



HAL
open science

Caractérisation des lymphocytes T CD8+ générés en conditions inflammatoires stériles

Florentin Martial Mbitikon-Kobo

► **To cite this version:**

Florentin Martial Mbitikon-Kobo. Caractérisation des lymphocytes T CD8+ générés en conditions inflammatoires stériles. Immunologie. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2009. Français. NNT: . tel-00389013

HAL Id: tel-00389013

<https://theses.hal.science/tel-00389013>

Submitted on 27 May 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N°d'ordre : 510

N° attribué par la bibliothèque : 07ENSL0 510

THÈSE

en vue d'obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Lyon – École Normale Supérieure de Lyon

spécialité : Sciences de la Vie

Laboratoire de l'INSERM U851 Apoptose et mémoire lymphocytaire

Ecole doctorale Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

présentée et soutenue publiquement le 25/03/09

par Monsieur Florentin Martial MBITIKON-KOBO

Titre :

Caractérisation des lymphocytes T CD8 mémoires générés en conditions inflammatoires stériles

Directeur(s) de thèse : Madame Jacqueline MARVEL

Co-directeur(s) de thèse :

Après avis de : Madame Annick GUIMEZANES, Membre/Rapporteur

Monsieur Emmanuel SCOTET, Membre/Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Madame Annick GUIMEZANES, Membre/Rapporteur

Monsieur Pierre JURDIC, Membre

Madame Jacqueline MARVEL, Membre

Monsieur Emmanuel SCOTET, Membre/Rapporteur

*The scientist is not a person who gives the right answers,
(s)he's one who asks the right questions.
Claude Lévi-Strauss*

À Véronique et à Ugo

À mes parents

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier Jacqueline MARVEL de m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour son soutien et son encadrement scientifique durant ces années de thèse.

Je tiens à remercier le Pr. Pierre JURDIC d'avoir accepté d'être président du jury de cette thèse. Mes remerciements s'adressent également au Dr. Annick GUIMEZANES et au Dr. Emmanuel SCOTET qui me font l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs.

Je remercie le gouvernement centrafricain et l'Association pour la Recherche sur le Cancer de m'avoir soutenu financièrement durant cette thèse.

Je remercie Christophe ARPIN pour son encadrement et ses précieux conseils scientifiques.

Un grand merci à Joël BAGUET de m'avoir initié à la biologie moléculaire, au Jazz (je connais maintenant tous les grands classiques jazzy de fréquence Jazz !) et surtout pour ces deux phrases que j'ai gravées dans la pierre :

- « Après un mercredi, il y a toujours un jeudi... »
- « En biologie moléculaire, quand ça ne marche pas, il faut tout jeter et tout recommencer ! »

Un très grand merci à Yann LEVERRIER qui, lors d'un déplacement à Paris en TGV, m'a gentiment prêté ses lunettes afin que je puisse voir, observer et analyser certaines questions existentielles de la vie de tous les jours et ce fut une expérience très enrichissante !

Je remercie du fond du cœur mes ami(e)s du club très fermé (The Coconut night club) pour leur soutien durant cette thèse. Tout d'abord à Charly « Robot » : « Mon ami, ta tâche sera rude, car il va falloir bien secouer le cocotier, mais j'ai confiance, tu rempliras ta mission... ». À Erwan alias « Gunter », j'ai envie de lui dire que le moment est venu de jouer à 100 % le rôle de Barry White, je sais que ce n'est pas facile de descendre dans les infrabass pour dire :

- « Eh baby ! You know... »
- « Vous pouvez quitter le ghetto, mais ce dernier ne vous quittera jamais... »

Quant aux miss de Brito et Raffaella, il n'y aura pas de changement pour leurs postes au sein du club, elles continueront à incarner les valeurs intrinsèques au club comme la joie, la générosité, l'entraide, la patience et surtout l'amitié.

Je voudrais surtout remercier Marie MICHALLET ou belle maman d'avoir guidé mes premiers pas en immunologie à l'université puis au sein de l'équipe. Compte tenu de ce double rôle, je pense que le moment est venu pour discuter et réévaluer ensemble la dote de ta fille...

Un énorme merci à Martine TOMKOWIAK pour sa disponibilité, sa rigueur, son sens de l'organisation et surtout ses précieux conseils techniques durant cette thèse.

Toute mon amitié à Emmanuelle DENIAUD « fille formidable » pour sa joie de vivre et pour sa grande capacité d'écoute.

Merci à Antoine « Tonio » MARÇAIS pour les nombreux discussions et échanges que nous avons eus sur l'épistémologie cartésienne, kantienne... Je me suis vraiment régalé en revisitant cette branche de la philosophie !

Merci à Sophia DJEBALI pour sa rigueur et d'avoir bien voulu reprendre le flambeau concernant les manips oreilles.

Je souhaite bonne chance et réussite à tous les nouveaux arrivants (Julien MEUNIER et Julien MAFILLE)

Merci à Virginie JUBIN pour son aide et ses critiques lors de mes répétitions orales pour ma soutenance

Je n'oublie pas bien sûr Roxane CHALARD et Molly BRUNNER pour leur gentillesse, leur sourire, leur énergie positive et leur vivacité d'esprit.

Toute ma gratitude et mon amitié à Blandine MERCIER et Anne COTTALORDA dont la participation a permis de caractériser la réponse des T_{IM} à l'IL-15 in vivo et in vitro.

Merci de tout cœur à mon ami Marc VOCANSON pour sa générosité et d'avoir bien voulu partager ses secrets sur le modèle DNFB avec le « petit scarabée ».

Je remercie particulièrement Anca HENNINO, pour les nombreuses discussions passionnées que nous ayons eues en géopolitique, Hélène PERRIN pour sa bonne humeur, son humour, Gaëlle POYET pour son efficacité, les dépannages de dernières minutes en anticorps, Karen, Béatrice pour leur sourire, leur humour, Amine ACHACHI incollable sur les chevaux de course et Josette BENETIÈRE, celle qui a su, dès mon arrivée au laboratoire, établir un langage privilégié avec mon estomac et surtout pour toute son aide dans l'utilisation des souris.

Un grand merci aux secrétaires (Véronique, Pascale, Céline et Alexandra) de l'équipe qui m'ont énormément aidé dans mes différentes démarches administratives.

Merci à Eddy KURPIK, grand supporter de l'OL et véritable antidote pour la mauvaise humeur.

Je remercie les personnels (Marie, Jean François et Jean Louis « Monsieur Inspirations ») du PBES qui m'ont énormément aidé dans la gestion de mes expériences in vivo.

Je remercie également Chantal BELLA du plateau technique : cytométrie en flux pour son professionnalisme, sa patience, son sourire même quand les tris des cellules se prolongeaient tard dans la soirée et de m'avoir appris de nombreuses astuces et méthodes en cytométrie.

Un grand merci à tous les membres de l'U851 que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant mes années de thèse à la tour CERVI.

Enfin, je remercie tous mes amis (Alassane OURO-MEDELI, Frederick LOGIN, Laetitia FURIO, Julien DIANA, Sara BREGA, Anzime ALI MOHAMED, Brice GOSNER et Godefroy DEVEVEY) hors laboratoire qui m'ont beaucoup soutenu durant cette thèse et qui ont su trouver les mots justes pendant les périodes difficiles pour me reconforter.

SOMMAIRE

Abréviations	3
Figures et tableaux	5
Résumé de la thèse	7
Introduction	9
Activation et différenciation de LT naïfs en cellules effectrices et mémoires	11
1. Phase d'activation des LT naïfs	12
1.1. Les interactions entre DC/LT et mise en place de la synapse immunologique	12
1.2. Les signaux d'activation des LT naïfs	15
1.2.1. <i>Signal 1 : interaction TCR/CMHp</i>	15
1.2.2. <i>Signal 2 : les molécules de costimulation</i>	15
1.2.3. <i>Signal 3 : les cytokines inflammatoires</i>	17
2. Expansion clonale et différenciation de LT naïfs en cellules effectrices	18
2.1. Expansion clonale des LT activés	18
2.2. Différenciation des LT activés en cellules effectrices	18
2.2.1. <i>Cytotoxicité</i>	19
2.2.2. <i>Sécrétion de cytokines et de chimiokines par les cellules effectrices</i>	20
3. La phase de contraction et génération des cellules mémoires	21
3.1. La phase de contraction	21
3.2. Génération des cellules mémoires	22
3.2.1. <i>Hétérogénéité de LT effecteurs et mémoires</i>	23
3.2.2. <i>Les différentes voies de différenciation des cellules naïves en cellules mémoires</i>	25
3.2.3. <i>Les différents modèles de différenciation et l'hétérogénéité des sous-populations des cellules mémoires</i>	27
3.2.4. <i>Les mécanismes responsables de l'hétérogénéité des cellules mémoires</i>	31
4. Caractéristiques des cellules mémoires	33
4.1. Les fonctions effectrices	33
4.1.1. <i>La cytotoxicité</i>	33
4.1.2. <i>Production des cytokines</i>	34
4.1.3. <i>Proliférations</i>	35
4.2. Maintien des cellules mémoires	35
4.2.1. <i>Rôle du contact TCR/CMH dans la survie des cellules mémoires</i>	35
4.2.2. <i>Rôles des cytokines</i>	36
Inflammation stérile et réponse des LT CD8+	39
1. Les haptènes et leurs caractéristiques chimiques	39
2. Physiopathologie de l'HSRC	40
3. Les composants cellulaires de la DAC	41
3.1. Les cellules de Langerhans (CLs)	41
3.1.1. <i>Internalisation des allergènes</i>	41
3.1.2. <i>Maturation</i>	42
3.1.3. <i>Migration des CLs vers les ganglions lymphatiques</i>	47
3.2. Les kératynocytes (KCs)	48

4. Les populations lymphocytaires impliquées dans la DAC.....	50
4.1. Les lymphocytes T (LT).....	50
4.2. Les lymphocytes B (LB).....	52
4.3. Les cellules NKT.....	53
4.4. Les LT régulateurs (Tregs).....	55
4.5. Les cellules NK.....	56
Conclusion de la partie bibliographique.....	57
Résultats.....	58
1. Les différents systèmes expérimentaux utilisés : avantages et contraintes.....	58
1.1. La lignée des souris F5 transgéniques : outil de génération des cellules mémoires.....	58
1.2. Modèle d'étude de l'HSRC.....	60
2. Objectifs du travail expérimental.....	61
3. Caractérisation des LT CD8+ (CD44/122 ^{int}) générés en conditions inflammatoires stériles (F.M. Mbitikon-Kobo et al).....	61
4. Résultats complémentaires : caractéristiques de LT CD8+ mémoires (CD44/122 ^{int}) générées de façon spontanée dans des souris nontransgéniques.....	64
Discussion.....	68
1. Les T _{IM} sont impliqués dans la physiopathologie de l'HSRC.....	68
2. Les différentes sous-populations de cellules mémoires et T _{IM}	70
3. Conditions de génération des T _{IM}	71
4. Maintien des T _{IM}	72
5. Hétérogénéité des T _{IM}	73
Annexe.....	74
Références bibliographiques.....	75

ABREVIATIONS

- AICD:** *Activation-Induced Cell Death*
- Ag:** *Antigènes*
- Bcl-2:** *B-cell-lymphoma-2-family*
- BCR:** *B Cell Receptor*
- BIM:** *Bcl-2-Interacting Mediator of cell death*
- Blimp-1:** *B lymphocyte-induced maturation protein 1*
- BrdU:** *BromodésoxyUridine*
- CARD:** *Caspase recruitment Domain*
- CFSE:** *Carboxy Fluoresceine Succinimidil Esther*
- CLA:** *Cutaneous Lymphocyte-Associated*
- CLs:** *Cellules de Langerhans*
- CMH:** *Complexe Majeur d'Histocompatibilité*
- CTL:** *Cytotoxic T lymphocytes*
- DAC:** *Dermatite Allergique de Contact*
- DAMPs:** *Damage Associated Molecular Patterns*
- DC:** *Dendritic Cell*
- DISC:** *Death Inducting Signaling Complex*
- Eomes:** *Eomesodermin*
- Foxp3:** *Forkhead box P3*
- Gzm:** *Granzyme*
- HSV:** *Herpes Simplex Virus*
- ID2:** *Inhibitor of differentiation 2*
- IFN:** *Interféron*
- IL:** *Interleukine*
- iNKT :** *invariant NKT*
- KCs:** *Kératynocytes*
- KLRG1:** *Killer-cell Lectin-like Receptor subfamily G, member 1*
- LCMV:** *Lymphocytic ChorioMeningitis Virus*
- LB:** *Lymphocyte B*
- LPS:** *Lipopolysaccharide*

LT: *Lymphocyte T*

MDA5: *Melanoma differentiation associated gene 5*

MP: *Memory-Phenotype T cells*

MPEC: *Memory Precursor Effector Cells*

NKT: *Natural Killer T*

NLRs: *Nod-like Receptors*

Nrp-1: *Neuropiline-1*

NOD 2: *Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing 2*

PAMPs: *Pathogen Associated Molecular Pattern*

PD-1: *Programmed Death-1*

PFN: *Perforine*

PLAP: *Placenta Alkaline Phosphatase*

PRRs: *Pattern Recognition Receptors*

Rag 2: *Recombination Activating Gene 2*

RANKL: *Receptor Activator of Nuclear factor κ B ligand*

RANTES: *Regulated upon Activation Normal T cells Expressed and Secreted*

RIG-I: *Retinoic acid-Inductible Gene-I*

RLRs: *RIG-I-like Receptors*

SLEC: *Short-Lived Effector Cells*

T_{CM}: *Central Memory T cell*

TCR: *T Cell Receptor*

T_{EM}: *Effector Memory T cell*

TNF: *Tumor-Necrosis Factor*

TRAIL: *Tumor-Necrosis Factor (TNF)-Related Apoptosis-inducing Ligand*

FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Cinétique de la réponse de LT CD8+ induite suite à une infection aiguë chez la souris

Figure 2. Représentation schématique des interactions entre les DCs et les LT

Figure 3. Organisation de la synapse immune entre les LT et les DCs

Figure 4. Modèles de différenciation des LT CD8+ mémoires (relation $LT_{EFF}/CD8$ mémoires)

Figure 5. Modèles de différenciation des LT D8+ mémoires (relation de lignage des populations T_{EM} et T_{CM})

Figure 6. Physiopathologie de la dermatite allergique de contact (DAC)

Figure 7. Caractéristiques des DCs immatures et matures

Figure 8. Exemples de récepteurs impliqués dans la reconnaissance des PAMPs et des alarmines

Figure 9. Modèle standard d'étude d'eczéma de contact

Figure 10. Caractérisation phénotypique des T_{IM} générées dans des souris nontransgéniques

Figure 11. Mesure de la prolifération homéostatique et de la survie des T_{IM}

Figure 12. Mesure de la prolifération des T_{IM} en réponse à l'IL-15 *in vivo*.

Figure 13. Persistance des T_{IM} au cours du temps dans les souris C57BL/10.

Tableau 1. Les molécules de costimulation et leurs ligands

Tableau 2. Exemples des marqueurs de surface des LT CD8+ naïfs, effecteurs (LT_{EFF}) et mémoires (T_{EM} et T_{CM})

Tableau 3. Les principales caractéristiques de deux sous-populations mémoires (T_{EM} et T_{CM})

Tableau 4. Phénotype des LT mémoires selon le type d'infection virale

Tableau 5. Exemples des signaux de danger et leurs récepteurs

Tableau 6. Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des populations de LT CD8+ naïfs et mémoires présents dans les souris F5.

Résumé de la thèse

RESUME DE LA THESE

Le système immunitaire adaptatif possède la capacité de stocker des informations relatives à une première stimulation antigénique et de mettre en place une réponse immunitaire plus efficace, plus intense et plus rapide lors d'une seconde rencontre avec le même antigène. Cette propriété du système immunitaire, généralement définie comme la mémoire immunologique, constitue le principe même de la vaccination. L'efficacité de la réponse mémoire ou secondaire, s'explique par l'augmentation du nombre des cellules spécifiques de l'antigène et l'acquisition de fonctions effectrices améliorées par les cellules mémoires. Ces différentes transformations touchent les lymphocytes T (CD4 et CD8) et B qui constituent la base cellulaire de la mémoire immunologique. En ce qui concerne les lymphocytes T mémoires, ils acquièrent la capacité de produire rapidement des cytokines et de proliférer suite à une stimulation antigénique. Bien que l'ensemble de ces paramètres, responsables de l'efficacité de la réponse secondaire soit maintenant défini, les mécanismes moléculaires indispensables à la génération des cellules mémoires sont encore mal connus.

L'objectif de mon travail de thèse fut de caractériser les lymphocytes T CD8+ mémoires générés en conditions inflammatoires stériles, c'est-à-dire en absence d'agents pathogènes ou des signaux pouvant être délivrés par ces derniers. Nous avons appelé T_{IM} (*Inflammatory Memory CD8 T cells*), les cellules mémoires générées dans ce contexte. Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé la souris transgénique F5 et le modèle expérimental chez la souris de l'hypersensibilité retardée de contact (HSRC) aux haptènes pour générer des T_{IM} . Dans une première partie, nous avons procédé à l'identification phénotypique des T_{IM} à l'aide des marqueurs de surface comme CD44 et CD122 ; les T_{IM} expriment des niveaux intermédiaires pour ces marqueurs. En effet, bien que le niveau d'expression de ces marqueurs soit supérieur à celui des lymphocytes T naïfs, il est toujours moindre par rapport à celui des cellules mémoires (CD44/122^{high}) générées suite à une infection virale. Nous avons montré par la suite que les T_{IM} possèdent aussi des propriétés fonctionnelles améliorées mais réduites en comparaison aux cellules mémoires CD44/122^{high}. Parallèlement, nous avons pu identifier des LT CD8+ mémoires similaires aux T_{IM} en termes de phénotype et de fonction dans des souris non transgéniques. Ces cellules mémoires sont donc générées et maintenues en présence de compétition inter-clonale. L'identification d'une population de lymphocytes T

CD8⁺ (CD44/122^{int}) dans des souris C57BL/6, nous a permis de mettre en évidence la présence de cellules mémoires pour l'haptène dans le modèle de HSRC dans cette population. Nous avons montré que les T_{IM} ont une prolifération basale *in vivo* en absence d'immunisation plus lente que les cellules mémoires CD44/122^{high}. La faible prolifération des T_{IM} s'expliquerait par la faible expression de la chaîne β du récepteur de l'IL-15 (CD122) à leur surface et par une réponse proliférative réduite en réponse à l'IL-15 par rapport aux cellules mémoires CD44/122^{high}. Par ailleurs, les T_{IM} peuvent se différencier en T_{CM}, s'ils sont restimulés avec des cellules dendritiques maturées par des signaux mimant la présence des pathogènes. Ainsi, ils correspondraient à un stade précoce de différenciation des cellules mémoires. Ce travail a permis de caractériser les différentes propriétés des cellules mémoires générées dans un contexte inflammatoire stérile et surtout l'implication de ces cellules dans les pathologies inflammatoires cutanées comme la dermatite allergique de contact.

Introduction bibliographique

INTRODUCTION

La mémoire immunitaire est définie comme la capacité du système immunitaire à répondre de façon plus efficace et plus rapide à un antigène (**Ag**) déjà rencontré. Elle est assurée par les lymphocytes T (**LT**) et B (**LB**) qui portent respectivement à leur surface les récepteurs spécifiques d'antigènes **TCR** (*T Cell Receptor*) et **BCR** (*B Cell Receptor*). Le BCR des LB reconnaît l'Ag natif. En revanche, le TCR des LT CD8⁺ ou CD4⁺ reconnaît l'Ag, présenté respectivement par une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (**CMH**) de classe I (**CMH-I**) ou de classe II (**CMH-II**). Les séquences des TCR et des BCR, et donc leurs structures, sont hypervariables d'un lymphocyte à l'autre du fait des événements de recombinaison qui touchent les gènes codant pour ces deux molécules et permettent la reconnaissance d'un grand nombre d'antigènes. Dans le cas des LB, il a été montré que lors de la réponse primaire contre un Ag, des mutations somatiques dans les gènes codant pour le BCR au cours d'une phase dite de « maturation d'affinité » conduisent à l'expression des BCR de haute affinité pour l'Ag. Les LB sécrétant ces BCR sous forme d'immunoglobulines (**Igs**) sont ensuite maintenus à long terme en nombre élevé et fournissent ainsi une immunité protectrice contre le pathogène pour lequel ils sont spécifiques. La production d'Igs neutralisantes suite à une première infection ou une vaccination permet ainsi une protection contre de nombreux pathogènes comme le virus de la rougeole, ou encore le virus de la chorioméningite lymphocytaire (**LCMV**) chez la souris.

Dans le cas des lymphocytes T (LT), aucune phase de maturation d'affinité par mutation somatique des gènes du TCR n'a été mise en évidence. Cependant il a été montré dans différents systèmes que les réponses T secondaires ou mémoire contre un Ag donné sont quantitativement et qualitativement plus efficaces que les réponses primaires ce qui contribue à l'immunité protectrice contre certaines bactéries comme *Listeria Monocytogenes* ou *Mycobacterium* ou certains virus comme *Influenza* ou *sendai*. Cette propriété tient d'une part au fait que les LT spécifiques de l'Ag sont maintenus en nombre augmenté à la suite de la réponse primaire contre cet Ag sous la forme de LT mémoire et parfois toute la vie de l'organisme. D'autre part, l'utilisation de souris transgéniques pour le TCR a permis de montrer que cette augmentation de fréquence s'accompagnait de modifications qualitatives intrinsèques qui contribuent à la plus grande efficacité de la réponse mémoire. Dans la partie

bibliographique qui va suivre, une revue de la réponse primaire des LT sera donnée en introduction des différentes problématiques liées à la génération et au maintien des LT mémoires, suite à une infection virale. Ensuite, l'accent sera plus particulièrement mis sur la réponse des LT CD8⁺ dans un contexte d'inflammatoire stérile qui a fait l'objet de mon travail expérimental.

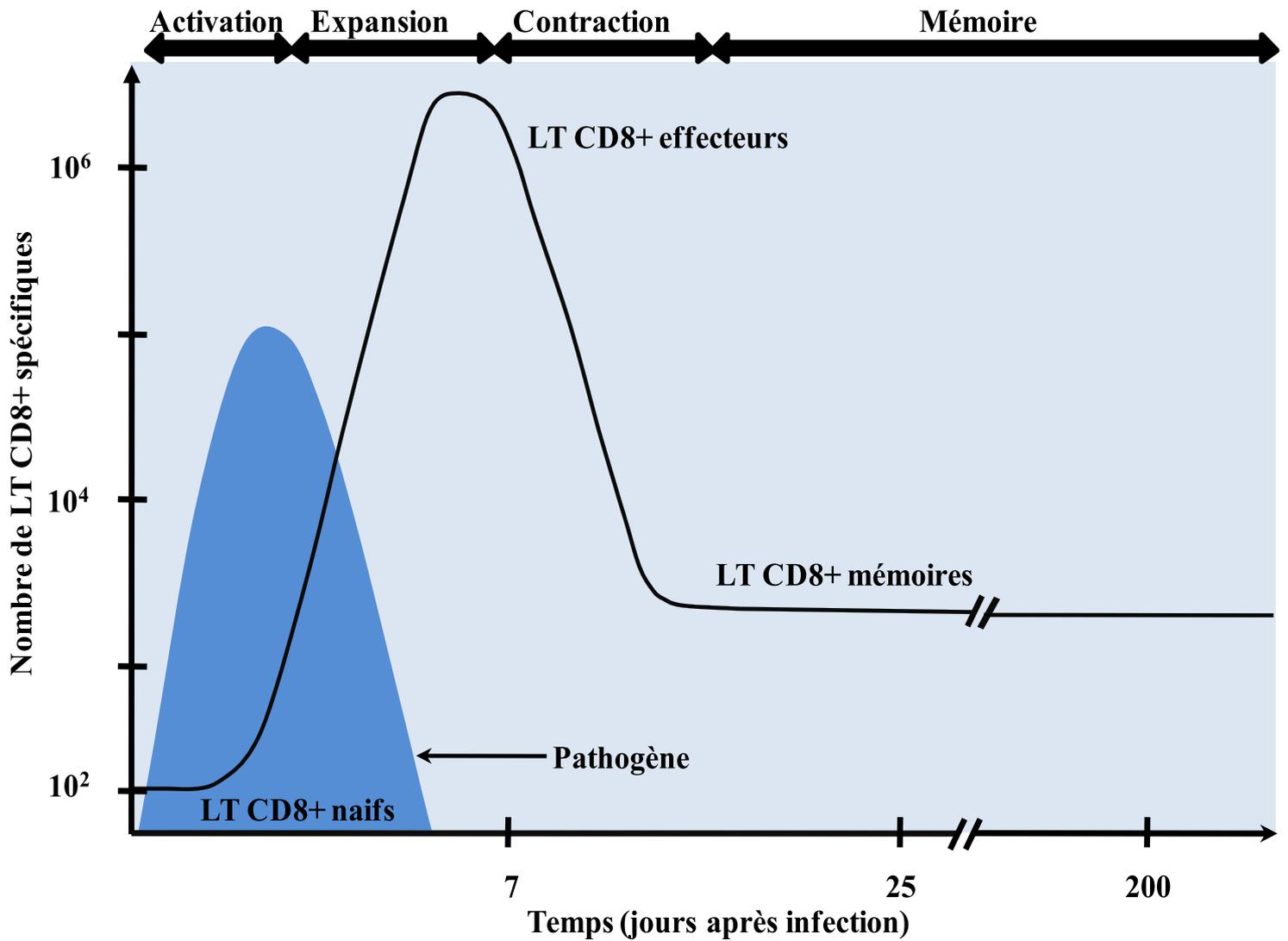


Figure 1. Cinétique de la réponse de LT CD8+ induite suite à une infection aiguë chez la souris (d'après William et al [6]). Ce schéma représente la cinétique de la réponse de LT CD8+ obtenue suite à des infections aiguës induite par des pathogènes comme *Listeria monocytogenes*, LCMV ou le virus de la vaccine. Les LT CD8+ naïfs spécifiques du pathogène, 24 heures après l'infection, entrent dans une phase d'expansion pour générer de nombreuses cellules effectrices aux alentours du 7^{ème} jour. Après l'élimination des pathogènes, les cellules effectrices entrent dans une phase de contraction qui est suivie de la génération des LT CD8+ mémoires.

ACTIVATION ET DIFFERENCIATION DE LT NAÏFS EN CELLULES EFFECTRICES ET MEMOIRES

Après la sélection thymique du répertoire des LT qui permet d'éliminer la plupart des clones autoréactifs et de produire des LT naïfs immunocompétents [1], les clones matures rejoignent les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate et plaques de Peyer) et migrent de façon continue d'un organe à un autre jusqu'à la reconnaissance spécifique d'un Ag. Ces organes lymphoïdes secondaires, constituent le microenvironnement au sein duquel les LT CD8⁺ naïfs seront activés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) spécialisées comme les cellules dendritiques (DC) [2, 3]. L'activation des LT naïfs par les DCs dans des conditions optimales, induit leur prolifération et leur différenciation en cellules effectrices puis mémoires. Cette réponse primaire comporte généralement 4 phases (Figure 1) : (i) une phase d'activation suivie (ii) d'une phase d'expansion clonale, (iii) d'une phase de contraction clonale et (iv) d'une phase de maintien des cellules mémoires. La première phase de la réponse primaire commence après la reconnaissance spécifique de l'Ag par les LT naïfs. Cette phase dure généralement 24 heures et elle est caractérisée par des changements phénotypiques et morphologiques des LT naïfs en cours d'activation. Durant cette phase, les LT naïfs spécifiques de l'Ag établissent des contacts prolongés de quelques heures avec les DCs. Il est généralement admis que durant cette phase, de nombreuses informations sont échangées entre les DCs et les LT, ces échanges auront pour conséquence la mise en place d'un programme de différenciation des LT. La première division cellulaire des LT marque la fin de la première phase et l'entrée dans la seconde phase de la réponse. Durant cette seconde phase, le nombre de LT activés croît de façon exponentielle. Parallèlement à cette expansion clonale, les LT vont acquérir des fonctions effectrices comme la cytotoxicité et la capacité à sécréter différentes cytokines. La phase de contraction est caractérisée par une décroissance du nombre de LT effecteurs dans tous les organes [4, 5]. Au cours de cette phase de décroissance, 90% des LT effecteurs meurent par apoptose, seule une fraction (~10 %) de la population des LT spécifiques de l'Ag est capable de se maintenir au cours du temps. Ce maintien marque le début de la dernière phase ou phase mémoire.

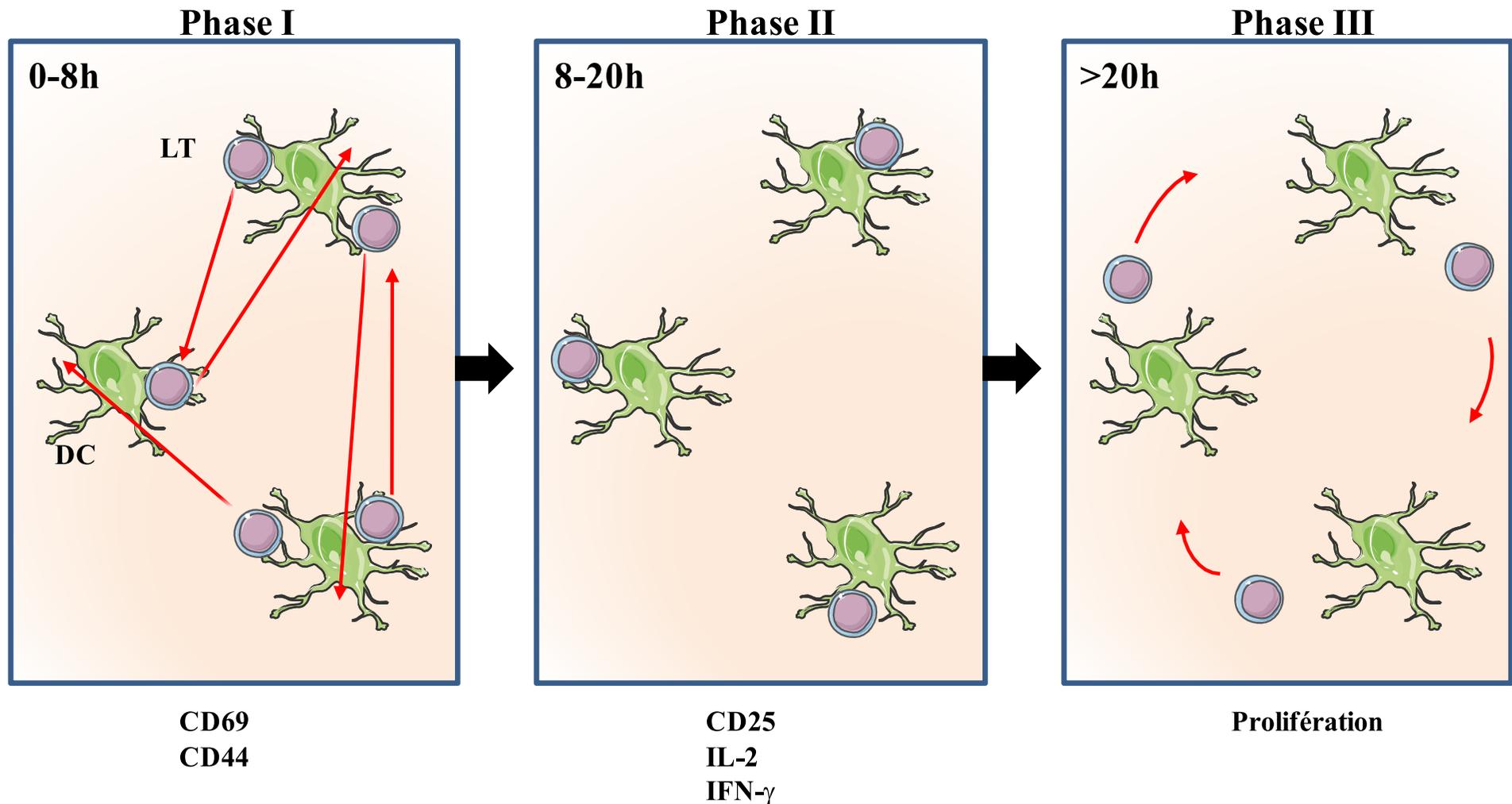


Figure 2. Représentation schématique des interactions entre les DCs et les LT (adaptée d'après Andrey S Shawn [19]).
 La phase I est caractérisée par l'entrée des LT naïfs dans les ganglions lymphatiques et leurs interactions avec de nombreuses DCs pendant 8 heures. Durant cette phase, les LT surexpriment à leur surface des marqueurs d'activation (CD44 et CD69) et ceux-ci participeraient à leur maintien dans ces organes. Au cours de la phase II, les LT vont interagir avec une seule DC pendant une période de 8 à 20 h. Ces interactions prolongées entre les LT et la DC auront pour conséquence la production des cytokines (IL-2 et l'IFN- γ) et l'expression de CD25. Après 20 h d'interaction (phase III) entre les DCs et les LT, ces derniers se détachent des DCs, redeviennent mobiles et entrent en prolifération

1. Phase d'activation des LT naïfs

De nombreuses études réalisées *in vivo*, ont montré que l'initiation de la réponse immunitaire a lieu dans la zone paracorticale du ganglion, lorsqu'un LT rencontre une DC présentant le complexe CMH/peptide (**CMHp**) qu'il reconnaît [7-9]. La physiologie des DCs sera présentée plus en détail dans un autre chapitre. Dans la partie qui va suivre nous nous attacherons à décrire, au niveau cellulaire et moléculaire, les premières étapes de l'activation des LT naïfs par des DCs matures.

1.1. Les interactions DC/LT et la mise en place de la synapse immunologique

L'utilisation de la microscopie intravital a permis de caractériser finement les interactions entre les LT et les DCs lors de la phase d'activation [10-16]. Ces différentes études montrent que le comportement des LT est très différent selon qu'ils rencontrent ou non des DCs présentant l'Ag spécifique. En absence d'Ag, les LT sont très mobiles (10-12 $\mu\text{m}/\text{min}$), leurs trajectoires sont aléatoires et leurs contacts avec les DCs sont nombreux mais brefs. Le comportement du LT change radicalement quand la DC présente à sa surface un Ag spécifique. Les interactions qui vont se mettre en place entre ces deux types cellulaires peuvent être découpées en 3 phases distinctes (Figure 2). La première phase dure entre 3 et 8 heures [15]. Au cours de celle-ci, la vitesse de déplacement du LT va décroître (10 à 4 $\mu\text{m}/\text{min}$) et la durée du contact avec la DC va augmenter légèrement mais il reste bref et transitoire. L'organisation de la zone de contact entre les deux types cellulaires, à ce stade n'est pas bien caractérisée et elle n'est en général pas observée *in vitro*, sauf cas particulier dans des matrices de collagène [17]. La quantité d'Ag présenté par la DC et l'affinité du TCR pour cet Ag, sont des paramètres pouvant moduler la durée de cette première phase et la cinétique d'activation des LT [18]. Il est probable que des signaux d'activation soient délivrés durant cette phase, puisque les molécules de costimulation comme CD44 ou CD69 sont exprimées [14, 15], par contre la production de l'IL-2 ou de l'IFN- γ reste faible [15]. Au cours de la seconde phase, les LT établissent des contacts prolongés avec la DC (de l'ordre de plusieurs heures) (72, 111). La troisième phase commence une vingtaine d'heures après l'entrée des LT dans les ganglions, elle est caractérisée par le détachement des LT des DCs et

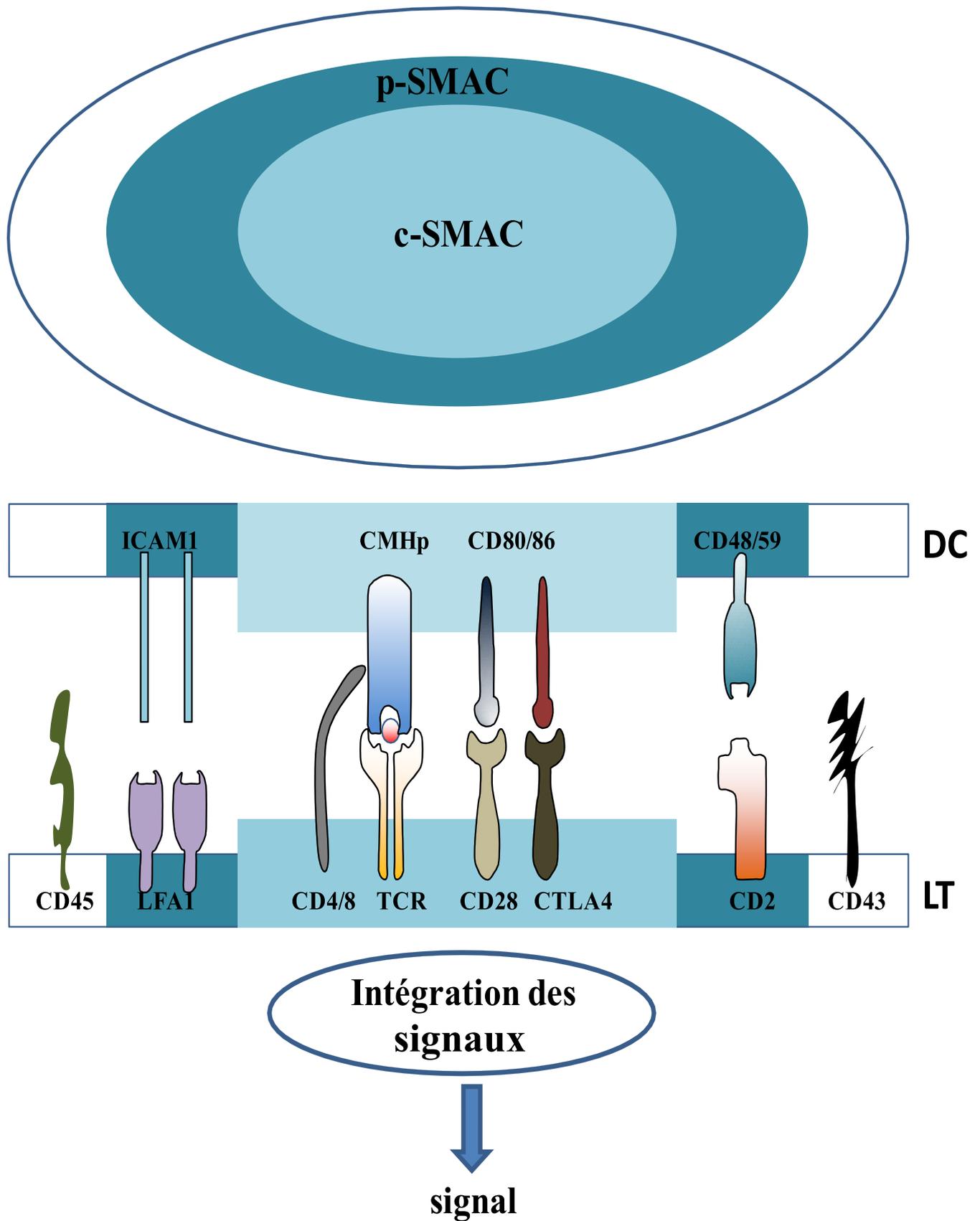


Figure 3. Organisation de la synapse immunitaire entre les LT/DCs.
 (a) Vue en plan et (b) en coupe de la synapse

l'initiation des premières divisions cellulaires. Les LT vont retrouver en partie leur mobilité (6-9 $\mu\text{m}/\text{min}$) avant de quitter les ganglions et de rejoindre la circulation [12, 13, 15].

Par ailleurs, l'analyse *in vitro* de la zone de contact entre la DC et les LT, a permis la caractérisation d'une zone organisée de la membrane plasmique au sein de laquelle, les complexes CMHp et les molécules costimulatrices sont regroupés. Ces microdomaines membranaires au contact de la DC et des LT sont désignés sous le terme de « synapse immune » par homologie aux synapses neurologiques [20]. La composition biochimique des microdomaines engagés dans la formation de la synapse immune est très particulière (Figure 3). Elle est organisée en territoires concentriques de composition moléculaire différente appelés **c-SMAC** et **p-SMAC** pour *central-* ou *peripheral-SupraMolecular Activation Cluster* [21]. À la surface cellulaire des LT, le c-SMAC renferme le TCR, CD28 et des protéines tyrosines kinases comme LcK (*Lymphocyte specific protein tyrosine Kinase*), Fyn et Zap 70 (*ζ-chain (TCR) associated protein kinase 70 kDa*), et la protéine kinase PKC θ qui participent à la transduction du signal TCR. D'autres molécules comme CD11a/CD18 (LFA-1) et CD2 n'entrent pas dans la composition de cette structure et forment le p-SMAC. De façon similaire, dans un premier temps, les molécules inhibitrices comme la phosphatase CD45 ou induisant un fort encombrement stérique comme CD43 sont exclues de la synapse [22]. Les molécules du cytosquelette (actines) jouent un rôle important dans l'organisation structurale de la synapse immunologique, elles dirigent les différents composés moléculaires de la synapse au site d'interaction entre les DCs et les LT [23, 24]. La stabilisation de la synapse est assurée par les molécules d'adhésion comme CD58 (LFA-3) et CD54 (ICAM-1) exprimées à la surface des DCs [25]. Ces molécules engagent respectivement CD2 et CD11a/CD18 (LFA-1) et vont assurer une interaction étroite entre les LT et les DCs.

Les mécanismes qui guident et/ou qui permettent la migration des DCs dans les ganglions lymphatiques ne sont pas encore bien caractérisés. Toutefois, la « domiciliation » et la migration des DCs seraient dépendantes du récepteur de chimiokine CCR7 et ses ligands CCL19 et CCL21 [28]. Les cellules stromales peuvent produire plusieurs chimiokines y compris CCL21 et CCL19 [29]. La production de ces chimiokines est indispensable à la migration de LT au sein des organes lymphoïdes. En effet, la mobilité de LT est très réduite si celui-ci présente une déficience pour CCR7 ou si la déficience concerne les gènes codant pour CCL19 et CCL21 pour les cellules de l'environnement [30, 31]. En outre, le rôle de ces

chimiokines produites au cours de cette phase d'activation ne se limite pas seulement à la migration des cellules T et des DCs, elles peuvent aussi potentialiser et moduler l'activation des LT par les DCs. En effet, la stimulation du TCR de LT naïfs exprimant le récepteur CCR7, en présence de chimiokines comme CCL19 et CCL21 aboutit à une amplification de la réponse [32, 33]. La libération de ces chimiokines par la DC, agissant localement dès que le conjugué commence à se former, pourrait donc leur permettre de jouer un rôle dans la stimulation directe des cellules T [34]. Récemment, une étude réalisée par Castellino et *al* a permis de mettre en évidence le rôle de la chimiokine CCL5 ou **RANTES** (*Regulated upon Activation Normal T cells Expressed and Secreted*) dans l'activation des LT CD8⁺ naïfs [35]. Cette étude a montré que lors d'interactions entre LT CD4⁺ et DCs, une production locale de CCL5 est initiée ainsi qu'un changement du contexte cytokinique dans le ganglion qui conduit à la surexpression de CCR5 à la surface cellulaire des LT CD8⁺ naïfs et leur attraction préférentielle pour une DC ayant interagit avec un LT CD4⁺ spécifique d'un Ag qu'elle présente [35]. Dans le cas où la DC peut recevoir des signaux auxiliaires de LT CD4⁺ spécifiques, ce mécanisme pourrait permettre aux LT CD8⁺ naïfs d'interagir préférentiellement avec les DCs qui ont déjà établi un contact avec un LT CD4⁺. Ce recrutement des LT CD8⁺ naïfs *via* la chimiokine CCL5 leur permet de recevoir les signaux adéquats pour leur différenciation en cellules mémoires. En effet, la génération des cellules mémoires à long terme est très affectée dans les souris déficientes pour CCR5 [35]. Enfin, l'établissement du contact entre les LT et les DCs peut également être affecté par d'autres populations cellulaires que les LT CD4⁺ auxiliaires. En effet, une augmentation du nombre des LT régulateurs (CD4⁺CD25⁺) inhiberait les interactions entre les LT et les DCs [35-37]. Une étude récente réalisée par Sarris et *al*, a permis de montrer que la Neuropiline-1 (**Nrp-1**) joue un rôle important dans les interactions entre les DCs immatures et les LT régulateurs. En effet, la molécule Nrp-1 qui n'est pas exprimée par les LT CD4⁺ naïfs mais par les LT régulateurs, potentialiserait les interactions prolongées entre ces derniers et les DCs immatures. Ainsi, l'accès aux DCs immatures par les LT CD4⁺ naïfs serait régulé par les LT régulateurs [38, 39].

1.2. Les signaux d'activation des LT naïfs

Plusieurs signaux sont nécessaires à la génération des LT CD8⁺ effecteurs, à leur survie et à leur différenciation en cellules mémoires. Bien que la caractérisation de ces différents signaux ne soit pas complète, il est reconnu que trois signaux au moins sont indispensables pour activer les LT naïfs. Le premier signal qui confère la spécificité antigénique de la réponse, résulte des interactions entre le TCR et le CMHp. Le second signal et le troisième signal sont délivrés respectivement par les molécules de costimulation exprimées à la surface des DCs matures et les cytokines proinflammatoires [40-43].

1.2.1. Signal 1 : interactions TCR/CMHp

La stimulation d'un LT *via* son TCR dans des conditions physiologiques n'induit pas son activation à moins que d'autres signaux comme les cytokines proinflammatoires y soient associées [44]. Pareillement, les LT mis en contact avec des cytokines proinflammatoires en absence du signal TCR, ne se différencient pas et meurent [45]. Les études récentes réalisées dans ce domaine dans des conditions physiologiques *in vivo*, ont montré que la variation de l'intensité de la stimulation antigénique, sans pour autant modifier le déroulement de l'infection (l'inflammation et la cinétique de clairance du pathogène), avait une incidence sur le nombre des LT générés au cours de la réponse primaire [46, 47]. Selon ces études, une augmentation de la durée de la stimulation antigénique augmenterait le nombre des cellules effectrices générées mais n'améliorerait pas les fonctions effectrices de ces dernières. Les autres signaux (2 et 3) sont indispensables pour une différenciation productive de LT naïfs en cellules effectrices et mémoires.

1.2.2. Signal 2 : les molécules de costimulation

Le signal 2 est régi par l'interaction de couples récepteurs/ligands, présents à la surface des LT et des DCs. Les molécules de costimulation sont des molécules de surface qui, en présence de leurs ligands, ne peuvent pas activer d'elles-mêmes de façon productive les LT, mais peuvent cependant, amplifier ou atténuer le signal délivré *via* le TCR. Selon le tableau 1, la majorité des molécules de costimulation appartient à la famille des molécules CD28 et **TNF** (*Tumor Necrosis Factor*). Parmi ces molécules, seules les molécules CD28,

Expression	Récepteurs (surface des LT)	Ligands (surface des DCs)	Signal	Superfamille
Constitutive	CD28	B7-1 (CD80)	+	CD28/B7
	CD28	B7-2 (CD86)	+	CD28/B7
	CD27	CD70	+	TNF/TNFR
	HVEM	LIGHT	+	TNF/TNFR
Inductible	ICOS	ICOS-L	+	CD28/B7
	CD30	CD30L (CD153)	+	TNF/TNFR
	OX40 (CD134)	OX40L	+	TNF/TNFR
	4-1BB(CD137)	4-1BBL	+	TNF/TNFR
	SLAM(CD150)	SLAM (CD150)	+	Ig
	CTLA-4 (CD152)	B7-1 (CD80)	-	CD28/B7
	CTLA-4 (CD152)	B7-2 (CD86)	-	CD28/B7
	PD-1	PD-L1	-	CD28/B7
	PD-1	PD-L2	-	CD28/B7
	inconnu	B7-H3	-	CD28/B7
	BTLA	B7-H4 (BTLA-L)	-	CD28/B7

Tableau 1. Les molécules de costimulation et leurs ligands (adapté d'après Kroczeck et *al* [61])

CD27 et HVEM sont exprimées de façon constitutive par les LT alors que la majeure partie d'entre elles n'est inducible que suite à la reconnaissance d'un Ag par le TCR. L'ensemble des molécules exprimées constitutivement à la surface des cellules ont un effet positif sur le signal transduit *via* le TCR alors que celles qui sont inducibles, peuvent soit avoir un effet positif (ICOS, CD30, OX40, 4-1BB, SLAM ; Tableau 1) ou négatif (CTLA-4, PD-1, BTLA ; Tableau 1) sur le signal TCR. Les récepteurs costimulateurs les plus connus correspondent aux molécules CD28 [48] et ICOS, tandis que les récepteurs co-inhibiteurs les plus étudiés sont CTLA-4, PD-1 et BTLA. Leurs ligands appartiennent essentiellement à la famille B7. L'activation des DCs induit à leur propre surface, la surexpression des molécules de costimulation CD80 et CD86. Les interactions entre ces dernières et leur ligand (CD28), lors de la stimulation antigénique, ont pour conséquence la prolifération, la survie des LT activés et la production d'IL-2 [49, 50]. Les études de souris déficientes pour les différentes molécules de costimulation comme CD28, 4-1BB et CD27 ont permis de montrer leur rôle au cours de l'expansion et de la différenciation de LT CD8⁺. Ainsi, la molécule CD28 serait indispensable pour la génération d'une réponse cytotoxique à de nombreux agents pathogènes divers et variés, y compris la bactérie *L. monocytogenes* [51] et le virus de l'*influenza* [52]. La molécule CD28 est indispensable pour la stimulation de LT CD8⁺ naïfs quand le signal d'activation est faible et de courte durée [53]. En ce qui concerne la molécule de costimulation 4-1BB, elle est induite de façon rapide sur les LT CD8⁺ (3h) suite à la stimulation antigénique [54]. Plusieurs études ont montré un rôle promoteur de la réponse CD8⁺ par cette molécule et notamment des effets sur la synthèse d'IFN- γ [55]. Les souris déficientes pour 4-1BB (CD137) ont ainsi des réponses antivirales de type CD8⁺ réduites [56] et une phase de contraction exacerbée [54, 56-58] suggérant que l'engagement de 4-1BB est particulièrement important pour la survie de LT activés. Les autres membres de la superfamille de TNF/TNFR jouent également un rôle important dans la génération de la réponse primaire de LT CD8. En effet, la molécule CD27, exprimée par les LT CD8⁺ naïfs, joue un rôle important dans la génération de LT CD8⁺ effecteurs et mémoires spécifiques du virus de l'*influenza* [59]. Il a été également démontré que les signaux délivrés par la molécule CD27 pouvait agir en synergie avec ceux de CD28 pour augmenter la survie des LT CD8⁺ effecteurs et leur accumulation [60].

L'ensemble de ces expériences suggère que durant leur activation, les LT naïfs sont capables d'intégrer ces différents signaux pour la plupart, délivrés directement par les DCs.

1.2.3. Signal 3 : les cytokines proinflammatoires

L'ajout de cytokines proinflammatoires comme l'interleukine-12 (IL-12) et des interférons de type I (INF- α et β) au milieu de culture de LT activés, améliore leur prolifération et leur survie [40, 43, 62]. Une étude du groupe de J. Harty montre notamment que des signaux liés à l'inflammation et présents au moment de l'activation contribuent à augmenter le nombre des LT effecteurs au pic de la réponse [63]. De plus, les études de Koluman et *al* ont permis de montrer dans divers systèmes d'immunisation *in vivo*, le rôle direct des cytokines proinflammatoires comme l'INF- α et β sur la réponse des LT CD8+ pour potentialiser leur expansion [64]. Le signal délivré par ces cytokines proinflammatoires favoriserait la survie des cellules T pendant la prolifération. En effet, l'expression des molécules indispensables à la survie des cellules T effectrices comme **Bcl3** (*B-cell lymphoma 3*) [65, 66] et l'équilibre entre les molécules pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de la famille Bcl2 peuvent être modulés *via* les cytokines proinflammatoires. Plusieurs études ont montré que la nature des différentes cytokines proinflammatoires pouvant fournir un signal 3, varie selon le type d'agent pathogène [67-69]. En effet, les cellules T déficientes pour le récepteur aux interférons de Type I (**IFNAR**) ont une expansion réduite dans un système d'infection avec le virus LCMV. Par contre, si les déficiences portent sur le récepteur à l'IL-12 ou à l'INF- γ (**IFNGR**) alors l'expansion des cellules T est quasiment normale suite à l'infection induite par LCMV. De plus, l'absence du récepteur IFNAR a un effet moins drastique sur l'expansion des cellules T si celle-ci est induite par des agents pathogènes (*L. monocytogenes* ou le virus de la vaccine) autre que le virus LCMV [64, 69-71]. De même, la cinétique et l'intensité de la réponse vont dépendre aussi de la nature de l'agent pathogène. En effet, la production de l'IL-12 et de l'INF- γ sera plus importante et plus rapide suite à une infection par *L. monocytogenes* que dans un contexte d'infection avec le virus LCMV [67]. Ainsi, les interactions spécifiques qui vont s'établir entre un agent pathogène et l'organisme seront déterminantes pour le type de cytokines pro-inflammatoires produites.

2. Expansion clonale et différenciation de LT naïfs en cellules effectrices

2.1. Expansion clonale des LT activés

Chez la souris, la fréquence des LT CD8⁺ naïfs spécifiques d'un Ag donné est comprise entre 10 à 1000 cellules par hôte [72-77]. Cette faible fréquence ne leur permet pas de combattre efficacement l'infection associée à une multiplication rapide des agents pathogènes. De plus, à ce stade, les LT CD8⁺ naïfs ne disposent pas de fonctions effectrices pour combattre efficacement l'infection [78]. Suite à leur activation dans les organes lymphoïdes secondaires par les DCs, les LT activés enclenchent une série de divisions rapides au cours desquelles ils vont acquérir des fonctions effectrices et croître de façon exponentielle en nombre [4]. La phase d'expansion de cellules spécifiques d'un CMHp donné, peut être évaluée *in vivo* au moyen de marquages avec des tétramères de CMHp couplés à un fluorochrome ou de marquages intracellulaires de cytokines suite à une réactivation par l'Ag *ex vivo* [79]. Il faut noter cependant que ces deux approches ont un bruit de fond trop important pour permettre l'évaluation de la fréquence de LT naïfs quand celle-ci est très faible [80]. Récemment, l'équipe de Jenkins a mis au point une méthode leur permettant d'évaluer la faible fréquence de LT CD4⁺ en marquant ces derniers avec des tétramères avant de les purifier par la suite à l'aide des billes magnétiques couplées avec des anticorps spécifiques des fluorochromes couplés aux tétramères [80]. Cette étude a permis de montrer que pour une population de LT CD4⁺ de spécificité donnée, 300 cellules sont capables de générer 80 000 cellules effectrices en 6 jours au pic de la réponse [80].

2.2. Différenciation des LT activés en cellules effectrices

L'activation induit l'acquisition de nouvelles fonctions qui vont permettre aux LT CD8⁺ effecteurs ou CTL (*cytotoxic T lymphocytes*) de déclencher l'apoptose des cellules exprimant un complexe CMHp pour lequel ils sont spécifiques. Cette activité implique plusieurs voies qui pourraient agir en synergie : la voie perforine / granzyme (dépendante de calcium), la voie Fas / FasL (indépendante de calcium) et aussi la sécrétion de cytokines proapoptotiques comme le TNF- α .

2.2.1. Cytotoxicité

- **La voie de perforine/granzyme**

Suite à la reconnaissance d'une cellule cible *via* les complexes CMHp spécifiques, les CTL réorganisent leur cytosquelette, établissent une synapse cytotoxique avec la cible [81] et libèrent des granules d'exocytose dans l'espace délimité par la synapse [81, 82]. Ces granules d'exocytose contiennent de nombreuses protéines capables d'induire la mort par apoptose de la cellule cible. Les granzymes (**Gzms**) et la perforine (**PFN**) constituent la majeure partie de ces protéines.

Les Gzms qui sont des protéases, seraient dissociés par la seryglycine avant leur entrée dans la cellule cible [83]. Les Gzms se fixent à la membrane plasmique de la cellule *via* des interactions électrostatiques. En effet, les Gzms sont chargés positivement et la surface cellulaire négativement [84-86]. La fixation et la cytotoxicité ne nécessitent donc pas de récepteurs spécifiques [85, 87, 88]. L'entrée des Gzms dans le cytoplasme de la cellule cible est généralement facilitée par la perforine (PFN), il faut noter cependant que les mécanismes mis en jeu par la perforine ne sont pas bien caractérisés [89]. Le modèle selon lequel, les perforines formeraient des pores dans la membrane plasmique comme les composants du complément, est souvent controversé. Ainsi, les perforines formeraient plutôt des pores microscopiques dans la membrane plasmique, ces derniers généreraient l'influx calcique provoquant l'endocytose rapide des Gzms [90]. L'entrée des Gzms est dépendante de la dynamine, une protéine cytoplasmique impliquée dans la formation des vésicules d'endocytose [91]. Les Gzms les plus abondants et les mieux caractérisés correspondent aux GzmA et B. Le GzmA induit la mort de la cellule indépendamment de la voie des caspases alors que le GzmB peut activer directement ou indirectement les caspases. La présence de ces Gzms dans le noyau induit le clivage des substrats nucléaires et entraîne la mort de la cellule cible. Les mécanismes qui permettent l'entrée de GzmA et GzmB dans le noyau ne sont pas connus.

- **La voie Fas/FasL**

Il a été démontré que les CTL expriment à leur surface la molécule FasL (CD95) qui, en se liant à son récepteur Fas (CD95) présent à la surface des cellules cibles, induit le

recrutement de diverses protéines au niveau de Fas et la formation d'un complexe appelé **DISC** (*pour death inducing signaling complex*). Le DISC induit l'activation de la caspase 8 [92, 93]. Celle-ci activée peut ensuite déclencher l'activation des caspases effectrices et l'apoptose des cellules cibles directement ou par l'intermédiaire du relargage de cytochrome-c par la mitochondrie [94].

D'autres membres de la famille des récepteurs TNF comme **TRAILR** (*Tumor-Necrosis Factor (TNF)-related apoptosis-inducing receptor*) et **TNFR1** peuvent également induire la mort des cellules cibles [95]. De façon similaire à la voie de perforine/granzyme, l'expression de FasL à la surface des CTL est dépendante du signal délivré *via* le TCR. Contrairement aux Gzms, la molécule de FasL n'est pas stockée, sa synthèse n'est optimale que quelques heures après le signal TCR. Ainsi, sa mise en place est tardive par rapport à la voie de perforine/granzyme.

2.2.2. Sécrétion de cytokines et de chimiokines par les cellules effectrices

Les LT CD8⁺ produisent aussi différentes cytokines après activation. Les LT CD8⁺ effecteurs se caractérisent principalement par la sécrétion d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-2. Ces cytokines ont des rôles très divers : augmentation de l'expression de molécules impliquées dans la présentation de l'Ag sur les APC ou les cellules cibles [96] et activation de l'activité microbicide d'autres types cellulaires pour l'IFN- γ ; d'autres cytokines comme l'IL-2 auraient un effet autocrine sur les LT ; TNF- α , molécule effectrice proinflammatoire et permettant d'induire la mort *via* le récepteur TNFR1[97].

Les LT CD8⁺ vont également produire différentes chimiokines dans les heures suivant l'activation (CCL3, CCL4) ou au contraire de façon tardive (CCL5) [98-100]. Leurs rôles peuvent être multiples, outre leur effet chimioattractant, ces chimiokines peuvent en effet moduler la prolifération de LT [34, 101]. Enfin, il faut noter que si, en absence d'antigène, la cellule effectrice garde la capacité d'exprimer ses fonctions, l'expression de ces fonctions reste sous le contrôle de l'interaction du TCR avec le CMHp spécifique [102, 103]. Cette particularité permet de restreindre l'expression des fonctions dans le temps et dans l'espace et ainsi d'éviter les effets non spécifiques. À ce jour, il existe une exception à cette règle ; ainsi, la production d'IFN- γ , par les LT CD8⁺ effecteurs ou mémoires peut être induite par une combinaison d'IL12/18 [104].

3. Phase de contraction et génération des cellules mémoires

3.1. La phase de contraction

La phase de contraction est caractérisée par un déclin du nombre des LT CD8+ effecteurs dans tous les organes. Durant cette phase, la majorité (95 %) des LT CD8+ effecteurs générés au cours de la phase d'expansion est éliminée. L'initiation de cette phase de contraction est souvent corrélée à la clairance de l'agent pathogène suite à une infection aiguë (Figure 1). Cette observation pouvait laisser penser que le système immunitaire disposait des mécanismes qui lui permettaient de détecter la clairance du pathogène et de réduire l'effectif des cellules effectrices. Un tel mécanisme permettrait le retour à l'homéostasie des organes lymphoïdes, la libération de l'espace utile dans ces organes et le maintien de la diversité du répertoire des LT périphériques. Cependant, Badovinac et *al* ont montré que la réduction de l'infection par un traitement à l'antibiotique des souris, 2 jours après l'infection avec *L. monocytogenes*, n'avait aucune incidence sur la phase de contraction des LT CD8+ effecteurs [105]. De plus la cinétique de cette phase de déléition serait identique suite à une infection aiguë ou chronique [105-107], même si la persistance ou la chronicité de l'agent pathogène altère les caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques des LT CD8+ mémoires générés [107-109]. Ces résultats suggèrent que la phase de contraction est programmée (indépendamment de la clairance ou non du pathogène) par les premiers signaux délivrés lors de l'infection [105].

Les mécanismes moléculaires contrôlant la phase de contraction des LT CD8+ effecteurs ne sont pas complètement caractérisés. Les premières études réalisées *in vitro* ont montré que les LT CD8+ effecteurs étaient plus sensibles à la mort induite par activation ou **AICD** (*Activation Induced Cell Death*) alors que les cellules mémoires sont plus résistantes à l'AICD [4, 5]. Les LT CD8+ effecteurs expriment en effet les couples Fas-FasL et TNF-TNF récepteur responsable de l'induction de l'AICD, lors d'une forte stimulation *via* le TCR [110, 111]. Cependant, les études réalisées *in vivo*, ont montré que l'absence de ces molécules n'altère pas la phase de contraction [110, 112] et celle-ci se met en place, lorsque la stimulation antigénique diminue de par la clairance du pathogène. Ce résultat suggère que l'AICD n'est probablement pas le principal mécanisme qui contrôle la phase de contraction. Elle serait plutôt régulée de façon homéostatique *via* l'expression des molécules pro et anti-

apoptotiques de la famille Bcl2 [113-117]. En effet, la délétion d'un des membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl2, **Bim** (*Bcl-2-interacting mediator of cell death*) supprime la phase de contraction des LT effecteurs spécifiques de superantigènes *in vivo* et réduit la phase de contraction des LT CD8⁺ effecteurs générés après une infection induite par un herpès virus [114]. Toutefois, ces résultats méritent d'être nuancés avec ceux qui sont obtenus à partir des souris déficientes pour Bim infectées avec LCMV. En effet, dans ce modèle la population des LT CD8⁺ peut se contracter, ce résultat suggère l'existence de voies alternatives contribuant à la mort des LT CD8⁺ préalablement activés [118-120]. Par ailleurs, plusieurs études indiqueraient que l'inflammation et plus particulièrement l'IFN- γ et l'IL-12 pourraient participer au contrôle de la phase de contraction [102]. En effet, la phase de contraction est quasiment inexistante dans les souris B6 déficientes pour l'IFN- γ [102]. Par contre, la cinétique avec laquelle l'agent pathogène est éliminé ne diffère pas de celle qui est obtenue avec des souris sauvages [102]. Des résultats similaires ont été obtenus à partir des souris (BALB/c et B6) déficientes pour l'IFN- γ et infectées avec LCMV [102, 121]. Toutefois, l'interprétation des résultats obtenus à partir des souris B6 est un peu complexe dans la mesure où le virus persiste [122].

Ainsi, selon la nature du pathogène et des cytokines proinflammatoires induites, celles-ci pourraient participer à la régulation de la phase de contraction.

3.2. Génération des cellules mémoires

La compréhension des mécanismes responsables de la génération des cellules mémoires est un élément clé pour la manipulation du système immunitaire dans le but de développer des vaccins efficaces. De nombreuses études ont donc tenté de fournir des explications précises sur les mécanismes qui permettent la survie d'une fraction des cellules répondeuses et leur différenciation en cellules mémoires. L'hétérogénéité des sous-populations des cellules effectrices et mémoires complique la problématique. Les cellules effectrices et mémoires peuvent être subdivisées selon leurs fonctions effectrices, leurs capacités migratoires, et prolifératives mais aussi selon leurs capacités à persister *in vivo*. Une des questions centrales au sujet des cellules effectrices et mémoires concerne leur lignage et les mécanismes contrôlant leur génération.

3.2.1. Hétérogénéité de LT effecteurs et mémoires

Les LT effecteurs (LT_{EFF}) et les LT mémoires sont très hétérogènes par leur fonction effectrice, leur localisation anatomique et leur capacité à proliférer [123, 124]. Malgré cette hétérogénéité, trois principales sous-populations ont été définies : la sous-population des cellules effectrices et les deux sous-populations de cellules mémoires T_{CM} (*Central Memory T cells*) et T_{EM} (*Effector Memory T Cells*). Ces populations peuvent être définies par des marqueurs communs ($CD44/122^{high}$) qui les distinguent des cellules naïves. De plus, les LT_{EFF} sont caractérisés par une courte durée de vie et l'aspect cinétique de la réponse est également utilisé pour définir les LT_{EFF} (pendant la réponse primaire) et les LT $CD8+$ mémoires (après retour au repos).

- **Diversité fonctionnelle**

Les LT_{EFF} sont générés au cours de la phase d'expansion. Ils ont la capacité de migrer vers les organes périphériques et les sites d'infection. La population des LT_{EFF} est elle-même hétérogène en terme de fonctions, certaines des cellules disposent d'un nombre restreint de fonctions effectrices alors que d'autres ont la capacité de sécréter de l'IFN- γ , du TNF- α , et/ou de l'IL-2. Ces dernières sont très importantes dans la réponse immune protectrice contre de nombreuses pathologies infectieuses comme le SIDA [123]. Les deux sous-populations de cellules mémoires (T_{CM} et les T_{EM}) ont été identifiées chez l'homme, puis chez la souris. Les T_{EM} auraient un rôle important dans la réponse immédiate du fait de leurs capacités effectrices et de leur localisation en périphérie, proche des sites d'entrée des pathogènes. Les T_{EM} sont aussi caractérisés par leur faible capacité à proliférer [125, 126] suite à une stimulation antigénique ou aux cytokines (IL-7 et l'IL-15) indispensables à la prolifération homéostatique ; la longueur de leurs télomères est également réduite [127-129]. En ce qui concerne les T_{CM} , ils sont localisés préférentiellement au niveau des organes lymphoïdes et possèdent des faibles capacités effectrices immédiates mais une forte capacité d'expansion. La majorité des études réalisées pour caractériser les T_{CM} ont également montré que ces derniers pouvaient produire de grandes quantités d'IL-2 suite à une stimulation antigénique [125, 126]. L'acquisition de leurs fonctions effectrices par les T_{CM} et les T_{EM} est dépendante des signaux de différenciation [125, 130].

Marqueurs	LT CD8+ naïfs	LT _{EFF}	LT CD8+ mémoires	
			T _{EM}	T _{CM}
CD11a	Low	High	High	High
CD25	Low	High	Low	Low
CD44	Low	High	High	High
CD62L	High	Low	Low	High
CD69	Low	High	Low	Low
CD122	Low	High	High	High
Ly6C	Low	High	High	Low
CCR7	High	Low	Low	High

Tableau 2. Exemples des marqueurs de surface des LT CD8+ naïfs, effecteurs (LT_{EFF}) et mémoires (T_{EM} et T_{CM}). La liste de ces marqueurs n'est pas exhaustive mais elle correspond aux principaux marqueurs généralement utilisés pour identifier les LT CD8+ naïfs, LT_{EFF}, T_{EM} et les T_{CM}.

- **Diversité des marqueurs de surface**

La diversité fonctionnelle des cellules effectrices et mémoires complexifie leur analyse et leur identification. Ainsi, de nombreuses études ont été réalisées afin d'établir des corrélations entre leurs propriétés fonctionnelles et leurs phénotypes. Le profil d'expression des marqueurs de surface des LT CD8 est unique et permet de caractériser des cellules naïves mais le phénotype des cellules mémoires T_{EM} est partagé par les T_{EFF} (Tableau 2). Les principaux marqueurs utilisés, sont constitués des molécules impliquées dans la migration et l'adhésion cellulaire (CD44, CD11a, CD62L), des récepteurs de cytokine/chimiokine (IL-2/15R β ou CD122, CCR7), des récepteurs des cellules NK (Ly49, NKG2...) et des glycoprotéines membranaires (CD45 et CD43) [103, 131-135]. D'autres marqueurs comme $\alpha_4\beta_7$, CD103, CD27, CD127 ou IL-7R, CD28, Ly6C, 2B4, CXCR3, **KLRG1** (*Killer lectin-like receptor G1*) et **PD-1** (*Programmed Death-1*) sont également utilisés pour discriminer les cellules mémoires des cellules effectrices et naïves [65, 113, 128, 134, 136-149]. Ainsi, chez l'homme et chez la souris, les phénotypes des T_{EM} et des T_{CM} sont respectivement CD127/CD27^{low} CD62L^{low} et CD127/CD27^{high} CD62L^{high} (Tableau 3) [143, 150]. L'expression de l'ensemble de ces marqueurs à la surface des cellules mémoires est influencée par plusieurs facteurs comme le type et la durée de l'infection (aiguë/latente/chronique) (Tableau 4), les cytokines inflammatoires et de type γ_c , la fréquence des précurseurs (LT naïfs), la localisation tissulaire des cellules et leur spécificité antigénique.

Les deux principaux marqueurs utilisés pour distinguer les cellules naïves des cellules ayant rencontré l'Ag sont également utilisés en combinaison avec CD44 et CD122 pour identifier des cellules de phénotype mémoire (**MP**, *Memory-Phenotype T cells*) qui se développent chez les souris naïves élevées dans un environnement stérile. Il est généralement admis, que les MP sont générées en réponse aux Ag environnementaux. Elles s'accumulent avec l'âge, possèdent les mêmes caractéristiques fonctionnelles que des cellules mémoires d'historique connu et sont donc utilisées comme modèle de ces dernières [151, 152].

- **Diversité des capacités protectrices**

De par leurs caractéristiques fonctionnelles distinctes, les T_{EM} et les T_{CM} diffèrent par leur capacité à répondre à une infection et à la mise en place d'une protection efficace. Leurs

	T _{CM}						T _{EM}					
Phénotypes	CCR7 ^{high}	CD62L ^{high}	CD122 ^{high}	CD44 ^{high}	CD27 ^{high}	CD127 ^{high}	CCR7 ^{low}	CD62L ^{low}	CD122 ^{high}	CD44 ^{high}	CD27 ^{low}	CD127 ^{low}
Prolifération en réponse à l'Ag	+++						+/-					
Cytokines produites de façon immédiate	INF-γ +, IL-2						INF-γ+++					
Cytotoxicité <i>in vitro/in vitro</i>	+++						+++/>++					
Localisation	organes lymphoïdes secondaires						rates, poumons, tissus					
Prolifération homéostatique <i>in vivo</i>	+++						+					

Tableau 3. Les principales caractéristiques des 2 sous-populations mémoires (T_{EM} et T_{CM}).

Infections	Phénotypes		Propriétés fonctionnelles
Aigue	CD62L	High	Capacité proliférative accrue
	CD44	High	IFN- γ , TNF- α , IL-2, cytotoxicité
	CD27	Int/high	Prolifération homéostatique
	CD11a	High	Persistance indépendante de l'antigène
	CCR7	High	
	CD127	High	
	CXCR3	High	
	KLRG1	Low	
	CD122	High	
	CD43	Low	
	PD1	Low	
	CD69	Low	
	CD57	Low	
Latente	CD62L	Low	Capacité proliférative intermédiaire
	CD44	High	Faible production (IFN- γ , TNF- α , IL-2)
	CD27	Low/int	Prolifération homéostatique réduite
	CD11a	High	
	CCR7	Low/high	
	CD127	Low/int	
	CD122	Low	
	KLRG1	High/low	
	PD1	int/high	
	CD69	Low	
	CD57	High	
Chronique	CD62L	Low	Faible capacité proliférative
	CD27	Low/int	
	CD44	High	prolifération homéostatique faible ou inexistante
	CCR7	Low	Persistance dépendante de l'antigène
	CD11a	High	
	CD122	High/low	
	CD127	Low/high	
	PD1	High	
	KLRG1	high/low	
	CD57	High	
CD69	high		

Tableau 4. Phénotypes des LT mémoires selon le type d'infection virale

Etude bibliographique : activation et différenciation de LT naïfs en cellules effectrices et mémoires

capacités protectrices ont été évaluées séparément dans les études et n'ont pas été comparées directement. Toutefois, l'étude réalisée chez la souris par Wherry et *al*, a permis de montrer que les LT CD8⁺ (T_{CM}) ont une plus grande capacité protectrice que les T_{EM} lors d'une infection systémique, locale ou respiratoire [128]. L'efficacité des T_{CM} s'expliquerait par leur capacité à proliférer et à générer des cellules effectrices secondaires [128]. Cependant, la capacité proliférative n'est pas toujours associée à la protection immune. En effet, les T_{CM} (CD62L^{high}) générés suite à une immunisation avec *L. monocytogenes* tuées par la chaleur, ont une prolifération et une expansion importante lors d'une réinfection avec *L. monocytogenes* vivantes mais sont incapables d'éliminer ces dernières [153]. Ce résultat suggère que les T_{CM} sont incapables de mettre en place une réponse protectrice contre les bactéries intracellulaires qui se multiplient rapidement comme *Listeria*. Une étude récente a montré que les T_{CM} peuvent conférer à l'hôte une protection contre les virus comme LCMV et non contre le virus de la vaccine. En revanche, les T_{EM} sont capables de mettre en place une réponse protectrice contre ces deux virus. Il faut noter cependant que le virus LCMV se réplique lentement dans les organes lymphoïdes, cela offrirait le temps et l'environnement optimal pour la conversion des T_{CM} en cellules effectrices. En revanche, le virus de la vaccine se réplique rapidement dans les organes périphériques (ovaires), le temps nécessaire à la conversion des T_{CM} en cellules effectrices pour mettre en place une réponse protectrice jouerait en sa faveur [126, 130, 154]. En somme, la protection immunitaire contre les agents pathogènes capables de se répliquer rapidement à la périphérie dépendrait de la présence en nombre suffisant des T_{EM} au niveau des sites d'infections, tandis que les T_{CM} pourraient maîtriser des pathogènes qui se répliquent lentement.

3.2.2. Les différentes voies de différenciation des cellules naïves en cellules mémoires

Deux modèles contradictoires ont été proposés pour décrire les voies de différenciation qui permettent la génération des cellules mémoires à partir des cellules naïves. Selon le premier modèle (différenciation linéaire), il existerait un continuum entre les cellules naïves, effectrices et mémoires [128]. Ainsi, l'engagement des cellules dans la voie de différenciation en cellules mémoires se situerait au cours de la phase de contraction. En ce qui concerne, le second modèle (différenciation ramifiée), les cellules naïves se différencieraient d'une part en

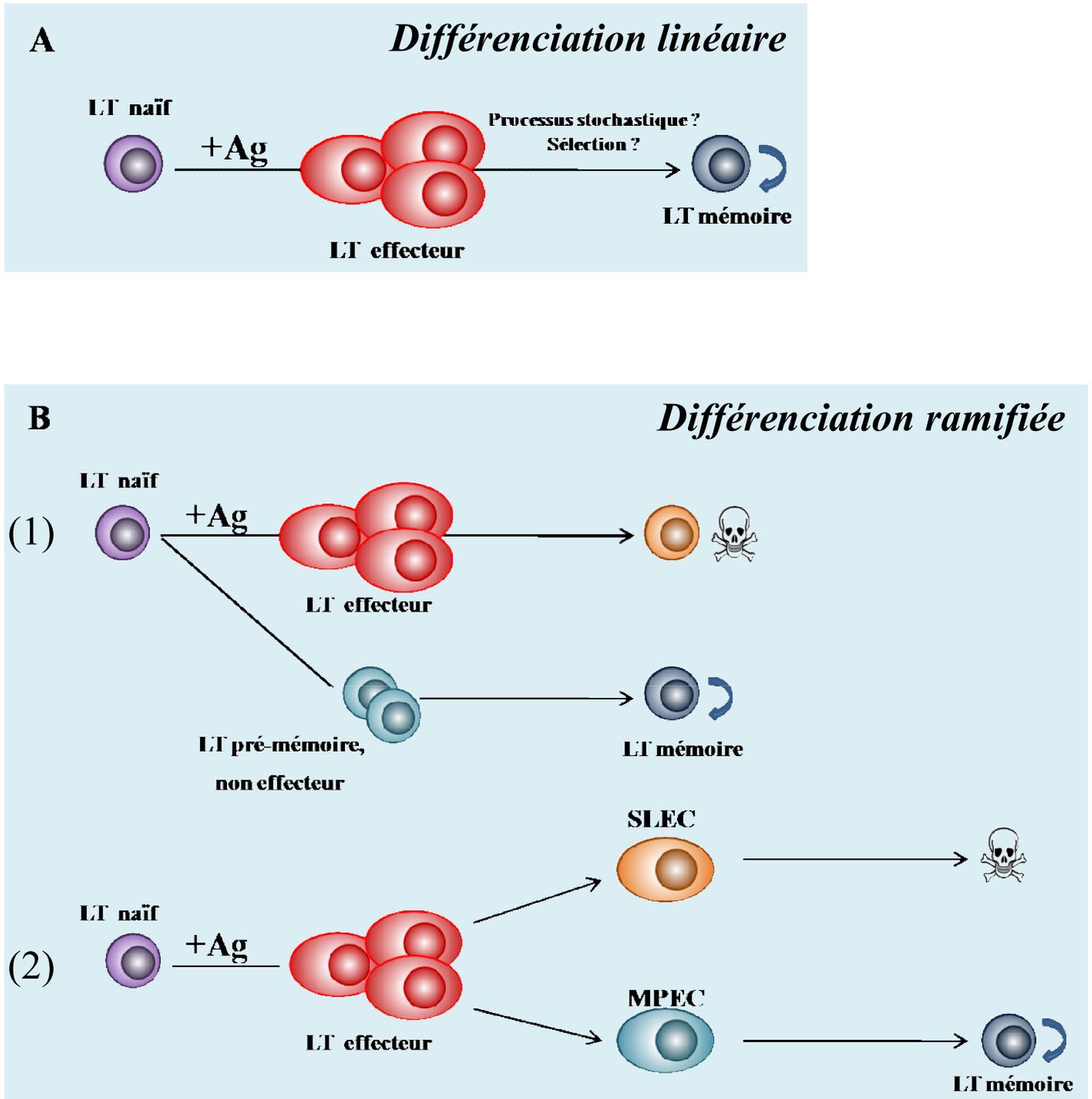


Figure 4. Modèles de différenciation des LT CD8+ mémoires (relation $LT_{EFF}/CD8+$ mémoires). (A) Différenciation linéaire : les LT naïfs se différencient en LT_{EFF} et seulement une fraction de ceux-ci vont se différencier en LT mémoires . (B1) Différenciation ramifiée : selon les conditions d'activation des LT naïfs, ils peuvent se différencier directement en LT mémoires . (B2) Différenciation des LT mémoires à partir des précurseurs présents dans la population des LT_{EFF} .

cellules effectrices destinées à mourir et d'autre part en cellules non-effectrices, précurseurs des cellules mémoires (Figure 4).

- **Les précurseurs des cellules mémoires sont-ils issus des cellules effectrices ?**

Plusieurs divisions sont nécessaires pour qu'une cellule naïve puisse acquérir la capacité à produire des molécules effectrices comme la perforine ou granzyme B. Ainsi, l'augmentation du nombre des divisions cellulaires serait probablement corrélée au niveau de différenciation des cellules et leur capacité à devenir des cellules mémoires [4, 155, 156]. Pour tester cette hypothèse, des cellules activées, marquées au CFSE pour quantifier le nombre de divisions cellulaires subies, ont été transférées dans des souris receveuses [156]. Les cellules ayant réalisé le plus grand nombre de divisions avant le transfert, correspondent à celles qui se différencient rapidement en cellules mémoires [156]. Une autre étude réalisée par Jacob et al a permis d'obtenir des résultats similaires. Dans cette étude, une phosphatase (**PLAP**, *Placental Alkaline Phosphatase*) est placée sous le contrôle du promoteur CD2 et la recombinaison Cre sous le promoteur de GrB. L'expression de PLAP est bloquée dans la souris par une séquence STOP. Suite à l'activation des LT CD8, l'expression de Cre est induite et s'en suit la délétion de la séquence STOP par Cre, permettant ainsi l'expression de PALP. Après une immunisation avec LCMV, virtuellement toutes les cellules sont PALP positives (mais Cre négatives), suggérant que les cellules mémoires sont issues de cellules ayant exprimé GrB au cours de leur différenciation (mais qui ne l'expriment plus) [155]. Par ailleurs, il est possible de générer des cellules effectrices après une stimulation antigénique brève de 2h, *in vitro*. Les cellules activées peuvent alors se différencier en autopilote en cellules mémoires après transfert *in vivo* sans autre stimulation, montrant que des cellules mémoires peuvent être générées à partir de LT_{EFF} [157]. L'ensemble de ces résultats, suggère que lors de la stimulation antigénique, un programme de différenciation est initié et ce dernier permet dans un premier temps la différenciation des cellules naïves en cellules effectrices puis en cellules mémoires. Toutefois, d'autres études montrent qu'une génération des cellules peut avoir lieu sans génération préalable des cellules effectrices [158] et l'hypothèse d'une différenciation ramifiée est renforcée par l'identification des précurseurs des cellules mémoires (**MPECs**, *Memory Precursor Effector Cells*) au sein des LT_{EFF} (Figure 4).

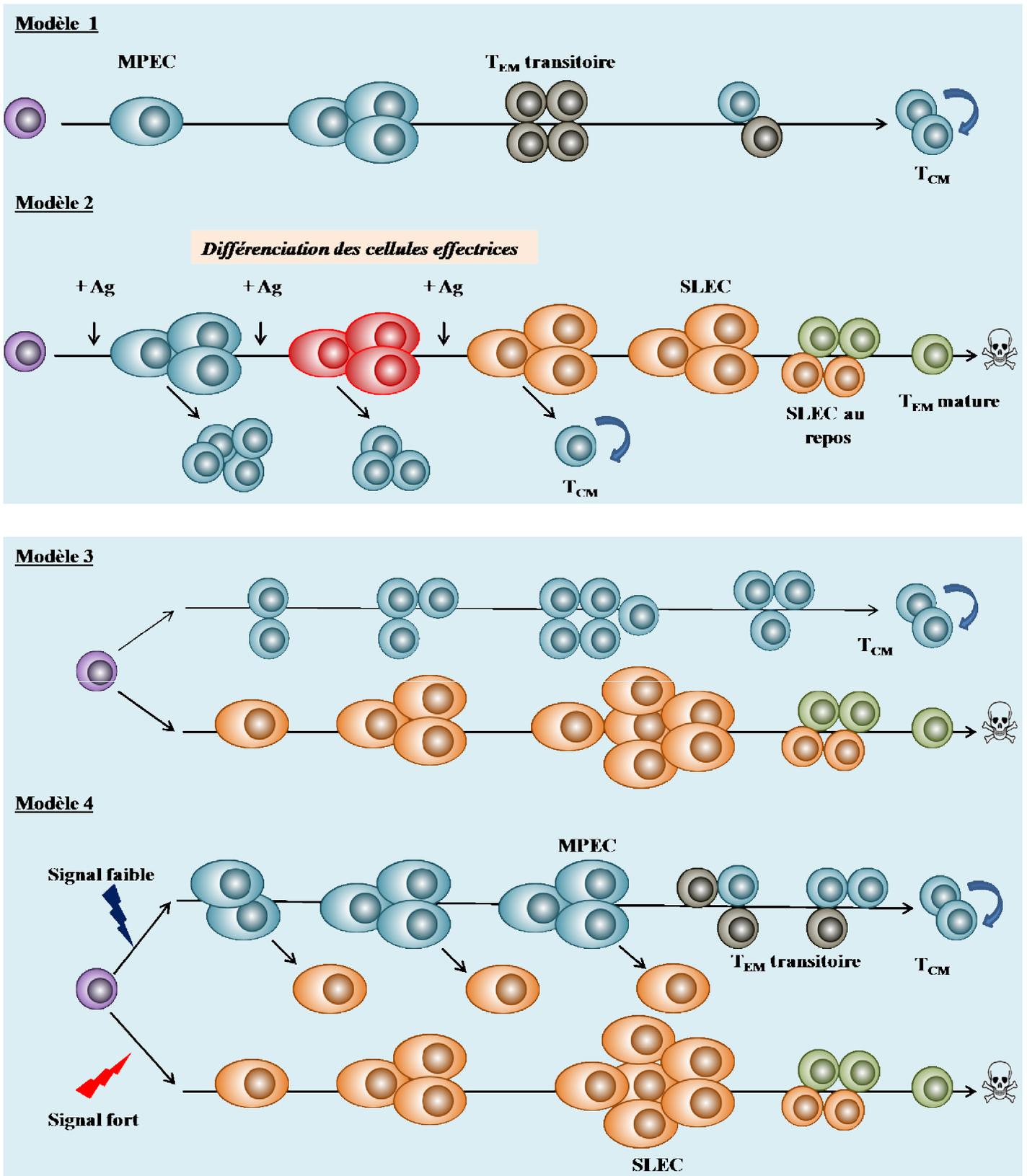


Figure 5. Modèles de différenciation des LT CD8⁺ mémoires (relation de lignage des populations T_{EM} et T_{CM})

- **Identification des précurseurs des cellules mémoires**

L'utilisation croisée des critères fonctionnels et des marqueurs cellulaires de surface a permis de discriminer parmi les LT CD8⁺ effecteurs, les MPECs, avec une capacité de survie accrue, des autres cellules effectrices à courte durée de vie (**SLECs**, *Short-lived Effector Cells*). En effet, les MPECs expriment de forts niveaux des molécules anti-apoptotiques Bcl-xL et Bcl2 ainsi que la molécule CD122 (IL-2/15Rβ) [143]. D'autres études réalisées dans des modèles murins d'infection pour le virus LCMV ou pour *L. monocytogenes* ont permis de montrer que les 2 marqueurs de surface KLRG1 et le récepteur à l'interleukine-7 (IL-7R) sont assez discriminants pour différencier les MPEC des SLEC [73, 148, 150]. En effet, l'expression de ces marqueurs de surface par les MPEC et SLEC est inversée, les SLEC sont KLRG1^{high} IL-7R^{low} et les MPEC KLRG1^{low} IL-7R^{high} [148]. Il faut noter cependant que la combinaison de ces deux marqueurs (KLRG1 et IL-7R) est inexacte dans certains cas pour différencier les MPEC des SLEC. En effet, certains LT_{EFF} (IL-7R^{high}) ne deviennent pas des cellules mémoires et certains LT CD8⁺ effecteurs KLRG1^{high} IL-7R^{low} peuvent persister quelque temps après une première et/ou une seconde infection [143, 148]. Enfin, des LT CD8⁺ effecteurs et mémoires peuvent exprimer simultanément KLRG1 et IL7-R [143, 148]. En outre, les méthodes d'activation non infectieuses des LT comme l'immunisation avec des DCs génèrent des LT CD8⁺ effecteurs qui expriment, presque dans leur globalité, le marqueur IL-7R même s'ils ne deviennent pas tous des cellules mémoires [63, 159]. Enfin, le niveau d'expression d'IL-6 permettrait également de distinguer les précurseurs des cellules mémoires [160]. Ces différents résultats soulignent l'hétérogénéité des LT CD8⁺ effecteurs et suggèrent des états de différenciation entre les SLECs et les MPECs et que d'autres paramètres sont à prendre en compte afin de discriminer finement ces 2 types cellulaires.

3.2.3. Les différents modèles de différenciation et l'hétérogénéité des sous-populations de cellules mémoires

Plusieurs modèles de différenciation (Figure 5) ont été proposés pour expliquer l'hétérogénéité des sous-populations des cellules mémoires et leur lien avec les MPECs et SLECs

- **Modèles de différenciation linéaire**

Modèle 1 : selon ce modèle de différenciation, la population de LT effecteurs est relativement homogène et chaque cellule possède la capacité de se différencier en cellules mémoires. Cependant la disponibilité des nutriments, des facteurs de croissance et d'autres ressources indispensables à leur survie, limiteraient leur nombre et seulement une fraction de ces cellules se différencierait en cellules mémoires [161]. Il faut noter cependant, que ce modèle n'explique pas l'hétérogénéité au sein de la population effectrice ou mémoire.

Modèle 2 : dans ce modèle, les LT naïfs possèdent les mêmes capacités à se différencier en cellules mémoires. Selon l'intensité de la stimulation antigénique, différents LT effecteurs seraient engendrés et donneraient ensuite naissance à différents types de LT mémoires [162]. Ce modèle est particulièrement utile pour expliquer la réponse des LT au cours d'une infection chronique ou latente ou une stimulation répétitive [163]. Ce modèle met surtout l'accent sur la stimulation antigénique *via* le TCR et ne fournit pas suffisamment d'informations sur l'implication d'autres signaux lors de ce processus de différenciation cellulaire.

- **Modèles de différenciation ramifiée**

Modèle 3 : suite à la stimulation antigénique, les LT seraient conduits à emprunter des voies de différenciation indépendantes selon la nature des co-sinaux (état physiologique de la DC, contexte cytokinique). Dans ce modèle de différenciation ramifiée, les cellules mémoires matures et effectrices coexisteraient au sein de la population de LT effecteurs [164, 165]. De plus, la génération des cellules mémoires se ferait sans génération préalable d'effecteurs et sans aucune phase de contraction [166]. En faveur de ce modèle, au pic de l'expansion clonale une fraction des LT possédant un phénotype de type mémoire seraient déjà présents et se maintiendraient plusieurs semaines après l'infection [167]. Il est d'ailleurs possible d'isoler assez précocement lors de la réponse immune, des LT CD4+ ne possédant pas la totalité de leurs fonctions mémoires mais capables de se maintenir à long terme [168]. En support de ce modèle, il a été observé dans une étude récente que lors de l'activation des LT naïfs, la première division cellulaire est asymétrique : la cellule fille proximale à la DC deviendrait une cellule effectrice alors que la cellule fille distale s'engagerait dans le lignage

des cellules mémoire [169]. Une autre étude récente réalisée par le groupe de Busch, a permis de montrer qu'une seule cellule naïve était capable de générer différentes sous-populations de cellules effectrices et mémoires suite à une stimulation antigénique [170]. Ce résultat suggère également que la diversification des cellules effectrices et mémoires se déroulerait pendant la phase d'expansion et dépendraient des facteurs liés au contexte de la réponse.

Modèle 4 : ce dernier modèle est une combinaison des trois autres modèles. En effet, il suggère l'existence des MPECs. Ces derniers ne sont pas des cellules mémoires complètement différenciées comme cela a été décrit dans le modèle 3 mais ils nécessitent des étapes supplémentaires pour acquérir des fonctions spécifiques aux mémoires comme la prolifération homéostatique. Toutefois, les MPECs générés dans ce modèle ne sont pas figés comme dans le modèle 1, ils gardent une certaine plasticité et peuvent donner des SLECs suite à une stimulation antigénique (persistance de l'Ag et/ ou inflammation). Selon ce modèle, l'engagement d'une cellule dans le lignage des cellules effectrices ou mémoires dépendrait de l'intensité globale des signaux (signal 1, 2 et 3) perçus lors de l'activation. Ainsi, un signal de forte intensité induirait une forte expansion clonale mais favoriserait la génération des cellules effectrices. Ce modèle diffère également du second modèle, l'engagement des cellules dans le lignage des MPECs ou des SLECs a lieu lors des premières divisions selon le niveau d'intensité des signaux reçus mais ne requiert pas une stimulation répétitive pour générer des cellules mémoires hétérogènes [127].

Ces différents modèles présentés découlent de résultats obtenus dans divers systèmes expérimentaux ; ils ne sont pas mutuellement exclusifs et il est possible que selon l'agent pathogène, son tropisme et les conditions d'activation des LT naïfs, plusieurs voies soient impliquées dans la génération des cellules effectrices et mémoires.

- **Lignage des T_{EM}/T_{CM} et leur lien avec les MPECs et les SLECs**

Le lignage et le lien des T_{CM} et T_{EM} ont été longtemps controversés. Plusieurs études, ont suggéré que les T_{CM} et les T_{EM} étaient figées et qu'il n'existait pas de conversion entre ces deux sous-populations au cours du temps (modèle 3, Figure 5) [158, 165, 171] alors que d'autres études suggèrent l'existence d'une conversion des T_{EM} en T_{CM} en absence de pathogène [128, 159, 163, 172, 173] (modèle 4). Les études récentes suggèrent l'existence de

trois sous-populations de cellules mémoires après une infection virale aiguë [128, 159, 163, 171]. Les T_{EM} issus des MPECs ($IL7R^{high}$) correspondraient à la sous-population transitoire ou capable de se convertir en T_{CM} au cours du temps en absence de pathogènes [128, 159, 163, 171]. Ainsi, la population des T_{CM} serait constituée de cellules avec des origines différentes : des cellules issues de la conversion des T_{EM} en T_{CM} et qui auraient acquis la capacité à se maintenir à long terme *via* une prolifération homéostatique [128, 163] et des cellules se différenciant directement à partir des MPECs ($CD62L^{high}$) présents au pic de l'expansion clonale. Toutefois, la comparaison de l'efficacité des fonctions effectrices de ces deux types de T_{CM} n'a pas encore fait l'objet d'une étude et l'on ignore si ces fonctions effectrices sont équivalentes. Enfin, le troisième groupe, les T_{EM} matures, correspondrait aux SLECs ($IL-7R^{low}$ $KLRG1^{high}$ $CD62L^{low}$). En effet ces derniers pourraient également entrer en phase mémoire et réduire par la suite leur niveau d'expression pour certaines molécules effectrices comme granzyme B. Ces SLECs au sein du groupe des mémoires n'auraient pas la capacité de persister à long terme *via* la prolifération homéostatique et non plus de se convertir en T_{CM} [148]. Cette population au repos pourrait donc correspondre à une étape de différenciation finale des T_{EM} . La répartition des cellules mémoires en T_{CM} , en T_{EM} transitoires/convertibles et des T_{EM} complètement différenciés, permettrait une meilleure compréhension et d'interprétation de la disparité des résultats obtenus dans ce domaine. En effet, un tel modèle pourrait expliquer l'hétérogénéité phénotypique et des capacités protectrices des T_{EM} observées à travers ces différentes études [108, 130, 154, 174-176]. La divergence de résultats dépendrait de la nature de l'infection et du moment choisi après l'infection pour l'analyse. En effet, ces deux paramètres auraient une incidence directe sur la fréquence des T_{EM} transitoires et des T_{EM} matures, générés lors de la réponse immune. Une réduction de l'intensité globale de tous les signaux indispensables à la stimulation des LT naïfs suite à une augmentation de la fréquence des précurseurs et la compétition interclonale, auraient pour conséquence un enrichissement de la population mémoire en T_{EM} transitoires [159]. Ces résultats montrent que les T_{EM} transitoires correspondraient à une étape particulière de la différenciation des cellules mémoires.

3.2.4. Les mécanismes responsables de l'hétérogénéité des cellules mémoires

- **Rôle des LT CD4+**

Diverses études ont montré que les signaux délivrés par les LT CD4+ et l'IL-2 seraient indispensables à l'expansion de LT CD8+ activés, à leur différenciation en cellules effectrices et à leur maintien [6, 51, 174, 177-184]. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'action de LT CD4+ sur la génération de LT CD8+. Un des premiers mécanismes consisterait à favoriser la rencontre entre les LT CD8+ et les DCs [35]. De plus, l'interaction entre CD40L/CD40 à la surface des LT CD4+ et des DCs, respectivement, rendrait la DC apte à initier la réponse T CD8+ [185-187]. Par ailleurs, on peut noter que les cellules générées en absence de LT CD4+ présenteraient des caractéristiques communes avec les T_{EM}, elles expriment à leur surface TRAIL et répondent moins bien lors d'un second contact [188]. En outre, il existerait un lien entre la surexpression de Tbet dans les LT CD8+ activés en absence de LT CD4+ et l'enrichissement de la sous-population mémoire T_{EM} [189].

En somme, les LT CD4+ contrôleraient le développement des cellules effectrices et mémoires *via* l'activation des DCs, l'interaction entre CD40/CD40L, l'IL-2, et la régulation de l'expression de TRAIL et de Tbet.

- **Rôle des facteurs des cytokines proinflammatoires et des facteurs de transcription dans la différenciation des cellules mémoires**

Contrairement aux LT CD8+, l'hétérogénéité des LT CD4+ associée à leurs fonctions effectrices est plus importante. Selon les signaux d'activation et le contexte cytokinique, un LT CD4+ naïf peut adopter l'une des voies de différenciation en cellules effectrices suivantes : IFN- γ et IL-12 \rightarrow Th1 ; IL-4 \rightarrow Th2 ; IL-6/TGF β /IL-1 β \rightarrow Th17 et TGF β \rightarrow T régulateurs (Treg) [190]. La compréhension de la différenciation des LT CD4+ nous est utile à la compréhension de celle des LT CD8+ effecteurs et mémoires. Certaines cytokines proinflammatoires peuvent contrôler le niveau d'expression des facteurs de transcription régulant la différenciation des LT CD4+ effecteurs. Le facteur de transcription **T-bet** est un régulateur important de la différenciation des Th1 et son association avec un autre facteur à boîte T, Eomesodermin (**Eomes**) contrôlerait l'acquisition des fonctions effectrices par les LT

CD8+ [191, 192]. L'IFN- γ est indispensable à l'induction de T-bet et le niveau d'expression de ce dernier est augmenté dans les LT CD4+ sous l'action de l'IL-12 [190] ; dans les LT CD8+ , l'IL-12 augmente l'expression de T-bet et réduit celle d'Eomes [148, 193]. Bien que ces cytokines proinflammatoires favorisent la génération des cellules mémoires de type Th1, il faut noter que ces mêmes cytokines peuvent aussi favoriser la génération des SLECs et donc limiter la génération des cellules mémoires. Les études récentes ont montré que l'IFN- γ favoriserait la contraction des LT CD8+ effecteurs et diminuerait le niveau d'expression de l'IL-7R [102]. Cependant, ce résultat est à nuancer avec l'étude de Whitmire et *al* qui montre que le récepteur de l'IFN- γ (IFNGR) serait requis pour la différenciation des LT CD8+ mémoires. Il est probable que ces résultats contradictoires soient liés aux systèmes d'étude [122]. Par ailleurs, les souris déficientes pour l'IL-12 (*Il12^{-/-}*) ont une fréquence élevée de MPECs (IL-7R^{high}) et de cellules mémoires générés suite à une infection de *Listeria* suggérant que l'IL-12 serait déterminante dans l'engagement des cellules dans le lignage des LT CD8+ effecteurs [193, 194]. En effet, le niveau d'expression de T-bet dans les LT CD8+ activés divise les cellules engagées vers le lignage des SLECs ou des MPECs. Ainsi, un fort niveau de T-bet favoriserait la formation des SLECs (KLRG1^{high} IL-7R^{low}) et un faible niveau d'expression favoriserait la formation des MPECs (KLRG1^{low} IL-7R^{high}) [148]. De façon similaire, une voie mettant en jeu l'IL-12 (et l'IL-18) pour contrôler le niveau d'expression de T-bet pourrait être requise pour la différenciation terminale des cellules NK (KLRG1^{high}) au cours d'une infection CMV chez la souris [195-198]. Selon ces résultats, T-bet favoriserait une différenciation divergente pour les LT CD4+ (Th1 vs Th2, Th17, et Treg) et CD8+ (SLECs vs MPECs) et une différenciation linéaire pour les cellules NK. Le rôle des cytokines tolérogéniques comme l'IL-10 pouvant réguler l'expression de l'IL-12 mérite d'être pris en considération dans ce processus. En effet, les souris déficientes pour l'IL-10 (*Il10^{-/-}*) génèrent peu de cellules mémoires suite à une infection par *Listeria* mais ce défaut ne serait pas lié à un effet direct de l'IL-10 sur les LT CD8+ [199, 200]. Cette étude suggère plutôt que l'équilibre entre l'expression d'IL-12 et d'IL-10 pourrait constituer un potentiel régulateur dans le développement des SLECs et des MPECs.

- **Rôles d'autres facteurs de transcription**

De façon similaire à T-bet, le facteur de transcription **ID2** (*Inhibitor of differentiation 2*) joue un rôle critique dans le développement des cellules NK et des LT CD8+ mémoires [201] et les LT CD8+ déficients pour ID2 génèrent préférentiellement des MPECs (IL-7R^{high} CD27^{high}) [202]. Un autre facteur de transcription, **Blimp-1** (*prdm1*), indispensable pour la différenciation terminale des LB en plasmocytes, est très exprimé par les SLECs [189, 203]. Les LT CD8+ déficients pour Blimp-1 ont un phénotype de cellules activées et de forte capacité proliférative, l'expression de Blimp-1 inhiberait la prolifération [204, 205]. Par ailleurs, les antagonistes potentiels de Blimp-1, Bcl-6, et son homologue, Bcl-6b favoriseraient la différenciation des cellules mémoires et favoriseraient également la réponse proliférative [206, 207]. Enfin, d'autres études suggèrent que la réduction des capacités prolifératives de LT CD8+ de phénotype KLRG1^{high} serait liée à la surexpression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{kip} [208] et leur incapacité à exprimer Bmi-1, un facteur de transcription favorisant la prolifération des LT [209].

4. Caractéristiques des cellules mémoires

Les LT mémoires diffèrent des LT naïfs par leurs capacités à disposer rapidement de leurs fonctions effectrices comme la cytotoxicité, la production des cytokines et la prolifération.

4.1. Les fonctions effectrices

4.1.1. La cytotoxicité

La cytotoxicité, une fonction effectrice acquise au cours de la réponse primaire, est aussi mémorisée par les LT CD8+ mémoires. En effet, les auteurs qui étudient ce paramètre détectent une activité cytotoxique dans les heures suivant le contact entre les LT CD8+ et leurs cibles *in vitro* [78, 210-214] comme *in vivo* [168, 215-217]. Cependant, la cinétique de cette activité cytotoxique des LT CD8+ mémoires diffère de celle des LT effecteurs. En effet, l'activité cytotoxique de cellules effectrices est détectée dès la première heure, voire les premières minutes suivant le contact avec les cibles, tandis qu'il faut quelques heures pour obtenir une lyse similaire avec des populations mémoires [78, 154, 214-216, 218]. Toutefois,

la lyse observée après 4 heures, *in vivo*, est équivalente pour les cellules mémoires ou effectrices [215]. Il existe également une hétérogénéité de l'activité cytotoxique au sein de la population mémoire. Une étude du groupe de L. Lefrançois a ainsi montré, dans des systèmes d'infection virale ou bactérienne, que les cellules mémoires ayant un potentiel cytolytique le plus élevé étaient localisées en périphérie plutôt que dans les organes lymphoïdes secondaires [210]. Une telle répartition suggère un lien entre capacités cytotoxiques et phénotypes T_{CM}/T_{EM} , d'autant plus que chez l'homme, l'expression constitutive de perforine semble restreinte à la sous-population T_{EM} [124]. Cependant, chez la souris, la comparaison de l'activité cytolytique de LT CD8+ mémoires de phénotype T_{CM} CD62L+ ou T_{EM} CD62L- par différents auteurs, *in vivo* ou *in vitro*, ne met pas en évidence de différences significatives entre ces 2 populations [108, 154, 215] utilisant pour cela des LT CD8+ mémoires T_{CM} et T_{EM} purifiés à partir de la rate, et l'on peut envisager que le microenvironnement périphérique puisse favoriser le développement d'une plus forte activité cytotoxique. Cette hypothèse est étayée par le fait que des LT CD8+ mémoires localisés dans la muqueuse intestinale expriment de plus forts niveaux de granzyme B que ceux qui sont situés dans la rate [141]

4.1.2. Production des cytokines

Plusieurs études ont démontré *in vitro* ou *ex vivo* que les cellules mémoires sont capables de produire l'IFN- γ et CCL5 plus rapidement suite à l'activation que les LT naïfs [103, 211, 212, 214, 219, 220]. Toutefois, il faut noter que pour d'autres cytokines comme CCL3, CCL4 et TNF- α , la cinétique de production est quasiment identique pour les cellules mémoires et naïves. En ce qui concerne l'expression de l'IL-2, plusieurs études ont montré une production hétérogène de cette dernière [154]. Les T_{EM} sécréteraient moins d'IL-2 que les T_{CM} et les LT naïfs [124].

La transcription rapide de l'ARNm de l'IFN- γ est liée à la déméthylation de son promoteur qui a lieu lors de la réponse primaire [221]. De plus, cette hypométhylation du promoteur peut être transmise aux cellules filles lors des divisions cellulaires. Ainsi, l'acquisition d'une hypométhylation au cours de la réponse primaire, qui permet de maintenir le gène en configuration « ouverte », serait responsable de la production rapide de l'IFN- γ lors de la réponse secondaire. En ce qui concerne la production de RANTES, Walzer et *al* ont

montré que l'ARNm mature de CCL5 était stocké dans le cytoplasme et non traduit en l'absence de stimulation antigénique. Contrairement à la production de l'IFN- γ , cette caractéristique permet aux LT mémoires de produire CCL5 de façon indépendante de la transcription [100]. Le maintien d'un fort niveau d'ARNm de CCL5 à long terme dans les LT CD8⁺ mémoires résulterait d'une transcription constitutive du gène associé à une stabilisation de l'ARNm produit [222]. De plus, aucun signal extérieur n'est nécessaire au maintien de la transcription autonome de *ccl5* par la cellule mémoire [223].

4.1.3. Prolifération

La comparaison des cellules naïves et mémoires de même spécificité a montré que les cellules mémoires avaient une grande capacité proliférative par rapport aux cellules naïves. Cette différence serait liée à la fréquence élevée de cellules capables de proliférer dans la population mémoire et aux paramètres du cycle cellulaire. Les études réalisées par Arpin [224] et *al* ont permis de montrer, *in vitro*, que les cellules mémoires possèdent une capacité clonogénique supérieure aux cellules naïves. Toutefois, *in vivo*, des différences intrinsèques peuvent être également observées au niveau des cellules qui répondent. Ainsi, Veiga-Fernades et *al* [225] ont modélisé la prolifération observée et calculé les paramètres suivants : le temps de latence séparant la stimulation et la première division est de 27 heures pour les cellules naïves et de 12 h seulement pour des cellules mémoires ; le cycle dure 19h pour les cellules naïves au lieu de 17h pour une cellule mémoire. De plus, la durée de vie d'une cellule naïve est de 42h au lieu de 62 h pour une cellule mémoire. Enfin, la capacité des cellules à entrer plus rapidement en cycle serait liée à la présence d'une kinase dépendante de cycline préactivée, Cdk6, dans le cytoplasme des cellules mémoires [225].

4.2. Maintien des cellules mémoires

4.2.1. Rôle du contact TCR/CMH dans la survie des cellules mémoires

Contrairement aux LT naïfs, le maintien des LT CD8⁺ mémoires est indépendant des interactions entre le TCR et le CMHp [226-229]. A l'opposé, une infection chronique altère la génération des LT mémoires et leurs fonctions effectrices sont profondément affectées. En effet, chez la souris, il a été clairement démontré qu'une infection virale chronique est souvent

associée à un épuisement des capacités prolifératives et des fonctions effectrices comme la cytotoxicité et la sécrétion des cytokines [230]. La perte de l'activité cytotoxique et l'incapacité à sécréter des cytokines ne sont pas les seuls signes d'un affaiblissement de la réponse des LT CD8+, la sénescence répllicative en fait partie également. Cet état de sénescence des LT CD8+ est caractérisé par une perte progressive de la capacité des cellules à proliférer suite à une stimulation par l'Ag ou *via* anti-CD3/anti-CD28 [231, 232] et par une réduction progressive de la longueur des télomères [233]. De plus, ces LT CD8+ sénescents peuvent exprimer à leur surface des récepteurs inhibiteurs du type de ceux habituellement exprimés par les cellules NK comme le récepteur KLRG1 [234, 235]. Les LT CD8+ spécifiques qui persistent au cours d'une infection chronique diffèrent par d'autres aspects des cellules mémoires générées suite à une infection aiguë. En effet, au cours d'une infection virale aiguë, la population des cellules mémoires générées s'enrichit en T_{CM} (CCR7⁺ CD62L⁺) au cours du temps mais l'expression de ces marqueurs est progressivement réduite si l'infection persiste et devient chronique (modèle 2, Figure 5) [128, 175]. La génération des T_{EM} (CCR7^{low} CD62L^{low}) et des cellules effectrices est prédominante au cours d'une infection chronique [108, 231, 236, 237]. Par ailleurs, les LT CD8+ mémoires générées suite à une infection chronique ne persistent pas lorsqu'ils sont transférés dans un environnement exempt de l'Ag pour lequel ils sont spécifiques [106]. Le maintien de ces cellules requiert les interactions avec le peptide viral et ne peut être accompli par des cytokines [106, 238-240]. Enfin, les LT CD8+ stimulés de façon chronique expriment également à leur surface PD1 [144, 241]. Ce marqueur membranaire est une molécule de costimulation inhibitrice appartenant à la superfamille de CD28 (Tableau 1). La molécule PD1 possède deux ligands appartenant à la famille des molécules B7 : PD-L1 (B7-H1) et PD-L2 (B7-DC). L'expression de PD1 dépend de plusieurs paramètres comme la répllication virale, la réaction inflammatoire associée à l'infection, la localisation anatomique de l'infection et la persistance de l'Ag. L'inhibition de PD1 induit la clairance de l'Ag responsable de l'infection chronique en rétablissant les fonctions effectrices des LT CD8+ mémoires [144].

4.2.2. Rôles des cytokines

Les études de Tough et ses collaborateurs ont permis de mettre en évidence le rôle essentiel de l'IL-15 dans le maintien des cellules mémoires. Leurs premières études

Etude bibliographique : activation et différenciation de LT naïfs en cellules effectrices et mémoires

montraient que les signaux présents sur les pathogènes (le LPS des bactéries gram négatif et le poly I : C mimant l'ARN double brin) sont capables de stimuler la prolifération de la population de phénotype mémoire MP CD8⁺ CD44^{high} *in vivo* [242, 243]. Cet effet passe par l'induction de la synthèse d'IFN de type I (IFN- α et IFN- β) qui à leur tour induisent la production d'IL-15, elle-même responsable de la stimulation directe de la prolifération des LT CD8⁺ CD44^{high} [244]. La restriction de la prolifération aux LT de phénotype mémoire corrèle avec le fait que ceux-ci expriment de forts niveaux de récepteurs à l'IL-15 [244]. Le récepteur de l'IL-15 est hétérotrimérique et seules les chaînes β (ou CD122, commune au récepteur de l'IL-2) et γ (chaîne γ_c commune aux récepteurs de l'IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 et IL-21) sont raccordées aux voies de signalisation en aval, la chaîne α étant responsable de la spécificité du récepteur qui sans elle peut lier l'IL-2. Or, si la population de LT CD8⁺ de souris IL-15R α ^{-/-} (la seule chaîne du récepteur spécifique de l'IL-15) ne répond pas à des signaux comme le poly I : C, son transfert dans un hôte sauvage restaure la réponse [245]. À l'inverse le transfert d'une population de LT CD8⁺ sauvages dans un hôte déficient pour l'IL-15R α ^{-/-} la rend insensible au poly I : C. C'est donc que l'IL-15R α ne doit pas nécessairement être présent sur le LT pour que l'IL-15 agisse, mais plutôt à la surface des cellules qui produisent l'IL-15. Cela suggère que l'IL-15R α fonctionnerait comme un transporteur intracellulaire de cytokine qui présenterait ensuite l'IL-15 à la surface cellulaire aux cellules receveuses pour signaler l'hétérodimère $\beta\gamma$ [246]. Des études récentes, suggèrent que la fixation de l'IL-15 par IL15R α formerait un complexe pouvant améliorer la transduction du signal *via* les deux chaînes $\beta\gamma$ [246]. Une telle potentialisation du signal, pourrait s'expliquer par un changement conformationnel de la cytokine ou de l'association des 3 chaînes ($\alpha\beta\gamma$). Les LT CD8⁺ mémoires et les cellules NK des souris injectées avec des complexes solubles (IL-15/IL-15R α), montrent une prolifération accrue. Ces résultats suggèrent que la forme active de l'IL-15 correspondrait à sa forme complexée avec l'IL-15R α . Ainsi, la cellule receveuse devrait interagir avec la cellule productrice de l'IL-15. L'IL-15 peut également potentialiser la survie des LT CD8⁺ mémoires, comme il a été démontré *in vitro* par la mise en culture de LT CD8⁺ mémoires en présence d'IL-15 soluble.

Par ailleurs, d'autres cytokines dont le signal passe par la chaîne γ_c , l'IL-7 et l'IL-2 ont aussi été impliquées dans la régulation du maintien des populations mémoires *in vivo*. La

prolifération homéostatique dépendrait en partie de l'IL-7 [65, 247, 248]. Contrairement aux LT CD8⁺ naïfs qui dépendent exclusivement pour leur survie et leur prolifération homéostatique de l'IL-7, la prolifération homéostatique des LT CD8⁺ mémoires n'est totalement abolie que lorsque les signaux délivrés par l'IL-7 et IL-15 sont absents [247, 248]. Le fait que l'IL-7 puisse partiellement compenser le manque d'IL-15 est de plus souligné par le fait qu'une population de phénotype mémoire peut être obtenue dans des souris déficientes pour l'IL-15 mais surexprimant l'IL-7 [249]. Les LT mémoires ont donc gardé leur sensibilité à l'IL-7 et ont de plus acquis la sensibilité à l'IL-15, ce qui permet de réguler séparément l'homéostasie des populations naïves et mémoires.

En ce qui concerne l'IL-2, son rôle n'est pas encore bien caractérisé. S'il est clair que cette cytokine ne peut remplacer l'IL-15, comme le fait l'IL-7 par exemple, des données récentes montrent que l'injection d'IL-2 recombinante stimule la prolifération homéostatique des LT CD8⁺ mémoires [250]. Cette prolifération est encore augmentée si un anticorps dirigé contre l'IL-2 est coinjecté. Cet anticorps monoclonal, utilisé dans des études précédentes pour bloquer le signal IL-2 [251], augmente l'activité biologique de l'IL-2 en s'y complexant contrairement à d'autres anticorps monoclonaux anti-IL-2 qui inhibent cette prolifération ce qui complique l'interprétation de certains résultats. Il semble donc que l'IL-2 potentialiserait la prolifération des LT CD8⁺ mémoires. Certains résultats suggèrent cependant que la population régulatrice de LT CD4⁺ CD25⁺ stimulé par l'IL-2 puisse aussi jouer un rôle inhibiteur dans la régulation de la prolifération homéostatique des LT CD8⁺ mémoires [250, 252].

Pour ces différentes études, le rôle des différents signaux dans le maintien des LT CD8⁺ mémoires a été établi en étudiant la population mémoire dans sa globalité sans prendre en compte l'existence de nombreuses sous-populations. Il est probable que d'autres signaux nécessaires au maintien des cellules mémoires n'ont pu être caractérisés au cours de ces différentes études.

INFLAMMATION STERILE ET REPOSE DES LT CD8+

L'inflammation est une réponse du système immunitaire à une infection ou à une lésion tissulaire dont la fonction est de favoriser la cicatrisation des tissus atteints, de restaurer leurs fonctions et leur homéostasie. La classification de la réponse inflammatoire se fait généralement en fonction de la durée. Contrairement à une réponse inflammatoire aiguë qui est limitée dans le temps, une réponse inflammatoire chronique est exacerbée, prolongée dans le temps (semaines, mois et années) et peut entraîner des pathologies. En effet, suite à une altération excessive du tissu ou d'une cicatrisation anormale, les lésions tissulaires peuvent persister et déclencher des pathologies comme la dermatite allergique de contact (**DAC**). Cette pathologie de la peau est un modèle d'étude de réponse inflammatoire spécifique de l'Ag, notamment grâce au modèle expérimental d'eczéma allergique de contact aux haptènes, chez la souris, appelé l'hypersensibilité retardée de contact (**HSRC**). Ce modèle présente également un autre intérêt : celui d'étudier la réponse de LT dans un contexte inflammatoire stérile, c'est-à-dire en absence d'agents pathogènes. Dans la partie qui va suivre, il sera présenté l'état des connaissances actuelles sur la physiopathologie de l'HSRC et le rôle des différentes populations lymphocytaires dans cette pathologie.

1. Les haptènes et leurs caractéristiques chimiques

Les haptènes sont des molécules chimiques caractérisées par leur faible poids moléculaire et capables de traverser la barrière cutanée. Ces molécules ont des origines très diverses, elles peuvent être issues des composés synthétiques (résines, colorant, conservateurs, parfums), des métaux (nickel, chrome, or), des végétaux (urushiol ou poison ivy) ou provenir des médicaments comme la pénicilline. Les haptènes ne sont pas reconnus directement par le système immunitaire, ils ne sont pas immunogènes. Cependant, ils ont la capacité de se fixer à certains acides aminés des protéines du soi, qui jouent le rôle de protéine « carrier » ou porteuses ; cette propriété leur permet de devenir immunogènes. Les groupements électrophiles des haptènes interagissent avec les résidus nucléophiles (lysine, cystéine et histidine) des protéines porteuses en établissant, selon le cas, des liaisons covalentes ou non covalentes. Les groupements électrophiles des haptènes correspondent généralement à des aldéhydes, des cétones, des amides ou des liaisons polarisées. Les cations

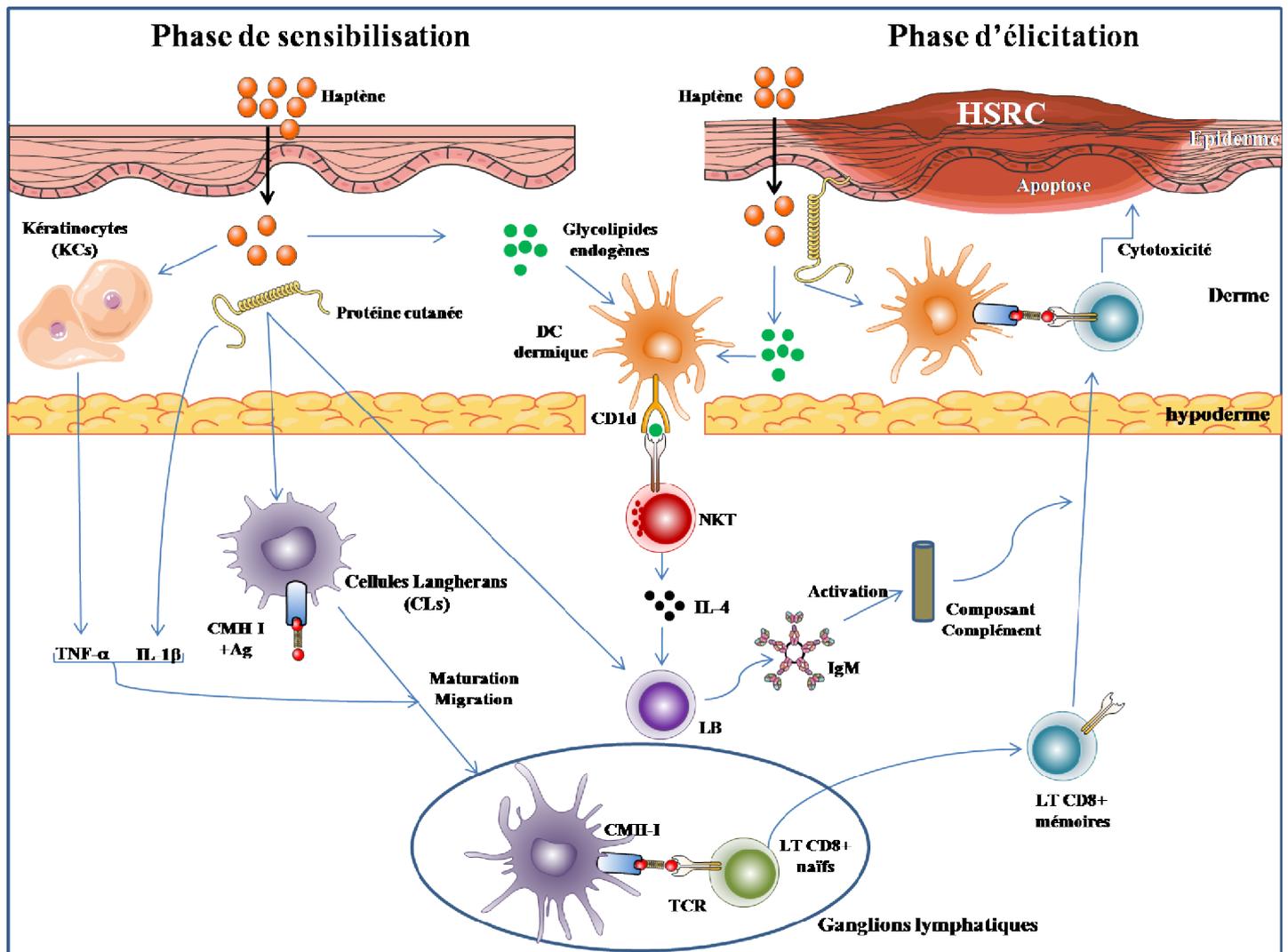


Figure 6. Physiopathologie de la dermatite allergique de contact (DAC). Au cours de la phase de la sensibilisation de la DAC, l'haptène appliquée sur la peau interagit avec les protéines cutanées pour former des complexes protéiques. Ces complexes sont endocytés par les CLs et sont présentés aux LT *via* la molécule de CMH-I. L'application cutanée de l'haptène entraîne également la libération des médiateurs proinflammatoires par les kératinocytes (KCs) et les CLs : TNF- α et l'IL-1 β . Ces médiateurs proinflammatoires induisent ensuite la maturation des CLs et leur migration vers les ganglions lymphatiques drainants pour activer les LT spécifiques de l'haptène. Les LT activés, vont proliférer et se différencier en cellules mémoires. Enfin, l'application cutanée de l'haptène induit la production des IgM par les LB B-1. Cette production est favorisée par la présence d'IL-4 qui serait fournie par les cellules NKT. Pendant la phase d'élicitation, les IgM et les allergènes vont agir en synergie pour activer les composants du complément et cela aura pour conséquence la libération des facteurs inflammatoires et chimioattractants par les mastocytes et les cellules endothéliales. Ainsi, les LT CD8+ spécifiques de l'haptène, sont recrutés au site d'application de l'haptène, activés par les DCs de la peau et déclenchent la réponse HSRC.

comme le Ni²⁺ souvent impliqués dans la DAC sont, par définition, électrophiles [253]. En ce qui concerne les groupements nucléophiles des protéines porteuses, leur degré d'ionisation va dépendre du pH de leur environnement et de leur localisation dans la peau [253]. Certains composés chimiques ne sont pas électrophiles à la base mais peuvent acquérir des caractéristiques des haptènes après leur oxydation avec l'air ou suite à des transformations liées au métabolisme cutané. En somme, le rôle d'un haptène dans l'initiation de la DAC dépend de plusieurs paramètres comme leur structure tridimensionnelle, leur lipophilicité et leur affinité à se fixer aux protéines cutanées [253]. L'ensemble de ces paramètres constituent le pouvoir sensibilisant d'un haptène. Ainsi, un haptène ayant un fort pouvoir sensibilisant est dit fort et faible dans le cas contraire. Un haptène comme le DNFB est dit fort, il est capable de sensibiliser 90 % des individus après un simple contact. En revanche, les haptènes dits « faibles » ne vont sensibiliser qu'une faible partie de la population, ce pourcentage pouvant varier de 5% dans le cas des haptènes métalliques à des pourcentages plus faibles de l'ordre de 0.01% s'il s'agit de la paraphénylène diamine (**PPD**). Enfin, le pouvoir de sensibilisation des haptènes est proportionnel à leur pouvoir proinflammatoire qui se traduit par l'activation de l'immunité innée *via* l'induction d'un signal danger aux cellules cutanées [254].

2. Physiopathologie de l'HSRC

L'HSRC est une réponse immune présentant (i) une première phase dite de sensibilisation souvent muette et (ii) une phase d'élicitation ou de révélation. Au cours de la phase de sensibilisation, les haptènes ayant traversé la barrière cutanée sont captés par des cellules présentatrices d'Ag comme les cellules de Langerhans (CLs), qui migrent jusqu'aux ganglions et y entraînent l'activation de LT naïfs (Figure 6). Les LT activés prolifèrent puis rejoignent la circulation lymphatique et sanguine, certains LT allant se localiser dans le derme. Lors d'une seconde rencontre avec le même haptène sensibilisant, les DCs réactivent les LT spécifiques de l'haptène. Ils produisent des cytokines entraînant l'activation d'autres cellules et la production de cytokines pro-inflammatoires. Les cellules mono- et polynucléées de la réponse inflammatoire sont alors recrutées dans l'épiderme et le derme. Cette phase de révélation se caractérise donc par une réaction inflammatoire qui se produit entre 24 heures et 48 heures après le second contact avec l'allergène.

3. Les composants cellulaires de la DAC

Dans la partie qui va suivre, nous allons présenter les deux principales cellules résidentes cutanées qui jouent un rôle important dans le déclenchement de la DAC. Il s'agit des cellules de Langerhans (CLs) et des kératinocytes (KCs).

3.1. Les cellules de Langerhans (CLs)

Les CLs correspondent à une sous-population des DCs, elles ont été identifiées pour la première fois par Paul Langerhans en 1868. Elles ont pour principale fonction la présentation des Ags qu'elles capturent à la périphérie aux LT naïfs au niveau des ganglions lymphatiques. Toutefois, des études récentes ont démontré l'implication des CLs dans l'innervation de l'épiderme et leur capacité à répondre à de nombreux neurotransmetteurs [255]. Les CLs sont issues de la lignée hématopoïétique myéloïde, elles expriment donc à leur surface des marqueurs comme CD33 et CD13. Chez l'homme, la molécule CD1a sert aussi de marqueur pour les CLs. Elles expriment également des molécules d'adhérence comme l'E-cadhérine qui leur permet d'adhérer aux kératinocytes [256]. La présence des granules de Birbeck [257], puis l'expression de la Langerine ont été utilisés pour identifier les CLs de façon spécifique [258] bien qu'une population de DCs du derme exprimant la Langerine ait été identifiée récemment [259].

3.1.1. Internalisation des allergènes

Les DCs peuvent internaliser les Ags par trois mécanismes différents : la macropinocytose, la phagocytose et l'endocytose *via* des récepteurs membranaires. La macropinocytose est la capacité des DCs immatures à internaliser constitutivement le fluide extracellulaire [260]. La phagocytose permet aux DCs d'internaliser des particules entières, comme des billes de latex ou des parasites cutanés présents dans l'environnement [261]. Enfin un autre mode de capture plus sélectif est l'endocytose dépendante de récepteurs membranaires. Ainsi, les CLs, utilisent des lectines de type C (Langerine), leur permettant de capturer des Ags glycolipidiques d'origine bactérienne (mycobactéries) ou virale [262, 263], et la lectine Dectine 1, récepteur des β -glucanes [264]. En ce qui concerne les agents

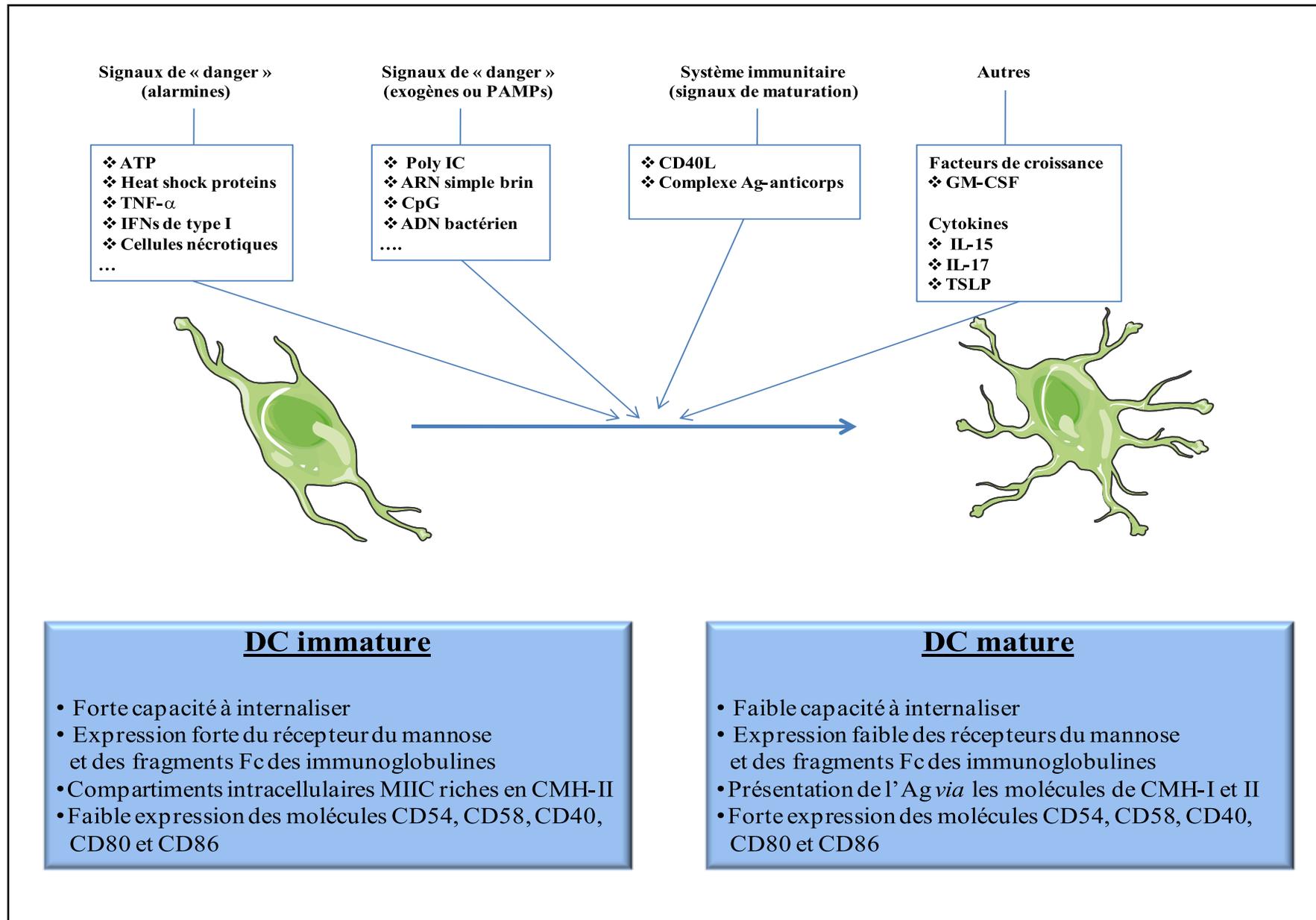


Figure 7. Caractéristiques des DCs immatures et matures

pathogènes opsonisés, ils peuvent être reconnus par des récepteurs des fragments Fc d'IgG par les CLs qui expriment CD64 (FcγRI), CD16 (FcγRII) et CD32 (FcγRII) [265].

En ce qui concerne les haptènes, leur prise en charge par les CLs est plus complexe, ils ont la capacité de se fixer à des protéines solubles ou à des protéines membranaires. Ainsi, les allergènes solubles sont endocytés par macropinocytose et les allergènes membranaires sont phagocytés. Il faut noter cependant que dans des contextes bien particuliers, certains haptènes avec des propriétés lipophiles peuvent traverser la membrane plasmique et se fixer directement aux protéines du cytosol [266]. Selon la présence ou non de l'allergène dans le cytosol, sa présentation aux LT CD8+ se fera par présentation directe sur les molécules de CMH-I ou par présentation croisée.

3.1.2. Maturation

Plusieurs stimuli sont capables d'induire la maturation des DCs (Figure 7). Selon le modèle de signal « danger », le système immunitaire inné serait capable de discriminer ce qui est dangereux de ce qui ne l'est pas. Les bactéries, les virus, les champignons, les vers parasites mais également les tumeurs malignes et les cellules nécrotiques peuvent mettre en péril la survie de l'organisme [267]. Toute molécule qui désigne un microorganisme ou une cellule comme une menace pour l'individu est un signal « danger » ou **DAMPs** (*Damage Associated Molecular Patterns*) [268, 269]. Ces signaux constituent donc une véritable étiquette « danger », reconnue comme telle par le système immunitaire inné. Les DAMPs peuvent être subdivisés en 2 catégories de signaux de « danger » : (i) les signaux exogènes (**PAMPs**, *Pathogen Associated Molecular Pattern*), portés par les pathogènes et (ii) les signaux endogènes (alarmines), produits par l'organisme lui-même et portés ou libérés par des cellules nécrotiques, infectées ou tumorales [268, 269].

- **Les signaux de « danger » exogènes ou PAMPs**

Les signaux de « danger » exogènes correspondent à des motifs moléculaires présentant les trois propriétés suivantes : (i) ces signaux sont délivrés par des agents pathogènes; (ii) ils sont communs à de nombreuses espèces de micro-organismes pathogènes, ce qui permet de compenser le nombre limité de récepteurs nécessaires à leur reconnaissance

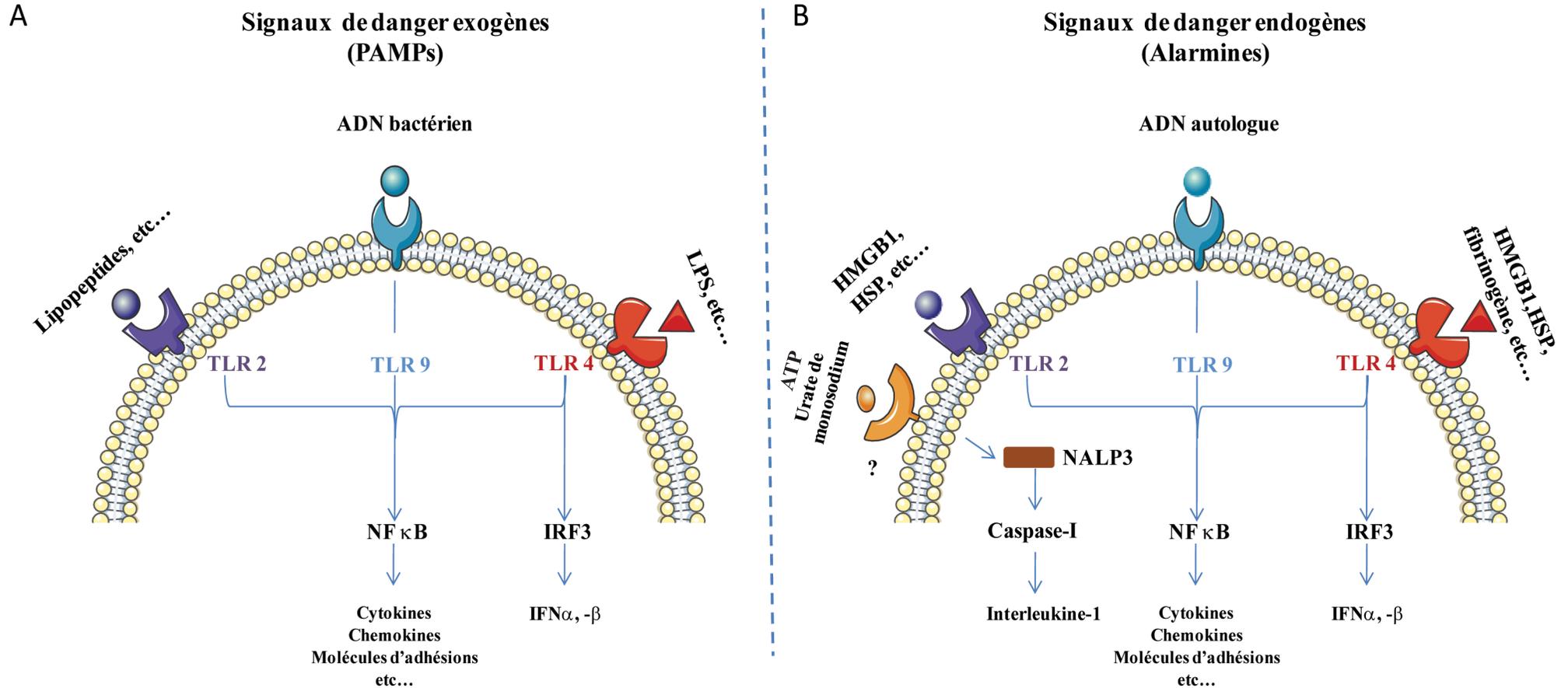
Danger	Signaux de danger	Récepteurs	Médiateurs inflammatoires	Références
	HMGB1	RAGE/TLRs		[269, 286, 287]
	S100	RAGE/TLRs		[288-290]
	HSPs	TLR		[291]
Cellules nécrotiques (EL4)	?	?	IL-1 α	[292]
	Acide urique	NALP3	IL-1 β	[293, 294]
	ATP (extracellulaire)	NALP3	IL-1 β	[295, 296]
Irritants cutanée	?	NALP3	IL-1 β	[283, 297]
UVB	?	NALP3	IL-1 β	[298]

Tableau 5. Exemples des signaux de danger et leurs récepteurs (d'après Fabio Martinon [299]). EL4(lignée murine de lymphome), HMGB1(*High Mobility Group Box 1*), HSP(*Heat Shock protein*), RAGE(*Receptor for Activated Glycation Endproducts*)

par rapport à l'énorme diversité des micro-organismes potentiellement infectieux ; et (iii) les molécules qui présentent ces motifs sont essentielles à la survie des micro-organismes, ce qui limite l'apparition de mutants pouvant échapper à la reconnaissance [270]. La nature biochimique des PAMPs est très diverse. Ils peuvent être constitués d'oligosaccharides, d'acides gras, d'acides nucléiques ou de peptides modifiés. De nombreux PAMPs peuvent combiner plusieurs de ces fonctions biochimiques comme le lipopolysaccharide (**LPS**) des bactéries Gram- qui est formé d'oligosaccharides et d'acides gras.

- **Les signaux de « danger » endogènes**

Contrairement aux PAMPs, les signaux de « danger » endogènes ou alarmines sont des molécules produites par l'organisme suite à un stress cellulaire [269]. Les cellules nécrotiques constituent une source importante de signaux de « danger » endogènes. En effet, lorsque l'agression physique, chimique ou biologique d'un tissu est trop intense, elle entraîne la nécrose des cellules qui le composent. Contrairement à la mort par apoptose, la mort cellulaire par nécrose ne correspond pas à l'exécution d'un programme de mort et est associée à une rupture de la membrane plasmique. En conséquence, la mort d'une cellule par nécrose libère des alarmines dans le milieu extracellulaire et est souvent associée à une réaction inflammatoire, activent la réponse immunitaire innée et les phagocytes pour éliminer les débris cellulaires [271]. Les alarmines sont capables d'activer le système immunitaire inné et adaptatif, elles participent également à la restauration de l'homéostasie des tissus lésés. Le tableau 4 récapitule quelques exemples des signaux de danger et leur récepteur.



Figures 8. Exemples de récepteurs impliqués dans la reconnaissance des PAMPs et des alarmines (d'après Kenneth *et al*, [300]). Les récepteurs Toll-like (TLR) sont capables de reconnaître à la fois des signaux de danger exogènes (A) et endogènes (B). Suite à leur activation par les signaux de danger, les TLRs induisent l'activation des facteurs de transcription comme NFκB et, dans certains contextes, le facteur de transcription **IRF3** (*interferon regulatory factor 3*). L'activation de ces facteurs de transcription aboutit à la mise en place de la réaction inflammatoire. La voie de signalisation de l'urate de monosodium comprend un récepteur intracellulaire Nod-like receptor NALP3 et induit la production de la cytokine proinflammatoire, l'IL-1. **HMGB1** (*high mobility group box 1*) ; **HSP** (*heat shock protein*).

- **Les récepteurs des DAMPs ou PRRs**

Les **PRRs** (*Pattern Recognition Receptors*), récepteurs des DAMPs, appartiennent à la famille des molécules **TLR** (*Toll-like receptor*), des molécules **RLRs** (*RIG-I-like Receptors*) et **NLRs** (*Nod-like Receptors*) [272, 273].

Les TLR jouent un rôle important dans l'activation des cellules de l'immunité innée et constituent des interfaces moléculaires entre immunité innée et immunité adaptative. Les récepteurs Toll, ont été identifiés pour la première fois par le groupe de Jules Hoffman [112] chez *Drosophila melanogaster*. Plus tard, une recherche de molécules similaires à Toll chez les mammifères a permis d'identifier une famille de molécules apparentées, appelées *Toll-like receptors* (TLRs), qui présentent les mêmes spécificités structurales que la molécule Toll. A ce jour, 13 molécules ont été identifiées (TLR-1 à -13) dont 10 sont formellement identifiés chez l'homme. Les homologies de séquences et l'organisation génomique des gènes, ont permis d'identifier cinq sous-classes de TLR qui reconnaissent des ligands de structures similaires : TLR-1, -2, -6 (et -10) reconnaissent des lipoprotéines ; TLR-4 le LPS entre autres ; TLR-5 (et -11) des protéines bactériennes ; TLR3 de l'ARN ; TLR-7, -8 et -9 des séquences ARN ou ADN. Ainsi, les TLRs sont spécialisés dans la reconnaissance des agents pathogènes mais ils sont aussi impliqués dans la reconnaissance des alarmines [274] (Figure 8).

En ce qui concerne les RLRs, ils sont constitués des hélicases cytosoliques **RIG-I** (*Retinoic acid-inducible gene-1*) et **MDA5** (*Melanoma differentiation-associated gene 5*) et participent à la reconnaissance des virus [273, 275].

Les NLRs sont aussi présents dans le cytosol et sont constitués de 20 membres chez l'homme [276]. Ils sont capables de reconnaître les bactéries intracellulaires et de nombreux signaux de danger endogènes. La physiologie des NLRs chez les mammifères n'est pas encore bien caractérisée. Toutefois certains membres des NLRs comme **NOD2** (*Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*) et **NALP3** sont bien décrits. Le récepteur NOD2 est capable de détecter les composants bactériens comme le peptidoglycane [277, 278] et d'activer le facteur de transcription NF- κ B, alors que NALP3 est impliqué plutôt dans l'activation de la caspase 1, qui induit à son tour la production de l'IL-1 β [279, 280]. Plusieurs stimuli, y compris la reconnaissance d'un pathogène peuvent activer NALP3 et

induire une réponse inflammatoire *via* la production de l'IL-1 β [281, 282]. Enfin, NALP3 est également nécessaire à l'induction de l'HSRC [283].

Par ailleurs, les récepteurs NLRs sont organisés en trois domaines : (i) le domaine C-terminale reconnaît les PAMPs, (ii) le domaine central est indispensable pour la transduction du signal et (iii) le domaine N-terminal possède des fonctions effectrices et qui, selon le récepteur, peut être un domaine pyrine (*PYD*) comme pour le récepteur cryopyrine ou un domaine pouvant recruter et activer des caspases (**CARD**, *Caspase recruitment Domain*) comme pour NOD 2. Ainsi, l'activation des récepteurs NODs ne se limite pas à l'initiation d'une réaction inflammatoire mais elle participe également à la régulation de l'apoptose de la cellule infectée [284]. Un dysfonctionnement des récepteurs NLRs est souvent associé à des pathologies chroniques comme la maladie de Crohn et les infections causées par *Helicobacter pylori* [277, 285].

- ***Rôle de l'ATP produit par les KCs dans la maturation des DCs, suite à une sensibilisation avec un haptène***

De nombreux stimuli environnementaux peuvent induire la libération des nucléotides comme l'ATP ou l'ADP [301-307]. Ainsi, l'étude réalisée par Mizumoto et *al* a permis de montrer que plusieurs irritants chimiques peuvent induire la libération de l'ATP par les KCs [308]. Les nucléotides libérés dans le milieu extracellulaire peuvent réguler la différenciation, la migration, les fonctions sécrétrices, la croissance et la mort des DCs, en se fixant à des récepteurs purinergiques de type 2 exprimés à leur surface [309-312]. Ces récepteurs peuvent activer NALP3 et la déficience de NALP3 se traduit par une résistance à l'HSRC au DNFB [283]. Ainsi, les DCs peuvent détecter la présence de l'ATP dans le milieu extracellulaire et cela a pour conséquence la surexpression des molécules CD54, CD80, CD86 et CD83 à leur surface cellulaire [313]. Par ailleurs, Grabbe et *al* ont démontré que l'irritation cutanée est requise pour induire une réponse HSRC [314]. Ainsi, l'ATP libéré par les KCs traités avec l'haptène pourrait contribuer à l'activation des CLs dans la phase de sensibilisation de l'HSRC [308].

- *Les haptènes comme signaux de maturation*

Chez la souris, l'application d'un haptène sur la peau induit la surexpression des molécules de CMH-II et de costimulation (CD40, CD54, CD80 et CD86) à la surface des CLs [315]. Enk et *al* ont également montré que la production de l'IL-1 β par les CLs pouvait être déclenchée suite à l'application de l'haptène sur la peau [316]. En outre, les études réalisées *in vitro* à partir des cellules dendritiques dérivées des monocytes humains (**MoDC**) ont permis de montrer que les haptènes comme le Chlorure de Nickel (NiCl₂) et le dinitrochlorobenzène (DNCB) sont capables d'activer les MoDCs alors que les irritants comme le sulfate de sodium lauryl (**SLS**) et le chlorure de benzalkonium (**BC**) en sont incapables [317]. L'activation des MoDCs se traduit par la surexpression de CD54, CD86, HLA-DR et l'augmentation de la production des cytokines proinflammatoires. De plus, l'utilisation des cellules dérivées des monocytes sanguins (MoDC) en présence de **TGF- β 1** (*Transforming Growth Factor β 1*), de GM-CSF et de l'IL-4, a permis de montrer que le traitement des MoDCs avec un haptène *in vitro* induisait les mêmes changements phénotypiques et fonctionnels que ceux qui sont observés au niveau des CLs *in vivo* [318]. En effet, lors de la phase d'initiation de la réaction d'hypersensibilité *in vivo*, l'expression de **CLA** (*Cutaneous lymphocyte-associated Antigen*) et E-cadhérine est moindre à la surface des CLs alors que celle des molécules comme MMP-9 [319], β 1-intégrines [320, 321], CD44 et ses variantes augmentent considérablement [322], des modifications qui peuvent être reproduites *in vitro*.

Les mécanismes moléculaires par lesquels, les haptènes induisent la maturation des MoDCs ne sont pas bien connus. Cependant, les études réalisées *in vitro* par Kuhn et *al*, ont permis de montrer que des haptènes comme le DNFB sont capables d'induire la formation des phosphotyrosine dans les MoDCs, suggérant qu'ils sont capables d'induire un signal dans ces cellules [323]. De plus, une étude récente réalisée par Arrighi et *al* a également montré que le DNFB et le sulfate de Nickel (NiSO₄) induisent la phosphorylation de **MAPK p-38** (*Mitogen Associated Protein Kinase*), et que la surexpression de CD80 et CD83 à la surface des MoDCs induite par NiSO₄, peut-être réduite de moitié par l'utilisation des anticorps monoclonaux spécifiques de MAPK p-38 [324]. Le rôle de MAPK p-38 et de NF- κ B a été également étudié dans les DCs stimulées par des haptènes comme le NiCl₂ et le DNCB [325]. La stimulation des MoDCs humaines par le DNCB induit la phosphorylation de p-38 et de

SAPK/JNK, alors que le NiCl₂ induit la phosphorylation d'IκB et l'activation de NF-κB. Par contre, les seuls irritants comme le SLS et le BC n'activent pas ces voies de transduction du signal. Ces résultats montrent que le NiCl₂ et le DNCB peuvent activer les MoDCs *via* différentes voies de transduction du signal de maturation et donc induire différentes modifications phénotypiques et fonctionnelles des MoDCs.

3.1.3. Migration des CLs vers les ganglions lymphatiques

Suite à l'application cutanée de l'haptène, la densité des CLs au niveau de la peau est réduite de moitié durant les 24 heures après la sensibilisation [326-328]. Ce phénomène s'explique par la migration des CLs vers les ganglions drainants [328-330]. Les mécanismes responsables de la migration des CLs de la périphérie vers les ganglions, sont contrôlés par des cytokines et des chimiokines. En effet, l'injection intradermale du TNF-α induit la migration des CLs, alors que l'injection des anticorps monoclonaux bloquant le TNF-α, inhibe leur migration [331-333]. Les CLs expriment de façon exclusive à leur surface, les récepteurs au TNF-α (**TNFR2** pour *TNF Receptor type 2*) qui ne possèdent pas de domaine de mort. Ainsi, le TNF-α ne peut agir en induisant la mort des CLs mais plutôt leur migration [334, 335]. Ces observations ont été validées par les études réalisées sur les souris déficientes pour le récepteur TNFR2 ; les CLs issues de ces souris survivent à l'application de l'haptène mais sont incapables de migrer vers les ganglions drainants [336].

L'IL-1 appartient à la famille des cytokines proinflammatoires au même titre que l'IL-18. Ces cytokines sont impliquées dans la migration des CLs, suite à une application cutanée de l'haptène, pendant la phase de sensibilisation [337-339]. Parmi ces cytokines, l'IL-1β joue un rôle important et induit la production du TNF-α par les KCs. L'IL-1 β produite de façon autocrine par les CLs, agit en synergie avec le TNF-α pour initier leur migration. Les souris déficientes pour l'IL-1 β, TNF-α ou TNFR2, ont une réponse HSRC réduite. Ces résultats suggèrent l'implication de TNF-α et IL-1 β dans la phase d'initiation de la DAC [340-342].

Enfin, les CLs matures migrent vers les ganglions drainants, du fait de la perte de molécules d'adhésion comme la E-cadhérine [343] et les récepteurs de chimiokines comme CCR6 [344] qui les maintiennent dans des tissus périphériques. Elles vont cependant, exprimer d'autres molécules d'adhésion et récepteurs de chimiokines, comme CCR7 [344],

récepteur aux chimiokines CCL19 (MIP-3 β) et 21 (SLC) produites au niveau des ganglions lymphatiques [345, 346]. D'autres études ont également montré que CCR7 agissait en synergie avec CCR8, récepteur de CCL-1 (I-309 chez l'homme et TCA-3 chez la souris) au cours de la migration des CLs de la peau ou des poumons vers les organes lymphoïdes secondaires [347]. Enfin, la maturation s'accompagne de l'acquisition de la capacité à présenter efficacement les antigènes phagocytés (Figure 7).

3.2. Les kératinocytes (KCs)

La couche superficielle de la peau est en majeure partie constituée des kératinocytes (KCs). Ces cellules jouent un rôle important dans la pathogénèse de la DAC. En effet, suite à un contact avec l'haptène, les KCs peuvent moduler la maturation et la migration des CLs vers les ganglions lymphatiques, en produisant du TNF- α [348]. Ils interviennent notamment dans le dialogue à deux signaux nécessaires à la migration de CLs. L'IL-1 β sécrétée par les CLs se fixe à son récepteur exprimé à la surface des KCs et induit la production du TNF- α , second signal nécessaire à l'activation subséquente et la migration des CLs vers les ganglions [349]. Les KCs participent également au recrutement de LT. En effet, les LT produisant de l'IFN- γ , expriment également à leur surface la molécule CD11a capable de se fixer à la molécule ICAM-1 (CD154) et l'INF- γ induit l'expression de la molécule ICAM-1 à la surface des KCs [350], facilitant ainsi le recrutement de LT au niveau de l'épiderme [350, 351]. L'ensemble de ces données montre que les KCs ont un rôle actif dans la pathogénèse de la DAC.

Par ailleurs, l'IFN- γ a également un autre effet sur les KCs, il induit la surexpression de la molécule de CMH-II à la surface des KCs [352]. Ainsi, les KCs sont capables de présenter des Ag aux LT CD4+, mais à la différence des CPA professionnelles, les KCs expriment faiblement les molécules CD80 et CD86. Or ces dernières, comme nous avons vu dans les chapitres précédents, sont indispensables pour une activation productive de LT. Ainsi, les KCs pourraient limiter ou écourter la réponse de la DAC, en induisant une anergie clonale de LT CD4+ stimulés par l'Ag en absence de costimulation. Ils pourraient entrer en compétition avec les autres APCs pour présenter les Ags aux LT CD4+ recrutés au niveau de la peau, en particulier dans l'épiderme. Ainsi, contrairement aux LT CD4+ qui interagissent

avec les KCs, ceux qui interagissent avec les CLs vont s'activer et proliférer. Par ailleurs, les LT anergiques surexpriment à leur surface le récepteur à l'IL-2 et peuvent entrer en compétition avec les LT activés pour ce facteur de croissance. Cela pourrait servir à limiter la DAC. Dans le but de valider cette hypothèse, des souris transgéniques dont les KCs expriment de façon constitutive les molécules costimulatrices CD80 et CD86 ont été créées. La sensibilisation de ces souris avec un haptène, induit une réponse HSRC exacerbée pouvant se maintenir durant les 8 semaines suivantes, alors que la durée d'une réponse HSRC normale chez une souris sauvages est de 24 heures [353, 354]. Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle les KCs jouent un rôle important dans la résolution de la réponse HSRC. Des études récentes ont démontré que les individus qui ne développent pas la DAC suite à leur exposition à un haptène comme le NiCl₂, possèdent des KCs qui expriment des faibles niveaux des molécules CD80 et CD86. Ce résultat suggère que l'intensité des signaux de costimulation délivrés par les KCs serait importante dans la sensibilité des individus à la DAC et que les KCs limitent la DAC principalement par l'induction de cellules anergiques. Cette hypothèse mérite d'être validée par des études supplémentaires. En effet, les KCs surexpriment, suite à une inflammation, **RANKL** (*Receptor Activator of nuclear factor κ B ligand*) [355]. Le récepteur de RANKL est exprimé à la surface des CLs, son activation induit l'expression à leur surface de marqueurs comme CD86 et CD205 [355]. Or, l'expression de CD205 par les DCs est souvent associée à la génération de LT CD4⁺CD25⁺ qui régule la réponse immunitaire [356], et la surexpression de RANKL induit la génération de LT CD4⁺CD25⁺ *via* un mécanisme dépendant des CLs [355]. De plus, les rayons ultraviolets (UV), qui sont connus pour avoir un effet suppresseur sur la réponse HSRC, sont capables d'induire l'expression de RANKL à la surface des KCs [355, 357]. Ainsi, la régulation de l'HSRC par les KCs pourrait passer par la production des LT régulateurs dont on sait qu'ils sont impliqués dans la résolution de l'HSRC.

Par ailleurs, d'autres résultats suggèrent que, suite à un contact avec un haptène, l'IL-10 produite par les KCs aurait un effet inhibiteur sur la réponse HSRC [348, 358]. Ainsi, les KCs peuvent également produire de l'IL-16, une cytokine proinflammatoire indispensable au chimiotactisme des cellules immunitaires, suite à un contact avec un haptène [359]. Ainsi, les KCs joueraient également un rôle dans la phase d'élicitation de la DAC.

L'ensemble de ces résultats démontrent l'importance des KCs dans la DAC. Les KCs facilitent le recrutement des cellules immunes dans les tissus au cours de la phase d'élicitation de la DAC, mais jouent aussi un rôle important dans la suppression de la réponse inflammatoire *via* l'IL-10, la génération des cellules anergiques et l'activation/recrutement de LT régulateurs (Tregs). Ainsi, un dysfonctionnement des KCs pourrait être impliqué dans des pathologies de la peau comme les dermatites chroniques.

4. Les populations lymphocytaires impliquées dans la DAC

4.1. Les lymphocytes T (LT)

Les LT spécifiques de l'haptène sont activés dans les ganglions lymphatiques par des APCs et prolifèrent pendant la phase de sensibilisation. Les LT générés circulent alors dans le sang avant d'être recrutés au niveau de la peau lors d'une seconde exposition à l'haptène. Un délai de 48 à 72h sépare généralement l'exposition à l'haptène et la mise en place de la réaction inflammatoire par les LT. Les cellules effectrices de la DAC sont des LT CD8+ [360-363]. Cela a pu être démontré en déplaçant, *in vivo*, les LT CD4+ ou les LT CD8+ à l'aide d'anticorps monoclonaux dans un modèle murin de la DAC [364]. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation des souris déficientes pour divers gènes. En effet, l'inactivation d'un gène permettant l'expression de la molécule du CMH-I chez la souris, a pour conséquence l'absence de LT CD8+ et dans un tel contexte, aucune réponse HSRC au DNFB n'a pu être observée. Par contre, les souris n'exprimant pas la molécule de CMH-II, sont dépourvues de LT CD4+ et développent une réponse HSRC prolongée au DNFB. Ces résultats suggèrent, que les LT CD8+ peuvent être stimulés en absence de LT CD4+ et sont responsables de la réponse HSRC au DNFB [363]. L'utilisation des souris déficientes pour la molécule CD4, par opposition aux souris déficientes pour la molécule de CMH-II, ont fourni des résultats contradictoires. En effet, la réponse HSRC au DNFB diminue considérablement dans les souris déficientes pour la molécule CD4 [365]. Par la suite, d'autres études ont montré que la réponse HSRC dans ces souris est en fait due à l'altération des fonctions de LT CD8+ spécifiques de l'haptène [366]. Les souris déficientes pour la molécule de CMH-II sont dépourvues de LT CD4+ mais les fonctions des LT CD8+ spécifiques de l'haptène ne sont pas altérées [362].

La majorité des études réalisées confortent l'idée selon laquelle les LT CD8+ jouent un rôle effecteur au cours de la phase de sensibilisation dans la DAC [362]. Toutefois, les études réalisées avec le trinitrophenyle (TNP), un haptène fort capable de déclencher une réponse de type HSRC, ont permis de montrer que les LT CD4+ et CD8+ pouvaient avoir tous les deux un rôle effecteur [362]. En effet, les souris déplétées en LT CD8+ peuvent déclencher une réponse HSRC au TNP et cette dernière ne peut être abolie que si les LT CD4+ sont déplétés également [362]. Les études réalisées *in vitro*, ont permis de démontrer que les LT CD8+ spécifiques d'haptènes pouvaient induire l'apoptose de LT CD4+ *via* la voie Fas/FasL [362]. Il est donc possible que pendant la phase de sensibilisation, les LT CD8+ induisent l'apoptose de LT CD4+, expliquant en partie pourquoi les LT CD8+ sont les effecteurs qui prédominent dans la réponse HSRC aux haptènes forts comme le DNFB [367]. Bien que les LT CD4+ helper (Th) ne jouent pas un rôle central dans la pathogénèse de la DAC, les cytokines indispensables à leur prolifération/ activation joueraient un rôle important dans le développement de la réponse HSRC. En effet, l'IL-12 a plutôt un effet amplificateur sur la réponse HSRC en inhibant la production des cytokines comme l'IL-4 et l'IL-10 [368]. Les APCs et en particulier les CLs produisent l'IL-12 indispensables à la différenciation des LT CD4+ vers Th1 en augmentant l'IFN- γ dans les LT [369]. De plus, l'IL-12 produite par les KCs, suite à un contact avec l'haptène induit la prolifération des Th1 [364]. Les études réalisées *in vivo* ont montré que les phases d'initiation et d'élicitation de la DAC au DNFB sont très affectées par l'utilisation des anticorps monoclonaux spécifiques de l'IL-12 [370]. Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle l'IL-12 jouerait un rôle important dans la pathogénèse de la DAC [371]. Cependant, l'utilisation des souris déficientes pour l'IL-12 n'a pas d'effet notable sur la réponse HSRC. Cela pourrait s'expliquer en partie par le fait que les cytokines ont des fonctions redondantes et de ce fait l'absence d'IL-12 peut être compensée par d'autres cytokines proinflammatoires dans l'activation des LT CD8+ [372]. L'IFN- γ qui est également produit par les LT CD8+ participe aussi de la DAC [373].

Cette cytokine est un composant important de la réponse inflammatoire, elle induit le recrutement et l'activation des monocytes en potentialisant l'expression de l'ICAM-1 et de CMH-I [374]. Les souris déficientes pour l'IFN- γ et sensibilisées avec des haptènes forts comme le TNCB, ne présentent pas de défaut dans la mise en place de l'œdème associée à la réponse HSRC. En revanche, le recrutement des monocytes au niveau du site de

l'inflammation, est très affecté. Ces résultats suggèrent que l'IFN- γ serait indispensable pour le recrutement des cellules proinflammatoires au niveau des tissus mais pas pour la mise en place de l'œdème cutané [374]. Les fonctions de l'IFN- γ seraient chevauchantes avec celles d'autres cytokines [374]. En effet, de nombreuses cytokines ont été identifiées comme potentiellement impliquées dans la pathogénèse de la DAC.

4.2. Les lymphocytes B (LB)

Comme la mise en place de la DAC, présente des similitudes avec l'HR, une majeure partie des études visant à caractériser la physiopathologie de la DAC se sont focalisées sur le rôle de LT CD4+, de LT CD8+, des CLs et non sur les LB. Cependant, les études récentes réalisées à partir de souris présentant des déficiences pour la molécule C5, un composant du système du complément, ont une réponse HSRC au chlorure de picryle (**PCL**, pour *Picryl chloride*) très affectée [375]. De plus, la réponse HSRC au PCL peut être rétablie en injectant un sérum contenant C5 en concentration élevée [375, 376]. Des résultats similaires ont été obtenus, en administrant à des souris sauvages des anticorps monoclonaux spécifiques de C5 ou sCR1, récepteur soluble pouvant neutraliser C5. Ces résultats suggèrent que C5 est requis pour la réponse HSRC. En outre, les souris déficientes pour le récepteur de la forme activée de C5 (C5a), ont une réponse HSRC réduite et le chimiotactisme des leucocytes est également réduit [377]. La molécule C5a est indispensable pour le chimiotactisme des leucocytes et la stimulation des réponses inflammatoires locales. Or le déclenchement de l'activation du complément dépend des anticorps produits par les LB, cela suggère que ces derniers pourraient jouer un rôle important dans la pathogénèse de l'HSRC [378, 379] (Figure 6).

La population des LB est constituée de deux sous-populations appelées B-1 et B-2. Les LB B-1 expriment une IgM de surface mais l'IgD est très peu exprimée [380]. Les LB B-1 sont beaucoup moins soumis à l'hypermutation somatique et à la commutation de classe que le groupe B-2 de LB [380]. Ces derniers correspondent aux LB classiques circulant dans les organes lymphoïdes secondaires et capables de produire toutes les sous-classes d'anticorps. Les souris déficientes pour les LB B-1 développent une HSRC réduite au PCL mais qui peut être rétablie en administrant à la souris des anticorps monoclonaux (IgM) spécifiques de l'haptène ou en transférant de LB B-1 ou encore en administrant un sérum provenant de souris sauvages sensibilisées avec l'haptène 24h auparavant [381]. Au cours de la phase de

sensibilisation de l'HSRC, les LB B-1 proliféreraient rapidement durant les premières 24h et produiraient des IgM, alors que l'activation des LB B2 se met à peine en place à ce stade [382]. Ces résultats soulignent l'importance des IgM dans la réponse HSRC. Par ailleurs, il faut noter que les LT circulants et sensibilisés sont incapables de déclencher une réponse HSRC après une exposition à l'Ag en absence des anticorps spécifiques. En résumé, les IgM produites par les LB B-1 activeraient le complément (C5) et la forme activée (C5a) de ce dernier se fixerait à son récepteur à la surface des mastocytes et des plaquettes (production des cytokines proinflammatoires comme le TNF- α) pour recruter les cellules effectrices [382]. Bien que l'activation de LB B-1 soit indépendante de LT, les cellules **NKT** (*Natural Killer T*) pourraient être impliquées.

4.3. Les cellules NKT

Les cellules NKT correspondent à une sous-population de LT pouvant être définies par l'expression du marqueur CD161 également connu sous le nom NK1.1 (classiquement exprimée par les cellules NK) et les deux chaînes α/β du TCR. Les NKT sont généralement considérés comme faisant partie du système immunitaire inné. Bien que les NKT expriment un TCR à leur surface cellulaire, il n'existe pas de réarrangement de ce TCR, qui est invariant [383]. Ainsi, leur répertoire serait très limité dans la reconnaissance des Ags. Le TCR des **iNKT** (*invariant NKT*) reconnaît *in vivo* les Ags glycolipidiques dans un contexte CD1d, une molécule semblable à la molécule de CMH-I et exprimée par les CPA. L'identité des glycolipides reconnus par les iNKT, *in vivo*, est encore inconnue. Les iNKT activés produisent des cytokines comme l'IL-2, TNF- α , IL-4 ou IFN- γ en fonction du microenvironnement. Certains des iNKT possèdent aussi la fonction de cytotoxicité associée aux LT CD8+ et aux NK [384]; cependant, le contrôle et la fonction de cette activité cytotoxique *in vivo* sont encore inconnus. Les cellules NKT sont impliquées dans la défense de l'hôte contre les agents infectieux aussi bien que dans la pathogénèse de nombreuses maladies comme l'asthme, l'hépatite auto-immune, le diabète et le lupus [383, 385-389]

Les NKT jouent un rôle important dans la pathogénèse de l'HSRC au PCI [390]. En effet, la déficience de la molécule CD1d chez la souris affecte la réaction. Il est à noter que l'application cutanée de l'haptène a pour conséquence immédiate, la prolifération rapide des iNKT dans le foie mais pas dans les ganglions lymphatiques, la rate ou la cavité péritonéale

[390]. De plus, le transfert adoptif d'iNKT isolés du foie des souris sauvages aux souris déficientes (CD1d^{-/-}) permet de restaurer la réponse HSRC. A l'opposé, un transfert adoptif de monocytes contenant des LT effecteurs, mais pas des LB, provenant des souris sauvages sensibilisées 4 jours auparavant, ne permet pas de restaurer la réponse HSRC dans les souris déficientes pour CD1d, 24 heures après la sensibilisation [381, 391]. Ces résultats suggèrent que les cellules iNKT soient impliquées dans l'activation de LB B-1. Par ailleurs l'administration intraveineuse de l'IL-4, une cytokine produite de façon rapide par les iNKT et connue pour activer les LB B-1, restaure la réponse HSRC dans les souris déficientes pour iNKT, suggérant que l'activation de LB B-1 par les iNKT se fait *via* la production de l'IL-4 [390].

Chez les souris déficientes pour l'IL-4, la réponse HSRC est réduite mais elle peut être rétablie en administrant l'IL-4 ou en réalisant un transfert adoptif de LB B-1 provenant des souris sauvages sensibilisées 24 auparavant [392]. La réponse HSRC réduite des souris déficientes pour les LB ne peut être rétablie que par le transfert de LB B-1 provenant des souris sauvages. Un transfert adoptif de LB B-1 issus des souris déficientes pour le récepteur à l'IL-4 ou STAT6, une molécule intracellulaire indispensable pour la transduction du signal IL-4, ne permettent pas restaurer la réponse HSRC, suggérant que l'IL-4 est indispensable pour l'activité de LB B-1 [392]. Des études réalisées *in vitro* à partir des cellules iNKT purifiées du foie, ont permis de caractériser le rôle de ces dernières dans la production de l'IL-4. En effet, ces cellules iNKT sont capables d'activer les LB B-1 provenant des souris sauvage ou des souris déficientes pour l'IL-4 [393]. Ce résultat démontre que l'IL-4 activant les LB est produit par les cellules iNKT. En outre, d'autres études ont également montré que la production de l'IL-4 par les cellules iNKT serait dépendante du signal transduit *via* les récepteurs Toll [394]. L'ensemble de ces résultats indiquent que l'activation des cellules iNKT a lieu très tôt après la sensibilisation avec l'haptène et que la production de l'IL-4 qui s'en suit va permettre l'activation de LB B-1 en présence de l'haptène pour produire des IgM. Les mécanismes impliqués dans la prolifération/activation sélective des iNKT dans le foie et non dans un autre organe ne sont pas encore connus.

4.4. Les LT régulateurs (Tregs)

Différentes études ont été initiées afin de caractériser les mécanismes de régulation de l'intensité et de la durée de l'HSRC. Une des premières observations, a permis de montrer que, suite à une injection intradermique d'IL-10, l'HSRC au DNFB pouvait être abolie [395]. De plus, les souris génétiquement déficientes pour l'IL-10, ont une réponse inflammatoire exacerbée. De façon similaire, les souris sauvages traitées avec des anticorps neutralisant l'IL-10 ont également une réponse HSRC accrue [396, 397]. Ces observations ont permis de démontrer le rôle de l'IL-10 dans la régulation de la DAC [396, 397]. Cependant, l'IL-10 comme l'IL-4 et l'IL-5 sont généralement sécrétées par les LT CD4⁺ de type Th2, suggérant que ces derniers seraient impliqués dans leur production et a fortiori dans la régulation de l'HSRC. En effet, les souris sensibilisées au DNFB, déficientes pour le CMH-II et en LT CD4⁺ ont une HSRC exacerbée par rapport aux souris sauvages [360]. Durant ces dernières années, de nouvelles populations de LT CD4⁺ impliquées dans la régulation de la DAC ont été décrites. La plus étudiée de ces sous-populations correspond aux LT régulateurs. Ces derniers expriment constitutivement, en plus de la molécule CD4, la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25), CTLA-4 et **Foxp3** (*Forkhead box P3*) ; ces différentes molécules sont aussi utilisées pour l'identification de ces cellules [398-400]. Initialement, il a été démontré que les Tregs jouaient un rôle important dans la suppression des maladies autoimmunes [398]. Les interactions cellules-cellules étaient supposées être le principal mécanisme par lequel les Tregs exerçaient leur fonction immunosuppressive dans la DAC et plusieurs maladies autoimmunes *via* la molécule CTLA-4, qui est très affine pour les molécules de costimulation CD80/CD86 et capable d'inhiber la production de l'IL-2 indispensable à la prolifération de LT effecteurs [401]. Les Tregs peuvent surexprimer la molécule CLA, vraisemblablement après leur interaction avec les DCs, avant de migrer vers la peau [402]. Les Tregs sont recrutés spécifiquement au niveau de la peau suite à l'application d'un haptène. Chez les individus qui ne développent pas la DAC au nickel, les Tregs sont capables d'inhiber l'activation de LT effecteur, tandis que les Tregs d'individus qui développent la DAC, sont incapables d'inhiber l'activation de LT effecteurs spécifiques du nickel *in vitro*, ces résultats suggèrent l'implication des Tregs dans la suppression de la DAC et la tolérance aux haptènes [403, 404].

L'ensemble de ces résultats est à nuancer, suite à une étude récente qui montre très clairement que la fonction immunosuppressive des Tregs n'est pas liée aux interactions cellules-cellules mais plutôt à la production de l'IL-10 [405]. Cette nouvelle sous-population des Tregs a été isolée et caractérisée à partir de la peau d'un individu souffrant de la DAC [404]. Ces cellules correspondent à des Tregs de type 1 (Tr1) et diffèrent des Tregs classiques par leur capacité à produire en grande quantité l'IL-10 [406]. Les Tr1 sont capables d'inhiber l'activation de LT effecteurs spécifiques d'un haptène *via* l'IL-10 [406]. Bien que les Tregs et Tr1 fonctionnent indépendamment l'un de l'autre, les cytokines immunosuppressives produites par les Tregs participeraient à l'activation des Tr1 [407]. Les Tregs et les Tr1 agiraient donc en synergie pour réguler la réponse lymphocytaire T aux haptènes [408].

4.5. Les cellules NK

Les cellules NK sont un composant important du système immunitaire inné. Elles n'expriment pas à leur surface de TCR et ne reconnaissent pas de façon spécifiques les Ags. De plus, elles n'auraient pas la capacité de se différencier en cellules mémoires. Cependant, une étude récente réalisée par O'Leary *et al* a permis de montrer à la fois l'implication des cellules NK dans la réponse HSRC et leur capacité à porter une mémoire spécifique de l'haptène [409]. Dans cette étude, les auteurs ont utilisé des souris déficientes génétiquement pour le gène de recombinaison **Rag2** (*Recombination activating gene 2*) et ne contenant pas de LT et B, le gène *rag2* étant requis pour le réarrangement des BCR et des TCR. Si les souris ont été sensibilisées avec du DNFB alors la réponse HSRC est accrue lors d'un second contact avec le même haptène et non avec un autre haptène que le DNFB. Ce résultat montre bien que l'HSRC peut être induite de façon spécifique en absence de LT et B. Le recrutement des cellules NK au niveau de la peau, suite à l'application du DNFB est rapide et la réponse HSRC peut être abolie en déplaçant les cellules NK. En outre, le transfert adoptif des cellules NK isolées du foie des souris (*rag2*^{-/-}) dans une souris receveuse déficiente en cellules NK, en LT et B, a permis de restaurer la réponse HSRC au DNFB [409]. L'ensemble de ces résultats a permis de montrer qu'en absence de LT et B, les cellules NK hépatiques auraient la capacité de déclencher une réponse HSRC spécifique de l'haptène et porteraient également une mémoire spécifique de l'haptène.

Conclusion de la partie bibliographique

A travers cette introduction bibliographique, nous avons pu montrer la plasticité, l'hétérogénéité et l'efficacité des cellules mémoires dans la réponse immunitaire secondaire. Nous avons également pu voir que la génération de ces cellules mémoires dépendait de nombreux signaux délivrés lors de la réponse immunitaire primaire. Selon les études récentes, les cytokines proinflammatoires ou la division asymétrique des cellules filles seraient des paramètres clés pouvant expliquer la programmation ou l'engagement des cellules naïves dans les différentes voies de différenciation aboutissant à l'hétérogénéité des cellules mémoires. Une meilleure compréhension de ces signaux et de ces voies de différenciation permettrait des progrès significatifs dans la mise au point de nouveaux vaccins ou de prophylaxies dans le cas des pathologies comme la DAC.

RESULTATS

1. Les différents systèmes expérimentaux utilisés : avantages et contraintes

1.1. La lignée des souris F5 transgéniques : outil de génération des cellules mémoires

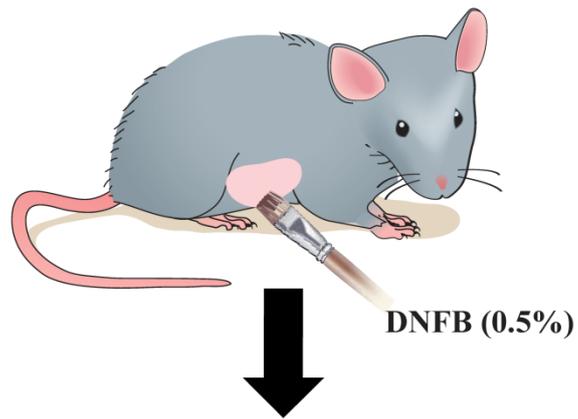
Notre équipe étudie les changements phénotypiques et fonctionnels qui ont lieu lors de la différenciation de LT naïfs en LT mémoires. Pour ce faire, nous utilisons des souris transgéniques pour le TCR (lignée F5). Cette lignée de souris transgéniques, créée par l'équipe de D. Kioussis [410], contient une construction permettant l'expression des chaînes α et β du TCR F5 ($V\alpha 4$ et $V\beta 11$) sous la dépendance du promoteur CD2 humain (hCD2). La plupart (85 à 90 %) de LT des souris F5 sont CD8, les autres correspondent à des LT CD4. Contrairement à ces derniers, la majorité (95%) des LT CD8 expriment le TCR F5 reconnaissant le peptide 366-374 (ASNENMDAM) de la nucléoprotéine (NP) du virus de l'influenza (souche A/NT/68) présenté par la molécule CMH-I H2-D^b. Une double injection de 50 nmol de peptide NP68, à 24 heures d'intervalle, par voie intrapéritonéale en solution saline induit l'activation de LT CD8 F5 à la périphérie [411, 412]. Cette activation de LT CD8 se traduit par leur expansion clonale avec pour conséquences, l'augmentation de leur nombre dans la rate, dans les ganglions lymphatiques et leur différenciation en cellules effectrices. Après le pic de la réponse, il s'en suit une phase de contraction des cellules effectrices, le reste des cellules se différencie en cellules mémoires [219, 411, 412]. Ces dernières sont en compétition avec les émigrants thymiques. Pour pallier à cela, les injections de peptide sont réalisées généralement dans des souris thymectomisées. Cette opération n'altère pas la réponse de LT CD8 F5 et leur différenciation en cellules mémoires, et permet d'obtenir un grand nombre de LT CD8⁺ mémoires homogènes et non contaminées par les émigrants thymiques naïfs.

Les travaux de l'équipe ont également permis de caractériser la population mémoire obtenue après immunisation de souris F5 à l'aide de peptide. En effet, ils ont permis de montrer l'existence de deux sous-populations de LT CD8 mémoires dans le système F5, lorsque ces dernières sont immunisées avec le peptide en solution saline comme décrit plus haut, la plupart des cellules mémoires générées sont de phénotype $CD44^{int} CD122^{int} Ly6c^{+} CD62L^{+}$ et une faible portion de ces cellules mémoires sont de phénotype $CD44/122^{high} Ly6c^{+}$

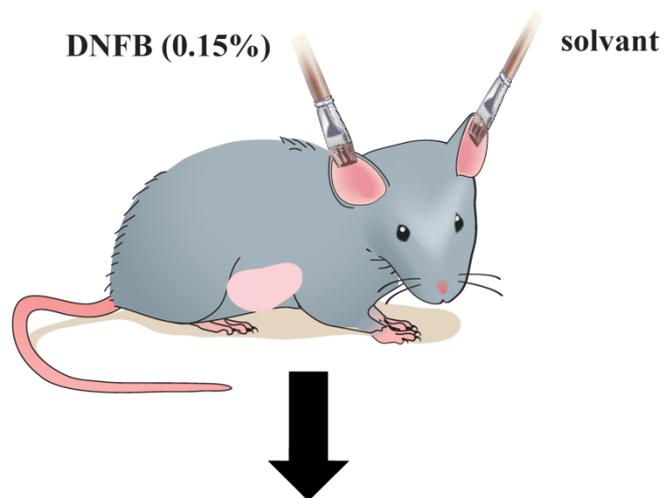
CD62L⁺ si les souris ont reçu une double injection du peptide NP68 [413]. La population mémoire CD44/122^{int} possède des fonctions améliorées par rapport aux cellules naïves. En effet, les études réalisées par Pihlgren et al ont permis de montrer une hyperréactivité de ces cellules, *in vitro*, en présence d'IL-2 et leur capacité à entrer en prolifération pour des doses de peptide moindre que celles qui sont nécessaires pour activer les LT naïfs [219, 412]. Cette hyperprolifération s'expliquerait par une proportion plus importante des cellules capables d'entrer en division au sein de la population mémoire en comparaison à la population naïve [224]. Par ailleurs, d'autres études réalisées par Pihlgren et Walzer et al ont permis de montrer que ces cellules étaient capables de sécréter rapidement l'IFN- γ dans les heures suivant la stimulation antigénique [219, 220] et dans un encore délai plus court (20 minutes) pour la chimiokine RANTES [100].

Enfin, la persistance de ces cellules mémoires a été également étudiée *in vivo* à l'aide des marquages BrdU. Les résultats montrent que la capacité de résistance à l'apoptose des cellules mémoires CD44^{int}CD122^{int} ne diffère pas de façon significative de celle des cellules naïves (CD44^{low}CD122^{low}) [219, 412, 413]. De plus, la demi-vie des populations naïves et mémoires CD44/122^{int}, *in vivo*, est équivalente dans des souris thymectomisées [413]. Ce résultat s'expliquerait par le faible niveau d'expression de CD122 [219] à la surface de ces cellules mémoires et qui les rendrait moins sensibles à l'IL-15. L'ensemble de ces données et des différentes caractéristiques des cellules mémoires générées dans les souris F5 est récapitulé dans le tableau 6.

**Phase de sensibilisation
(J0)**



**Phase d'élicitation /
Challenge (J5)**



**Mesure oedème de
l'oreille (J6 à J9)**

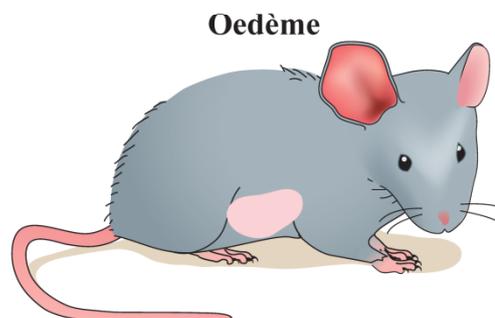


Figure 9. Modèle standard d'étude d'eczéma de contact (adapté de Peter Paraham [418]).

		Naïve	Mémoires
Phénotypes	CD44	-	+
	Ly6c	-	++
	CD122	-	+
	CCR7	+	+
	CD62L	+	+
Fonctions	Prolifération <i>in vitro</i> en réponse à l'Ag et l'IL-2	+	++
	Prolifération homéostatique	-	-
	Maintien <i>in vivo</i>	+	+
	Production cytokiniques dans les heures suivant la stimulation antigénique	TNF- α , MIP1 β , MIP1 α	TNF- α , INF- γ , MIP1 β , CCL5, MIP1 α
	Cytotoxicité <i>in vivo</i>	-	+

Tableau 6. Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des populations de LT CD8+ naïfs et mémoires présents dans les souris F5 [219, 412]

1.2. Modèle d'étude de l'HSRC

L'utilisation des modèles animaux d'HSRC a permis d'améliorer considérablement notre connaissance de la physiopathologie de l'eczéma allergique de contact. Le premier modèle utilisé fut le cochon d'Inde [414] avant d'être remplacé en 1968 par le modèle murin [415], ce dernier présente de nombreux avantages liés à la simplicité avec laquelle il est possible de déclencher et de quantifier une réponse d'eczéma. Selon le pouvoir sensibilisant de l'haptène, une ou plusieurs doses de celui-ci peuvent être appliquées sur la face ventrale préalablement rasée de la souris à sensibiliser. Puis 5 jours plus tard (Figure 9), le challenge ou l'élicitation de la réponse s'effectue à l'aide d'une faible dose du même haptène sur l'une des oreilles de la souris sensibilisée, tandis que l'autre oreille, qui sert de contrôle, ne reçoit que le véhicule dans lequel l'haptène a été dilué. Parallèlement au groupe des souris sensibilisées, d'autres souris (contrôles) non sensibilisées reçoivent une seule application de l'haptène sur l'oreille, cela permet de quantifier le pouvoir irritant de l'haptène.

L'inflammation (œdème) de l'oreille est mesurée par le **MEST** (*Mouse Ear Swelling Test*) mis au point en 1986 par Gad et *al* [416]. L'analyse porte ainsi principalement sur l'oreille, qui est utilisée comme site d'application du chimique et permet de suivre l'inflammation par mesure de l'épaisseur de l'œdème, mais aussi pour visualiser et caractériser les cellules résidentes et recrutées (cytométrie en flux). La réponse immunitaire correspondante est facilement accessible grâce à la caractérisation des cellules présentes dans les ganglions drainants et la rate [417].

2. Objectifs du travail expérimental

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressé à la génération et à la caractérisation phénotypique et fonctionnelle de cellules mémoires générées dans des conditions inflammatoires stériles que nous avons appelé T_{IM} (*Inflammatory Memory CD8 T cells*). Les différentes questions ont été abordées en utilisant les deux systèmes décrits précédemment : F5 et le modèle d'HSRC, deux modèles où l'activation de LT CD8+ naïfs se fait en absence de pathogènes et de PAMPs. Nous avons montré que la stimulation de LT CD8 naïfs dans ces deux systèmes pouvait générer des cellules mémoires. Ces cellules sont ensuite caractérisées aux niveaux phénotypique et fonctionnel.

3. Caractérisation des cellules mémoires en conditions inflammatoires stérile (Mbitikon-Kobo et *al*)

Nous avons ainsi montré que les cellules mémoires générées en conditions inflammatoires stériles dans le modèle F5, expriment des niveaux intermédiaires pour les marqueurs de surface comme CD44, CD122 et un ensemble de fonctions améliorées qui sont intermédiaires entre les cellules naïves et les cellules mémoires conventionnelles (CD44/122^{high}). Nous avons également montré que ces cellules mémoires CD44/122^{int} se développaient de façon spontanée dans des souris non transgéniques. Ces cellules sont donc générées et maintenues en présence de compétition inter-clonale. Nous avons alors recherché des conditions physiopathologiques dans lesquelles le contexte de la génération des LT CD8+ mimait celui du modèle F5 (inflammation stérile). Nous avons ainsi montré l'existence d'une mémoire dans le modèle d'HSRC au DNFB et que les cellules impliquées dans la réponse

HSRC ont le même phénotype que la sous-population T_{IM} (CD44/122^{int}). De plus, ces cellules sont également capables de transmettre l'HSRC à des souris naïves. Enfin, nous avons démontré que les cellules mémoires CD44/122^{int} correspondaient à une étape précoce de différenciation des cellules naïves en cellules mémoires CD44/122^{high}.

Characterization of a CD44/CD122^{int} memory CD8 T cell subset generated under sterile inflammatory conditions

Florentin-Martial Mbitikon-Kobo, Marc Vocanson, Marie-Cécile Michallet, Martine Tomkowiak, Anne Cottalorda, Georgi S. Angelov, Charles-Antoine Coupet, Sophia Djebali, Antoine Marçais, Bertrand Dubois, Nathalie Bonnefoy-Bérard, Jean-François Nicolas, Christophe Arpin, and Jacqueline Marvel.

(Article accepté pour publication dans The Journal of Immunology)

Characterization of a CD44/CD122^{int} Memory CD8 T Cell Subset Generated under Sterile Inflammatory Conditions¹

Florentin-Martial Mbitikon-Kobo,^{*†‡} Marc Vocanson,^{*†§} Marie-Cécile Michallet,^{2*†‡} Martine Tomkowiak,^{*†‡} Anne Cottalorda,^{*†‡} Georgi S. Angelov,^{3*†‡} Charles-Antoine Coupet,^{*†‡} Sophia Djebali,^{*†‡} Antoine Marçais,^{4*†‡} Bertrand Dubois,^{*†‡} Nathalie Bonnefoy-Bérard,^{*†‡} Jean-François Nicolas,^{*†‡§} Christophe Arpin,^{5*†‡} and Jacqueline Marvel^{5,6*†‡}

Most memory CD8 T cell subsets that have been hitherto defined are generated in response to infectious pathogens. In this study, we have characterized the CD8 T cells that survive priming conditions, devoid of pathogen-derived danger signals. In both a TCR-transgenic model and a model of contact hypersensitivity, we show that the priming of naive CD8 T cells under sterile inflammatory conditions generates memory. The corresponding memory CD8 T cells can be identified by their intermediate expression levels of CD44 and CD122. We also show that CD44/122^{int} memory CD8 T cells spontaneously develop in wild type mice and that they display intermediate levels of several other memory traits including functional (IFN- γ secretion capacity, CCL5 messenger stores), phenotypic, and molecular (T-bet and eomesodermin expression levels) features. We finally show that they correspond to an early differentiation stage and can further differentiate in CD44/122^{high} memory T cells. Altogether, our results identify a new memory CD8 T cell subset that is generated under sterile inflammatory conditions and involved in the recall contact hypersensitivity reactions that are responsible for allergic contact dermatitis. *The Journal of Immunology*, 2009, 182: 3846–3854.

CD8 T cells play a crucial role in adaptive immune responses to pathogens. CD8 T cell responses are triggered by dendritic cells (DC)⁷ that present pathogen-derived antigenic peptides to naive CD8 T cells and provide them with costimulation (1). DC sense danger through germline encoded pattern recognition receptors (PRR) that detect damage associated molecular patterns such as highly conserved microbial molecular motifs known as pathogen associated molecular patterns (PAMP)

(2). Thus, PAMP recognition by specific PRR enables DC to discriminate between different types of pathogens and, through specific maturation programs, endows them with the ability to trigger appropriate CD8 T cells responses. Moreover, CD8 T cells can also mount responses in sterile, noninfectious, contexts, such as exemplified by deregulated autoimmune responses to self-Ags (3), allografts rejection (4), the immunosurveillance of emerging transformed cells (5), or allergic contact dermatitis, a delayed type hypersensitivity (DTH) reaction with a high prevalence in human (6). Thus, endogenous damage associated molecular patterns, collectively known as alarmins (7), can promote specific DC-conditioned adaptive immune responses in sterile inflammatory conditions. Although the activation of DC by alarmins released by dying cells after chemical or physical trauma has been described (8), the mechanisms involved in the initiation of immune responses in sterile conditions are still poorly understood. Moreover, the fate of CD8 T lymphocytes activated in this context, and more particularly the phenotypic and functional characteristics of the ensuing memory CD8 T cells have rarely been investigated (9).

Memory CD8 T cells can be defined as Ag-experienced cells that display an improved response as compared with naive cells. This has been shown to result from the accelerated acquisition of effector functions such as cytotoxicity and soluble effectors secretion capacities (10). Given their importance in antipathogen responses, many studies on memory CD8 T cells are performed in infectious models based on pathogen infections or immunizations associated with PRR-ligands that mimic PAMP activation signals. To determine whether memory CD8 T cells are produced following priming under sterile inflammatory conditions, we have used two noninfectious murine models in which Ag-specific effector CD8 T cells are generated and we have characterized the primed CD8 T cells that survive the effector phase of the response. In the first, TCR-transgenic model, sterile inflammatory conditions are provided by the synchronous activation of numerous Ag-specific T cells. For the second, we have used a DTH model in which contact

*Université de Lyon, France; †Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, U851, Lyon, France; ‡Université Lyon 1, IFR128, France; and §Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, France

Received for publication July 24, 2008. Accepted for publication January 14, 2009.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by institutional grants from the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, Université Claude Bernard Lyon 1, the Association pour la Recherche contre le Cancer, the Ligue Régionale de Lutte Contre le Cancer, the Région Rhône-Alpes, and the Institut National du Cancer (ACI-63-04). F.M.M.-K. was supported by the Centrafrican government and the Association pour la Recherche contre le Cancer and A.C. and C.-A.C. by the French Ministère de l'Éducation et de la Recherche.

² Current address: Université de Lausanne, Department of Biochemistry, Ch. Des Boveresses 155, Epalinges, Switzerland.

³ Current address: Ludwig Institute for Cancer Research, Lausanne Branch, Ch. Des Boveresses 155, Epalinges, Switzerland.

⁴ Current address: Hammersmith Hospital, Imperial College School of Medicine, Du Cane Road, London, United Kingdom.

⁵ C.A. and J.M. share co-authorship.

⁶ Address correspondence and reprint requests to Dr. Jacqueline Marvel, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale U851, 21 Avenue Tony Garnier, Lyon, France. E-mail address: jacqueline.marvel@inserm.fr

⁷ Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cell; PRR, pattern recognition receptor; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; DTH, delayed-type hypersensitivity; CHS, contact hypersensitivity; CM, culture medium; BMDC, bone marrow-derived DC; qPCR, quantitative real-time PCR; KLRG1, killer cell lectin-like receptor G1; DNFB, 2,4-dinitrofluorobenzene; PD-1, programmed death-1; T_{CM}, T central memory; T_{IM}, T inflammatory memory; LN, lymph node.

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/\$2.00

hypersensitivity (CHS) reactions to haptens can be elicited in sterile conditions and strictly depend on the inflammatory context generated by chemicals (11). In both models, we show that immunization in an inflammatory context devoid of pathogen-derived signals generates a subset of inflammatory memory CD8 T cells. Indeed, they have acquired phenotypic, molecular, and functional traits that characterize classical pathogen-induced memory CD8 T cells, and they are responsible for the memory response to a hapten challenge. These cells can be identified by their CD44/122^{int} phenotype, are present in nontransgenic animals, and define a new subset of inflammatory memory CD8 T cells.

Materials and Methods

Mice

F5 TCR-transgenic mice were provided by Dr. D. Kioussis (12). The F5 TCR recognizes the NP68 peptide from influenza A virus (NP₃₆₆₋₃₇₄) in the context of H-2D^b. CD3 ϵ -deficient mice were provided by Dr. M. Malissen (CIML, Marseille, France). All mice were bred at the institute's animal facility (AniRA.PBES-ENS-Lyon, France) under pathogen-free conditions. Experimental animal procedures were submitted to the approval of an institutional review board: the Comité Régional d'Éthique pour l'Expérimentation Animale.

mAbs and flow cytometry

All surface stainings were performed at 4°C in PBS (Invitrogen) supplemented with 1% FCS (Invitrogen) and 0.09% NaN₃ (Sigma-Aldrich). All mAbs used were from BD Pharmingen except FITC-labeled anti-CD44 (clone IM7.8.1), produced in house; and anti-KLRG1 and anti-PD-1 purchased from eBiosciences. The F5 TCR was detected with NP68-conjugated H-2D^b-PE tetramers or pentamers from ProImmune. FITC-labeled dextramers from DakoCytomation were also used.

Fixation and permeabilization for intracellular detection of IFN- γ and the cleaved form of caspase-3 were performed with CytoFix/CytoPerm from BD Pharmingen and the intranuclear detection of BrdU with the BD Pharmingen's kit. Phosphatidylserine exposure was detected by surface binding of FITC-conjugated Annexin V, using the kit from Bender Medsystems. All procedures were done according to the manufacturers' instructions. All analyses were performed on a FACSCalibur or FACSCanto (BD Biosciences) and sortings using a FACS Vantage (BD Biosciences).

In situ detection of apoptotic cells

DNA fragmentation was detected on frozen 5- μ m thick lymph node (LN) sections by a TUNEL assay with the Apoptag in situ detection kit (SeroLogicals) according to the manufacturer's instructions.

Immunizations

F5 memory CD8 T cells were generated either by i.p. injection of 50 nmol of NP68 peptide in PBS (IBCP) in naive thymectomized transgenic mice, as described previously (13), or by i.v. injection of 2×10^6 NP68 peptide-pulsed, CpG-matured bone marrow-derived DC (BMDC) in syngeneic C57BL/10 mice that had received 3×10^6 naive F5 CD8 T cells, 24 h before immunization (14). Hapten-specific memory CD8 T cells were generated by sensitization of C57BL/6 mice with the epicutaneous application of 25 μ l of 0.5% DNFB onto 2 cm² of fur-shaved ventral skin. Naive mice were age-matched controls. Where indicated, mice were challenged by the application of 10 μ l of 0.15% DNFB on the ear. The ear thickness was then measured daily with a spring-loaded micrometer (Blét SA, Lyon, France).

Generation of BMDCs

DCs were generated from bone marrow cell precursors cultured for 6 to 9 days in RPMI 1628 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamin, 50 μ g/ml gentamicin, 10 mM HEPES buffer (pH 7.4) (all from Invitrogen), and 50 μ M 2-ME (Sigma-Aldrich). BMDCs were differentiated as previously described, either with Flt3L (14) or GM-CSF (15), for F5 immunizations and hapten-specific in vitro T cell stimulations, respectively.

CD8 T cell purification and activation

Lymphocytes were extracted from ear tissues by DNase and collagenase (400 IU/ml; from Roche Diagnostics and Sigma-Aldrich, respectively) digestion for 1 h at 37°C.

Spleen and/or LN CD8 T cells were purified by magnetic beads-negative depletion as described previously (14). In some cases, CD8⁺ T cells were

purified by positive selection using MACS microbeads (Miltenyi Biotec). For subset isolation, purified CD8 T cells were stained for cell surface expression of CD8, CD44, and CD122 and sorted by flow cytometry. Purity was routinely above 98%.⁸ Cell activation for intracellular detection of IFN- γ , was performed in culture medium (CM; DMEM supplemented with 6% FCS and the same additives as in bone marrow CM), in the presence of 0.67 μ l/ml GolgiStop (BD Pharmingen). Cells were either stimulated by PMA (10 ng/ml, Sigma-Aldrich) and ionomycin (1 μ g/ml, Sigma-Aldrich) or 10 nM NP68 peptide, for 4 to 6 h. Cell activation to detect hapten-specific CD8 T cells was performed by stimulating 5×10^4 sorted CD8 T cells with 10^4 dinitrobenzene-sulfonic acid-treated BMDCs during 3 days in RPMI 1628 supplemented with 10% FCS and the same additives as in CM. IFN- γ in the supernatants was quantified in a classical ELISA-sandwich assay (R&D Systems) and proliferation was measured by [³H]thymidine (Amersham Biosciences) incorporation during the last 8 h of the culture (1 μ Ci/well). For apoptosis detection, cells were cultured ex vivo in CM, before staining with anti-CD8 and Annexin V.

RT-quantitative real-time PCR (qPCR) analysis

RNAs were extracted from 5×10^5 to 10^6 cells of FACS-sorted subsets using RNA NOW reagent (Ozyme) and submitted to retro-transcription using Superscript II (Invitrogen). Real-time PCR analysis was conducted using the Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG kit (Invitrogen) on an ABI Prism 7700 (Perkin Elmer). Each sample was amplified in duplicate and each dissociation curve was analyzed. Relative levels of the target sequence against the reference sequence were calculated using the $\Delta\Delta$ cycle threshold method with calculated real efficiencies (16).

Statistical analysis

The normal distribution of data was assessed by a Kolmogorov and Smirnov's test. Non-normal sets were compared using a one-tail Mann-Whitney's non-parametric test and normal data with a one-tail Student's test, applying Welch's correction for unequal variances where necessary.

Results

F5 CD44/122^{int} memory CD8 T cells are generated under sterile inflammatory conditions

The first model we have investigated corresponds to the synchronous activation of a large number of Ag-specific CD8 T cells that follows the immunization of TCR-transgenic F5 mice with the antigenic peptide in saline. Indeed, these priming conditions lead to the activation of a large number of CD8 T cells (13) that produce inflammatory cytokines such as TNF- α (17). Moreover, they induce a massive decrease in the number of Ag-specific cells that precedes the clonal expansion (Fig. 1A). This early drop in CD8 T cell numbers is due in part to apoptosis, as evidenced by cell surface exposition of phosphatidylserines, caspase-3 activation, and DNA fragmentation (Fig. 1, B–D). Thus, NP-68 peptide injection in F5 mice creates an inflammatory context resulting from massive T cell activation and apoptosis. As shown by others, these sterile inflammatory conditions can lead to the maturation of DC (18). Therefore, we analyzed the surface phenotype of DC obtained from F5 or control C57BL/10 mice, 18 h after peptide injection. DC purified from peptide-injected F5 mice showed an increased expression of CD40 and CD80 compared with DC from naive mice (Fig. 1, E and F). In contrast, peptide injection in C57BL/10 mice that have a very low frequency of NP-68-specific cells did not induce the up-regulation of these maturation markers. Altogether these results show that the synchronous activation of CD8 T cells that follows antigenic peptide injection in F5 mice generates a sterile inflammatory context that drives DC maturation.

We have previously shown that the CD8 T cells that survive priming in this sterile inflammatory context display several functional and molecular features of memory cells (13, 17, 19–21). In terms of phenotype, they express a stable increase in the levels of

⁸ The online version of this article contains supplemental material.

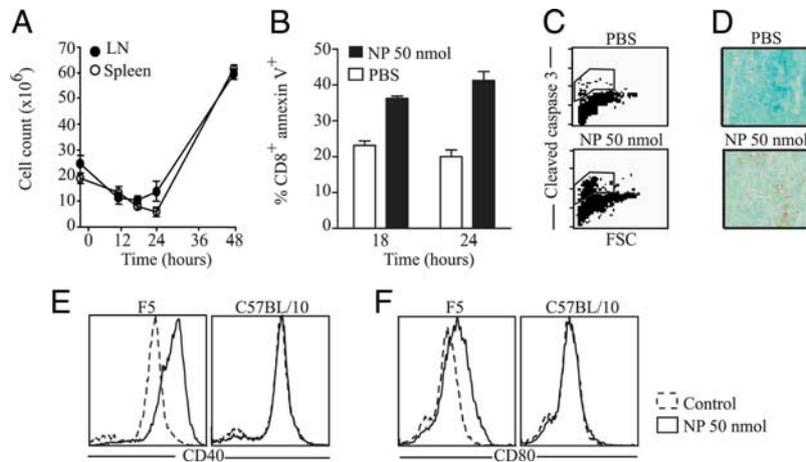


FIGURE 1. Antigenic peptide injection in F5 mice induces massive T cell deletion and in situ DC maturation. *A*, F5 TCR-transgenic mice were injected with NP68 peptide. At the indicated times, the number of CD8 T cells in the spleen and LN of immunized animals was assessed by flow-cytometry (Mean \pm SD of three mice per group). *B–D*, F5 TCR-transgenic mice were injected with the antigenic peptide or PBS and the apoptosis of mesenteric LN cells was measured by the percentage of Annexin V⁺CD8⁺ T cells at the indicated times (*B*), flow-cytometry analysis of cleaved (i.e., activated) caspase-3 (*C*), and TUNEL assay on frozen sections (*D*), 24 h after immunization. All results are representative of two independent experiments with three mice per group. *E* and *F*, F5 TCR-transgenic or C57BL/10 mice were injected i.p. with 50 nmol of NP68 peptide in saline. Eighteen hours later, DC were purified from pooled spleens, surface stained, and analyzed by flow cytometry. The levels of CD40 (*E*) and CD80 (*F*) expression on gated CD11c⁺ DC from peptide injected or control F5 and C57BL/10 mice are shown. Results show one representative experiment out of more than three.

two memory cells markers, CD44 and CD122 (Fig. 2*A*), as compared with naive cells. However, this increase is intermediate compared with classical memory CD8 T cells that are generated following CpG-matured DC immunization of TCR-transgenic na-

ive CD8 T cells, after dilution by transfer in a syngeneic host (Fig. 2*B*). In terms of functions, these CD44/122^{int} cells have the capacity to secrete IFN- γ and IL-2, in contrast to naive cells, after a short-term in vitro stimulation (Fig. 2, *C* and *D*). In addition, they

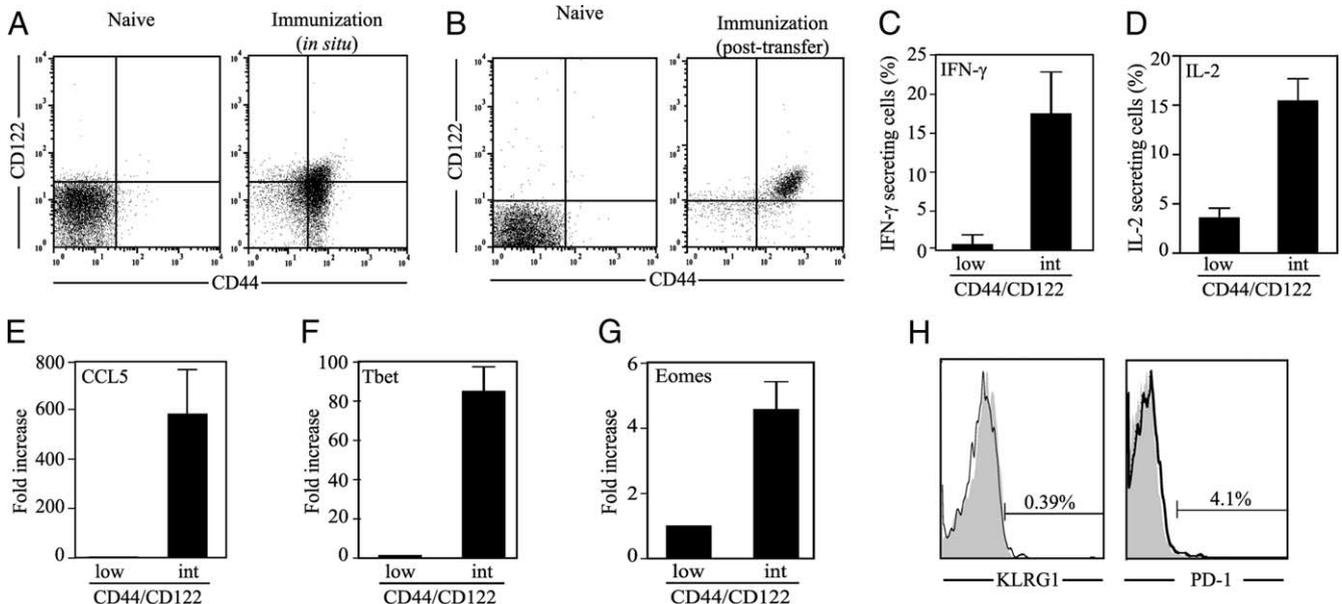


FIGURE 2. Synchronous activation of naive F5 CD8 T cells in a sterile context generates a CD44/122^{int} memory population. *A*, F5 mice were thymectomized and immunized by direct injection of NP68 peptide in PBS. The expression of CD44 and CD122 on the surface of NP68/H2D^b-multimer-positive CD8 T cells from the LN of naive and peptide-immunized mice at least 4 wk after immunization is shown. *B*, Sorted naive F5 TCR-transgenic CD8 T cells were transferred into syngeneic C57BL/10 mice 1 day before immunization with CpG-matured, peptide-pulsed DC. CD8 T cells were analyzed by flow-cytometry at least 4 wk later. The phenotype of NP68/H2D^b-multimer-positive CD8 T cells from the LN of naive and DC-immunized recipient mice is presented as in *A*. *C* and *D*, CD8 T cells from naive and memory F5 mice immunized as in *A* were stimulated for 6 h in vitro with the antigenic peptide in the presence of monensin and then stained for FACS analysis. The percentage of IFN- γ (*C*) or IL-2 (*D*) positive CD44/122^{low} and CD44/122^{int} CD8 T cells from naive and immunized mice, respectively, is shown. Results in *A–C* are representative of more than 10 experiments and of seven and six immunized and naive F5 mice, respectively, in *D*. *E–G*, CD44/122^{low} naive CD8 T cells from naive and CD44/122^{int} memory CD8 T cells from immunized F5 mice were sorted by FACS. mRNAs were extracted and quantified by RT-qPCR. The fold increase in CCL5 (*E*), Tbet (*F*), and eomesodermin (*G*) mRNA quantities, as compared with naive cells, is shown. Mean \pm SD of two to three mice. *H*, Cell surface expression of KLRG1 and PD-1 on gated naive (shaded histograms) and memory (solid lines) CD8 T cells from the spleens of F5 mice are shown. Representative of seven to eleven mice in two independent experiments. The numbers represent the mean percentages of positive cells among CD44/122^{int} memory CD8 T cells from all immunized animals.

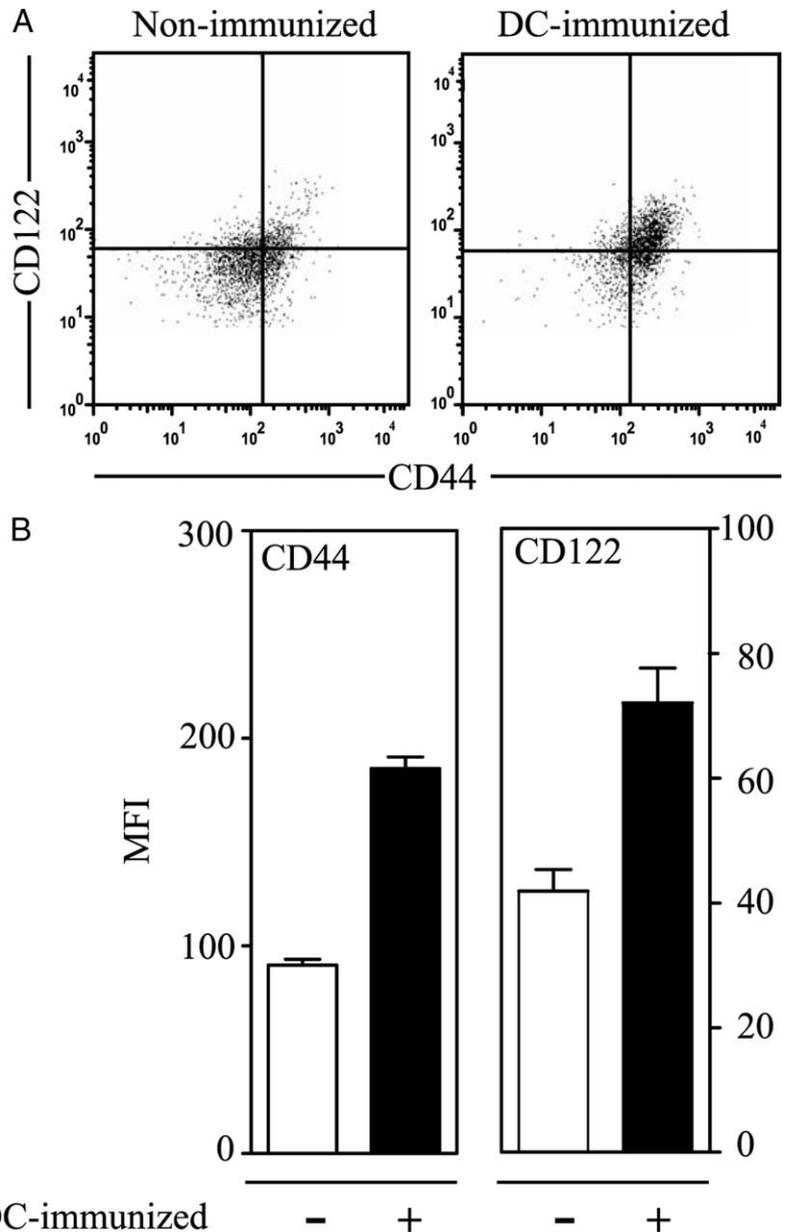


FIGURE 3. T_{IM} CD8 T cells further differentiate in CD44/122^{high} cells after in vivo stimulation with CpG-matured, peptide-loaded DC. T_{IM} cells were generated by peptide-immunization of F5 mice and then sorted and transferred to C57BL/10 mice. One day later, recipient mice were immunized with CpG-matured, peptide-pulsed DC and four weeks later F5 TCR-transgenic CD8 T cells from the LN of recipient mice were identified with NP68/H2D^b-multimer staining and analyzed for CD44 and CD122 cell surface expression. *A*, CD44 and CD122 expression on gated multimer-positive CD8 T cells from one representative immunized and nonimmunized C57BL/10 recipient mouse and *B*, MFI of CD44 and CD122 expression by gated multimer-positive CD8 T cells from immunized or nonimmunized mice are shown. Similar results were obtained with spleen cells. One representative experiment of three is shown.

contain 600 times more CCL5 mRNAs than naive F5 CD8 T cells (Fig. 2*E*), indicating that they have acquired the capacity to store CCL5 messengers, another functional feature of memory CD8 T cells (21–24). Moreover, they express increased levels of T-bet and eomesodermin (Fig. 2, *F* and *G*), two transcription factors controlling the differentiation program into effector and memory CD8 T cells (25). Finally, they do not express markers of functionally compromised cells such as the killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1) or the programmed death-1 (PD-1) markers, that are associated with senescent and exhausted CD8 T cells, respectively (Fig. 2*H*) (26, 27).

Together, these results show that the synchronous activation of F5 CD8 T cells in a sterile inflammatory context generates a subset of CD8 T cells that, based on their surface phenotype, functions, and pattern of transcription factor expression, is engaged in the memory differentiation pathway. This new subset, that we have named inflammatory memory CD8 T cells (T_{IM}) hereafter, can be identified by its intermediate expression levels of CD44 and CD122.

T_{IM} memory CD8 T cells can further differentiate after in vivo restimulation

To determine whether T_{IM} generation corresponds to a terminal differentiation stage, we questioned whether these cells were able to respond to an in vivo antigenic challenge and differentiate further along the memory pathway. For that purpose, T_{IM} cells generated in F5 mice were sorted by FACS and transferred into C57BL/10 syngeneic hosts. Twenty-four hours later, mice were immunized with peptide-pulsed DC that had been matured with CpG. In the absence of DC stimulation, T_{IM} cells maintained their surface phenotype (Fig. 3) for 4 wk after transfer. However, following CpG-matured, peptide-pulsed DC stimulation, they acquired high expression levels of CD122 and CD44. These results indicate that T_{IM} can further differentiate into classical CD44/122^{high} memory cells after an in vivo antigenic challenge. Hence, they do not represent an end stage but rather an early step in the memory differentiation pathway and can further differentiate in CD44/122^{high} memory CD8 T cells.

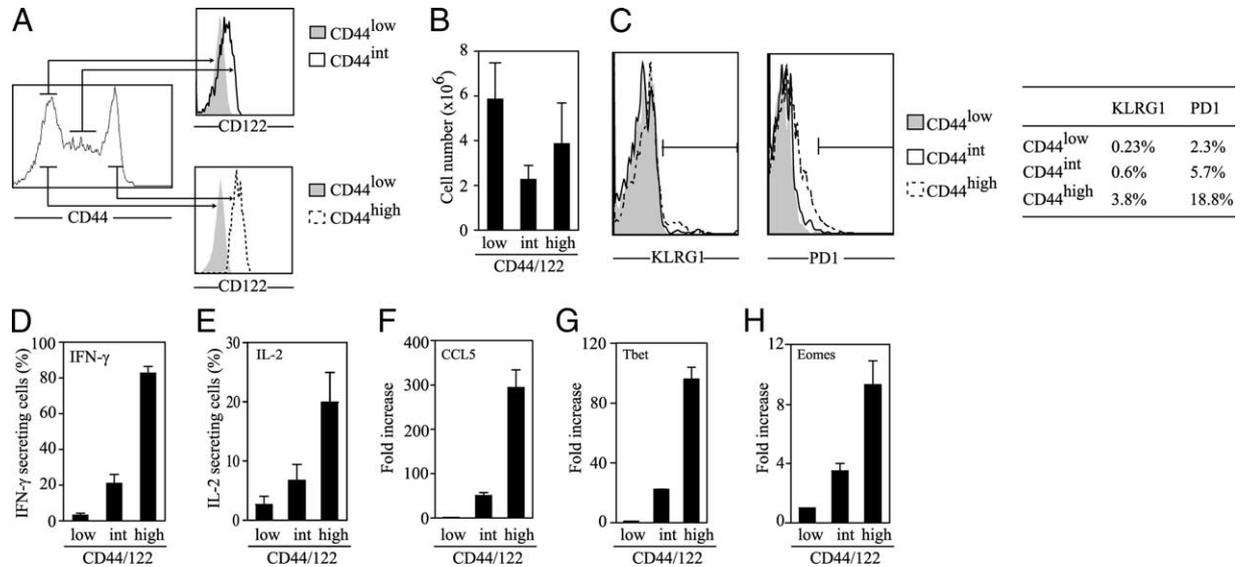


FIGURE 4. Naive nontransgenic mice harbor T_{IM} -phenotype CD8 T cells. *A* and *B*, Splenocytes from nonimmunized C57BL/10 mice were stained to analyze the coexpression of CD8, CD44, and CD122. *A*, CD44 expression pattern on gated CD8⁺ T cells (*left*) and CD122 expression by CD44^{low}, CD44^{int}, and CD44^{high} subsets (*right*). *B*, Numbers of cells in the indicated CD8 T cell subsets from pooled spleens and lymph nodes of 2–4 mo old mice. Results are representative (*A*) or mean \pm SD (*B*) of six mice. *C*, Splenocytes from nonimmunized C57BL/10 mice were stained to analyze the coexpression of CD8, CD44, CD122, and KLRG1 or PD-1. KLRG1 and PD-1 expression by CD44^{low}, CD44^{int}, and CD44^{high} subsets are shown. The table lists the mean percentages of positive cells in the indicated subsets. Representative of seven to nine mice in three independent experiments. *D*, Splenocytes from C57BL/10 naive mice were stimulated for 6 h in vitro with PMA and ionomycin in the presence of monensin. Cells were then stained for CD8, CD44, CD122 cell surface expression, and intracellular IFN- γ content. The frequency of IFN- γ secreting cells for each indicated subsets is shown (mean \pm SD of six mice). *E*, Splenocytes from C57BL/6 naive mice were stimulated for 6 h in vitro with PMA and ionomycin in the presence of monensin. Cells were then stained for CD8, CD44, CD122 cell surface expression, and intracellular IL-2 content. The frequency of IL-2 secreting cells for each indicated subsets is shown (mean \pm SD of eleven mice). *F–H*, CD44/122^{low}, CD44/122^{int}, and CD44/122^{high} phenotype CD8 T cell subsets from C57BL/10 naive mice were sorted by FACS. mRNAs were then extracted and submitted to RT-qPCR to analyze the expression of CCL5 (*F*), T-bet (*G*), or eomesodermin (*H*). The results are expressed as the fold increase in mRNA quantities in the indicated subsets, as compared with the mean quantities in the naive-phenotype population (mean \pm SD of two independent experiments).

Nontransgenic naive mice harbor T_{IM} -phenotype CD8 T cells

The generation and the survival of T_{IM} cells in the F5 model could be due to the lack of competition with other clones and we therefore assessed whether these cells are generated and maintained in a polyclonal competitive environment. Memory CD8 T cells of unknown antigenic history that share a number of properties with pathogen-induced memory cells are generated in non-TCR transgenic mice in the absence of immunization and are commonly identified by their CD44/122^{high} phenotype (10). Therefore, we searched the spleens and lymph nodes of naive nontransgenic C57BL/10 mice for the presence of CD8 T cells that could correspond to the T_{IM} subset. Results in Fig. 4, *A* and *B*, show that a substantial number of CD8 T cells express intermediate levels of CD44 and CD122, as compared with the CD44/122^{low} naive and the classical CD44/122^{high} memory subsets. Similarly to the T_{IM} CD8 T cells generated in F5 mice, these CD44/122^{int} CD8 T cells do not express KLRG1 and PD-1 in contrast to the classical CD44/122^{high} memory CD8 T cells, a significant fraction (20%) of which are PD-1⁺ (Fig. 4*C*). We next assessed whether they displayed memory traits. Results in Fig. 4, *D* and *E* show that these cells have the capacity to rapidly secrete IFN- γ and IL-2 after a brief polyclonal stimulation, in contrast to naive CD8 T cells. Of note, the lower frequency of IFN- γ -producing cells in the T_{IM} subset, as compared with classical CD44/122^{high} memory CD8 T cells, is not due to a contamination by these CD44/122^{high} CD8 T cells, as IFN- γ -secreting cells from both subsets can be distinguished on a per cell basis by the levels of cytokine they secrete, as reflected by the mean fluorescent intensity of the IFN- γ staining.⁸ In addition, T_{IM} CD8 T cells contain 50 \times more CCL5 mRNAs than naive CD8 T cells (Fig. 4*F*). Finally, they express intermediate levels of T-bet

and eomesodermin (Fig. 4, *G* and *H*). Altogether, these results indicate that the CD44/122^{int} CD8 T cells that are found in wild-type mice are similar in terms of phenotype and function to the T_{IM} generated in the F5 model.

Contact sensitization with DNFB establishes a persistent hapten-specific memory

The second model we have used to characterize memory CD8 T cells generated in a sterile inflammatory context is the CHS reaction to the hapten 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB), a widely used model of DTH in which the immune response is mediated by CD8 T cells (28) that are activated under inflammatory conditions and in the absence of signals delivered by pathogens (11). In the standard model, mice are sensitized to DNFB by epicutaneous application on the ventral skin and the effector CD8 response is revealed by tissue infiltration and inflammation after a challenge with a small dose of hapten on the ear, 5 days after sensitization (29). In an initial set of experiments, we studied the development of a memory response in this model. Therefore, we extended the course of the study to include challenge time points after the effector phase that correspond to the memory phase in other experimental systems (13, 30, 31). The generation of an Ag-specific memory was evidenced by the induction of a substantial ear swelling following recall exposure to DNFB (Fig. 5). Although the inflammatory reaction 20 days after sensitization was less important than when mice were re-exposed at the peak of the primary effector response (day 5), the difference between nonsensitized and day 20-sensitized mice was highly significant. Furthermore, this memory response was maintained for another 3 wk, as animals challenged 40 days after sensitization displayed a similar hypersensitivity reaction.

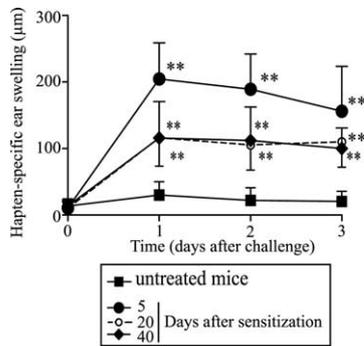


FIGURE 5. Sensitization to DNFB results in long-term hapten-specific hypersensitivity. C57BL/6 mice were sensitized, or not (untreated mice), by the application of 25 μ l of 0.5% DNFB solution on the ventral skin. They were then challenged by the application of 10 μ l of 0.15% DNFB solution on the left ear 5, 20, and 40 days later. Right ears were painted with vehicle and used as controls. Ears thickness was measured on the following days and the ear thickness measured on day 0 before challenge was subtracted to calculate the swelling value. The hapten-specific ear swelling was obtained by the difference between left and right ear swelling values. Mean \pm SD of two to four independent experiments with four to six mice in each group. Statistical analyses showed that data from animals sensitized 5, 20, and 40 days earlier were all significantly different (**, $p < 0.001$) from control nonsensitized animals at all time points.

The memory CD8 T cells responsible for the CHS reaction belong to the T_{IM} subset

Next, we sought to characterize the memory CD8 T cells responsible for this inflammatory reaction. We first identified which phenotypic subset harbors hapten-specific cells in the memory phase of CHS. Total CD8⁺, as well as CD44/122^{low}, CD44/122^{int}, and CD44/122^{high} naive and memory subsets were FACS sorted⁸ and their proliferation and IFN- γ production capacities in response to hapten-pulsed DC stimulation were measured. The naive CD8 T cell subset did not display a hapten-specific response at any time-point tested (Fig. 6). Similarly, in naive mice, no hapten-specific response could be detected in memory CD8 T cell subsets, confirming that specific cells are only generated following hapten sensitization. Five days after hapten application, the majority of hapten-specific IFN- γ -producing cells were found in the CD44/122^{high} population that corresponds to effector cells at the peak of the response (Fig. 6A). However, as soon as 10 days after sensitization, the IFN- γ secretion capacities of the CD44/122^{high} subset dropped sharply to background levels. In contrast, T_{IM} CD8 cells specifically produced significant amounts of IFN- γ during the effector (day 5), posteffector (day 10), and the memory (day 20 and 40) phases of the response (Fig. 6A). Similarly, at the peak of the response (day 5), both CD44/122^{int} and CD44/122^{high} CD8 T cells proliferated vigorously upon in vitro restimulation (Fig. 6B). However, only T_{IM} CD8 cells displayed a strong hapten-specific proliferative response in the posteffector and memory phases of the response. In conclusion, the T_{IM} subset is specifically enriched in hapten-specific cells in the memory phase of the CHS response.

To further characterize the memory CD8 T cells that take part to the CHS reaction, we analyzed the phenotype of the ear-infiltrating CD8 T cells after DNFB challenge in the memory phase of CHS. We have used the level of CD44 expression to distinguish between CD8 T cell subsets, as the collagenase digestion of the organs that is necessary to isolate lymphocytes from the ear tissues affects CD122 detection by flow cytometry (data not shown). Mice were sensitized to DNFB by ventral skin application and challenged on the ears 38 days later. As shown in Fig. 7A (S+C2), the CD8 T cells that had infiltrated the ears 48 h after the challenge expressed

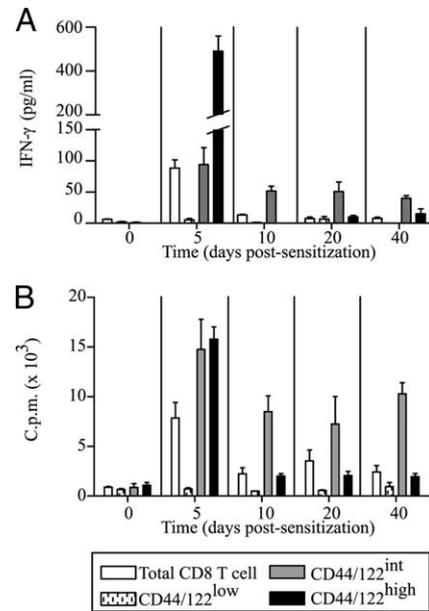


FIGURE 6. The T_{IM} subset is enriched in hapten-responsive CD8 T cells in the memory phase of CHS. C57BL/6 mice were sensitized to DNFB by epicutaneous application on the ventral skin. Mice were analyzed 5, 10, 20, and 40 days later. LN and spleen cells were pooled and stained for the surface expression of CD8, CD44, and CD122 and total CD8⁺, as well as the CD44/122^{low}, CD44/122^{int}, and CD44/122^{high} subsets were FACS sorted⁸ and their specific IFN- γ secretion (A) and proliferative (B) capacities were measured by ELISA and thymidine incorporation, respectively, after 3 days of in vitro restimulation with hapten-pulsed BMDCs. The values obtained with control BMDCs that were not pulsed with hapten were subtracted. Day 0 data correspond to nonsensitized age-matched controls. Results are representative of more than five independent experiments with five to six mice in each group.

intermediate levels of CD44. The colonization of this peripheral tissue by CD8 T cells was dependent on previous priming to DNFB, as no CD8 T cells were present in challenged naive mice (Fig. 7A, C2). Moreover, ear infiltration was dependent on hapten application, as contralateral control ears did not contain CD8 T cells (data not shown). We next looked at the recruitment of CD8 T cells in the ears of mice that had been challenged during the effector phase. Resident CD8 T cells were still present in the ears 5 wk after this first challenge and expressed high levels of CD44 (Fig. 7A, S+C1). However, after a second challenge performed in the memory phase, the hapten-specific memory CD8 T cells attracted from the lymphoid organs were still CD44^{int} (Fig. 7A, S+C1+C2). Altogether, these results suggest that the memory CD8 T cells, that are recruited from the lymph nodes of primed animals to peripheral tissues after challenge with the hapten and that are responsible for the inflammatory CHS response, belong to the T_{IM} subset.

To directly test this, CD8 T cells from animals sensitized with DNFB 20 days earlier were sorted by FACS and transferred in T cell-deficient mice. One day after cell transfer, DNFB was applied to the ears of the recipient mice and the CHS reaction was assessed 24 h later by measuring the specific ear swelling. As shown in Fig. 7B, the transfer of 12×10^6 total CD8 T cells from animals sensitized once, 20 days earlier, was necessary to reveal the presence of hapten-specific memory cells that are able to induce ear swelling, illustrating the low frequency of hapten-specific cells among total CD8 T cells. However, the difference between the mean values observed for the transferred and the nontransferred control

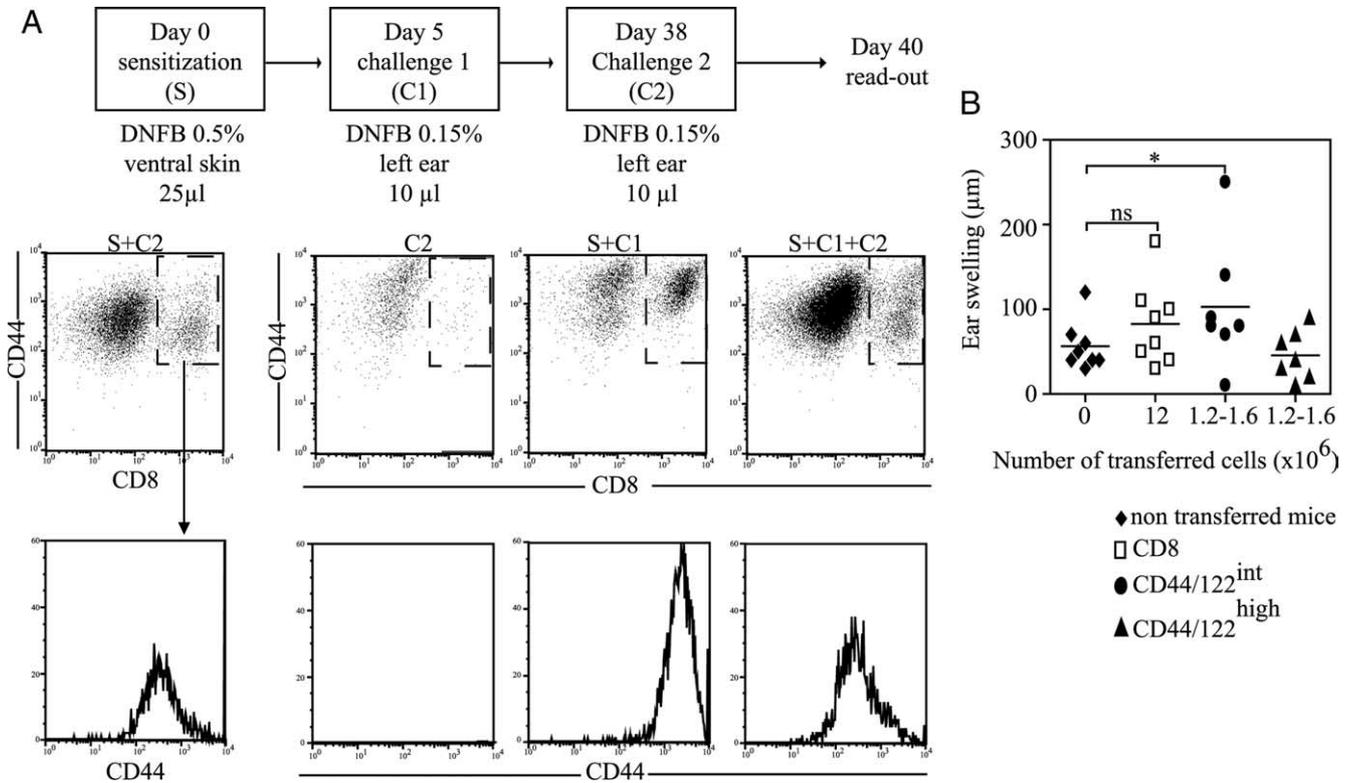


FIGURE 7. The hapten-specific memory CD8 T cells responsible for the CHS reaction belong to the T_{IM} subset. *A*, *Top row* (protocol), C57BL/6 mice were sensitized by the application of 25 μ l of 0.5% DNFB solution on the ventral skin (sensitization). They were then challenged by the application of 10 μ l of 0.15% DNFB solution on the left ear 38 days later (Challenge 2). Two days after challenge, painted ears were digested and cell suspensions were stained for cell surface expression of CD45, CD8, and CD44. Some mice were also challenged on the ear 5 days after sensitization (Challenge 1). *Middle row*, CD44/CD8 expression profiles of CD45⁺ cells from the ears of mice in the indicated experimental groups are depicted. *Bottom row*, CD44 expression by gated CD44⁺CD45⁺CD8⁺ T cells from the ears of mice in the indicated experimental groups is shown. One representative experiment of three, with six mice per group, is shown. *B*, C57BL/6 mice were sensitized by the application of DNFB on the ventral skin and CD8 T cell subsets from pooled spleens and LN were stained and FACS-sorted 20 days later. The indicated numbers of total, CD44/122^{int}, or CD44/122^{high} CD8 T cells were transferred into CD3 ϵ deficient animals (0 denotes no cell transfer). Twenty-four hours later, a challenge dose of DNFB was applied to the ears of recipient mice and the hapten-induced ear swelling was measured the day after as described in the legend to Fig. 5. Results show the specific ear swelling of seven to eight mice in two independent experiments (*, $p < 0.05$; ns: not significant).

groups did not reach significance ($p = 0.16$). In contrast, the transfer of only 1.2 to 1.6×10^6 T_{IM} cells from sensitized animals resulted in a significant ($p = 0.0413$) ear swelling after DNFB application while the transfer of the same number of CD44/122^{high} memory CD8 T cells (Fig. 7*B*, $p = 0.2617$), or total CD8 T cells (data not shown), did not. This formally demonstrates that the hapten-specific memory cells capable of transferring the CHS reaction belong to the T_{IM} subset.

Discussion

Using two different mouse models in which an Ag-specific CD8 T cell response can be elicited in the absence of pathogen-derived signals, we show that the priming of naive CD8 T cells under sterile inflammatory conditions generates memory. Indeed, the inflammatory memory CD8 T cells (T_{IM}) that survive such priming display several memory traits, including cell surface phenotype and functional as well as molecular signatures that are hallmarks of classical pathogen-induced memory CD8 T cells. Moreover, we show that the CHS reaction to DNFB can be elicited in primed animals several weeks after sensitization and that T_{IM} are responsible for this secondary immune response. Thus, these cells have acquired an improved responsiveness that allows the development of an Ag-specific inflammatory response to a dose of Ag that is harmless, i.e., not sufficient to initiate a response, in a naive subject. These results do not exclude the participation in the memory

response to DNFB of other innate cells such as NK cells (32). However, they clearly identify T_{IM} as a bona fide memory CD8 T cell population.

T_{IM} are different from pathogen-induced memory CD8 T cells. First, they are generated during an immune response, in the absence of pathogen-derived danger signals. Indeed, the in situ DC maturation we observe in peptide-injected F5 mice is strictly dependent on a massive T cell activation, as it is not observed after peptide injection in C57BL/10 animals, which harbor a few Ag-specific CD8 T cells, therefore demonstrating the absence of non-specific pathogen-derived contaminating signals associated with the experimental procedure that leads to T_{IM} generation in F5 mice. The definition of the exact signals involved in the maturation of DC allowing the generation of T_{IM} cells will need further investigation. In our models, DC activation under sterile conditions could result from at least two types of endogenous signals. The cytokinetic environment in which naive cells are primed could be involved in the generation of T_{IM} . Indeed, the production of IL-1 β and TNF- α induced by DNFB sensitization is mandatory for DC maturation and the induction of the CHS response (11, 33). Similarly, an inflammatory cytokinetic environment is provided by the massive activation of naive cells that rapidly differentiate into potent TNF- α producers upon activation in the F5 model (17). However, inflammatory mediators might not be sufficient to induce T_{IM}

generation as it has been shown by others that they cannot substitute for direct activation of DC by PAMP in the initiation of a Th1 response (34). Cell death could also initiate the generation of T_{IM} by providing specific endogenous danger signals in the form of alarmins (7, 35, 36). Indeed, the sensitization to DNFB provokes local tissue damage and we show in this study that peptide immunization of F5 mice induces massive T cell apoptosis. Alternatively, endogenous secretory mediators, such as thymic stromal lymphopoietin or eosinophil-derived neurotoxin that are associated with inflammatory disorders and promote Th2 responses (37, 38) could also play a role. Second, T_{IM} are generated in the absence of CD4 help in the synchronous T cell activation model (17) and in the CHS model. Indeed, in this latter the CD4 compartment is not involved in the priming of CD8 T cells but plays an important role in the regulation of their response (28). Therefore, T_{IM} define a new class of memory CD8 T cells that are independent of CD4 help. Interestingly, they might also be generated and take part in other CD4-independent sterile inflammatory immune responses, as it was shown in a graft rejection model that naive CD8 T cells are able to generate functional memory cells in response to an alloantigen, in the absence of CD4 T cells (4). In the case of pathogen infections, CD4 T cell-deficient animals show normal primary CD8 T cell responses, but the resulting "helpless" memory populations display impaired protective secondary responses (39–41). Thus, protection against aggressive challenges such as pathogen infections is unlikely to be mediated by T_{IM} -like memory cells.

Another question raised by the identification of T_{IM} concerns their relation to the classical pathogen-induced memory CD8 T cells. All the memory characteristics they display are intermediate between those of CD44/122^{low} naive and CD44/122^{high} memory subsets. They express CD62L and could therefore represent an early differentiation stage of the T central memory (T_{CM}) subset (42, 43). However, although they do not express known markers of functionally compromised cells such as KLRG1 or PD-1, they are generated in a poorly immunogenic context and might represent a terminal differentiation stage. We therefore tested this hypothesis and our results show that they further up-regulate CD122 and differentiate into CD62L-positive (data not shown), CD44/122^{high} memory cells upon antigenic restimulation in the presence of PAMP signals, confirming that they have maintained a differentiation potential and therefore represent a very early differentiation step ("pre- T_{CM} ") in the naive-to-memory differentiation pathway.

T_{IM} -phenotype cells are present in unmanipulated wild-type animals, illustrating that they can develop and maintain in a polyclonal competitive environment. However, they are characterized by an intermediate level of CD122 cell surface expression and, as IL-15 has been shown to play a major role in the maintenance of memory-phenotype CD8 T cells, notably by supporting their survival and driving their proliferation (44, 45), CD122^{int} and CD122^{high} memory subsets might have different persistence capacities. Moreover, there is a positive correlation between the level of CD122 expression at the surface of these cells and their resistance to apoptosis in vivo (20). Altogether, this suggests that in the absence of restimulation T_{IM} -based memory might be lost with time. In that context, the capacity of T_{IM} to further differentiate and acquire high levels of CD122 could have important implications in allergic contact dermatitis. Indeed, repeated Ag stimulations (20) and/or the presence of PAMP during priming (Ref. 46 and the present study) could generate different memory subsets. This would in turn determine the medical course of the disease, i.e., transient in the case of T_{IM} generation vs chronic when CD44/122^{high} memory cells arise.

Acknowledgments

We thank Drs T. Defrance, Y. Leverrier, and Y.-J. Liu for critical reading of the manuscript. We thank the staff of the Plateau de Biologie Experimentale de la Souris and of the Plateforme de Cytométrie en Flux of IFR128 Biosciences Lyon-Gerland for their technical assistance.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767–811.
- Janeway, C. A., Jr., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197–216.
- Anderson, M. S., and J. A. Bluestone. 2005. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 447–485.
- Jones, N. D., M. Carvalho-Gaspar, S. Luo, M. O. Brook, L. Martin, and K. J. Wood. 2006. Effector and memory CD8⁺ T cells can be generated in response to alloantigen independently of CD4⁺ T cell help. *J. Immunol.* 176: 2316–2323.
- Koebel, C. M., W. Vermi, J. B. Swann, N. Zerafa, S. J. Rodig, L. J. Old, M. J. Smyth, and R. D. Schreiber. 2007. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450: 903–907.
- Goh, C. L. 1986. Prevalence of contact allergy by sex, race and age. *Contact Dermatitis* 14: 237–240.
- Bianchi, M. E. 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukocyte Biol.* 81: 1–5.
- Gallucci, S., M. Lolkema, and P. Matzinger. 1999. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med.* 5: 1249–1255.
- Tanchot, C., S. Guillaume, J. Delon, C. Bourgeois, A. Franzke, A. Sarukhan, A. Trautmann, and B. Rocha. 1998. Modifications of CD8⁺ T cell function during in vivo memory or tolerance induction. *Immunity* 8: 581–590.
- Sprent, J., and C. D. Surh. 2002. T cell memory. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 551–579.
- Watanabe, H., O. Gaide, V. Petrilli, F. Martinon, E. Contassot, S. Roques, J. A. Kummer, J. Tschopp, and L. E. French. 2007. Activation of the IL-1 β -processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 127: 1956–1963.
- Mamalaki, C., T. Norton, Y. Tanaka, A. R. Townsend, P. Chandler, E. Simpson, and D. Kiousis. 1992. Thymic depletion and peripheral activation of class I major histocompatibility complex-restricted T cells by soluble peptide in T-cell receptor transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11342–11346.
- Pihlgren, M., P. M. Dubois, M. Tomkowiak, T. Sjogren, and J. Marvel. 1996. Resting memory CD8⁺ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro. *J. Exp. Med.* 184: 2141–2151.
- Angelov, G. S., M. Tomkowiak, A. Marçais, Y. Leverrier, and J. Marvel. 2005. Flt3 ligand-generated murine plasmacytoid and conventional dendritic cells differ in their capacity to prime naive CD8 T cells and to generate memory cells in vivo. *J. Immunol.* 175: 189–195.
- Krasteva, M., J. Kehren, G. Choquet, D. Kaiserlian, and J. F. Nicolas. 1998. The role of dendritic cells in contact hypersensitivity. *Immunol. Today* 19: 289.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45.
- Arpin, C., G. Angelov, T. Walzer, M. Tomkowiak, L. Beloeil, and J. Marvel. 2002. Hyperproliferative response of a monoclonal memory CD8 T cell population is characterized by an increased frequency of clonogenic precursors. *J. Immunol.* 168: 2147–2153.
- Muraille, E., C. De Trez, B. Pajak, M. Brait, J. Urbain, and O. Leo. 2002. T cell-dependent maturation of dendritic cells in response to bacterial superantigens. *J. Immunol.* 168: 4352–4360.
- Pihlgren, M., C. Arpin, T. Walzer, M. Tomkowiak, A. Thomas, J. Marvel, and P. M. Dubois. 1999. Memory CD44^{int} CD8 T cells show increased proliferative responses and IFN- γ production following antigenic challenge in vitro. *Int. Immunol.* 11: 699–706.
- Walzer, T., C. Arpin, L. Beloeil, and J. Marvel. 2002. Differential in vivo persistence of two subsets of memory phenotype CD8 T cells defined by CD44 and CD122 expression levels. *J. Immunol.* 168: 2704–2711.
- Walzer, T., A. Marçais, F. Saltel, C. Bella, P. Jurdic, and J. Marvel. 2003. Cutting edge: immediate RANTES secretion by resting memory CD8 T cells following antigenic stimulation. *J. Immunol.* 170: 1615–1619.
- Swanson, B. J., M. Murakami, T. C. Mitchell, J. Kappler, and P. Marrack. 2002. RANTES production by memory phenotype T cells is controlled by a posttranscriptional, TCR-dependent process. *Immunity* 17: 605–615.
- Marçais, A., C. A. Coupet, T. Walzer, M. Tomkowiak, R. Ghittoni, and J. Marvel. 2006. Cell-autonomous CCL5 transcription by memory CD8 T cells is regulated by IL-4. *J. Immunol.* 177: 4451–4457.
- Marçais, A., M. Tomkowiak, T. Walzer, C. A. Coupet, A. Ravel-Chapuis, and J. Marvel. 2006. Maintenance of CCL5 mRNA stores by post-effector and memory CD8 T cells is dependent on transcription and is coupled to increased mRNA stability. *Eur. J. Immunol.* 36: 2745–2754.
- Intlekofer, A. M., N. Takemoto, E. J. Wherry, S. A. Longworth, J. T. Northrup, V. R. Palanivel, A. C. Mullen, C. R. Gasink, S. M. Kaech, J. D. Miller, et al.

2005. Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat. Immunol.* 6: 1236–1244.
26. Voehringer, D., C. Blaser, P. Brawand, D. H. Raulet, T. Hanke, and H. Pircher. 2001. Viral infections induce abundant numbers of senescent CD8 T cells. *J. Immunol.* 167: 4838–4843.
 27. Barber, D. L., E. J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J. P. Allison, A. H. Sharpe, G. J. Freeman, and R. Ahmed. 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439: 682–687.
 28. Bour, H., E. Peyron, M. Gaucherand, J. L. Garrigue, C. Desvignes, D. Kaiserlian, J. P. Revillard, and J. F. Nicolas. 1995. Major histocompatibility complex class I-restricted CD8⁺ T cells and class II-restricted CD4⁺ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur. J. Immunol.* 25: 3006–3010.
 29. Asherson, G. L., and W. Ptak. 1968. Contact and delayed hypersensitivity in the mouse, I: active sensitization and passive transfer. *Immunology* 15: 405–416.
 30. Murali-Krishna, K., J. D. Altman, M. Suresh, D. J. Sourdive, A. J. Zajac, J. D. Miller, J. Slansky, and R. Ahmed. 1998. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 8: 177–187.
 31. Veiga-Fernandes, H., U. Walter, C. Bourgeois, A. McLean, and B. Rocha. 2000. Response of naive and memory CD8⁺ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat. Immunol.* 1: 47–53.
 32. O'Leary, J. G., M. Goodarzi, D. L. Drayton, and U. H. von Andrian. 2006. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat. Immunol.* 7: 507–516.
 33. Grabbe, S., and T. Schwarz. 1998. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol. Today* 19: 37–44.
 34. Sporri, R., and C. Reis e Sousa. 2005. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4⁺ T cell populations lacking helper function. *Nat. Immunol.* 6: 163–170.
 35. Chen, C. J., H. Kono, D. Golenbock, G. Reed, S. Akira, and K. L. Rock. 2007. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat. Med.* 13: 851–856.
 36. Kroemer, G., and L. Zitvogel. 2007. Death, danger, and immunity: an infernal trio. *Immunol. Rev.* 220: 5–7.
 37. Liu, Y. J., V. Soumelis, N. Watanabe, T. Ito, Y. H. Wang, W. Malefyt Rde, M. Omori, B. Zhou, and S. F. Ziegler. 2007. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 193–219.
 38. Yang, D., Q. Chen, S. B. Su, P. Zhang, K. Kurosaka, R. R. Caspi, S. M. Michalek, H. F. Rosenberg, N. Zhang, and J. J. Oppenheim. 2008. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. *J. Exp. Med.* 205: 79–90.
 39. Belz, G. T., D. Wodarz, G. Diaz, M. A. Nowak, and P. C. Doherty. 2002. Compromised influenza virus-specific CD8⁺-T-cell memory in CD4⁺-T-cell-deficient mice. *J. Virol.* 76: 12388–12393.
 40. Shedlock, D. J., and H. Shen. 2003. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300: 337–339.
 41. Sun, J. C., and M. J. Bevan. 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300: 339–342.
 42. Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 2001. Exploring pathways for memory T cell generation. *J. Clin. Invest.* 108: 805–806.
 43. Wherry, E. J., and R. Ahmed. 2004. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J. Virol.* 78: 5535–5545.
 44. Zhang, X., S. Sun, I. Hwang, D. F. Tough, and J. Sprent. 1998. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8: 591–599.
 45. Berard, M., K. Brandt, S. Bulfone-Paus, and D. F. Tough. 2003. IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 170: 5018–5026.
 46. Beloeil, L., M. Tomkowiak, G. Angelov, T. Walzer, P. Dubois, and J. Marvel. 2003. In vivo impact of CpG1826 oligodeoxynucleotide on CD8 T cell primary responses and survival. *J. Immunol.* 171: 2995–3002.

4. Résultats complémentaires : caractéristiques de LT CD8+ mémoires (CD44/122^{int}) générés de façon spontanée dans des souris nontransgéniques

Les LT CD8+ mémoires CD44/122^{int} ou T_{IM} sont générés dans des souris transgéniques en absence de compétition inter-clonale. Afin d'identifier un phénotype spécifique des T_{IM}, nous avons procédé à la caractérisation de ces cellules issues des rates et des ganglions de souris sauvages et en utilisant des marqueurs de surface supplémentaires classiquement exprimés par les cellules mémoires. Les résultats ont montré, comme pour d'autres molécules et fonctions une expression de ces molécules par les T_{IM}, à des niveaux intermédiaires entre les cellules naïves et mémoires conventionnelles (Figure 10). Ainsi, nous n'avons pas réussi à identifier un marqueur spécifique des T_{IM}, une approche par microarray est en cours dans l'équipe.

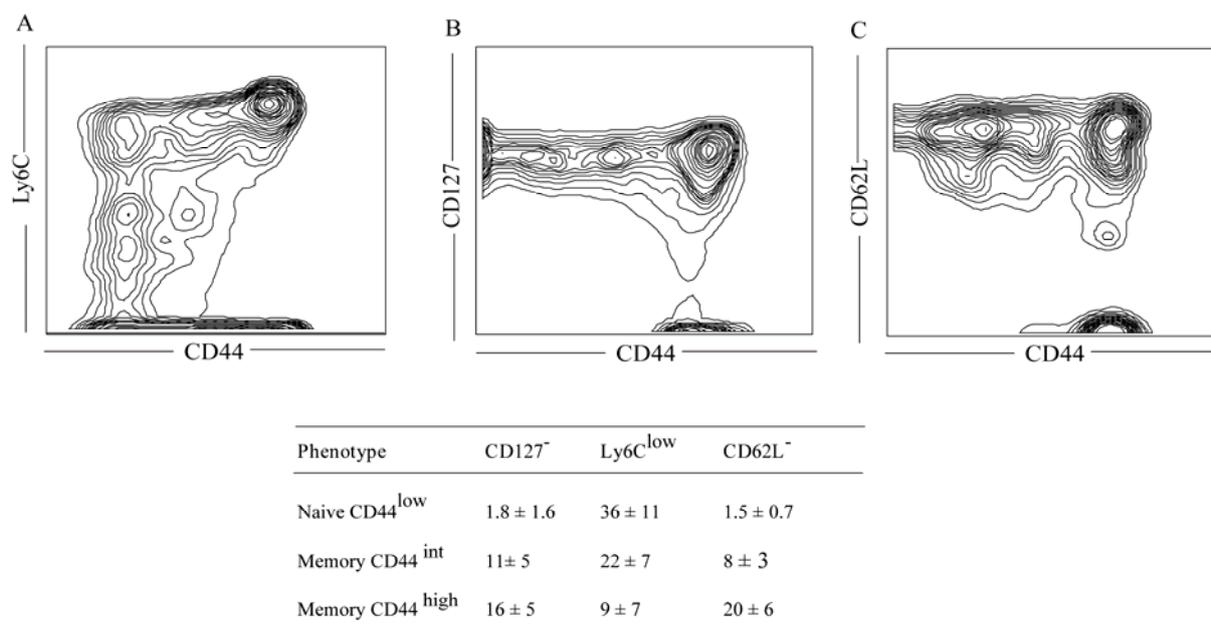


Figure 10. Caractérisation phénotypique des T_{IM} générés dans des souris nontransgéniques.

Les cellules des rates des souris C57BL/6 sont analysées au FACs selon leur niveau d'expression pour différents marqueurs comme CD8, CD44 et des marqueurs des cellules mémoires. Les « contours plots » représentent la co-expression du marqueur CD44 et Ly6C (A), CD127(B) ou CD62L (C) parmi les LT CD8+. Le tableau correspond aux pourcentages (moyenne ± Ecart-type) des différents marqueurs exprimés par les cellules naïves ou mémoires obtenues à partir des rates de 12 à 19 souris dans des expériences indépendantes

Nous avons également utilisé la population phénotype T_{IM} qui se développent spontanément dans les souris naïves non transgéniques pour étudier leur maintien. Pour cela, nous avons étudié leur persistance au cours du temps, et évalué leur survie et leur prolifération homéostatique *in vitro* et *in vivo*. La prolifération homéostatique des T_{IM} a été évaluée *in vivo* en mesurant leur niveau d'incorporation pour le BrdU (Figure 11A).

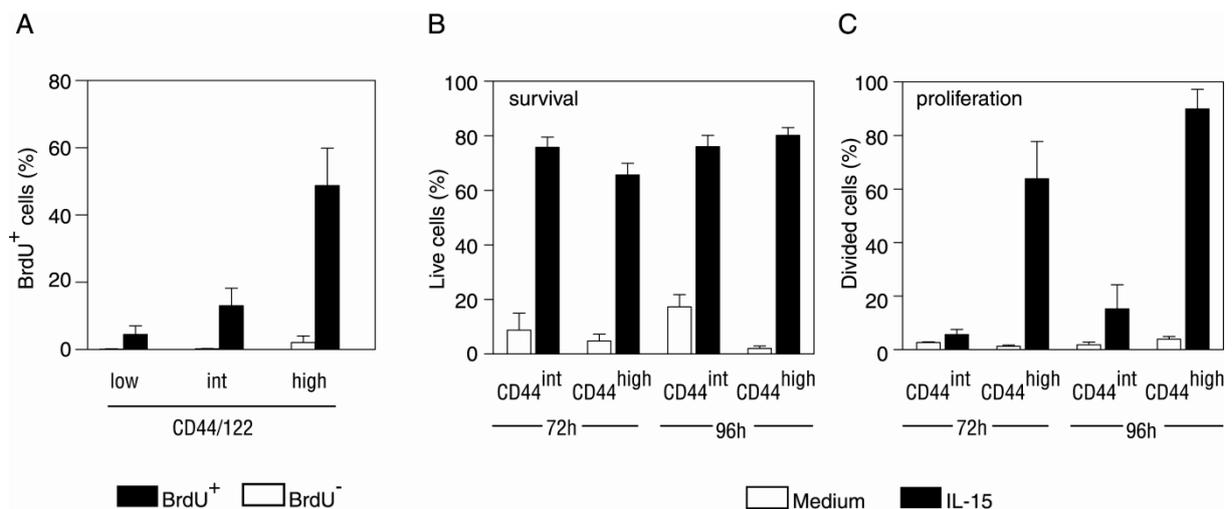


Figure 11. Mesure de la prolifération homéostatique et de la survie des T_{IM} . (A) L'eau fournie aux souris C57BL/10 sur une période de 9 jours a été supplémentée en BrdU ■ ou non supplémentée □. Les cellules des rates de ces souris sont ensuite analysées au FACS selon les marqueurs CD8, CD44 et CD122 ; un marquage intracellulaire est également réalisé pour mesurer leur incorporation nucléaire de BrdU. Les résultats obtenus correspondent aux pourcentages (moyenne ± Ecart-type de 3 expériences indépendantes) des cellules BrdU⁺ parmi les cellules naïves CD44/122^{low} et mémoires (CD44/122^{int} et CD44/122^{high}). (B-C) Les cellules de phénotype mémoires (CD44^{int} CD44^{high}) sont triées à partir des rates de souris C57BL/6 au FACS. Ces cellules sont ensuite marquées au CFSE avant leur incubation *in vitro* en présence ■ ou non □ d'IL-15 (50 ng/ml). Leur survie (B) et leur prolifération (C) sont mesurées 72h et 96h plus tard. Les histogrammes correspondent à la moyenne ± Ecart-type de deux expériences indépendantes

La prolifération homéostatique des T_{IM} est plus importante que celle de LT naïfs mais moins importante que celles des mémoires CD44/122^{high} ou T_{CM} . Notre hypothèse explicative de ce phénomène : le faible niveau d'expression de la chaîne β du récepteur à l'IL-15 (CD122) à la surface des T_{IM} , les rendrait peu sensibles à cette cytokine qui est indispensable à leur maintien à long terme. Afin de valider notre hypothèse, nous avons trié les LT CD8 selon leur niveau d'expression pour la molécule CD44 (CD44^{int} et CD44^{high}) que nous avons

marqué au CFSE avant de mesurer leur survie et leur prolifération *in vitro* en présence d'IL-15. Bien que le niveau d'expression de CD122 soit faible à la surface des T_{IM}, ils sont capables de se maintenir *in vitro* pendant 4 jours en présence d'IL-15 (Figure 11B). Toutefois, la prolifération des T_{IM} est moins importante que celle de cellules CD44^{high} en réponse à l'IL-15 (Figure 11C). La comparaison de la prolifération des cellules CD44^{int} et CD44^{high} *in vivo* a donné des résultats similaires, la prolifération des cellules CD44^{int} est moins importante que celle des CD44^{high} (Figure 12).

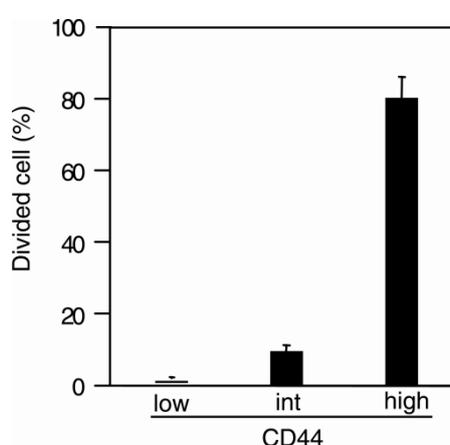


Figure 12. Mesure de la prolifération des TIM en réponse à l'IL-15 *in vivo*. Les LT CD8⁺ issus des souris C57BL/6 (Ly5.1) ont été triés au FACS selon leur niveau d'expression pour le marqueur CD44. Les trois sous-populations CD44^{low}, CD44^{int} et CD44^{high} sont ensuite marquées au CFSE avant d'être transférées dans des souris receveuses C57BL/6 (Ly5.1). Les souris receveuses sont ensuite injectées avec 3 µg d'IL-15 à 24h et à 48h après le transfert. Les cellules provenant des ganglions lymphatiques des souris hôtes, 72h après la première injection, sont ensuite identifiées par leur niveau d'expression pour les marqueurs CD8/CD44/Ly5.1. La prolifération des cellules est mesurée à l'aide du marquage au CFSE. Les résultats correspondent aux pourcentages (moyenne ± écart-type) des cellules ayant subi des divisions cellulaires parmi les cellules transférées (CD8⁺ Ly5.1⁺) naïves (CD44^{low}) ou mémoires (CD44^{int} et CD44^{high}) obtenues à partir de 4 souris. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

Ce résultat suggère que le faible niveau d'expression de CD122 par les T_{IM} permet leur survie, mais pas leur prolifération homéostatique en réponse à l'IL-15. Enfin, nous avons directement mesuré *in vivo*, la persistance des cellules CD44^{int} et CD44^{high} par rapport aux cellules naïves sur une période de 22 mois dans les souris C57BL/10 (Figure 13). La fréquence des cellules CD44/122^{int} parmi les LT CD8⁺ est relativement constante au cours

des 18 premiers mois de la vie des souris. Toutefois, chez les souris très âgées, cette population ne se maintient plus contrairement aux LT CD8⁺ mémoires de phénotype CD44/122^{high}.

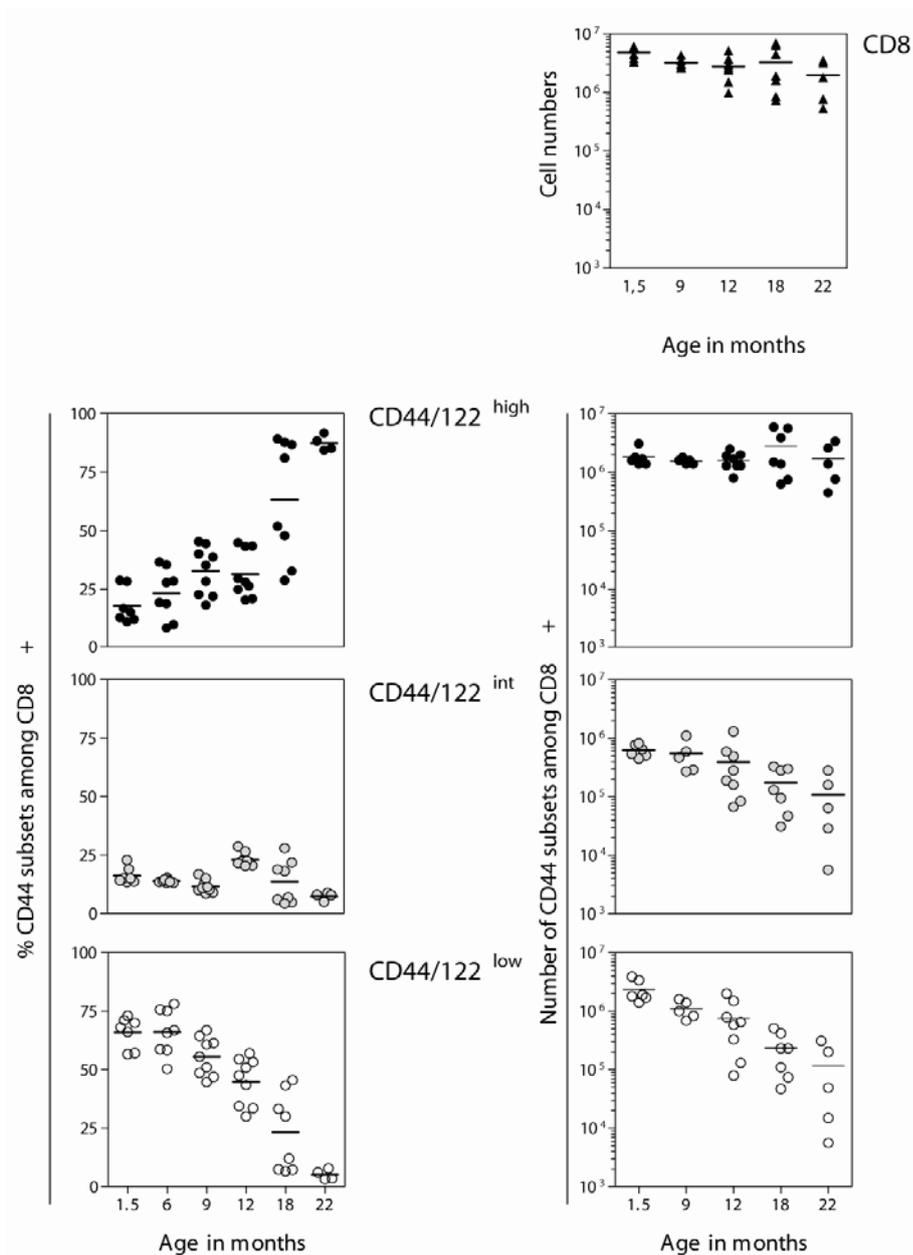


Figure 13. Persistance des TIM au cours du temps dans les souris C57BL/10. Les cellules issues des rates des souris C57BL/10 et d'âges différents ont été analysées au FACS afin de déterminer pour chaque souris, les pourcentages (panneaux de gauche) et les nombres (panneaux de droite) de cellules correspondant respectivement aux CD8 totaux et aux sous-populations CD44/122^{low}

○, CD44/122^{int} ● et CD44/122^{high} ● parmi les LT CD8⁺. Les barres horizontales indiquent la moyenne des pourcentages ou des nombres de cellules pour chaque groupe d'âge de souris.

Discussion

DISCUSSION

L'état actuel de nos connaissances sur le développement et les fonctions des LT CD8+ mémoires, proviennent essentiellement des études réalisées sur les cellules mémoires générées suite à une réponse inflammatoire induite par des agents pathogènes. Bien que les infections virales ou bactériennes induisent toujours des réactions inflammatoires, ces dernières peuvent être déclenchées en absence d'agents pathogènes et sont alors dites « stériles ». Les inflammations stériles peuvent provoquer des dysfonctionnements ou déclencher des pathologies comme des « cancers inflammatoires » [419]. Cependant, les mécanismes qui participent à la mise en place d'une réponse CD8+ dans un contexte inflammatoire stérile et les cellules impliquées ne sont pas bien caractérisées

Au cours de ma thèse, nous avons caractérisé une sous-population de LT CD8 mémoires impliquée dans les pathologies inflammatoires cutanées comme la dermatite allergique de contact. Nous avons appelé T_{IM} (*Inflammatory Memory CD8 T cells*), les cellules mémoires générées en condition inflammatoires stériles. Nous discuterons dans les parties qui vont suivre les différentes propriétés des T_{IM} par rapport aux cellules mémoires classiques générées dans un contexte infectieux.

1. Les T_{IM} sont impliqués dans la physiopathologie de l'HSRC

La mise en place de la DAC requiert à la fois une phase de sensibilisation, au cours de laquelle, les LT CD8+ spécifiques de l'allergène sont activés, et une phase d'élicitation induite lors d'un second contact avec le même allergène. La phase d'élicitation est caractérisée par le recrutement de LT CD8+ spécifiques de l'allergène au niveau cutané et la mise en place de la réponse inflammatoire. Les données relatives à cette phase d'élicitation sont généralement obtenues au pic de la réponse, c'est-à-dire 5 jours après le premier contact avec l'allergène. Ce délai est trop court pour caractériser les cellules mémoires générées dans un tel contexte. En effet, plusieurs études ont montré que plusieurs semaines sont nécessaires pour que les phénotypes et le profil global d'expression des gènes spécifiques des cellules mémoires puissent se stabiliser [5, 147, 166]. Dans la plupart des modèles d'immunisation volontaire chez la souris, 3 à 4 semaines sont nécessaires pour revenir au repos et ce laps de temps est considéré comme suffisant pour déterminer la phase mémoire. Ainsi, nous avons

choisi un délai de 40 jours séparant le premier contact avec l'haptène et la phase de révélation pour caractériser les LT CD8+ mémoires spécifiques de l'haptène. Notre premier objectif expérimental a été de démontrer que les cellules qui persistaient au delà des 40 jours correspondaient réellement à des cellules mémoires et non à une stimulation ou un recrutement permanent des cellules effectrices à partir des cellules naïves. Ce recrutement des cellules naïves pourrait s'expliquer par la persistance de l'haptène au niveau cutané. Cette hypothèse n'ayant pas été testée expérimentalement, la possibilité qu'il y ait de l'haptène résiduel au niveau cutané au moment de nos analyses n'est pas exclue. Toutefois, les résultats obtenus montrent bien l'existence de « vraies » cellules mémoires. En effet, la comparaison à différents jours, *in vitro*, des capacités prolifératives et de production des molécules effectrices (INF- γ) par les cellules spécifiques de l'haptène, nous ont permis à la fois de démontrer l'existence des cellules mémoires et de déterminer leur phénotype. Au pic de la réponse HSRC, c'est-à-dire 5 jours après le premier contact avec l'haptène, les phénotypes des cellules spécifiques de l'haptène correspondent à ceux des cellules effectrices/activées, elles expriment à leur surface de fort niveau des marqueurs CD44 et CD122 (CD44/122^{high}). Par contre, 40 jours plus tard, les cellules spécifiques de l'haptène expriment, de façon similaire aux T_{IM}, des niveaux intermédiaires pour les marqueurs CD44 et CD122 (CD44/122^{int}) tandis que la population mémoire identifiée par un phénotype partagé avec les LT_{EFF} (CD44/122^{high}) n'est pas enrichie en cellules spécifiques de l'haptène. Nous avons également confirmé *in vivo*, l'implication des T_{IM} dans la réponse HSRC. En effet, le transfert adoptif des cellules de même phénotype que les T_{IM}, issues des ganglions drainants et des rates des souris sensibilisées, dans des souris receveuses (CD3 ϵ ^{-/-}) permet de conférer à ces dernières l'hypersensibilité au DNFB. Nous pouvons ainsi réfuter l'hypothèse selon laquelle la réponse secondaire observée à ce temps pourrait être liée à l'action de cellules effectrices récemment activées par l'haptène persistant au niveau cutané. L'œdème provoqué à 40 jours est donc bien une réponse mémoire portée par des lymphocytes de phénotype T_{IM}. Il faut noter cependant que l'implication des T_{IM} dans la physiopathologie de l'HSRC n'exclut pas la possibilité que d'autres cellules soient impliquées. En effet, les cellules NK pourraient aussi participer à la réponse mémoire au DNFB [409]. Le rôle des cellules NK comme cellules mémoires est contradictoire avec la physiologie décrite jusqu'à présent pour ces cellules [420]. En effet, les cellules NK ont toujours été décrites comme des cellules appartenant à

l'immunité innée capables de détecter des cellules infectées par des microorganismes, des tumeurs et des cellules allogéniques sans aucune reconnaissance spécifique [133, 134, 420]. Cependant, les résultats obtenus par O'leary montrent que les cellules NK n'exprimant pas à leur surface des récepteurs spécifiques d'un Ag, seraient impliquées dans une réponse mémoire spécifique [409]. De nouvelles études sont nécessaires pour comprendre les mécanismes permettant aux cellules NK de porter une mémoire spécifique d'un antigène donné.

2. Les différentes sous-populations de cellules mémoires et T_{IM}

La dichotomie T_{CM} et T_{EM} a permis d'affiner l'étude des propriétés des LT CD8+ mémoires. Il est toutefois évident aujourd'hui que l'hétérogénéité des cellules mémoires dépasse cette simple dichotomie. D'autres paramètres comme le niveau d'expression des marqueurs comme KLRG1, PD1, les récepteurs inhibiteurs des cellules NK (**KIRs** pour *killer cell immunoglobulin-like receptors* et Ly49) [421] et les facteurs de transcription comme Tbet et Eomes sont maintenant utilisés pour une meilleure compréhension de la diversité des cellules mémoires et leur classification.

Par ailleurs, le contexte de la réponse primaire influençant directement les propriétés de cellules mémoires générées, la définition d'une sous-population mémoire en fonction des conditions dans lesquelles elle est générée (infection virale aiguë ou chronique, autoimmunité, inflammation stérile...) fait sens ou porte tout son sens. Ainsi, la caractérisation des cellules mémoires générées dans un contexte d'inflammation stérile nous a permis de définir les T_{IM} comme des cellules exprimant des niveaux intermédiaires en comparaison aux cellules naïves et mémoires induites par un virus, de différents marqueurs phénotypiques et fonctionnels : CD44, CD122, KLRG1, PD1, mais également les facteurs de transcription T-bet et Eomes ou encore le niveau de production d'IFN- γ , CCL5, ou d'IL-2. Par ailleurs, les T_{IM} ne correspondent pas un stade de différenciation final et peuvent se différencier en cellules mémoires de phénotype classique T_{CM} (CD44/122^{high} CD62L+) après une restimulation antigénique à l'aide de DCs matures. L'ensemble de ces résultats suggère que les T_{IM} correspondent à une étape précoce de la différenciation des cellules naïves en cellules mémoires apparentées à la population mémoire centrale par l'expression de CD62L.

Par ailleurs, les T_{IM} pourraient être apparentés aux MPECs, mais sont présents bien après la résolution de la réponse primaire (sensibilisation) dans le modèle DNFB (≥ 65 jours) et à vie dans les souris transgéniques F5 et n'appartiennent pas donc à une population effectrice. Ils pourraient correspondre à un stade de pré- T_{CM}

3. Conditions de génération des T_{IM}

La génération des cellules mémoires dépend des signaux perçus lors de la réponse primaire. Nous avons voulu ainsi caractériser la nature des signaux indispensables à la génération des T_{IM} . Nous montrons dans ce travail que l'immunisation des souris transgéniques F5 avec le peptide NP68 en solution saline induit la maturation des DCs *in situ*. Par ailleurs, il a été montré dans d'autres protocoles d'immunisation (anti-CD3, super antigène) que l'activation concomitante d'un grand nombre de cellules T peut induire une maturation des DCs *in situ*. De plus, la maturation des DCs dans le modèle F5 est bien lié à l'activation simultanée d'un très grand nombre de lymphocytes spécifiques du peptide NP68, puisqu'elle n'est pas observée quand le peptide est injecté à des souris non transgéniques. En outre, l'immunisation avec le peptide de cellules F5 naïves transférées en nombre limité (jusqu'à 2×10^6) dans un hôte syngénique n'est pas productive et ne permet pas la génération de cellules mémoires [422].

Ainsi, l'activation simultanée d'un grand nombre de cellules naïves en absence de PAMPs conduit à la génération des T_{IM} dans le modèle F5. Il apparaît crucial pour la suite de ce travail de déterminer les signaux impliqués dans la maturation des DCs dans cette réponse. Le TNF- α produit par les LT CD8+ naïfs F5 après stimulation antigénique est un bon candidat; de même qu'il est impliqué, au même titre que l'IL-1 β , dans la phase de sensibilisation au DNFB [224]. La mort cellulaire importante observée dans les 2 modèles de génération de T_{IM} que nous avons utilisé est également une source partielle d'alarmines qui pourraient être impliquées dans la maturation des DCs conduisant à la génération des T_{IM} .

Par ailleurs, dans ces deux modèles l'activation des LT CD8+ se fait en absence de LT CD4+. Or les études des LT CD8+ mémoires générées suite à une infection virale montrent que les cellules générées en absence des signaux délivrés par les LT CD4+, ont des fonctions effectrices réduites, et a fortiori des capacités protectrices réduites lors d'un second contact avec le même Ag [6, 178]. Les capacités effectrices des T_{IM} sont moindres par rapport aux

cellules mémoires CD44/122^{high}. Ainsi, dans un modèle murin d'infection virale, les T_{IM} auraient pu être considérés comme des cellules mémoires compromises et leur capacité à répondre à une infection virale sont d'ailleurs en cours d'étude dans l'équipe. Toutefois, dans la réponse HSRC, seuls les T_{IM} sont capables de transférer l'hypersensibilité au DNFB à une souris non sensibilisée. Ces résultats suggèrent que selon la nature de l'Ag, les signaux délivrés par les LT CD4⁺ peuvent être plus ou moins indispensable à la génération de cellules mémoires efficaces dans leur contexte de rappel.

4. Maintien des T_{IM}

Les cellules mémoires T_{IM} expriment des niveaux intermédiaires de la molécule CD122 à leur surface. Un tel niveau d'expression de CD122 pourrait influencer leur maintien *in vivo*. Nous avons montré que les cellules mémoires T_{IM} générées de façon spontanée dans les souris non immunisées, prolifèrent en réponse à l'IL-15 *in vitro* ; et *in vivo*. Toutefois, les capacités prolifératives des T_{IM} restent modérées par rapport aux cellules mémoires CD44/122^{high}. En outre, bien que nos résultats ne nous permettent pas de montrer l'effet différentiel de l'IL-15, *in vitro*, sur la survie des T_{IM} et des cellules mémoires CD44/122^{high}, il existerait une corrélation positive entre le niveau d'expression de CD122 à la surface de ces cellules et leur résistance à l'apoptose [413]. L'ensemble de ces résultats, suggère que le maintien des cellules mémoires T_{IM}, *in vivo*, est moindre par rapport aux cellules mémoires CD44/122^{high}. Ainsi, seules les cellules de phénotype CD44/122^{high} s'accumuleraient au cours du temps dans les souris non immunisées et c'est ce qui est observé dans les souris très âgées (≥ 18 mois) (Figure14). Le fait que les T_{IM} ne puissent pas se maintenir à long terme *in vivo*, pourrait avoir une implication importante dans l'évolution pathologique de la DAC. En effet, les études antérieures de l'équipe dans le modèle F5 ont montré qu'une stimulation antigénique répétée ou la présence de PAMP comme le CpG pouvait influencer directement le niveau d'expression de CD122 à la surface de LT CD8⁺ mémoires générées [413, 422]. En ce qui concerne la réponse HSRC, l'étude réalisée par Akiba et *al* a permis de montrer que le CpG avait un effet direct à la fois sur l'état de maturation des DCs et de l'intensité de la réponse. En effet, une injection sous-cutanée du CpG, 24h avant l'application du DNFB, augmente l'HSRC testée 5 jours après la sensibilisation. Ainsi, la présence de PAMPs lors de la sensibilisation (infection concomitante) ou une exposition répétée à un allergène pourrait

convertir un syndrome aigu (génération de T_{IM}) en maladie chronique (génération de mémoire $CD44/122^{high}$) [423].

5. Hétérogénéité des T_{IM}

Nous avons défini la population T_{IM} selon des conditions de génération et cette population, au même titre que les T_{CM} et T_{EM} , est probablement elle-même hétérogène. Pour apprécier cette diversité, nous avons affiné l'étude du phénotype de la population $CD44/122^{int}$ dans les souris polyclonales. Le niveau d'expression des marqueurs Ly6c, CD127 et CD62L par les T_{IM} dans les souris B10, nous a permis de montrer que la population des $CD44/CD122^{int}$ est effectivement hétérogène, et contient des cellules exprimant des niveaux ou moins forts de ces marqueurs. Cependant, la population $CD44/122^{int}$ de souris C57BL/10 ne contient probablement pas que des cellules mémoires du type T_{IM} . Ainsi, l'étude d'une population homogène de T_{IM} générée dans le modèle F5 sera nécessaire pour identifier des marqueurs spécifiques de cette population, qui pourront alors être utilisés dans un modèle polyclonal afin d'étudier l'hétérogénéité de la population. Les travaux en cours utilisent donc une approche plus globale avec des outils comme le transcriptome afin de mieux caractériser cette population et éventuellement d'identifier son équivalent chez l'homme, ce qui permettrait de confirmer son rôle dans les différentes pathologies inflammatoires.

TLR2 engagement on memory CD8 T cells modulates their cytokine-mediated proliferation and the maintenance of their IFN- γ secretion capacity *in vivo*

Anne Cottalorda, Blandine C. Mercier, **F.Martial Mbitikon-Kobo**, Christophe Arpin, Denise Y.L. Teoh, Andrew McMichael, Jacqueline Marvel and Nathalie Bonnefoy-Bérard.

(Article soumis)

TLR2 engagement on memory CD8 T cells modulates their cytokine-mediated proliferation and the maintenance of their IFN- γ secretion capacity in vivo.

Anne Cottalorda^{1,2,3}, Blandine C. Mercier^{1,2,3}, F. Martial Mbitikon-Kobo^{1,2,3}, Christophe Arpin^{1,2,3}, Denise Y.L. Teoh⁴, Andrew McMichael⁵, Jacqueline Marvel^{1,2,3,6} and Nathalie Bonnefoy-Bérard^{1,2,3,6}

¹ Université de Lyon, France; ² INSERM, U851, 21 Avenue Tony Garnier, Lyon, F-69007, France; ³ Université Lyon1, IFR128, France; ⁴ Singapore Institute for Clinical Sciences, Brenner Centre for Molecular Medicine, Singapore; ⁵ MRC, Human Immunology Unit, Institute of Molecular Medicine, Oxford, UK.

⁶These two authors equally contributed to the manuscript and therefore share the last authorship.

Correspondence: Dr. Nathalie Bonnefoy-Bérard (INSERM U851; 21 avenue Tony Garnier; 69365 Lyon Cedex 07; France; Tel: +33 437 282 372; Fax: +33 437 282 341; nathalie.bonnefoy-berard@inserm.fr)

Total character count: 19206

Running title: TLR2 controls memory CD8 T cell homeostasis

Abbreviations: Ab, Antibody ; Ag, antigen ; γ c : gamma chain ; MP, Memory-phenotype; Pam, Pam₃CysSK₄ ; T_{IM}, inflammatory memory T cell ; TLR, Toll-like Receptor.

Abstract

Persistence of memory CD8 T cells is known to be controlled by common gamma chain cytokines, such as IL-2, -7 and -15. However, other molecules may be involved in this phenomenon. We show here that TLR2^{-/-} mice have a decreased frequency of memory-phenotype CD8 T cells compared to WT mice. This prompted the investigation of the potential role of TLR2 in the homeostasis of memory CD8 T cells. We demonstrate that TLR2 engagement on memory CD8 T cells increases their proliferation and expansion induced by IL-7 both *in vitro* and *in vivo*. We also demonstrate that TLR2 engagement potentiates IL-2 signaling to induce IFN- γ secretion *in vitro* and to increase the pool of memory cells with improved effector function *in vivo*. Collectively, our results describe a new TLR2-dependent mechanism that directly controls memory CD8 T cell proliferation and IFN- γ secretion in the absence of specific antigen. These results suggest that continuous TLR signaling in response to microbial stimuli or danger signals might directly promotes the maintenance of memory CD8 T cells in the organism.

175 words

Introduction

Immunological memory, a hallmark of the adaptative immune system, is the basis for protection against previously encountered pathogen, and is thus the ultimate goal of vaccination. Long-term T cell immunity is provided by an increased number of antigen (Ag)-specific precursors, which persists over time (1). Increased survival is a key feature of memory cells, but they are also defined as Ag-experienced cells which have acquired greater proliferative capacities and improved effector functions, such as cytotoxicity or the capacity to secrete various soluble effectors (2, 3).

Numerous studies have tried to determine which factors allow the maintenance of memory CD8 T cells. Whereas naive CD8 T cells required MHC-I and self peptide contacts to survive, memory CD8 T cells can be maintained without any MHC-I requirement (4, 5). In contrast, they are strongly dependent on signals induced by cytokines, especially cytokines using the common gamma chain (γ c) receptor such as IL-15 and IL-7 (6-9). Indeed, IL-15 is one of the major cytokines that governs memory CD8 T cells survival and turnover. In the absence of Ag, IL-15 enables proliferation and survival of memory-phenotype (MP) CD8 T cells both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, mice which over express IL-15 provide a positive environment for memory CD8 T cells, while mice deficient for IL-15 (IL-15^{-/-}) or its specific receptor subunit (IL-15R^{-/-}) show a 50-70% reduction in memory CD8 T cells (10-12). Due to its key role in T cell development, the effect of IL-7 on memory CD8 T cells has been more difficult to decrypt. IL-7 was first shown to play a role in the survival of memory CD8 T cells, but not their basal turnover (8). However, over-expression of IL-7 restores MP CD8 T cell proliferation and numbers in IL15^{-/-} mice (9). Thus, both IL-15 and IL-7 seem to be important for memory CD8 T cell homeostasis. The role of IL-2, another γ c cytokine, is much more debated. Since injection of anti-IL-2 antibodies (Ab) increased the turnover of memory cells

(13), IL-2 was first described as a negative regulator of the memory CD8 T cell compartment. However, it has now been demonstrated that injection of anti-IL-2 Ab do not antagonize, but instead, increase IL-2 biological activity, indicating a positive role for IL-2 on memory CD8 T cell turnover (14). Therefore, all three γ c cytokines, IL-15, IL-7 and IL-2, could potentially positively regulate memory CD8 T cell homeostasis.

Although cytokines play an essential role in CD8 T cell homeostasis, other molecules may contribute to the maintenance of memory cells. Consistently, IL-15R α ^{-/-} mice have consistently been shown to carry a residual population of MP CD8 T cells. (10). T cells express Toll-like receptors (TLR) and recent studies have suggested a direct role of TLR in driving memory CD4 T cell proliferation and IFN- γ secretion *in vitro* (15, 16). We describe here that TLR2^{-/-} mice present a decreased frequency of MP CD8 T cells as compared to WT mice. We have previously shown that TLR2 acts as a costimulatory receptor, on murine CD8 T cells (17, 18). Therefore, we have assessed its contribution to memory CD8 T cells homeostasis. We demonstrate, both *in vitro* and *in vivo*, that TLR2 engagement on memory CD8 T cells increases their proliferation and expansion induced by IL-7. In presence of IL-2, TLR2 engagement on memory CD8 T cells increases CD25 expression. TLR2 engagement also potentiates IL-2, but not IL-7 or IL-15, signaling to induce IFN- γ secretion *in vitro* and increases the pool of memory cells with improved IFN- γ secretion capacities *in vivo*. In conclusion, we propose here a new TLR2-dependent mechanism involved in the Ag-independent control of memory CD8 T cell homeostasis and function.

Results and discussion

TLR2 knock-out mice show a decreased frequency of naturally occurring MP CD8 T cells

We analyzed the impact of knocking out TLR2 on the representation of CD8 T cell sub-populations. As shown in figure 1A, the proportion of naturally occurring MP CD8 T cell sub-population within total CD8 T cells was significantly lower in TLR2^{-/-} mice than in WT mice. In contrast, we did not observe such a decrease for the memory CD4 T cell compartment (unpublished data) and, as previously described by Akira and colleagues (19), representation of total CD3, CD4 and CD8 T cell populations was not affected in TLR2^{-/-} mice (Fig 1B and unpublished data). Altogether, these results suggested a potential role for TLR2 in the maintenance of memory CD8 T cells *in vivo*. As we previously demonstrated that TLR2 is functionally expressed on murine CD8 T cells (17, 18), we examined its potential involvement in memory CD8 T cells homeostasis.

TLR2 ligands directly affect the cytokine-mediated proliferation and the expansion of MP and Ag-specific memory CD8 T cells in vitro

We next assessed the effect of the TLR2 ligand Pam₃CysSK₄ (Pam) on the proliferative response of naturally-occurring MP CD8 T cells. MP CD8 T cells were cell-sorted by FACS and cultured for 96 h either in medium alone or in the presence of IL-2, IL-7, or IL-15, with or without Pam. (Fig. 2). IL-2, IL-7 or IL-15 enabled the proliferation of MP CD8 T cells (60, 25, and 85% of proliferating cells in each condition respectively) (Fig 2A and B) and the expression of the IL-2R α chain (CD25) at the surface of proliferating cells (see further) (Fig 2A and C). IL-2 and IL-15-mediated proliferations were associated with cell expansion and IL-7-mediated proliferation was associated with the maintenance of the initial cell numbers (Fig 2D). Pam alone had no effect on MP CD8 T cell proliferation, CD25

expression or cell surviving (Fig 2A-D). In the presence of IL-2, Pam strongly increased CD25 expression of MP CD8 T cells but it did not increase their proliferation or the number of surviving cells (Fig 2A-D). In the presence of IL-7, addition of Pam strongly increased MP cell proliferation, an effect associated with a two-fold increase in cell numbers (Fig 2A, B and D). Finally, we did not observe any effect of Pam in the presence of IL-15 (Fig 2A-D). A similar increase in IL-2-induced CD25 expression and in IL-7-induced proliferation and was observed with MALP-2, another TLR2 ligand, but not with LPS, a TLR4 ligand (Fig S1). Moreover, the addition of Pam did not modify proliferation and CD25 expression of memory CD8 T cells from TLR2^{-/-} mice in response to IL-2 or IL-7 (Fig S2). Hence, these results clearly demonstrate that, *in vitro*, TLR2 engagement on MP CD8 T cells increases their responsiveness to IL-2 and IL-7 cytokines.

The above experiments were performed using naturally occurring MP CD8 T cells. We next assessed the effect of TLR2 ligands on Ag-specific memory CD8 T cells. Two types of Ag-specific memory CD8 T cells were generated: inflammatory memory cells (T_{IM}) (CD44^{int}CD122^{int}) (20, 21) and vaccinia-specific memory cells (CD44^{hi}CD122^{hi}). The two subsets of memory cells were cell-sorted by FACS and cultured in medium alone or in the presence of IL-2, IL-7 or IL-15, with or without Pam (Fig 3). As previously observed on MP CD8 T cells (Fig 2), Pam did not modify proliferative response and CD25 expression induced by IL-15 stimulation (unpublished data). In contrast, the addition of Pam slightly affected proliferation induced by IL-7 and increased CD25 expression induced by IL-2 for both types of Ag-specific memory CD8 T cells (Fig 3A-F). Furthermore, Pam was also able to significantly increase the IL-2-induced proliferation of T_{IM} (Fig 3D and E) but not vaccinia-specific memory CD8 T cells (Fig 3A and B).

Collectively, our *in vitro* results demonstrate that TLR2 engagement on either naturally occurring MP CD8 T cells or Ag-specific memory CD8 T cells strongly potentiates

their IL-2-driven CD25 expression and increases their IL-7-mediated proliferation. These observations extend to murine memory CD8 T cells the previously published demonstrations that TLR engagement increases Ag-independent proliferation of human memory CD4 T cells *in vitro* (15, 16). We next asked whether TLR2 ligands could potentiate cytokine effects on memory CD8 T cell maintenance *in vivo*.

TLR2 engagement on memory CD8 T cells potentiates IL-2 and IL-7 signaling in vivo.

To address the effects of Pam on CD8 T cells *in vivo*, total CFSE-labeled CD8 T cells from C57BL/6 CD45.1 mice were transferred to non-irradiated, syngenic TLR2^{-/-} CD45.2 mice. This experimental set up ensured that the only cells capable of responding to TLR2 engagement were the transferred CD8 T cells. Mice then received injections of IL-2 or IL-7 or Pam as described in materials and methods. Seven days after the first injection, proliferation and expansion of both naive and memory transferred cells were analyzed directly *ex vivo*.

As shown in figure S3, IL-2 alone or in combination with Pam did not induce any cellular proliferation or accumulation of naive CD8 T cells. IL-7 led to a weak proliferation of naive CD8 T cells and addition of Pam increased the percentage of cells having divided. However, this proliferation was not associated with an increase of the naive CD8 T cell number (Fig S3). When analyzing transferred MP CD8 T cells, we showed that both cytokines induced a substantial cell proliferation (55% and 80% of cells had divided at least once respectively). Pam alone had no effect on transferred memory CD8 T cells, but it significantly increased the percentage of cells which had divided in IL-2- and IL-7-treated mice (Fig 4A). When compared to mice treated with PBS, IL-2 or IL-7 treatment was associated with increased numbers of memory CD8 T cells and, as found *in vitro*, the addition of Pam further increased IL-7-driven expansion *in vivo* (Fig 4B). Thus, our results show that

TLR2 engagement on MP CD8 T cells affects IL-2-driven proliferation and enhances both proliferation and expansion in the presence of IL-7 *in vivo*.

TLR2 ligands directly affect IFN- γ secretion capacity of memory CD8 T cells

Together with a greater capacity for survival and proliferation (1), memory CD8 T cells are also known for their augmented ability to rapidly produce IFN- γ following TCR engagement or stimulation with cytokines such as IL-12 and IL-18 (2, 22). We thus examined the effect of TLR2 ligands on IFN- γ secretion by naturally occurring MP CD8 T cells. For that purpose, MP CD8 T cells were cultured in medium alone or in the presence of IL-2, IL-7 or IL-15, with or without Pam and IFN- γ secretion was monitored in cell culture supernatants for the next 96 h. While cytokines or Pam alone did not induce any detectable IFN- γ production, the combination of Pam with IL-2 (but not with IL-7 or IL-15) induced a strong IFN- γ secretion (Fig 5A and unpublished results). This increased IFN- γ detected in culture supernatants was associated with an increased percentage of IFN- γ producing cells and a higher IFN- γ content per cell (Fig 5B). However, the degree of IFN- γ production in response to IL-2 and Pam combination was lower and delayed when compared to the one induced following IL-12 and IL-18 stimulation (Fig 5C and D). Using virus-specific memory CD8 T cells (Fig S4 A) or T_{IM} cells (Fig S4 B), we confirmed that Pam acts synergistically with IL-2 to induce IFN- γ production, but the response elicited is notably delayed in comparison to that induced by TCR engagement (Fig S4 B). Collectively, these results show that TLR2 ligands act in synergy with IL-2 to induce IFN- γ production in the absence of specific Ag *in vitro*.

We next analyzed *ex vivo* the IFN- γ secretion by naturally occurring MP CD8 T cells isolated from mice treated with IL-2, IL-7, Pam or combination of cytokines and Pam. When cells were directly tested *ex vivo*, we did not detect any IFN- γ ⁺ cells, regardless of the *in vivo* treatment administered (Fig 5E). However, following PMA and ionomycin stimulation, we

showed that about 55 % of memory CD8 T cells treated with IL-2 expressed IFN- γ and that the presence of Pam increased the percentage of IFN- γ^+ memory CD8 T cells up to 63 % (Fig 5F). In contrast, addition of Pam had no apparent effect on the amount of IFN- γ production induced by IL-7 (Fig 5F). Altogether, our results show that TLR2 and IL-2, but not IL-7, act in combination *in vivo* to maintain and/or induce memory CD8 T cells, which exert improved effector functions upon restimulation.

Collectively, our results provide evidence for a direct role of TLR2 in the Ag-independent responses of memory CD8 T cells. First, we demonstrate that TLR2 engagement on memory CD8 T cells increases their proliferation and expansion induced by IL-7. Second, we show that TLR2 ligands act in synergy with IL-2 to modulate IFN- γ secretion capacity of memory CD8 T cells. The absence of effect of TLR2 ligands on IL-2 induced proliferation could be associated with the heterogeneity of memory CD8 T cell populations and especially naturally occurring MP population. Thus, one could speculate that only some subsets, the T_{IM} subset for example, have the ability to proliferate more vigorously in response to the combination of IL-2 and Pam. Furthermore, the differences observed between IL-2, IL-7 and IL-15 could be associated with different signaling events downstream their receptors, even if these events need to be defined (23). For example, it has been demonstrated that the co-engagement of IL-2R and TLR2 on effector CD4 T cells leads to an augmented activation of p38 and JNK kinases, which are involved in IFN- γ transcription (24). Therefore, testing whether the combination of IL-2 and Pam (but not IL-7 and Pam) stimulates this signaling pathway in memory CD8 T cells would be of special interest.

Pathogens, which are the main source of TLR ligands, have long been associated with the homeostasis of memory CD8 T cells. (25-27). This was first demonstrated by the reactivation of memory CD8 T cells by heterologous virus, that is to say by their capacity to

cross-react with MHC-presented heterologous viral-peptides (28). It was also reported that infections might induce polyclonal proliferation of memory CD8 T cells by a TCR-independent mechanism. This mechanism can be mimicked by injections of TLR3, TLR4 or TLR9 ligands, which induce type I IFN and then IL-15 production by APC (26, 27). Since IL-15 is a key cytokine for the control of memory CD8 T cell proliferation and expansion, TLR ligands, and thus pathogens, could indirectly control the homeostasis of memory CD8 T cells *in vivo* (6, 7). Here, we propose a novel pathway that would directly involve TLR2 in the TCR-independent expansion of memory CD8 T cells following infections. Indeed, in the presence of IL-7, TLR2 ligands increase proliferation and expansion of both naturally occurring and Ag-specific memory CD8 T cell subsets *in vitro* and *in vivo*. We also demonstrate that the combination of IL-2 and TLR2 ligands favors the accumulation of memory cells, which exert improved effector functions upon stimulation. Thus, our results support the idea that pathogens, through their direct interaction with TLR expressed on memory CD8 T cells, modulate maintenance and effector capacities of such lymphocytes, in a TCR-independent manner.

Our results also support a new mechanism by which TLR2, in combination with IL-2, could act on IFN- γ production in the absence of specific Ag. Until recently, it was assumed that TCR engagement was the only mechanism whereby memory T cells could be activated to perform effector function, with the notable exception of Bancroft and colleagues who recently reported that IL-12 and IL-18 are capable of mediating bystander activation and IFN- γ production by memory CD8 T cells (22). Here, we describe a second pathway, dependent on IL-2R and TLR2 engagement, which results in IFN- γ secretion by memory CD8 T cells in the absence of Ag. We thus reinforce the idea that memory CD8 T cells could play a role in innate immune responses, independently of TCR specificity. We propose that TLR ligands may play a role in the early CD8 T cell mediated IFN- γ secretion in response to pathogens,

not only through their capacities to induce production of IL-12 and IL-18 by innate cells and but also directly through the engagement of TLR2 on memory CD8 T cells.

Finally, TLR are not only receptors for pathogen-associated molecular patterns but also for endogenous molecules associated with danger signals (29). Therefore, exposition of memory CD8 T cells to endogenous TLR2 ligands such as High mobility group box 1 factor, Heat shock protein 60 or hyaluronic acid fragments of low molecular weight, resulting from tissue lesions or extensive cell death, could also drive the maintenance of memory CD8 T cells or the Ag-independent production of IFN- γ over time.

Conclusion

In conclusion, we show evidence for a novel role for TLR2 in memory CD8 T cell homeostasis. We demonstrate that TLR2 ligands, in combination with IL-7, participate to the maintenance of memory CD8 T cells whereas, in the presence of IL-2, they improve IFN- γ secretion capacity of memory CD8 T cells. TLR have been previously shown to support memory CD4 T cells proliferation and effector functions *in vitro* (16) and to participate to the maintenance of serological memory (30). Therefore, TLR could be now defined as key regulators of long-term immunity.

Materials&Methods

Mice

TCR-transgenic F5 mice were a gift from D. Kioussis (National Institute for Medical Research, London, UK) and TLR2^{-/-} mice were obtained from S. Akira (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka, Japan). C57BL/6, C57BL/6 CD45.1 mice were purchased from Charles Rivers laboratories (l'Arbresle, France). Mice were bred at the "Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris" under specific pathogen-free conditions. Experimental procedures have been approved by an institutional review board, the CREEA.

Immunization

TCR-transgenic F5 mice were immunized twice, with a 24 h interval, with 50 nmol A/NT/60/68 influenza virus nucleoprotein peptide NP68 (residues 366-374; Dr. D. Fischeux, Institut de Biologie et Biochimie des Protéines, Lyon, France). In other experiments, 1x10⁶ naive F5 CD8 T cells were injected i.v. into C57BL/6 CD45.1 hosts. One day later, mice were immunized with 2x10⁵ PFU of recombinant *vaccinia* virus, which expressed NP68. Memory cells were recovered 4 weeks after immunization.

Cell preparation and culture

CD8 T cells were negatively selected, cell-sorted by FACS and CFSE-labelled (17). CD8 T cell populations were then cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 40 µg/ml gentamycin and 50 µM 2-ME. For *in vitro* experiments, cells were stimulated with IL-2 (20 ng/mL), IL-7 (12.5 ng/mL), IL-15 (25 ng/mL), IL-12 (1 ng/mL) or IL-18 (100ng/mL) (Peprotech France, Levallois Perret, France), Pam (2 µg/mL) (EMC Tübingen, Germany), MALP-2 (0.5 µg/mL) (EMC Tübingen, Germany or NP68 peptide (10 nM).

Adoptive transfer

2×10^6 CD45.1⁺ CD8 T cells were injected i.v. to TLR2^{-/-} mice. As previously described by Sprent and colleagues (14), recipients were injected i.p. with 1.5 μ g IL-2 alone or in combination with 20 μ g Pam consecutively for 7 days. In other experiments, mice were injected with 1.5 μ g IL-7 alone or in combination with 20 μ g Pam for 4 days and then with saline or 20 μ g Pam over the next 3 days.

Cytokine production analysis

IFN- γ production was determined as previously described (17).

Flow cytometry

Cells were stained with PE-Cyanine5- or PerCP-Cyanine 5.5-coupled anti-CD8 α , anti-CD44 PE, anti-CD25 PE, biotinylated anti-Ly6C and anti-CD45.1 Ab for 30 min at 4°C. Biotinylated Ab were revealed by incubating cells with APC or FITC coupled streptavidin (BD PharMingen). For intracellular-cytokine detection assays, cells were incubated with 0.67 μ L/mL GolgiStop (BD PharMingen), PMA (10 ng/mL) and ionomycin (1 μ g/mL) for 5 h. At the end of incubation, IFN- γ staining was realized as previously described (17).

Online supplemental material

Fig. S1 shows that TLR2 ligands, but no TLR4 ligands, enhance the proliferation and CD25 expression of MP CD8 T cells. Fig. S2 shows that the effects of Pam are TLR2-dependent. Fig. S3 shows the effect of Pam, alone or in combination with cytokines, on naive CD8 T cell proliferation and cell numbers *in vivo*. Fig. S4 shows that TLR2 ligands and IL-2 lead to IFN-

γ secretion by Ag-specific memory CD8 T cells. IFN- γ secretion is, however, delayed and weak when compared to the one induced following TCR engagement.

Acknowledgment

This work was supported by institutional grants from the INSERM and the UCB Lyon I, and additional support from the Association pour la Recherche contre le Cancer, the ligue contre le cancer, the Rhône-Alpes Region and the Institut National du Cancer (ACI-63-04). B.M. and A.C. are supported by a fellowship from the French Education and Research Ministry. A.C. was also supported by a fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer. F.M.M.-K. was supported by the Centrafrican government and the Association pour la Recherche contre le Cancer. We thank the staff of the Plateau de Biologie Experimentale de la Souris and of the Plateforme de Cytométrie en Flux of IFR128 Biosciences Lyon-Gerland for their technical assistance.

References

1. Tough, D.F., and J. Sprent. 1994. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *The Journal of experimental medicine* 179:1127-1135.
2. Pihlgren, M., C. Arpin, T. Walzer, M. Tomkowiak, A. Thomas, J. Marvel, and P.M. Dubois. 1999. Memory CD44(int) CD8 T cells show increased proliferative responses and IFN-gamma production following antigenic challenge in vitro. *International immunology* 11:699-706.
3. Veiga-Fernandes, H., U. Walter, C. Bourgeois, A. McLean, and B. Rocha. 2000. Response of naive and memory CD8⁺ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nature immunology* 1:47-53.
4. Murali-Krishna, K., L.L. Lau, S. Sambhara, F. Lemonnier, J. Altman, and R. Ahmed. 1999. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science (New York, N.Y)* 286:1377-1381.
5. Mullbacher, A. 1994. The long-term maintenance of cytotoxic T cell memory does not require persistence of antigen. *The Journal of experimental medicine* 179:317-321.
6. Zhang, X., S. Sun, I. Hwang, D.F. Tough, and J. Sprent. 1998. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8:591-599.
7. Judge, A.D., X. Zhang, H. Fujii, C.D. Surh, and J. Sprent. 2002. Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *The Journal of experimental medicine* 196:935-946.
8. Goldrath, A.W., P.V. Sivakumar, M. Glaccum, M.K. Kennedy, M.J. Bevan, C. Benoist, D. Mathis, and E.A. Butz. 2002. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8⁺ T cells. *The Journal of experimental medicine* 195:1515-1522.

9. Kieper, W.C., J.T. Tan, B. Bondi-Boyd, L. Gapin, J. Sprent, R. Ceredig, and C.D. Surh. 2002. Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8⁺ T cells. *The Journal of experimental medicine* 195:1533-1539.
10. Lodolce, J.P., D.L. Boone, S. Chai, R.E. Swain, T. Dassopoulos, S. Trettin, and A. Ma. 1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9:669-676.
11. Kennedy, M.K., M. Glaccum, S.N. Brown, E.A. Butz, J.L. Viney, M. Embers, N. Matsuki, K. Charrier, L. Sedger, C.R. Willis, K. Brasel, P.J. Morrissey, K. Stocking, J.C. Schuh, S. Joyce, and J.J. Peschon. 2000. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 191:771-780.
12. Marks-Konczalik, J., S. Dubois, J.M. Losi, H. Sabzevari, N. Yamada, L. Feigenbaum, T.A. Waldmann, and Y. Tagaya. 2000. IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:11445-11450.
13. Ku, C.C., M. Murakami, A. Sakamoto, J. Kappler, and P. Murrack. 2000. Control of homeostasis of CD8⁺ memory T cells by opposing cytokines. *Science (New York, N.Y)* 288:675-678.
14. Boyman, O., M. Kovar, M.P. Rubinstein, C.D. Surh, and J. Sprent. 2006. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science (New York, N.Y)* 311:1924-1927.
15. Komai-Koma, M., L. Jones, G.S. Ogg, D. Xu, and F.Y. Liew. 2004. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:3029-3034.

16. Caron, G., D. Duluc, I. Fremaux, P. Jeannin, C. David, H. Gascan, and Y. Delneste. 2005. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4⁺ T cells. *J Immunol* 175:1551-1557.
17. Cottalorda, A., C. Vershelde, A. Marçais, M. Tomkowiak, P. Musette, S. Uematsu, S. Akira, J. Marvel, and N. Bonnefoy-Berard. 2006. TLR2 engagement on CD8 T cells lowers the threshold for optimal antigen-induced T cell activation. *European journal of immunology* 36:1684-1693.
18. Mercier, B.C., A. Cottalorda, C.A. Coupet, J. Marvel, and N. Bonnefoy-Berard. TLR2 engagement on CD8 T cells enables generation of functional memory cells in response to a suboptimal TCR signal. *J Immunol* In press.
19. Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11:443-451.
20. Pihlgren, M., P.M. Dubois, M. Tomkowiak, T. Sjogren, and J. Marvel. 1996. Resting memory CD8⁺ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro. *The Journal of experimental medicine* 184:2141-2151.
21. Mbitikon-Kobo, F.M., M. Vocanson, M.C. Michallet, M. Tomkowiak, A. Cottalorda, G.S. Angelov, C.A. Coupet, S Djebali, A. Marçais, B. Dubois, N. Bonnefoy-Berard, J.F. Nicolas, C. Arpin and J. Marvel. Characterization of a CD44/CD122^{int} memory CD8 T cell subset generated under sterile inflammatory conditions. *J Immunol* In press.
22. Lertmemongkolchai, G., G. Cai, C.A. Hunter, and G.J. Bancroft. 2001. Bystander activation of CD8⁺ T cells contributes to the rapid production of IFN-gamma in response to bacterial pathogens. *J Immunol* 166:1097-1105.

23. Ma, A., R. Koka, and P. Burkett. 2006. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annual review of immunology* 24:657-679.
24. Imanishi, T., H. Hara, S. Suzuki, N. Suzuki, S. Akira, and T. Saito. 2007. Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *J Immunol* 178:6715-6719.
25. Yang, H.Y., P.L. Dundon, S.R. Nahill, and R.M. Welsh. 1989. Virus-induced polyclonal cytotoxic T lymphocyte stimulation. *J Immunol* 142:1710-1718.
26. Tough, D.F., P. Borrow, and J. Sprent. 1996. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science (New York, N.Y)* 272:1947-1950.
27. Tough, D.F., S. Sun, and J. Sprent. 1997. T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS). *The Journal of experimental medicine* 185:2089-2094.
28. Selin, L.K., S.R. Nahill, and R.M. Welsh. 1994. Cross-reactivities in memory cytotoxic T lymphocyte recognition of heterologous viruses. *The Journal of experimental medicine* 179:1933-1943.
29. Oppenheim, J.J., P. Tewary, G. de la Rosa, and D. Yang. 2007. Alarmins initiate host defense. *Advances in experimental medicine and biology* 601:185-194.
30. Bernasconi, N.L., E. Traggiai, and A. Lanzavecchia. 2002. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science (New York, N.Y)* 298:2199-2202.

Figure legends

Figure 1 : TLR2-deficient mice have a decrease frequency of MP CD8 T cells when compared to WT mice. Lymph node cells (inguinal, axillar, lateral axillar and mesenteric lymph nodes) from WT and TLR2^{-/-} mice were stained with anti-CD8, anti-CD44 and anti-Ly6C Ab. (A) Percentages of CD44^{hi}Ly6C⁺ cells (MP CD8 T cells) among total CD8 T cells. (B) Percentages of total CD8⁺ T cells. Dots represent individual mice and bars indicate arithmetic means. Results were obtained from 3 independent experiments. * = p<0.05 ; **=p<0.01.

Figure 2 : TLR2 engagement on MP CD8 T cells increases their proliferation and survival *in vitro*. MP CD8 T cells were cell-sorted by FACS, labeled with CFSE and cultured for 96 h either in medium alone or in the presence of IL-2 (40 ng/mL), IL-7 (12.5 ng/mL), or IL-15 (25 ng/mL), with or without Pam (2 µg/mL). (A) CFSE and CD25 expression were analyzed by flow cytometry. (B) Percentages of cells that had divided at least once. (C) CD25 MFI of proliferating cells. (D) Numbers of viable cells recovered at the end of the culture. The dashed line indicates the initial cell number. Results are the mean of 3 to 5 experiments. * = p<0.05; ** = p<0.01.

Figure 3 : TLR2 engagement on Ag-specific memory CD8 T cells increases their proliferation *in vitro*. (A-C) 1x10⁶ CD8 T cells from TCR-transgenic F5 mice were transferred to CD45.1⁺ recipient mice. Recipient mice were then immunized with recombinant *vaccinia* virus, which expressed the F5-specific epitope NP68. Thirty days later, transferred CD8 T cells were cell-sorted by FACS according to CD8 and CD45.1 expression, CFSE-labeled and cultured in medium alone or with IL-2 (40 ng/mL), IL-7 (12.5 ng/mL) or Pam (2 µg/mL). (D-E). TCR-transgenic F5 mice were injected *i.p.* twice with 50 nmol NP68.

Thirty day later, memory CD8⁺CD44^{int} T cells were cell-sorted by FACS and cultured as described in (A-C). (A, D) CFSE and CD25 expression were analyzed by flow cytometry. (B, E) Percentages of cells that had divided at least once. (C, F) CD25 MFI of proliferating cells. Values are the mean of 2 (D-F) or 3 (A-C) independent experiments. * = p<0.05.

Figure 4 : TLR2 ligands modulate the homeostasis of MP CD8 T cells *in vivo*. Total CD8 T cells from CD45.1 mice were cell-sorted by FACS and 2.5x10⁶ CFSE-labeled CD8 T cells were adoptively transferred to TLR2^{-/-} mice. Recipient mice received either daily injections of saline, IL-2 (1.5 µg) or Pam (20 µg) or injections of IL-7 (1.5 µg) with or without Pam by i.p. for 4 days and injections of saline or Pam over the next 3 days. Seven days after the first injection, cells from lymph nodes were isolated. (A) Proliferation of transferred memory CD8 T cells. (B) Numbers of transferred memory CD8 T cells per 10⁴ lymph node cells. Dots represent individual mice and bars indicate arithmetic means. Results are pooled from of 2 to 4 experiments. * = p<0.05; ** = p<0.01.

Figure 5 : TLR2 ligands act in synergy with IL-2 to induce IFN-γ secretion by MP CD8 T cells. (A-D) FACS-sorted and CFSE-labeled MP CD8 T cells were cultured medium alone or in the presence of IL-2 (40 ng/mL), IL-7 (12.5 ng/mL), IL-15 (25 ng/mL), Pam (2 µg/mL) or a combination of IL-12 (1 ng/mL) and IL-18 (100 ng/mL) for the indicated times. (A, C) IFN-γ concentration in cell supernatants. (B, D) Percentages of IFN-γ⁺ cells. (E-F) Total CD8 T cells from CD45.1 mice were cell-sorted by FACS and 2.5x10⁶ CFSE-labeled CD8 T cells were adoptively transferred to TLR2^{-/-} mice. Mice were then treated as described in Figure 4. Percentages of IFN-γ⁺ cells without *ex vivo* treatment (E) or following stimulation with PMA and ionomycin (F) were measured. Dots represent individual mice and bars indicate

TLR2 controls memory CD8 T cell homeostasis

arithmetic means. Results are obtained from 2 (C-F) or 3 (A-B) independent experiments. * =
p<0.05.

Figure 1

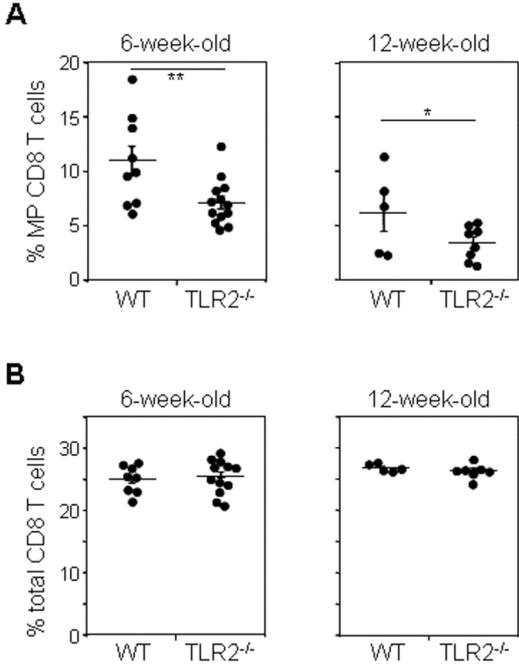


Figure 2

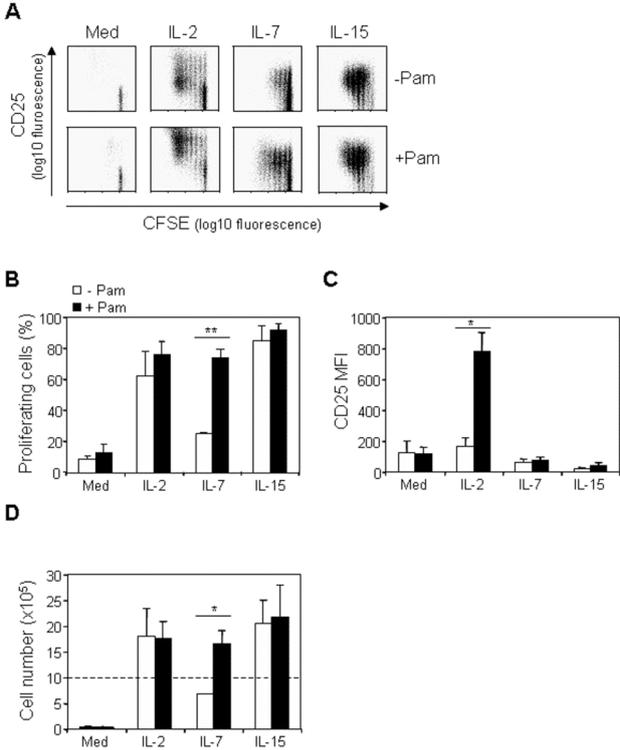


Figure 3

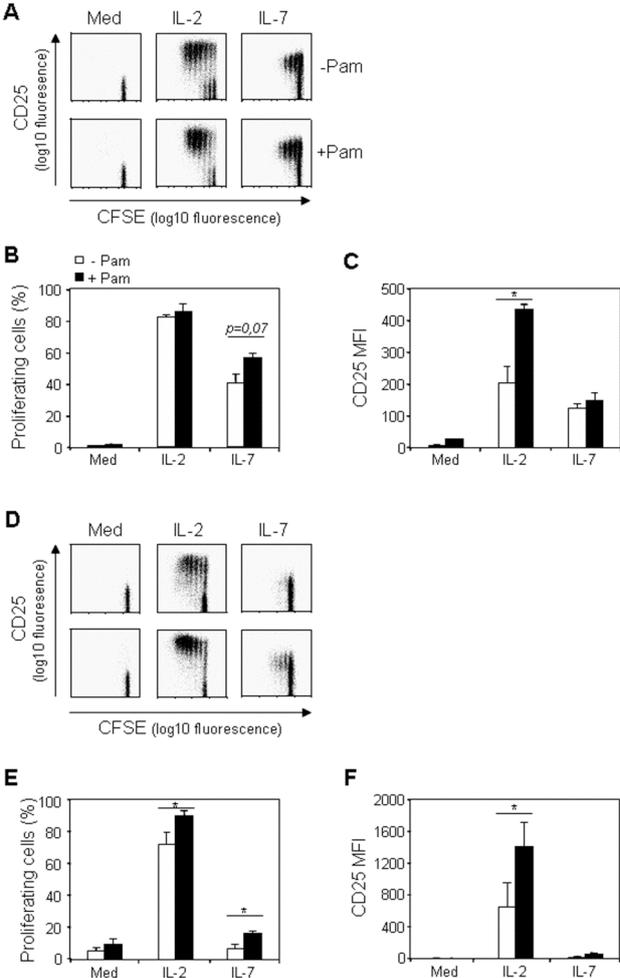


Figure 4

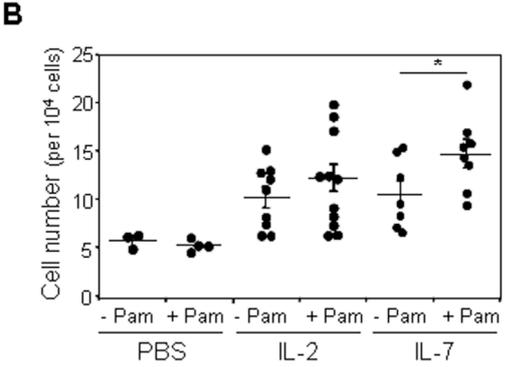
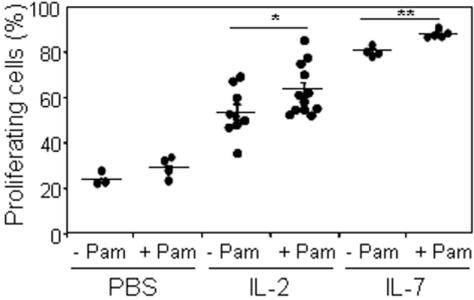
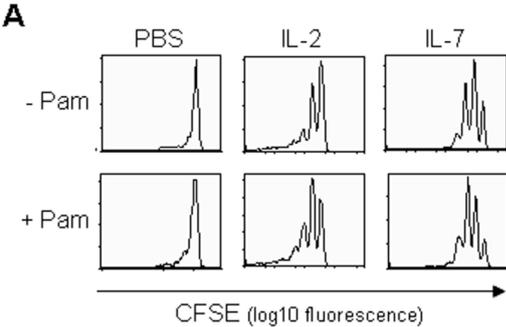
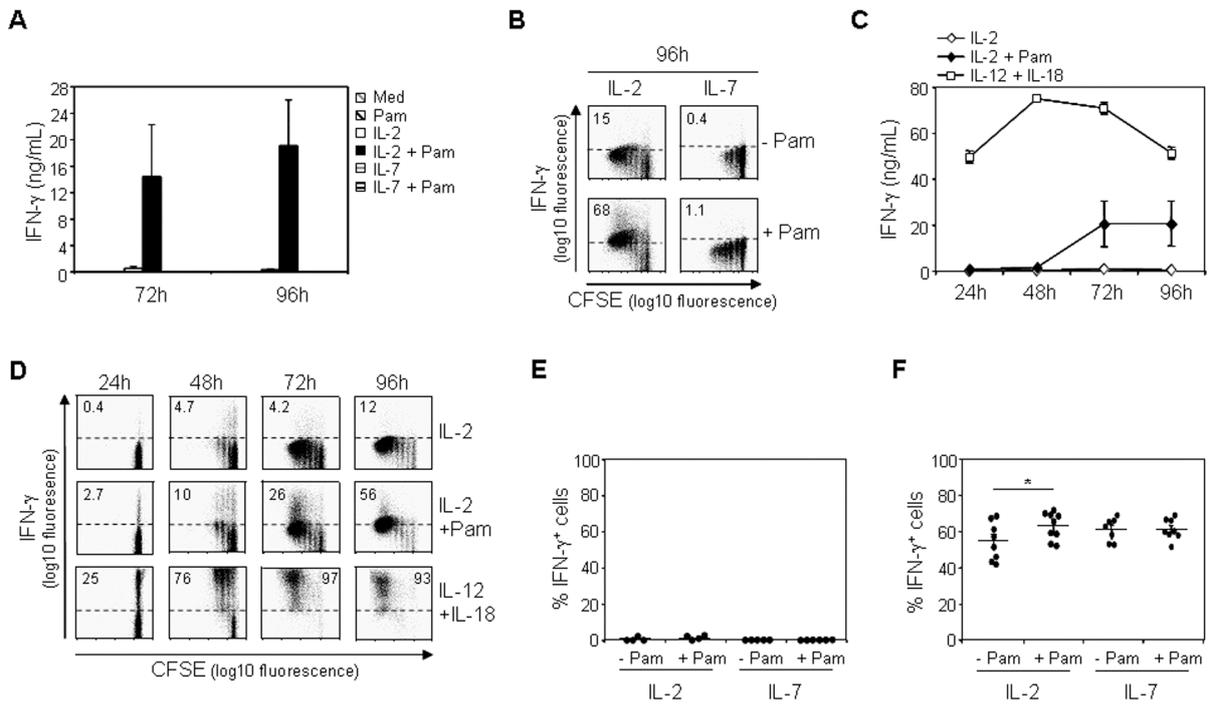
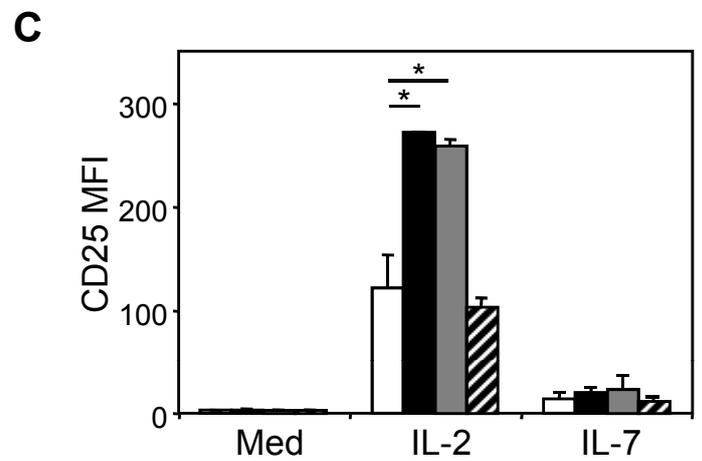
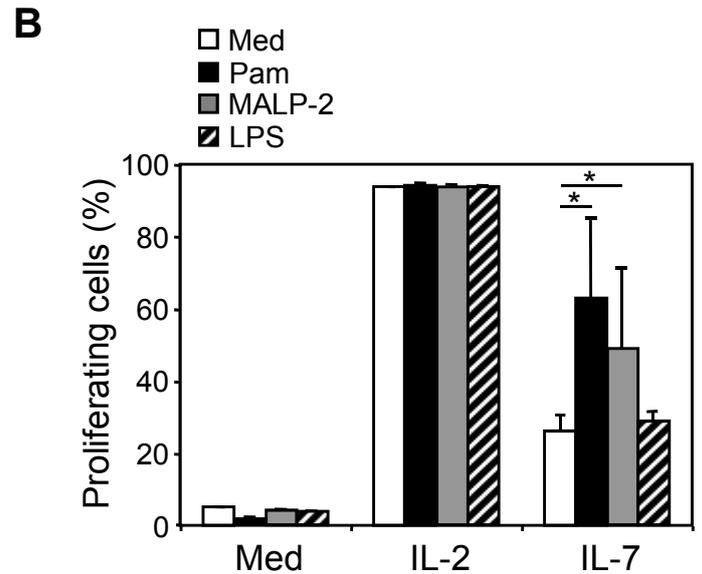
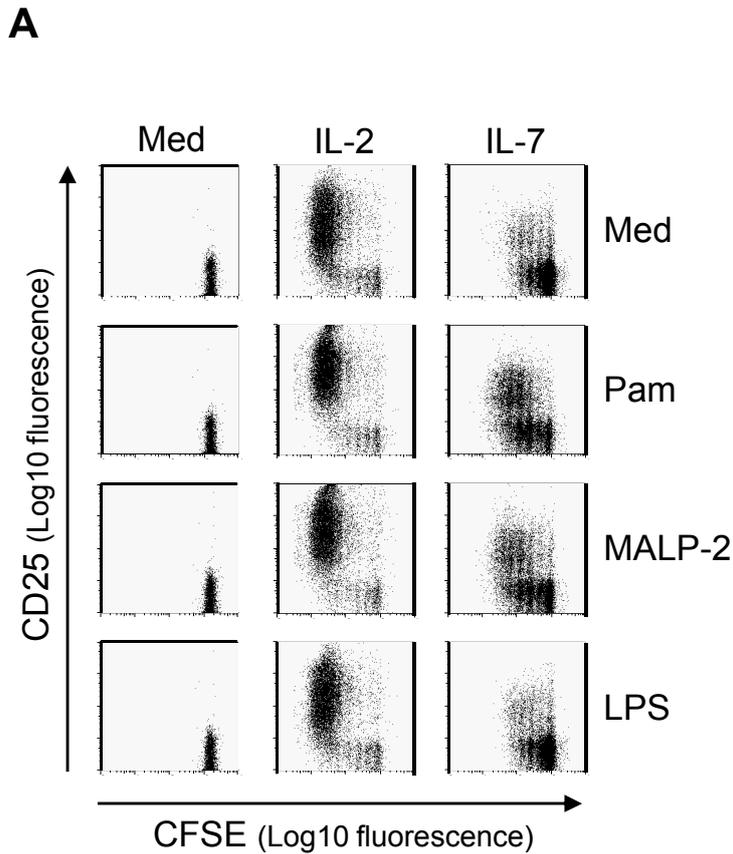


Figure 5

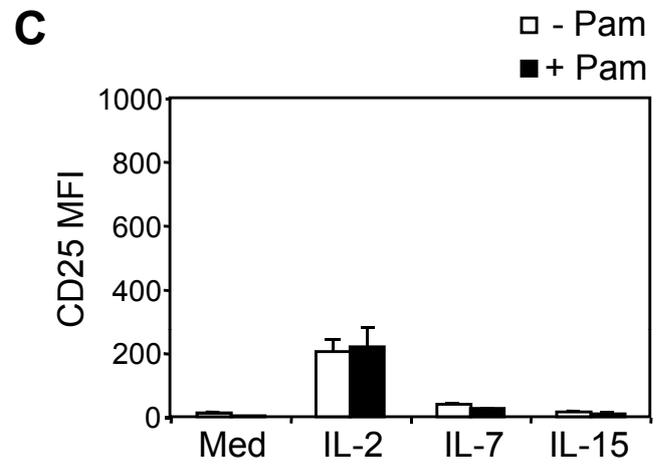
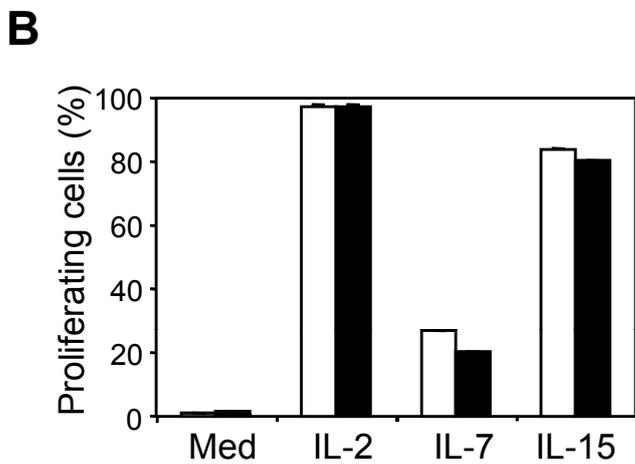
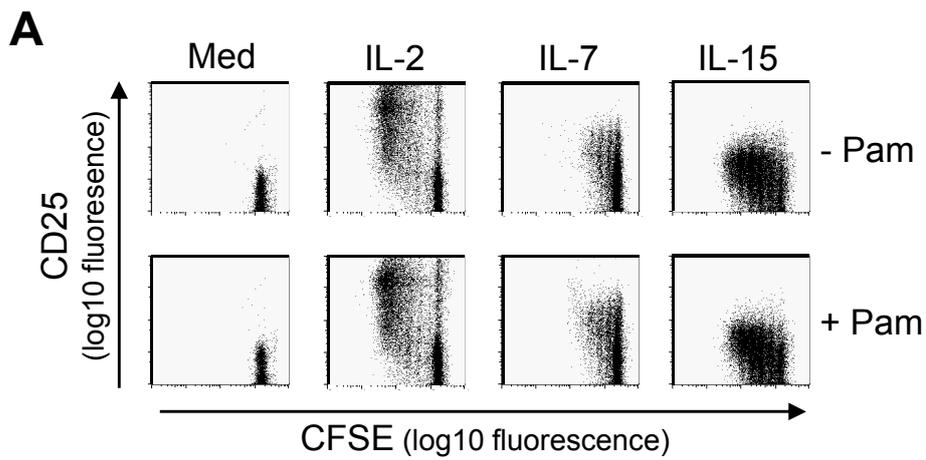




A. Cottalorda et al.

Supplemental 1. TLR2 ligands, but not TLR4 ligands, increase MP CD8 T cell proliferation and CD25 expression induced by cytokines.

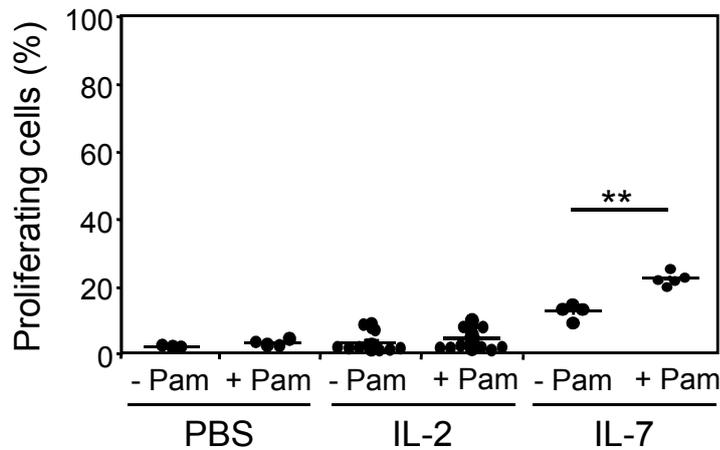
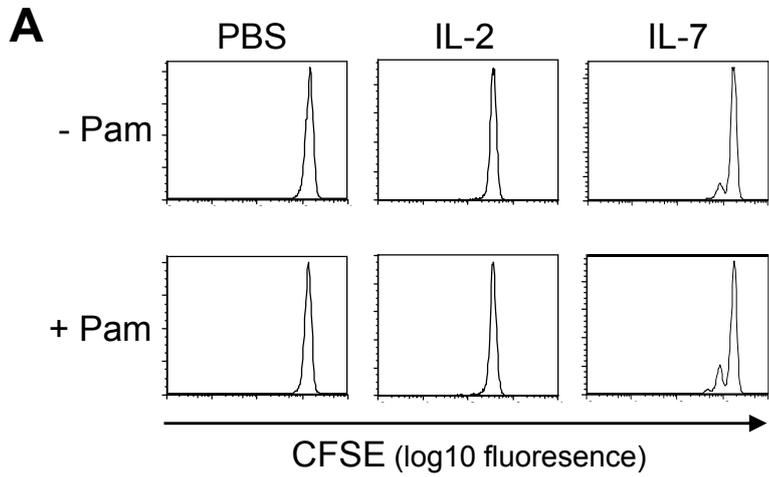
MP CD8 T cells were cell-sorted by FACS, labeled with CFSE and cultured for 96 h either in medium alone or in the presence of IL-2 (40 ng/mL) or IL-7 (12.5 ng/mL), with or without Pam (2 µg/mL), MALP-2 (0.5 µg/mL) or LPS (10 µg/mL). (A) CFSE and CD25 expression were analyzed by flow cytometry. (B) Percentages of cells that had divided at least once. (C) CD25 MFI of proliferating cells. Results are the mean of 2 experiments. * = $p < 0.05$.



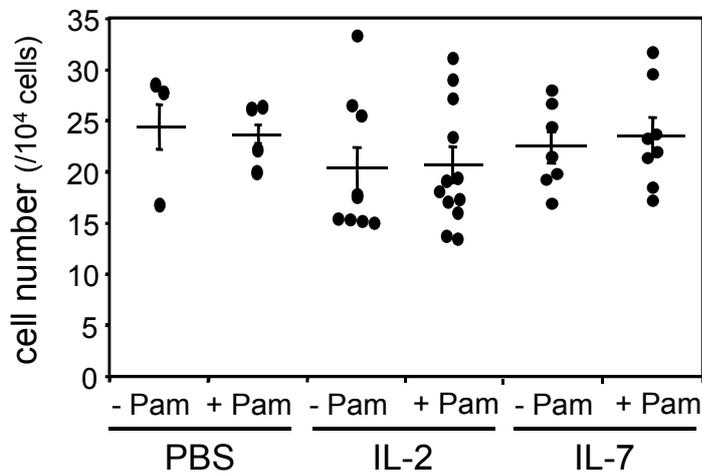
A. Cottalorda et al.

Supplemental 2. The effects of Pam are dependent on TLR2.

MP CD8 T cells from TLR2^{-/-} mice were cell-sorted by FACS, labeled with CFSE and cultured for 96 h either in medium alone or in the presence of IL-2, IL-7, or IL-15, with or without Pam. (A) CFSE and CD25 expression were analyzed by flow cytometry. (B) Percentages of cells that had divided at least once. (C) CD25 MFI of proliferating cells. Results are the mean of 3 independent experiments.

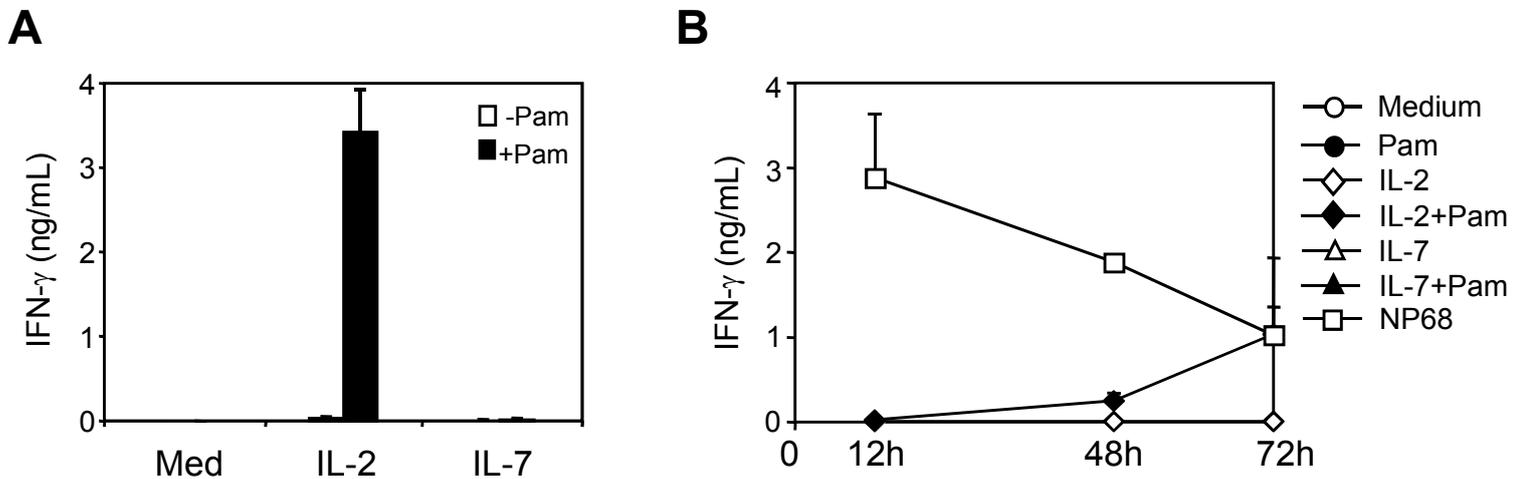


B



A. Cottalorda et al.

Supplemental 3. Pam slightly increases naive CD8 T cell proliferation induced by IL-7. Total CD8 T cells from Ly5.1 mice were cell-sorted by FACS and 2.5×10^6 CFSE-labeled CD8 T cells were adoptively transferred to TLR2^{-/-} mice. Recipient mice received either daily injections of saline, IL-2 (1.5 μ g) or Pam (20 μ g) by i.p. or injections of IL-7 (1.5 μ g) with or without Pam by i.p. for 4 consecutive days and injections of saline or Pam over the next 3 days. Seven days after the first injection, cells from lymph nodes were isolated. (A) Proliferation of transferred naive CD8 T cells. (B) Numbers of transferred naive CD8 T cells per 10^4 lymph node cells. Dots represent individual mice and bars indicate arithmetic means. Results are the means of 2 to 4 independent experiments. ** = $p < 0.01$.



A. Cottalorda et al.

Supplemental 4. TLR2 ligands act in synergy with IL-2 to induce IFN- γ secretion by Ag-specific memory CD8 T cells.

(A) 2×10^6 CD8 T cells from TCR-transgenic F5 mice were transferred to recipient mice. Recipients were then immunized with recombinant *vaccinia* virus, which expressed NP68 epitope. Thirty day later, memory CD8 T cells were isolated, CFSE-labeled and cultured either in medium alone or in the presence of IL-2 or IL-7, with or without Pam. IFN- γ in cell supernatant was measured after 96 h of culture. Results are the mean of two independent experiments. (B) TCR-transgenic F5 mice were injected *i.p.* twice with 50 nmol NP68. Thirty days later, CD8 memory T cells were FACS-sorted, CFSE-labeled and cultured either in medium alone or in the presence of IL-2, IL-7, Pam or NP68 (10 nM). Results are the mean of 3 independent experiments.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Jameson, S.C., *Maintaining the norm: T-cell homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(8): p. 547-56.
2. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 47-64.
3. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 685-711.
4. Kaech, S.M., E.J. Wherry, and R. Ahmed, *Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(4): p. 251-62.
5. Badovinac, V.P. and J.T. Harty, *Programming, demarcating, and manipulating CD8+ T-cell memory*. Immunol Rev, 2006. **211**: p. 67-80.
6. Williams, M.A. and M.J. Bevan, *Effector and memory CTL differentiation*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 171-92.
7. Bajenoff, M., S. Granjeaud, and S. Guerder, *The strategy of T cell antigen-presenting cell encounter in antigen-draining lymph nodes revealed by imaging of initial T cell activation*. J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 715-24.
8. Norbury, C.C., et al., *Visualizing priming of virus-specific CD8+ T cells by infected dendritic cells in vivo*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 265-71.
9. Schaefer, B.C., et al., *Observation of antigen-dependent CD8+ T-cell/ dendritic cell interactions in vivo*. Cell Immunol, 2001. **214**(2): p. 110-22.
10. Bousso, P. and E. Robey, *Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes*. Nat Immunol, 2003. **4**(6): p. 579-85.
11. Miller, M.J., et al., *T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(4): p. 998-1003.
12. Miller, M.J., et al., *Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes*. J Exp Med, 2004. **200**(7): p. 847-56.

13. Miller, M.J., et al., *Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node*. Science, 2002. **296**(5574): p. 1869-73.
14. Stoll, S., et al., *Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes*. Science, 2002. **296**(5574): p. 1873-6.
15. Mempel, T.R., S.E. Henrickson, and U.H. Von Andrian, *T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases*. Nature, 2004. **427**(6970): p. 154-9.
16. Miller, M.J., et al., *Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2604-9.
17. Gunzer, M., et al., *Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential*. Immunity, 2000. **13**(3): p. 323-32.
18. Henrickson, S.E., et al., *T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation*. Nat Immunol, 2008. **9**(3): p. 282-91.
19. Shaw, A.S., *How T cells 'find' the right dendritic cell*. Nat Immunol, 2008. **9**(3): p. 229-30.
20. Paul, W.E. and R.A. Seder, *Lymphocyte responses and cytokines*. Cell, 1994. **76**(2): p. 241-51.
21. Monks, C.R., et al., *Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells*. Nature, 1998. **395**(6697): p. 82-6.
22. Johnson, K.G., et al., *A supramolecular basis for CD45 tyrosine phosphatase regulation in sustained T cell activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(18): p. 10138-43.
23. Wulfig, C. and M.M. Davis, *A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation*. Science, 1998. **282**(5397): p. 2266-9.
24. Friedl, P. and J. Storim, *Diversity in immune-cell interactions: states and functions of the immunological synapse*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(10): p. 557-67.
25. Caux, C., et al., *Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking*. J Exp Med, 1994. **180**(4): p. 1263-72.

26. Friedl, P., A.T. den Boer, and M. Gunzer, *Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(7): p. 532-45.
27. Huppa, J.B. and M.M. Davis, *T-cell-antigen recognition and the immunological synapse*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 973-83.
28. von Andrian, U.H. and T.R. Mempel, *Homing and cellular traffic in lymph nodes*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(11): p. 867-78.
29. Luther, S.A., et al., *Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(23): p. 12694-9.
30. Worbs, T., et al., *CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo*. J Exp Med, 2007. **204**(3): p. 489-95.
31. Okada, T. and J.G. Cyster, *CC chemokine receptor 7 contributes to Gi-dependent T cell motility in the lymph node*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2973-8.
32. Friedman, R.S., J. Jacobelli, and M.F. Krummel, *Surface-bound chemokines capture and prime T cells for synapse formation*. Nat Immunol, 2006. **7**(10): p. 1101-8.
33. Kaiser, A., et al., *CC chemokine ligand 19 secreted by mature dendritic cells increases naive T cell scanning behavior and their response to rare cognate antigen*. J Immunol, 2005. **175**(4): p. 2349-56.
34. Molon, B., et al., *T cell costimulation by chemokine receptors*. Nat Immunol, 2005. **6**(5): p. 465-71.
35. Castellino, F., et al., *Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction*. Nature, 2006. **440**(7086): p. 890-5.
36. Tadokoro, C.E., et al., *Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 505-11.
37. Tang, Q., et al., *Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice*. Nat Immunol, 2006. **7**(1): p. 83-92.
38. Sarris, M., et al., *Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition*. Immunity, 2008. **28**(3): p. 402-13.

39. Bruder, D., et al., *Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells*. Eur J Immunol, 2004. **34**(3): p. 623-30.
40. Mescher, M.F., et al., *Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells*. Immunol Rev, 2006. **211**: p. 81-92.
41. Greenwald, R.J., G.J. Freeman, and A.H. Sharpe, *The B7 family revisited*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 515-48.
42. Watts, T.H., *TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 23-68.
43. Curtsinger, J.M., et al., *Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3256-62.
44. Bevan, M.J., *Helping the CD8(+) T-cell response*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(8): p. 595-602.
45. Jiang, J., L.L. Lau, and H. Shen, *Selective depletion of nonspecific T cells during the early stage of immune responses to infection*. J Immunol, 2003. **171**(8): p. 4352-8.
46. Prlic, M., G. Hernandez-Hoyos, and M.J. Bevan, *Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8+ T cell response*. J Exp Med, 2006. **203**(9): p. 2135-43.
47. Tewari, K., et al., *Differential requirement for Lck during primary and memory CD8+ T cell responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(44): p. 16388-93.
48. Bromley, S.K., et al., *The immunological synapse and CD28-CD80 interactions*. Nat Immunol, 2001. **2**(12): p. 1159-66.
49. Lenschow, D.J., T.L. Walunas, and J.A. Bluestone, *CD28/B7 system of T cell costimulation*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 233-58.
50. Sharpe, A.H. and G.J. Freeman, *The B7-CD28 superfamily*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 116-26.
51. Shedlock, D.J., et al., *Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during Listeria monocytogenes infection*. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 2053-63.

52. Liu, Y., et al., *Distinct costimulatory molecules are required for the induction of effector and memory cytotoxic T lymphocytes*. J Exp Med, 1997. **185**(2): p. 251-62.
53. Kundig, T.M., et al., *Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells*. Immunity, 1996. **5**(1): p. 41-52.
54. Takahashi, C., R.S. Mittler, and A.T. Vella, *Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5037-40.
55. Cannons, J.L., et al., *4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1313-24.
56. Tan, J.T., et al., *4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses*. J Immunol, 1999. **163**(9): p. 4859-68.
57. Bertram, E.M., P. Lau, and T.H. Watts, *Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection*. J Immunol, 2002. **168**(8): p. 3777-85.
58. Tan, J.T., et al., *4-1BB costimulation is required for protective anti-viral immunity after peptide vaccination*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2320-5.
59. Hendriks, J., et al., *CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 433-40.
60. Hendriks, J., Y. Xiao, and J. Borst, *CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool*. J Exp Med, 2003. **198**(9): p. 1369-80.
61. Kroczek, R.A., H.W. Mages, and A. Hutloff, *Emerging paradigms of T-cell co-stimulation*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(3): p. 321-7.
62. Schmidt, C.S. and M.F. Mescher, *Adjuvant effect of IL-12: conversion of peptide antigen administration from tolerizing to immunizing for CD8+ T cells in vivo*. J Immunol, 1999. **163**(5): p. 2561-7.
63. Badovinac, V.P., B.B. Porter, and J.T. Harty, *CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation*. Nat Immunol, 2004. **5**(8): p. 809-17.

64. Kolumam, G.A., et al., *Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection*. J Exp Med, 2005. **202**(5): p. 637-50.
65. Schluns, K.S., et al., *Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 426-32.
66. Mitchell, T.C., et al., *Immunological adjuvants promote activated T cell survival via induction of Bcl-3*. Nat Immunol, 2001. **2**(5): p. 397-402.
67. Haring, J.S., V.P. Badovinac, and J.T. Harty, *Inflaming the CD8+ T cell response*. Immunity, 2006. **25**(1): p. 19-29.
68. Thomas, S., G.A. Kolumam, and K. Murali-Krishna, *Antigen presentation by nonhemopoietic cells amplifies clonal expansion of effector CD8 T cells in a pathogen-specific manner*. J Immunol, 2007. **178**(9): p. 5802-11.
69. Way, S.S., et al., *IL-12 and type-I IFN synergize for IFN-gamma production by CD4 T cells, whereas neither are required for IFN-gamma production by CD8 T cells after Listeria monocytogenes infection*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4498-505.
70. Aichele, P., et al., *CD8 T cells specific for lymphocytic choriomeningitis virus require type I IFN receptor for clonal expansion*. J Immunol, 2006. **176**(8): p. 4525-9.
71. Thompson, L.J., et al., *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, 2006. **177**(3): p. 1746-54.
72. Arstila, T.P., et al., *A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity*. Science, 1999. **286**(5441): p. 958-61.
73. Blattman, J.N., et al., *Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells*. J Exp Med, 2002. **195**(5): p. 657-64.
74. Bousso, P., et al., *Individual variations in the murine T cell response to a specific peptide reflect variability in naive repertoires*. Immunity, 1998. **9**(2): p. 169-78.
75. Casrouge, A., et al., *Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes*. J Immunol, 2000. **164**(11): p. 5782-7.
76. Kedzierska, K., et al., *Quantification of repertoire diversity of influenza-specific epitopes with predominant public or private TCR usage*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 6705-12.

77. Pewe, L.L., et al., *Very diverse CD8 T cell clonotypic responses after virus infections*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 3151-6.
78. Kedl, R.M. and M.F. Mescher, *Qualitative differences between naive and memory T cells make a major contribution to the more rapid and efficient memory CD8+ T cell response*. J Immunol, 1998. **161**(2): p. 674-83.
79. Harty, J.T. and V.P. Badovinac, *Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(2): p. 107-19.
80. Moon, J.J., et al., *Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude*. Immunity, 2007. **27**(2): p. 203-13.
81. Stinchcombe, J.C., et al., *The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges*. Immunity, 2001. **15**(5): p. 751-61.
82. Peters, P.J., et al., *Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes*. J Exp Med, 1991. **173**(5): p. 1099-109.
83. Raja, S.M., et al., *A novel mechanism for protein delivery: granzyme B undergoes electrostatic exchange from serglycin to target cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20752-61.
84. Bird, C.H., et al., *Cationic sites on granzyme B contribute to cytotoxicity by promoting its uptake into target cells*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(17): p. 7854-67.
85. Kurschus, F.C., et al., *Membrane receptors are not required to deliver granzyme B during killer cell attack*. Blood, 2005. **105**(5): p. 2049-58.
86. Shi, L., et al., *Granzyme B binds to target cells mostly by charge and must be added at the same time as perforin to trigger apoptosis*. J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5456-61.
87. Dressel, R., et al., *Granzyme-mediated cytotoxicity does not involve the mannose 6-phosphate receptors on target cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 20200-10.
88. Trapani, J.A., et al., *A clathrin/dynamin- and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death*. J Cell Biol, 2003. **160**(2): p. 223-33.
89. Pipkin, M.E. and J. Lieberman, *Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 301-8.

90. Keefe, D., et al., *Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis*. *Immunity*, 2005. **23**(3): p. 249-62.
91. Motyka, B., et al., *Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis*. *Cell*, 2000. **103**(3): p. 491-500.
92. Chan, K.F., M.R. Siegel, and J.M. Lenardo, *Signaling by the TNF receptor superfamily and T cell homeostasis*. *Immunity*, 2000. **13**(4): p. 419-22.
93. Siegel, R.M., et al., *The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(6): p. 469-74.
94. Lenardo, M., et al., *Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment*. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 221-53.
95. Kischkel, F.C., et al., *Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5*. *Immunity*, 2000. **12**(6): p. 611-20.
96. Fruh, K. and Y. Yang, *Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma*. *Curr Opin Immunol*, 1999. **11**(1): p. 76-81.
97. Harty, J.T., A.R. Tinnereim, and D.W. White, *CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection*. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 275-308.
98. Dorner, B.G., et al., *Single-cell analysis of the murine chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES and ATAC/lymphotactin by flow cytometry*. *J Immunol Methods*, 2003. **274**(1-2): p. 83-91.
99. Ortiz, B.D., A.M. Krensky, and P.J. Nelson, *Kinetics of transcription factors regulating the RANTES chemokine gene reveal a developmental switch in nuclear events during T-lymphocyte maturation*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(1): p. 202-10.
100. Walzer, T., et al., *Cutting edge: immediate RANTES secretion by resting memory CD8 T cells following antigenic stimulation*. *J Immunol*, 2003. **170**(4): p. 1615-9.
101. Taub, D.D., et al., *Chemokines and T lymphocyte activation: I. Beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro*. *J Immunol*, 1996. **156**(6): p. 2095-2103.
102. Badovinac, V.P., A.R. Tinnereim, and J.T. Harty, *Regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma*. *Science*, 2000. **290**(5495): p. 1354-8.

103. Slifka, M.K. and J.L. Whitton, *Antigen-specific regulation of T cell-mediated cytokine production*. *Immunity*, 2000. **12**(5): p. 451-7.
104. Lertmemongkolchai, G., et al., *Bystander activation of CD8+ T cells contributes to the rapid production of IFN-gamma in response to bacterial pathogens*. *J Immunol*, 2001. **166**(2): p. 1097-105.
105. Badovinac, V.P., B.B. Porter, and J.T. Harty, *Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(7): p. 619-26.
106. Wherry, E.J., et al., *Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(45): p. 16004-9.
107. Fuller, M.J., et al., *Maintenance, loss, and resurgence of T cell responses during acute, protracted, and chronic viral infections*. *J Immunol*, 2004. **172**(7): p. 4204-14.
108. Wherry, E.J., et al., *Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment*. *J Virol*, 2003. **77**(8): p. 4911-27.
109. Zhou, S., et al., *Critical role for perforin-, Fas/FasL-, and TNFR1-mediated cytotoxic pathways in down-regulation of antigen-specific T cells during persistent viral infection*. *J Virol*, 2002. **76**(2): p. 829-40.
110. Nguyen, L.T., et al., *TNF receptor 1 (TNFR1) and CD95 are not required for T cell deletion after virus infection but contribute to peptide-induced deletion under limited conditions*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(2): p. 683-8.
111. Reich, A., et al., *Immune down-regulation and peripheral deletion of CD8 T cells does not require TNF receptor-ligand interactions nor CD95 (Fas, APO-1)*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(2): p. 678-82.
112. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. *Cell*, 1996. **86**(6): p. 973-83.
113. Grayson, J.M., et al., *Cutting edge: increased expression of Bcl-2 in antigen-specific memory CD8+ T cells*. *J Immunol*, 2000. **164**(8): p. 3950-4.
114. Hildeman, D.A., et al., *Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim*. *Immunity*, 2002. **16**(6): p. 759-67.

115. Pellegrini, M., et al., *Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(24): p. 14175-80.
116. Plas, D.R., J.C. Rathmell, and C.B. Thompson, *Homeostatic control of lymphocyte survival: potential origins and implications*. Nat Immunol, 2002. **3**(6): p. 515-21.
117. Hildeman, D., et al., *Apoptosis and the homeostatic control of immune responses*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(5): p. 516-21.
118. Grayson, J.M., et al., *Role of Bim in regulating CD8+ T-cell responses during chronic viral infection*. J Virol, 2006. **80**(17): p. 8627-38.
119. Wojciechowski, S., et al., *Bim/Bcl-2 balance is critical for maintaining naive and memory T cell homeostasis*. J Exp Med, 2007. **204**(7): p. 1665-75.
120. Wojciechowski, S., et al., *Bim mediates apoptosis of CD127(lo) effector T cells and limits T cell memory*. Eur J Immunol, 2006. **36**(7): p. 1694-706.
121. Tewari, K., Y. Nakayama, and M. Suresh, *Role of direct effects of IFN-gamma on T cells in the regulation of CD8 T cell homeostasis*. J Immunol, 2007. **179**(4): p. 2115-25.
122. Whitmire, J.K., et al., *Direct interferon-gamma signaling dramatically enhances CD4+ and CD8+ T cell memory*. J Immunol, 2007. **179**(2): p. 1190-7.
123. Pantaleo, G. and R.A. Koup, *Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 806-10.
124. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
125. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 745-63.
126. Huster, K.M., C. Stemmerger, and D.H. Busch, *Protective immunity towards intracellular pathogens*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(4): p. 458-64.
127. Gett, A.V., et al., *T cell fitness determined by signal strength*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 355-60.

128. Wherry, E.J., et al., *Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets*. Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 225-34.
129. Akbar, A.N. and J.M. Fletcher, *Memory T cell homeostasis and senescence during aging*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(5): p. 480-5.
130. Huster, K.M., et al., *Unidirectional development of CD8+ central memory T cells into protective Listeria-specific effector memory T cells*. Eur J Immunol, 2006. **36**(6): p. 1453-64.
131. Galvan, M., et al., *Alterations in cell surface carbohydrates on T cells from virally infected mice can distinguish effector/memory CD8+ T cells from naive cells*. J Immunol, 1998. **161**(2): p. 641-8.
132. Harrington, L.E., et al., *Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans*. J Exp Med, 2000. **191**(7): p. 1241-6.
133. Jamieson, A.M., et al., *The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing*. Immunity, 2002. **17**(1): p. 19-29.
134. McMahon, C.W., et al., *Viral and bacterial infections induce expression of multiple NK cell receptors in responding CD8(+) T cells*. J Immunol, 2002. **169**(3): p. 1444-52.
135. Slifka, M.K., R.R. Pagarigan, and J.L. Whitton, *NK markers are expressed on a high percentage of virus-specific CD8+ and CD4+ T cells*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 2009-15.
136. Voehringer, D., et al., *Viral infections induce abundant numbers of senescent CD8 T cells*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 4838-43.
137. Voehringer, D., M. Koschella, and H. Pircher, *Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectinlike receptor G1 (KLRG1)*. Blood, 2002. **100**(10): p. 3698-702.
138. Peixoto, A., et al., *CD8 single-cell gene coexpression reveals three different effector types present at distinct phases of the immune response*. J Exp Med, 2007. **204**(5): p. 1193-205.
139. Grayson, J.M., et al., *Gene expression in antigen-specific CD8+ T cells during viral infection*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 795-9.

140. Sallusto, F., et al., *Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells*. Eur J Immunol, 1999. **29**(6): p. 2037-45.
141. Masopust, D., et al., *Cutting edge: gut microenvironment promotes differentiation of a unique memory CD8 T cell population*. J Immunol, 2006. **176**(4): p. 2079-83.
142. Wille-Reece, U., et al., *Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates*. J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1249-58.
143. Kaech, S.M., et al., *Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1191-8.
144. Barber, D.L., et al., *Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection*. Nature, 2006. **439**(7077): p. 682-7.
145. de Bree, G.J., et al., *Selective accumulation of differentiated CD8+ T cells specific for respiratory viruses in the human lung*. J Exp Med, 2005. **202**(10): p. 1433-42.
146. Ibegbu, C.C., et al., *Expression of killer cell lectin-like receptor G1 on antigen-specific human CD8+ T lymphocytes during active, latent, and resolved infection and its relation with CD57*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6088-94.
147. Hikono, H., et al., *Activation phenotype, rather than central- or effector-memory phenotype, predicts the recall efficacy of memory CD8+ T cells*. J Exp Med, 2007. **204**(7): p. 1625-36.
148. Joshi, N.S., et al., *Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor*. Immunity, 2007. **27**(2): p. 281-95.
149. Laouar, A., et al., *Cutting Edge: Distinct NK receptor profiles are imprinted on CD8 T cells in the mucosa and periphery during the same antigen challenge: role of tissue-specific factors*. J Immunol, 2007. **178**(2): p. 652-6.
150. Huster, K.M., et al., *Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(15): p. 5610-5.
151. Sprent, J., *T memory cells: quality not quantity*. Curr Biol, 2002. **12**(5): p. R174-6.

152. Zhang, X., et al., *Aging leads to disturbed homeostasis of memory phenotype CD8(+) cells*. J Exp Med, 2002. **195**(3): p. 283-93.
153. Lauvau, G., et al., *Priming of memory but not effector CD8 T cells by a killed bacterial vaccine*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1735-9.
154. Bachmann, M.F., et al., *Functional properties and lineage relationship of CD8+ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4686-96.
155. Jacob, J. and D. Baltimore, *Modelling T-cell memory by genetic marking of memory T cells in vivo*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 593-7.
156. Opferman, J.T., B.T. Ober, and P.G. Ashton-Rickardt, *Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes*. Science, 1999. **283**(5408): p. 1745-8.
157. Kaech, S.M. and R. Ahmed, *Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells*. Nat Immunol, 2001. **2**(5): p. 415-22.
158. Manjunath, N., et al., *Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes*. J Clin Invest, 2001. **108**(6): p. 871-8.
159. Badovinac, V.P. and J.T. Harty, *Manipulating the rate of memory CD8+ T cell generation after acute infection*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 53-63.
160. Castellino, F. and R.N. Germain, *Chemokine-guided CD4+ T cell help enhances generation of IL-6RalphahighIL-7Ralpha high prememory CD8+ T cells*. J Immunol, 2007. **178**(2): p. 778-87.
161. Freitas, A.A. and B. Rocha, *Population biology of lymphocytes: the flight for survival*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 83-111.
162. Ahmed, R. and D. Gray, *Immunological memory and protective immunity: understanding their relation*. Science, 1996. **272**(5258): p. 54-60.
163. Wherry, E.J. and R. Ahmed, *Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection*. J Virol, 2004. **78**(11): p. 5535-45.
164. Farber, D.L., *Differential TCR signaling and the generation of memory T cells*. J Immunol, 1998. **160**(2): p. 535-9.

165. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Exploring pathways for memory T cell generation*. J Clin Invest, 2001. **108**(6): p. 805-6.
166. Lefrancois, L. and A.L. Marzo, *The descent of memory T-cell subsets*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(8): p. 618-23.
167. Wu, C.Y., et al., *Distinct lineages of T(H)1 cells have differential capacities for memory cell generation in vivo*. Nat Immunol, 2002. **3**(9): p. 852-8.
168. Badovinac, V.P., et al., *Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination*. Nat Med, 2005. **11**(7): p. 748-56.
169. Chang, J.T., et al., *Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses*. Science, 2007. **315**(5819): p. 1687-91.
170. Stemberger, C., et al., *A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets*. Immunity, 2007. **27**(6): p. 985-97.
171. Marzo, A.L., et al., *Initial T cell frequency dictates memory CD8+ T cell lineage commitment*. Nat Immunol, 2005. **6**(8): p. 793-9.
172. Zaph, C., et al., *Persistence and function of central and effector memory CD4+ T cells following infection with a gastrointestinal helminth*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 511-8.
173. Bouneaud, C., et al., *Lineage relationships, homeostasis, and recall capacities of central- and effector-memory CD8 T cells in vivo*. J Exp Med, 2005. **201**(4): p. 579-90.
174. Bachmann, M.F., et al., *Recall proliferation potential of memory CD8+ T cells and antiviral protection*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4677-85.
175. Roberts, A.D., K.H. Ely, and D.L. Woodland, *Differential contributions of central and effector memory T cells to recall responses*. J Exp Med, 2005. **202**(1): p. 123-33.
176. Roberts, A.D. and D.L. Woodland, *Cutting edge: effector memory CD8+ T cells play a prominent role in recall responses to secondary viral infection in the lung*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 6533-7.
177. Bachmann, M.F., et al., *Cutting edge: distinct roles for T help and CD40/CD40 ligand in regulating differentiation of proliferation-competent memory CD8+ T cells*. J Immunol, 2004. **173**(4): p. 2217-21.

178. Rocha, B. and C. Tanchot, *Towards a cellular definition of CD8+ T-cell memory: the role of CD4+ T-cell help in CD8+ T-cell responses*. *Curr Opin Immunol*, 2004. **16**(3): p. 259-63.
179. Janssen, E.M., et al., *CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death*. *Nature*, 2005. **434**(7029): p. 88-93.
180. Janssen, E.M., et al., *CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes*. *Nature*, 2003. **421**(6925): p. 852-6.
181. Bourgeois, C., B. Rocha, and C. Tanchot, *A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory*. *Science*, 2002. **297**(5589): p. 2060-3.
182. Lee, B.O., L. Hartson, and T.D. Randall, *CD40-deficient, influenza-specific CD8 memory T cells develop and function normally in a CD40-sufficient environment*. *J Exp Med*, 2003. **198**(11): p. 1759-64.
183. Sun, J.C. and M.J. Bevan, *Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help*. *Science*, 2003. **300**(5617): p. 339-42.
184. Shedlock, D.J. and H. Shen, *Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory*. *Science*, 2003. **300**(5617): p. 337-9.
185. Bennett, S.R., et al., *Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling*. *Nature*, 1998. **393**(6684): p. 478-80.
186. Ridge, J.P., F. Di Rosa, and P. Matzinger, *A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell*. *Nature*, 1998. **393**(6684): p. 474-8.
187. Schoenberger, S.P., et al., *T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions*. *Nature*, 1998. **393**(6684): p. 480-3.
188. Badovinac, V.P., et al., *TRAIL deficiency delays, but does not prevent, erosion in the quality of "helpless" memory CD8 T cells*. *J Immunol*, 2006. **177**(2): p. 999-1006.
189. Intlekofer, A.M., et al., *Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8+ T cells*. *J Exp Med*, 2007. **204**(9): p. 2015-21.
190. Weaver, C.T., et al., *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 821-52.

191. Szabo, S.J., et al., *Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells*. Science, 2002. **295**(5553): p. 338-42.
192. Pearce, E.L., et al., *Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin*. Science, 2003. **302**(5647): p. 1041-3.
193. Takemoto, N., et al., *Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8+ T cell differentiation*. J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7515-9.
194. Pearce, E.L. and H. Shen, *Generation of CD8 T cell memory is regulated by IL-12*. J Immunol, 2007. **179**(4): p. 2074-81.
195. Huntington, N.D., et al., *NK cell maturation and peripheral homeostasis is associated with KLRG1 up-regulation*. J Immunol, 2007. **178**(8): p. 4764-70.
196. Robbins, S.H., et al., *Expansion and contraction of the NK cell compartment in response to murine cytomegalovirus infection*. J Immunol, 2004. **173**(1): p. 259-66.
197. Townsend, M.J., et al., *T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells*. Immunity, 2004. **20**(4): p. 477-94.
198. Robbins, S.H., et al., *Direct effects of T-bet and MHC class I expression, but not STAT1, on peripheral NK cell maturation*. Eur J Immunol, 2005. **35**(3): p. 757-65.
199. Foulds, K.E., M.J. Rotte, and R.A. Seder, *IL-10 is required for optimal CD8 T cell memory following Listeria monocytogenes infection*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2565-74.
200. Biswas, P.S., et al., *Pathogen-specific CD8 T cell responses are directly inhibited by IL-10*. J Immunol, 2007. **179**(7): p. 4520-8.
201. Yokota, Y., et al., *Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2*. Nature, 1999. **397**(6721): p. 702-6.
202. Cannarile, M.A., et al., *Transcriptional regulator Id2 mediates CD8+ T cell immunity*. Nat Immunol, 2006. **7**(12): p. 1317-25.
203. Shapiro-Shelef, M., et al., *Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells*. Immunity, 2003. **19**(4): p. 607-20.

204. Kallies, A., et al., *Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance*. Nat Immunol, 2006. **7**(5): p. 466-74.
205. Martins, G.A., et al., *Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function*. Nat Immunol, 2006. **7**(5): p. 457-65.
206. Manders, P.M., et al., *BCL6b mediates the enhanced magnitude of the secondary response of memory CD8+ T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(21): p. 7418-25.
207. Ichii, H., et al., *Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8+ T cells*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 883-91.
208. Hand, T.W., M. Morre, and S.M. Kaech, *Expression of IL-7 receptor alpha is necessary but not sufficient for the formation of memory CD8 T cells during viral infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(28): p. 11730-5.
209. Heffner, M. and D.T. Fearon, *Loss of T cell receptor-induced Bmi-1 in the KLRG1(+) senescent CD8(+) T lymphocyte*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(33): p. 13414-9.
210. Masopust, D., et al., *Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue*. Science, 2001. **291**(5512): p. 2413-7.
211. Zimmermann, C., et al., *Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences*. Eur J Immunol, 1999. **29**(1): p. 284-90.
212. Cho, B.K., et al., *Functional differences between memory and naive CD8 T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 2976-81.
213. Selin, L.K. and R.M. Welsh, *Cytolytically active memory CTL present in lymphocytic choriomeningitis virus-immune mice after clearance of virus infection*. J Immunol, 1997. **158**(11): p. 5366-73.
214. Bachmann, M.F., et al., *Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection*. Eur J Immunol, 1999. **29**(1): p. 291-9.
215. Barber, D.L., E.J. Wherry, and R. Ahmed, *Cutting edge: rapid in vivo killing by memory CD8 T cells*. J Immunol, 2003. **171**(1): p. 27-31.
216. Byers, A.M., et al., *Cutting edge: rapid in vivo CTL activity by polyoma virus-specific effector and memory CD8+ T cells*. J Immunol, 2003. **171**(1): p. 17-21.

217. Jabbari, A. and J.T. Harty, *Secondary memory CD8+ T cells are more protective but slower to acquire a central-memory phenotype*. J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 919-32.
218. Wolint, P., et al., *Immediate cytotoxicity but not degranulation distinguishes effector and memory subsets of CD8+ T cells*. J Exp Med, 2004. **199**(7): p. 925-36.
219. Pihlgren, M., et al., *Memory CD44(int) CD8 T cells show increased proliferative responses and IFN-gamma production following antigenic challenge in vitro*. Int Immunol, 1999. **11**(5): p. 699-706.
220. Walzer, T., et al., *Characterization at the single-cell level of naive and primed CD8 T cell cytokine responses*. Cell Immunol, 2000. **206**(1): p. 16-25.
221. Fitzpatrick, D.R., et al., *Distinct methylation of the interferon gamma (IFN-gamma) and interleukin 3 (IL-3) genes in newly activated primary CD8+ T lymphocytes: regional IFN-gamma promoter demethylation and mRNA expression are heritable in CD44(high)CD8+ T cells*. J Exp Med, 1998. **188**(1): p. 103-17.
222. Marcais, A., et al., *Maintenance of CCL5 mRNA stores by post-effector and memory CD8 T cells is dependent on transcription and is coupled to increased mRNA stability*. Eur J Immunol, 2006. **36**(10): p. 2745-54.
223. Marcais, A., et al., *Cell-autonomous CCL5 transcription by memory CD8 T cells is regulated by IL-4*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4451-7.
224. Arpin, C., et al., *Hyperproliferative response of a monoclonal memory CD8 T cell population is characterized by an increased frequency of clonogenic precursors*. J Immunol, 2002. **168**(5): p. 2147-53.
225. Veiga-Fernandes, H. and B. Rocha, *High expression of active CDK6 in the cytoplasm of CD8 memory cells favors rapid division*. Nat Immunol, 2004. **5**(1): p. 31-7.
226. Hou, S., et al., *Virus-specific CD8+ T-cell memory determined by clonal burst size*. Nature, 1994. **369**(6482): p. 652-4.
227. Kundig, T.M., et al., *On the role of antigen in maintaining cytotoxic T-cell memory*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9716-23.
228. Mullbacher, A., *The long-term maintenance of cytotoxic T cell memory does not require persistence of antigen*. J Exp Med, 1994. **179**(1): p. 317-21.
229. Lau, L.L., et al., *Cytotoxic T-cell memory without antigen*. Nature, 1994. **369**(6482): p. 648-52.

230. Klenerman, P. and A. Hill, *T cells and viral persistence: lessons from diverse infections*. Nat Immunol, 2005. **6**(9): p. 873-9.
231. Champagne, P., et al., *Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 106-11.
232. Wherry, E.J., J.N. Blattman, and R. Ahmed, *Low CD8 T-cell proliferative potential and high viral load limit the effectiveness of therapeutic vaccination*. J Virol, 2005. **79**(14): p. 8960-8.
233. Papagno, L., et al., *Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection*. PLoS Biol, 2004. **2**(2): p. E20.
234. Thimme, R., et al., *Increased expression of the NK cell receptor KLRG1 by virus-specific CD8 T cells during persistent antigen stimulation*. J Virol, 2005. **79**(18): p. 12112-6.
235. Brenchley, J.M., et al., *Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2711-20.
236. Tewari, K., et al., *Effect of chronic viral infection on epitope selection, cytokine production, and surface phenotype of CD8 T cells and the role of IFN-gamma receptor in immune regulation*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1491-500.
237. Powell, D.J., Jr. and S.A. Rosenberg, *Phenotypic and functional maturation of tumor antigen-reactive CD8+ T lymphocytes in patients undergoing multiple course peptide vaccination*. J Immunother, 2004. **27**(1): p. 36-47.
238. Lang, K.S., et al., *Inverse correlation between IL-7 receptor expression and CD8 T cell exhaustion during persistent antigen stimulation*. Eur J Immunol, 2005. **35**(3): p. 738-45.
239. Fuller, M.J., et al., *Cutting edge: emergence of CD127high functionally competent memory T cells is compromised by high viral loads and inadequate T cell help*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 5926-30.
240. Shin, H., et al., *Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection*. J Exp Med, 2007. **204**(4): p. 941-9.
241. Petrovas, C., et al., *PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection*. J Exp Med, 2006. **203**(10): p. 2281-92.

242. Tough, D.F. and J. Sprent, *Turnover of naive- and memory-phenotype T cells*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1127-35.
243. Tough, D.F., S. Sun, and J. Sprent, *T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS)*. J Exp Med, 1997. **185**(12): p. 2089-94.
244. Zhang, X., et al., *Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15*. Immunity, 1998. **8**(5): p. 591-9.
245. Lodolce, J.P., et al., *IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation*. Immunity, 1998. **9**(5): p. 669-76.
246. Burkett, P.R., et al., *Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15 α and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8+ T cell homeostasis*. J Exp Med, 2004. **200**(7): p. 825-34.
247. Tan, J.T., et al., *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 Med, 2002. **195**(12): p. 1523-32.
248. Goldrath, A.W., et al., *Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells*. J Exp Med, 2002. **195**(12): p. 1515-22.
249. Kieper, W.C., et al., *Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8+ T cells*. J Exp Med, 2002. **195**(12): p. 1533-9.
250. Boyman, O., et al., *A major histocompatibility complex class I-dependent subset of memory phenotype CD8+ cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1817-25.
251. Ku, C.C., et al., *Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines*. Science, 2000. **288**(5466): p. 675-8.
252. Murakami, M., et al., *CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(13): p. 8832-7.
253. Divkovic, M., et al., *Hapten-protein binding: from theory to practical application in the in vitro prediction of skin sensitization*. Contact Dermatitis, 2005. **53**(4): p. 189-200.
254. Revillard, J.P., *Innate immunity*. Eur J Dermatol, 2002. **12**(3): p. 224-7.

255. Seiffert, K. and R.D. Granstein, *Neuroendocrine regulation of skin dendritic cells*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1088**: p. 195-206.
256. Valladeau, J. and S. Saeland, *Cutaneous dendritic cells*. Semin Immunol, 2005. **17**(4): p. 273-83.
257. Wolff, K., *The fine structure of the Langerhans cell granule*. J Cell Biol, 1967. **35**(2): p. 468-73.
258. Valladeau, J., et al., *Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules*. Immunity, 2000. **12**(1): p. 71-81.
259. Bursch, L.S., et al., *Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells*. J Exp Med, 2007. **204**(13): p. 3147-56.
260. Sallusto, F., et al., *Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 389-400.
261. Inaba, K., et al., *Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(7): p. 3038-42.
262. Hunger, R.E., et al., *Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells*. J Clin Invest, 2004. **113**(5): p. 701-8.
263. Turville, S.G., et al., *Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets*. Nat Immunol, 2002. **3**(10): p. 975-83.
264. Yokota, K., et al., *Identification of a human homologue of the dendritic cell-associated C-type lectin-1, dectin-1*. Gene, 2001. **272**(1-2): p. 51-60.
265. de la Salle, H., et al., *Functions of Fc receptors on human dendritic Langerhans cells*. Int Rev Immunol, 1997. **16**(1-2): p. 187-203.
266. Dupuis, G., *Nature of hapten-protein interactions. Chemically reactive functions in haptens and proteins, in allergic contact dermatitis to simple chemicals. A molecular approach*. Ed Marcel Dekker ed, ed. C.D. Calnan and H.I. Maibach. 1982, New York.

267. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. *Annu Rev Immunol*, 1994. **12**: p. 991-1045.
268. *Proceedings of the 2006 EMBO Workshop on Innate Danger Signals and HMGB1*. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(1): p. 1-136.
269. Bianchi, M.E., *DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger*. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(1): p. 1-5.
270. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition*. *Cell*, 1997. **91**(3): p. 295-8.
271. Fadok, V.A., et al., *Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases*. *J Immunol*, 2001. **166**(11): p. 6847-54.
272. Meylan, E., J. Tschopp, and M. Karin, *Intracellular pattern recognition receptors in the host response*. *Nature*, 2006. **442**(7098): p. 39-44.
273. Andrejeva, J., et al., *The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(49): p. 17264-9.
274. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. *Semin Immunol*, 2007. **19**(1): p. 24-32.
275. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(7): p. 730-7.
276. Martinon, F. and J. Tschopp, *NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens*. *Trends Immunol*, 2005. **26**(8): p. 447-54.
277. Strober, W., et al., *Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(1): p. 9-20.
278. Carneiro, L.A., L.H. Travassos, and D.J. Philpott, *Innate immune recognition of microbes through Nod1 and Nod2: implications for disease*. *Microbes Infect*, 2004. **6**(6): p. 609-16.
279. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. *Mol Cell*, 2002. **10**(2): p. 417-26.

280. Martinon, F. and J. Tschopp, *Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation*. Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 10-22.
281. Sutterwala, F.S., Y. Ogura, and R.A. Flavell, *The inflammasome in pathogen recognition and inflammation*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(2): p. 259-64.
282. Pan, Q., et al., *MDP-induced interleukin-1beta processing requires Nod2 and CIAS1/NALP3*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(1): p. 177-83.
283. Watanabe, H., et al., *Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(8): p. 1956-63.
284. Chamailard, M., et al., *Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation*. Cell Microbiol, 2003. **5**(9): p. 581-92.
285. Maeda, S., et al., *Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing*. Science, 2005. **307**(5710): p. 734-8.
286. Foell, D., et al., *S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 28-37.
287. Vogl, T., et al., *Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock*. Nat Med, 2007. **13**(9): p. 1042-9.
288. Tian, J., et al., *Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE*. Nat Immunol, 2007. **8**(5): p. 487-96.
289. Yu, M., et al., *HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2*. Shock, 2006. **26**(2): p. 174-9.
290. Scaffidi, P., T. Misteli, and M.E. Bianchi, *Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 191-5.
291. Calderwood, S.K., et al., *Extracellular heat shock proteins in cell signaling*. FEBS Lett, 2007. **581**(19): p. 3689-94.
292. Chen, C.J., et al., *Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells*. Nat Med, 2007. **13**(7): p. 851-6.
293. Martinon, F., et al., *Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome*. Nature, 2006. **440**(7081): p. 237-41.

294. Chen, C.J., et al., *MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals*. J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2262-71.
295. Mariathasan, S., et al., *Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf*. Nature, 2004. **430**(6996): p. 213-8.
296. Kanneganti, T.D., et al., *Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3*. Nature, 2006. **440**(7081): p. 233-6.
297. Sutterwala, F.S., et al., *Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1*. Immunity, 2006. **24**(3): p. 317-27.
298. Feldmeyer, L., et al., *The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes*. Curr Biol, 2007. **17**(13): p. 1140-5.
299. Martinon, F., *Detection of immune danger signals by NALP3*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(3): p. 507-11.
300. Rock, K.L. and H. Kono, *The inflammatory response to cell death*. Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 99-126.
301. Lazarowski, E.R., et al., *Direct demonstration of mechanically induced release of cellular UTP and its implication for uridine nucleotide receptor activation*. J Biol Chem, 1997. **272**(39): p. 24348-54.
302. Roman, R.M., et al., *Hepatocellular ATP-binding cassette protein expression enhances ATP release and autocrine regulation of cell volume*. J Biol Chem, 1997. **272**(35): p. 21970-6.
303. Cotrina, M.L., et al., *Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15735-40.
304. Hamada, K., et al., *Stretch activates Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase in vascular smooth muscle cells through mechanisms involving autocrine ATP stimulation of purinoceptors*. J Biol Chem, 1998. **273**(11): p. 6334-40.
305. Mitchell, C.H., et al., *A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 7174-8.
306. Imai, M., et al., *CD39 modulates IL-1 release from activated endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **270**(1): p. 272-8.

307. Ferrari, D., et al., *The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release*. FASEB J, 2000. **14**(15): p. 2466-76.
308. Mizumoto, N., et al., *Keratinocyte ATP release assay for testing skin-irritating potentials of structurally diverse chemicals*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(5): p. 1066-72.
309. la Sala, A., et al., *Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(3): p. 339-43.
310. Ralevic, V. and G. Burnstock, *Receptors for purines and pyrimidines*. Pharmacol Rev, 1998. **50**(3): p. 413-92.
311. Williams, M. and M.F. Jarvis, *Adenosine antagonists as potential therapeutic agents*. Pharmacol Biochem Behav, 1988. **29**(2): p. 433-41.
312. Williams, M. and M.F. Jarvis, *Purinergic and pyrimidinergic receptors as potential drug targets*. Biochem Pharmacol, 2000. **59**(10): p. 1173-85.
313. la Sala, A., et al., *Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 1611-7.
314. Grabbe, S., et al., *Dissection of antigenic and irritative effects of epicutaneously applied haptens in mice. Evidence that not the antigenic component but nonspecific proinflammatory effects of haptens determine the concentration-dependent elicitation of allergic contact dermatitis*. J Clin Invest, 1996. **98**(5): p. 1158-64.
315. Aiba, S. and S.I. Katz, *Phenotypic and functional characteristics of in vivo-activated Langerhans cells*. J Immunol, 1990. **145**(9): p. 2791-6.
316. Ozawa, H., et al., *Interleukin-1 beta and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mediate Langerhans cell maturation differently*. J Invest Dermatol, 1996. **106**(3): p. 441-5.
317. Aiba, S., et al., *Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules*. Eur J Immunol, 1997. **27**(11): p. 3031-8.
318. Aiba, S., et al., *In vitro treatment of human transforming growth factor-beta1-treated monocyte-derived dendritic cells with haptens can induce the phenotypic and functional changes similar to epidermal Langerhans cells in the initiation phase of allergic contact sensitivity reaction*. Immunology, 2000. **101**(1): p. 68-75.

319. Kobayashi, Y., *Langerhans' cells produce type IV collagenase (MMP-9) following epicutaneous stimulation with haptens*. Immunology, 1997. **90**(4): p. 496-501.
320. Staquet, M.J., et al., *Human epidermal Langerhans cells express beta 1 integrins that mediate their adhesion to laminin and fibronectin*. J Invest Dermatol, 1992. **99**(5): p. 12S-14S.
321. Aiba, S., et al., *Up-regulation of alpha 4 integrin on activated Langerhans cells: analysis of adhesion molecules on Langerhans cells relating to their migration from skin to draining lymph nodes*. J Invest Dermatol, 1993. **100**(2): p. 143-7.
322. Weiss, J.M., et al., *An essential role for CD44 variant isoforms in epidermal Langerhans cell and blood dendritic cell function*. J Cell Biol, 1997. **137**(5): p. 1137-47.
323. Kuhn, U., et al., *Induction of tyrosine phosphorylation in human MHC class II-positive antigen-presenting cells by stimulation with contact sensitizers*. J Immunol, 1998. **160**(2): p. 667-73.
324. Arrighi, J.F., et al., *A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 3837-45.
325. Aiba, S., et al., *p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and 2,4-dinitrochlorobenzene*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(3): p. 390-9.
326. Bergstresser, P.R., G.B. Toews, and J.W. Streilein, *Natural and perturbed distributions of Langerhans cells: responses to ultraviolet light, heterotopic skin grafting, and dinitrofluorobenzene sensitization*. J Invest Dermatol, 1980. **75**(1): p. 73-7.
327. Weinlich, G., et al., *Entry into afferent lymphatics and maturation in situ of migrating murine cutaneous dendritic cells*. J Invest Dermatol, 1998. **110**(4): p. 441-8.
328. Steinbrink, K., et al., *Induction of low zone tolerance to contact allergens in mice does not require functional Langerhans cells*. J Invest Dermatol, 1996. **107**(2): p. 243-7.
329. Larsen, C.P., et al., *Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants*. J Exp Med, 1990. **172**(5): p. 1483-93.

330. Lukas, M., et al., *Human cutaneous dendritic cells migrate through dermal lymphatic vessels in a skin organ culture model*. *J Invest Dermatol*, 1996. **106**(6): p. 1293-9.
331. Cumberbatch, M., I. Fielding, and I. Kimber, *Modulation of epidermal Langerhans' cell frequency by tumour necrosis factor-alpha*. *Immunology*, 1994. **81**(3): p. 395-401.
332. Cumberbatch, M. and I. Kimber, *Dermal tumour necrosis factor-alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans' cell migration*. *Immunology*, 1992. **75**(2): p. 257-63.
333. Cumberbatch, M. and I. Kimber, *Tumour necrosis factor-alpha is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization*. *Immunology*, 1995. **84**(1): p. 31-5.
334. Kimber, I., et al., *Langerhans cells and chemical allergy*. *Curr Opin Immunol*, 1998. **10**(6): p. 614-9.
335. Shu, H.B., M. Takeuchi, and D.V. Goeddel, *The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(24): p. 13973-8.
336. Wang, B., et al., *Depressed Langerhans cell migration and reduced contact hypersensitivity response in mice lacking TNF receptor p75*. *J Immunol*, 1997. **159**(12): p. 6148-55.
337. Nakae, S., et al., *IL-1 alpha, but not IL-1 beta, is required for contact-allergen-specific T cell activation during the sensitization phase in contact hypersensitivity*. *Int Immunol*, 2001. **13**(12): p. 1471-8.
338. Cumberbatch, M., et al., *Interleukin (IL)-18 induces Langerhans cell migration by a tumour necrosis factor-alpha- and IL-1beta-dependent mechanism*. *Immunology*, 2001. **102**(3): p. 323-30.
339. Cumberbatch, M., R.J. Dearman, and I. Kimber, *Interleukin 1 beta and the stimulation of Langerhans cell migration: comparisons with tumour necrosis factor alpha*. *Arch Dermatol Res*, 1997. **289**(5): p. 277-84.
340. Shornick, L.P., et al., *Mice deficient in IL-1beta manifest impaired contact hypersensitivity to trinitrochlorobenzene*. *J Exp Med*, 1996. **183**(4): p. 1427-36.
341. Pasparakis, M., et al., *Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles*,

- follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response.* J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1397-411.
342. Enk, A.H., et al., *An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 beta in the initiation of primary immune responses in skin.* J Immunol, 1993. **150**(9): p. 3698-704.
343. Tang, A., et al., *Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin.* Nature, 1993. **361**(6407): p. 82-5.
344. Dieu, M.C., et al., *Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites.* J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 373-86.
345. Saeki, H., et al., *Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes.* J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2472-5.
346. Caux, C., et al., *Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines.* Springer Semin Immunopathol, 2000. **22**(4): p. 345-69.
347. Qu, C., et al., *Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes.* J Exp Med, 2004. **200**(10): p. 1231-41.
348. Enk, A.H. and S.I. Katz, *Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(4): p. 1398-402.
349. Stoitzner, P., et al., *Migration of langerhans cells and dermal dendritic cells in skin organ cultures: augmentation by TNF-alpha and IL-1beta.* J Leukoc Biol, 1999. **66**(3): p. 462-70.
350. Caughman, S.W., L.J. Li, and K. Degitz, *Characterization and functional analysis of interferon-gamma-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in human keratinocytes and A-431 cells.* J Invest Dermatol, 1990. **94**(6 Suppl): p. 22S-26S.
351. Garioch, J.J., et al., *Keratinocyte expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) correlated with infiltration of lymphocyte function associated antigen 1 (LFA-1) positive cells in evolving allergic contact dermatitis reactions.* Histopathology, 1991. **19**(4): p. 351-4.

352. Albanesi, C., A. Cavani, and G. Girolomoni, *Interferon-gamma-stimulated human keratinocytes express the genes necessary for the production of peptide-loaded MHC class II molecules*. *J Invest Dermatol*, 1998. **110**(2): p. 138-42.
353. Gaspari, A.A., et al., *Characterization of the altered cutaneous reactivity of transgenic mice whose keratinocytes overexpress B7-1*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1998. **86**(3): p. 259-70.
354. Nasir, A., et al., *Exaggerated and persistent cutaneous delayed-type hypersensitivity in transgenic mice whose epidermal keratinocytes constitutively express B7-1 antigen*. *J Clin Invest*, 1994. **94**(2): p. 892-8.
355. Loser, K., et al., *Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells*. *Nat Med*, 2006. **12**(12): p. 1372-9.
356. Mahnke, K., et al., *Induction of CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells*. *Blood*, 2003. **101**(12): p. 4862-9.
357. Theill, L.E., W.J. Boyle, and J.M. Penninger, *RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 795-823.
358. Burns, R., et al., *Keratinocyte-derived, CD80-mediated costimulation is associated with hapten-specific IgE production during contact hypersensitivity to TH1 haptens*. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. **115**(2): p. 383-90.
359. Masuda, K., et al., *The role of interleukin-16 in murine contact hypersensitivity*. *Clin Exp Immunol*, 2005. **140**(2): p. 213-9.
360. Bour, H., et al., *Major histocompatibility complex class I-restricted CD8⁺ T cells and class II-restricted CD4⁺ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene*. *Eur J Immunol*, 1995. **25**(11): p. 3006-10.
361. Martin, S., et al., *Peptide immunization indicates that CD8⁺ T cells are the dominant effector cells in trinitrophenyl-specific contact hypersensitivity*. *J Invest Dermatol*, 2000. **115**(2): p. 260-6.
362. Vocanson, M., et al., *CD8⁺ T cells are effector cells of contact dermatitis to common skin allergens in mice*. *J Invest Dermatol*, 2006. **126**(4): p. 815-20.
363. Gocinski, B.L. and R.E. Tigelaar, *Roles of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion*. *J Immunol*, 1990. **144**(11): p. 4121-8.

364. Banerjee, G., et al., *Role of keratinocytes in antigen presentation and polarization of human T lymphocytes*. Scand J Immunol, 2004. **59**(4): p. 385-94.
365. Kondo, S., et al., *Hyporesponsiveness in contact hypersensitivity and irritant contact dermatitis in CD4 gene targeted mouse*. J Invest Dermatol, 1996. **106**(5): p. 993-1000.
366. Saint-Mezard, P., et al., *Deficient contact hypersensitivity reaction in CD4^{-/-} mice is because of impaired hapten-specific CD8⁺ T cell functions*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(3): p. 562-9.
367. Martin, S.F., et al., *Fas-mediated inhibition of CD4⁺ T cell priming results in dominance of type 1 CD8⁺ T cells in the immune response to the contact sensitizer trinitrophenyl*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 3178-85.
368. Watanabe, H., et al., *Contact hypersensitivity: the mechanism of immune responses and T cell balance*. J Interferon Cytokine Res, 2002. **22**(4): p. 407-12.
369. Macatonia, S.E., et al., *Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells*. J Immunol, 1995. **154**(10): p. 5071-9.
370. Riemann, H., et al., *Neutralization of IL-12 in vivo prevents induction of contact hypersensitivity and induces hapten-specific tolerance*. J Immunol, 1996. **156**(5): p. 1799-803.
371. Gorbachev, A.V., N.A. DiIulio, and R.L. Fairchild, *IL-12 augments CD8⁺ T cell development for contact hypersensitivity responses and circumvents anti-CD154 antibody-mediated inhibition*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 156-62.
372. Wang, B., et al., *Cytokine knockouts in contact hypersensitivity research*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(5): p. 381-9.
373. Xu, H., N.A. DiIulio, and R.L. Fairchild, *T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8⁺ T cells and interleukin (Il) 4/Il-10-producing (Th2) negative regulatory CD4⁺ T cells*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1001-12.
374. Saulnier, M., et al., *Role of interferon-gamma in contact hypersensitivity assessed in interferon-gamma receptor-deficient mice*. Toxicology, 1995. **102**(3): p. 301-12.
375. Tsuji, R.F., M. Kikuchi, and P.W. Askenase, *Possible involvement of C5/C5a in the efferent and elicitation phases of contact sensitivity*. J Immunol, 1996. **156**(12): p. 4444-50.

376. Tsuji, R.F., et al., *Required early complement activation in contact sensitivity with generation of local C5-dependent chemotactic activity, and late T cell interferon gamma: a possible initiating role of B cells.* J Exp Med, 1997. **186**(7): p. 1015-26.
377. Tsuji, R.F., et al., *Early local generation of C5a initiates the elicitation of contact sensitivity by leading to early T cell recruitment.* J Immunol, 2000. **165**(3): p. 1588-98.
378. Barrington, R., et al., *The role of complement in inflammation and adaptive immunity.* Immunol Rev, 2001. **180**: p. 5-15.
379. Yancey, K.B., et al., *Studies of human C5a as a mediator of inflammation in normal human skin.* J Clin Invest, 1985. **75**(2): p. 486-95.
380. Stall, A.M., S.M. Wells, and K.P. Lam, *B-1 cells: unique origins and functions.* Semin Immunol, 1996. **8**(1): p. 45-59.
381. Tsuji, R.F., et al., *B cell-dependent T cell responses: IgM antibodies are required to elicit contact sensitivity.* J Exp Med, 2002. **196**(10): p. 1277-90.
382. Askenase, P.W., et al., *Extravascular T-cell recruitment requires initiation begun by Valpha14+ NKT cells and B-1 B cells.* Trends Immunol, 2004. **25**(8): p. 441-9.
383. Mercer, J.C., M.J. Ragin, and A. August, *Natural killer T cells: rapid responders controlling immunity and disease.* Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(7): p. 1337-43.
384. Kawano, T., et al., *Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5690-3.
385. Hansen, D.S. and L. Schofield, *Regulation of immunity and pathogenesis in infectious diseases by CD1d-restricted NKT cells.* Int J Parasitol, 2004. **34**(1): p. 15-25.
386. Akbari, O., et al., *CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma.* N Engl J Med, 2006. **354**(11): p. 1117-29.
387. Hong, S., et al., *The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice.* Nat Med, 2001. **7**(9): p. 1052-6.
388. Zeng, D., et al., *Activation of natural killer T cells in NZB/W mice induces Th1-type immune responses exacerbating lupus.* J Clin Invest, 2003. **112**(8): p. 1211-22.

389. Kakimi, K., et al., *Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 921-30.
390. Campos, R.A., et al., *Cutaneous immunization rapidly activates liver invariant Valpha14 NKT cells stimulating B-1 B cells to initiate T cell recruitment for elicitation of contact sensitivity*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1785-96.
391. Ptak, W., W.R. Herzog, and P.W. Askenase, *Delayed-type hypersensitivity initiation by early-acting cells that are antigen mismatched or MHC incompatible with late-acting, delayed-type hypersensitivity effector T cells*. J Immunol, 1991. **146**(2): p. 469-75.
392. Campos, R.A., et al., *Interleukin-4-dependent innate collaboration between iNKT cells and B-1 B cells controls adaptative contact sensitivity*. Immunology, 2006. **117**(4): p. 536-47.
393. Campos, R.A., et al., *Invariant NKT cells rapidly activated via immunization with diverse contact antigens collaborate in vitro with B-1 cells to initiate contact sensitivity*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 3686-94.
394. Askenase, P.W., et al., *TLR-dependent IL-4 production by invariant Valpha14+Jalpha18+ NKT cells to initiate contact sensitivity in vivo*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6390-401.
395. Kondo, S., R.C. McKenzie, and D.N. Sauder, *Interleukin-10 inhibits the elicitation phase of allergic contact hypersensitivity*. J Invest Dermatol, 1994. **103**(6): p. 811-4.
396. Maguire, H.C., Jr., K.A. Ketcha, and E.C. Lattime, *Neutralizing anti-IL-10 antibody upregulates the induction and elicitation of contact hypersensitivity*. J Interferon Cytokine Res, 1997. **17**(12): p. 763-8.
397. Berg, D.J., et al., *Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses*. J Exp Med, 1995. **182**(1): p. 99-108.
398. Sakaguchi, S., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 345-52.
399. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
400. Liu, H. and B.P. Leung, *CD4+CD25+ regulatory T cells in health and disease*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006. **33**(5-6): p. 519-24.

401. Shevach, E.M., *CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 389-400.
402. Colantonio, L., et al., *Skin-homing CLA+ T cells and regulatory CD25+ T cells represent major subsets of human peripheral blood memory T cells migrating in response to CCL1/I-309*. Eur J Immunol, 2002. **32**(12): p. 3506-14.
403. Cavani, A., et al., *Human CD25+ regulatory T cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, nonallergic individuals*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 5760-8.
404. Cavani, A., et al., *Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(2): p. 295-302.
405. Ring, S., et al., *CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue*. Eur J Immunol, 2006. **36**(11): p. 2981-92.
406. Roncarolo, M.G., et al., *Type 1 T regulatory cells*. Immunol Rev, 2001. **182**: p. 68-79.
407. Girolomoni, G., et al., *Immunoregulation of allergic contact dermatitis*. J Dermatol, 2004. **31**(4): p. 264-70.
408. Dieckmann, D., et al., *Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]*. J Exp Med, 2002. **196**(2): p. 247-53.
409. O'Leary, J.G., et al., *T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells*. Nat Immunol, 2006. **7**(5): p. 507-16.
410. Mamalaki, C., et al., *Positive and negative selection in transgenic mice expressing a T-cell receptor specific for influenza nucleoprotein and endogenous superantigen*. Dev Immunol, 1993. **3**(3): p. 159-74.
411. Mamalaki, C., et al., *Thymic depletion and peripheral activation of class I major histocompatibility complex-restricted T cells by soluble peptide in T-cell receptor transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(23): p. 11342-6.
412. Pihlgren, M., et al., *Resting memory CD8+ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro*. J Exp Med, 1996. **184**(6): p. 2141-51.

413. Walzer, T., et al., *Differential in vivo persistence of two subsets of memory phenotype CD8 T cells defined by CD44 and CD122 expression levels*. J Immunol, 2002. **168**(6): p. 2704-11.
414. Jacobs, K.L.a.J., *Studies on the sensitization of animals with single chemical compounds*. The journal of experimental medicine, 1935. **61**: p. 643.
415. Asherson, G.L. and W. Ptak, *Contact and delayed hypersensitivity in the mouse. I. Active sensitization and passive transfer*. Immunology, 1968. **15**(3): p. 405-16.
416. Gad, S.C., et al., *Development and validation of an alternative dermal sensitization test: the mouse ear swelling test (MEST)*. Toxicol Appl Pharmacol, 1986. **84**(1): p. 93-114.
417. Le Borgne, M., et al., *Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8+ T cell crosspriming in vivo*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 191-201.
418. Parham, P., *Immunology: adaptable innate killers*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 415-6.
419. Beutler, B., *Neo-ligands for innate immune receptors and the etiology of sterile inflammatory disease*. Immunol Rev, 2007. **220**: p. 113-28.
420. Raulet, D.H., *Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 996-1002.
421. Ugolini, S., et al., *Involvement of inhibitory NKRs in the survival of a subset of memory-phenotype CD8+ T cells*. Nat Immunol, 2001. **2**(5): p. 430-5.
422. Beloeil, L., et al., *In vivo impact of CpG1826 oligodeoxynucleotide on CD8 T cell primary responses and survival*. J Immunol, 2003. **171**(6): p. 2995-3002.
423. Akiba, H., et al., *CpG immunostimulatory sequences enhance contact hypersensitivity responses in mice*. J Invest Dermatol, 2004. **123**(3): p. 488-93.