., Ha, S.-J., and Sung, Y.-C. (2004). IL-12 Priming during In Vitro Antigenic Stimulation Changes Properties of CD8 T Cells and Increases

Generation of Effector and Memory Cells. *J Immunol* 172, 2818–2826. 10.4049/jimmunol.172.5.2818.

170. Toumi, R., Yuzefpolskiy, Y., Vegaraju, A., Xiao, H., Smith, K.A., Sarkar, S., and Kalia, V. (2022). Autocrine and paracrine IL-2 signals collaborate to regulate distinct phases of CD8 T cell memory. *Cell Reports* 39, 110632. 10.1016/j.celrep.2022.110632.

171. Whyte, C.E., Singh, K., Burton, O.T., Aloulou, M., Kouser, L., Veiga, R.V., Dashwood, A., Okkenhaug, H., Benadda, S., Moudra, A., et al. (2022). Context-dependent effects of IL-2 rewire immunity into distinct cellular circuits. *J Exp Medicine* 219, e20212391. 10.1084/jem.20212391.

172. Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Medicine* 201, 723–735. 10.1084/jem.20041982.

173. Malek, T.R. (2008). The Biology of Interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 26, 453–479. 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090357.

174. Granucci, F., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Feau, S., Persico, M., Virzi, E., Rescigno, M., Moro, G., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* 2, 882–888. 10.1038/ni0901-882.

175. Hashimoto, M., Im, S.J., Araki, K., and Ahmed, R. (2019). Cytokine-Mediated Regulation of CD8 T-Cell Responses During Acute and Chronic Viral Infection. *Csh Perspect Biol* 11, a028464. 10.1101/cshperspect.a028464.

176. Kalia, V., Sarkar, S., Subramaniam, S., Haining, W.N., Smith, K.A., and Ahmed, R. (2010). Prolonged Interleukin-2R α Expression on Virus-Specific CD8⁺ T Cells Favors Terminal-Effector Differentiation In Vivo. *Immunity* 32, 91–103. 10.1016/j.immuni.2009.11.010.

177. Rutishauser, R.L., Martins, G.A., Kalachikov, S., Chandele, A., Parish, I.A., Meffre, E., Jacob, J., Calame, K., and Kaech, S.M. (2009). Transcriptional Repressor Blimp-1 Promotes CD8⁺ T Cell Terminal Differentiation and Represses the Acquisition of Central Memory T Cell Properties. *Immunity* 31, 296–308. 10.1016/j.immuni.2009.05.014.

178. Kallies, A., Xin, A., Belz, G.T., and Nutt, S.L. (2009). Blimp-1 Transcription Factor Is Required for the Differentiation of Effector CD8⁺ T Cells and Memory Responses. *Immunity* 31, 283–295. 10.1016/j.immuni.2009.06.021.

179. Gong, D., and Malek, T.R. (2007). Cytokine-Dependent Blimp-1 Expression in Activated T Cells Inhibits IL-2 Production. *J Immunol* 178, 242–252. 10.4049/jimmunol.178.1.242.

180. Mitchell, D.M., Ravkov, E.V., and Williams, M.A. (2010). Distinct Roles for IL-2 and IL-15 in the Differentiation and Survival of CD8⁺ Effector and Memory T Cells. *J Immunol* 184, 6719–6730. 10.4049/jimmunol.0904089.

181. Castro, F., Cardoso, A.P., Gonçalves, R.M., Serre, K., and Oliveira, M.J. (2018). Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front Immunol* 9, 847. 10.3389/fimmu.2018.00847.
182. Krummel, M.F., Mahale, J.N., Uhl, L.F.K., Hardison, E.A., Mujal, A.M., Mazet, J.M., Weber, R.J., Gartner, Z.J., and Gérard, A. (2018). Paracrine costimulation of IFN- γ signaling by integrins modulates CD8 T cell differentiation. *Proc National Acad Sci* 115, 201804556. 10.1073/pnas.1804556115.
183. Whitmire, J.K., Tan, J.T., and Whitton, J.L. (2005). Interferon- γ acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. *J Exp Medicine* 201, 1053–1059. 10.1084/jem.20041463.
184. Bhat, P., Leggatt, G., Waterhouse, N., and Frazer, I.H. (2017). Interferon- γ derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell Death Dis* 8, e2836–e2836. 10.1038/cddis.2017.67.
185. Curtsinger, J.M., Agarwal, P., Lins, D.C., and Mescher, M.F. (2012). Autocrine IFN- γ Promotes Naive CD8 T Cell Differentiation and Synergizes with IFN- α To Stimulate Strong Function. *J Immunol* 189, 659–668. 10.4049/jimmunol.1102727.
186. Laidlaw, B.J., Craft, J.E., and Kaech, S.M. (2016). The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory. *Nat Rev Immunol* 16, 102–111. 10.1038/nri.2015.10.
187. Borst, J., Ahrends, T., Bąbała, N., Melief, C.J.M., and Kastenmüller, W. (2018). CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 18, 635–647. 10.1038/s41577-018-0044-0.
188. Bennett, S.R.M., Carbone, F.R., Karamalis, F., Flavell, R.A., Miller, J.F.A.P., and Heath, W.R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393, 478–480. 10.1038/30996.
189. Smith, C.M., Wilson, N.S., Waithman, J., Villadangos, J.A., Carbone, F.R., Heath, W.R., and Belz, G.T. (2004). Cognate CD4+ T cell licensing of dendritic cells in CD8+ T cell immunity. *Nat Immunol* 5, 1143–1148. 10.1038/ni1129.
190. Greyer, M., Whitney, P.G., Stock, A.T., Davey, G.M., Tebartz, C., Bachem, A., Mintern, J.D., Strugnell, R.A., Turner, S.J., Gebhardt, T., et al. (2016). T Cell Help Amplifies Innate Signals in CD8+ DCs for Optimal CD8+ T Cell Priming. *Cell Reports* 14, 586–597. 10.1016/j.celrep.2015.12.058.
191. Prilliman, K.R., Lemmens, E.E., Palioungas, G., Wolfe, T.G., Allison, J.P., Sharpe, A.H., and Schoenberger, S.P. (2002). Cutting Edge: A Crucial Role for B7-CD28 in Transmitting T Help from APC to CTL. *J Immunol* 169, 4094–4097. 10.4049/jimmunol.169.8.4094.

192. Castellino, F., and Germain, R.N. (2007). Chemokine-Guided CD4+ T Cell Help Enhances Generation of IL-6R α highIL-7R α high Prememory CD8+ T Cells. *J Immunol* *178*, 778–787. 10.4049/jimmunol.178.2.778.
193. Greyer, M., Whitney, P.G., Stock, A.T., Davey, G.M., Tebartz, C., Bachem, A., Mintern, J.D., Strugnell, R.A., Turner, S.J., Gebhardt, T., et al. (2016). T Cell Help Amplifies Innate Signals in CD8+ DCs for Optimal CD8+ T Cell Priming. *CellReports* *14*, 586–597. 10.1016/j.celrep.2015.12.058.
194. Filatenkov, A.A., Jacovetty, E.L., Fischer, U.B., Curtsinger, J.M., Mescher, M.F., and Ingulli, E. (2005). CD4 T Cell-Dependent Conditioning of Dendritic Cells to Produce IL-12 Results in CD8-Mediated Graft Rejection and Avoidance of Tolerance. *J Immunol* *174*, 6909–6917. 10.4049/jimmunol.174.11.6909.
195. Hinrichs, C.S., Spolski, R., Paulos, C.M., Gattinoni, L., Kerstann, K.W., Palmer, D.C., Klebanoff, C.A., Rosenberg, S.A., Leonard, W.J., and Restifo, N.P. (2008). IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8+ T cells for adoptive immunotherapy. *Blood* *111*, 5326–5333. 10.1182/blood-2007-09-113050.
196. Zhang, S., Zhang, H., and Zhao, J. (2009). The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. *Biochem Bioph Res Co* *384*, 405–408. 10.1016/j.bbrc.2009.04.134.
197. Janssen, E.M., Lemmens, E.E., Wolfe, T., Christen, U., Herrath, M.G. von, and Schoenberger, S.P. (2003). CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* *421*, 852–856. 10.1038/nature01441.
198. Williams, M.A., Tyznik, A.J., and Bevan, M.J. (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* *441*, 890–893. 10.1038/nature04790.
199. Kumaraguru, U., Banerjee, K., and Rouse, B.T. (2005). In vivo rescue of defective memory CD8 + T cells by cognate helper T cells. *J Leukocyte Biol* *78*, 879–887. 10.1189/jlb.0105007.
200. Spolski, R., and Leonard, W.J. (2014). Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* *13*, 379–395. 10.1038/nrd4296.
201. Mehta, D.S., Wurster, A.L., and Grusby, M.J. (2004). Biology of IL-21 and the IL-21 receptor. *Immunol Rev* *202*, 84–95. 10.1111/j.0105-2896.2004.00201.x.
202. Zander, R., Schauder, D., Xin, G., Nguyen, C., Wu, X., Zajac, A., and Cui, W. (2019). CD4+ T Cell Help Is Required for the Formation of a Cytolytic CD8+ T Cell Subset that Protects against Chronic Infection and Cancer. *Immunity* *51*, 1028-1042.e4. 10.1016/j.immuni.2019.10.009.
203. Obar, J.J., Molloy, M.J., Jellison, E.R., Stoklasek, T.A., Zhang, W., Usherwood, E.J., and Lefrançois, L. (2010). CD4+ T cell regulation of CD25 expression controls development of short-

lived effector CD8⁺ T cells in primary and secondary responses. *Proc National Acad Sci* 107, 193–198. 10.1073/pnas.0909945107.

204. Janssen, E.M., Droin, N.M., Lemmens, E.E., Pinkoski, M.J., Bensinger, S.J., Ehst, B.D., Griffith, T.S., Green, D.R., and Schoenberger, S.P. (2005). CD4⁺ T-cell help controls CD8⁺ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 434, 88–93. 10.1038/nature03337.

205. Ahrends, T., Busselaar, J., Severson, T.M., Bąbała, N., Vries, E. de, Bovens, A., Wessels, L., Leeuwen, F. van, and Borst, J. (2019). CD4⁺ T cell help creates memory CD8⁺ T cells with innate and help-independent recall capacities. *Nat Commun* 10, 5531. 10.1038/s41467-019-13438-1.

206. Wang, D., Diao, H., Getzler, A.J., Rogal, W., Frederick, M.A., Milner, J., Yu, B., Crotty, S., Goldrath, A.W., and Pipkin, M.E. (2018). The Transcription Factor Runx3 Establishes Chromatin Accessibility of cis-Regulatory Landscapes that Drive Memory Cytotoxic T Lymphocyte Formation. *Immunity* 48, 659-674.e6. 10.1016/j.immuni.2018.03.028.

207. Cruz-Guilloty, F., Pipkin, M.E., Djuretic, I.M., Levanon, D., Lotem, J., Lichtenheld, M.G., Groner, Y., and Rao, A. (2009). Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J Exp Med* 206, 51–59. 10.1084/jem.20081242.

208. Shan, Q., Zeng, Z., Xing, S., Li, F., Hartwig, S.M., Gullicksrud, J.A., Kurup, S.P., Braeckel-Budimir, N.V., Su, Y., Martin, M.D., et al. (2017). The transcription factor Runx3 guards cytotoxic CD8⁺ effector T cells against deviation towards follicular helper T cell lineage. *Nat Immunol* 18, 931–939. 10.1038/ni.3773.

209. Kurachi, M., Barnitz, R.A., Yosef, N., Odorizzi, P.M., DiIorio, M.A., Lemieux, M.E., Yates, K., Godec, J., Klatt, M.G., Regev, A., et al. (2014). The transcription factor BATF operates as an essential differentiation checkpoint in early effector CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* 15, 373–383. 10.1038/ni.2834.

210. Tsao, H.-W., Kaminski, J., Kurachi, M., Barnitz, R.A., DiIorio, M.A., LaFleur, M.W., Ise, W., Kurosaki, T., Wherry, E.J., Haining, W.N., et al. (2022). Batf-mediated epigenetic control of effector CD8⁺ T cell differentiation. *Sci Immunol* 7, eabi4919. 10.1126/sciimmunol.abi4919.

211. Murphy, T.L., Tussiwand, R., and Murphy, K.M. (2013). Specificity through cooperation: BATF–IRF interactions control immune-regulatory networks. *Nat Rev Immunol* 13, 499–509. 10.1038/nri3470.

212. Foletta, V.C., Segal, D.H., and Cohen, D.R. (1998). Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J Leukocyte Biol* 63, 139–152. 10.1002/jlb.63.2.139.

213. Yukawa, M., Jagannathan, S., Vallabh, S., Kartashov, A.V., Chen, X., Weirauch, M.T., and Barski, A. (2019). AP-1 activity induced by co-stimulation is required for chromatin opening during T cell activation. *J Exp Med* 217, e20182009. 10.1084/jem.20182009.

214. Papavassiliou, A.G., and Musti, A.M. (2020). The Multifaceted Output of c-Jun Biological Activity: Focus at the Junction of CD8 T Cell Activation and Exhaustion. *Cells* 9, 2470. 10.3390/cells9112470.
215. Rooney, J.W., Sun, Y.L., Glimcher, L.H., and Hoey, T. (1995). Novel NFAT sites that mediate activation of the interleukin-2 promoter in response to T-cell receptor stimulation. *Mol Cell Biol* 15, 6299–6310. 10.1128/mcb.15.11.6299.
216. Walters, R.D., Drullinger, L.F., Kugel, J.F., and Goodrich, J.A. (2013). NFATc2 recruits cJun homodimers to an NFAT site to synergistically activate interleukin-2 transcription. *Mol Immunol* 56, 48–56. 10.1016/j.molimm.2013.03.022.
217. Nguyen, T.N., Kim, L.J., Walters, R.D., Drullinger, L.F., Lively, T.N., Kugel, J.F., and Goodrich, J.A. (2010). The C-terminal region of human NFATc2 binds cJun to synergistically activate interleukin-2 transcription. *Mol Immunol* 47, 2314–2322. 10.1016/j.molimm.2010.05.287.
218. Williams, K.L., Nanda, I., Lyons, G.E., Kuo, C.T., Schmid, M., Leiden, J.M., Kaplan, M.H., and Taparowsky, E.J. (2001). Characterization of murine BATF: a negative regulator of activator protein-1 activity in the thymus. *Eur. J. Immunol.* 31, 1620–1627. 10.1002/1521-4141(200105)31:5<1620::aid-immu1620>3.0.co;2-3.
219. Quigley, M., Pereyra, F., Nilsson, B., Porichis, F., Fonseca, C., Eichbaum, Q., Julg, B., Jesneck, J.L., Brosnahan, K., Imam, S., et al. (2010). Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat Med* 16, 1147–1151. 10.1038/nm.2232.
220. Martins, G.A., Cimmino, L., Liao, J., Magnusdottir, E., and Calame, K. (2008). Blimp-1 directly represses Il2 and the Il2 activator Fos, attenuating T cell proliferation and survival. *J Exp Medicine* 205, 1959–1965. 10.1084/jem.20080526.
221. Stelekati, E., Chen, Z., Manne, S., Kurachi, M., Ali, M.-A., Lewy, K., Cai, Z., Nzingha, K., McLane, L.M., Hope, J.L., et al. (2018). Long-Term Persistence of Exhausted CD8 T Cells in Chronic Infection Is Regulated by MicroRNA-155. *Cell Reports* 23, 2142–2156. 10.1016/j.celrep.2018.04.038.
222. Li, S., Miao, T., Sebastian, M., Bhullar, P., Ghaffari, E., Liu, M., Symonds, A.L.J., and Wang, P. (2012). The Transcription Factors Egr2 and Egr3 Are Essential for the Control of Inflammation and Antigen-Induced Proliferation of B and T Cells. *Immunity* 37, 685–696. 10.1016/j.immuni.2012.08.001.
223. Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A., He, C., and Zhang, Y. (2011). Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *Science* 333, 1300–1303. 10.1126/science.1210597.

224. Carty, S.A., Gohil, M., Banks, L.B., Cotton, R.M., Johnson, M.E., Stelekati, E., Wells, A.D., Wherry, E.J., Koretzky, G.A., and Jordan, M.S. (2018). The Loss of TET2 Promotes CD8⁺ T Cell Memory Differentiation. *J Immunol* *200*, 82–91. 10.4049/jimmunol.1700559.
225. Stephen, T.L., Payne, K.K., Chaurio, R.A., Allegranza, M.J., Zhu, H., Perez-Sanz, J., Perales-Puchalt, A., Nguyen, J.M., Vara-Ailor, A.E., Eruslanov, E.B., et al. (2017). SATB1 Expression Governs Epigenetic Repression of PD-1 in Tumor-Reactive T Cells. *Immunity* *46*, 51–64. 10.1016/j.immuni.2016.12.015.
226. Chang, J.T., Palanivel, V.R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Longworth, S.A., Vinup, K.E., Mrass, P., Oliaro, J., et al. (2007). Asymmetric T Lymphocyte Division in the Initiation of Adaptive Immune Responses. *Science* *315*, 1687–1691. 10.1126/science.1139393.
227. Oliaro, J., Ham, V.V., Sacirbegovic, F., Pasam, A., Bomzon, Z., Pham, K., Ludford-Menting, M.J., Waterhouse, N.J., Bots, M., Hawkins, E.D., et al. (2010). Asymmetric Cell Division of T Cells upon Antigen Presentation Uses Multiple Conserved Mechanisms. *The Journal of Immunology* *185*, 367–375. 10.4049/jimmunol.0903627.
228. Pollizzi, K.N., Sun, I.-H., Patel, C.H., Lo, Y.-C., Oh, M.-H., Waickman, A.T., Tam, A.J., Blosser, R.L., Wen, J., Delgoffe, G.M., et al. (2016). Asymmetric inheritance of mTORC1 kinase activity during division dictates CD8⁺ T cell differentiation. *Nat Immunol* *17*, 704–711. 10.1038/ni.3438.
229. Chang, J.T., Ciocca, M.L., Kinjyo, I., Palanivel, V.R., McClurkin, C.E., DeJong, C.S., Mooney, E.C., Kim, J.S., Steinel, N.C., Oliaro, J., et al. (2011). Asymmetric Proteasome Segregation as a Mechanism for Unequal Partitioning of the Transcription Factor T-bet during T Lymphocyte Division. *Immunity* *34*, 492–504. 10.1016/j.immuni.2011.03.017.
230. Metz, P.J., Lopez, J., Kim, S.H., Akimoto, K., Ohno, S., and Chang, J.T. (2016). Regulation of Asymmetric Division by Atypical Protein Kinase C Influences Early Specification of CD8⁺ T Lymphocyte Fates. *Sci Rep-uk* *6*, 19182. 10.1038/srep19182.
231. Chen, Y.-H., Kratchmarov, R., Lin, W.-H.W., Rothman, N.J., Yen, B., Adams, W.C., Nish, S.A., Rathmell, J.C., and Reiner, S.L. (2018). Asymmetric PI3K Activity in Lymphocytes Organized by a PI3K-Mediated Polarity Pathway. *CellReports* *22*, 860–868. 10.1016/j.celrep.2017.12.087.
232. Lin, W.-H.W., Adams, W.C., Nish, S.A., Chen, Y.-H., Yen, B., Rothman, N.J., Kratchmarov, R., Okada, T., Klein, U., and Reiner, S.L. (2015). Asymmetric PI3K Signaling Driving Developmental and Regenerative Cell Fate Bifurcation. *Cell Reports* *13*, 2203–2218. 10.1016/j.celrep.2015.10.072.
233. Verbist, K.C., Guy, C.S., Milasta, S., Liedmann, S., Kamiński, M.M., Wang, R., and Green, D.R. (2016). Metabolic maintenance of cell asymmetry following division in activated T lymphocytes. *Nature* *532*, 389–393. 10.1038/nature17442.

234. Widjaja, C.E., Olvera, J.G., Metz, P.J., Phan, A.T., Savas, J.N., Bruin, G. de, Leestemaker, Y., Berkers, C.R., Jong, A. de, Florea, B.I., et al. (2017). Proteasome activity regulates CD8+ T lymphocyte metabolism and fate specification. *J Clin Invest* *127*, 3609–3623. 10.1172/jci90895.
235. Arsenio, J., Kakaradov, B., Metz, P.J., Kim, S.H., Yeo, G.W., and Chang, J.T. (2014). Early specification of CD8+ T lymphocyte fates during adaptive immunity revealed by single-cell gene-expression analyses. *Nat Immunol* *15*, 365–372. 10.1038/ni.2842.
236. Flossdorf, M., Rössler, J., Buchholz, V.R., Busch, D.H., and Höfer, T. (2015). CD8+ T cell diversification by asymmetric cell division. *Nat Immunol* *16*, 891–893. 10.1038/ni.3235.
237. Kakaradov, B., Arsenio, J., Widjaja, C.E., He, Z., Aigner, S., Metz, P.J., Yu, B., Wehrens, E.J., Lopez, J., Kim, S.H., et al. (2017). Early transcriptional and epigenetic regulation of CD8+ T cell differentiation revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat Immunol* *18*, 422–432. 10.1038/ni.3688.
238. Metz, P.J., Arsenio, J., Kakaradov, B., Kim, S.H., Remedios, K.A., Oakley, K., Akimoto, K., Ohno, S., Yeo, G.W., and Chang, J.T. (2015). Regulation of Asymmetric Division and CD8+ T Lymphocyte Fate Specification by Protein Kinase C ζ and Protein Kinase C λ 1. *J Immunol* *194*, 2249–2259. 10.4049/jimmunol.1401652.
239. Borsa, M., Barnstorf, I., Baumann, N.S., Pallmer, K., Yermanos, A., Gräbnitz, F., Barandun, N., Hausmann, A., Sandu, I., Barral, Y., et al. (2019). Modulation of asymmetric cell division as a mechanism to boost CD8+ T cell memory. *Sci Immunol* *4*, eaav1730. 10.1126/sciimmunol.aav1730.
240. Ciocca, M.L., Barnett, B.E., Burkhardt, J.K., Chang, J.T., and Reiner, S.L. (2012). Cutting Edge: Asymmetric Memory T Cell Division in Response to Rechallenge. *J Immunol* *188*, 4145–4148. 10.4049/jimmunol.1200176.
241. Michalek, R.D., and Rathmell, J.C. (2010). The metabolic life and times of a T-cell. *Immunol Rev* *236*, 190–202. 10.1111/j.1600-065x.2010.00911.x.
242. Reina-Campos, M., Scharping, N.E., and Goldrath, A.W. (2021). CD8+ T cell metabolism in infection and cancer. *Nat Rev Immunol* *21*, 718–738. 10.1038/s41577-021-00537-8.
243. Wang, R., Dillon, C.P., Shi, L.Z., Milasta, S., Carter, R., Finkelstein, D., McCormick, L.L., Fitzgerald, P., Chi, H., Munger, J., et al. (2011). The Transcription Factor Myc Controls Metabolic Reprogramming upon T Lymphocyte Activation. *Immunity* *35*, 871–882. 10.1016/j.immuni.2011.09.021.
244. Heinzl, S., Giang, T.B., Kan, A., Marchingo, J.M., Lye, B.K., Corcoran, L.M., and Hodgkin, P.D. (2017). A Myc-dependent division timer complements a cell-death timer to regulate T cell and B cell responses. *Nat Immunol* *18*, 96–103. 10.1038/ni.3598.

245. Prlic, M., Hernandez-Hoyos, G., and Bevan, M.J. (2006). Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8⁺ T cell response. *J Exp Medicine* 203, 2135–2143. 10.1084/jem.20060928.
246. Zehn, D., Lee, S.Y., and Bevan, M.J. (2009). Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature* 458, 211–214. 10.1038/nature07657.
247. D'Souza, W.N., and Lefrançois, L. (2003). IL-2 Is Not Required for the Initiation of CD8 T Cell Cycling but Sustains Expansion. *J Immunol* 171, 5727–5735. 10.4049/jimmunol.171.11.5727.
248. Curtsinger, J.M., Johnson, C.M., and Mescher, M.F. (2003). CD8 T Cell Clonal Expansion and Development of Effector Function Require Prolonged Exposure to Antigen, Costimulation, and Signal 3 Cytokine. *J Immunol* 171, 5165–5171. 10.4049/jimmunol.171.10.5165.
249. Redeker, A., Welten, S.P.M., Baert, M.R.M., Vloemans, S.A., Tiemessen, M.M., Staal, F.J.T., and Arens, R. (2015). The Quantity of Autocrine IL-2 Governs the Expansion Potential of CD8⁺ T Cells. *J Immunol* 195, 4792–4801. 10.4049/jimmunol.1501083.
250. Bon, A.L., Durand, V., Kamphuis, E., Thompson, C., Bulfone-Paus, S., Rossmann, C., Kalinke, U., and Tough, D.F. (2006). Direct Stimulation of T Cells by Type I IFN Enhances the CD8⁺ T Cell Response during Cross-Priming. *J Immunol* 176, 4682–4689. 10.4049/jimmunol.176.8.4682.
251. Bonilla, W.V., Fröhlich, A., Senn, K., Kallert, S., Fernandez, M., Johnson, S., Kreutzfeldt, M., Hegazy, A.N., Schrick, C., Fallon, P.G., et al. (2012). The Alarmin Interleukin-33 Drives Protective Antiviral CD8⁺ T Cell Responses. *Science* 335, 984–989. 10.1126/science.1215418.
252. Man, K., Miasari, M., Shi, W., Xin, A., Henstridge, D.C., Preston, S., Pellegrini, M., Belz, G.T., Smyth, G.K., Febbraio, M.A., et al. (2013). The transcription factor IRF4 is essential for TCR affinity-mediated metabolic programming and clonal expansion of T cells. *Nat Immunol* 14, 1155–1165. 10.1038/ni.2710.
253. Yao, S., Buzo, B.F., Pham, D., Jiang, L., Taparowsky, E.J., Kaplan, M.H., and Sun, J. (2013). Interferon Regulatory Factor 4 Sustains CD8⁺ T Cell Expansion and Effector Differentiation. *Immunity* 39, 833–845. 10.1016/j.immuni.2013.10.007.
254. Nayar, R., Schutten, E., Bautista, B., Daniels, K., Prince, A.L., Enos, M., Brehm, M.A., Swain, S.L., Welsh, R.M., and Berg, L.J. (2014). Graded levels of IRF4 regulate CD8⁺ T cell differentiation and expansion, but not attrition, in response to acute virus infection. *J. Immunol.* 192, 5881–5893. 10.4049/jimmunol.1303187.
255. Kaech, S.M., Tan, J.T., Wherry, E.J., Konieczny, B.T., Surh, C.D., and Ahmed, R. (2003). Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 4, 1191–1198. 10.1038/ni1009.

256. Sarkar, S., Kalia, V., Haining, W.N., Konieczny, B.T., Subramaniam, S., and Ahmed, R. (2008). Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J Exp Medicine* *205*, 625–640. 10.1084/jem.20071641.
257. Obar, J.J., Jellison, E.R., Sheridan, B.S., Blair, D.A., Pham, Q.-M., Zickovich, J.M., and Lefrançois, L. (2011). Pathogen-Induced Inflammatory Environment Controls Effector and Memory CD8+ T Cell Differentiation. *J Immunol* *187*, 4967–4978. 10.4049/jimmunol.1102335.
258. Casey, K.A., Fraser, K.A., Schenkel, J.M., Moran, A., Abt, M.C., Beura, L.K., Lucas, P.J., Artis, D., Wherry, E.J., Hogquist, K., et al. (2012). Antigen-Independent Differentiation and Maintenance of Effector-like Resident Memory T Cells in Tissues. *J Immunol* *188*, 4866–4875. 10.4049/jimmunol.1200402.
259. Mackay, L.K., Rahimpour, A., Ma, J.Z., Collins, N., Stock, A.T., Hafon, M.-L., Vega-Ramos, J., Lauzurica, P., Mueller, S.N., Stefanovic, T., et al. (2013). The developmental pathway for CD103+CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol* *14*, 1294–1301. 10.1038/ni.2744.
260. Milner, J.J., Toma, C., Yu, B., Zhang, K., Omilusik, K., Phan, A.T., Wang, D., Getzler, A.J., Nguyen, T., Crotty, S., et al. (2017). Runx3 programs CD8+ T cell residency in non-lymphoid tissues and tumours. *Nature* *552*, 253–257. 10.1038/nature24993.
261. Kurd, N.S., He, Z., Louis, T.L., Milner, J.J., Omilusik, K.D., Jin, W., Tsai, M.S., Widjaja, C.E., Kanbar, J.N., Olvera, J.G., et al. (2020). Early precursors and molecular determinants of tissue-resident memory CD8+ T lymphocytes revealed by single-cell RNA sequencing. *Sci Immunol* *5*. 10.1126/sciimmunol.aaz6894.
262. Herndler-Brandstetter, D., Ishigame, H., Shinnakasu, R., Plajer, V., Stecher, C., Zhao, J., Lietzenmayer, M., Kroehling, L., Takumi, A., Kometani, K., et al. (2018). KLRG1+ Effector CD8+ T Cells Lose KLRG1, Differentiate into All Memory T Cell Lineages, and Convey Enhanced Protective Immunity. *Immunity* *48*, 716–729.e8. 10.1016/j.immuni.2018.03.015.
263. Renkema, K.R., Huggins, M.A., Silva, H.B. da, Knutson, T.P., Henzler, C.M., and Hamilton, S.E. (2020). KLRG1 + Memory CD8 T Cells Combine Properties of Short-Lived Effectors and Long-Lived Memory. *J Immunol* *205*, 1059–1069. 10.4049/jimmunol.1901512.
264. Huang, H., Zhou, P., Wei, J., Long, L., Shi, H., Dhungana, Y., Chapman, N.M., Fu, G., Saravia, J., Raynor, J.L., et al. (2021). In vivo CRISPR screening reveals nutrient signaling processes underpinning CD8+ T cell fate decisions. *Cell* *184*, 1245–1261.e21. 10.1016/j.cell.2021.02.021.
265. Gerlach, C., Moseman, E.A., Loughhead, S.M., Alvarez, D., Zwijnenburg, A.J., Waanders, L., Garg, R., Torre, J.C. de la, and Andrian, U.H. von (2016). The Chemokine Receptor CX3CR1 Defines Three Antigen-Experienced CD8 T Cell Subsets with Distinct Roles in Immune Surveillance and Homeostasis. *Immunity* *45*, 1270–1284. 10.1016/j.immuni.2016.10.018.

266. Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Stemann, C., Satoskar, A.R., Sleckman, B.P., and Glimcher, L.H. (2002). Distinct Effects of T-bet in TH1 Lineage Commitment and IFN- γ Production in CD4 and CD8 T Cells. *Science* 295, 338–342. 10.1126/science.1065543.
267. Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Wherry, E.J., Longworth, S.A., Northrup, J.T., Palanivel, V.R., Mullen, A.C., Gasink, C.R., Kaech, S.M., Miller, J.D., et al. (2005). Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol* 6, 1236–1244. 10.1038/ni1268.
268. Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Takemoto, N., Gordon, S.M., DeJong, C.S., Shin, H., Hunter, C.A., Wherry, E.J., Lindsten, T., and Reiner, S.L. (2008). Anomalous Type 17 Response to Viral Infection by CD8⁺ T Cells Lacking T-bet and Eomesodermin. *Science* 321, 408–411. 10.1126/science.1159806.
269. Dominguez, C.X., Amezcua, R.A., Guan, T., Marshall, H.D., Joshi, N.S., Kleinstein, S.H., and Kaech, S.M. (2015). The transcription factors ZEB2 and T-bet cooperate to program cytotoxic T cell terminal differentiation in response to LCMV viral infection. *J Exp Med* 212, 2041–2056. 10.1084/jem.20150186.
270. Omilusik, K.D., Best, J.A., Yu, B., Goossens, S., Weidemann, A., Nguyen, J.V., Seuntjens, E., Stryjewska, A., Zweier, C., Roychoudhuri, R., et al. (2015). Transcriptional repressor ZEB2 promotes terminal differentiation of CD8⁺ effector and memory T cell populations during infection. *J Exp Med* 212, 2027–2039. 10.1084/jem.20150194.
271. Ji, Y., Pos, Z., Rao, M., Klebanoff, C.A., Yu, Z., Sukumar, M., Reger, R.N., Palmer, D.C., Borman, Z.A., Muranski, P., et al. (2011). Repression of the DNA-binding inhibitor Id3 by Blimp-1 limits the formation of memory CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* 12, 1230–1237. 10.1038/ni.2153.
272. Boulet, S., Daudelin, J.-F., and Labrecque, N. (2014). IL-2 Induction of Blimp-1 Is a Key In Vivo Signal for CD8⁺ Short-Lived Effector T Cell Differentiation. *J Immunol* 193, 1847–1854. 10.4049/jimmunol.1302365.
273. Guan, T., Dominguez, C.X., Amezcua, R.A., Laidlaw, B.J., Cheng, J., Henao-Mejia, J., Williams, A., Flavell, R.A., Lu, J., and Kaech, S.M. (2018). ZEB1, ZEB2, and the miR-200 family form a counterregulatory network to regulate CD8⁺ T cell fates. *J Exp Med* 215, 1153–1168. 10.1084/jem.20171352.
274. Yang, C.Y., Best, J.A., Knell, J., Yang, E., Sheridan, A.D., Jesionek, A.K., Li, H.S., Rivera, R.R., Lind, K.C., D’Cruz, L.M., et al. (2011). The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8⁺ T cell subsets. *Nat Immunol* 12, 1221–1229. 10.1038/ni.2158.
275. Backer, R.A., Helbig, C., Gentek, R., Kent, A., Laidlaw, B.J., Dominguez, C.X., Souza, Y.S. de, Trierum, S.E. van, Beek, R. van, Rimmelzwaan, G.F., et al. (2014). A central role for Notch in effector CD8⁺ T cell differentiation. *Nat Immunol* 15, 1143–1151. 10.1038/ni.3027.

276. Mathieu, M., Duval, F., Daudelin, J.-F., and Labrecque, N. (2015). The Notch Signaling Pathway Controls Short-Lived Effector CD8⁺ T Cell Differentiation but Is Dispensable for Memory Generation. *The Journal of Immunology* *194*, 5654–5662. 10.4049/jimmunol.1402837.
277. Osborne, B.A., and Minter, L.M. (2007). Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nat Rev Immunol* *7*, 64–75. 10.1038/nri1998.
278. Sousa, D.M.D., Duval, F., Daudelin, J.-F., Boulet, S., and Labrecque, N. (2019). The Notch signaling pathway controls CD8⁺ T cell differentiation independently of the classical effector HES1. *Plos One* *14*, e0215012. 10.1371/journal.pone.0215012.
279. Raczkowski, F., Ritter, J., Heesch, K., Schumacher, V., Guralnik, A., Höcker, L., Raifer, H., Klein, M., Bopp, T., Harb, H., et al. (2013). The transcription factor Interferon Regulatory Factor 4 is required for the generation of protective effector CD8⁺ T cells. *Proc National Acad Sci* *110*, 15019–15024. 10.1073/pnas.1309378110.
280. Grusdat, M., McIlwain, D.R., Xu, H.C., Pozdeev, V.I., Knievel, J., Crome, S.Q., Robert-Tissot, C., Dress, R.J., Pandyra, A.A., Speiser, D.E., et al. (2014). IRF4 and BATF are critical for CD8⁺ T-cell function following infection with LCMV. *Cell Death Differ* *21*, 1050–1060. 10.1038/cdd.2014.19.
281. Chen, A., Engel, P., and Tedder, T.F. (1995). Structural requirements regulate endoproteolytic release of the L-selectin (CD62L) adhesion receptor from the cell surface of leukocytes. *J Exp Medicine* *182*, 519–530. 10.1084/jem.182.2.519.
282. Hobbs, S.J., and Nolz, J.C. (2017). Regulation of T Cell Trafficking by Enzymatic Synthesis of O-Glycans. *Front Immunol* *8*, 600. 10.3389/fimmu.2017.00600.
283. Nolz, J.C. (2015). Molecular mechanisms of CD8⁺ T cell trafficking and localization. *Cell Mol Life Sci* *72*, 2461–2473. 10.1007/s00018-015-1835-0.
284. Ley, K., and Kansas, G.S. (2004). Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nature Reviews Immunology* *4*, 325–336. 10.1038/nri1351.
285. Pober, J.S., and Sessa, W.C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* *7*, 803–815. 10.1038/nri2171.
286. Hidalgo, A., Peired, A.J., Wild, M.K., Vestweber, D., and Frenette, P.S. (2007). Complete Identification of E-Selectin Ligands on Neutrophils Reveals Distinct Functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity* *26*, 477–489. 10.1016/j.immuni.2007.03.011.
287. Lefrançois, L., Parker, C.M., Olson, S., Muller, W., Wagner, N., and Puddington, L. (1999). The Role of β 7 Integrins in CD8 T Cell Trafficking During an Antiviral Immune Response. *J Exp Medicine* *189*, 1631–1638. 10.1084/jem.189.10.1631.

288. Ray, S.J., Franki, S.N., Pierce, R.H., Dimitrova, S., Koteliansky, V., Sprague, A.G., Doherty, P.C., Fougerolles, A.R. de, and Topham, D.J. (2004). The Collagen Binding α 1 β 1 Integrin VLA-1 Regulates CD8 T Cell-Mediated Immune Protection against Heterologous Influenza Infection. *Immunity* 20, 167–179. 10.1016/s1074-7613(04)00021-4.
289. Liu, L., Fuhlbrigge, R.C., Karibian, K., Tian, T., and Kupper, T.S. (2006). Dynamic Programming of CD8+ T Cell Trafficking after Live Viral Immunization. *Immunity* 25, 511–520. 10.1016/j.immuni.2006.06.019.
290. Mora, J.R., Cheng, G., Picarella, D., Briskin, M., Buchanan, N., and Andrian, U.H. von (2005). Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues. *J Exp Medicine* 201, 303–316. 10.1084/jem.20041645.
291. Cox, M.A., Harrington, L.E., and Zajac, A.J. (2011). Cytokines and the inception of CD8 T cell responses. *Trends in Immunology* 32, 180–186. 10.1016/j.it.2011.01.004.
292. Zhang, N., and Bevan, M.J. (2011). CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity* 35, 161–168. 10.1016/j.immuni.2011.07.010.
293. Brehm, M.A., Daniels, K.A., and Welsh, R.M. (2005). Rapid Production of TNF- α following TCR Engagement of Naive CD8 T Cells. *J Immunol* 175, 5043–5049. 10.4049/jimmunol.175.8.5043.
294. Hosking, M.P., Flynn, C.T., and Whitton, J.L. (2014). Antigen-Specific Naive CD8+ T Cells Produce a Single Pulse of IFN- γ In Vivo within Hours of Infection, but without Antiviral Effect. *J Immunol* 193, 1873–1885. 10.4049/jimmunol.1400348.
295. Siska, P.J., and Rathmell, J.C. (2016). Metabolic Signaling Drives IFN- γ . *Cell Metab* 24, 651–652. 10.1016/j.cmet.2016.10.018.
296. Chen, Y., Zander, R., Khatun, A., Schauder, D.M., and Cui, W. (2018). Transcriptional and Epigenetic Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation. *Front Immunol* 9, 2826. 10.3389/fimmu.2018.02826.
297. Klein-Hessling, S., Muhammad, K., Klein, M., Pusch, T., Rudolf, R., Flöter, J., Qureischi, M., Beilhack, A., Vaeth, M., Kummerow, C., et al. (2017). NFATc1 controls the cytotoxicity of CD8+ T cells. *Nat Commun* 8, 511. 10.1038/s41467-017-00612-6.
298. Sullivan, B.M., Juedes, A., Szabo, S.J., Herrath, M. von, and Glimcher, L.H. (2003). Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet. *Proc National Acad Sci* 100, 15818–15823. 10.1073/pnas.2636938100.
299. Chinen, T., Kannan, A.K., Levine, A.G., Fan, X., Klein, U., Zheng, Y., Gasteiger, G., Feng, Y., Fontenot, J.D., and Rudensky, A.Y. (2016). An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat Immunol* 17, 1322–1333. 10.1038/ni.3540.

300. Barthlott, T., Moncrieffe, H., Veldhoen, M., Atkins, C.J., Christensen, J., O'Garra, A., and Stockinger, B. (2005). CD25+CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *Int Immunol* *17*, 279–288. 10.1093/intimm/dxh207.
301. Yamaguchi, T., Kishi, A., Osaki, M., Morikawa, H., Prieto-Martin, P., Wing, K., Saito, T., and Sakaguchi, S. (2013). Construction of self-recognizing regulatory T cells from conventional T cells by controlling CTLA-4 and IL-2 expression. *Proc National Acad Sci* *110*, E2116–E2125. 10.1073/pnas.1307185110.
302. Ye, C., Brand, D., and Zheng, S.G. (2018). Targeting IL-2: an unexpected effect in treating immunological diseases. *Signal Transduct Target Ther* *3*, 2. 10.1038/s41392-017-0002-5.
303. Kalia, V., and Sarkar, S. (2018). Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation by IL-2—A Balancing Act. *Front Immunol* *9*, 2987. 10.3389/fimmu.2018.02987.
304. Cho, J.-H., Kim, H.-O., Kim, K.-S., Yang, D.-H., Surh, C.D., and Sprent, J. (2013). Unique Features of Naive CD8+ T Cell Activation by IL-2. *J Immunol* *191*, 5559–5573. 10.4049/jimmunol.1302293.
305. Kahan, S.M., Bakshi, R.K., Ingram, J.T., Hendrickson, R.C., Lefkowitz, E.J., Crossman, D.K., Harrington, L.E., Weaver, C.T., and Zajac, A.J. (2022). Intrinsic IL-2 production by effector CD8 T cells affects IL-2 signaling and promotes fate decisions, stemness, and protection. *Sci Immunol* *7*, eabl6322. 10.1126/sciimmunol.abl6322.
306. Feau, S., Arens, R., Togher, S., and Schoenberger, S.P. (2011). Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8+ memory T cells. *Nat Immunol* *12*, 908–913. 10.1038/ni.2079.
307. Zhou, F. (2009). Molecular Mechanisms of IFN- γ to Up-Regulate MHC Class I Antigen Processing and Presentation. *Int Rev Immunol* *28*, 239–260. 10.1080/08830180902978120.
308. Zhang, S., Kohli, K., Black, R.G., Yao, L., Spadinger, S.M., He, Q., Pillarisetty, V.G., Cranmer, L.D., Tine, B.A.V., Yee, C., et al. (2019). Systemic Interferon- γ Increases MHC Class I Expression and T-cell Infiltration in Cold Tumors: Results of a Phase 0 Clinical Trial. *Cancer Immunol Res* *7*, 1237–1243. 10.1158/2326-6066.cir-18-0940.
309. Ivashkiv, L.B. (2018). IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* *18*, 545–558. 10.1038/s41577-018-0029-z.
310. Rožman, P., and Švajger, U. (2018). The tolerogenic role of IFN- γ . *Cytokine Growth F R* *41*, 40–53. 10.1016/j.cytogfr.2018.04.001.
311. Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., et al. (2014). Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* *41*, 14–20. 10.1016/j.immuni.2014.06.008.

312. Chávez-Galán, L., Olleros, M.L., Vesin, D., and Garcia, I. (2015). Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169+ and TCR+ Macrophages. *Front Immunol* 6, 263. 10.3389/fimmu.2015.00263.
313. Hirahara, K., and Nakayama, T. (2015). CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int Immunol* 28, 163–171. 10.1093/intimm/dxw006.
314. Mehta, A.K., Gracias, D.T., and Croft, M. (2018). TNF activity and T cells. *Cytokine* 101, 14–18. 10.1016/j.cyto.2016.08.003.
315. Banerjee, D., Liou, H.-C., and Sen, R. (2005). c-Rel-Dependent Priming of Naive T Cells by Inflammatory Cytokines. *Immunity* 23, 445–458. 10.1016/j.immuni.2005.09.012.
316. Calzascia, T., Pellegrini, M., Hall, H., Sabbagh, L., Ono, N., Elford, A.R., Mak, T.W., and Ohashi, P.S. (2007). TNF- α is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice. *J Clin Invest* 117, 3833–3845. 10.1172/jci32567.
317. Ye, L.-L., Wei, X.-S., Zhang, M., Niu, Y.-R., and Zhou, Q. (2018). The Significance of Tumor Necrosis Factor Receptor Type II in CD8+ Regulatory T Cells and CD8+ Effector T Cells. *Front Immunol* 9, 583. 10.3389/fimmu.2018.00583.
318. Chowdhury, D., and Lieberman, J. (2008). Death by a Thousand Cuts: Granzyme Pathways of Programmed Cell Death. *Annu Rev Immunol* 26, 389–420. 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090404.
319. Johnson, B.J., Costelloe, E.O., Fitzpatrick, D.R., Haanen, J.B.A.G., Schumacher, T.N.M., Brown, L.E., and Kelso, A. (2003). Single-cell perforin and granzyme expression reveals the anatomical localization of effector CD8+ T cells in influenza virus-infected mice. *Proc National Acad Sci* 100, 2657–2662. 10.1073/pnas.0538056100.
320. Janas, M.L., Groves, P., Kienzle, N., and Kelso, A. (2005). IL-2 Regulates Perforin and Granzyme Gene Expression in CD8+ T Cells Independently of Its Effects on Survival and Proliferation. *J Immunol* 175, 8003–8010. 10.4049/jimmunol.175.12.8003.
321. Voskoboinik, I., Whisstock, J.C., and Trapani, J.A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol* 15, 388–400. 10.1038/nri3839.
322. Dustin, M.L., and Long, E.O. (2010). Cytotoxic immunological synapses. *Immunol Rev* 235, 24–34. 10.1111/j.0105-2896.2010.00904.x.
323. Jaime-Sanchez, P., Uranga-Murillo, I., Aguilo, N., Khouili, S.C., Arias, M.A., Sancho, D., and Pardo, J. (2020). Cell death induced by cytotoxic CD8+ T cells is immunogenic and primes caspase-3–dependent spread immunity against endogenous tumor antigens. *J. Immunother. Cancer* 8, e000528. 10.1136/jitc-2020-000528.

324. Metkar, S.S., Wang, B., Ebbs, M.L., Kim, J.H., Lee, Y.J., Raja, S.M., and Froelich, C.J. (2003). Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *J. Cell Biol.* *160*, 875–885. 10.1083/jcb.200210158.
325. Ewen, C.L., Kane, K.P., and Bleackley, R.C. (2012). A quarter century of granzymes. *Cell Death Differ* *19*, 28–35. 10.1038/cdd.2011.153.
326. Hlongwane, P., Mungra, N., Madheswaran, S., Akinrinmade, O.A., Chetty, S., and Barth, S. (2018). Human Granzyme B Based Targeted Cytolytic Fusion Proteins. *Biomed* *6*, 72. 10.3390/biomedicines6020072.
327. Weigelin, B., and Friedl, P. (2022). T cell-mediated additive cytotoxicity – death by multiple bullets. *Trends Cancer* *8*, 980–987. 10.1016/j.trecan.2022.07.007.
328. Sutton, V.R., Davis, J.E., Cancilla, M., Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Sedelies, K., Browne, K.A., and Trapani, J.A. (2000). Initiation of Apoptosis by Granzyme B Requires Direct Cleavage of Bid, but Not Direct Granzyme B–Mediated Caspase Activation. *J. Exp. Med.* *192*, 1403–1414. 10.1084/jem.192.10.1403.
329. Alimonti, J.B., Shi, L., Baijal, P.K., and Greenberg, A.H. (2001). Granzyme B Induces BID-mediated Cytochrome c Release and Mitochondrial Permeability Transition*. *J. Biol. Chem.* *276*, 6974–6982. 10.1074/jbc.m008444200.
330. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* *91*, 479–489. 10.1016/s0092-8674(00)80434-1.
331. Jiang, X., and Wang, X. (2000). Cytochrome c Promotes Caspase-9 Activation by Inducing Nucleotide Binding to Apaf-1*. *J. Biol. Chem.* *275*, 31199–31203. 10.1074/jbc.c000405200.
332. Thomas, D.A., Du, C., Xu, M., Wang, X., and Ley, T.J. (2000). DFF45/ICAD Can Be Directly Processed by Granzyme B during the Induction of Apoptosis. *Immunity* *12*, 621–632. 10.1016/s1074-7613(00)80213-7.
333. Sharif-Askari, E., Alam, A., Rhéaume, E., Beresford, P.J., Scotto, C., Sharma, K., Lee, D., DeWolf, W.E., Nuttall, M.E., Lieberman, J., et al. (2001). Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation. *EMBO J.* *20*, 3101–3113. 10.1093/emboj/20.12.3101.
334. Zhang, D., Beresford, P.J., Greenberg, A.H., and Lieberman, J. (2001). Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 5746–5751. 10.1073/pnas.101329598.
335. Andrade, F., Roy, S., Nicholson, D., Thornberry, N., Rosen, A., and Casciola-Rosen, L. (1998). Granzyme B Directly and Efficiently Cleaves Several Downstream Caspase Substrates:

Implications for CTL-Induced Apoptosis. *Immunity* 8, 451–460. 10.1016/s1074-7613(00)80550-6.

336. Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ.* 15, 251–262. 10.1038/sj.cdd.4402244.

337. Yamada, A., Arakaki, R., Saito, M., Kudo, Y., and Ishimaru, N. (2017). Dual Role of Fas/FasL-Mediated Signal in Peripheral Immune Tolerance. *Front Immunol* 8, 403. 10.3389/fimmu.2017.00403.

338. Shrestha, B., and Diamond, M.S. (2007). Fas Ligand Interactions Contribute to CD8 + T-Cell-Mediated Control of West Nile Virus Infection in the Central Nervous System. *J Virol* 81, 11749–11757. 10.1128/jvi.01136-07.

339. Liesche, C., Sauer, P., Prager, I., Urlaub, D., Claus, M., Eils, R., Beaudouin, J., and Watzl, C. (2018). Single-Fluorescent Protein Reporters Allow Parallel Quantification of Natural Killer Cell-Mediated Granzyme and Caspase Activities in Single Target Cells. *Front. Immunol.* 9, 1840. 10.3389/fimmu.2018.01840.

340. D’Cruz, L.M., Rubinstein, M.P., and Goldrath, A.W. (2009). Surviving the crash: Transitioning from effector to memory CD8+ T cell. *Semin Immunol* 21, 92–98. 10.1016/j.smim.2009.02.002.

341. Snow, A.L., Oliveira, J.B., Zheng, L., Dale, J.K., Fleisher, T.A., and Lenardo, M.J. (2008). Critical role for BIM in T cell receptor restimulation-induced death. *Biol Direct* 3, 34. 10.1186/1745-6150-3-34.

342. Green, D.R. (2008). Fas Bim Boom! *Immunity* 28, 141–143. 10.1016/j.immuni.2008.01.004.

343. Pellegrini, M., Belz, G., Bouillet, P., and Strasser, A. (2003). Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim. *Proc National Acad Sci* 100, 14175–14180. 10.1073/pnas.2336198100.

344. Prlic, M., and Bevan, M.J. (2008). Exploring regulatory mechanisms of CD8+ T cell contraction. *Proc National Acad Sci* 105, 16689–16694. 10.1073/pnas.0808997105.

345. Garrod, K.R., Moreau, H.D., Garcia, Z., Lemaître, F., Bouvier, I., Albert, M.L., and Bousso, P. (2012). Dissecting T Cell Contraction In Vivo Using a Genetically Encoded Reporter of Apoptosis. *Cell Reports* 2, 1438–1447. 10.1016/j.celrep.2012.10.015.

346. Li, M., Wang, D., He, J., Chen, L., and Li, H. (2020). Bcl-XL: A multifunctional anti-apoptotic protein. *Pharmacol Res* 151, 104547. 10.1016/j.phrs.2019.104547.

347. Ataide, M.A., Komander, K., Knöpper, K., Peters, A.E., Wu, H., Eickhoff, S., Gogishvili, T., Weber, J., Grafen, A., Kallies, A., et al. (2020). BATF3 programs CD8+ T cell memory. *Nat Immunol* 21, 1397–1407. 10.1038/s41590-020-0786-2.

348. ARAKAWA, S., HONDA, S., YAMAGUCHI, H., and SHIMIZU, S. (2017). Molecular mechanisms and physiological roles of Atg5/Atg7-independent alternative autophagy. *Proc Jpn Acad Ser B* 93, 378–385. 10.2183/pjab.93.023.
349. Xu, X., Araki, K., Li, S., Han, J.-H., Ye, L., Tan, W.G., Konieczny, B.T., Bruinsma, M.W., Martinez, J., Pearce, E.L., et al. (2014). Autophagy is essential for effector CD8⁺ T cell survival and memory formation. *Nat Immunol* 15, 1152–1161. 10.1038/ni.3025.
350. Nanjappa, S.G., Walent, J.H., Morre, M., and Suresh, M. (2008). Effects of IL-7 on memory CD8⁺ T cell homeostasis are influenced by the timing of therapy in mice. *J Clin Invest* 118, 1027–1039. 10.1172/jci32020.
351. Yajima, T., Yoshihara, K., Nakazato, K., Kumabe, S., Koyasu, S., Sad, S., Shen, H., Kuwano, H., and Yoshikai, Y. (2006). IL-15 Regulates CD8⁺ T Cell Contraction during Primary Infection. *J Immunol* 176, 507–515. 10.4049/jimmunol.176.1.507.
352. Wherry, E.J., Teichgräber, V., Becker, T.C., Masopust, D., Kaech, S.M., Antia, R., Andrian, U.H. von, and Ahmed, R. (2003). Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* 4, 225–234. 10.1038/ni889.
353. Curtsinger, J.M., Lins, D.C., and Mescher, M.F. (1998). CD8⁺ Memory T Cells (CD44^{high}, Ly-6C⁺) Are More Sensitive than Naive Cells (CD44^{low}, Ly-6C⁻) to TCR/CD8 Signaling in Response to Antigen. *J Immunol* 160, 3236–3243. 10.4049/jimmunol.160.7.3236.
354. Kumar, R., Ferez, M., Swamy, M., Arechaga, I., Rejas, M.T., Valpuesta, J.M., Schamel, W.W.A., Alarcon, B., and van Santen, H.M. (2011). Increased Sensitivity of Antigen-Experienced T Cells through the Enrichment of Oligomeric T Cell Receptor Complexes. *Immunity* 35, 375–387. 10.1016/j.immuni.2011.08.010.
355. Stout, R.D., and Suttles, J. (1992). T cells bearing the CD44^{hi} “memory” phenotype display characteristics of activated cells in G1 stage of cell cycle. *Cell Immunol* 141, 433–443. 10.1016/0008-8749(92)90161-h.
356. Veiga-Fernandes, H., Walter, U., Bourgeois, C., McLean, A., and Rocha, B. (2000). Response of naïve and memory CD8⁺ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat Immunol* 1, 47–53. 10.1038/76907.
357. Akondy, R.S., Fitch, M., Edupuganti, S., Yang, S., Kissick, H.T., Li, K.W., Youngblood, B.A., Abdelsamed, H.A., McGuire, D.J., Cohen, K.W., et al. (2017). Origin and differentiation of human memory CD8 T cells after vaccination. *Nature* 552, 362–367. 10.1038/nature24633.
358. Cho, B.K., Wang, C., Sugawa, S., Eisen, H.N., and Chen, J. (1999). Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc National Acad Sci* 96, 2976–2981. 10.1073/pnas.96.6.2976.

359. Scott-Browne, J.P., López-Moyado, I.F., Trifari, S., Wong, V., Chavez, L., Rao, A., and Pereira, R.M. (2016). Dynamic Changes in Chromatin Accessibility Occur in CD8⁺ T Cells Responding to Viral Infection. *Immunity* 45, 1327–1340. 10.1016/j.immuni.2016.10.028.
360. Schauder, D.M., Shen, J., Chen, Y., Kasmani, M.Y., Kudek, M.R., Burns, R., and Cui, W. (2021). E2A-regulated epigenetic landscape promotes memory CD8 T cell differentiation. *Proc National Acad Sci* 118, e2013452118. 10.1073/pnas.2013452118.
361. Scharer, C.D., Bally, A.P.R., Gandham, B., and Boss, J.M. (2017). Cutting Edge: Chromatin Accessibility Programs CD8 T Cell Memory. *J Immunol* 198, 2238–2243. 10.4049/jimmunol.1602086.
362. Soudja, S.M., Ruiz, A.L., Marie, J.C., and Lauvau, G. (2012). Inflammatory Monocytes Activate Memory CD8⁺ T and Innate NK Lymphocytes Independent of Cognate Antigen during Microbial Pathogen Invasion. *Immunity* 37, 549–562. 10.1016/j.immuni.2012.05.029.
363. Raué, H.-P., Beadling, C., Haun, J., and Slifka, M.K. (2013). Cytokine-Mediated Programmed Proliferation of Virus-Specific CD8⁺ Memory T Cells. *Immunity* 38, 131–139. 10.1016/j.immuni.2012.09.019.
364. Richer, M.J., Nolz, J.C., and Harty, J.T. (2013). Pathogen-Specific Inflammatory Milieu Tune the Antigen Sensitivity of CD8⁺ T Cells by Enhancing T Cell Receptor Signaling. *Immunity* 38, 140–152. 10.1016/j.immuni.2012.09.017.
365. Richer, M.J., Pewe, L.L., Hancox, L.S., Hartwig, S.M., Varga, S.M., and Harty, J.T. (2015). Inflammatory IL-15 is required for optimal memory T cell responses. *J Clin Invest* 125, 3477–3490. 10.1172/jci81261.
366. Wolint, P., Betts, M.R., Koup, R.A., and Oxenius, A. (2004). Immediate Cytotoxicity But Not Degranulation Distinguishes Effector and Memory Subsets of CD8⁺ T Cells. *J Exp Medicine* 199, 925–936. 10.1084/jem.20031799.
367. Milner, J.J., Nguyen, H., Omilusik, K., Reina-Campos, M., Tsai, M., Toma, C., Delpoux, A., Boland, B.S., Hedrick, S.M., Chang, J.T., et al. (2020). Delineation of a molecularly distinct terminally differentiated memory CD8 T cell population. *Proc National Acad Sci* 117, 25667–25678. 10.1073/pnas.2008571117.
368. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708–712. 10.1038/44385.
369. Farber, D.L., Yudanin, N.A., and Restifo, N.P. (2014). Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14, 24–35. 10.1038/nri3567.
370. Masopust, D., and Schenkel, J.M. (2013). The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat Rev Immunol* 13, 309–320. 10.1038/nri3442.

371. Osborn, J.F., Mooster, J.L., Hobbs, S.J., Munks, M.W., Barry, C., Harty, J.T., Hill, A.B., and Nolz, J.C. (2017). Enzymatic synthesis of core 2 O-glycans governs the tissue-trafficking potential of memory CD8⁺ T cells. *Sci Immunol* 2, eaan6049. 10.1126/sciimmunol.aan6049.
372. Graef, P., Buchholz, V.R., Stemberger, C., Flossdorf, M., Henkel, L., Schiemann, M., Drexler, I., Höfer, T., Riddell, S.R., and Busch, D.H. (2014). Serial Transfer of Single-Cell-Derived Immunocompetence Reveals Stemness of CD8⁺ Central Memory T Cells. *Immunity* 41, 116–126. 10.1016/j.immuni.2014.05.018.
373. Huster, K.M., Koffler, M., Stemberger, C., Schiemann, M., Wagner, H., and Busch, D.H. (2006). Unidirectional development of CD8⁺ central memory T cells into protective Listeria-specific effector memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 36, 1453–1464. 10.1002/eji.200635874.
374. Osborn, J.F., Hobbs, S.J., Mooster, J.L., Khan, T.N., Kilgore, A.M., Harbour, J.C., and Nolz, J.C. (2019). Central memory CD8⁺ T cells become CD69⁺ tissue-residents during viral skin infection independent of CD62L-mediated lymph node surveillance. *Plos Pathog* 15, e1007633. 10.1371/journal.ppat.1007633.
375. Mueller, S.N., Gebhardt, T., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2013). Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence. *Annu Rev Immunol* 31, 137–161. 10.1146/annurev-immunol-032712-095954.
376. Steinert, E.M., Schenkel, J.M., Fraser, K.A., Beura, L.K., Manlove, L.S., Igyártó, B.Z., Southern, P.J., and Masopust, D. (2015). Quantifying Memory CD8 T Cells Reveals Regionalization of Immunosurveillance. *Cell* 161, 737–749. 10.1016/j.cell.2015.03.031.
377. Masopust, D., Vezys, V., Usherwood, E.J., Cauley, L.S., Olson, S., Marzo, A.L., Ward, R.L., Woodland, D.L., and Lefrançois, L. (2004). Activated Primary and Memory CD8 T Cells Migrate to Nonlymphoid Tissues Regardless of Site of Activation or Tissue of Origin. *J Immunol* 172, 4875–4882. 10.4049/jimmunol.172.8.4875.
378. Wijeyesinghe, S., Beura, L.K., Pierson, M.J., Stolley, J.M., Adam, O.A., Ruscher, R., Steinert, E.M., Rosato, P.C., Vezys, V., and Masopust, D. (2021). Expansive residence decentralizes immune homeostasis. *Nature* 592, 457–462. 10.1038/s41586-021-03351-3.
379. Parga-Vidal, L., and Gisbergen, K.P.J.M. van (2020). Area under Immunosurveillance: Dedicated Roles of Memory CD8 T-Cell Subsets. *Csh Perspect Biol* 12, a037796. 10.1101/cshperspect.a037796.
380. Kieper, W.C., and Jameson, S.C. (1999). Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naïve T cells in response to self peptide/MHC ligands. *Proc National Acad Sci* 96, 13306–13311. 10.1073/pnas.96.23.13306.
381. Lee, J.-Y., Hamilton, S.E., Akue, A.D., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2013). Virtual memory CD8 T cells display unique functional properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 13498–13503. 10.1073/pnas.1307572110.

382. Kwesi-Maliepaard, E.M., Jacobs, H., and Leeuwen, F. van (2021). Signals for antigen-independent differentiation of memory CD8⁺ T cells. *Cell Mol Life Sci* 78, 6395–6408. 10.1007/s00018-021-03912-9.
383. Smith, N.L., Patel, R.K., Reynaldi, A., Grenier, J.K., Wang, J., Watson, N.B., Nzingha, K., Mon, K.J.Y., Peng, S.A., Grimson, A., et al. (2018). Developmental Origin Governs CD8⁺ T Cell Fate Decisions during Infection. *Cell* 174, 117–130.e14. 10.1016/j.cell.2018.05.029.
384. Chiu, B.-C., Martin, B.E., Stolberg, V.R., and Chensue, S.W. (2013). Cutting Edge: Central Memory CD8 T Cells in Aged Mice Are Virtual Memory Cells. *J Immunol* 191, 5793–5796. 10.4049/jimmunol.1302509.
385. Schüler, T., Hämmerling, G.J., and Arnold, B. (2004). Cutting Edge: IL-7-Dependent Homeostatic Proliferation of CD8⁺ T Cells in Neonatal Mice Allows the Generation of Long-Lived Natural Memory T Cells. *J Immunol* 172, 15–19. 10.4049/jimmunol.172.1.15.
386. Sosinowski, T., White, J.T., Cross, E.W., Haluszczak, C., Marrack, P., Gapin, L., and Kedl, R.M. (2013). CD8 α ⁺ Dendritic Cell Trans Presentation of IL-15 to Naive CD8⁺ T Cells Produces Antigen-Inexperienced T Cells in the Periphery with Memory Phenotype and Function. *J Immunol* 190, 1936–1947. 10.4049/jimmunol.1203149.
387. White, J.T., Cross, E.W., Burchill, M.A., Danhorn, T., McCarter, M.D., Rosen, H.R., O'Connor, B., and Kedl, R.M. (2016). Virtual memory T cells develop and mediate bystander protective immunity in an IL-15-dependent manner. *Nat Commun* 7, 11291. 10.1038/ncomms11291.
388. Tripathi, P., Morris, S.C., Perkins, C., Sholl, A., Finkelman, F.D., and Hildeman, D.A. (2016). IL-4 and IL-15 promotion of virtual memory CD8⁺ T cells is determined by genetic background. *Eur. J. Immunol.* 46, 2333–2339. 10.1002/eji.201646404.
389. Weinreich, M.A., Odumade, O.A., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2010). T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* 11, 709–716. 10.1038/ni.1898.
390. Akue, A.D., Lee, J.Y., and Jameson, S.C. (2012). Derivation and Maintenance of Virtual Memory CD8 T Cells. *The Journal of Immunology* 188, 2516–2523. 10.4049/jimmunol.1102213.
391. Jergović, M., Coplen, C.P., Uhrlaub, J.L., Besselsen, D.G., Cheng, S., Smithey, M.J., and Nikolich-Zugich, J. (2021). Infection-induced type I interferons critically modulate the homeostasis and function of CD8⁺ naïve T cells. *Nat Commun* 12, 5303. 10.1038/s41467-021-25645-w.
392. Haluszczak, C., Akue, A.D., Hamilton, S.E., Johnson, L.D.S., Pujanauski, L., Teodorovic, L., Jameson, S.C., and Kedl, R.M. (2009). The antigen-specific CD8⁺ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. *J Exp Med* 206, 435–448. 10.1084/jem.20081829.

393. Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Kao, C., Banerjee, A., Schambach, F., Northrop, J.K., Shen, H., Wherry, E.J., and Reiner, S.L. (2007). Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8⁺T cells. *J Exp Med* 204, 2015–2021. 10.1084/jem.20070841.
394. Cannarile, M.A., Lind, N.A., Rivera, R., Sheridan, A.D., Camfield, K.A., Wu, B.B., Cheung, K.P., Ding, Z., and Goldrath, A.W. (2006). Transcriptional regulator Id2 mediates CD8⁺ T cell immunity. *Nat Immunol* 7, 1317–1325. 10.1038/ni1403.
395. Jeannot, G., Boudousquié, C., Gardiol, N., Kang, J., Huelsken, J., and Held, W. (2010). Essential role of the Wnt pathway effector Tcf-1 for the establishment of functional CD8 T cell memory. *Proc National Acad Sci* 107, 9777–9782. 10.1073/pnas.0914127107.
396. Zhou, X., Yu, S., Zhao, D.-M., Harty, J.T., Badovinac, V.P., and Xue, H.-H. (2010). Differentiation and Persistence of Memory CD8⁺ T Cells Depend on T Cell Factor 1. *Immunity* 33, 229–240. 10.1016/j.immuni.2010.08.002.
397. Banerjee, A., Gordon, S.M., Intlekofer, A.M., Paley, M.A., Mooney, E.C., Lindsten, T., Wherry, E.J., and Reiner, S.L. (2010). Cutting Edge: The Transcription Factor Eomesodermin Enables CD8⁺ T Cells To Compete for the Memory Cell Niche. *J Immunol* 185, 4988–4992. 10.4049/jimmunol.1002042.
398. Ichii, H., Sakamoto, A., Kuroda, Y., and Tokuhisa, T. (2004). Bcl6 Acts as an Amplifier for the Generation and Proliferative Capacity of Central Memory CD8⁺ T Cells. *J Immunol* 173, 883–891. 10.4049/jimmunol.173.2.883.
399. Cui, W., Liu, Y., Weinstein, J.S., Craft, J., and Kaech, S.M. (2011). An Interleukin-21-Interleukin-10-STAT3 Pathway Is Critical for Functional Maturation of Memory CD8⁺ T Cells. *Immunity* 35, 792–805. 10.1016/j.immuni.2011.09.017.
400. Mackay, L.K., Minnich, M., Kragten, N.A.M., Liao, Y., Nota, B., Seillet, C., Zaid, A., Man, K., Preston, S., Freestone, D., et al. (2016). Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. *Science* 352, 459–463. 10.1126/science.aad2035.
401. Mora-Buch, R., and Bromley, S.K. (2021). Discipline in Stages: Regulating CD8⁺ Resident Memory T Cells. *Front Immunol* 11, 624199. 10.3389/fimmu.2020.624199.
402. Skon, C.N., Lee, J.-Y., Anderson, K.G., Masopust, D., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2013). Transcriptional downregulation of *S1pr1* is required for the establishment of resident memory CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* 14, 1285–1293. 10.1038/ni.2745.
403. Mackay, L.K., Wynne-Jones, E., Freestone, D., Pellicci, D.G., Mielke, L.A., Newman, D.M., Braun, A., Masson, F., Kallies, A., Belz, G.T., et al. (2015). T-box Transcription Factors Combine with the Cytokines TGF- β and IL-15 to Control Tissue-Resident Memory T Cell Fate. *Immunity* 43, 1101–1111. 10.1016/j.immuni.2015.11.008.

404. Weinreich, M.A., Takada, K., Skon, C., Reiner, S.L., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2009). KLF2 Transcription-Factor Deficiency in T Cells Results in Unrestrained Cytokine Production and Upregulation of Bystander Chemokine Receptors. *Immunity* *31*, 122–130. 10.1016/j.immuni.2009.05.011.
405. Takada, K., Wang, X., Hart, G.T., Odumade, O.A., Weinreich, M.A., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2011). Kruppel-Like Factor 2 Is Required for Trafficking but Not Quiescence in Postactivated T Cells. *J Immunol* *186*, 775–783. 10.4049/jimmunol.1000094.
406. Behr, F.M., Kragten, N.A.M., Wesselink, T.H., Nota, B., Lier, R.A.W. van, Amsen, D., Stark, R., Hombrink, P., and Gisbergen, K.P.J.M. van (2019). Blimp-1 Rather Than Hobit Drives the Formation of Tissue-Resident Memory CD8⁺ T Cells in the Lungs. *Front Immunol* *10*, 400. 10.3389/fimmu.2019.00400.
407. Parga-Vidal, L., Behr, F.M., Kragten, N.A.M., Nota, B., Wesselink, T.H., Kavazović, I., Covill, L.E., Schuller, M.B.P., Bryceson, Y.T., Wensveen, F.M., et al. (2021). Hobit identifies tissue-resident memory T cell precursors that are regulated by Eomes. *Sci Immunol* *6*, eabg3533. 10.1126/sciimmunol.abg3533.
408. Parga-Vidal, L., Taggenbrock, R.L.R.E., Beumer-Chuwonpad, A., Aglmous, H., Kragten, N.A.M., Behr, F.M., Bovens, A.A., Lier, R.A.W. van, Stark, R., and Gisbergen, K.P.J.M. van (2022). Hobit and Blimp-1 regulate TRM abundance after LCMV infection by suppressing tissue exit pathways of TRM precursors. *Eur. J. Immunol.* *52*, 1095–1111. 10.1002/eji.202149665.
409. Siracusa, F., Alp, Ö.S., Maschmeyer, P., McGrath, M., Mashreghi, M., Hojyo, S., Chang, H., Tokoyoda, K., and Radbruch, A. (2017). Maintenance of CD8⁺ memory T lymphocytes in the spleen but not in the bone marrow is dependent on proliferation. *Eur. J. Immunol.* *47*, 1900–1905. 10.1002/eji.201747063.
410. Rosa, F.D. (2016). Two Niches in the Bone Marrow: A Hypothesis on Life-long T Cell Memory. *Trends Immunol* *37*, 503–512. 10.1016/j.it.2016.05.004.
411. Bachmann, M.F., Wolint, P., Schwarz, K., Jäger, P., and Oxenius, A. (2005). Functional Properties and Lineage Relationship of CD8⁺ T Cell Subsets Identified by Expression of IL-7 Receptor α and CD62L. *J Immunol* *175*, 4686–4696. 10.4049/jimmunol.175.7.4686.
412. Klonowski, K.D., Williams, K.J., Marzo, A.L., and Lefrançois, L. (2006). Cutting Edge: IL-7-Independent Regulation of IL-7 Receptor α Expression and Memory CD8 T Cell Development. *J Immunol* *177*, 4247–4251. 10.4049/jimmunol.177.7.4247.
413. Hand, T.W., Morre, M., and Kaech, S.M. (2007). Expression of IL-7 receptor α is necessary but not sufficient for the formation of memory CD8 T cells during viral infection. *Proc National Acad Sci* *104*, 11730–11735. 10.1073/pnas.0705007104.

414. Cui, G., Staron, M.M., Gray, S.M., Ho, P.-C., Amezcua, R.A., Wu, J., and Kaech, S.M. (2015). IL-7-Induced Glycerol Transport and TAG Synthesis Promotes Memory CD8⁺ T Cell Longevity. *Cell* *161*, 750–761. 10.1016/j.cell.2015.03.021.
415. van der Windt, G.J.W., Everts, B., Chang, C.-H., Curtis, J.D., Freitas, T.C., Amiel, E., Pearce, E.J., and Pearce, E.L. (2012). Mitochondrial Respiratory Capacity Is a Critical Regulator of CD8⁺ T Cell Memory Development. *Immunity* *36*, 68–78. 10.1016/j.immuni.2011.12.007.
416. O’Sullivan, D., van der Windt, G.J.W., Huang, S.C.-C., Curtis, J.D., Chang, C.-H., Buck, M.D., Qiu, J., Smith, A.M., Lam, W.Y., DiPlato, L.M., et al. (2014). Memory CD8⁺ T Cells Use Cell-Intrinsic Lipolysis to Support the Metabolic Programming Necessary for Development. *Immunity* *41*, 75–88. 10.1016/j.immuni.2014.06.005.
417. Sandau, M.M., Kohlmeier, J.E., Woodland, D.L., and Jameson, S.C. (2010). IL-15 Regulates Both Quantitative and Qualitative Features of the Memory CD8 T Cell Pool. *J Immunol* *184*, 35–44. 10.4049/jimmunol.0803355.
418. Becker, T.C., Wherry, E.J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A., and Ahmed, R. (2002). Interleukin 15 Is Required for Proliferative Renewal of Virus-specific Memory CD8 T Cells. *J Exp Medicine* *195*, 1541–1548. 10.1084/jem.20020369.
419. Schluns, K.S., Williams, K., Ma, A., Zheng, X.X., and Lefrançois, L. (2002). Cutting Edge: Requirement for IL-15 in the Generation of Primary and Memory Antigen-Specific CD8 T Cells. *J Immunol* *168*, 4827–4831. 10.4049/jimmunol.168.10.4827.
420. DiSpirito, J.R., and Shen, H. (2010). Quick to remember, slow to forget: rapid recall responses of memory CD8⁺ T cells. *Cell Res* *20*, 13–23. 10.1038/cr.2009.140.
421. Roberts, A.D., Ely, K.H., and Woodland, D.L. (2005). Differential contributions of central and effector memory T cells to recall responses. *J Exp Medicine* *202*, 123–133. 10.1084/jem.20050137.
422. Sung, J.H., Zhang, H., Moseman, E.A., Alvarez, D., Iannaccone, M., Henrickson, S.E., de la Torre, J.C., Groom, J.R., Luster, A.D., and von Andrian, U.H. (2012). Chemokine Guidance of Central Memory T Cells Is Critical for Antiviral Recall Responses in Lymph Nodes. *Cell* *150*, 1249–1263. 10.1016/j.cell.2012.08.015.
423. Martin, M.D., Kim, M.T., Shan, Q., Sompallae, R., Xue, H.-H., Harty, J.T., and Badovinac, V.P. (2015). Phenotypic and Functional Alterations in Circulating Memory CD8 T Cells with Time after Primary Infection. *Plos Pathog* *11*, e1005219. 10.1371/journal.ppat.1005219.
424. Olson, J.A., McDonald-Hyman, C., Jameson, S.C., and Hamilton, S.E. (2013). Effector-like CD8⁺ T Cells in the Memory Population Mediate Potent Protective Immunity. *Immunity* *38*, 1250–1260. 10.1016/j.immuni.2013.05.009.

425. Wu, T., Hu, Y., Lee, Y., Bouchard, K.R., Benechet, A., Khanna, K., and Cauley, L.S. (2014). Lung-resident memory CD8 T cells (TRM) are indispensable for optimal cross-protection against pulmonary virus infection. *J Leukocyte Biol* 95, 215–224. 10.1189/jlb.0313180.
426. Jiang, X., Clark, R.A., Liu, L., Wagers, A.J., Fuhlbrigge, R.C., and Kupper, T.S. (2012). Skin infection generates non-migratory memory CD8⁺ TRM cells providing global skin immunity. *Nature* 483, 227–231. 10.1038/nature10851.
427. Gebhardt, T., Wakim, L.M., Eidsmo, L., Reading, P.C., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2009). Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol* 10, 524–530. 10.1038/ni.1718.
428. Beura, L.K., Mitchell, J.S., Thompson, E.A., Schenkel, J.M., Mohammed, J., Wijeyesinghe, S., Fonseca, R., Burbach, B.J., Hickman, H.D., Vezys, V., et al. (2018). Intravital mucosal imaging of CD8⁺ resident memory T cells shows tissue-autonomous recall responses that amplify secondary memory. *Nat Immunol* 19, 173–182. 10.1038/s41590-017-0029-3.
429. Masopust, D., Vezys, V., Wherry, E.J., Barber, D.L., and Ahmed, R. (2006). Cutting Edge: Gut Microenvironment Promotes Differentiation of a Unique Memory CD8 T Cell Population. *J Immunol* 176, 2079–2083. 10.4049/jimmunol.176.4.2079.
430. Park, S.L., Zaid, A., Hor, J.L., Christo, S.N., Prier, J.E., Davies, B., Alexandre, Y.O., Gregory, J.L., Russell, T.A., Gebhardt, T., et al. (2018). Local proliferation maintains a stable pool of tissue-resident memory T cells after antiviral recall responses. *Nat Immunol* 19, 183–191. 10.1038/s41590-017-0027-5.
431. Beura, L.K., Wijeyesinghe, S., Thompson, E.A., Macchietto, M.G., Rosato, P.C., Pierson, M.J., Schenkel, J.M., Mitchell, J.S., Vezys, V., Fife, B.T., et al. (2018). T Cells in Nonlymphoid Tissues Give Rise to Lymph-Node-Resident Memory T Cells. *Immunity* 48, 327–338.e5. 10.1016/j.immuni.2018.01.015.
432. Fonseca, R., Beura, L.K., Quarnstrom, C.F., Ghoneim, H.E., Fan, Y., Zebley, C.C., Scott, M.C., Fares-Frederickson, N.J., Wijeyesinghe, S., Thompson, E.A., et al. (2020). Developmental plasticity allows outside-in immune responses by resident memory T cells. *Nat Immunol* 21, 412–421. 10.1038/s41590-020-0607-7.
433. Slütter, B., Braeckel-Budimir, N.V., Abboud, G., Varga, S.M., Salek-Ardakani, S., and Harty, J.T. (2017). Dynamics of influenza-induced lung-resident memory T cells underlie waning heterosubtypic immunity. *Sci Immunol* 2, eaag2031. 10.1126/sciimmunol.aag2031.
434. Böttcher, J.P., Beyer, M., Meissner, F., Abdullah, Z., Sander, J., Höchst, B., Eickhoff, S., Rieckmann, J.C., Russo, C., Bauer, T., et al. (2015). Functional classification of memory CD8⁺ T cells by CX3CR1 expression. *Nat Commun* 6, 8306. 10.1038/ncomms9306.

435. Bachmann, M.F., Wolint, P., Walton, S., Schwarz, K., and Oxenius, A. (2007). Differential role of IL-2R signaling for CD8⁺ T cell responses in acute and chronic viral infections. *Eur. J. Immunol.* *37*, 1502–1512. 10.1002/eji.200637023.
436. Blackburn, S.D., Shin, H., Haining, W.N., Zou, T., Workman, C.J., Polley, A., Betts, M.R., Freeman, G.J., Vignali, D.A.A., and Wherry, E.J. (2009). Coregulation of CD8⁺ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* *10*, 29–37. 10.1038/ni.1679.
437. Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Kurosaki, T., and Honjo, T. (2001). PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc National Acad Sci* *98*, 13866–13871. 10.1073/pnas.231486598.
438. Sheppard, K.-A., Fitz, L.J., Lee, J.M., Benander, C., George, J.A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J.M., Carter, L.L., Wood, C.R., et al. (2004). PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3 ζ signalosome and downstream signaling to PKC θ . *Febs Lett* *574*, 37–41. 10.1016/j.febslet.2004.07.083.
439. Li, K., Yuan, Z., Lyu, J., Ahn, E., Davis, S.J., Ahmed, R., and Zhu, C. (2021). PD-1 suppresses TCR-CD8 cooperativity during T-cell antigen recognition. *Nat Commun* *12*, 2746. 10.1038/s41467-021-22965-9.
440. Patsoukis, N., Brown, J., Petkova, V., Liu, F., Li, L., and Boussiotis, V.A. (2012). Selective Effects of PD-1 on Akt and Ras Pathways Regulate Molecular Components of the Cell Cycle and Inhibit T Cell Proliferation. *Sci Signal* *5*, ra46–ra46. 10.1126/scisignal.2002796.
441. Patsoukis, N., Sari, D., and Boussiotis, V.A. (2012). PD-1 inhibits T cell proliferation by upregulating p27 and p15 and suppressing Cdc25A. *Cell Cycle* *11*, 4305–4309. 10.4161/cc.22135.
442. Parry, R.V., Chemnitz, J.M., Frauwirth, K.A., Lanfranco, A.R., Braunstein, I., Kobayashi, S.V., Linsley, P.S., Thompson, C.B., and Riley, J.L. (2005). CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Mol Cell Biol* *25*, 9543–9553. 10.1128/mcb.25.21.9543-9553.2005.
443. Patsoukis, N., Bardhan, K., Chatterjee, P., Sari, D., Liu, B., Bell, L.N., Karoly, E.D., Freeman, G.J., Petkova, V., Seth, P., et al. (2015). PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun* *6*, 6692. 10.1038/ncomms7692.
444. Staron, M.M., Gray, S.M., Marshall, H.D., Parish, I.A., Chen, J.H., Perry, C.J., Cui, G., Li, M.O., and Kaech, S.M. (2014). The transcription factor FoxO1 sustains expression of the inhibitory receptor PD-1 and survival of antiviral CD8⁽⁺⁾ T cells during chronic infection. *Immunity* *41*, 802–814. 10.1016/j.immuni.2014.10.013.

445. Bengsch, B., Johnson, A.L., Kurachi, M., Odorizzi, P.M., Pauken, K.E., Attanasio, J., Stelekati, E., McLane, L.M., Paley, M.A., Delgoffe, G.M., et al. (2016). Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8⁺ T Cell Exhaustion. *Immunity* 45, 358–373. 10.1016/j.immuni.2016.07.008.
446. Wang, J., Sanmamed, M.F., Datar, I., Su, T.T., Ji, L., Sun, J., Chen, L., Chen, Y., Zhu, G., Yin, W., et al. (2019). Fibrinogen-like Protein 1 Is a Major Immune Inhibitory Ligand of LAG-3. *Cell* 176, 334–347.e12. 10.1016/j.cell.2018.11.010.
447. Kouo, T., Huang, L., Pucsek, A.B., Cao, M., Solt, S., Armstrong, T., and Jaffee, E. (2015). Galectin-3 Shapes Antitumor Immune Responses by Suppressing CD8⁺ T Cells via LAG-3 and Inhibiting Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Cancer Immunol Res* 3, 412–423. 10.1158/2326-6066.cir-14-0150.
448. Liu, W., Tang, L., Zhang, G., Wei, H., Cui, Y., Guo, L., Gou, Z., Chen, X., Jiang, D., Zhu, Y., et al. (2004). Characterization of a Novel C-type Lectin-like Gene, LSECTin DEMONSTRATION OF CARBOHYDRATE BINDING AND EXPRESSION IN SINUSOIDAL ENDOTHELIAL CELLS OF LIVER AND LYMPH NODE*. *J Biol Chem* 279, 18748–18758. 10.1074/jbc.m311227200.
449. Xu, F., Liu, J., Liu, D., Liu, B., Wang, M., Hu, Z., Du, X., Tang, L., and He, F. (2014). LSECTin Expressed on Melanoma Cells Promotes Tumor Progression by Inhibiting Antitumor T-cell Responses. *Cancer Res* 74, 3418–3428. 10.1158/0008-5472.can-13-2690.
450. Mao, X., Ou, M.T., Karuppagounder, S.S., Kam, T.-I., Yin, X., Xiong, Y., Ge, P., Umanah, G.E., Brahmachari, S., Shin, J.-H., et al. (2016). Pathological α -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Science* 353. 10.1126/science.aah3374.
451. Weyer, P.S. van de, Muehlfeit, M., Klose, C., Bonventre, J.V., Walz, G., and Kuehn, E.W. (2006). A highly conserved tyrosine of Tim-3 is phosphorylated upon stimulation by its ligand galectin-9. *Biochem Bioph Res Co* 351, 571–576. 10.1016/j.bbrc.2006.10.079.
452. Huang, Y.-H., Zhu, C., Kondo, Y., Anderson, A.C., Gandhi, A., Russell, A., Dougan, S.K., Petersen, B.-S., Melum, E., Pertel, T., et al. (2015). CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature* 517, 386–390. 10.1038/nature13848.
453. DeKruyff, R.H., Bu, X., Ballesteros, A., Santiago, C., Chim, Y.-L.E., Lee, H.-H., Karisola, P., Pichavant, M., Kaplan, G.G., Umetsu, D.T., et al. (2010). T Cell/Transmembrane, Ig, and Mucin-3 Allelic Variants Differentially Recognize Phosphatidylserine and Mediate Phagocytosis of Apoptotic Cells. *J Immunol* 184, 1918–1930. 10.4049/jimmunol.0903059.
454. Wolf, Y., Anderson, A.C., and Kuchroo, V.K. (2020). TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. *Nat Rev Immunol* 20, 173–185. 10.1038/s41577-019-0224-6.

455. Zhu, C., Dixon, K.O., Newcomer, K., Gu, G., Xiao, S., Zaghouani, S., Schramm, M.A., Wang, C., Zhang, H., Goto, K., et al. (2021). Tim-3 adaptor protein Bat3 is a molecular checkpoint of T cell terminal differentiation and exhaustion. *Sci Adv* 7, eabd2710. 10.1126/sciadv.abd2710.
456. Kikushige, Y. (2021). TIM-3 in normal and malignant hematopoiesis: Structure, function, and signaling pathways. *Cancer Sci* 112, 3419–3426. 10.1111/cas.15042.
457. Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Medicine* 182, 459–465. 10.1084/jem.182.2.459.
458. Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1996). CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Medicine* 183, 2533–2540. 10.1084/jem.183.6.2533.
459. Pentcheva-Hoang, T., Egen, J.G., Wojnoonski, K., and Allison, J.P. (2004). B7-1 and B7-2 Selectively Recruit CTLA-4 and CD28 to the Immunological Synapse. *Immunity* 21, 401–413. 10.1016/j.immuni.2004.06.017.
460. Walker, L.S.K., and Sansom, D.M. (2011). The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol* 11, 852–863. 10.1038/nri3108.
461. Collins, A.V., Brodie, D.W., Gilbert, R.J.C., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B., Stuart, D.I., Merwe, P.A. van der, and Davis, S.J. (2002). The Interaction Properties of Costimulatory Molecules Revisited. *Immunity* 17, 201–210. 10.1016/s1074-7613(02)00362-x.
462. Darlington, P.J., Baroja, M.L., Chau, T.A., Siu, E., Ling, V., Carreno, B.M., and Madrenas, J. (2002). Surface Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4 Partitions Within Lipid Rafts and Relocates to the Immunological Synapse under Conditions of Inhibition of T Cell Activation. *J Exp Medicine* 195, 1337–1347. 10.1084/jem.20011868.
463. Schneider, H., Downey, J., Smith, A., Zinselmeyer, B.H., Rush, C., Brewer, J.M., Wei, B., Hogg, N., Garside, P., and Rudd, C.E. (2006). Reversal of the TCR Stop Signal by CTLA-4. *Science* 313, 1972–1975. 10.1126/science.1131078.
464. Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., Jeffery, L.E., Kaur, S., Briggs, Z., et al. (2011). Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of CTLA-4. *Science* 332, 600–603. 10.1126/science.1202947.
465. Ovcinnikovs, V., Ross, E.M., Peterson, L., Edner, N.M., Heuts, F., Ntavli, E., Kogimtzis, A., Kennedy, A., Wang, C.J., Bennett, C.L., et al. (2019). CTLA-4-mediated transendocytosis of costimulatory molecules primarily targets migratory dendritic cells. *Sci Immunol* 4. 10.1126/sciimmunol.aaw0902.

466. Philip, M., Fairchild, L., Sun, L., Horste, E.L., Camara, S., Shakiba, M., Scott, A.C., Viale, A., Lauer, P., Merghoub, T., et al. (2017). Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. *Nature* 545, 452–456. 10.1038/nature22367.
467. Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J.M., Blazar, B.R., Kuchroo, V.K., and Anderson, A.C. (2010). Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Medicine* 207, 2187–2194. 10.1084/jem.20100643.
468. Hudson, W.H., Gensheimer, J., Hashimoto, M., Wieland, A., Valanparambil, R.M., Li, P., Lin, J.-X., Konieczny, B.T., Im, S.J., Freeman, G.J., et al. (2019). Proliferating Transitory T Cells with an Effector-like Transcriptional Signature Emerge from PD-1+ Stem-like CD8+ T Cells during Chronic Infection. *Immunity* 51, 1043-1058.e4. 10.1016/j.immuni.2019.11.002.
469. Beltra, J.-C., Manne, S., Abdel-Hakeem, M.S., Kurachi, M., Giles, J.R., Chen, Z., Casella, V., Ngiow, S.F., Khan, O., Huang, Y.J., et al. (2020). Developmental Relationships of Four Exhausted CD8+ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms. *Immunity* 52, 825-841.e8. 10.1016/j.immuni.2020.04.014.
470. Wu, T., Ji, Y., Moseman, E.A., Xu, H.C., Manghani, M., Kirby, M., Anderson, S.M., Handon, R., Kenyon, E., Elkahloun, A., et al. (2016). The TCF1-Bcl6 axis counteracts type I interferon to repress exhaustion and maintain T cell stemness. *Sci Immunol* 1. 10.1126/sciimmunol.aai8593.
471. Miller, B.C., Sen, D.R., Abosy, R.A., Bi, K., Virkud, Y.V., LaFleur, M.W., Yates, K.B., Lako, A., Felt, K., Naik, G.S., et al. (2019). Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat Immunol* 20, 326–336. 10.1038/s41590-019-0312-6.
472. Utzschneider, D.T., Charmoy, M., Chennupati, V., Pousse, L., Ferreira, D.P., Calderon-Copete, S., Danilo, M., Alfei, F., Hofmann, M., Wieland, D., et al. (2016). T Cell Factor 1-Expressing Memory-like CD8+ T Cells Sustain the Immune Response to Chronic Viral Infections. *Immunity* 45, 415–427. 10.1016/j.immuni.2016.07.021.
473. Im, S.J., Hashimoto, M., Gerner, M.Y., Lee, J., Kissick, H.T., Burger, M.C., Shan, Q., Hale, J.S., Lee, J., Nasti, T.H., et al. (2016). Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature* 537, 417–421. 10.1038/nature19330.
474. Yates, K.B., Tonnerre, P., Martin, G.E., Gerdemann, U., Abosy, R.A., Comstock, D.E., Weiss, S.A., Wolski, D., Tully, D.C., Chung, R.T., et al. (2021). Epigenetic scars of CD8+ T cell exhaustion persist after cure of chronic infection in humans. *Nat Immunol* 22, 1020–1029. 10.1038/s41590-021-00979-1.
475. Pauken, K.E., Sammons, M.A., Odorizzi, P.M., Manne, S., Godec, J., Khan, O., Drake, A.M., Chen, Z., Sen, D.R., Kurachi, M., et al. (2016). Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science* 354, 1160–1165. 10.1126/science.aaf2807.

476. Sen, D.R., Kaminski, J., Barnitz, R.A., Kurachi, M., Gerdemann, U., Yates, K.B., Tsao, H.-W., Godec, J., LaFleur, M.W., Brown, F.D., et al. (2016). The epigenetic landscape of T cell exhaustion. *Science* *354*, 1165–1169. 10.1126/science.aac0491.
477. Ghoneim, H.E., Fan, Y., Moustaki, A., Abdelsamed, H.A., Dash, P., Dogra, P., Carter, R., Awad, W., Neale, G., Thomas, P.G., et al. (2017). De Novo Epigenetic Programs Inhibit PD-1 Blockade-Mediated T Cell Rejuvenation. *Cell* *170*, 142-157.e19. 10.1016/j.cell.2017.06.007.
478. He, R., Hou, S., Liu, C., Zhang, A., Bai, Q., Han, M., Yang, Y., Wei, G., Shen, T., Yang, X., et al. (2016). Follicular CXCR5-expressing CD8⁺ T cells curtail chronic viral infection. *Nature* *537*, 412–416. 10.1038/nature19317.
479. Chen, Z., Ji, Z., Ngiow, S.F., Manne, S., Cai, Z., Huang, A.C., Johnson, J., Staupe, R.P., Bengsch, B., Xu, C., et al. (2019). TCF-1-Centered Transcriptional Network Drives an Effector versus Exhausted CD8 T Cell-Fate Decision. *Immunity* *51*, 840-855.e5. 10.1016/j.immuni.2019.09.013.
480. Connolly, K.A., Kuchroo, M., Venkat, A., Khatun, A., Wang, J., William, I., Hornick, N., Fitzgerald, B., Damo, M., Kasmani, M.Y., et al. (2021). A reservoir of stem-like CD8⁺ T cells in the tumor-draining lymph node preserves the ongoing anti-tumor immune response. *Sci Immunol* *6*, eabg7836. 10.1126/sciimmunol.abg7836.
481. Im, S.J., Konieczny, B.T., Hudson, W.H., Masopust, D., and Ahmed, R. (2020). PD-1⁺ stemlike CD8 T cells are resident in lymphoid tissues during persistent LCMV infection. *Proc National Acad Sci* *117*, 4292–4299. 10.1073/pnas.1917298117.
482. Wang, Y., Swiecki, M., Cella, M., Alber, G., Schreiber, R.D., Gilfillan, S., and Colonna, M. (2012). Timing and Magnitude of Type I Interferon Responses by Distinct Sensors Impact CD8 T Cell Exhaustion and Chronic Viral Infection. *Cell Host Microbe* *11*, 631–642. 10.1016/j.chom.2012.05.003.
483. Diamond, M.S., Kinder, M., Matsushita, H., Mashayekhi, M., Dunn, G.P., Archambault, J.M., Lee, H., Arthur, C.D., White, J.M., Kalinke, U., et al. (2011). Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med* *208*, 1989–2003. 10.1084/jem.20101158.
484. Fuertes, M.B., Kacha, A.K., Kline, J., Woo, S.-R., Kranz, D.M., Murphy, K.M., and Gajewski, T.F. (2011). Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells. *J Exp Med* *208*, 2005–2016. 10.1084/jem.20101159.
485. Moseman, E.A., Wu, T., Torre, J.C. de la, Schwartzberg, P.L., and McGavern, D.B. (2016). Type I interferon suppresses virus-specific B cell responses by modulating CD8⁺ T cell differentiation. *Sci Immunol* *1*. 10.1126/sciimmunol.aah3565.

486. Wilson, E.B., Yamada, D.H., Elsaesser, H., Herskovitz, J., Deng, J., Cheng, G., Aronow, B.J., Karp, C.L., and Brooks, D.G. (2013). Blockade of Chronic Type I Interferon Signaling to Control Persistent LCMV Infection. *Science* 340, 202–207. 10.1126/science.1235208.
487. Teijaro, J.R., Ng, C., Lee, A.M., Sullivan, B.M., Sheehan, K.C.F., Welch, M., Schreiber, R.D., Torre, J.C. de la, and Oldstone, M.B.A. (2013). Persistent LCMV Infection Is Controlled by Blockade of Type I Interferon Signaling. *Science* 340, 207–211. 10.1126/science.1235214.
488. Rojas, J.M., Avia, M., Martín, V., and Sevilla, N. (2017). IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. *J Immunol Res* 2017, 6104054. 10.1155/2017/6104054.
489. Shen, P., and Fillatreau, S. (2015). Suppressive functions of B cells in infectious diseases. *Int Immunol* 27, 513–519. 10.1093/intimm/dxv037.
490. Wilson, E.B., and Brooks, D.G. (2010). Negative Co-Receptors and Ligands. *Curr Top Microbiol* 350, 39–65. 10.1007/82_2010_96.
491. Brooks, D.G., Trifilo, M.J., Edelmann, K.H., Teyton, L., McGavern, D.B., and Oldstone, M.B.A. (2006). Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med* 12, 1301–1309. 10.1038/nm1492.
492. Ejrnaes, M., Filippi, C.M., Martinic, M.M., Ling, E.M., Togher, L.M., Crotty, S., and Herrath, M.G. von (2006). Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J Exp Medicine* 203, 2461–2472. 10.1084/jem.20061462.
493. Smith, L.K., Boukhaled, G.M., Condotta, S.A., Mazouz, S., Guthmiller, J.J., Vijay, R., Butler, N.S., Bruneau, J., Shoukry, N.H., Krawczyk, C.M., et al. (2018). Interleukin-10 Directly Inhibits CD8⁺ T Cell Function by Enhancing N-Glycan Branching to Decrease Antigen Sensitivity. *Immunity* 48, 299-312.e5. 10.1016/j.immuni.2018.01.006.
494. Hirahara, K., Onodera, A., Villarino, A.V., Bonelli, M., Sciumè, G., Laurence, A., Sun, H.-W., Brooks, S.R., Vahedi, G., Shih, H.-Y., et al. (2015). Asymmetric Action of STAT Transcription Factors Drives Transcriptional Outputs and Cytokine Specificity. *Immunity* 42, 877–889. 10.1016/j.immuni.2015.04.014.
495. Harker, J.A., Dolgoter, A., and Zuniga, E.I. (2013). Cell-Intrinsic IL-27 and gp130 Cytokine Receptor Signaling Regulates Virus-Specific CD4⁺ T Cell Responses and Viral Control during Chronic Infection. *Immunity* 39, 548–559. 10.1016/j.immuni.2013.08.010.
496. Yoshida, H., and Hunter, C.A. (2015). The Immunobiology of Interleukin-27. *Annu Rev Immunol* 33, 417–443. 10.1146/annurev-immunol-032414-112134.
497. Fabbi, M., Carbotti, G., and Ferrini, S. (2017). Dual Roles of IL-27 in Cancer Biology and Immunotherapy. *Mediat Inflamm* 2017, 3958069. 10.1155/2017/3958069.

498. Harker, J.A., Wong, K.A., Dallari, S., Bao, P., Dolgoter, A., Jo, Y., Wehrens, E.J., Macal, M., and Zuniga, E.I. (2018). Interleukin-27R Signaling Mediates Early Viral Containment and Impacts Innate and Adaptive Immunity after Chronic Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection. *J Virol* 92, e02196-17. 10.1128/jvi.02196-17.
499. Pratumchai, I., Zak, J., Huang, Z., Min, B., Oldstone, M.B.A., and Teijaro, J.R. (2022). B cell-derived IL-27 promotes control of persistent LCMV infection. *Proc National Acad Sci* 119, e2116741119. 10.1073/pnas.2116741119.
500. Huang, Z., Zak, J., Pratumchai, I., Shaabani, N., Vartabedian, V.F., Nguyen, N., Wu, T., Xiao, C., and Teijaro, J.R. (2019). IL-27 promotes the expansion of self-renewing CD8⁺ T cells in persistent viral infection. *J Exp Med* 216, 1791–1808. 10.1084/jem.20190173.
501. Park, Y.-J., Ryu, H., Choi, G., Kim, B.-S., Hwang, E.S., Kim, H.S., and Chung, Y. (2019). IL-27 confers a protumorigenic activity of regulatory T cells via CD39. *Proc National Acad Sci* 116, 3106–3111. 10.1073/pnas.1810254116.
502. Fröhlich, A., Kisielow, J., Schmitz, I., Freigang, S., Shamshiev, A.T., Weber, J., Marsland, B.J., Oxenius, A., and Kopf, M. (2009). IL-21R on T Cells Is Critical for Sustained Functionality and Control of Chronic Viral Infection. *Science* 324, 1576–1580. 10.1126/science.1172815.
503. Yi, J.S., Du, M., and Zajac, A.J. (2009). A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection. *Science* 324, 1572–1576. 10.1126/science.1175194.
504. Elsaesser, H., Sauer, K., and Brooks, D.G. (2009). IL-21 Is Required to Control Chronic Viral Infection. *Science* 324, 1569–1572. 10.1126/science.1174182.
505. Skak, K., Kragh, M., Hausman, D., Smyth, M.J., and Sivakumar, P.V. (2008). Interleukin 21: combination strategies for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 7, 231–240. 10.1038/nrd2482.
506. Li, Y., Cong, Y., Jia, M., He, Q., Zhong, H., Zhao, Y., Li, H., Yan, M., You, J., Liu, J., et al. (2021). Targeting IL-21 to tumor-reactive T cells enhances memory T cell responses and anti-PD-1 antibody therapy. *Nat Commun* 12, 951. 10.1038/s41467-021-21241-0.
507. Jadhav, R.R., Im, S.J., Hu, B., Hashimoto, M., Li, P., Lin, J.-X., Leonard, W.J., Greenleaf, W.J., Ahmed, R., and Goronzy, J.J. (2019). Epigenetic signature of PD-1⁺ TCF1⁺ CD8 T cells that act as resource cells during chronic viral infection and respond to PD-1 blockade. *Proc National Acad Sci* 116, 14113–14118. 10.1073/pnas.1903520116.
508. Shan, Q., Hu, S., Chen, X., Danahy, D.B., Badovinac, V.P., Zang, C., and Xue, H.-H. (2021). Ectopic Tcf1 expression instills a stem-like program in exhausted CD8⁺ T cells to enhance viral and tumor immunity. *Cell Mol Immunol* 18, 1262–1277. 10.1038/s41423-020-0436-5.
509. Wang, Y., Hu, J., Li, Y., Xiao, M., Wang, H., Tian, Q., Li, Z., Tang, J., Hu, L., Tan, Y., et al. (2019). The Transcription Factor TCF1 Preserves the Effector Function of Exhausted CD8 T Cells During Chronic Viral Infection. *Front Immunol* 10, 169. 10.3389/fimmu.2019.00169.

510. Utzschneider, D.T., Gabriel, S.S., Chisanga, D., Gloury, R., Gubser, P.M., Vasanthakumar, A., Shi, W., and Kallies, A. (2020). Early precursor T cells establish and propagate T cell exhaustion in chronic infection. *Nat Immunol* 21, 1256–1266. 10.1038/s41590-020-0760-z.
511. Yao, C., Lou, G., Sun, H.-W., Zhu, Z., Sun, Y., Chen, Z., Chauss, D., Moseman, E.A., Cheng, J., D’Antonio, M.A., et al. (2021). BACH2 enforces the transcriptional and epigenetic programs of stem-like CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* 22, 370–380. 10.1038/s41590-021-00868-7.
512. Gautam, S., Fioravanti, J., Zhu, W., Gall, J.B.L., Brohawn, P., Lacey, N.E., Hu, J., Hocker, J.D., Hawk, N.V., Kapoor, V., et al. (2019). The transcription factor c-Myb regulates CD8⁺ T cell stemness and antitumor immunity. *Nat Immunol* 20, 337–349. 10.1038/s41590-018-0311-z.
513. Tsui, C., Kretschmer, L., Rapelius, S., Gabriel, S.S., Chisanga, D., Knöpper, K., Utzschneider, D.T., Nüssing, S., Liao, Y., Mason, T., et al. (2022). MYB orchestrates T cell exhaustion and response to checkpoint inhibition. *Nature* 609, 354–360. 10.1038/s41586-022-05105-1.
514. Mognol, G.P., Spreafico, R., Wong, V., Scott-Browne, J.P., Togher, S., Hoffmann, A., Hogan, P.G., Rao, A., and Trifari, S. (2017). Exhaustion-associated regulatory regions in CD8⁺ tumor-infiltrating T cells. *Proc National Acad Sci USA* 114, E2776–E2785. 10.1073/pnas.1620498114.
515. Lynn, R.C., Weber, E.W., Sotillo, E., Gennert, D., Xu, P., Good, Z., Anbunathan, H., Lattin, J., Jones, R., Tieu, V., et al. (2019). c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance. *Nature* 576, 293–300. 10.1038/s41586-019-1805-z.
516. Martinez, G.J., Pereira, R.M., Äijö, T., Kim, E.Y., Marangoni, F., Pipkin, M.E., Togher, S., Heissmeyer, V., Zhang, Y.C., Crotty, S., et al. (2015). The Transcription Factor NFAT Promotes Exhaustion of Activated CD8⁺ T Cells. *Immunity* 42, 265–278. 10.1016/j.immuni.2015.01.006.
517. Man, K., Gabriel, S.S., Liao, Y., Gloury, R., Preston, S., Henstridge, D.C., Pellegrini, M., Zehn, D., Berberich-Siebelt, F., Febbraio, M.A., et al. (2017). Transcription Factor IRF4 Promotes CD8⁺ T Cell Exhaustion and Limits the Development of Memory-like T Cells during Chronic Infection. *Immunity* 47, 1129–1141.e5. 10.1016/j.immuni.2017.11.021.
518. Paley, M.A., Kroy, D.C., Odorizzi, P.M., Johnnidis, J.B., Dolfi, D.V., Barnett, B.E., Bikoff, E.K., Robertson, E.J., Lauer, G.M., Reiner, S.L., et al. (2012). Progenitor and Terminal Subsets of CD8⁺ T Cells Cooperate to Contain Chronic Viral Infection. *Science* 338, 1220–1225. 10.1126/science.1229620.
519. Buggert, M., Tauriainen, J., Yamamoto, T., Frederiksen, J., Ivarsson, M.A., Michaëlsson, J., Lund, O., Hejdeman, B., Jansson, M., Sönnernborg, A., et al. (2014). T-bet and Eomes Are Differentially Linked to the Exhausted Phenotype of CD8⁺ T Cells in HIV Infection. *Plos Pathog* 10, e1004251. 10.1371/journal.ppat.1004251.
520. Llaó-Cid, L., Roessner, P.M., Chapaprieta, V., Öztürk, S., Roeder, T., Bordas, M., Izcue, A., Colomer, D., Dietrich, S., Stilgenbauer, S., et al. (2021). EOMES is essential for antitumor activity

of CD8⁺ T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 35, 3152–3162. 10.1038/s41375-021-01198-1.

521. McLane, L.M., Ngiow, S.F., Chen, Z., Attanasio, J., Manne, S., Ruthel, G., Wu, J.E., Staube, R.P., Xu, W., Amaravadi, R.K., et al. (2021). Role of nuclear localization in the regulation and function of T-bet and Eomes in exhausted CD8⁺ T cells. *Cell Reports* 35, 109120. 10.1016/j.celrep.2021.109120.

522. Li, J., He, Y., Hao, J., Ni, L., and Dong, C. (2018). High Levels of Eomes Promote Exhaustion of Anti-tumor CD8⁺ T Cells. *Front Immunol* 9, 2981. 10.3389/fimmu.2018.02981.

523. Shin, H., Blackburn, S.D., Intlekofer, A.M., Kao, C., Angelosanto, J.M., Reiner, S.L., and Wherry, E.J. (2009). A Role for the Transcriptional Repressor Blimp-1 in CD8⁺ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. *Immunity* 31, 309–320. 10.1016/j.immuni.2009.06.019.

524. Zhu, L., Kong, Y., Zhang, J., Claxton, D.F., Ehmann, W.C., Rybka, W.B., Palmisiano, N.D., Wang, M., Jia, B., Bayerl, M., et al. (2017). Blimp-1 impairs T cell function via upregulation of TIGIT and PD-1 in patients with acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 10, 124. 10.1186/s13045-017-0486-z.

525. Khan, O., Giles, J.R., McDonald, S., Manne, S., Ngiow, S.F., Patel, K.P., Werner, M.T., Huang, A.C., Alexander, K.A., Wu, J.E., et al. (2019). TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8⁺ T cell exhaustion. *Nature* 571, 211–218. 10.1038/s41586-019-1325-x.

526. Scott, A.C., Dündar, F., Zumbo, P., Chandran, S.S., Klebanoff, C.A., Shakiba, M., Trivedi, P., Menocal, L., Appleby, H., Camara, S., et al. (2019). TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. *Nature* 571, 270–274. 10.1038/s41586-019-1324-y.

527. Alfei, F., Kanev, K., Hofmann, M., Wu, M., Ghoneim, H.E., Roelli, P., Utzschneider, D.T., Hoesslin, M. von, Cullen, J.G., Fan, Y., et al. (2019). TOX reinforces the phenotype and longevity of exhausted T cells in chronic viral infection. *Nature* 571, 265–269. 10.1038/s41586-019-1326-9.

528. Seo, H., Chen, J., González-Avalos, E., Samaniego-Castruita, D., Das, A., Wang, Y.H., López-Moyado, I.F., Georges, R.O., Zhang, W., Onodera, A., et al. (2019). TOX and TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8⁺ T cell exhaustion. *Proc National Acad Sci* 116, 12410–12415. 10.1073/pnas.1905675116.

529. Yao, C., Sun, H.-W., Lacey, N.E., Ji, Y., Moseman, E.A., Shih, H.-Y., Heuston, E.F., Kirby, M., Anderson, S., Cheng, J., et al. (2019). Single-cell RNA-seq reveals TOX as a key regulator of CD8⁺ T cell persistence in chronic infection. *Nat Immunol* 20, 890–901. 10.1038/s41590-019-0403-4.

530. Zhang, X., Zhang, C., Qiao, M., Cheng, C., Tang, N., Lu, S., Sun, W., Xu, B., Cao, Y., Wei, X., et al. (2022). Depletion of BATF in CAR-T cells enhances antitumor activity by inducing resistance against exhaustion and formation of central memory cells. *Cancer Cell*. 10.1016/j.ccell.2022.09.013.

531. Xin, G., Schauder, D.M., Lainez, B., Weinstein, J.S., Dai, Z., Chen, Y., Esplugues, E., Wen, R., Wang, D., Parish, I.A., et al. (2015). A Critical Role of IL-21-Induced BATF in Sustaining CD8-T-Cell-Mediated Chronic Viral Control. *Cell Reports* *13*, 1118–1124. 10.1016/j.celrep.2015.09.069.
532. Chen, Y., Zander, R.A., Wu, X., Schauder, D.M., Kasmani, M.Y., Shen, J., Zheng, S., Burns, R., Taparowsky, E.J., and Cui, W. (2021). BATF regulates progenitor to cytolytic effector CD8+ T cell transition during chronic viral infection. *Nat Immunol* *22*, 996–1007. 10.1038/s41590-021-00965-7.
533. Kao, C., Oestreich, K.J., Paley, M.A., Crawford, A., Angelosanto, J.M., Ali, M.-A.A., Intlekofer, A.M., Boss, J.M., Reiner, S.L., Weinmann, A.S., et al. (2011). Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8+ T cell responses during chronic infection. *Nat Immunol* *12*, 663–671. 10.1038/ni.2046.
534. Doering, T.A., Crawford, A., Angelosanto, J.M., Paley, M.A., Ziegler, C.G., and Wherry, E.J. (2012). Network Analysis Reveals Centrally Connected Genes and Pathways Involved in CD8+ T Cell Exhaustion versus Memory. *Immunity* *37*, 1130–1144. 10.1016/j.immuni.2012.08.021.
535. Raju, S., Xia, Y., Daniel, B., Yost, K.E., Bradshaw, E., Tonc, E., Verbaro, D.J., Kometani, K., Yokoyama, W.M., Kurosaki, T., et al. (2021). Identification of a T-bet hi Quiescent Exhausted CD8 T Cell Subpopulation That Can Differentiate into TIM3 + CX3CR1 + Effectors and Memory-like Cells. *J Immunol* *206*, 2924–2936. 10.4049/jimmunol.2001348.
536. Stairiker, C.J., Thomas, G.D., and Salek-Ardakani, S. (2020). EZH2 as a Regulator of CD8+ T Cell Fate and Function. *Front Immunol* *11*, 593203. 10.3389/fimmu.2020.593203.
537. He, S., Liu, Y., Meng, L., Sun, H., Wang, Y., Ji, Y., Purushe, J., Chen, P., Li, C., Madzo, J., et al. (2017). Ezh2 phosphorylation state determines its capacity to maintain CD8+ T memory precursors for antitumor immunity. *Nat Commun* *8*, 2125. 10.1038/s41467-017-02187-8.
538. Niborski, L.L., Gueguen, P., Ye, M., Thiolat, A., Ramos, R.N., Caudana, P., Denizeau, J., Colombeau, L., Rodriguez, R., Goudot, C., et al. (2022). CD8+T cell responsiveness to anti-PD-1 is epigenetically regulated by Suv39h1 in melanomas. *Nat Commun* *13*, 3739. 10.1038/s41467-022-31504-z.
539. Prinzing, B., Zebley, C.C., Petersen, C.T., Fan, Y., Anido, A.A., Yi, Z., Nguyen, P., Houke, H., Bell, M., Haydar, D., et al. (2021). Deleting DNMT3A in CAR T cells prevents exhaustion and enhances antitumor activity. *Sci Transl Med* *13*, eabh0272. 10.1126/scitranslmed.abh0272.
540. Moufarrij, S., Srivastava, A., Gomez, S., Hadley, M., Palmer, E., Austin, P.T., Chisholm, S., Diab, N., Roche, K., Yu, A., et al. (2020). Combining DNMT and HDAC6 inhibitors increases anti-tumor immune signaling and decreases tumor burden in ovarian cancer. *Sci Rep-uk* *10*, 3470. 10.1038/s41598-020-60409-4.

541. Angelosanto, J.M., Blackburn, S.D., Crawford, A., and Wherry, E.J. (2012). Progressive Loss of Memory T Cell Potential and Commitment to Exhaustion during Chronic Viral Infection. *J Virol* *86*, 8161–8170. 10.1128/jvi.00889-12.
542. Ahrends, T., Spanjaard, A., Pilzecker, B., Bąbała, N., Bovens, A., Xiao, Y., Jacobs, H., and Borst, J. (2016). CD4⁺ T Cell Help Confers a Cytotoxic T Cell Effector Program Including Coinhibitory Receptor Downregulation and Increased Tissue Invasiveness. *Immunity* *47*, 848–861.e5. 10.1016/j.immuni.2017.10.009.
543. González, S., González-Rodríguez, A.P., López-Soto, A., Huergo-Zapico, L., López-Larrea, C., and Suárez-Álvarez, B. (2011). Conceptual aspects of self and nonself discrimination. *Self/Nonself* *2*, 19–25. 10.4161/self.2.1.15094.
544. Rao, S., Gharib, K., and Han, A. (2019). Chapter Five Cancer Immunosurveillance by T Cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *342*, 149–173. 10.1016/bs.ircmb.2018.08.001.
545. Park, S.L., Gebhardt, T., and Mackay, L.K. (2019). Tissue-Resident Memory T Cells in Cancer Immunosurveillance. *Trends Immunol* *40*, 735–747. 10.1016/j.it.2019.06.002.
546. O'Donnell, J.S., Teng, M.W.L., and Smyth, M.J. (2019). Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* *16*, 151–167. 10.1038/s41571-018-0142-8.
547. Joyce, J.A., and Fearon, D.T. (2015). T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* *348*, 74–80. 10.1126/science.aaa6204.
548. Jiang, Y., Li, Y., and Zhu, B. (2015). T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis* *6*, e1792–e1792. 10.1038/cddis.2015.162.
549. Togashi, Y., Shitara, K., and Nishikawa, H. (2019). Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* *16*, 356–371. 10.1038/s41571-019-0175-7.
550. Marvel, D., and Gabrilovich, D.I. (2015). Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *J Clin Invest* *125*, 3356–3364. 10.1172/jci80005.
551. Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Ebrahimi-Kalan, A., Jaymand, M., Kolahian, S., Javaheri, T., and Zare, P. (2020). Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal* *18*, 59. 10.1186/s12964-020-0530-4.
552. Labani-Motlagh, A., Ashja-Mahdavi, M., and Loskog, A. (2020). The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses. *Front Immunol* *11*, 940. 10.3389/fimmu.2020.00940.

553. Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 Control over Foxp3⁺ Regulatory T Cell Function. *Science* 322, 271–275. 10.1126/science.1160062.
554. Perez, V.L., Parijs, L.V., Biuckians, A., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Abbas, A.K. (1997). Induction of Peripheral T Cell Tolerance In Vivo Requires CTLA-4 Engagement. *Immunity* 6, 411–417. 10.1016/s1074-7613(00)80284-8.
555. Jarnicki, A.G., Lysaght, J., Todryk, S., and Mills, K.H.G. (2006). Suppression of Antitumor Immunity by IL-10 and TGF- β -Producing T Cells Infiltrating the Growing Tumor: Influence of Tumor Environment on the Induction of CD4⁺ and CD8⁺ Regulatory T Cells. *J Immunol* 177, 896–904. 10.4049/jimmunol.177.2.896.
556. Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F., Enjoyji, K., Linden, J., Oukka, M., et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Medicine* 204, 1257–1265. 10.1084/jem.20062512.
557. Vignali, P.D.A., DePeaux, K., Watson, M.J., Ye, C., Ford, B.R., Lontos, K., McGaa, N.K., Scharping, N.E., Menk, A.V., Robson, S.C., et al. (2023). Hypoxia drives CD39-dependent suppressor function in exhausted T cells to limit antitumor immunity. *Nat Immunol* 24, 267–279. 10.1038/s41590-022-01379-9.
558. Wilson, J.M., Ross, W.G., Agbai, O.N., Frazier, R., Figler, R.A., Rieger, J., Linden, J., and Ernst, P.B. (2009). The A2B Adenosine Receptor Impairs the Maturation and Immunogenicity of Dendritic Cells. *J Immunol* 182, 4616–4623. 10.4049/jimmunol.0801279.
559. Kuehnemuth, B., Piseddu, I., Wiedemann, G.M., Lauseker, M., Kuhn, C., Hofmann, S., Schmoeckel, E., Endres, S., Mayr, D., Jeschke, U., et al. (2018). CCL1 is a major regulatory T cell attracting factor in human breast cancer. *Bmc Cancer* 18, 1278. 10.1186/s12885-018-5117-8.
560. Hoelzinger, D.B., Smith, S.E., Mirza, N., Dominguez, A.L., Manrique, S.Z., and Lustgarten, J. (2010). Blockade of CCL1 Inhibits T Regulatory Cell Suppressive Function Enhancing Tumor Immunity without Affecting T Effector Responses. *J Immunol* 184, 6833–6842. 10.4049/jimmunol.0904084.
561. Barsheshet, Y., Wildbaum, G., Levy, E., Vitenshtein, A., Akinseye, C., Griggs, J., Lira, S.A., and Karin, N. (2017). CCR8+FOXP3⁺ Treg cells as master drivers of immune regulation. *Proc National Acad Sci* 114, 6086–6091. 10.1073/pnas.1621280114.
562. Deng, J., Li, J., Sarde, A., Lines, J.L., Lee, Y.-C., Qian, D.C., Pechenick, D.A., Manivanh, R., Mercier, I.L., Lowrey, C.H., et al. (2019). Hypoxia-Induced VISTA Promotes the Suppressive Function of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Cancer Immunol Res* 7, 1079–1090. 10.1158/2326-6066.cir-18-0507.

563. Noman, M.Z., Desantis, G., Janji, B., Hasmmim, M., Karray, S., Dessen, P., Bronte, V., and Chouaib, S. (2014). PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J Exp Med* 211, 781–790. 10.1084/jem.20131916.
564. Ibrahim, M.L., Klement, J.D., Lu, C., Redd, P.S., Xiao, W., Yang, D., Browning, D.D., Savage, N.M., Buckhaults, P.J., Morse, H.C., et al. (2018). Myeloid-Derived Suppressor Cells Produce IL-10 to Elicit DNMT3b-Dependent IRF8 Silencing to Promote Colitis-Associated Colon Tumorigenesis. *Cell Reports* 25, 3036-3046.e6. 10.1016/j.celrep.2018.11.050.
565. Huang, B., Pan, P.-Y., Li, Q., Sato, A.I., Levy, D.E., Bromberg, J., Divino, C.M., and Chen, S.-H. (2006). Gr-1+CD115+ Immature Myeloid Suppressor Cells Mediate the Development of Tumor-Induced T Regulatory Cells and T-Cell Anergy in Tumor-Bearing Host. *Cancer Res* 66, 1123–1131. 10.1158/0008-5472.can-05-1299.
566. Szefel, J., Danielak, A., and Kruszewski, W.J. (2019). Metabolic pathways of L-arginine and therapeutic consequences in tumors. *Adv Med Sci* 64, 104–110. 10.1016/j.advms.2018.08.018.
567. Bozkus, C.C., Elzey, B.D., Crist, S.A., Ellies, L.G., and Ratliff, T.L. (2015). Expression of Cationic Amino Acid Transporter 2 Is Required for Myeloid-Derived Suppressor Cell–Mediated Control of T Cell Immunity. *J Immunol* 195, 5237–5250. 10.4049/jimmunol.1500959.
568. Satoh, Y., Kotani, H., Iida, Y., Taniura, T., Notsu, Y., and Harada, M. (2020). Supplementation of l-arginine boosts the therapeutic efficacy of anticancer chemoimmunotherapy. *Cancer Sci* 111, 2248–2258. 10.1111/cas.14490.
569. Srivastava, M.K., Sinha, P., Clements, V.K., Rodriguez, P., and Ostrand-Rosenberg, S. (2010). Myeloid-Derived Suppressor Cells Inhibit T-Cell Activation by Depleting Cystine and Cysteine. *Cancer Res* 70, 68–77. 10.1158/0008-5472.can-09-2587.
570. Fleming, V., Hu, X., Weber, R., Nagibin, V., Groth, C., Altevogt, P., Utikal, J., and Umansky, V. (2018). Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Bypass Tumor-Induced Immunosuppression. *Front Immunol* 9, 398. 10.3389/fimmu.2018.00398.
571. Qin, R., Zhao, C., Wang, C.-J., Xu, W., Zhao, J.-Y., Lin, Y., Yuan, Y.-Y., Lin, P.-C., Li, Y., Zhao, S., et al. (2021). Tryptophan potentiates CD8+ T cells against cancer cells by TRIP12 tryptophanylation and surface PD-1 downregulation. *J Immunother Cancer* 9, e002840. 10.1136/jitc-2021-002840.
572. Liu, Y., Wei, J., Guo, G., and Zhou, J. (2015). Norepinephrine-induced myeloid-derived suppressor cells block T-cell responses via generation of reactive oxygen species. *Immunopharm Immunot* 37, 359–365. 10.3109/08923973.2015.1059442.
573. Yang, Y., Li, C., Liu, T., Dai, X., and Bazhin, A.V. (2020). Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumors: From Mechanisms to Antigen Specificity and Microenvironmental Regulation. *Front Immunol* 11, 1371. 10.3389/fimmu.2020.01371.

574. Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., and Gabrilovich, D.I. (2016). The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol* 37, 208–220. 10.1016/j.it.2016.01.004.
575. Hegde, S., Leader, A.M., and Merad, M. (2021). MDSC: Markers, development, states, and unaddressed complexity. *Immunity* 54, 875–884. 10.1016/j.immuni.2021.04.004.
576. Maeurer, M.J., Gollin, S.M., Storkus, W.J., Swaney, W., Karbach, J., Martin, D., Castelli, C., Salter, R., Knuth, A., and Lotze, M.T. (1996). Tumor escape from immune recognition: loss of HLA-A2 melanoma cell surface expression is associated with a complex rearrangement of the short arm of chromosome 6. *Clin Cancer Res Official J Am Assoc Cancer Res* 2, 641–652.
577. Dhatchinamoorthy, K., Colbert, J.D., and Rock, K.L. (2021). Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. *Front Immunol* 12, 636568. 10.3389/fimmu.2021.636568.
578. Sideras, K., Biermann, K., Yap, K., Mancham, S., Boor, P.P.C., Hansen, B.E., Stoop, H.J.A., Peppelenbosch, M.P., Eijck, C.H., Sleijfer, S., et al. (2017). Tumor cell expression of immune inhibitory molecules and tumor-infiltrating lymphocyte count predict cancer-specific survival in pancreatic and ampullary cancer. *Int. J. Cancer* 141, 572–582. 10.1002/ijc.30760.
579. Liu, H., Liu, L., Liu, K., Bizargity, P., Hancock, W.W., and Visner, G.A. (2009). Reduced Cytotoxic Function of Effector CD8⁺ T Cells Is Responsible for Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Dependent Immune Suppression. *J Immunol* 183, 1022–1031. 10.4049/jimmunol.0900408.
580. Lou, Q., Liu, R., Yang, X., Li, W., Huang, L., Wei, L., Tan, H., Xiang, N., Chan, K., Chen, J., et al. (2019). miR-448 targets IDO1 and regulates CD8⁺ T cell response in human colon cancer. *J Immunother Cancer* 7, 210. 10.1186/s40425-019-0691-0.
581. Mellor, A.L., Lemos, H., and Huang, L. (2017). Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Tolerance: Where Are We Now? *Front Immunol* 8, 1360. 10.3389/fimmu.2017.01360.
582. Bellomo, C., Caja, L., and Moustakas, A. (2016). Transforming growth factor β as regulator of cancer stemness and metastasis. *Brit J Cancer* 115, 761–769. 10.1038/bjc.2016.255.
583. West, E.E., Jin, H.-T., Rasheed, A.-U., Penaloza-MacMaster, P., Ha, S.-J., Tan, W.G., Youngblood, B., Freeman, G.J., Smith, K.A., and Ahmed, R. (2013). PD-L1 blockade synergizes with IL-2 therapy in reinvigorating exhausted T cells. *J Clin Invest* 123, 2604–2615. 10.1172/jci67008.
584. Hashimoto, M., Araki, K., Cardenas, M.A., Li, P., Jadhav, R.R., Kissick, H.T., Hudson, W.H., McGuire, D.J., Obeng, R.C., Wieland, A., et al. (2022). PD-1 combination therapy with IL-2 modifies CD8⁺ T cell exhaustion program. *Nature* 610, 173–181. 10.1038/s41586-022-05257-0.

585. Ahmadzadeh, M., and Rosenberg, S.A. (2006). IL-2 administration increases CD4⁺CD25^{hi} Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* *107*, 2409–2414. 10.1182/blood-2005-06-2399.
586. Jensen, H.K., Donskov, F., Nordmark, M., Marcussen, N., and Maase, H. von der (2009). Increased Intratumoral FOXP3-positive Regulatory Immune Cells during Interleukin-2 Treatment in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* *15*, 1052–1058. 10.1158/1078-0432.ccr-08-1296.
587. Sim, G.C., Martin-Orozco, N., Jin, L., Yang, Y., Wu, S., Washington, E., Sanders, D., Lacey, C., Wang, Y., Vence, L., et al. (2014). IL-2 therapy promotes suppressive ICOS⁺ Treg expansion in melanoma patients. *J Clin Invest* *124*, 99–110. 10.1172/jci46266.
588. Sun, Z., Ren, Z., Yang, K., Liu, Z., Cao, S., Deng, S., Xu, L., Liang, Y., Guo, J., Bian, Y., et al. (2019). A next-generation tumor-targeting IL-2 preferentially promotes tumor-infiltrating CD8⁺ T-cell response and effective tumor control. *Nat Commun* *10*, 3874. 10.1038/s41467-019-11782-w.
589. Klein, C., Waldhauer, I., Nicolini, V., Dunn, C., Freimoser-Grundschober, A., Danny, G., Boerman, O., Nayak, T., Herter, S., Puijtenbroek, E.V., et al. (2013). Novel Tumor-Targeted, Engineered IL-2 Variant (IL2v)-Based Immunocytokines For Immunotherapy Of Cancer. *Blood* *122*, 2278–2278. 10.1182/blood.v122.21.2278.2278.
590. Waldhauer, I., Gonzalez-Nicolini, V., Freimoser-Grundschober, A., Nayak, T.K., Fahrni, L., Hosse, R.J., Gerrits, D., Geven, E.J.W., Sam, J., Lang, S., et al. (2021). Simlukafusp alfa (FAP-IL2v) immunocytokine is a versatile combination partner for cancer immunotherapy. *Mabs* *13*, 1913791. 10.1080/19420862.2021.1913791.
591. Bae, J., Liu, L., Moore, C., Hsu, E., Zhang, A., Ren, Z., Sun, Z., Wang, X., Zhu, J., Shen, J., et al. (2022). IL-2 delivery by engineered mesenchymal stem cells re-invigorates CD8⁺ T cells to overcome immunotherapy resistance in cancer. *Nat Cell Biol* *24*, 1754–1765. 10.1038/s41556-022-01024-5.
592. Deak, L.C., Nicolini, V., Hashimoto, M., Karagianni, M., Schwalie, P.C., Lauener, L., Varypataki, E.M., Richard, M., Bommer, E., Sam, J., et al. (2022). PD-1-cis IL-2R agonism yields better effectors from stem-like CD8⁺ T cells. *Nature* *610*, 161–172. 10.1038/s41586-022-05192-0.
593. Jin, S., Sun, Y., Liang, X., Gu, X., Ning, J., Xu, Y., Chen, S., and Pan, L. (2022). Emerging new therapeutic antibody derivatives for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther* *7*, 39. 10.1038/s41392-021-00868-x.
594. Abdin, S.M., Zaher, D.M., Arafa, E.-S.A., and Omar, H.A. (2018). Tackling Cancer Resistance by Immunotherapy: Updated Clinical Impact and Safety of PD-1/PD-L1 Inhibitors. *Cancers* *10*, 32. 10.3390/cancers10020032.

595. Wei, S.C., Levine, J.H., Cogdill, A.P., Zhao, Y., Anang, N.-A.A.S., Andrews, M.C., Sharma, P., Wang, J., Wargo, J.A., Pe'er, D., et al. (2017). Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. *Cell* 170, 1120-1133.e17. 10.1016/j.cell.2017.07.024.
596. Melerio, I., Hervas-Stubbs, S., Glennie, M., Pardoll, D.M., and Chen, L. (2007). Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 7, 95–106. 10.1038/nrc2051.
597. Leach, D.R., Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1996). Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science* 271, 1734–1736. 10.1126/science.271.5256.1734.
598. Elsas, A. van, Hurwitz, A.A., and Allison, J.P. (1999). Combination Immunotherapy of B16 Melanoma Using Anti-Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 (Ctla-4) and Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor (Gm-Csf)-Producing Vaccines Induces Rejection of Subcutaneous and Metastatic Tumors Accompanied by Autoimmune Depigmentation. *J Exp Medicine* 190, 355–366. 10.1084/jem.190.3.355.
599. Hurwitz, A.A., Yu, T.F.-Y., Leach, D.R., and Allison, J.P. (1998). CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte–macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. *Proc National Acad Sci* 95, 10067–10071. 10.1073/pnas.95.17.10067.
600. Ledford, H. (2011). Melanoma drug wins US approval. *Nature* 471, 561–561. 10.1038/471561a.
601. Callahan, M.K., Wolchok, J.D., and Allison, J.P. (2010). Anti-CTLA-4 Antibody Therapy: Immune Monitoring During Clinical Development of a Novel Immunotherapy. *Semin Oncol* 37, 473–484. 10.1053/j.seminoncol.2010.09.001.
602. Stephen, H.F., J., O.S., F., M.D., W., W.R., A., S.J., B., H.J., Rene, G., Caroline, R., Dirk, S., C., H.J., et al. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New Engl J Med* 363, 711–723. 10.1056/nejmoa1003466.
603. Schadendorf, D., Hodi, F.S., Robert, C., Weber, J.S., Margolin, K., Hamid, O., Patt, D., Chen, T.-T., Berman, D.M., and Wolchok, J.D. (2015). Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* 33, 1889–1894. 10.1200/jco.2014.56.2736.
604. Ribas, A., Kefford, R., Marshall, M.A., Punt, C.J.A., Haanen, J.B., Marmol, M., Garbe, C., Gogas, H., Schachter, J., Linette, G., et al. (2013). Phase III Randomized Clinical Trial Comparing Tremelimumab With Standard-of-Care Chemotherapy in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol* 31, 616–622. 10.1200/jco.2012.44.6112.
605. Comin-Anduix, B., Escuin-Ordinas, H., and Ibarondo, F.J. (2016). Tremelimumab: research and clinical development. *Oncotargets Ther* 9, 1767–1776. 10.2147/ott.s65802.

606. Abou-Alfa, G.K., Lau, G., Kudo, M., Chan, S.L., Kelley, R.K., Furuse, J., Sukeepaisarnjaroen, W., Kang, Y.-K., Dao, T.V., Toni, E.N.D., et al. (2022). Tremelimumab plus Durvalumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *Nejm Évid 1*. 10.1056/evidoa2100070.
607. Savoia, P., Astrua, C., and Fava, P. (2016). Ipilimumab (Anti-Ctla-4 Mab) in the treatment of metastatic melanoma: Effectiveness and toxicity management. *Hum Vacc Immunother 12*, 1092–1101. 10.1080/21645515.2015.1129478.
608. Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., and Minato, N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc National Acad Sci 99*, 12293–12297. 10.1073/pnas.192461099.
609. Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., et al. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med 8*, 793–800. 10.1038/nm730.
610. Hirano, F., Kaneko, K., Tamura, H., Dong, H., Wang, S., Ichikawa, M., Rietz, C., Flies, D.B., Lau, J.S., Zhu, G., et al. (2005). Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res 65*, 1089–1096.
611. Diskin, B., Adam, S., Cassini, M.F., Sanchez, G., Liria, M., Aykut, B., Buttar, C., Li, E., Sundberg, B., Salas, R.D., et al. (2020). PD-L1 engagement on T cells promotes self-tolerance and suppression of neighboring macrophages and effector T cells in cancer. *Nat Immunol 21*, 442–454. 10.1038/s41590-020-0620-x.
612. Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu Rev Immunol 26*, 677–704. 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
613. Muenst, S., Schaerli, A.R., Gao, F., Däster, S., Trella, E., Drosner, R.A., Muraro, M.G., Zajac, P., Zanetti, R., Gillanders, W.E., et al. (2014). Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Tr 146*, 15–24. 10.1007/s10549-014-2988-5.
614. Maine, C.J., Aziz, N.H.A., Chatterjee, J., Hayford, C., Brewig, N., Whilding, L., George, A.J.T., and Ghaem-Maghami, S. (2014). Programmed death ligand-1 over-expression correlates with malignancy and contributes to immune regulation in ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother 63*, 215–224. 10.1007/s00262-013-1503-x.
615. Hino, R., Kabashima, K., Kato, Y., Yagi, H., Nakamura, M., Honjo, T., Okazaki, T., and Tokura, Y. (2010). Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer 116*, 1757–1766. 10.1002/cncr.24899.
616. Rosenberg, J.E., Hoffman-Censits, J., Powles, T., Heijden, M.S. van der, Balar, A.V., Necchi, A., Dawson, N., O'Donnell, P.H., Balmanoukian, A., Loriot, Y., et al. (2016). Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following

treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* 387, 1909–1920. 10.1016/s0140-6736(16)00561-4.

617. Fehrenbacher, L., Spira, A., Ballinger, M., Kowanetz, M., Vansteenkiste, J., Mazieres, J., Park, K., Smith, D., Artal-Cortes, A., Lewanski, C., et al. (2016). Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* 387, 1837–1846. 10.1016/s0140-6736(16)00587-0.

618. Motzer, R.J., Penkov, K., Haanen, J., Rini, B., Albiges, L., Campbell, M.T., Venugopal, B., Kollmannsberger, C., Negrier, S., Uemura, M., et al. (2019). Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New Engl J Med* 380, 1103–1115. 10.1056/nejmoa1816047.

619. Antonia, S.J., Villegas, A., Daniel, D., Vicente, D., Murakami, S., Hui, R., Yokoi, T., Chiappori, A., Lee, K.H., Wit, M. de, et al. (2017). Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *New Engl J Med* 377, 1919–1929. 10.1056/nejmoa1709937.

620. Carrera, W., Baartman, B.J., and Kosmorsky, G. (2017). A Case Report of Drug-Induced Myopathy Involving Extraocular Muscles after Combination Therapy with Tremelimumab and Durvalumab for Non-Small Cell Lung Cancer. *Neuro-ophthalmology* 41, 140–143. 10.1080/01658107.2017.1291686.

621. Su, C., Wang, H., Liu, Y., Guo, Q., Zhang, L., Li, J., Zhou, W., Yan, Y., Zhou, X., and Zhang, J. (2020). Adverse Effects of Anti-PD-1/PD-L1 Therapy in Non-small Cell Lung Cancer. *Frontiers Oncol* 10, 554313. 10.3389/fonc.2020.554313.

622. Ahmadzadeh, M., Johnson, L.A., Heemskerk, B., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., White, D.E., and Rosenberg, S.A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114, 1537–1544. 10.1182/blood-2008-12-195792.

623. Topalian, S.L., Drake, C.G., and Pardoll, D.M. (2015). Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell* 27, 450–461. 10.1016/j.ccell.2015.03.001.

624. Taube, J.M., Klein, A., Brahmer, J.R., Xu, H., Pan, X., Kim, J.H., Chen, L., Pardoll, D.M., Topalian, S.L., and Anders, R.A. (2014). Association of PD-1, PD-1 Ligands, and Other Features of the Tumor Immune Microenvironment with Response to Anti-PD-1 Therapy. *Clin Cancer Res* 20, 5064–5074. 10.1158/1078-0432.ccr-13-3271.

625. Huang, A.C., Postow, M.A., Orlowski, R.J., Mick, R., Bengsch, B., Manne, S., Xu, W., Harmon, S., Giles, J.R., Wenz, B., et al. (2017). T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature* 545, 60–65. 10.1038/nature22079.

626. Teng, M.W.L., Ngiow, S.F., Ribas, A., and Smyth, M.J. (2015). Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res* 75, 2139–2145. 10.1158/0008-5472.can-15-0255.
627. Robert, C., Schachter, J., Long, G.V., Arance, A., Grob, J.J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M.S., McNeil, C., Lotem, M., et al. (2015). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New Engl J Med* 372, 2521–2532. 10.1056/nejmoa1503093.
628. Weber, J.S., D’Angelo, S.P., Minor, D., Hodi, F.S., Gutzmer, R., Neyns, B., Hoeller, C., Khushalani, N.I., Miller, W.H., Lao, C.D., et al. (2015). Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 16, 375–384. 10.1016/s1470-2045(15)70076-8.
629. Weber, J., Mandala, M., Vecchio, M.D., Gogas, H.J., Arance, A.M., Cowey, C.L., Dalle, S., Schenker, M., Chiarion-Sileni, V., Marquez-Rodas, I., et al. (2017). Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *New Engl J Med* 377, 1824–1835. 10.1056/nejmoa1709030.
630. Herbst, R.S., Baas, P., Kim, D.-W., Felip, E., Pérez-Gracia, J.L., Han, J.-Y., Molina, J., Kim, J.-H., Arvis, C.D., Ahn, M.-J., et al. (2016). Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 387, 1540–1550. 10.1016/s0140-6736(15)01281-7.
631. Cohen, E.E.W., Soulières, D., Tourneau, C.L., Dinis, J., Licitra, L., Ahn, M.-J., Soria, A., Machiels, J.-P., Mach, N., Mehra, R., et al. (2019). Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 393, 156–167. 10.1016/s0140-6736(18)31999-8.
632. Moskowitz, C.H., Zinzani, P.L., Fanale, M.A., Armand, P., Johnson, N.A., Radford, J.A., Ribrag, V., Molin, D., Vassilakopoulos, T.P., Tomita, A., et al. (2016). Pembrolizumab in Relapsed/Refractory Classical Hodgkin Lymphoma: Primary End Point Analysis of the Phase 2 Keynote-087 Study. *Blood* 128, 1107–1107. 10.1182/blood.v128.22.1107.1107.
633. L., T.S., Stephen, H.F., R., B.J., N., G.S., C., S.D., F., M.D., D., P.J., D., C.R., A., S.J., B., A.M., et al. (2012). Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *New Engl J Med* 366, 2443–2454. 10.1056/nejmoa1200690.
634. Turnis, M.E., Andrews, L.P., and Vignali, D.A.A. (2015). Inhibitory receptors as targets for cancer immunotherapy. *Eur J Immunol* 45, 1892–1905. 10.1002/eji.201344413.
635. Schumacher, T.N., Scheper, W., and Kvistborg, P. (2018). Cancer Neoantigens. *Annu Rev Immunol* 37, 1–28. 10.1146/annurev-immunol-042617-053402.

636. Janelle, V., Carli, C., Taillefer, J., Orio, J., and Delisle, J.-S. (2015). Defining novel parameters for the optimal priming and expansion of minor histocompatibility antigen-specific T cells in culture. *J Transl Med* 13, 123–13. 10.1186/s12967-015-0495-z.
637. Chapuis, A.G., Ragnarsson, G.B., Nguyen, H.N., Chaney, C.N., Pufnock, J.S., Schmitt, T.M., Duerkopp, N., Roberts, I.M., Pogosov, G.L., Ho, W.Y., et al. (2013). Transferred WT1-Reactive CD8+ T Cells Can Mediate Antileukemic Activity and Persist in Post-Transplant Patients. *Sci Transl Med* 5, 174ra27. 10.1126/scitranslmed.3004916.
638. Gattinoni, L., Klebanoff, C.A., Palmer, D.C., Wrzesinski, C., Kerstann, K., Yu, Z., Finkelstein, S.E., Theoret, M.R., Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (2005). Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *J Clin Invest* 115, 1616–1626. 10.1172/jci24480.
639. June, C.H., Riddell, S.R., and Schumacher, T.N. (2015). Adoptive cellular therapy: A race to the finish line. *Sci Transl Med* 7, 280ps7. 10.1126/scitranslmed.aaa3643.
640. Inozume, T., Hanada, K., Wang, Q.J., Ahmadzadeh, M., Wunderlich, J.R., Rosenberg, S.A., and Yang, J.C. (2010). Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells. *J Immunother* 33, 956–964. 10.1097/cji.0b013e3181fad2b0.
641. Berg, J.H. van den, Heemskerck, B., Rooij, N. van, Gomez-Eerland, R., Michels, S., Zon, M. van, Boer, R. de, Bakker, N.A.M., Jorritsma-Smit, A., Buuren, M.M. van, et al. (2020). Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) therapy in metastatic melanoma: boosting of neoantigen-specific T cell reactivity and long-term follow-up. *J Immunother Cancer* 8, e000848. 10.1136/jitc-2020-000848.
642. Besser, M.J., Shapira-Frommer, R., Itzhaki, O., Treves, A.J., Zippel, D.B., Levy, D., Kubi, A., Shoshani, N., Zikich, D., Ohayon, Y., et al. (2013). Adoptive Transfer of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients with Metastatic Melanoma: Intent-to-Treat Analysis and Efficacy after Failure to Prior Immunotherapies. *Clin Cancer Res* 19, 4792–4800. 10.1158/1078-0432.ccr-13-0380.
643. Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Kammula, U.S., Hughes, M.S., Phan, G.Q., Citrin, D.E., Restifo, N.P., Robbins, P.F., Wunderlich, J.R., et al. (2011). Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 17, 4550–4557. 10.1158/1078-0432.ccr-11-0116.
644. Jansen, C.S., Prokhnevskaya, N., Master, V.A., Sanda, M.G., Carlisle, J.W., Bilen, M.A., Cardenas, M., Wilkinson, S., Lake, R., Sowalsky, A.G., et al. (2019). An intra-tumoral niche maintains and differentiates stem-like CD8 T cells. *Nature* 576, 465–470. 10.1038/s41586-019-1836-5.
645. Janelle, V., and Delisle, J.-S. (2021). T-Cell Dysfunction as a Limitation of Adoptive Immunotherapy: Current Concepts and Mitigation Strategies. *Cancers* 13, 598. 10.3390/cancers13040598.

646. Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G., and Schindler, D.G. (1993). Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc National Acad Sci* 90, 720–724. 10.1073/pnas.90.2.720.
647. Chmielewski, M., Kopecky, C., Hombach, A.A., and Abken, H. (2011). IL-12 Release by Engineered T Cells Expressing Chimeric Antigen Receptors Can Effectively Muster an Antigen-Independent Macrophage Response on Tumor Cells That Have Shut Down Tumor Antigen Expression. *Cancer Res* 71, 5697–5706. 10.1158/0008-5472.can-11-0103.
648. Tokarew, N., Ogonek, J., Endres, S., Bergwelt-Baildon, M. von, and Kobold, S. (2019). Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. *Brit J Cancer* 120, 26–37. 10.1038/s41416-018-0325-1.
649. Chmielewski, M., and Abken, H. (2017). CAR T Cells Releasing IL-18 Convert to T-Bethigh FoxO1low Effectors that Exhibit Augmented Activity against Advanced Solid Tumors. *Cell Reports* 21, 3205–3219. 10.1016/j.celrep.2017.11.063.
650. Sheykhhasan, M., Manoochehri, H., and Dama, P. (2022). Use of CAR T-cell for acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment: a review study. *Cancer Gene Ther* 29, 1080–1096. 10.1038/s41417-021-00418-1.
651. Zah, E., Lin, M.-Y., Silva-Benedict, A., Jensen, M.C., and Chen, Y.Y. (2016). T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. *Cancer Immunol Res* 4, 498–508. 10.1158/2326-6066.cir-15-0231.
652. Lee, D.W., Kochenderfer, J.N., Stetler-Stevenson, M., Cui, Y.K., Delbrook, C., Feldman, S.A., Fry, T.J., Orentas, R., Sabatino, M., Shah, N.N., et al. (2015). T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 385, 517–528. 10.1016/s0140-6736(14)61403-3.
653. L., M.S., Noelle, F., A., S.P., Richard, A., M., B.D., J., B.N., Anne, C., E., G.V., Zhaohui, Z., F., L.S., et al. (2014). Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *New Engl J Med* 371, 1507–1517. 10.1056/nejmoa1407222.
654. Riaz, I.B., Zahid, U., Kamal, M.U., Husnain, M., McBride, A., Hua, A., Hamadani, A.A., George, L., Zeeshan, A., Sipra, Q.-A.R., et al. (2017). Anti-CD 19 and anti-CD 20 CAR-modified T cells for B-cell malignancies: a systematic review and meta-analysis. *Immunotherapy* 9, 979–993. 10.2217/imt-2017-0062.
655. Dai, H., Wu, Z., Jia, H., Tong, C., Guo, Y., Ti, D., Han, X., Liu, Y., Zhang, W., Wang, C., et al. (2020). Bispecific CAR-T cells targeting both CD19 and CD22 for therapy of adults with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol* 13, 30. 10.1186/s13045-020-00856-8.

656. Liu, Y., An, L., Huang, R., Xiong, J., Yang, H., Wang, X., and Zhang, X. (2022). Strategies to enhance CAR-T persistence. *Biomark Res* *10*, 86. 10.1186/s40364-022-00434-9.
657. Lim, W.A., and June, C.H. (2017). The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell* *168*, 724–740. 10.1016/j.cell.2017.01.016.
658. Sterner, R.C., and Sterner, R.M. (2021). CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J* *11*, 69. 10.1038/s41408-021-00459-7.
659. Turtle, C.J., Hanafi, L.-A., Berger, C., Gooley, T.A., Cherian, S., Hudecek, M., Sommermeyer, D., Melville, K., Pender, B., Budiarto, T.M., et al. (2016). CD19 CAR–T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest* *126*, 2123–2138. 10.1172/jci85309.
660. Newick, K., O’Brien, S., Moon, E., and Albelda, S.M. (2016). CAR T Cell Therapy for Solid Tumors. *Annu Rev Med* *68*, 139–152. 10.1146/annurev-med-062315-120245.
661. Liu, G., Rui, W., Zhao, X., and Lin, X. (2021). Enhancing CAR-T cell efficacy in solid tumors by targeting the tumor microenvironment. *Cell Mol Immunol* *18*, 1085–1095. 10.1038/s41423-021-00655-2.
662. López-Cantillo, G., Urueña, C., Camacho, B.A., and Ramírez-Segura, C. (2022). CAR-T Cell Performance: How to Improve Their Persistence? *Front Immunol* *13*, 878209. 10.3389/fimmu.2022.878209.
663. Kandra, P., Nandigama, R., Eul, B., Huber, M., Kobold, S., Seeger, W., Grimminger, F., and Savai, R. (2022). Utility and Drawbacks of Chimeric Antigen Receptor T Cell (CAR-T) Therapy in Lung Cancer. *Front Immunol* *13*, 903562. 10.3389/fimmu.2022.903562.
664. Linette, G.P., Stadtmauer, E.A., Maus, M.V., Rapoport, A.P., Levine, B.L., Emery, L., Litzky, L., Bagg, A., Carreno, B.M., Cimino, P.J., et al. (2013). Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood* *122*, 863–871. 10.1182/blood-2013-03-490565.
665. Stoiber, S., Cadilha, B.L., Benmebarek, M.-R., Lesch, S., Endres, S., and Kobold, S. (2019). Limitations in the Design of Chimeric Antigen Receptors for Cancer Therapy. *Cells* *8*, 472. 10.3390/cells8050472.
666. Neelapu, S.S. (2019). Managing the toxicities of CAR T-cell therapy. *Hematol. Oncol.* *37*, 48–52. 10.1002/hon.2595.
667. Brown, K., Seftel, M.D., and Hay, K.A. (2021). Innovations en immunothérapie anticancéreuse: thérapie par lymphocytes T porteurs de récepteurs antigéniques chimériques (cellules CAR-T). *Cmaj* *193*, E1639–E1642. 10.1503/cmaj.202907-f.

668. Lonberg, N., and Korman, A.J. (2017). Masterful Antibodies: Checkpoint Blockade. *Cancer Immunol Res* 5, 275–281. 10.1158/2326-6066.cir-17-0057.
669. Blackburn, S.D., Shin, H., Freeman, G.J., and Wherry, E.J. (2008). Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15016–15021. 10.1073/pnas.0801497105.
670. Siddiqui, I., Schaeuble, K., Chennupati, V., Marraco, S.A.F., Calderon-Copete, S., Ferreira, D.P., Carmona, S.J., Scarpellino, L., Gfeller, D., Pradervand, S., et al. (2019). Intratumoral Tcf1+PD-1+CD8+ T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Immunity* 50, 195-211.e10. 10.1016/j.immuni.2018.12.021.
671. Prokhnevskaya, N., Cardenas, M.A., Valanparambil, R.M., Sobierajska, E., Barwick, B.G., Jansen, C., Moon, A.R., Gregorova, P., delBalzo, L., Greenwald, R., et al. (2022). CD8+ T cell activation in cancer comprises an initial activation phase in lymph nodes followed by effector differentiation within the tumor. *Immunity*. 10.1016/j.immuni.2022.12.002.
672. Kurtulus, S., Madi, A., Escobar, G., Klapholz, M., Nyman, J., Christian, E., Pawlak, M., Dionne, D., Xia, J., Rozenblatt-Rosen, O., et al. (2019). Checkpoint Blockade Immunotherapy Induces Dynamic Changes in PD-1–CD8+ Tumor-Infiltrating T Cells. *Immunity* 50, 181-194.e6. 10.1016/j.immuni.2018.11.014.
673. Zhulai, G., and Oleinik, E. (2022). Targeting regulatory T cells in anti-PD-1/PD-L1 cancer immunotherapy. *Scand J Immunol* 95, e13129. 10.1111/sji.13129.
674. Weber, R., Fleming, V., Hu, X., Nagibin, V., Groth, C., Altevogt, P., Utikal, J., and Umansky, V. (2018). Myeloid-Derived Suppressor Cells Hinder the Anti-Cancer Activity of Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Immunol* 9, 1310. 10.3389/fimmu.2018.01310.
675. Chang, C.-H., Qiu, J., O’Sullivan, D., Buck, M.D., Noguchi, T., Curtis, J.D., Chen, Q., Gindin, M., Gubin, M.M., van der Windt, G.J.W., et al. (2015). Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* 162, 1229–1241. 10.1016/j.cell.2015.08.016.
676. Cham, C.M., Driessens, G., O’Keefe, J.P., and Gajewski, T.F. (2008). Glucose deprivation inhibits multiple key gene expression events and effector functions in CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 38, 2438–2450. 10.1002/eji.200838289.
677. Li, C., Zhu, B., Son, Y.M., Wang, Z., Jiang, L., Xiang, M., Ye, Z., Beckermann, K.E., Wu, Y., Jenkins, J.W., et al. (2019). The Transcription Factor Bhlhe40 Programs Mitochondrial Regulation of Resident CD8+ T Cell Fitness and Functionality. *Immunity* 51, 491-507.e7. 10.1016/j.immuni.2019.08.013.
678. Chambon, P. (2005). The Nuclear Receptor Superfamily: A Personal Retrospect on the First Two Decades. *Mol Endocrinol* 19, 1418–1428. 10.1210/me.2005-0125.

679. Zhang, C., Zhang, B., Zhang, X., Sun, G., and Sun, X. (2020). Targeting Orphan Nuclear Receptors NR4As for Energy Homeostasis and Diabetes. *Front Pharmacol* *11*, 587457. 10.3389/fphar.2020.587457.
680. Murphy, E.P., and Crean, D. (2022). NR4A1-3 nuclear receptor activity and immune cell dysregulation in rheumatic diseases. *Frontiers Medicine* *9*, 874182. 10.3389/fmed.2022.874182.
681. Chai, S.C., and Chen, T. (2022). *Comprehensive Pharmacology*. 151–164. 10.1016/b978-0-12-820472-6.00113-4.
682. Niu, Y., and Tang, S. (2022). Circadian clock-mediated nuclear receptors in cancer. *J Cell Physiol*. 10.1002/jcp.30905.
683. Scholtes, C., and Giguère, V. (2022). Transcriptional control of energy metabolism by nuclear receptors. *Nat Rev Mol Cell Bio* *23*, 750–770. 10.1038/s41580-022-00486-7.
684. Friesema, E.C.H., Ganguly, S., Abdalla, A., Fox, J.E.M., Halestrap, A.P., and Visser, T.J. (2003). Identification of Monocarboxylate Transporter 8 as a Specific Thyroid Hormone Transporter*. *J Biol Chem* *278*, 40128–40135. 10.1074/jbc.m300909200.
685. Frigo, D.E., Bondesson, M., and Williams, C. (2021). Nuclear receptors: from molecular mechanisms to therapeutics. *Essays Biochem* *65*, 847–856. 10.1042/ebc20210020.
686. Kadmiel, M., and Cidlowski, J.A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* *34*, 518–530. 10.1016/j.tips.2013.07.003.
687. Smoak, K.A., and Cidlowski, J.A. (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev* *125*, 697–706. 10.1016/j.mad.2004.06.010.
688. Vera, I.M.S. de (2018). Advances in Orphan Nuclear Receptor Pharmacology: A New Era in Drug Discovery. *Acs Pharmacol Transl Sci* *1*, 134–137. 10.1021/acspsci.8b00029.
689. Weikum, E.R., Liu, X., and Ortlund, E.A. (2018). The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Sci* *27*, 1876–1892. 10.1002/pro.3496.
690. Anbalagan, M., Huderson, B., Murphy, L., and Rowan, B.G. (2012). Post-Translational Modifications of Nuclear Receptors and Human Disease. *Nucl Recept Signal* *10*, nrs.10001. 10.1621/nrs.10001.
691. Maire, A. le, Teyssier, C., Erb, C., Grimaldi, M., Alvarez, S., Lera, A.R. de, Balaguer, P., Gronemeyer, H., Royer, C.A., Germain, P., et al. (2010). A unique secondary-structure switch controls constitutive gene repression by retinoic acid receptor. *Nat Struct Mol Biol* *17*, 801–807. 10.1038/nsmb.1855.

692. Xu, H.E., Stanley, T.B., Montana, V.G., Lambert, M.H., Shearer, B.G., Cobb, J.E., McKee, D.D., Galardi, C.M., Plunket, K.D., Nolte, R.T., et al. (2002). Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPAR α . *Nature* *415*, 813–817. 10.1038/415813a.
693. Legrand, N., Bretscher, C.L., Zielke, S., Wilke, B., Daude, M., Fritz, B., Diederich, W.E., and Adhikary, T. (2019). PPAR β/δ recruits NCOR and regulates transcription reinitiation of ANGPTL4. *Nucleic Acids Res* *47*, 9573–9591. 10.1093/nar/gkz685.
694. Li, P., Spann, N.J., Kaikkonen, M.U., Lu, M., Oh, D.Y., Fox, J.N., Bandyopadhyay, G., Talukdar, S., Xu, J., Lagakos, W.S., et al. (2013). NCoR Repression of LXRs Restricts Macrophage Biosynthesis of Insulin-Sensitizing Omega 3 Fatty Acids. *Cell* *155*, 200–214. 10.1016/j.cell.2013.08.054.
695. Watson, P.J., Fairall, L., and Schwabe, J.W.R. (2012). Nuclear hormone receptor co-repressors: Structure and function. *Mol Cell Endocrinol* *348*, 440–449. 10.1016/j.mce.2011.08.033.
696. Bulyanko, Y.A., and O'Malley, B.W. (2011). Nuclear Receptor Coactivators: Structural and Functional Biochemistry. *Biochemistry-us* *50*, 313–328. 10.1021/bi101762x.
697. Bosscher, K.D., Beck, I.M., Dejager, L., Bougarne, N., Gaigneaux, A., Chateauvieux, S., Ratman, D., Bracke, M., Tavernier, J., Berghe, W.V., et al. (2014). Selective modulation of the glucocorticoid receptor can distinguish between transrepression of NF- κ B and AP-1. *Cell Mol Life Sci* *71*, 143–163. 10.1007/s00018-013-1367-4.
698. Glass, C.K., and Saijo, K. (2010). Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat Rev Immunol* *10*, 365–376. 10.1038/nri2748.
699. Glass, C.K., and Ogawa, S. (2006). Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* *6*, 44–55. 10.1038/nri1748.
700. Rhen, T., and Cidlowski, J.A. (2005). Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *New Engl J Medicine* *353*, 1711–1723. 10.1056/nejmra050541.
701. Kourakis, S., Timpani, C.A., Campelj, D.G., Hafner, P., Gueven, N., Fischer, D., and Rybalka, E. (2021). Standard of care versus new-wave corticosteroids in the treatment of Duchenne muscular dystrophy: Can we do better? *Orphanet J Rare Dis* *16*, 117. 10.1186/s13023-021-01758-9.
702. DeLaForest, A., Furio, F.D., Jing, R., Ludwig-Kubinski, A., Twaroski, K., Urick, A., Pulakanti, K., Rao, S., and Duncan, S.A. (2018). HNF4A Regulates the Formation of Hepatic Progenitor Cells from Human iPSC-Derived Endoderm by Facilitating Efficient Recruitment of RNA Pol II. *Genes-basel* *10*, 21. 10.3390/genes10010021.
703. Wang, Q., and Cooney, A.J. (2013). Revisiting the role of GCNF in embryonic development. *Semin Cell Dev Biol* *24*, 679–686. 10.1016/j.semcd.2013.08.003.

704. Gu, P., LeMenuet, D., Chung, A.C.-K., Mancini, M., Wheeler, D.A., and Cooney, A.J. (2005). Orphan Nuclear Receptor GCNF Is Required for the Repression of Pluripotency Genes during Retinoic Acid-Induced Embryonic Stem Cell Differentiation. *Mol Cell Biol* 25, 8507–8519. 10.1128/mcb.25.19.8507-8519.2005.
705. Schoonjans, K., Annicotte, J., Huby, T., Botrugno, O.A., Fayard, E., Ueda, Y., Chapman, J., and Auwerx, J. (2002). Liver receptor homolog 1 controls the expression of the scavenger receptor class B type I. *Embo Rep* 3, 1181–1187. 10.1093/embo-reports/kvf238.
706. Sun, Y., Demagny, H., and Schoonjans, K. (2021). Emerging functions of the nuclear receptor LRH-1 in liver physiology and pathology. *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Mol Basis Dis* 1867, 166145. 10.1016/j.bbadis.2021.166145.
707. Ferraz-de-Souza, B., Lin, L., and Achermann, J.C. (2011). Steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and human disease. *Mol Cell Endocrinol* 336, 198–205. 10.1016/j.mce.2010.11.006.
708. Lin, L., and Achermann, J.C. (2008). Steroidogenic Factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and Disorders of Testis Development. *Sex Dev* 2, 200–209. 10.1159/000152036.
709. Duez, H., and Staels, B. (2010). Nuclear Receptors Linking Circadian Rhythms and Cardiometabolic Control. *Arteriosclerosis Thrombosis Vasc Biology* 30, 1529–1534. 10.1161/atvbaha.110.209098.
710. Michaels, A.J., Campbell, C., Bou-Puerto, R., and Rudensky, A.Y. (2020). Nuclear receptor LXR β controls fitness and functionality of activated T cells. *J Exp Med* 218, e20201311. 10.1084/jem.20201311.
711. Seitz, C., Huang, J., Geiselhöringer, A.-L., Galbani-Bianchi, P., Michalek, S., Phan, T.S., Reinhold, C., Dietrich, L., Schmidt, C., Corazza, N., et al. (2019). The orphan nuclear receptor LRH-1/NR5a2 critically regulates T cell functions. *Sci Adv* 5, eaav9732. 10.1126/sciadv.aav9732.
712. Klepsch, V., Hermann-Kleiter, N., Do-Dinh, P., Jakic, B., Offermann, A., Efremova, M., Sopper, S., Rieder, D., Krogsdam, A., Gamerith, G., et al. (2018). Nuclear receptor NR2F6 inhibition potentiates responses to PD-L1/PD-1 cancer immune checkpoint blockade. *Nature Communications* 9, 1538–13. 10.1038/s41467-018-04004-2.
713. Hermann-Kleiter, N., Klepsch, V., Wallner, S., Siegmund, K., Klepsch, S., Tuzlak, S., Villunger, A., Kaminski, S., Pfeifhofer-Obermair, C., Gruber, T., et al. (2015). The Nuclear Orphan Receptor NR2F6 Is a Central Checkpoint for Cancer Immune Surveillance. *Cell Reports* 12, 2072–2085. 10.1016/j.celrep.2015.08.035.
714. Klepsch, V., Pommermayr, M., Humer, D., Brigo, N., Hermann-Kleiter, N., and Baier, G. (2020). Targeting the orphan nuclear receptor NR2F6 in T cells primes tumors for immune checkpoint therapy. *Cell Commun Signal Ccs* 18, 8. 10.1186/s12964-019-0454-z.

715. Hierweger, A.M., Engler, J.B., Friese, M.A., Reichardt, H.M., Lydon, J., DeMayo, F., Mittrücker, H., and Arck, P.C. (2019). Progesterone modulates the T-cell response via glucocorticoid receptor-dependent pathways. *Am. J. Reprod. Immunol.* *81*, e13084. 10.1111/aji.13084.
716. Engler, J.B., Kursawe, N., Solano, M.E., Patas, K., Wehrmann, S., Heckmann, N., Lühder, F., Reichardt, H.M., Arck, P.C., Gold, S.M., et al. (2017). Glucocorticoid receptor in T cells mediates protection from autoimmunity in pregnancy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, E181–E190. 10.1073/pnas.1617115114.
717. Radojević, K., Arsenović-Ranin, N., Kosec, D., Pešić, V., Pilipović, I., Perišić, M., Plečaš-Solarović, B., and Leposavić, G. (2007). Neonatal castration affects intrathymic kinetics of T-cell differentiation and the spleen T-cell level. *J. Endocrinol.* *192*, 669–682. 10.1677/joe.1.07019.
718. Hewagama, A., Patel, D., Yarlagadda, S., Strickland, F.M., and Richardson, B.C. (2009). Stronger inflammatory/cytotoxic T-cell response in women identified by microarray analysis. *Genes Immun.* *10*, 509–516. 10.1038/gene.2009.12.
719. Brown, M.A., and Su, M.A. (2019). An Inconvenient Variable: Sex Hormones and Their Impact on T Cell Responses. *J. Immunol.* *202*, 1927–1933. 10.4049/jimmunol.1801403.
720. Klein, S.L., and Flanagan, K.L. (2016). Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol* *16*, 626–638. 10.1038/nri.2016.90.
721. Zhu, M.-L., Bakhru, P., Conley, B., Nelson, J.S., Free, M., Martin, A., Starmer, J., Wilson, E.M., and Su, M.A. (2016). Sex bias in CNS autoimmune disease mediated by androgen control of autoimmune regulator. *Nat. Commun.* *7*, 11350. 10.1038/ncomms11350.
722. Dragin, N., Bismuth, J., Cizeron-Clairac, G., Biferi, M.G., Berthault, C., Serraf, A., Nottin, R., Klatzmann, D., Cumano, A., Barkats, M., et al. (2016). Estrogen-mediated downregulation of AIRE influences sexual dimorphism in autoimmune diseases. *J. Clin. Investig.* *126*, 1525–1537. 10.1172/jci81894.
723. Wilkinson, N.M., Chen, H.-C., Lechner, M.G., and Su, M.A. (2022). Sex Differences in Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* *40*, 1–20. 10.1146/annurev-immunol-101320-125133.
724. Phiel, K.L., Henderson, R.A., Adelman, S.J., and Elloso, M.M. (2005). Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunol. Lett.* *97*, 107–113. 10.1016/j.imlet.2004.10.007.
725. Oliva, M., Muñoz-Aguirre, M., Kim-Hellmuth, S., Wucher, V., Gewirtz, A.D.H., Cotter, D.J., Parsana, P., Kasela, S., Balliu, B., Viñuela, A., et al. (2020). The impact of sex on gene expression across human tissues. *Science* *369*, eaba3066. 10.1126/science.aba3066.

726. Robinson, D.P., Hall, O.J., Nilles, T.L., Bream, J.H., and Klein, S.L. (2014). 17 β -Estradiol Protects Females against Influenza by Recruiting Neutrophils and Increasing Virus-Specific CD8 T Cell Responses in the Lungs. *J. Virol.* *88*, 4711–4720. 10.1128/jvi.02081-13.
727. Chen, R.-Y., Fan, Y.-M., Zhang, Q., Liu, S., Li, Q., Ke, G.-L., Li, C., and You, Z. (2015). Estradiol Inhibits Th17 Cell Differentiation through Inhibition of ROR γ T Transcription by Recruiting the ER α /REA Complex to Estrogen Response Elements of the ROR γ T Promoter. *J. Immunol.* *194*, 4019–4028. 10.4049/jimmunol.1400806.
728. Khan, D., Dai, R., Karpuzoglu, E., and Ahmed, S.A. (2010). Estrogen increases, whereas IL-27 and IFN- γ decrease, splenocyte IL-17 production in WT mice. *Eur. J. Immunol.* *40*, 2549–2556. 10.1002/eji.201040303.
729. L lu, K., Laffont, S., Delpy, L., Paulet, P.-E., P rinat, T., Tschanz, S.A., Pelletier, L., Engelhardt, B., and Gu ry, J.-C. (2011). Estrogen Receptor α Signaling in T Lymphocytes Is Required for Estradiol-Mediated Inhibition of Th1 and Th17 Cell Differentiation and Protection against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* *187*, 2386–2393. 10.4049/jimmunol.1101578.
730. Vassiliadou, N., Tucker, L., and Anderson, D.J. (1999). Progesterone-Induced Inhibition of Chemokine Receptor Expression on Peripheral Blood Mononuclear Cells Correlates with Reduced HIV-1 Infectability In Vitro. *J. Immunol.* *162*, 7510–7518. 10.4049/jimmunol.162.12.7510.
731. Schafer, J.M., Xiao, T., Kwon, H., Collier, K., Chang, Y., Abdel-Hafiz, H., Bolyard, C., Chung, D., Yang, Y., Sundi, D., et al. (2022). Sex-biased adaptive immune regulation in cancer development and therapy. *Iscience* *25*, 104717. 10.1016/j.isci.2022.104717.
732. Page, S.T., Plymate, S.R., Bremner, W.J., Matsumoto, A.M., Hess, D.L., Lin, D.W., Amory, J.K., Nelson, P.S., and Wu, J.D. (2006). Effect of medical castration on CD4+CD25+ T cells, CD8+ T cell IFN- γ expression, and NK cells: a physiological role for testosterone and/or its metabolites. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* *290*, E856–E863. 10.1152/ajpendo.00484.2005.
733. Walecki, M., Eisel, F., Klug, J., Baal, N., Paradowska-Dogan, A., Wahle, E., Hackstein, H., Meinhardt, A., and Fijak, M. (2015). Androgen receptor modulates Foxp3 expression in CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T-cells. *Mol. Biol. Cell* *26*, 2845–2857. 10.1091/mbc.e14-08-1323.
734. Kissick, H.T., Sanda, M.G., Dunn, L.K., Pellegrini, K.L., On, S.T., Noel, J.K., and Arredouani, M.S. (2014). Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 9887–9892. 10.1073/pnas.1402468111.
735. Yang, C., Jin, J., Yang, Y., Sun, H., Wu, L., Shen, M., Hong, X., Li, W., Lu, L., Cao, D., et al. (2022). Androgen receptor-mediated CD8+ T cell stemness programs drive sex differences in antitumor immunity. *Immunity*. 10.1016/j.immuni.2022.05.012.

736. Pala, L., Pas, T.D., and Conforti, F. (2022). Boosting anticancer immunotherapy through androgen receptor blockade. *Cancer Cell* 40, 455–457. 10.1016/j.ccell.2022.04.007.
737. Guan, X., Polesso, F., Wang, C., Sehrawat, A., Hawkins, R.M., Murray, S.E., Thomas, G.V., Caruso, B., Thompson, R.F., Wood, M.A., et al. (2022). Androgen receptor activity in T cells limits checkpoint blockade efficacy. *Nature*, 1–6. 10.1038/s41586-022-04522-6.
738. Kwon, H., Schafer, J.M., Song, N.-J., Kaneko, S., Li, A., Xiao, T., Ma, A., Allen, C., Das, K., Zhou, L., et al. (2022). Androgen conspires with the CD8⁺ T cell exhaustion program and contributes to sex bias in cancer. *Sci Immunol* 7, eabq2630. 10.1126/sciimmunol.abq2630.
739. Mukherjee, S., Rathore, A., and Mani, S. (2017). *Encyclopedia of Cancer*. 2656–2661. 10.1007/978-3-642-16483-5_4262.
740. Herring, J.A., Elison, W.S., and Tessem, J.S. (2019). Function of Nr4a Orphan Nuclear Receptors in Proliferation, Apoptosis and Fuel Utilization Across Tissues. *Cells* 8, 1373. 10.3390/cells8111373.
741. Pearen, M.A., and Muscat, G.E.O. (2010). Minireview: Nuclear Hormone Receptor 4A Signaling: Implications for Metabolic Disease. *Mol Endocrinol* 24, 1891–1903. 10.1210/me.2010-0015.
742. Philips, A., Lesage, S., Gingras, R., Maira, M.H., Gauthier, Y., Hugo, P., and Drouin, J. (1997). Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 17, 5946–5951. 10.1128/mcb.17.10.5946.
743. Winoto, A., and Littman, D.R. (2002). Nuclear Hormone Receptors in T Lymphocytes. *Cell* 109, S57–S66. 10.1016/s0092-8674(02)00710-9.
744. Perlmann, T., and Jansson, L. (1995). A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Gene Dev* 9, 769–782. 10.1101/gad.9.7.769.
745. Zetterström, R.H., Solomin, L., Mitsiadis, T., Olson, L., and Perlmann, T. (1996). Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Mol Endocrinol* 10, 1656–1666. 10.1210/mend.10.12.8961274.
746. Scheepstra, M., Andrei, S.A., Vries, R.M.J.M. de, Meijer, F.A., Ma, J.-N., Burstein, E.S., Olsson, R., Ottmann, C., Milroy, L.-G., and Brunsveld, L. (2017). Ligand Dependent Switch from RXR Homo- to RXR-NURR1 Heterodimerization. *Acs Chem Neurosci* 8, 2065–2077. 10.1021/acchemneuro.7b00216.
747. Maxwell, M.A., and Muscat, G.E.O. (2006). The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal* 4, e002. 10.1621/nrs.04002.
748. Moran, A.E., Holzapfel, K.L., Xing, Y., Cunningham, N.R., Maltzman, J.S., Punt, J., and Hogquist, K.A. (2011). T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development

demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J Exp Medicine* 208, 1279–1289. 10.1084/jem.20110308.

749. Zhu, F., Ma, J., Li, W., Liu, Q., Qin, X., Qian, Y., Wang, C., Zhang, Y., Li, Y., Jiang, D., et al. (2023). The orphan receptor Nur77 binds cytoplasmic LPS to activate the non-canonical NLRP3 inflammasome. *Immunity*. 10.1016/j.immuni.2023.03.003.

750. Huang, H.-Y., Chang, H.-F., Tsai, M.-J., Chen, J.-S., and Wang, M.-J. (2016). 6-Mercaptopurine attenuates tumor necrosis factor- α production in microglia through Nur77-mediated transrepression and PI3K/Akt/mTOR signaling-mediated translational regulation. *J Neuroinflamm* 13, 78. 10.1186/s12974-016-0543-5.

751. Wansa, K.D.S.A., and Muscat, G.E.O. (2005). TRAP220 is modulated by the antineoplastic agent 6-Mercaptopurine, and mediates the activation of the NR4A subgroup of nuclear receptors. *J Mol Endocrinol* 34, 835–848. 10.1677/jme.1.01739.

752. Egarnes, B., Blanchet, M.-R., and Gosselin, J. (2017). Treatment with the NR4A1 agonist cytosporone B controls influenza virus infection and improves pulmonary function in infected mice. *Plos One* 12, e0186639. 10.1371/journal.pone.0186639.

753. Zhan, Y., Du, X., Chen, H., Liu, J., Zhao, B., Huang, D., Li, G., Xu, Q., Zhang, M., Weimer, B.C., et al. (2008). Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77. *Nat Chem Biol* 4, 548–556. 10.1038/nchembio.106.

754. Richard, A.C., Lun, A.T.L., Lau, W.W.Y., Göttgens, B., Marioni, J.C., and Griffiths, G.M. (2018). T cell cytolytic capacity is independent of initial stimulation strength. *Nat Immunol* 19, 849–858. 10.1038/s41590-018-0160-9.

755. Ashouri, J.F., and Weiss, A. (2017). Endogenous Nur77 Is a Specific Indicator of Antigen Receptor Signaling in Human T and B Cells. *J. Immunol.* 198, 657–668. 10.4049/jimmunol.1601301.

756. Bending, D., Martín, P.P., Paduraru, A., Ducker, C., Marzaganov, E., Laviron, M., Kitano, S., Miyachi, H., Crompton, T., and Ono, M. (2018). A timer for analyzing temporally dynamic changes in transcription during differentiation in vivo. *J Cell Biol* 217, 2931–2950. 10.1083/jcb.201711048.

757. Wang, Z., Benoit, G., Liu, J., Prasad, S., Aarnisalo, P., Liu, X., Xu, H., Walker, N.P.C., and Perlmann, T. (2003). Structure and function of Nurrl identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 423, 555–560. 10.1038/nature01645.

758. Baker, K.D., Shewchuk, L.M., Kozlova, T., Makishima, M., Hassell, A., Wisely, B., Caravella, J.A., Lambert, M.H., Reinking, J.L., Krause, H., et al. (2003). The Drosophila Orphan Nuclear Receptor DHR38 Mediates an Atypical Ecdysteroid Signaling Pathway. *Cell* 113, 731–742. 10.1016/s0092-8674(03)00420-3.

759. Vera, I.M.S. de, Munoz-Tello, P., Zheng, J., Dharmarajan, V., Marciano, D.P., Matta-Camacho, E., Giri, P.K., Shang, J., Hughes, T.S., Rance, M., et al. (2019). Defining a Canonical Ligand-Binding Pocket in the Orphan Nuclear Receptor Nurr1. *Structure* 27, 66-77.e5. 10.1016/j.str.2018.10.002.
760. Lakshmi, S.P., Reddy, A.T., Banno, A., and Reddy, R.C. (2019). Molecular, chemical, and structural characterization of prostaglandin A2 as a novel agonist for Nur77. *Biochem J* 476, 2757–2767. 10.1042/bcj20190253.
761. Rajan, S., Jang, Y., Kim, C.-H., Kim, W., Toh, H.T., Jeon, J., Song, B., Serra, A., Lescar, J., Yoo, J.Y., et al. (2020). PGE1 and PGA1 bind to Nurr1 and activate its transcriptional function. *Nat Chem Biol* 16, 876–886. 10.1038/s41589-020-0553-6.
762. Munoz-Tello, P., Lin, H., Khan, P., Vera, I.M.S. de, Kamenecka, T.M., and Kojetin, D.J. (2020). Assessment of NR4A Ligands That Directly Bind and Modulate the Orphan Nuclear Receptor Nurr1. *J Med Chem* 63, 15639–15654. 10.1021/acs.jmedchem.0c00894.
763. Kholodar, S.A., Lang, G., Cortopassi, W.A., Iizuka, Y., Brah, H.S., Jacobson, M.P., and England, P.M. (2021). Analogs of the Dopamine Metabolite 5,6-Dihydroxyindole Bind Directly to and Activate the Nuclear Receptor Nurr1. *Acs Chem Biol* 16, 1159–1163. 10.1021/acscchembio.1c00326.
764. Bruning, J.M., Wang, Y., Oltrabella, F., Tian, B., Kholodar, S.A., Liu, H., Bhattacharya, P., Guo, S., Holton, J.M., Fletterick, R.J., et al. (2019). Covalent Modification and Regulation of the Nuclear Receptor Nurr1 by a Dopamine Metabolite. *Cell Chem Biol* 26, 674-685.e6. 10.1016/j.chembiol.2019.02.002.
765. Kagaya, S., Ohkura, N., Tsukada, T., Miyagawa, M., Sugita, Y., Tsujimoto, G., Matsumoto, K., Saito, H., and Hashida, R. (2005). Prostaglandin A2 Acts as a Transactivator for NOR1 (NR4A3) within the Nuclear Receptor Superfamily. *Biological Pharm Bulletin* 28, 1603–1607. 10.1248/bpb.28.1603.
766. Lee, S.-O., Li, X., Hedrick, E., Jin, U.-H., Tjalkens, R.B., Backos, D.S., Li, L., Zhang, Y., Wu, Q., and Safe, S. (2014). Diindolylmethane Analogs Bind NR4A1 and Are NR4A1 Antagonists in Colon Cancer Cells. *Mol Endocrinol* 28, 1729–1739. 10.1210/me.2014-1102.
767. Hedrick, E., Li, X., Cheng, Y., Lacey, A., Mohankumar, K., Zarei, M., and Safe, S. (2019). Potent inhibition of breast cancer by bis-indole-derived nuclear receptor 4A1 (NR4A1) antagonists. *Breast Cancer Res Tr* 177, 29–40. 10.1007/s10549-019-05279-9.
768. Karki, K., Wright, G.A., Mohankumar, K., Jin, U.-H., Zhang, X.-H., and Safe, S. (2020). A Bis-Indole-Derived NR4A1 Antagonist Induces PD-L1 Degradation and Enhances Antitumor Immunity. *Cancer Res* 80, 1011–1023. 10.1158/0008-5472.can-19-2314.

769. Zetterström, R.H., Solomin, L., Jansson, L., Hoffer, B.J., Olson, L., and Perlmann, T. (1997). Dopamine Neuron Agenesis in *Nurr1*-Deficient Mice. *Science* *276*, 248–250. 10.1126/science.276.5310.248.
770. Pearen, M.A., Eriksson, N.A., Fitzsimmons, R.L., Goode, J.M., Martel, N., Andrikopoulos, S., and Muscat, G.E.O. (2012). The Nuclear Receptor, Nor-1, Markedly Increases Type II Oxidative Muscle Fibers and Resistance to Fatigue. *Mol Endocrinol* *26*, 372–384. 10.1210/me.2011-1274.
771. Chao, L.C., Zhang, Z., Pei, L., Saito, T., Tontonoz, P., and Pilch, P.F. (2007). *Nur77* Coordinately Regulates Expression of Genes Linked to Glucose Metabolism in Skeletal Muscle. *Mol Endocrinol* *21*, 2152–2163. 10.1210/me.2007-0169.
772. Pei, L., Waki, H., Vaitheesvaran, B., Wilpitz, D.C., Kurland, I.J., and Tontonoz, P. (2006). NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism. *Nat Med* *12*, 1048–1055. 10.1038/nm1471.
773. Walton, R.G., Zhu, X., Tian, L., Heywood, E.B., Liu, J., Hill, H.S., Liu, J., Bruemmer, D., Yang, Q., Fu, Y., et al. (2016). AP2-NR4A3 transgenic mice display reduced serum epinephrine because of increased catecholamine catabolism in adipose tissue. *Am J Physiol-endoc M* *311*, E69–E81. 10.1152/ajpendo.00330.2015.
774. Zhao, Y., and Bruemmer, D. (2010). NR4A Orphan Nuclear Receptors. *Arteriosclerosis Thrombosis Vasc Biology* *30*, 1535–1541. 10.1161/atvbaha.109.191163.
775. Gizard, F., Zhao, Y., Findeisen, H.M., Qing, H., Cohn, D., Heywood, E.B., Jones, K.L., Nomiya, T., and Bruemmer, D. (2011). Transcriptional Regulation of S Phase Kinase-associated Protein 2 by NR4A Orphan Nuclear Receptor NOR1 in Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* *286*, 35485–35493. 10.1074/jbc.m111.295840.
776. Boulet, S., Corre, L.L., Odagiu, L., and Labrecque, N. (2022). Role of NR4A family members in myeloid cells and leukemia. *Curr Res Immunol* *3*, 23–36. 10.1016/j.crimmu.2022.02.001.
777. Wager, C.M.L., Arnett, E., and Schlesinger, L.S. (2019). Macrophage nuclear receptors: Emerging key players in infectious diseases. *Plos Pathog* *15*, e1007585. 10.1371/journal.ppat.1007585.
778. Hiwa, R., Nielsen, H.V., Mueller, J.L., Mandla, R., and Zikherman, J. (2021). NR4A family members regulate T cell tolerance to preserve immune homeostasis and suppress autoimmunity. *Jci Insight*. 10.1172/jci.insight.151005.
779. Odagiu, L., May, J., Boulet, S., Baldwin, T.A., and Labrecque, N. (2021). Role of the Orphan Nuclear Receptor NR4A Family in T-Cell Biology. *Front Endocrinol* *11*, 624122. 10.3389/fendo.2020.624122.

780. Cunningham, N.R., Artim, S.C., Fornadel, C.M., Sellars, M.C., Edmonson, S.G., Scott, G., Albino, F., Mathur, A., and Punt, J.A. (2006). Immature CD4+CD8+ Thymocytes and Mature T Cells Regulate Nur77 Distinctly in Response to TCR Stimulation. *J Immunol* 177, 6660–6666. 10.4049/jimmunol.177.10.6660.
781. Liebmann, M., Hucke, S., Koch, K., Eschborn, M., Ghelman, J., Chasan, A.I., Glander, S., Schädlich, M., Kuhlencord, M., Daber, N.M., et al. (2018). Nur77 serves as a molecular brake of the metabolic switch during T cell activation to restrict autoimmunity. *Proc National Acad Sci* 115, 201721049. 10.1073/pnas.1721049115.
782. Sekiya, T., Kashiwagi, I., Inoue, N., Morita, R., Hori, S., Waldmann, H., Rudensky, A.Y., Ichinose, H., Metzger, D., Chambon, P., et al. (2011). The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4+ T cells. *Nat Commun* 2, 269. 10.1038/ncomms1272.
783. Liu, X., Wang, Y., Lu, H., Li, J., Yan, X., Xiao, M., Hao, J., Alekseev, A., Khong, H., Chen, T., et al. (2019). Genome-wide analysis identifies NR4A1 as a key mediator of T cell dysfunction. *Nature* 567, 525–529. 10.1038/s41586-019-0979-8.
784. Ma, W., Zhao, R., Yang, R., Liu, B., Chen, X., Wu, L., and Qi, H. (2015). Nuclear receptors of the NR4a family are not required for the development and function of follicular T helper cells. *Int Immunopharmacol* 28, 841–845. 10.1016/j.intimp.2015.04.012.
785. Sekiya, T., Kondo, T., Shichita, T., Morita, R., Ichinose, H., and Yoshimura, A. (2015). Suppression of Th2 and Tfh immune reactions by Nr4a receptors in mature T reg cells. *Journal of Experimental Medicine* 212, 1623–1640. 10.1084/jem.20142088.
786. Raveney, B.J.E., Oki, S., and Yamamura, T. (2013). Nuclear Receptor NR4A2 Orchestrates Th17 Cell-Mediated Autoimmune Inflammation via IL-21 Signalling. *Plos One* 8, e56595. 10.1371/journal.pone.0056595.
787. Harant, H., and Lindley, I.J.D. (2004). Negative cross-talk between the human orphan nuclear receptor Nur77/NAK-1/TR3 and nuclear factor-kappaB. *Nucleic Acids Res.* 32, 5280–5290. 10.1093/nar/gkh856.
788. Doi, Y., Oki, S., Ozawa, T., Hohjoh, H., Miyake, S., and Yamamura, T. (2008). Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proc National Acad Sci* 105, 8381–8386. 10.1073/pnas.0803454105.
789. Satoh, J., Nakanishi, M., Koike, F., Onoue, H., Aranami, T., Yamamoto, T., Kawai, M., Kikuchi, S., Nomura, K., Yokoyama, K., et al. (2006). T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of Japanese multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 174, 108–118. 10.1016/j.jneuroim.2006.02.004.
790. Hill, L., and Schwickert, T.A. (2020). NR4As apply brakes on the B cell response. *Nat Immunol* 21, 1137–1139. 10.1038/s41590-020-0775-5.

791. Doyon-Laliberté, K., Chagnon-Choquet, J., Byrns, M., Aranguren, M., Memmi, M., Chrobak, P., Stagg, J., Poudrier, J., and Roger, M. (2019). NR4A Expression by Human Marginal Zone B-Cells. *Antibodies (Basel)* *8*, 50. 10.3390/antib8040050.
792. Tan, C., Hiwa, R., Mueller, J.L., Vykunta, V., Hibiya, K., Noviski, M., Huizar, J., Brooks, J.F., Garcia, J., Heyn, C., et al. (2020). NR4A nuclear receptors restrain B cell responses to antigen when second signals are absent or limiting. *Nat Immunol* *21*, 1267–1279. 10.1038/s41590-020-0765-7.
793. Cyster, J.G., and Allen, C.D.C. (2019). B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell* *177*, 524–540. 10.1016/j.cell.2019.03.016.
794. Zaretsky, I., Atrakchi, O., Mazor, R.D., Stoler-Barak, L., Biram, A., Feigelson, S.W., Gitlin, A.D., Engelhardt, B., and Shulman, Z. (2017). ICAMs support B cell interactions with T follicular helper cells and promote clonal selection. *J Exp Med* *214*, 3435–3448. 10.1084/jem.20171129.
795. Taub, D.D., Conlon, K., Lloyd, A.R., Oppenheim, J.J., and Kelvin, D.J. (1993). Preferential Migration of Activated CD4⁺ and CD8⁺ T Cells in Response to MIP-1 α and MIP-1 β . *Science* *260*, 355–358. 10.1126/science.7682337.
796. Meednu, N., Rangel-Moreno, J., Zhang, F., Escalera-Rivera, K., Corsiero, E., Prediletto, E., DiCarlo, E., Goodman, S., Donlin, L.T., Raychauduri, S., et al. (2022). Dynamic spectrum of ectopic lymphoid B cell activation and hypermutation in the RA synovium characterized by NR4A nuclear receptor expression. *Cell Reports* *39*, 110766. 10.1016/j.celrep.2022.110766.
797. Cheng, L.E., Chan, F.K., Cado, D., and Winoto, A. (1997). Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *Embo J* *16*, 1865–1875. 10.1093/emboj/16.8.1865.
798. Fassett, M.S., Jiang, W., D’Alise, A.M., Mathis, D., and Benoist, C. (2012). Nuclear receptor Nr4a1 modulates both regulatory T-cell (Treg) differentiation and clonal deletion. *Proc National Acad Sci* *109*, 3891–3896. 10.1073/pnas.1200090109.
799. Sekiya, T., Kashiwagi, I., Yoshida, R., Fukaya, T., Morita, R., Kimura, A., Ichinose, H., Metzger, D., Chambon, P., and Yoshimura, A. (2013). Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nat Immunol* *14*, 230–237. 10.1038/ni.2520.
800. Sekiya, T., Hibino, S., Saeki, K., Kanamori, M., Takaki, S., and Yoshimura, A. (2018). Nr4a Receptors Regulate Development and Death of Labile Treg Precursors to Prevent Generation of Pathogenic Self-Reactive Cells. *Cell Reports* *24*, 1627-1638.e6. 10.1016/j.celrep.2018.07.008.
801. Mingueneau, M., Kreslavsky, T., Gray, D., Heng, T., Cruse, R., Ericson, J., Bendall, S., Spitzer, M.H., Nolan, G.P., Kobayashi, K., et al. (2013). The transcriptional landscape of $\alpha\beta$ T cell differentiation. *Nat Immunol* *14*, 619–632. 10.1038/ni.2590.

802. Zhou, T., Cheng, J., Yang, P., Wang, Z., Liu, C., Su, X., Bluethmann, H., and Mountz, J.D. (1996). Inhibition of Nur77/Nurr1 leads to inefficient clonal deletion of self-reactive T cells. *J Exp Medicine* 183, 1879–1892. 10.1084/jem.183.4.1879.
803. Weih, F., Ryseck, R.P., Chen, L., and Bravo, R. (1996). Apoptosis of nur77/N10-transgenic thymocytes involves the Fas/Fas ligand pathway. *Proc National Acad Sci* 93, 5533–5538. 10.1073/pnas.93.11.5533.
804. Woronicz, J.D., Calnan, B., Ngo, V., and Winoto, A. (1994). Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature* 367, 277–281. 10.1038/367277a0.
805. Thompson, J., and Winoto, A. (2008). During negative selection, Nur77 family proteins translocate to mitochondria where they associate with Bcl-2 and expose its proapoptotic BH3 domain. *J Exp Medicine* 205, 1029–1036. 10.1084/jem.20080101.
806. Li, H., Kolluri, S.K., Gu, J., Dawson, M.I., Cao, X., Hobbs, P.D., Lin, B., Chen, G., Lu, J., Lin, F., et al. (2000). Cytochrome c Release and Apoptosis Induced by Mitochondrial Targeting of Nuclear Orphan Receptor TR3. *Science* 289, 1159–1164. 10.1126/science.289.5482.1159.
807. Hu, Q.N., Suen, A.Y.W., Caviedes, L.M.H., and Baldwin, T.A. (2017). Nur77 Regulates Nondeletional Mechanisms of Tolerance in T Cells. *J Immunol* 199, 3147–3157. 10.4049/jimmunol.1701085.
808. Boulet, S., Odagiu, L., Dong, M., Lebel, M.-È., Daudelin, J.-F., Melichar, H.J., and Labrecque, N. (2021). NR4A3 Mediates Thymic Negative Selection. *J Immunol* 207, 1055–1064. 10.4049/jimmunol.1901228.
809. Nowyhed, H.N., Huynh, T.R., Blatchley, A., Wu, R., Thomas, G.D., and Hedrick, C.C. (2015). The Nuclear Receptor Nr4a1 Controls CD8 T Cell Development Through Transcriptional Suppression of Runx3. *Scientific Reports* 5, S57-9. 10.1038/srep09059.
810. Jennings, E., Elliot, T.A.E., Thawait, N., Kanabar, S., Yam-Puc, J.C., Ono, M., Toellner, K.-M., Wraith, D.C., Anderson, G., and Bending, D. (2020). Nr4a1 and Nr4a3 Reporter Mice Are Differentially Sensitive to T Cell Receptor Signal Strength and Duration. *Cell Reports* 33, 108328. 10.1016/j.celrep.2020.108328.
811. Jennings, E.K., Lecky, D.A.J., Ono, M., and Bending, D. (2021). Application of dual Nr4a1-GFP Nr4a3-Tocky reporter mice to study T cell receptor signaling by flow cytometry. *Star Protoc* 2, 100284. 10.1016/j.xpro.2020.100284.
812. Sekiya, T. (2022). Comparison Between Nr4a Transcription Factor Regulation and Function in Lymphoid and Tumor Treg Cells. *Front Immunol* 13, 866339. 10.3389/fimmu.2022.866339.
813. Sekiya, T., Kashiwagi, I., Yoshida, R., Fukaya, T., Morita, R., Kimura, A., Ichinose, H., Metzger, D., Chambon, P., and Yoshimura, A. (2013). Nr4a receptors are essential for thymic

regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nat Immunol* 14, 230–237. 10.1038/ni.2520.

814. Hiwa, R., Brooks, J.F., Mueller, J.L., Nielsen, H.V., and Zikherman, J. (2022). NR4A nuclear receptors in T and B lymphocytes: Gatekeepers of immune tolerance*. *Immunol Rev* 307, 116–133. 10.1111/imr.13072.

815. Hibino, S., Chikuma, S., Kondo, T., Ito, M., Nakatsukasa, H., Omata-Mise, S., and Yoshimura, A. (2018). Inhibition of Nr4a Receptors Enhances Antitumor Immunity by Breaking Treg-Mediated Immune Tolerance. *Cancer Research* 78, 3027–3040. 10.1158/0008-5472.can-17-3102.

816. Schmiedel, B.J., Singh, D., Madrigal, A., Valdovino-Gonzalez, A.G., White, B.M., Zapardiel-Gonzalo, J., Ha, B., Altay, G., Greenbaum, J.A., McVicker, G., et al. (2018). Impact of Genetic Polymorphisms on Human Immune Cell Gene Expression. *Cell* 175, 1701-1715.e16. 10.1016/j.cell.2018.10.022.

817. Monaco, G., Lee, B., Xu, W., Mustafah, S., Hwang, Y.Y., Carré, C., Burdin, N., Visan, L., Ceccarelli, M., Poidinger, M., et al. (2019). RNA-Seq Signatures Normalized by mRNA Abundance Allow Absolute Deconvolution of Human Immune Cell Types. *Cell Rep.* 26, 1627-1640.e7. 10.1016/j.celrep.2019.01.041.

818. Uhlen, M., Karlsson, M.J., Zhong, W., Tebani, A., Pou, C., Mikes, J., Lakshmikanth, T., Forsström, B., Edfors, F., Odeberg, J., et al. (2019). A genome-wide transcriptomic analysis of protein-coding genes in human blood cells. *Science* 366. 10.1126/science.aax9198.

819. Chen, J., López-Moyado, I.F., Seo, H., Lio, C.-W.J., Hempleman, L.J., Sekiya, T., Yoshimura, A., Scott-Browne, J.P., and Rao, A. (2019). NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours. *Nature* 567, 530–534. 10.1038/s41586-019-0985-x.

820. Nowyhed, H.N., Huynh, T.R., Thomas, G.D., Blatchley, A., and Hedrick, C.C. (2015). Cutting Edge: The Orphan Nuclear Receptor Nr4a1 Regulates CD8⁺ T Cell Expansion and Effector Function through Direct Repression of Irf4. *J Immunol* 195, 3515–3519. 10.4049/jimmunol.1403027.

821. Williams, M.A., Ravkov, E.V., and Bevan, M.J. (2008). Rapid Culling of the CD4⁺ T Cell Repertoire in the Transition from Effector to Memory. *Immunity* 28, 533–545. 10.1016/j.immuni.2008.02.014.

822. Leignadier, J., and Labrecque, N. (2010). Epitope Density Influences CD8⁺ Memory T Cell Differentiation. *Plos One* 5, e13740. 10.1371/journal.pone.0013740.

823. Boddupalli, C.S., Nair, S., Gray, S.M., Nowyhed, H.N., Verma, R., Gibson, J.A., Abraham, C., Narayan, D., Vasquez, J., Hedrick, C.C., et al. (2016). ABC transporters and NR4A1 identify a quiescent subset of tissue-resident memory T cells. *J Clin Invest* 126, 3905–3916. 10.1172/jci85329.

824. Jung, I.-Y., Narayan, V., McDonald, S., Rech, A.J., Bartoszek, R., Hong, G., Davis, M.M., Xu, J., Boesteanu, A.C., Barber-Rotenberg, J.S., et al. (2022). BLIMP1 and NR4A3 transcription factors reciprocally regulate antitumor CAR T cell stemness and exhaustion. *Sci Transl Med* *14*, eabn7336. 10.1126/scitranslmed.abn7336.
825. Saijo, K., Winner, B., Carson, C.T., Collier, J.G., Boyer, L., Rosenfeld, M.G., Gage, F.H., and Glass, C.K. (2009). A Nurr1/CoREST Pathway in Microglia and Astrocytes Protects Dopaminergic Neurons from Inflammation-Induced Death. *Cell* *137*, 47–59. 10.1016/j.cell.2009.01.038.
826. Fagerberg, L., Hallström, B.M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpoor, S., Danielsson, A., Edlund, K., et al. (2014). Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics*. *Mol. Cell. Proteom.* *13*, 397–406. 10.1074/mcp.m113.035600.
827. Karlsson, M., Zhang, C., Méar, L., Zhong, W., Digre, A., Katona, B., Sjöstedt, E., Butler, L., Odeberg, J., Dusart, P., et al. (2021). A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Sci. Adv.* *7*, eabh2169. 10.1126/sciadv.abh2169.
828. Sjöstedt, E., Zhong, W., Fagerberg, L., Karlsson, M., Mitsios, N., Adori, C., Oksvold, P., Edfors, F., Limiszewska, A., Hikmet, F., et al. (2020). An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain. *Science* *367*. 10.1126/science.aay5947.
829. Lonsdale, J., Thomas, J., Salvatore, M., Phillips, R., Lo, E., Shad, S., Hasz, R., Walters, G., Garcia, F., Young, N., et al. (2013). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat. Genet.* *45*, 580–585. 10.1038/ng.2653.
830. Labelle, Y., Zucman, J., Stenman, G., Kindblom, L.-G., Knight, J., Turc-Carel, C., Dockhorn-Dworniczak, B., Mandahl, N., Desmaze, C., Peter, M., et al. (1995). Oncogenic conversion of a novel orphan nuclear receptor by chromosome translocation. *Hum. Mol. Genet.* *4*, 2219–2226. 10.1093/hmg/4.12.2219.
831. Labelle, Y., Bussièrès, J., Courjal, F., and Goldring, M.B. (1999). The EWS/TEC fusion protein encoded by the t(9;22) chromosomal translocation in human chondrosarcomas is a highly potent transcriptional activator. *Oncogene* *18*, 3303–3308. 10.1038/sj.onc.1202675.
832. Ohkura, N., Yaguchi, H., Tsukada, T., and Yamaguchi, K. (2002). The EWS/NOR1 Fusion Gene Product Gains a Novel Activity Affecting Pre-mRNA Splicing*. *J. Biol. Chem.* *277*, 535–543. 10.1074/jbc.m109018200.
833. Panagopoulos, I., Mencinger, M., Dietrich, C.U., Bjerkehagen, B., Saeter, G., Mertens, F., Mandahl, N., and Heim, S. (1999). Fusion of the RBP56 and CHN genes in extraskeletal myxoid chondrosarcomas with translocation t(9;17)(q22;q11). *Oncogene* *18*, 7594–7598. 10.1038/sj.onc.1203155.
834. Sjögren, H., Wedell, B., Meis-Kindblom, J.M., Kindblom, L.G., Stenman, G., and Kindblom, J.M. (2000). Fusion of the NH2-terminal domain of the basic helix-loop-helix protein TCF12 to

TEC in extraskeletal myxoid chondrosarcoma with translocation t(9;15)(q22;q21). *Cancer Res.* *60*, 6832–6835.

835. Haller, F., Bieg, M., Will, R., Körner, C., Weichenhan, D., Bott, A., Ishaque, N., Lutsik, P., Moskalev, E.A., Mueller, S.K., et al. (2019). Enhancer hijacking activates oncogenic transcription factor NR4A3 in acinic cell carcinomas of the salivary glands. *Nat. Commun.* *10*, 368. 10.1038/s41467-018-08069-x.

836. Wang, H., Zhai, C., Zhang, C., Liu, Q., Zhang, H., Sun, X., Lin, L., Yu, H., and Wang, D. (2022). Analysis of clinicopathologic features and expression of NR4A3 in sinonasal acinic cell carcinoma. *Mod. Pathol.* *35*, 594–600. 10.1038/s41379-021-00959-8.

837. Richardson, E.T., Selenica, P., Pareja, F., Cin, P.D., Hanlon, E., Weigelt, B., Reis-Filho, J.S., Hornick, J.L., Jo, V.Y., and Schnitt, S.J. (2023). NR4A3 Expression Is Consistently Absent in Acinic Cell Carcinomas of the Breast: A Potential Nosologic Shift. *Mod. Pathol.* *36*, 100144. 10.1016/j.modpat.2023.100144.

838. Ramirez-Herrick, A.M., Mullican, S.E., Sheehan, A.M., and Conneely, O.M. (2011). Reduced NR4A gene dosage leads to mixed myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms in mice. *Blood* *117*, 2681–2690. 10.1182/blood-2010-02-267906.

839. Lin, S.-C., Yao, C.-Y., Hsu, C.-A., Lin, C.-T., Calkins, M.J., Kuo, Y.-Y., Tang, J.-L., Tien, H.-F., and Wu, S.-J. (2022). Functional association of NR4A3 downregulation with impaired differentiation in myeloid leukemogenesis. *Ann. Hematol.* *101*, 2209–2218. 10.1007/s00277-022-04961-1.

840. Tirosh, I., Izar, B., Prakadan, S.M., II, M.H.W., Treacy, D., Trombetta, J.J., Rotem, A., Rodman, C., Lian, C., Murphy, G., et al. (2016). Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* *352*, 189–196. 10.1126/science.aad0501.

841. Lu, J., Meng, M., Zhou, X., Ding, S., Feng, K., Zeng, Z., Huang, T., and Cai, Y.-D. (2022). Identification of COVID-19 severity biomarkers based on feature selection on single-cell RNA-Seq data of CD8+ T cells. *Front. Genet.* *13*, 1053772. 10.3389/fgene.2022.1053772.

842. Ichii, H., Sakamoto, A., Hatano, M., Okada, S., Toyama, H., Taki, S., Arima, M., Kuroda, Y., and Tokuhisa, T. (2002). Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* *3*, 558–563. 10.1038/ni802.

843. Delpoux, A., Lai, C.-Y., Hedrick, S.M., and Doedens, A.L. (2017). FOXO1 opposition of CD8 +T cell effector programming confers early memory properties and phenotypic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *114*, E8865–E8874. 10.1073/pnas.1618916114.

844. Michelini, R.H., Doedens, A.L., Goldrath, A.W., and Hedrick, S.M. (2013). Differentiation of CD8 memory T cells depends on Foxo1. *J Exp Med* *210*, 1189–1200. 10.1084/jem.20130392.

845. McLane, L.M., Abdel-Hakeem, M.S., and Wherry, E.J. (2015). CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu Rev Immunol* 37, 1–39. 10.1146/annurev-immunol-041015-055318.
846. Collier, J.L., Weiss, S.A., Pauken, K.E., Sen, D.R., and Sharpe, A.H. (2021). Not-so-opposite ends of the spectrum: CD8⁺ T cell dysfunction across chronic infection, cancer and autoimmunity. *Nat Immunol* 22, 809–819. 10.1038/s41590-021-00949-7.
847. Kurakula, K., Koenis, D.S., Tiel, C.M. van, and Vries, C.J.M. de (2014). NR4A nuclear receptors are orphans but not lonesome. *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Mol Cell Res* 1843, 2543–2555. 10.1016/j.bbamcr.2014.06.010.
848. Pearen, M.A., and Muscat, G.E.O. (2010). Minireview: Nuclear hormone receptor 4A signaling: implications for metabolic disease. *Mol. Endocrinol.* 24, 1891–1903. 10.1210/me.2010-0015.
849. Boulet, S., Daudelin, J.-F., Odagiu, L., Pelletier, A.-N., Yun, T.J., Lesage, S., Cheong, C., and Labrecque, N. (2019). The orphan nuclear receptor NR4A3 controls the differentiation of monocyte-derived dendritic cells following microbial stimulation. *Proc National Acad Sci* 116, 15150–15159. 10.1073/pnas.1821296116.
850. Blank, C.U., Haining, W.N., Held, W., Hogan, P.G., Kallies, A., Lugli, E., Lynn, R.C., Philip, M., Rao, A., Restifo, N.P., et al. (2019). Defining ‘T cell exhaustion.’ *Nat Rev Immunol* 19, 665–674. 10.1038/s41577-019-0221-9.
851. Zebley, C.C., Abdelsamed, H.A., Ghoneim, H.E., Alli, S., Brown, C., Haydar, D., Mi, T., Harris, T., McGargill, M.A., Krenciute, G., et al. (2021). Proinflammatory cytokines promote TET2-mediated DNA demethylation during CD8 T cell effector differentiation. *Cell Reports* 37, 109796. 10.1016/j.celrep.2021.109796.
852. Feng, D., Chen, Y., Dai, R., Bian, S., Xue, W., Zhu, Y., Li, Z., Yang, Y., Zhang, Y., Zhang, J., et al. (2022). Chromatin organizer SATB1 controls the cell identity of CD4⁺ CD8⁺ double-positive thymocytes by regulating the activity of super-enhancers. *Nat Commun* 13, 5554. 10.1038/s41467-022-33333-6.
853. Nüssing, S., Miosge, L.A., Lee, K., Olshansky, M., Barugahare, A., Roots, C.M., Sontani, Y., Day, E.B., Koutsakos, M., Kedzierska, K., et al. (2022). SATB1 ensures appropriate transcriptional programs within naïve CD8⁺ T cells. *Immunol Cell Biol* 100, 636–652. 10.1111/imcb.12566.
854. Milner, J.J., Toma, C., He, Z., Kurd, N.S., Nguyen, Q.P., McDonald, B., Quezada, L., Widjaja, C.E., Witherden, D.A., Crowl, J.T., et al. (2020). Heterogenous Populations of Tissue-Resident CD8⁺ T Cells Are Generated in Response to Infection and Malignancy. *Immunity* 52, 808-824.e7. 10.1016/j.immuni.2020.04.007.

855. Li, X., Li, Y., Dong, L., Chang, Y., Zhang, X., Wang, C., Chen, M., Bo, X., Chen, H., Han, W., et al. (2023). Decitabine-priming increases anti-PD-1 antitumor efficacy by promoting CD8⁺ progenitor exhausted T-cell expansion in tumor models. *J Clin Invest*. 10.1172/jci165673.
856. Muthusamy, N., Barton, K., and Leiden, J.M. (1995). Defective activation and survival of T cells lacking the Ets-1 transcription factor. *Nature* 377, 639–642. 10.1038/377639a0.
857. Grenningloh, R., Tai, T.-S., Frahm, N., Hongo, T.C., Chicoine, A.T., Brander, C., Kaufmann, D.E., and Ho, I.-C. (2011). Ets-1 Maintains IL-7 Receptor Expression in Peripheral T Cells. *J Immunol* 186, 969–976. 10.4049/jimmunol.1002099.
858. Maira, M., Martens, C., Philips, A., and Drouin, J. (1999). Heterodimerization between Members of the Nur Subfamily of Orphan Nuclear Receptors as a Novel Mechanism for Gene Activation. *Mol Cell Biol* 19, 7549–7557. 10.1128/mcb.19.11.7549.
859. Pollizzi, K.N., and Powell, J.D. (2014). Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses. *Nat Rev Immunol* 14, 435–446. 10.1038/nri3701.
860. Boudreaux, S.P., Ramirez-Herrick, A.M., Duren, R.P., and Conneely, O.M. (2012). Genome-wide profiling reveals transcriptional repression of MYC as a core component of NR4A tumor suppression in acute myeloid leukemia. *Oncogenesis* 1, e19–e19. 10.1038/oncsis.2012.19.
861. Allard, E., Hardy, M., Leignadier, J., Marquis, M., Rooney, J., Lehoux, D., and Labrecque, N. (2007). Overexpression of IL-21 promotes massive CD8⁺ memory T cell accumulation. *Eur. J. Immunol.* 37, 3069–3077. 10.1002/eji.200637017.
862. Novy, P., Huang, X., Leonard, W.J., and Yang, Y. (2011). Intrinsic IL-21 Signaling Is Critical for CD8 T Cell Survival and Memory Formation in Response to Vaccinia Viral Infection. *J Immunol* 186, 2729–2738. 10.4049/jimmunol.1003009.
863. Renkema, K.R., Lee, J.-Y., Lee, Y.J., Hamilton, S.E., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2016). IL-4 sensitivity shapes the peripheral CD8⁺ T cell pool and response to infection. *J Exp Med* 213, 1319–1329. 10.1084/jem.20151359.
864. Jakic, B., Olson, W.J., Siegmund, K., Klepsch, V., Kimpel, J., Labi, V., Zehn, D., Baier, G., and Hermann-Kleiter, N. (2021). Loss of the orphan nuclear receptor NR2F6 enhances CD8⁺ T-cell memory via IFN- γ . *Cell Death Dis* 12, 187. 10.1038/s41419-021-03470-9.
865. Riese, M.J., Grewal, J., Das, J., Zou, T., Patil, V., Chakraborty, A.K., and Koretzky, G.A. (2011). Decreased Diacylglycerol Metabolism Enhances ERK Activation and Augments CD8⁺ T Cell Functional Responses*. *J Biol Chem* 286, 5254–5265. 10.1074/jbc.m110.171884.
866. Gu, J., Wang, C., Cao, C., Huang, J., Holzhauer, S., Desilva, H., Wesley, E.M., Evans, D.B., Benci, J., Wichroski, M., et al. (2021). DGK ζ exerts greater control than DGK α over CD8⁺ T cell activity and tumor inhibition. *Oncoimmunology* 10, 1941566. 10.1080/2162402x.2021.1941566.

867. Mohammed, J., Beura, L.K., Bobr, A., Astry, B., Chicoine, B., Kashem, S.W., Welty, N.E., Igyártó, B.Z., Wijeyesinghe, S., Thompson, E.A., et al. (2016). Stromal cells control the epithelial residence of DCs and memory T cells by regulated activation of TGF- β . *Nat Immunol* *17*, 414–421. 10.1038/ni.3396.
868. Schenkel, J.M., Fraser, K.A., Casey, K.A., Beura, L.K., Pauken, K.E., Vezys, V., and Masopust, D. (2016). IL-15–Independent Maintenance of Tissue-Resident and Boosted Effector Memory CD8 T Cells. *J Immunol* *196*, 3920–3926. 10.4049/jimmunol.1502337.
869. Pan, Y., Tian, T., Park, C.O., Lofftus, S.Y., Mei, S., Liu, X., Luo, C., O’Malley, J.T., Gehad, A., Teague, J.E., et al. (2017). Survival of tissue-resident memory T cells requires exogenous lipid uptake and metabolism. *Nature* *543*, 252–256. 10.1038/nature21379.
870. Martin, M.D., and Badovinac, V.P. (2015). Antigen-dependent and –independent contributions to primary memory CD8 T cell activation and protection following infection. *Sci Rep-uk* *5*, 18022. 10.1038/srep18022.
871. Martin, M.D., Shan, Q., Xue, H.-H., and Badovinac, V.P. (2017). Time and Antigen-Stimulation History Influence Memory CD8 T Cell Bystander Responses. *Front Immunol* *8*, 634. 10.3389/fimmu.2017.00634.
872. Soerens, A.G., Künzli, M., Quarnstrom, C.F., Scott, M.C., Swanson, L., Locquiao, J.J., Ghoneim, H.E., Zehn, D., Youngblood, B., Vezys, V., et al. (2023). Functional T cells are capable of supernumerary cell division and longevity. *Nature* *614*, 762–766. 10.1038/s41586-022-05626-9.
873. Maekawa, Y., Minato, Y., Ishifune, C., Kurihara, T., Kitamura, A., Kojima, H., Yagita, H., Sakata-Yanagimoto, M., Saito, T., Taniuchi, I., et al. (2008). Notch2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity. *Nat Immunol* *9*, 1140–1147. 10.1038/ni.1649.
874. Pircher, H., Bürki, K., Lang, R., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (1989). Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* *342*, 559–561. 10.1038/342559a0.
875. Kisielow, P., Blüthmann, H., Staerz, U.D., Steinmetz, M., and Boehmer, H. von (1988). Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* *333*, 742–746. 10.1038/333742a0.
876. Fulton, R.B., Hamilton, S.E., Xing, Y., Best, J.A., Goldrath, A.W., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2014). The TCR’s sensitivity to self peptide–MHC dictates the ability of naive CD8+ T cells to respond to foreign antigens. *Nat Immunol* *16*, 107–117. 10.1038/ni.3043.
877. Anderson, K.G., Mayer-Barber, K., Sung, H., Beura, L., James, B.R., Taylor, J.J., Qunaj, L., Griffith, T.S., Vezys, V., Barber, D.L., et al. (2014). Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes. *Nat Protoc* *9*, 209–222. 10.1038/nprot.2014.005.

878. Reynders, N., Abboud, D., Baragli, A., Noman, M.Z., Rogister, B., Niclou, S.P., Heveker, N., Janji, B., Hanson, J., Szpakowska, M., et al. (2019). The Distinct Roles of CXCR3 Variants and Their Ligands in the Tumor Microenvironment. *Cells* 8, 613. 10.3390/cells8060613.
879. Chheda, Z.S., Sharma, R.K., Jala, V.R., Luster, A.D., and Haribabu, B. (2016). Chemoattractant Receptors BLT1 and CXCR3 Regulate Antitumor Immunity by Facilitating CD8+ T Cell Migration into Tumors. *J Immunol* 197, 2016–2026. 10.4049/jimmunol.1502376.
880. Chiba, K. (2005). FTY720, a new class of immunomodulator, inhibits lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus by agonistic activity at sphingosine 1-phosphate receptors. *Pharmacol Therapeut* 108, 308–319. 10.1016/j.pharmthera.2005.05.002.
881. Morris, M.A., Gibb, D.R., Picard, F., Brinkmann, V., Straume, M., and Ley, K. (2005). Transient T cell accumulation in lymph nodes and sustained lymphopenia in mice treated with FTY720. *Eur. J. Immunol.* 35, 3570–3580. 10.1002/eji.200526218.
882. Park, S.-J., and Im, D.-S. (2017). Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulators and Drug Discovery. *Biomol. Ther.* 25, 80–90. 10.4062/biomolther.2016.160.
883. Bravo, G.Á., Cedeño, R.R., Casadevall, M.P., and Ramió-Torrentà, L. (2022). Sphingosine-1-Phosphate (S1P) and S1P Signaling Pathway Modulators, from Current Insights to Future Perspectives. *Cells* 11, 2058. 10.3390/cells11132058.
884. Lee, J., Ahn, E., Kissick, H.T., and Ahmed, R. (2016). Reinvigorating Exhausted T Cells by Blockade of the PD-1 Pathway. *Forum Immunopathol Dis Ther* 6, 7–17. 10.1615/forumimmunodisther.2015014188.
885. Jubel, J.M., Barbati, Z.R., Burger, C., Wirtz, D.C., and Schildberg, F.A. (2020). The Role of PD-1 in Acute and Chronic Infection. *Front Immunol* 11, 487. 10.3389/fimmu.2020.00487.
886. Gueguen, P., Metoikidou, C., Dupic, T., Lawand, M., Goudot, C., Baulande, S., Lameiras, S., Lantz, O., Girard, N., Seguin-Givelet, A., et al. (2021). Contribution of resident and circulating precursors to tumor-infiltrating CD8+ T cell populations in lung cancer. *Sci Immunol* 6, eabd5778. 10.1126/sciimmunol.abd5778.
887. Abdulrahman, Z., Santegoets, S.J., Sturm, G., Charoentong, P., Ijsselsteijn, M.E., Somarakis, A., Höllt, T., Finotello, F., Trajanoski, Z., Egmond, S.L. van, et al. (2022). Tumor-specific T cells support chemokine-driven spatial organization of intratumoral immune microaggregates needed for long survival. *J Immunother Cancer* 10, e004346. 10.1136/jitc-2021-004346.
888. Pilato, M.D., Kfuri-Rubens, R., Pruessmann, J.N., Ozga, A.J., Messemaker, M., Cadilha, B.L., Sivakumar, R., Cianciaruso, C., Warner, R.D., Marangoni, F., et al. (2021). CXCR6 positions cytotoxic T cells to receive critical survival signals in the tumor microenvironment. *Cell* 184, 4512–4530.e22. 10.1016/j.cell.2021.07.015.

889. Nagasaki, J., Inozume, T., Sax, N., Ariyasu, R., Ishikawa, M., Yamashita, K., Kawazu, M., Ueno, T., Irie, T., Tanji, E., et al. (2022). PD-1 blockade therapy promotes infiltration of tumor-attacking exhausted T cell clonotypes. *Cell Reports* 38, 110331. 10.1016/j.celrep.2022.110331.
890. Han, J., Yu, R., Duan, J., Li, J., Zhao, W., Feng, G., Bai, H., Wang, Y., Zhang, X., Wan, R., et al. (2021). Weighting tumor-specific TCR repertoires as a classifier to stratify the immunotherapy delivery in non-small cell lung cancers. *Sci Adv* 7, eabd6971. 10.1126/sciadv.abd6971.
891. Chen, I.X., Newcomer, K., Pauken, K.E., Juneja, V.R., Naxerova, K., Wu, M.W., Pinter, M., Sen, D.R., Singer, M., Sharpe, A.H., et al. (2020). A bilateral tumor model identifies transcriptional programs associated with patient response to immune checkpoint blockade. *Proc National Acad Sci* 117, 23684–23694. 10.1073/pnas.2002806117.
892. Salmon, A.J., Shavkunov, A.S., Miao, Q., Jarjour, N.N., Keshari, S., Esaulova, E., Williams, C.D., Ward, J.P., Highsmith, A.M., Pineda, J.E., et al. (2022). BHLHE40 Regulates the T-Cell Effector Function Required for Tumor Microenvironment Remodeling and Immune Checkpoint Therapy Efficacy Effective Immune Checkpoint Therapy Requires BHLHE40. *Cancer Immunol Res* 10, 597–611. 10.1158/2326-6066.cir-21-0129.
893. Enamorado, M., Iborra, S., Priego, E., Cueto, F.J., Quintana, J.A., Martínez-Cano, S., Mejías-Pérez, E., Esteban, M., Melero, I., Hidalgo, A., et al. (2017). Enhanced anti-tumour immunity requires the interplay between resident and circulating memory CD8⁺ T cells. *Nat Commun* 8, 16073. 10.1038/ncomms16073.
894. Malik, B.T., Byrne, K.T., Vella, J.L., Zhang, P., Shabaneh, T.B., Steinberg, S.M., Molodtsov, A.K., Bowers, J.S., Angeles, C.V., Paulos, C.M., et al. (2017). Resident memory T cells in the skin mediate durable immunity to melanoma. *Sci Immunol* 2, eaam6346. 10.1126/sciimmunol.aam6346.
895. Shakiba, M., Zumbo, P., Espinosa-Carrasco, G., Menocal, L., DüNDAR, F., Carson, S.E., Bruno, E.M., Sanchez-Rivera, F.J., Lowe, S.W., Camara, S., et al. (2021). TCR signal strength defines distinct mechanisms of T cell dysfunction and cancer evasion. *J Exp Med* 219, e20201966. 10.1084/jem.20201966.
896. Lepone, L.M., Donahue, R.N., Grenga, I., Metenou, S., Richards, J., Heery, C.R., Madan, R.A., Gulley, J.L., and Schlom, J. (2016). Analyses of 123 Peripheral Human Immune Cell Subsets: Defining Differences with Age and between Healthy Donors and Cancer Patients Not Detected in Analysis of Standard Immune Cell Types. *J Circulating Biomarkers* 5, 5. 10.5772/62322.
897. Karki, R., Sharma, B.R., Tuladhar, S., Williams, E.P., Zalduondo, L., Samir, P., Zheng, M., Sundaram, B., Banth, B., Malireddi, R.K.S., et al. (2021). Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. *Cell* 184, 149-168.e17. 10.1016/j.cell.2020.11.025.

Annexes

Annexe 1 : Role of the Orphan Nuclear Receptor NR4A Family in T-Cell Biology

Odagiu, L., May, J., Boulet, S., Baldwin, T.A., et Labrecque, N.

Publié dans *Front Endocrinol* en 2021 (*11*, 624122)

DOI : [10.3389/fendo.2020.624122](https://doi.org/10.3389/fendo.2020.624122)

Annexe 2 : Expression précoce de CD71 et de CD98 par les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} lors d'une infection Lm-OVA

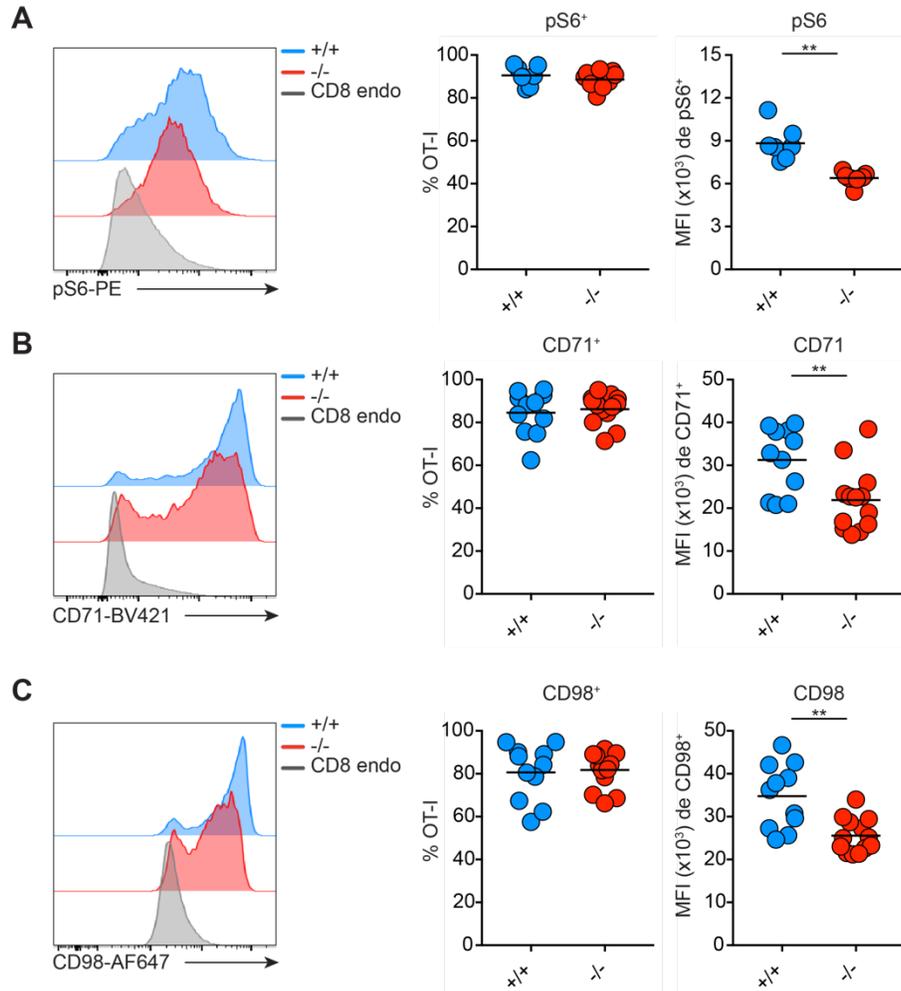


Figure annexe 2. Les LT CD8 *Nr4a3*^{-/-} expriment un moindre niveau de récepteurs de nutriments CD71 et CD98 tôt lors d'une infection Lm-OVA. 2*10⁶ LT CD8 OT-I (CD45.2⁺) *Nr4a3*^{-/-} et *Nr4a3*^{+/+} ont été transférées dans des souris sauvages B6.SJL (CD45.1⁺) qui ont été ensuite infectées avec 2000 CFU de Lm-OVA. À jour 3 post infection, le pourcentage de LT CD8 OT-I *Nr4a3*^{-/-} et *Nr4a3*^{+/+} positifs pour l'expression de pS6 (A), de CD71 (B) et de CD98 (C) ainsi que le niveau d'expression de ces molécules ont été quantifiés par cytométrie en flux. Les données présentées ont été obtenues suite à deux (A) ou trois (B-C) expériences indépendantes. Les comparaisons statistiques ont été effectuées par un t-test : ***P*<0.01.

Annexe 3 : Les lymphocytes T infiltrant les tumeurs $Nr4a3^{+/+}$ et $Nr4a3^{-/-}$ produisent le même niveau d'IFN- γ , d'IL-2 et de TNF- α

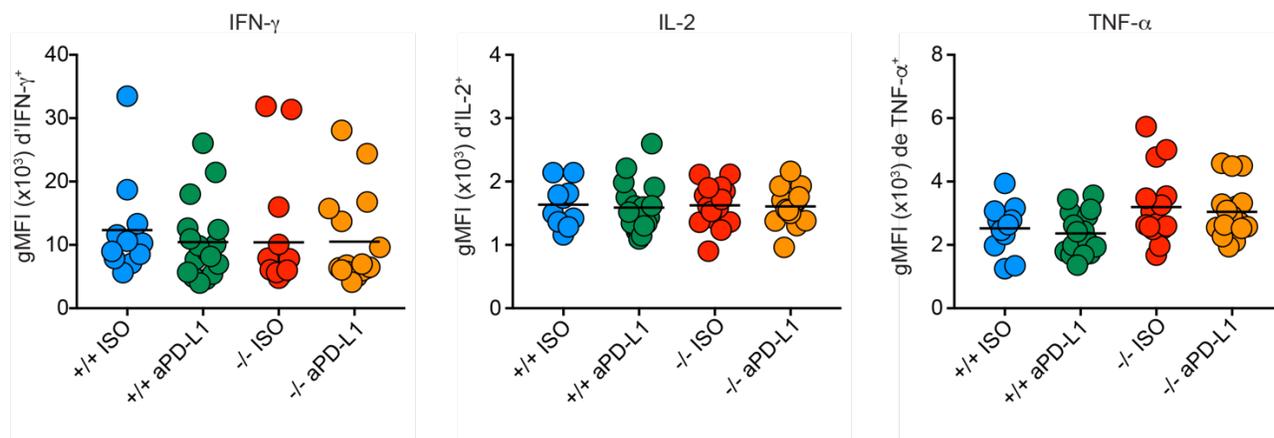


Figure annexe 3. Les TIL $Nr4a3^{+/+}$ et $Nr4a3^{-/-}$ producteurs d'IFN- γ , d'IL-2 ou de TNF- α ont le même niveau de production de ces cytokines suite à une re-stimulation *in vitro*. Les souris B6.SJL ont été implantées par voie sous-cutanée avec 5×10^5 cellules B16-OVA. À jour 12 post implantation tumorale, ces souris porteuses de tumeurs ont été traitées avec des LTE générés *in vitro*, et un co-traitement d'anti-PD-L1 a été administré à jour 15 et 18. À jour 21, les TIL ont été extraits et restimulés 5h *in vitro* avec de la PMA/ionomycine en présence de bréfeldine A. La production de cytokines a été quantifiée par cytométrie en flux suite à un marquage intracellulaire. Une analyse statistique ANOVA Kruskal-Wallis avec les comparaisons multiples de Dunn a été effectuée pour l'intensité de l'expression de chaque cytokine.

Annexe 4 : Les lymphocytes T infiltrant les tumeurs $Nr4a3^{+/+}$ et $Nr4a3^{-/-}$ expriment des niveaux similaires de PD-L1

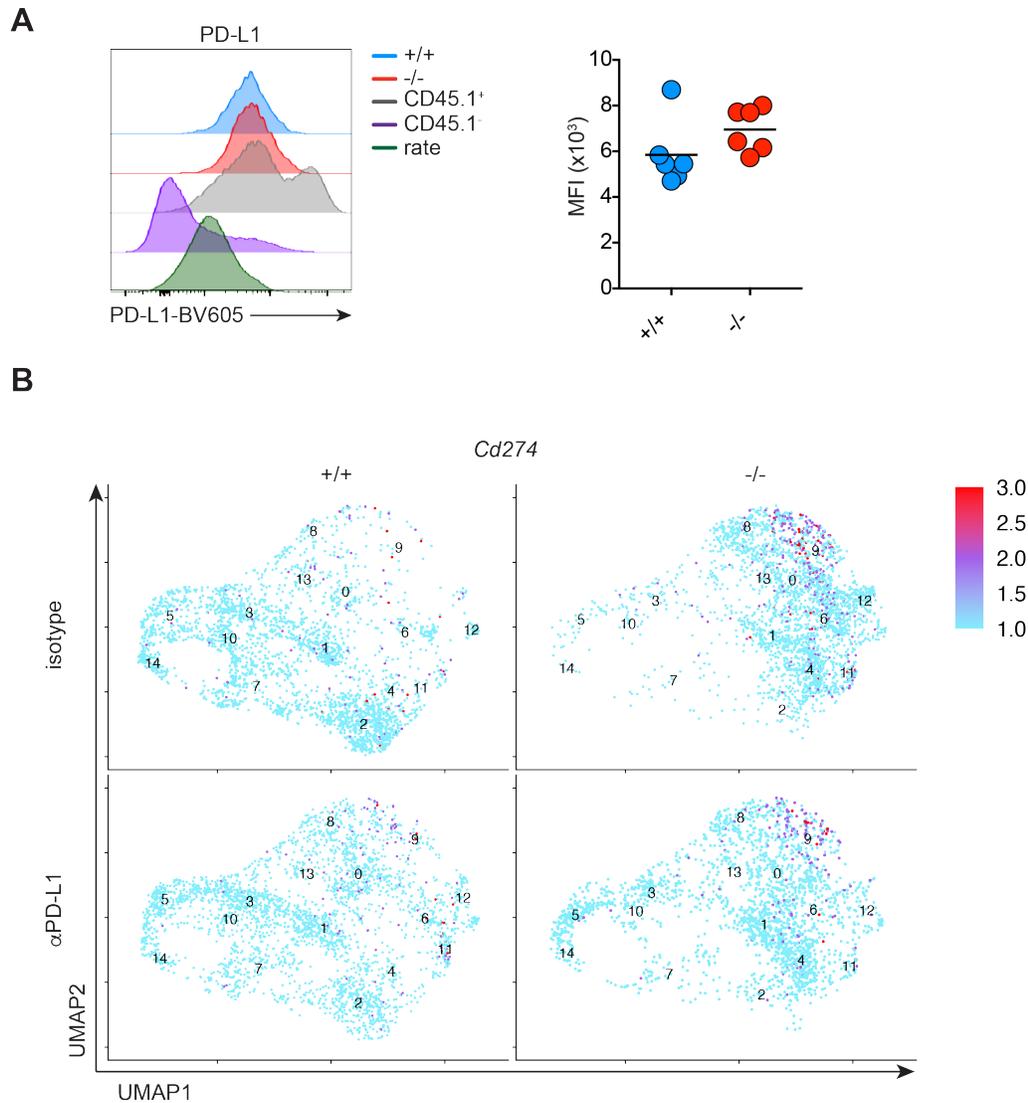


Figure annexe 4. Les TIL $Nr4a3^{+/+}$ et $Nr4a3^{-/-}$ expriment le même niveau de PD-L1. Les souris B6.SJL ont été implantées par voie sous-cutanée avec 5×10^5 cellules B16-OVA. À jour 12 post-implantation tumorale, ces souris porteuses de tumeurs ont été traitées avec des LTE $Nr4a3^{+/+}$ et $Nr4a3^{-/-}$ générés *in vitro* (A) et un co-traitement d'anti-PD-L1 a été administré à jour 15 et 18 (B). Le niveau d'expression de PD-L1 (clone MIH6) a été quantifié à jour 20 et 21 par cytométrie en flux (A) ainsi qu'à jour 21 par un séquençage de cellules uniques (B). En A, la condition CD45.1⁺ identifie les cellules immunitaires endogènes infiltrant la tumeur, alors que les CD45.1⁻ sont les autres cellules de la tumeur parmi lesquelles il y a les cellules tumorales.