



HAL
open science

Modulation des fonctions des lymphocytes T CD8 par l'Interleukine-4 et les cytokines de la famille γc

Erwann Ventre

► **To cite this version:**

Erwann Ventre. Modulation des fonctions des lymphocytes T CD8 par l'Interleukine-4 et les cytokines de la famille γc . Sciences agricoles. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2011. Français. NNT : 2011ENSL0697 . tel-00678496

HAL Id: tel-00678496

<https://theses.hal.science/tel-00678496>

Submitted on 13 Mar 2012

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 :

N° attribué par la bibliothèque :

THESE

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LYON – ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON

Spécialité : Sciences de la vie

CERVI-INSERM U851 « Immunité, Infection, Vaccination »
Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement le 7 décembre 2011 par

Monsieur Erwann Ventre

Modulation des fonctions des lymphocytes T CD8 par l'Interleukine-4 et les cytokines de la famille γ c

Directrice de thèse : Dr Jacqueline Marvel

Après avis du Dr Sylvie Guerder et du Dr Anne-Marie Schmitt-Verhulst

Devant la commission composée de :

Dr Sylvie Guerder	Rapporteur
Dr Anne-Marie Schmitt-Verhulst	Rapporteur
Dr Jerome Galon	Examineur
Dr Agnès Le Bon	Examineur
Dr Pierre Jurdic	Président
Dr Jacqueline Marvel	Membre

Objectifs et lignes directrices du travail de thèse

Les LT CD8 sont des cellules de l'immunité adaptative qui participent à la protection de l'organisme contre les pathogènes et à l'élimination de cellules tumorales. De plus, suite à une première infection, ils peuvent se différencier en cellules mémoires capables de répondre très rapidement lors d'une nouvelle rencontre avec l'antigène. Ce principe est à la base de la vaccination.

Cette accélération de la réponse a pour origine l'amélioration d'un certain nombre de caractéristiques : d'une part, les LT CD8 mémoires spécifiques d'un antigène sont présents en fréquence plus élevée que les LT CD8 naïfs, ce qui permet une expansion plus rapide suite à une infection secondaire. D'autre part, ils ont des fonctions améliorées leur permettant d'éliminer plus rapidement leurs cellules cibles et d'amplifier la réponse immunitaire. Parmi ces fonctions améliorées, il a été montré par l'équipe que les LT CD8 mémoires sécrètent la chimiokine CCL5 en quelques heures, quand les LT CD8 naïfs la sécrètent en plusieurs jours. L'équipe a montré que cette accélération avait pour origine le maintien dans les cellules mémoires d'un stock d'ARNm codant pour CCL5.

A mon arrivée dans l'équipe, A. Marçais venait de terminer l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de ces ARNm dans les LT CD8 mémoires. Il avait également montré que la transcription du gène *Ccl5* dans les cellules mémoires était inhibée de façon réversible par l'IL-4, ce qui laissait penser que cette cytokine pourrait réguler d'autres fonctions effectrices spécifiques des LT CD8 mémoires.

Les données bibliographiques disponibles concernant les voies de signalisation modulées par l'IL-4 dans les LT CD8 étaient alors mal fragmentaires, mais suggéraient fortement que cette cytokine pourrait avoir une importante fonction de régulation de leurs fonctions effectrices

Le travail présenté dans cette thèse a eu pour premier objectif d'identifier les fonctions des LT CD8 mémoires régulées par l'IL-4 en conditions homéostatiques. Nous avons utilisé une approche par microarray nous permettant de dégager une signature d'expression génique de l'IL-4 dans ces cellules. Nous avons notamment montré que l'IL-4 inhibe l'expression d'un récepteur dont l'engagement diminue le seuil d'activation des LT CD8 mémoires : NKG2D.

L'IL-4 fait partie de la famille des cytokines γ_c , famille dont les membres ont un rôle important dans la régulation de l'acquisition des fonctions effectrices par les LT CD8 effecteurs et mémoires. Nous avons, dans un deuxième axe de travail, étudié les effets de l'IL-4 et des autres membres de la famille sur l'acquisition des fonctions effectrices par les LT CD8 effecteurs et mémoires.

Les Résultats obtenus sont précédés d'une introduction bibliographique dans laquelle nous reviendrons dans un premier chapitre sur l'ensemble des mécanismes impliqués dans l'activation des LT CD8 naïfs, l'acquisition des fonctions effectrices par les LT CD8 effecteurs et la différenciation des LT CD8 mémoires. Dans une deuxième partie, nous développerons le rôle de l'IL-4 et des cytokines de la famille γ_c dans le maintien de l'homéostasie des LT CD8 naïfs et mémoires, puis nous décrirons l'état des connaissances concernant leur rôle dans la régulation de l'acquisition des fonctions effectrices par les LT CD8 et la différenciation des LT CD8 mémoires.

Sommaire

OBJECTIFS ET LIGNES DIRECTRICES DU TRAVAIL DE THESE	3
SOMMAIRE	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS	7
PRINCIPALES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	11
I- LA REPOSE IMMUNITAIRE DES LYMPHOCYTES T CD8	13
1- ACTIVATION DES LT CD8	13
2- EXPANSION CLONALE ET ACQUISITION DE FONCTIONS EFFECTRICES	25
3- PHASE DE CONTRACTION ET GENERATION DES LT CD8 MEMOIRES	30
II- INFLUENCE DES CYTOKINES γC SUR LA BIOLOGIE DES LT CD8	59
1- LA FAMILLE DES RECEPTEURS DE CYTOKINES CONTENANT UNE CHAINE γ C	59
2- EFFETS DES CYTOKINES γ C SUR LES LT CD8 NAÏFS EN CONDITIONS HOMEOSTATIQUES	62
3- EFFETS DES CYTOKINES γ C SUR LES LT CD8 MEMOIRES EN CONDITIONS HOMEOSTATIQUES	72
4- LES CYTOKINES γ C INFLUENCENT FORTEMENT LA REPOSE EFFECTRICE ET LA GENERATION DES LT CD8 MEMOIRES	78
CONCLUSION	89
RESULTATS	91
1. PARTIE 1 : L'IL-4 MODULE LES FONCTIONS DES LT CD8 MEMOIRES	93
ANNEXE 1	146
ANNEXE 2	147
2. PARTIE 2 : L'IL-4 ET LES CYTOKINES γC AFFECTENT L'ACQUISITION DE FONCTIONS EFFECTRICES PAR LES LT CD8 EFFECTEURS ET MEMOIRES	149
1. SYSTEME EXPERIMENTAL	151
2. RESULTATS	151
3. DISCUSSION : MODELE D'ACTIVATION ET ROLE DE L'IL-2	163

DISCUSSION ET PERSPECTIVES **165**

1- L'IL-4 REGULE UNE GRANDE DIVERSITE DE FONCTIONS DES LT CD8 MEMOIRES. **168**

1.1 SIGNATURE IL-4	168
1.2 L'IL-4 REGULE L'EXPRESSION DE NKG2D ET CD94 IN VITRO ET IN VIVO	172
1.3 GENERATION DE CELLULES CD8 « INNEES » EN REPOSE A L'IL-4 DANS LA RATE	176
1.4 L'IL-4 REGULE LA REPOSE DE NOMBREUX ACTEURS DU SYSTEME IMMUNITAIRE.	178
1.5 PERSPECTIVES	180

2. L'ACTIVATION DE LT CD8 EN PRESENCE DE CYTOKINES Tc AFFECTE FORTEMENT LES FONCTIONS DES LT CD8 EFFECTEURS GENERES ET LEUR DIFFERENCIATION EN CELLULES MEMOIRES **183**

2.1 LES CYTOKINES Tc MODULENT L'ACQUISITION DE FONCTIONS PAR LES LT CD8 EFFECTEURS	184
2.2 LA GENERATION DE CELLULE MEMOIRES	185
2.3 INTERACTIONS IL-4/IL-21	187
2.3 PERSPECTIVES	187

CONCLUSION **191**

ANNEXE 3 **193**

(REFERENCES BIBLIOGRPAHIQUES **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

Table des illustrations

1. Introduction Bibliographique

Figure 1 : Evolution du nombre de LT CD8 au cours des différentes étapes de la réponse immunitaire

Figure 2 : Présentation directe et différentes hypothèse expliquant les mécanismes de la présentation croisée des antigènes

Figure 3 : Organisation de la synapse immune LT CD8/APC

Figure 4 : Structure du TCR et interactions avec les complexes CMH-I/p

Figure 5 : Principales propriétés des TEM et des TCM

Figure 6 : Propriétés des trois populations mémoires identifiées selon leur phénotype CD43/CD27

Figure 7 : modèles de différenciation des LT CD8 mémoires

Figure 8 : Modèle de différenciation de Chang et Reiner

Figure 9 : Modèle de Joshi et Sarkar

Figure 10 : Modèle hypothétique de différenciation des LT CD8 naïfs en cellules mémoires et facteurs de transcription (TF) impliqués

Figure 11 : Facteurs influençant la balance SLEC/MPEC

Figure 12 : Schéma simplifié de la voie de signalisation du complexe mTORC1

Figure 13 : Effets de la rapamycine sur la différenciation des LT CD8 effecteurs et mémoires

Figure 14 : structure des membres de la famille des récepteurs à chaîne γ c et principaux facteurs de transcription en aval

Figure 15 : voies de signalisation en aval du récepteur de l'IL-4, dépendante de STAT6 et du complexe IRS1/2

Figure 16 : disponibilité et consommation de l'IL-7

Figure 17 : Bilan des effets des cytokines γ c sur la biologie des LT CD8 naïfs

Figure 18 : Bilan des effets des cytokines γ c sur la biologie des LT CD8 mémoires

Figure 19 : Voies de différenciation des différents types de T-helpers

2. Résultats

2.1 L'IL-4 module les fonctions des LT CD8 mémoires

Figure 20 : IL-4 inhibits CD94 expression by memory CD8 T cells in a STAT6-dependant manner

Figure 21 : IL-4-induced innate CD8 T cells express low levels of Itg β 7

2.2 L'IL-4 et les cytokines γ c affectent l'acquisition de fonctions effectrices par les LT CD8 effecteurs et mémoires

Figure 22 : Modèle d'activation des LT CD8 F5 utilisé

Figure 23 : Activation des LT CD8 F5 et OT-I en présence d'IL-2

Figure 24 : Nombre de LT CD8 effecteurs générés 5 jours après activation

Figure 25 : L'IL-4 et l'IL-21 régulent l'expression de récepteurs NK par les LT CD8 effecteurs

Figure 26 : L'IL-4 et l'IL-21 affectent les capacités de sécrétion de cytokines et la polyfonctionnalité des LT CD8 effecteurs

Figure 27 : L'IL-4 affecte la polyfonctionnalité des LT CD8 effecteurs

Figure 28 : Les cytokines γ c affectent la production de chimiokines par les LT CD8 effecteurs

Figure 29 : L'IL-4 et l'IL-21 affectent la capacité de sécrétion de CCL5 et XCL1 par les LT CD8 effecteurs

Figure 30 : L'IL-4 et l'IL-21 régulent l'expression de récepteurs de cytokines par les LT CD8

Figure 31 : L'IL-4 et l'IL-21 affectent la différenciation des LT CD8 effecteurs en LT CD8 mémoires

3. Discussion

Figure 32 : le complexe de gènes NK

Figure 33 : modèle d'étude de la réponse secondaire de LT CD8 traités *in vivo* par l'IL-4.

Figure 34 : modèle d'étude de la réponse des LT CD8 en cas de co-infection par un virus vaccinia et un parasite induisant une réponse Th2.

Figure 35 : Modèle d'étude du potentiel de différenciation en cellules mémoires de LT CD8 activés en présence de cytokines γ c

Principales abréviations

ADN	: Acide Désoxyribonucléique
AICD	: Mort Cellulaire Induite par l'Activation
Ag	: Antigène
APC	: Antigen Presenting Cell
BCG	: Bilié de Calmette et Guérin
CD8SP	: CD8 simple positif
CMH	: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DAMPS	: Danger-Associated Molecular Pattern
DC	: Dendritic Cell
DTR	: Diphtheria Toxin Receptor
HIV	: Human immunodeficiency virus
IFN	: Interferon
IL	: Interleukine
IL-4Rα	: Chaîne α du récepteur de l'IL-4
ITAM	: Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif
LCMV	: Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LT	: Lymphocyte T
LPS	: Lipopolysaccharide
MPEC	: Memory-Precursor Effector Cell
MVA	: Modified Virus Ankara
NK	: Natural-Killer cell
NKT	: Natural-Killer T cell
NLR	: Nod-Like Receptor
PAMPS	: Pathogen-Associated Molecular Pattern

P. Yoelii : Plasmodium Yoelii

RLR : Rig-Like Receptor

SCID : Immunodéficience sévère combinée

SLEC : Short-Lived Effector Cell

Tc1 : Lymphocyte T CD8 cytotoxique de type 1

T_{CM} : Central Memory CD8 T cell

TCR : T-Cell Receptor

T_{EM} : **Effector Memory CD8 T cell**

Tfh : Lymphocyte T CD4 helper folliculaire

TGF : Tumor Growth Factor

Th1 : Lymphocyte T CD4 helper de type 1

T_{IM} : Inflammatory Memory CD8 T cell

TLR : Toll-Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TSLP : Thymic Stromal Lymphopietin

VSV : Vesicular stomatitis virus

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

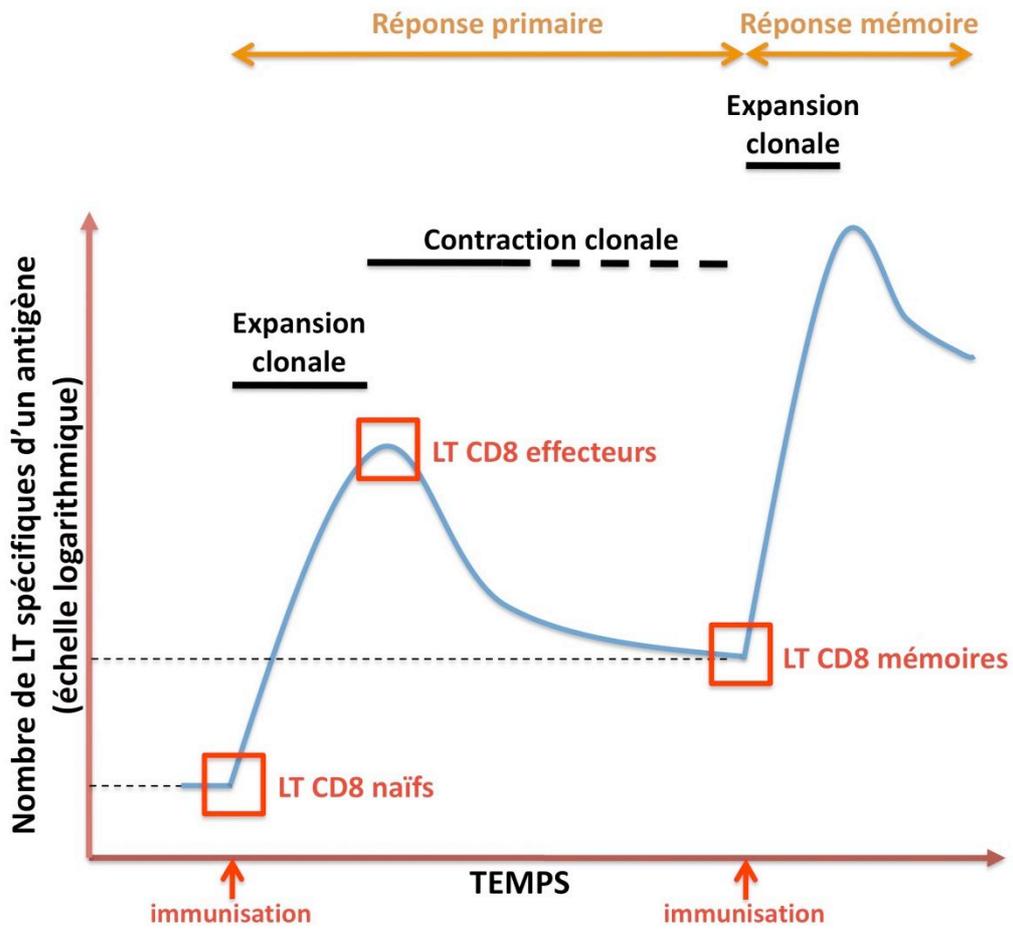


Figure 1 : Evolution du nombre de LT CD8 au cours des différentes étapes de la réponse immunitaire

I- LA REPONSE IMMUNITAIRE DES LYMPHOCYTES T CD8

Les lymphocytes T (LT) CD8 sont des cellules de l'immunité adaptative capables, après activation, de reconnaître et d'éliminer des cellules infectées ou du soi modifié. La réponse immunitaire des LT CD8 peut être initiée lorsqu'un LT CD8 naïf reconnaît un antigène (Ag) fixé sur une molécule du CMH de classe I (CMH-I) à la surface d'une cellule spécialisée : la Cellule Présentatrice d'Antigène (APC pour Antigen Presenting Cell). Lorsque le LT CD8 reçoit en outre les co-signaux nécessaires à une activation optimale, celui-ci entre alors dans une phase d'expansion clonale, caractérisée par une amplification du nombre de LT CD8 spécifiques de l'antigène et par une différenciation des cellules en LT CD8 effecteurs capables de reconnaître et de lyser les cellules infectées ou tumorales (figure 1).

Suite à l'élimination du pathogène ou de la tumeur, les LT CD8 effecteurs subissent une phase de contraction durant laquelle la majorité des cellules meurent par apoptose. Seule une petite fraction des cellules (5 à 10%) survit : les LT CD8 mémoires. Ces cellules, à la base du principe de vaccination, ont la particularité d'être en fréquence augmentée par rapport aux cellules naïves et d'avoir des fonctions améliorées leur permettant de répondre plus rapidement et plus fortement lors d'un nouveau challenge. Les caractéristiques de ces différentes étapes seront développées dans cette première partie.

1- Activation des LT CD8

1.1 L'activation fait suite à la reconnaissance de l'Ag à la surface d'une APC

Suite à un challenge infectieux, les APC les plus efficaces pour stimuler les LT CD8 naïfs sont les cellules dendritiques (DC) (Jung et al., Immunity, 2002). A l'état homéostatique, ces cellules sont réparties de façon ubiquitaire au sein des organes lymphoïdes primaires et secondaires mais également en périphérie, au niveau des principaux sites d'entrée des pathogènes, tels que la peau et les muqueuses. Elles sont dans un état dit « immature », et sont capables d'échantillonner leur environnement par différents mécanismes tels que l'endocytose et la phagocytose.

La reconnaissance de signaux de danger par l'intermédiaire des Pattern Recognition Receptors (PRR) induit l'activation ou « maturation » des DC, modifiant considérablement

leurs propriétés. Il existe plusieurs familles de PRR dont les Nod-Like Receptors (NLR), les Rig-Like Receptors (RLR), ou les Toll-Like Receptors (TLR). Ces derniers sont les mieux décrits, leur découverte étant plus ancienne. Le rôle des TLR dans l'induction de l'immunité innée a été clairement établi par des études de Medzhitov et Poltorak montrant que TLR-4 est capable de lier le lipopolysaccharide (LPS) bactérien, induisant l'expression de cytokines inflammatoires dans des lignées humaines (Medzhitov et al., *Nature*, 1997 ; Poltorak et al., *Science*, 1998). Il est aujourd'hui connu que les TLR, dont 13 ont été identifiés chez la souris, peuvent reconnaître une grande diversité de motifs viraux, bactériens, ou fongiques. Ces motifs associés aux pathogènes font partie de la famille des Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPS). Par ailleurs, les TLR sont également capables de reconnaître des signaux de danger endogènes tels que HMGB1, molécule passivement libérée par les cellules nécrotiques ou endommagées, et sécrétée par les monocytes activés et les macrophages, ce qui a pour conséquence une activation de l'inflammation (Scaffidi et al., *Nature*, 2002 ; Lotfi et al., *J Immunother*, 2007). Le concept de PAMPS a donc par la suite été élargi aux molécules de stress endogènes (ou alarmines), l'ensemble constituant la famille des Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPS).

La reconnaissance de ces signaux par les DC a pour conséquence d'augmenter transitoirement leurs capacités de phagocytose et la demi-vie des molécules du CMH-II à leur surface. Cela leur permettra de présenter de façon durable les Ag capturés lors de la détection de l'infection (Blander et al., *Nature*, 2006). Par ailleurs, au niveau des tissus, les DC ainsi activées acquièrent la capacité de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires où elles pourront présenter les antigènes capturés aux LT CD8 et participer de cette façon à leur activation. Cette capacité, couplée à l'augmentation de l'expression de surface de molécules du CMH et de molécules de costimulation ainsi qu'à une augmentation de la capacité de sécrétion de cytokines par les DC interviendra dans l'activation des LT CD8 naïfs (voir plus loin).

Les LT CD8 sont capables de reconnaître les antigènes présentés par les DC lorsqu'ils sont apprêtés sur des molécules du CMH-I. Lorsque la DC est infectée par un pathogène intracellulaire, cet apprêtement est réalisé par un mécanisme classique de présentation « directe ». Ce processus fait intervenir des protéases cytosoliques regroupées en complexes appelés protéasomes qui clivent les protéines intracellulaires endommagées ou en excès, qu'elles soient endogènes ou dérivées d'un pathogène. Les protéines ainsi dégradées sont transportées dans le réticulum endoplasmique par l'intermédiaire des protéines TAP, puis

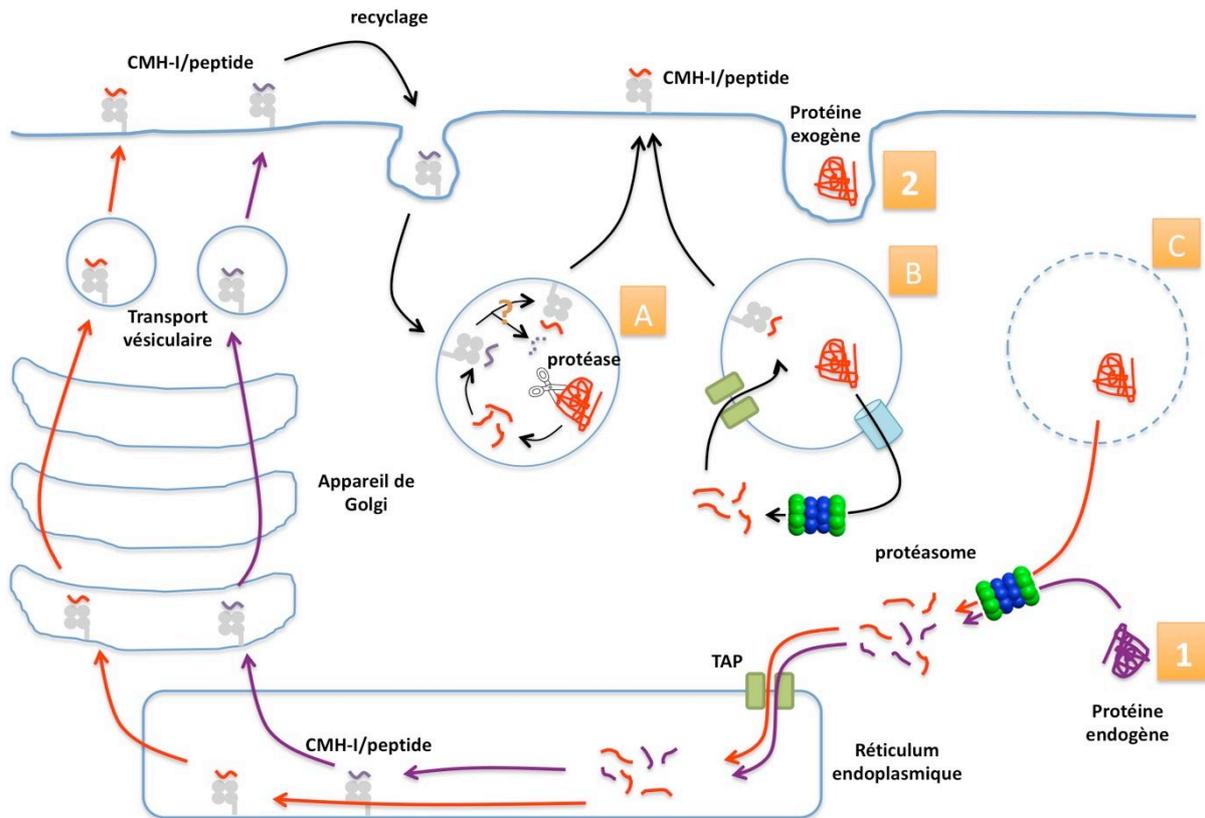


Figure 2 : Présentation directe (1) et différentes hypothèses expliquant les mécanismes de la présentation croisée des antigènes (2A, 2B et 2C). 2A : Les antigènes sont dégradés par des protéases endosomales et chargés sur des molécules du CMH-I directement présentes dans les endosomes après fusion avec des endosomes de recyclage. 2B : Le CMH-I est chargé dans des endosomes équipés de protéines du réticulum : les antigènes rejoignent le cytosol par un canal (qui pourrait être Sec61) où ils sont dégradés par le protéasome puis réimportés dans les endosomes via TAP. Ils y sont chargés grâce à des protéines comme la calréticuline, la calnexine et ERp57. 2C : Les antigènes sont transférés des vésicules d'endocytose vers le cytosol par un mécanisme inconnu, sont dégradés par le protéasome puis rejoignent la voie de présentation directe.

chargées à cet endroit sur des molécules du CMH-I. Ces complexes CMH/antigène peptidique (CMH/p) sont ensuite dirigés vers la membrane plasmique (Figure 2, 1). En revanche, lorsque l'antigène est d'origine exogène (endocytose, phagocytose...), l'apprêtement sur le CMH-I des DC fait intervenir un mécanisme particulier de chargement connu sous le nom de présentation « croisée ». Toutes les DC ne sont pas aussi efficaces pour faire de la présentation croisée : Iyoda et collègues ont ainsi montré que les DC spléniques exprimant le marqueur CD8 α ont les capacités de présentation croisée *in vivo* les plus importantes (Iyoda et al., J Exp Med, 2002). Il a été montré récemment que cette population de DC exprime spécifiquement le récepteur XCR1, dont le ligand XCL1, exprimé par les LT CD8 activés et les LT CD8 mémoires, participe activement à l'attraction des DC CD8 α + (Dorner et al. Immunity, 2009 ; Crozat et al., J Exp Med, 2010). Les mécanismes impliqués dans le phénomène de présentation croisée sont encore mal élucidés, plusieurs théories étant actuellement avancées (figure 2, 2).

La rencontre entre APC et LT CD8 au sein des organes lymphoïdes secondaires est rendue délicate par les vitesses élevées de circulation des LT au sein des organes lymphoïdes secondaires : les LT CD8 naïfs se déplaceraient à une vitesse moyenne de 15 μ m/min et seraient capables de contacter ~5000 DC par heure (Miller et al., Science, 2002 ; Miller et al., PNAS, 2003). De plus, suite à la rencontre APC/LT CD8, le LT doit être capable de discriminer par l'intermédiaire du TCR les complexes CMH-I/p dont il est spécifique. Cette reconnaissance est complexe car le TCR des LT CD8 doit être capable de reconnaître un nombre restreint de complexes CMH/p (~10) dérivés de pathogènes parmi les complexes CMH/p endogènes à la surface des DC (Bromley et al, Annu Rev Immunol, 2001). Lorsque l'interaction est suffisamment stable, il se met en place une structure permettant l'activation des LT CD8 : la synapse immune.

La synapse immune est la structure qui se forme au niveau de la zone de contact entre LT CD8 et APC après engagement du TCR. Elle a pour fonction d'améliorer l'efficacité de la signalisation du TCR, notamment en concentrant au centre de la zone de contact les TCR et les complexes CMH/p au sein de radeaux lipidiques enrichis en molécules de signalisation, ce qui aura pour conséquence une intégration efficace des signaux d'activation et une amplification du signal (Bromley et al, Annu Rev Immunol, 2001). Cette structure est particulièrement bien organisée : au centre se trouvent les complexes TCR-CMH/p stabilisés par la molécule co-réceptrice CD8 ainsi que les récepteurs costimulateurs ou coinhibiteurs tels que CD28 ou CTLA-4, associés à leurs ligands B7-1 et B7-2 exprimés par la DC, au sein

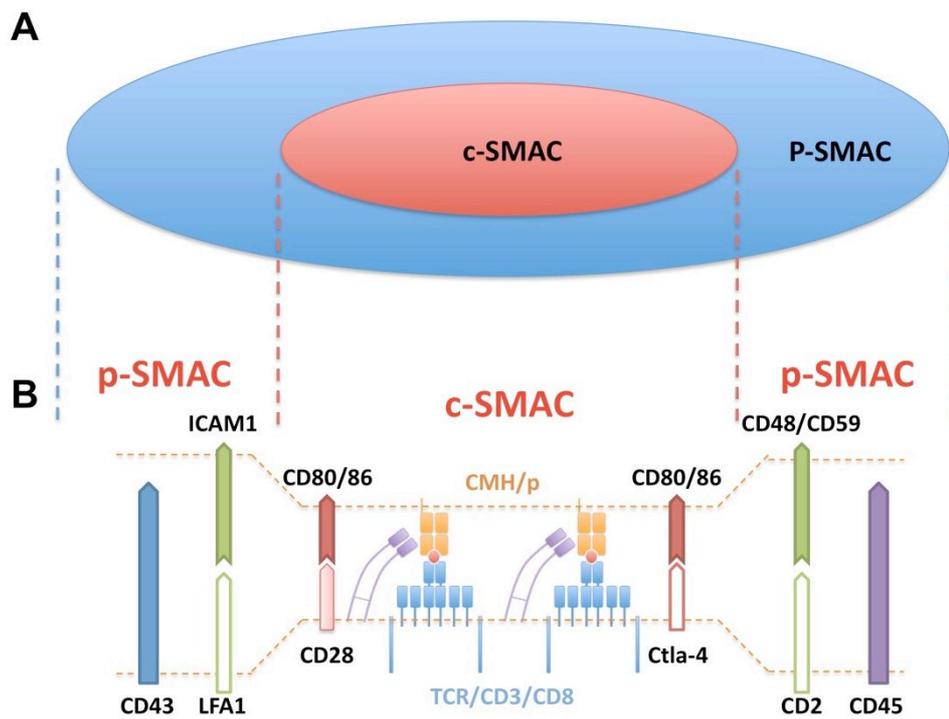


Figure 3 : Organisation de la synapse immunitaire LT CD8/APC. Vue en plan (A) et en coupe (B)

d'une zone appelée cluster d'activation supramoléculaire central (c-SMAC). En périphérie de cette zone se trouve le cluster d'activation supramoléculaire périphérique (p-SMAC) : il s'agit d'un anneau riche en molécules d'adhésion (Grakoui et al., Science, 1999). Enfin, les molécules à fort encombrement stérique comme CD43 et CD45 sont reléguées en périphérie de cette structure (Figure 3).

Cette période d'interaction stable dure environ 24h et coïncide avec l'activation des voies de signalisation en aval du TCR (signal 1) et des molécules de costimulation (signal 2). Un troisième signal, indépendant de la synapse immune, est également nécessaire : il s'agit de la présence dans l'environnement du LT CD8 de cytokines inflammatoires (signal 3). Ces trois signaux sont indispensables à l'induction d'une réponse effectrice robuste et au développement de cellules mémoires efficaces.

1.2 Signal 1 : la stimulation antigénique

Le signal 1 correspond à la stimulation du TCR. Le TCR est un dimère ancré dans la membrane plasmique et composé de deux chaînes polypeptides α et β ou γ et δ . Dans la suite de cette étude, nous nous restreindrons à la description des LT CD8 exposant un récepteur de type $\alpha\beta$. Chaque chaîne est composée d'un domaine variable N-terminal et d'un domaine constant contenant une séquence hydrophobe permettant l'ancrage dans la bicouche lipidique.

La diversité des TCR exposés par les LT CD8 trouve son origine dans les réarrangements génétiques aléatoires entre segments V et J de la chaîne α , et les segments V, D et J de la chaîne β . Le TCR est associé, sur la membrane plasmique, au complexe moléculaire CD3 composé de 5 chaînes polypeptidiques : les chaînes γ , δ , ϵ , ζ et η . Ce complexe est indispensable à la transduction du signal provoqué par l'engagement du TCR. Les molécules du complexe CD3 possèdent en effet dans leur domaine intracytoplasmique un ou plusieurs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif), permettant d'initier la cascade de phosphorylations nécessaire à l'activation des LT CD8 en réponse à l'engagement du TCR. En effet, les chaînes α et β du TCR sont dépourvues de motifs ITAM et ne peuvent donc pas transduire le signal en absence de CD3. De plus, le complexe TCR/CD3 s'associe à la molécule co-réceptrice CD8, qui interagit avec les molécules du complexe CMH-I de l'APC, permettant la stabilisation de l'interaction et une signalisation efficace (figure 4).

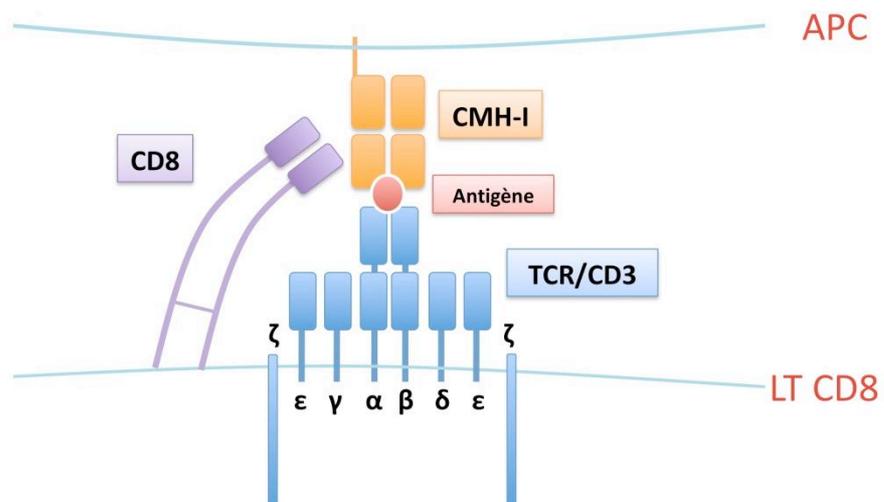


Figure 4 : Structure du TCR et interactions avec les complexes CMH-I/p

Deux paramètres influencent le niveau d'activation des LT CD8 suite à l'engagement du TCR : la force du signal reçu et la durée de l'interaction. La force du signal reçu par le LT CD8 est dépendante du nombre de TCR engagés à sa surface et de l'affinité de l'interaction TCR-CMH/p. L'amplitude de la prolifération ainsi initiée est dépendante de l'abondance d'antigènes : Wherry et collaborateurs, en générant des souches du virus vaccinia qui induisent l'expression de quantités variables d'antigène à la surface des cellules infectées, montrent que la taille de la population de LT effecteurs générée est directement proportionnelle à la quantité d'antigène présentée (Wherry, *J Immunol*, 1999). Concernant l'affinité, une liaison de faible affinité entre TCR et antigène peut suffire à activer les LT CD8 (Iezzi et al., *Immunity*, 1998 ; Rosette et al., *Immunity*, 2001 ; Lanzavecchia et al., *Nat Immunol*, 2001 ; Zehn et al., *Nature*, 2009). Ainsi, Zehn et collègues montrent en 2009 que les LT CD8 stimulés suite à une interaction TCR-CMH/p de faible affinité peuvent se différencier en effecteurs puis en cellules mémoires. Cependant, les auteurs montrent qu'une interaction de forte affinité est nécessaire à une prolifération soutenue des cellules activées, et que l'affinité de cette interaction influence fortement la cinétique de l'expansion, de la contraction, et de la sortie des LT CD8 activés des organes lymphoïdes. Les auteurs suggèrent ainsi que, suite à une infection, des LT CD8 portant des TCR de différentes affinités sont recrutés à l'initiation de la réponse. Cependant, par la suite, seuls les LT CD8 ayant répondu à une interaction de forte affinité sont capables de répondre de façon soutenue, et il s'opère ainsi une sélection du répertoire TCR (Zehn et al., *Nature*, 2009). Cette hypothèse de sélection des clones les plus réactifs est également soutenue par Wensveen et collègues, qui ont récemment montré qu'il existe un mécanisme dépendant de la molécule pro-apoptique Noxa induisant l'apoptose des LT CD8 ayant été activés suite à une interaction TCR-CMH/p de faible affinité (Wensveen et al., *Immunity*, 2010). Ce mécanisme a pour conséquence une limitation de la compétition interclonale lors de la phase d'expansion, assurant ainsi un développement optimal des LT CD8 ayant été activés suite à une interaction de forte affinité.

Par ailleurs, la durée de la stimulation influence également l'efficacité de l'activation : en utilisant un système de souris transgénique CD11c-DTR permettant l'élimination spécifique *in vivo* des DC par injection de toxine diphtérique, Prlic et collègues démontrent en 2006 que la durée de la stimulation influe directement sur l'amplitude de la prolifération des LT CD8 en réponse primaire, sans toutefois modifier l'acquisition de fonctions effectrices (Prlic et al., *J Exp Med*, 2006).

En conclusion, suite à l'engagement de leur TCR, les LT CD8 naïfs peuvent intégrer la force et la durée de la stimulation, induisant la prolifération et l'acquisition de fonctions effectrices indépendamment de toute autre rencontre avec l'antigène. Cependant, si la stimulation du TCR est nécessaire à l'activation des LT CD8, elle n'est pas suffisante pour le développement d'une prolifération soutenue et l'acquisition de fonctions effectrices. La présence de cosignaux tels que les signaux de costimulation et la présence de cytokines inflammatoires sont nécessaires à l'initiation d'une activation efficace et robuste des LT CD8.

1.3 Signal 2 : le signal de costimulation

Le signal 2 est délivré par l'engagement de récepteurs présents à la membrane des LT CD8. Ce signal a pour fonction de moduler le seuil d'activation des LT CD8. Certains récepteurs sont dits « costimulateurs » : leur engagement diminue le seuil d'activation des LT CD8. En revanche, l'engagement d'un récepteur inhibiteur a pour conséquence l'augmentation du seuil de stimulation des LT. C'est la balance des signaux délivrés par ces différents récepteurs qui est intégrée par les LT. Les récepteurs costimulateurs et inhibiteurs sont nombreux et divers : le tableau 1 montre un aperçu de cette diversité.

1.3.1 Superfamille des Immunoglobulines

Le principal récepteur costimulateur est un membre de la superfamille des immunoglobulines : CD28. Deux ligands de CD28 sont connus, B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86), dont l'expression est faible à nulle sur les DC immatures mais rapidement induite suite à leur maturation. L'engagement de ce récepteur induit l'expression de gènes de survie, soutient la prolifération cellulaire et induit la production d'Interleukine (IL)-2 (Rochford et al., Immunobiology, 2004 ; Suresh et al., J Immunol, 2001 ; Christensen et al., Int Immunol, 2002 ; Mittrücker et al., J Immunol, 2001). Le rôle de CD28 dans l'activation primaire des LT CD8 a été décrit dans la réponse à des virus tels que le VSV (McAdam et al., J Virol, 2000), le MHV-68 (Fuse et al., J Virol 2006), ou le virus Influenza de type A (Bertram et al., J Immunol, 2002). Dans cette dernière étude, Bertram et ses collaborateurs démontrent, à l'aide de souris invalidées pour le gène *cd28*, que la génération de LT CD8 effecteurs est fortement

Famille	Nom	Ligand(s)	Signal
Immunoglobulines	CD28	B7-1/B7-2	+
	CTLA-4	B7-1/B7-2	-
	ICOS	ICOSL	+
	PD-1	PD-L1/PD-L2	-
	BTLA-4	HVEM	-
TNF/TNFR	CD27	CD70	+
	OX-40	OX-40L	+
	HVEM	Light	+
	4-1BB	4-1BBL	+
	CD30	CD30L	+
	GITR	GITRL	+
TLR	TLR-2	PAM ₃ CSK ₄	+

Tableau 1 : récepteurs costimulateurs et coinhibiteurs des LT CD8

réduite suite à une infection par Influenza par voie intrapéritonéale ou intranasale en absence de cosignaux délivrés par CD28. En revanche, d'autres études basées sur l'utilisation du virus LCMV suggèrent que les LT CD8 peuvent être activés efficacement malgré l'absence de l'engagement de CD28. En effet, dans des souris *cd28*^{-/-} infectées par ce virus, l'expansion des LT CD8 est normale et l'efficacité de l'élimination du pathogène est comparable à celle observée dans des souris sauvages (Shahonian et al., Science, 1993). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène : Viola et collègues montrent en 1996 que le nombre de TCR devant être engagées pour induire une activation des LT CD8 est considérablement réduit en présence d'un signal costimulateur délivré par CD28, passant d'environ 8000 à 1500 (Viola et al., Science, 1996). Par ailleurs, la durée de l'interaction LT CD8/APC module également le niveau de costimulation nécessaire à l'activation (Kündig et al., Immunity 1996). Il est donc possible que, contrairement au virus LCMV, l'infection par Influenza A ne génère pas la quantité d'antigènes nécessaire et/ou que la durée des interactions LT/DC lors de cette infection soit trop faible. Il est également possible que les récepteurs de costimulation associés à la réponse immunitaire contre ces deux virus soient différents.

Egalement membre de la superfamille des immunoglobulines et structurellement très proche de CD28, le récepteur CTLA-4 est un récepteur inhibiteur. Il interagit avec les mêmes ligands que CD28 mais avec une affinité différente (Balzano et al., J Exp Med, 1992 ; Van der Merwe et al., J Exp Med, 1997). A la différence de CD28, la fonction de CTLA-4 est d'augmenter le seuil d'activation des LT CD8, propriété essentielle au contrôle du développement de maladies auto-immunes. Ainsi, l'inactivation du gène *ctla4* chez la souris induit une mort rapide due à une hyperprolifération lymphocytaire accompagnée d'une importante infiltration dans les tissus et d'une destruction des organes (Tivol et al., Immunity, 1995 ; Waterhouse et al., Science, 1995).

1.3.2 Superfamille des TNF-récepteurs

Certains membres de la famille des TNF-récepteurs sont également d'importants récepteurs costimulateurs. On pourra citer parmi eux le récepteur CD27, récepteur costimulateur dont le rôle dans la réponse primaire des LT CD8 et la réversion de l'anergie a récemment été décrit (Hendriks et al., Nat Immunol, 2000 ; Hendriks et al., J Exp Med, 2003 ;

Matter et al., EJI, 2005 ; Keller et al., Immunity, 2008). En effet, la délétion du gène *cd27* inhibe fortement la génération de LT CD8 mémoires en réponse primaire au virus Influenza. Dans ce modèle viral, CD27 agit en augmentant la survie des LT CD8 effecteurs générés, mais n'affecte ni l'activation ni l'acquisition des fonctions effectrices telles que la sécrétion d'IFN γ (Hendriks et al., Nat Immunol, 2000 ; Hendriks et al., J Exp Med, 2003). De même que pour CD28, le rôle de CD27 dans la costimulation des LT CD8 est dépendant du pathogène, la délétion du gène *cd27* ne modifiant pas la réponse contre le virus LCMV (Matter et al., Eur J Immunol, 2005). Par ailleurs, en 2008, Keller et ses collaborateurs démontrent que l'expression forcée de CD70, le ligand de CD27, à la surface de DC immatures, est suffisante pour briser la tolérance de LT CD8 OT-I préalablement induite par injection de peptide OVA sans cosignaux (Keller et Borst, Immunity, 2008).

Le rôle du récepteur 4-1BB dans la réponse anti-virale a également été décrit. Ainsi, le nombre de LT CD8 effecteurs générés dans des souris déficientes pour le gène *tnfrsf9* (gène codant pour la protéine 4-1BB) en réponse aux virus Influenza A et LCMV est fortement diminué (Tan et al., J Immunol, 1999 ; Hendriks et al., J Immunol, 2005).

Enfin, ces différentes molécules peuvent agir en synergie, comme cela a notamment été démontré pour les molécules CD27 et CD28 dans le cas d'une infection par le virus Influenza (Hendricks et al., J Exp Med, 2003).

Comme nous l'avons vu, ces différents récepteurs n'interviennent pas dans tous les types d'infections. En effet différents pathogènes peuvent activer différents PRR à la surface des APC, générer des charges antigéniques variables, et induire l'expression de différents ligands de récepteurs costimulateurs. Cependant, ces différents pathogènes induisent aussi différents milieux cytokiniques qui influencent fortement l'activation des LT CD8 naïfs.

1.4 Le signal 3 : les signaux cytokiniques

La prolifération et la différenciation des LT CD8 naïfs suite à leur stimulation sont grandement influencées par la présence dans l'environnement de diverses cytokines. Un certain nombre d'études décrivent une réponse primaire peu efficace lorsque les LT CD8 sont générés uniquement en présence des signaux 1 et 2, induisant une expansion faible ainsi qu'une acquisition limitée de fonctions effectrices, ou une induction de tolérance (Albert et

al., Nat Immunol, 2001 ; Hernandez et al., J Exp Med, 2002 ; Fujii et al., J Exp Med, 2004). Ces études suggèrent qu'un troisième signal est nécessaire pour une activation efficace des LT CD8 naïfs.

Le signal 3 est constitué de médiateurs solubles, les cytokines, sécrétées par les APC, les LT CD4 ou les LT CD8. L'IL-12 et les IFN de type 1 (IFN-I) sont les principales cytokines identifiées comme délivrant ce signal 3 (Curtsinger et al., J Immunol, 2005). Plus récemment, L'IL-21 a été décrite comme pouvant également délivrer ce signal 3 (Casey et al., J Immunol, 2007). De même que pour le signal 2, l'importance de chaque cytokine est variable en fonction du pathogène détecté par le système immunitaire. Ainsi, si les IFN-I semblent avoir un rôle important dans la réponse contre le LCMV, leur fonction dans l'initiation d'une réponse robuste contre Influenza apparaît moins fondamentale (Kolumam et al., J Exp Med 2005 ; Meshner et al., Immunological Review, 2006). Les signaux délivrés par ces cytokines conservent malgré tout une certaine redondance : ainsi, dans un modèle d'activation *in vitro* puis transfert *in vivo*, l'IL-12 peut délivrer les signaux nécessaires à une activation efficace. Cependant, l'infection de souris déficientes pour les gènes *il12p40* ou *il12rb1*, gènes codant respectivement pour une sous-unité de l'IL-12 et une sous-unité de son récepteur, n'implique pas de diminution d'efficacité de la réponse primaire en réponse à une infection virale (Chang et al., J Immunol, 2004). L'absence d'IL12 pourrait donc être en partie être compensée par la présence d'autres cytokines comme l'IFN α (Meshner et al., Immunol Rev, 2006).

2- Expansion clonale et acquisition de fonctions effectrices

Suite à leur activation, les LT CD8 entrent dans une phase dite d'expansion clonale durant laquelle ils prolifèrent de façon soutenue : l'activation provoque en effet leur entrée dans le cycle cellulaire et la génération de nombreux LT effecteurs (figure 1). Cette intense prolifération permettra au système immunitaire de lutter de façon efficace contre une infection. La prolifération des LT CD8 est accompagnée d'une modification de leurs propriétés migratoires : l'expression de CD62L à la surface cellulaire diminue, tandis que celle de S1P1 augmente, permettant la sortie des cellules des organes lymphoïdes secondaires vers la périphérie et le site de l'infection. Par ailleurs, les cellules acquièrent des fonctions effectrices leur permettant de lutter efficacement contre l'infection.

2.1 Expansion clonale des LT CD8 activés

De nombreuses études établissent un nombre de LT CD8 spécifiques d'un épitope compris entre 50 et 1000 au sein d'une souris (Arstilla et al., Science, 1999 ; Blattman et al., J Exp Med, 2002 ; Bousso et al., Immunity, 1998 ; Casrouge et al., J Immunol, 2000 ; Kedzierska et al., J Immunol, 2006). En 2002, Blattman et collaborateurs ont estimé que, chez la souris, 100 à 200 LT CD8 naïfs sont spécifiques de l'épitope GP33-41 du virus LCMV. Suite à une infection par le virus, ces cellules subissent plus de 14 divisions en 1 semaine, générant ainsi une population d'environ 10 millions d'effecteurs (Blattman et al., J Exp Med, 2002).

Cette phase d'expansion est fortement influencée par la présence dans l'environnement cellulaire de certaines cytokines liant les récepteurs de la famille γ_c . Un certain nombre d'études montrent en effet que les IL-2, -4, -15 et -21 peuvent jouer un rôle important dans le soutien de la prolifération des cellules, *in vitro* ou *in vivo*, en cas d'infection aiguë ou chronique (D'souza et al., J Immunol, 2003 ; Carvalho et al., Nat Med, 2002 ; Oh et al., PNAS, 2008 ; Elsaesser et al., Science, 2009 ; Yi et al., Science, 2009 ; Fröhlich et al., Science, 2009). Le rôle des cytokines de la famille γ_c dans la prolifération et l'acquisition des fonctions effectrices des LT CD8 sera développé dans la deuxième partie (II-3).

2.2 Acquisition de fonction effectrices

Suite à leur migration en périphérie, les LT CD8 effecteurs ont la capacité de reconnaître les cellules infectées par l'intermédiaire des interactions entre TCR et complexe CMH/p. Cette reconnaissance déclenche les fonctions effectrices des LT CD8 : la cytotoxicité, leur permettant d'éliminer les cellules cibles infectées ou tumorales, et la sécrétion de cytokines.

2.2.1 Cytotoxicité

Fonction principale des LT CD8, l'élimination d'une cellule cible peut faire intervenir deux voies : la cytotoxicité par la voie perforine/granzymes, ainsi que la voie Fas/FasL. Elle fait suite à la reconnaissance de l'antigène à la surface des cellules cibles par le TCR.

La voie perforine/granzymes

La reconnaissance d'une cellule infectée provoque l'exocytose de granules contenant différents types de protéines intervenant dans l'induction de l'apoptose des cellules cibles : des protéases, les granzymes, et une protéine capable de former des pores, la perforine. Un certain nombre d'études ont suggéré un modèle dans lequel la perforine était capable de polymériser pour former des pores d'environ 10 à 20 nM, permettant l'entrée des granzymes (Young et al., PNAS, 1985 ; Young et al., Science, 1986 ; Young et al., J Exp Med, 1986 ; Sauer et al., Biochim Biophys Acta, 1991). Cependant, peu de données sont venues par la suite confirmer ce modèle, notamment concernant les mécanismes d'action de la perforine. Un deuxième modèle proposé par Motyka et collègues en 2000 suggère que Granzyme-B (Gzm-B) peut s'associer avec le récepteur M6PR (Manose-6-phosphate Récepteur) à la surface de la cellule cible, puis être introduit dans la cellule par l'intermédiaire de l'endocytose du complexe (Motyka et al., Cell, 2000). Dans ce modèle, la fonction de la perforine n'est pas bien définie, mais elle reste indispensable à l'induction de l'apoptose (Froelich et al., JBC, 1996). Cependant, en 2003, Trapani et collègues montrent que Gzm-B peut s'introduire dans la cellule cible indépendamment de l'expression de M6PR par la cellule cible (Trapani et al., JCB, 2003). Un troisième modèle, proposé par Keefe et collègues suggère que les granzymes peuvent se lier à la membrane de la cellule cible, et que la perforine permet la formation de pores induisant un flux de Ca^{2+} dans cellule cible. Ce flux active l'endocytose des parties de la membrane contenant les pores, provoquant l'entrée des Gzm-B qui peuvent par la suite induire l'apoptose de la cellule (Keefe et al., Immunity, 2005).

Une fois dans le cytosol, les granzymes induisent l'entrée de la cellule cible en apoptose par l'intermédiaire de l'activation de la caspase-3 (Waterhouse et al., JBC, 2005 ; Sutton et al., Immunity, 2003 ; Sutton et al., J Exp Med, 2000).

La voie Fas/FasL

Les LT CD8 peuvent également provoquer la mort de la cellule cible par l'intermédiaire de la voie Fas/FasL. En effet, les LT CD8 effecteurs expriment à leur surface la molécule FasL, capable de reconnaître son récepteur Fas à la surface des cellules cibles. Cette reconnaissance induit le recrutement d'un complexe au niveau de Fas, le complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex), capable de recruter la caspase-8 et de provoquer l'apoptose de la cellule cible. Celle-ci peut intervenir par deux voies : d'une part, la caspase-8 peut activer les caspases 3 et 7, ce qui aura pour conséquences le clivage de protéines vitales pour la cellule ainsi que l'activation de la DNase CAD (Caspase-activated DNase) et l'apoptose cellulaire (Strasser et al., Immunity, 2009). D'autre part, une autre voie, dépendante de la protéine BID (membre de la famille de Bcl-2), peut être activée, conduisant à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et au relargage du cytochrome-c dans le cytoplasme. Ce relargage a pour conséquence la formation d'un complexe appelé apoptosome activant la caspase-9, capable à son tour d'activer les caspase-3 et 7, initiant l'apoptose (Strasser et al., Immunity, 2009).

2.2.2 La sécrétion de cytokines

Outre leurs capacités cytolytiques, les LT CD8 effecteurs sont capables de sécréter différents médiateurs de la réponse immunitaire comme l'IL-2, l'IFN γ , le TNF α , XCL1, ainsi que trois membres de la famille des chimiokines en C-C : CCL3, CCL4 et CCL5.

L'IL-2 a principalement une action autocrine sur les effecteurs, soutenant leur prolifération (D'souza et al., J Immunol, 2003). L'IFN γ active les LT CD8 ainsi que les macrophages et induit l'augmentation de l'expression des molécules du CMH-I à leur surface ainsi qu'à la surface des cellules cibles et des APC, permettant une reconnaissance plus aisée

par les cellules effectrices. Le TNF α participe au maintien de l'inflammation, et stimule la production de radicaux libres oxygénés par les phagocytes (Narni-Mancinelli et al., J Exp Med, 2007). Enfin, Le TNF α et l'IFN γ bloquent la synthèse protéique et la réplication virale dans les cellules infectées (Gilles et al., J Virol, 1992 ; Kohonen-Corish et al., Eur J Immunol, 1990 ; Sambhi et al., PNAS, 1991 ; Pavic et al., J Gen Virol, 1993).

XCL1 est une chimiokine dont le rôle dans la réponse des LT CD8 a plus récemment été décrit. Cette cytokine est sécrétée par les LT CD8 effecteurs après stimulation *in vitro* et son rôle chimio-attractant a été décrit dans un certain nombre d'études. Si certaines décrivent un rôle d'attraction des LT ainsi que des lymphocytes Natural Killer (NK) (Giancarlo et al., Eur J Immunol, 1996 ; Boismenu et al., J Immunol, 1996 ; Borthwick et al., Immunology, 1997), d'autres au contraire n'observent pas cette chimiotaxie (Müller et al., Eur J Immunol, 1995 ; Bleul et al., J Exp Med, 1996 ; Dorner et al., JBC, 1997). Son rôle dans l'attraction des DC a en revanche été très récemment décrit. En effet, deux études indépendantes ont montré que XCL1 est capable de recruter sélectivement les DC CD8a+, capable de faire de la présentation croisée des antigènes. Ces études montrent également que XCR1, unique récepteur connu de la molécule XCL1, est un marqueur spécifique et conservé entre espèces des DC capables de présentation croisée (Dorner et al. Immunity, 2009 ; Crozat et al., J Exp Med, 2010). Il semble donc que XCL1 ait un rôle majeur dans le recrutement des cellules capables de présenter les antigènes exogènes aux LT CD8. Par ailleurs, XCL1 est co-sécrété par les LT CD8 en compagnie d'autres chimiokines comme CCL3, CCL4 et CCL5 (Dorner et al., PNAS, 2002). Ces trois chimiokines sont connues pour leur rôle de chimioattraction, mais un rôle costimulateur a également été mis en évidence (Molon et al., Nat Immunol, 2005). De plus, en réponse à une infection par la bactérie intracellulaire *Listeria monocytogenes*, la sécrétion de CCL3 par les LT CD8 active la production de TNF α par des phagocytes mononucléés, induisant à son tour la production de radicaux libres oxygénés par ces cellules et les neutrophiles (Narni-Mancinelli et al., J Exp Med, 2007).

3- Phase de contraction et génération des LT CD8 mémoires

3.1 La contraction de la réponse

Une fois le pathogène éliminé, 90 à 95% des LT CD8 meurent par apoptose au cours d'une phase appelée contraction clonale (Pellegrini et al., PNAS, 2003). Si la corrélation temporelle entre l'élimination du pathogène et la contraction de la réponse a longtemps laissé penser que l'organisme disposait d'un moyen de « détecter » que le danger avait disparu, il apparaît finalement qu'il n'en est rien : Badovinac et collègues montrent ainsi en 2004 que le traitement de souris infectées par *Listeria monocytogenes* par un antibiotique ne modifiait pas la cinétique de la contraction de la réponse (Badovinac et al., Nat Immunol, 2004). Plusieurs études suggèrent en revanche que le déclenchement de la contraction est dépendant de signaux détectés précocement au cours de l'activation des LT CD8, tels l'inflammation (Badovinac et al., Nat Immunol, 2004 ; Pearce et al., J Immunol, 2007), et le signal TCR dont la force, la durée et l'affinité influence la taille de la population générée. Ainsi, l'étude de Zehn et collègues montre que les LT CD8 activés suite à une interaction TCR-CMH/p de forte affinité survivent plus longtemps, et initient donc la phase de contraction plus tardivement (Zehn et al., Nature, 2009).

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ce phénomène de contraction. La première indique que la taille de la population générée au pic de la réponse immunitaire limiterait l'accès aux cytokines de survie (Fischer et al., PNAS, 2008 ; Strasser et al., Trends Immunol, 2004 ; Vella et al., PNAS, 1998 ; Yajima et al., J Immunol, 2006). Ainsi, l'injection d'IL-2 ou d'IL-15 au cours de la contraction augmente la survie des LT CD8 (Blattman et al., Nat Med, 2003 ; Yajima et al., J Immunol 2006). Une étude récente est cependant venue contester le rôle de la compétition dans la phase de contraction, suggérant que si l'injection de certaines cytokines pendant la phase de contraction pouvait augmenter la survie des LT CD8, la compétition pour l'accès à ces molécules n'avait pas de lien direct avec la mort cellulaire (Prlic et al., PNAS, 2008). En effet, l'augmentation « artificielle » du nombre de cellules effectrices au pic de la réponse n'a pas d'influence directe sur la cinétique de la contraction. Au contraire, cette étape serait contrôlée précocement au moment de l'activation, potentiellement par la génération de deux populations d'effecteurs : l'une composée de précurseurs de cellules mémoires à longue vie, l'autre composée d'effecteurs à un stade

terminal de différenciation et très sensible à l'apoptose (Kaech et al., Nat Immunol, 2003 ; Joshi et al., Immunity, 2007). Nous reviendrons sur cette hypothèse par la suite.

Les mécanismes moléculaires contrôlant la phase de contraction des LT CD8 sont encore largement controversés. Si le mécanisme de mort cellulaire induite par l'activation (AICD) a longtemps été présenté comme le mécanisme principal régulant cette phase, l'inactivation de gènes contrôlant ce mécanisme a montré *in vivo* que sa contribution était mineure (Nguyen et al., Eur J Immunol, 2000). Il a par ailleurs été montré que cette phase était indépendante des caspases (Nussbaum et al., J Immunol, 2004) et que la surexpression de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl-x_L n'avait pas d'effet (Petschener et al., Eur J Immunol, 1998). En revanche, le rôle de Bim, membre de la famille des protéines anti-apoptotiques de type Bcl-2, est documenté. En effet, *in vivo*, l'inactivation de Bim inhibe le déroulement de la phase de contraction (Pellegrini et al., PNAS, 2003 ; Wojciechowski et al., Eur J Immunol, 2006). Par ailleurs, les interactions TCR-CMH/p de haute affinité induisent l'expression de MCL-1, membre de la famille des protéines anti-apoptotiques, ce qui neutralise la molécule pro-apoptotique Noxa, retardant l'entrée en phase de contraction des cellules ayant été activées suite à de telles interactions (Wensveen et al., Immunity et al., 2010).

3.2 Propriétés des LT CD8 mémoires

Suite à la phase de contraction perdure une population de LT CD8 particuliers : les LT CD8 mémoires. Ces cellules, impliquées dans la protection de l'organisme contre des réinfections, ont la capacité de répondre de façon plus rapide et plus forte suite à un nouveau challenge. Ces capacités particulières trouvent leur origine dans l'amélioration d'un certain nombre de paramètres quantitatifs et qualitatifs.

3.2.1 Les LT CD8 mémoires sont présents en fréquence plus importante que les LT CD8 naïfs

Une des premières propriétés des cellules mémoires est d'être présentes en fréquence plus importante que les LT CD8 naïfs (Ahmed et al., Science, 1996 ; Blattman et al., J Exp

Med, 2002). Ainsi, lors d'une nouvelle rencontre avec l'antigène, les LT CD8 mémoires subissent une expansion plus rapide que les LT CD8 naïfs (Pihlgren et al., Int Immunol, 1999 ; Cho et al., PNAS, 1999). Cela a également pour origine une accélération du cycle cellulaire dans les cellules mémoires (Veiga-Fernandes et al., Nat Immunol, 2000).

3.2.2 Les LT CD8 mémoires ont des fonctions améliorées

Les LT CD8 mémoires exercent un certain nombre de fonctions effectrices plus rapidement que les LT CD8 naïfs, ce qui a pour conséquence un contrôle plus rapide de l'infection. Si la sécrétion de cytokines comme le TNF α , CCL3 ou CCL4 n'est pas modifiée de manière significative par rapport aux cellules naïves, CCL5, l'IFN γ et XCL1 sont sécrétés plus rapidement suite à une stimulation antigénique (Walzer et al., J Immunol, 2003 ; Bachmann et al., EJI, 1999 ; Cho et al., PNAS, 1999 ; Pihlgren et al., Int Immunol, 1999 ; Kersh et al., J Immunol, 2006 ; Northrop et al., J Immunol, 2008). Par exemple les LT CD8 mémoires secrètent CCL5 en 20 minutes après stimulation du TCR tandis que les LT CD8 naïfs le produisent plusieurs jours après (Walzer et al., J Immunol, 2003 ; Bachmann et al., EJI, 1999 ; Cho et al., PNAS, 1999 ; Pihlgren et al., Int Immunol, 1999). Ce processus de « mémorisation » des fonctions effectrices fait intervenir des modifications épigénétiques : ainsi, il est connu que les LT CD8 mémoires contiennent des stocks d'ARNm codant pour CCL5, permettant une traduction et une sécrétion très rapide (Marçais et al., Eur J Immunol, 2006). En ce qui concerne l'IFN γ , la sécrétion rapide par les LT CD8 mémoires a pour origine une modification du niveau de méthylation du gène. En effet Kersh et collègues montrent en 2006 que si le gène *ifng* est fortement méthylé dans les cellules naïves, il ne l'est que partiellement dans les cellules mémoires. Par ailleurs, le gène est très rapidement déméthylé dans les cellules mémoires suite à une activation, permettant une transcription très rapide du gène (Kersh et al., J Immunol, 2006). Une autre étude publiée par Northrop et collègues montre qu'une augmentation du niveau d'acétylation des histones au niveau du gène *ifng* joue un rôle dans la sécrétion rapide de cette cytokine par les LT CD8 mémoires (Northrop et al., J Immunol, 2008).

Il est de plus connu que les LT CD8 mémoires peuvent être stimulés indépendamment du TCR, de façon semblable à des cellules du système inné comme les NK : la combinaison d'IL-12/IL-18 stimule en effet la sécrétion d'IFN γ *in vitro* et *in vivo* (Berg et al., Eur J

Immunol, 2002 ; Berg et al., J Exp Med, 2003). Cela a notamment pour origine une forte expression des récepteurs de l'IL12 et de l'IL18 par les cellules mémoires (Berg et al., J Exp Med, 2003).

Plusieurs études ont montré que l'efficacité de la protection conférée par les cellules mémoires est directement liée à leur polyfonctionnalité, c'est à dire au nombre de cytokines et chimiokines différentes qu'elles sont capables de sécréter en réponse à une activation (Precopio et al., J Exp Med, 2007 ; Darrah et al., Nat Med, 2007, Beveridge et al., EJI, 2007), ainsi que l'affinité TCR-CMH/p (Moutaftsi et al., Eur J Immunol, 2009). Ainsi, l'étude de Darrah et collègues montre que les LT CD4 mémoires générés en réponse à une vaccination par un antigène leishmanial (MLL) et un ligand de TLR-9 (CpG) sont bon protecteurs contre un challenge avec *Leishmania major*, et que cela est directement corrélé avec leur capacité à co-produire diverses cytokines telles que le TNF α , l'IFN γ et l'IL2 (Darrah et al., Nat Med, 2007). Diverses études ont de plus associé la polyfonctionnalité des LT CD8 mémoires ainsi que l'avidité de leur TCR pour des antigènes viraux avec une bonne protection contre le virus HIV (Betts et al., Blood, 2006 ; Almeida et al., J Exp Med, 2007). Enfin, des vaccins efficaces contre le virus Vaccinia comme le MVA (Modified Virus Ankara) et Dryvax, ou le vaccin BCG (vaccin Bilié de Calmette et Guérin) génèrent une importante population de LT CD8 mémoires polyfonctionnels (Precopio et al., J Exp Med, 2007 ; Beveridge et al., Eur J Immunol, 2007).

Enfin, concernant leurs capacités cytotoxiques, certaines études suggèrent que les LT CD8 mémoires tuent leurs cibles très rapidement (Cho et al, PNAS, 1999 ; Barber et al., J Immunol, 2003), d'autres suggèrent que les LT CD8 naïfs et mémoires éliminent les cibles à la même vitesse (Bachmann et al., Eur J Immunol, 1999).

3.3 Les LT CD8 mémoires sont hétérogènes

3.3.1 T_{CM}/T_{EM} : première mise en évidence de l'hétérogénéité des LT CD8 mémoires

Les premières évidences de la diversité des cellules mémoires CD8 sont rapportées par Sallusto et Lanzavecchia en 1999 qui décrivent *in vitro* chez l'homme l'existence de deux

populations mémoires : les mémoires effectrices (T_{EM}) et les mémoires centrales (T_{CM}). Les auteurs distinguent ces deux populations notamment sur la base de leur phénotype : les T_{CM} expriment CCR7 et CD62L tandis que les T_{EM} n'expriment que de faibles niveaux de ces molécules impliquées dans la résidence dans les organes lymphoïdes secondaires, suggérant que ces deux populations ont des capacités migratoires différentes (Sallusto et al., Nature, 1999). Cette hypothèse a par la suite été vérifiée *in vivo* chez la souris par plusieurs études (Masopust et al., Science, 2001 ; Wherry et al., Nat Immunol, 2003).

Les T_{CM} sont localisés principalement dans les ganglions tandis que les T_{EM} sont localisés principalement dans les tissus périphériques. Les deux populations sont également retrouvées au niveau de la rate et du sang. Nous verrons par la suite que ces deux populations expriment également des marqueurs spécifiques de tissus lorsqu'ils migrent vers des organes périphériques tels que la peau, les poumons, le foie ou les muqueuses.

Par ailleurs, ces deux populations ont des fonctions effectrices différentes (Sallusto et al., Nature, 1999 ; Masopust et al., Science, 2001) (figure 5). En effet, Si les T_{EM} et les T_{CM} produisent des quantités semblables d'IFN γ et de TNF en réponse à une stimulation antigénique, une fraction plus importante de T_{CM} produit de l'IL-2 (MacLeod et al., PNAS, 2008 ; Ravkov et al., J Immunol, 2003). Cette capacité pourrait expliquer que les T_{CM} sont capables de proliférer de façon importante en réponse à un pathogène et ont d'importantes capacités de prolifération homéostatique, à la différence des T_{EM} . En revanche, les T_{EM} ont une activité cytolytique *ex vivo* plus importante que celle des T_{CM} . Cela est notamment dû à une expression plus importante de la perforine par ces cellules, mais également au maintien de stocks d'ARNm codant pour des protéines cytolytiques comme Gzm-B (Mintern et al., J Immunol, 2007), permettant leur traduction très rapide suite à une stimulation.

Les différences entre ces deux populations suggèrent qu'elles répondent différemment lors d'un challenge secondaire : du fait du déclenchement très rapide de leurs fonctions et de leur localisation, les T_{EM} seraient capables de répondre immédiatement à un challenge infectieux, tandis que les T_{CM} seraient capables de répondre plus tardivement mais de façon plus prolongée grâce à leurs propriétés d'auto-renouvellement (Hikono et al., Immunological Review, 2006).

En 2005, le groupe de Woodland démontre que les T_{CM}/T_{EM} de rate isolés un an après une infection primaire par le virus Sendai étaient plus efficaces que les mêmes cellules isolées 1 mois après infection pour éliminer un pathogène, mettant en évidence une évolution des capacités effectrices des LT CD8 mémoires au cours du temps, indépendamment du

- Production d'IL-2
- Prolifération homéostatique
- Résidence dans les organes lymphoïdes secondaires
- Longévité

T_{CM}



T_{EM}

- Fonctions effectrices immédiates
- Résidence en périphérie
- Faible prolifération homéostatique

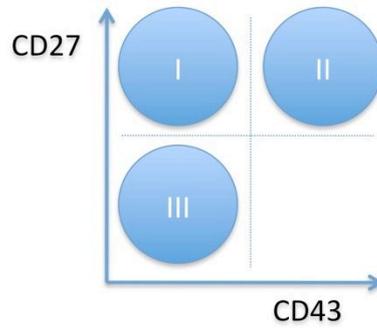
Figure 5 : Principales propriétés des T_{EM} et des T_{CM}

phénotype T_{CM}/T_{EM} (Roberts et al., J Exp Med, 2005). Cela les a conduits à chercher d'autres marqueurs identifiant les populations mémoires « efficaces ».

3.3.2 CD43 et CD27 identifient des populations mémoires ayant des capacités de prolifération différentes en réponse secondaire

La répartition des cellules mémoires en T_{CM} et T_{EM} étant peu indicatrice de l'efficacité de la réponse mémoire, Hikono et Woodland ont recherché, dans un modèle d'infection respiratoire, de nouveaux marqueurs permettant d'identifier différentes populations mémoires en fonction de leur capacité à répondre à une infection secondaire (Hikono et al., J Exp Med, 2007). Ils proposent en 2007 l'utilisation des marqueurs CD43 et CD27 pour définir trois populations : $CD27^{hi}/CD43^{hi}$, $CD27^{hi}/CD43^{lo}$, $CD27^{lo}/CD43^{lo}$ (Figure 6). Si ces trois populations présentent des différences d'expression de marqueurs de sénescence comme KLRG1 et de prolifération homéostatique (figure 6), Hikono et Woodland démontrent que la population $CD27^{hi}/CD43^{lo}$ est la plus performante pour se diviser et coloniser le site de l'infection lors d'une immunisation locale de rappel : en effet, en réalisant des expériences de co-transfert, les auteurs montrent que la population $CD27^{hi}/CD43^{lo}$ prolifère de façon beaucoup plus importante que les deux autres en réponse à une seconde infection par le virus Sendai (figure 6).

Le phénotype de ces trois populations mémoires est totalement indépendant des marqueurs utilisés pour discriminer les T_{CM} des T_{EM} : les proportions des cellules mémoires $CD27^{hi}/CD43^{hi}$, $CD27^{hi}/CD43^{lo}$ et $CD27^{lo}/CD43^{lo}$ au sein de ces deux populations est identique. Elle n'est pas basée sur des propriétés migratoires ou des fonctions effectrices différentes, mais permet d'isoler des populations ayant des capacités différentes à répondre à une seconde infection. Par ailleurs, elle permet d'avancer une explication simple à l'augmentation de l'efficacité de la réponse mémoire avec le temps (Roberts et al., J Exp Med, 2005) : en effet, Hikono et Woodland montrent que la proportion de ces trois populations change, les populations doubles positives et doubles négatives disparaissant petit



	Granzyme (steady-state)	KLRG1	Prolifération homéostatique	Réponse secondaire
I (CD43 ^{low} CD27 ^{hi})	low	low	++	+++
II (CD43 ^{hi} CD27 ^{hi})	low	low	+++	++
III (CD43 ^{low} CD27 ^{low})	high	high	+	+

Figure 6 : Propriétés des trois populations mémoires identifiées selon leur phénotype CD43/CD27

à petit au profit de la population CD27^{hi}/CD43^{lo}, meilleure répondeuse (Hikono et al., J Exp Med, 2007).

3.3.3 Autres marqueurs exprimés de façon hétérogène par les LT CD8 mémoires

Derrière les deux nomenclatures précédentes se cache une importante diversité en termes de phénotype, de fonctions, et d'homéostasie des LT CD8 mémoires. Le site d'infection et de réplication du pathogène ainsi que les conditions d'activation des LT CD8 naïfs en réponse primaire influencent fortement les caractéristiques des LT CD8 mémoires générés.

LT CD8 mémoires générés dans un contexte d'infection chronique

En cas d'infection chronique, les stimulations répétées dont font l'objet les LT CD8 conduisent à un phénotype particulier de cellules sénescents à faibles capacités de réponse. En effet, on observe chez les cellules stimulées de façon chronique une diminution des capacités de prolifération, de cytotoxicité et de production de cytokines (Lieberman et al., Blood, 2001 ; shin et al., Curr opin Immunol, 2007 ; Wherry et al., Immunity, 2007). Par ailleurs, le phénotype des cellules mémoires est profondément affecté. L'expression de nombreux marqueurs est modifiée dans des modèles d'infection virale chronique : ainsi l'expression de trois récepteurs inhibiteurs, PD-1, Lag-3 et 2B4, est augmentée, tandis que celle de CD124 et CD127, chaînes α des récepteurs à l'IL-4 et à l'IL-7, est diminuée (Day et al., Nature, 2006 ; Wherry et al., Virology, 2006 ; Wherry et al., Immunity, 2007). Nous verrons que cela s'accompagne d'une modification des mécanismes de maintien de l'homéostasie de ces cellules.

LT CD8 mémoires générés dans un contexte de réponse inflammatoire stérile

Récemment, des cellules mémoires générées dans un contexte d'hypersensibilité de contact, les LT CD8 mémoires inflammatoires (T_{IM}), ont été décrites dans l'équipe. Ces cellules sont à un état de différenciation intermédiaire entre LT CD8 naïfs et mémoires : elles expriment les marqueurs membranaires CD44 et CD122 et les facteurs de transcription Eomes

et T-bet à des niveaux intermédiaires. Elles ont également des fonctions effectrices intermédiaires entre cellules naïves et cellules mémoires, notamment en terme de sécrétion de CCL5 et d'IFN γ . Enfin, elles sont capables de participer à une réponse antivirale (Mbitikon-Kobo et al., J Immunol, 2009 ; Jubin et al., en préparation).

Les LT CD8 mémorisent le site de l'infection

Si l'expression de certains marqueurs impliqués dans les capacités migratoires des cellules comme CD44, LFA-1, VLA-4 et PSGL-1 est uniformément augmentée à la surface des LT CD8 mémoires par rapport aux LT CD8 naïfs, les LT CD8 mémoires situés en périphérie expriment à leur surface un certain nombre de marqueurs spécifiques du tissu dans lequel ils ont été générés, leur conférant des propriétés migratoires particulières (Sanders et al., J Immunol, 1998 ; Shimizu et al., Nature, 1990 ; Hirata et al., J Exp Med, 2000 ; Bonder et al., Blood, 2006 ; Ostermann et al., Nat Immunol, 2002).

Ainsi, les LT CD8 mémoires résidant dans la peau expriment un ligand particulier des P- et E-selectines, le CLA (Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen) (Fuhlbrigge et al., Nature 1997). Ils expriment également CCR4 et/ou CCR10 qui interagissent respectivement avec CCL17 et CCL27, tous deux associés au derme (Campbell et al., Nature, 1999 ; Reiss et al., J Exp Med, 2001). En revanche, les LT CD8 qui résident dans l'épithélium intestinal expriment à leur surface CCR9, capable d'interagir avec CCL25 sécrété par l'épithélium intestinal, et l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, interagissant avec MADCAM1 (Zabel et al., J Exp Med, 1999 ; Kunkel et al., J Exp Med, 2000 ; Berlin et al., Cell, 1993 ; Lefrançois et al., J Exp Med, 1999). Les LT CD8 mémoires gardent cependant une certaine plasticité : Mora et Von Adrian ont ainsi montré que les DC résidant dans la peau ou dans les intestins pouvaient « reprogrammer » les LT CD8 mémoires lors d'un challenge secondaire (Mora et al., J Exp Med, 2005).

Les mécanismes permettant l'acquisition de ces propriétés migratoires sont partiellement connus. L'acquisition de ce phénotype est dépendante de l'environnement dans lequel sont générées les cellules mémoires et non du pathogène impliqué : les DC, mais également les tissus périphériques (par le biais de la sécrétion d'acide rétinoïque), et les cellules stromales des organes lymphoïdes secondaires ont un rôle important dans le modelage des capacités migratoires des cellules (Jiang et al., J virol, 2008 ; Campbell et al., J

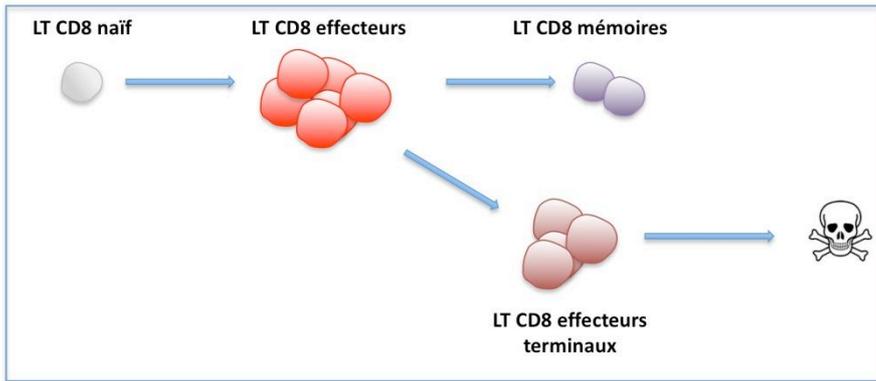
Exp Med, 2002 ; Mora et al., Nature, 2003 ; Edele et al., J Immunol, 2008 ; Ahrendt et al., J Immunol, 2008).

3.4 Différenciation en cellules mémoires

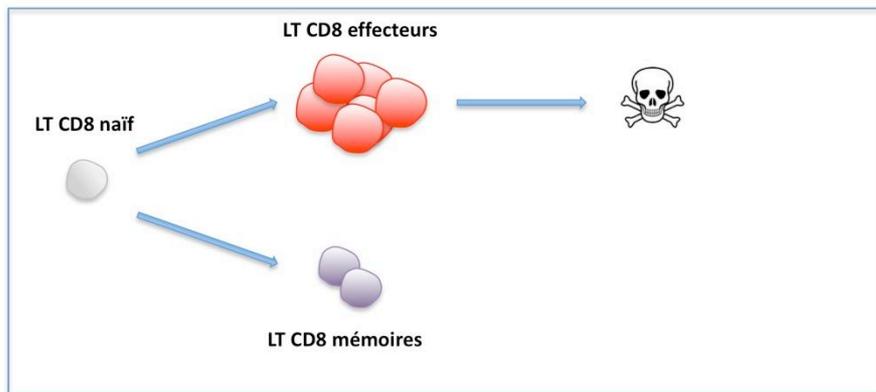
Divers modèles ont été proposés pour tenter d'expliquer la différenciation des LT CD8 mémoires. Une importante question a été de déterminer si les LT CD8 mémoires se différencient à partir de précurseurs présents dans la population de LT CD8 effecteurs (modèle linéaire : figure 7, modèle A) ou si l'activation des LT CD8 naïfs induit la différenciation d'une population d'effecteurs et d'une population de LT CD8 mémoires ne passant pas par un stade effecteur (modèle ramifié : figure 7, modèle B).

De nombreuses études ont montré que la population d'effecteurs contenait les précurseurs de la future population mémoire (Huster et al., PNAS, 2004 ; Jacob et al., Nature, 1999 ; Kaech et al., Nat Immunol, 2003 ; Kaech et al., Immunity, 2007 ; Sarkar et al., J Exp Med, 2008). En 1999, Jacob et collaborateurs mettent au point un système de souris transgéniques dans lequel le gène rapporteur *plap* est mis sous le contrôle du promoteur du gène *gzmB*. En utilisant ce système, Jacob et collaborateurs mettent en évidence que tous les LT CD8 activés expriment Gzm-B et passent donc par une phase effectrice (Jacob et al., Nature, 1999). Cela implique donc que les LT CD8 mémoires sont dérivées de cellules effectrices, bien qu'un marqueur spécifique de ces précurseurs ne soit alors pas identifié.

S'il est clair depuis un certain nombre d'années que les LT CD8 mémoires sont hétérogènes, la communauté scientifique a commencé il y a peu à apprécier la diversité des LT CD8 effecteurs. Il est à présent connu que cette diversité apparaît rapidement au cours de la réponse immunitaire : 4 jours après activation, plusieurs marqueurs sont exprimés de façon hétérogène au sein de ces cellules. Le premier marqueur de précurseurs de LT CD8 mémoires à avoir été proposé est l'IL-7R (Kaech et al., Nat Immunol, 2003 ; Huster et al., PNAS, 2004 ; Schluns et al., Nat Immunol, 2000). Les LT CD8 naïfs et mémoires expriment ce récepteur,



A : modèle de différenciation linéaire



B : modèle de différenciation ramifiée

Figure 7 : modèles de différenciation des LT CD8 mémoires

l'IL-7 participant d'ailleurs au maintien de leur homéostasie (voir partie II). Suite à une infection, l'expression de l'IL-7R est inhibée en 48 heures, et seule une petite proportion des LT CD8 effecteurs l'expriment de nouveau environ 8 jours après l'activation (Kaech et al., Nat Immunol, 2003). Ces cellules IL-7R^{high} ont des fonctions effectrices (IFN γ , Gzm-B) similaires à celles des cellules IL-7R^{low}; cependant, elles ont un phénotype similaire à celui des LT CD8 mémoires ainsi que des capacités d'auto-renouvellement et de réponse à un nouveau challenge supérieures aux cellules IL-7R^{low}. Enfin, comme le suggèrent des expériences de transfert adoptif, les cellules IL-7R^{high} ont un potentiel de génération de LT CD8 mémoires plus important que les cellules IL-7R^{low} (Kaech et al., Nat Immunol, 2003).

Cette première identification a permis le développement d'un modèle de différenciation des LT CD8 mémoires, basé sur l'intervention d'une première division asymétrique des LT CD8 activés. Il a également permis l'identification de précurseurs des cellules mémoires au sein de la population effectrice.

3.4.1 La décision Mémoire/Effecteur est faite après la première division des LT CD8 naïfs

En 2007, Chang et Reiner proposent un modèle selon lequel l'activation des LT CD8 naïfs par une APC engendrerait une première division asymétrique (figure 8). Lors de la formation de la synapse, la cellule se polariserait, la synapse se situant au pôle apical. Au cours de la première division, la cellule fille dérivant du pôle apical (ou cellule proximale) se différencierait en cellule effectrice, tandis que la cellule fille du pôle basal (ou cellule distale) se différencierait en cellule mémoire. Ils constatent en effet que la cellule distale est de petite taille et a un contenu enrichi en marqueurs mémoires tels que l'IL7R et CD62L, tandis que la cellule proximale est de taille plus importante et a un contenu enrichi en molécules telles que CD25, CD43, CD44 et CD69. De plus, la cellule proximale exprime plus fortement les gènes codant pour Gzm-B et l'IFN γ (Chang et al., Science, 2007). Par ailleurs, l'étude suggère que les cellules distales confèrent une meilleure protection à long terme que les cellules proximales. Ce phénomène de ségrégation différentielle des protéines suite à la première division suggère donc que le devenir des LT CD8 est fixé très tôt dans la réponse, au moment de la première division cellulaire.

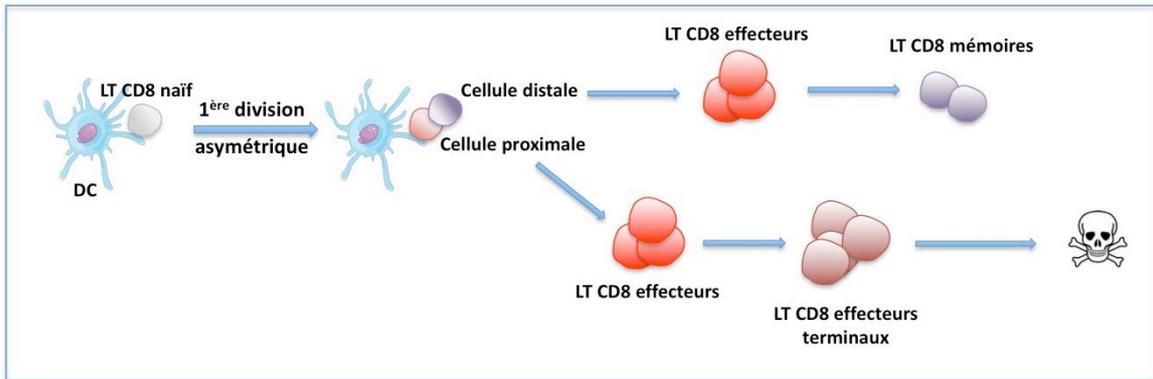


Figure 8 : Modèle de différenciation de Chang et Reiner

3.4.2 L'activation des LT CD8 naïfs génère des cellules ayant différents potentiels mémoires

En 2007 et 2008, deux études de Joshi et Sarkar mettent en évidence l'existence d'un nouveau marqueur isolant deux populations de LT CD8 activés ayant différents potentiels de différenciation en LT CD8 mémoires : KLRG1 (Joshi et al., *Immunity*, 2007 ; Sarkar et al., *J Exp Med*, 2008). En effet, suite à l'activation, deux populations se différencient rapidement (environ 4/5 jours) en réponse au virus LCMV *in vivo* : une population KLRG1^{hi} et une population KLRG1^{int}. Ces deux populations cellulaires ont des fonctions effectrices similaires en terme de sécrétion d'IFN γ et de cytotoxicité. En revanche, la plupart des cellules KLRG1^{int} ré-expriment préférentiellement l'IL7R 9 jours après activation (Joshi et al., *Immunity*, 2007). Par ailleurs, la survie de ces deux populations est différente : des études de transfert adoptif de cellules KLRG1^{int} et KLRG1^{hi} montrent que ces dernières survivent moins bien à la phase de contraction que les cellules KLRG1^{int}. Cela suggère que les cellules KLRG1^{hi} ont un faible potentiel de différenciation en LT CD8 mémoires : elles sont appelées « cellules effectrices à durée de vie réduite » ou SLEC (Short-Lived Effector Cells). En revanche, les cellules KLRG1^{int} ont un potentiel de différenciation en cellules mémoires plus important et sont appelées « cellules effectrices précurseurs de mémoires » ou MPEC (Memory Precursor Effector Cells) (Figure 9). D'autres marqueurs des MPEC ont par la suite été proposés : ainsi, outre l'IL7R, CXCR3, CD27, CD28 ont une expression augmentée à la surface des MPEC (Kaech et al., *Immunity*, 2007 ; Joshi et al., *J Immunol*, 2008 ; Joshi et al., *Immunity*, 2007 ; Akondy et al., *J Immunol*, 2009). Par ailleurs, les SLEC sécrètent moins d'IL2, expriment plus faiblement la télomérase et expriment des niveaux plus faibles de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{kip} (Plunkett et al., *J Immunol*, 2007 ; Hand et al., *PNAS*, 2007 ; Henson et al., *Blood*, 2009).

IL est cependant nécessaire de préciser que la diversité des cellules effectrices et mémoires générées ne se limite pas à deux types cellulaires, et des phénotypes « hybrides » de type KLRG1^{lo}/IL7R^{lo} et KLRG1^{hi}/IL7R^{hi} sont décrits dans la littérature (Rubinstein et al., *Blood*, 2008 ; Obar et al., *PNAS*, 2010 ; Jabbari et al., *J Exp Med*, 2006 ; Masopust et al., *J Immunol*, 2006). Il semble donc qu'il existe des stades de différenciation intermédiaires entre SLEC et MPEC, au sein desquels la différenciation en cellules mémoires ou en effecteurs terminaux est incertaine. Ces deux dernières hypothèses permettent de proposer le schéma de différenciation décrit dans la figure 10.

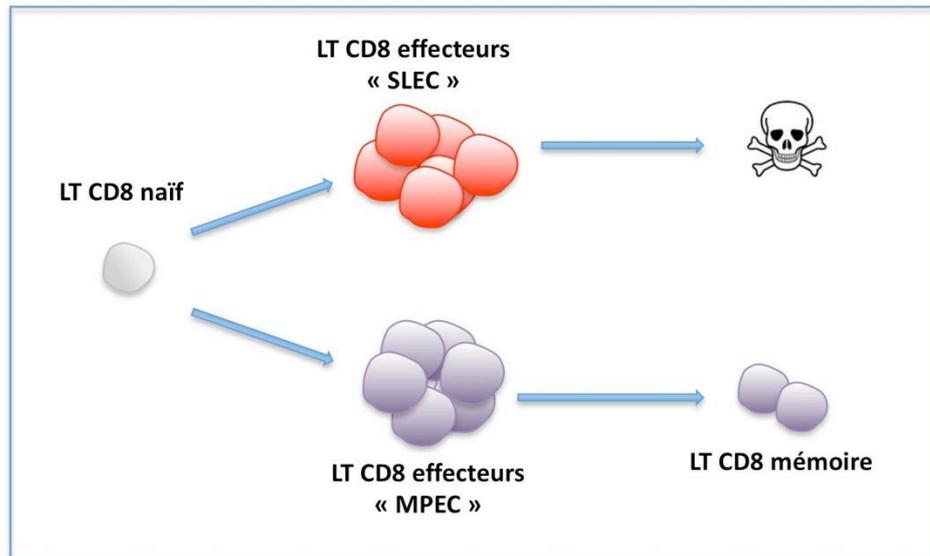


Figure 9 : Modèle de Joshi et Sarkar

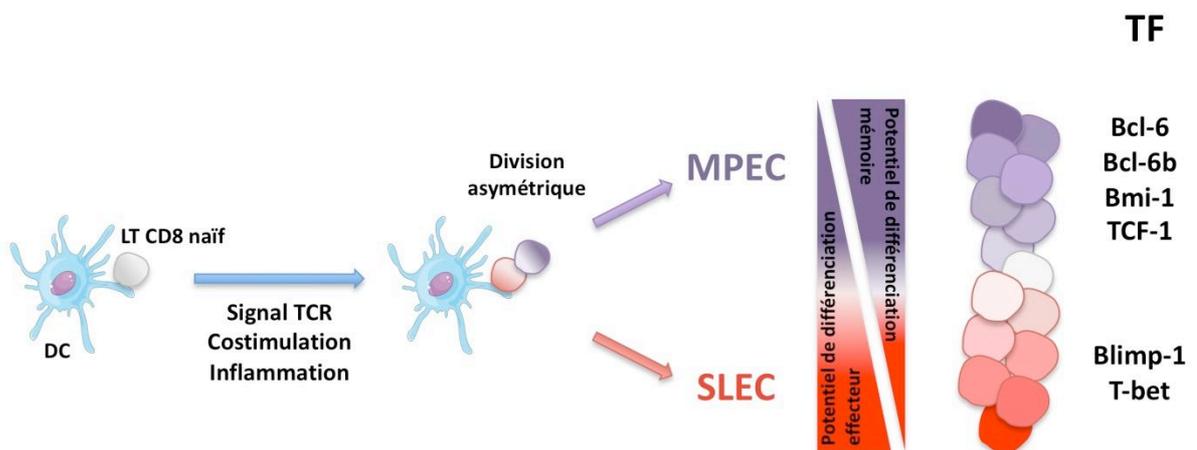


Figure 10 : Modèle hypothétique de différenciation des LT CD8 naïfs en cellules mémoires et facteurs de transcription (TF) impliqués

3.5 Origine des cellules mémoires

Ces différents modèles posent la question de la génération de cellules effectrices à potentiel mémoire hétérogène. Afin d'expliquer ce phénomène, il est nécessaire de revenir sur les conditions initiales d'activation des LT CD8. Il est en effet clair à présent que ces conditions déterminent largement le ratio SLEC/MPEC des LT CD8 effecteurs descendants : c'est l'intégration des signaux 1, 2 et 3 qui est à l'origine de la diversité de potentiel mémoire des LT CD8 effecteurs (figure 11).

Nous avons vu que les LT CD8 naïfs sont capables d'intégrer la force et la durée du signal TCR pour induire un programme de différenciation en LT CD8 effecteurs. Le rôle de la force de ce signal dans l'induction d'un programme de différenciation et la détermination du potentiel mémoire des LT CD8 effecteurs générés a été exposé dans une étude de Beuneu et collègues (Beuneu et al., J Exp Med, 2010). Dans cette étude, les auteurs s'intéressent au rôle de la force de l'interaction T/DC dans la génération des LT CD8 effecteurs. Ils utilisent pour cela un système de visualisation de la production d'IFN γ par des LT CD8 spécifiques pour le peptide OVA co-transférés avec des DC chargées avec différentes concentrations de peptide. Ils constatent ainsi que la capacité à produire de l'IFN γ des LT CD8 effecteurs est directement proportionnelle à la force du signal reçu lors de l'activation. L'étude montre par ailleurs que cette expression différentielle est acquise de façon très précoce, avant la première division cellulaire. Même si elle ne prend pas en compte les effets de probables stimulations répétées des LT CD8 ainsi que l'effet des signaux 2 et 3, cette étude renforce l'idée selon laquelle les conditions précoces d'activation des LT CD8 contribuent à la génération d'une population hétérogène d'effecteurs, et suggère que la force du signal TCR influence directement cette génération. Ces résultats sont à relier aux travaux de Zehn et collègues montrant que l'activation des LT CD8 suite à une interaction TCR-CMH/p de faible affinité génère une population mémoire plus importante que lorsque l'interaction est de forte affinité (Zehn et al. Nature, 2009).

Le signal costimulateur influence également la balance SLEC/MPEC : il a ainsi été montré qu'en absence de la molécule OX-40, la génération de MPEC et de LT CD8 mémoires en réponse à une infection par *Listeria monocytogenes* était réduite (Mousavi et al., J Immunol, 2008). De même, l'engagement de TLR-2 à la surface des LT CD8 naïfs en réponse au même type d'infection favorise la génération de LT CD8 mémoires (Mercier et al., en préparation). En revanche, Gisbergen et collègues ont récemment montré que l'engagement

chronique de CD70 induisait l'accumulation de cellules à un stade effecteur « épuisées » (« exhausted »), limitant la génération de cellules mémoires (Gisbergen et al., J Immunol, 2009).

Par ailleurs, il est à présent admis que l'environnement cytokinique dans lequel sont activées les cellules naïves a un rôle prépondérant dans la différenciation des cellules mémoires. Ainsi, l'étude de Joshi et collègues en 2007 montre que la quantité d'IL-12 présente dans le milieu lors de l'activation influence fortement la balance précurseur de mémoire/effecteur en favorisant la génération de SLEC (Joshi et al., Immunity, 2007). D'autres études basées notamment sur l'utilisation de souris déficientes pour les gènes *il12p35* et *lfn* montrent que la génération de cellules mémoires est augmentée lorsque l'inflammation est réduite lors de l'activation des LT CD8 naïfs (Pearce et al., J Immunol, 2007 ; Pham et al., J Immunol, 2009 ; Cui et al., Vaccine, 2009 ; Takemoto et al., J Immunol, 2006). Par ailleurs, une étude de Badovinac et Harty montre en 2005 que l'environnement inflammatoire influence également le temps de génération des cellules mémoires. En effet, l'immunisation de souris avec des DC chargées avec un peptide antigénique de *Listeria monocytogenes* induit la génération de cellules mémoires en 5 à 6 jours, accélérant ainsi fortement la transition des LT CD8 du stade effecteur au stade mémoire. Les auteurs montrent que cette accélération est due à une faible inflammation dans ces conditions d'activation, et notamment à une faible quantité d'IFN γ dans l'environnement (Badovinac et al., Nat Med, 2005). Ces résultats suggèrent donc également que la présence de signaux inflammatoires dans l'environnement des LT CD8 lors de l'activation influence fortement l'amplitude et la durée de la génération de cellules mémoires. De nombreux signaux environnementaux peuvent donc moduler le devenir d'une cellule naïve lors de son activation. C'est l'intégration de ces différents signaux qui module la balance précurseurs de mémoire/effecteurs.

Des études ont également montré que la stimulation du TCR et la « délivrance » de signaux inflammatoires doivent être simultanés afin d'induire la génération maximale de cellules effectrices (Sarkar et al., J Exp Med, 2008 ; Pham et al., J Immunol, 2009 ; Cui et al., Vaccine, 2009). En revanche, la diminution de la durée de l'infection diminue la génération de cellules effectrices au profit des mémoires (Pham et al., J Immunol, 2009 ; Sarkar et al., J Immunol, 2007). De plus, si la quantité d'antigènes présente lors de l'activation influence l'expansion des cellules activées, elle module également la quantité d'IFN γ présente dans l'environnement. Ainsi, de fortes concentration d'antigènes induisent la sécrétion de grandes

quantités d'IFN γ , favorisant la différenciation des cellules en effecteurs au détriment des cellules mémoires, et inversement.

Enfin, la communauté scientifique a longtemps spéculé sur le rôle des LT CD4 dans la génération des LT CD8 mémoires. Certaines études suggèrent que ces cellules sont importantes dans le maintien de la population mémoire et la réponse secondaire des LT CD8 mémoires (Sun et al., Nat Immunol, 2004 ; Janssen et al., Nature, 2003). Ces études montrent en effet qu'en absence de LT CD4, les LT CD8 mémoires sont générés normalement suite à une activation primaire, mais que leur nombre décroît ensuite progressivement et que leur prolifération est réduite en réponse secondaire. Le principal défaut des LT CD8 mémoires générés en absence de LT CD4 semble donc être un défaut de survie et/ou de prolifération. Deux études suggèrent que les LT CD4 pourraient agir en inhibant l'expression par les LT CD8 mémoires de la molécule pro-apoptotique TRAIL (Janssen et al., Nature, 2005 ; Hamilton et al., Nat Immunol, 2006). Nous verrons dans la deuxième partie que la réponse secondaire des LT CD8 mémoires pourrait être également dépendante de la présence d'IL-2 dans l'environnement en réponse primaire, cytokine produite en grandes quantités par les LT CD4.

3.6 Régulation transcriptionnelle et métabolique de la différenciation des LT CD8

Un grand nombre de facteurs de transcription ayant un rôle dans la génération de cellules effectrices et la différenciation des LT CD8 mémoires ont été décrits, principalement lors de ces dix dernières années. Les mécanismes régulateurs impliqués dans la différenciation des LT CD8 ainsi que leurs interactions sont encore largement inconnus.

3.6.1 T-bet/Eomes

T-bet et Eomes sont deux membres de la famille des facteurs de transcription à « boîte T », et leur rôle a été principalement décrit dans la régulation des fonctions effectrices des LT CD8 et leur différenciation en LT CD8 mémoires. Ainsi, la délétion du gène *tbx21* (codant pour la protéine T-bet) induit une diminution de la sécrétion d'IFN γ et de la cytotoxicité des

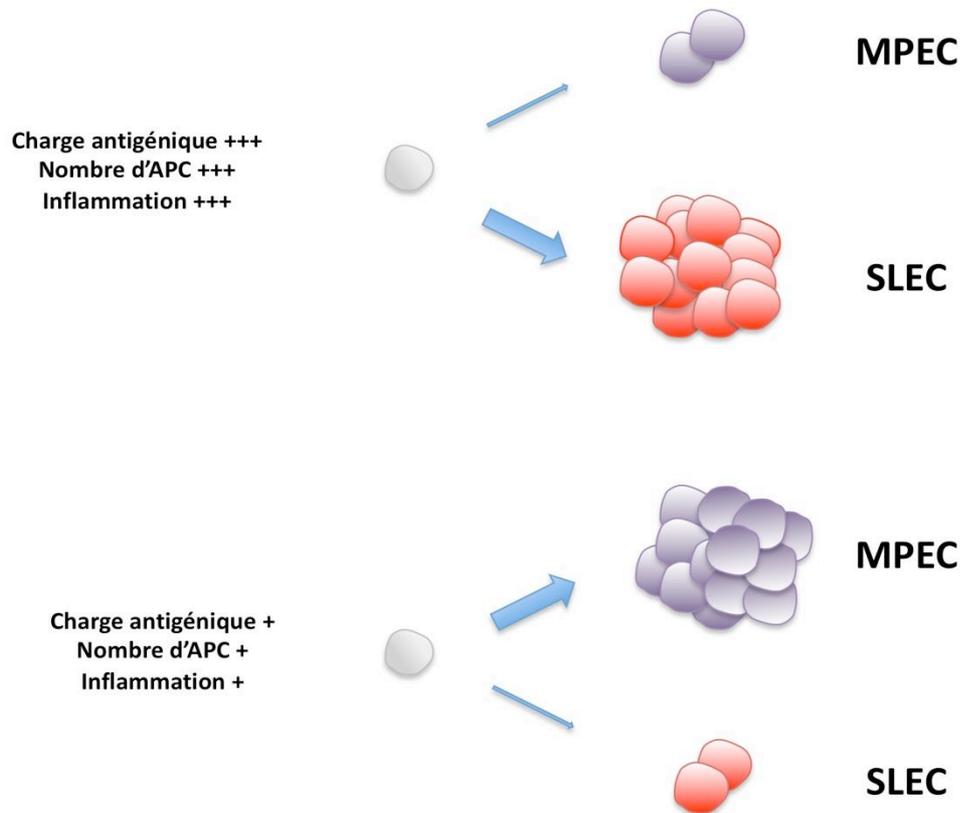


Figure 11 : Facteurs influençant la balance SLEC/MPEC. L'activation des LT CD8 résulte de l'intégration de différents facteurs environnementaux par la cellule. Ces facteurs modifient profondément la proportion de SLEC et de MPEC générés.

LT CD8 effecteurs en réponse à une stimulation *in vitro* (Sullivan et al., PNAS, 2003). *In vivo*, la délétion de *tbx21* inhibe la sécrétion d'IFN γ par les LT CD8 effecteurs en réponse à une infection par LCMV mais pas par *Listeria monocytogenes*, suggérant des mécanismes de régulation pathogène-dépendants (Way et al., J Immunol, 2004). L'étude du rôle d'Eomes dans la régulation des fonctions des LT a été rendue plus difficile par la létalité de la délétion du gène au stade embryonnaire (Mao et al., Development, 2008). Il est cependant connu que, à la différence de T-bet, la surexpression d'Eomes induit une augmentation de la sécrétion d'IFN γ et de l'expression des perforine et Gzm-B par les LT CD8 effecteurs (Pearce et al., Science, 2003).

Une étude d'Intlekofer et collègues montre en 2008 que ces deux facteurs de transcription coopèrent pour induire les fonctions effectrices de LT CD8. En utilisant des systèmes de KO conditionnel pour induire la délétion de l'expression de *tbx21*, d'*eomes*, ou des deux gènes, les auteurs montrent que la double délétion abroge totalement l'expression de l'IFN γ et la cytotoxicité des LT CD8 effecteurs répondant *in vivo* au virus LCMV (Intlekofer et al., Science, 2008). Cette inhibition s'accompagne du développement de caractéristiques proches des cellules T-helper17 (Th17 : LT CD4 impliqués dans le développement de réactions inflammatoires) : expression du facteur de transcription ROR γ T, sécrétion d'IL-17, d'IL-21, d'IL-22, et expression du récepteur de l'IL-23 (Intlekofer et al., Science, 2008). Par ailleurs, une autre étude d'Intlekofer et collègues montre en 2005 que les souris dont les gènes *tbx21* et *eomes* portent une mutation n'ont plus de NK ni de LT CD8 mémoires (Intlekofer et al., Nat Immunol, 2005). Cela est notamment dû au rôle important de ces deux facteurs de transcription dans la régulation de l'expression de CD122, chaîne β du récepteur de l'IL-15, cytokine ayant un rôle très important dans la régulation de l'homéostasie des LT CD8 mémoires (voir partie II).

Par ailleurs, T-bet semble déterminer la génération des LT CD8 mémoires très tôt dans la réponse immunitaire en influençant fortement la régulation de la balance MPEC/SLEC. En effet, nous avons vu que le degré d'inflammation de l'environnement lors de l'activation des LT CD8 influence fortement cette balance. Joshi et collègues montrent en 2007 que le niveau d'expression de T-bet par les LT CD8 lors de l'activation est directement influencé par la quantité d'IL-12 présente dans l'environnement, et qu'une forte expression de T-bet induit la génération d'effecteurs de type SLEC au détriment des MPEC (Joshi et al., Immunity, 2007). Ces données sont confirmées par l'étude d'Intlekofer et collègues en 2007 dans laquelle les auteurs mettent en évidence la répression de l'expression de l'IL-7R par T-bet (Intlekofer et

al., J Exp Med, 2007). T-bet a donc un rôle essentiel dans la régulation de la balance MPEC/SLEC. Intlekofer et collègues ont également montré dans cette étude que la délétion de *tbx21* réduisait la génération de T_{EM} au profit des T_{CM} suggérant de nouveau un rôle de T-bet dans le développement de cellules mémoires de type « effectrices » (Intlekofer et al., JEM, 2007).

Le rôle spécifique d'Eomes dans la génération des LT CD8 mémoire n'est pas bien connu. Une étude récente de Banerjee et collègues montre que la génération de T_{CM} est réduite dans des souris déficientes pour *eomes*, ce qui s'accompagne d'une faible diminution de la protection contre *Listeria monocytogenes* dans le foie mais pas dans la rate, ainsi que d'une diminution progressive du nombre de LT CD8 mémoires (Banerjee et al., J Immunol, 2010).

T-bet et Eomes agissent donc de façon coopérative pour induire les fonctions effectrices des LT CD8 et leur différenciation en cellules mémoires, T-bet favorisant la génération d'effecteurs à courte vie et de cellules mémoires de type T_{EM} tandis que Eomes favoriserait la génération de cellules mémoires de type T_{CM}.

3.6.2 Bcl-6/Blimp-1

Un autre couple de facteurs de transcription dont le rôle dans la régulation de la génération de cellules mémoires a été plus récemment mis en évidence est le couple Bcl-6/Blimp-1. Leur rôle et leur mécanisme d'action a été mis en évidence dans un premier temps dans le développement des centres germinatifs des lymphocytes B (LB) et des cellules plasmocytaires à longue durée de vie (Tunayaplin et al., J Immunol, 2004 ; Crotty et al., Nat Immunol, 2010) mais un certain nombre d'étude récentes ont mis en évidence leur rôle essentiel dans le développement des LT CD4 Tfh (Follicular Helper CD4 T cells) (Johnston et al., Science, 2009 ; Nurieva et al., Science, 2009 ; Yu et al., Immunity, 2009). Il est ainsi connu que les effets de ces deux facteurs de transcription sur le développement des LB sont antagonistes (Martins, Annu Rev Immunol, 2008).

En 2006, deux études ont suggéré un rôle important de Blimp-1 dans la différenciation des LT CD8. En effet, la délétion de *prdm1* (codant pour Blimp-1) dans un modèle de délétion conditionnelle, ou la mutation du domaine de fixation à l'ADN de Blimp-1 induit une

forte expansion des LT CD8 effecteurs et/ou mémoires en périphérie provoquant rapidement le développement d'une colite chez la souris (Martins et al., Nat Immunol, 2006 ; Kallies et al., Nat Immunol, 2006). Par la suite, deux études montrent que l'expression de Blimp-1 est observée principalement dans les LT CD8 effecteurs à vie courte et dans les T_{EM}, tandis que la délétion de *prdm1* dans les LT CD8 induit une forte différenciation de cellules MPEC puis des cellules mémoires de type T_{CM} (Rutishauser et al., Immunity, 2009 ; Kallies et al., Immunity, 2009). Par ailleurs, les LT CD8 déficients pour le gène *prdm1* ont des propriétés migratoires altérées, et une expression de protéines intervenant dans la cytotoxicité comme la perforine et Gzm-B plus faible, rendant la réponse immunitaire contre une infection par le virus influenza déficiente (Kallies et al., Immunity, 2009). Enfin, les LT CD8 effecteurs des souris déficientes pour le gène *prdm1* ont un profil d'expression de facteurs de transcription altéré, notamment concernant les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des LT CD8 mémoires. Ainsi, l'expression de T-bet est fortement diminuée tandis que celle de Bcl-6 est fortement augmentée (Rutishauser et al., Immunity, 2009).

Bcl-6 est un répresseur transcriptionnel dont le rôle dans la différenciation des LT CD8 a d'abord été décrit dans la génération et la maintenance des cellules mémoires. Ainsi, Ichii et collègues démontrent en 2002 que la délétion du gène *bcl6* induit une forte diminution de la population mémoire CD8 dans la rate, tandis que la surexpression de *bcl6* induit au contraire une forte augmentation de cette population (Ichii et al., Nat Immunol, 2002). Par ailleurs, à l'inverse de Blimp-1, Bcl-6 est plus fortement exprimé dans les T_{CM} que dans les T_{EM} (Ichii et al., J Immunol, 2004). Enfin, Bcl-6 est indispensable au développement des LT CD4 mémoires et capable de réprimer le locus génétique *gzmB* (Ichii et al., Int Immunol, 2007 ; Yoshida et al., Eur J Immunol, 2006). Les délétions de *prdm1* et *bcl6* semblent donc avoir des effets inverses sur le développement des LT CD8 effecteurs et mémoires, et il est probable que, comme chez les lymphocytes B (LB), les effets de ces deux facteurs de transcription soient antagonistes.

Enfin, un analogue de Bcl-6, Bcl-6b, semble également avoir un rôle dans le développement des propriétés des LT CD8 mémoire : en effet, Manders et collègue ont montré en 2005 que la délétion de *bcl6b* dans les LT CD8 n'affecte pas leur réponse primaire mais diminue fortement leur réponse secondaire (Manders et al., PNAS, 2005).

3.6.3 La voie Wnt/ β -caténine

Si le rôle de cette voie dans le développement des LT immatures est déjà documenté (Van de Wetering, Cell, 2002), son rôle dans le développement des LT CD8 matures n'a été décrit que très récemment. La voie de signalisation Wnt est bien caractérisée : l'activation de cette voie inhibe la dégradation des β -caténines cytosoliques par le protéasome et permet leur translocation dans le noyau. Elles peuvent y interagir avec des facteurs de transcription comme LEF-1 et TCF-1 afin d'activer les gènes cibles de la voie de Wnt. En l'absence de signalisation par cette voie, LEF-1 et TCF-1 agissent comme inhibiteurs de l'expression de ces gènes, notamment par le biais du recrutement de répresseurs transcriptionnels comme la protéine Groucho (Reya et al., Nature, 2005 ; Hurlstone et al., EMBO, 2002 ; MacDonald et al., Dev Cell, 2009).

En 2006, une étude par Willinger et collègues montre que l'expression de LEF-1 et TCF-1 est régulée par l'engagement du TCR, suggérant que la voie de Wnt pourrait jouer un rôle dans la différenciation des LT CD8 matures (Willinger et al., J Immunol, 2006). En 2009, Gattinoni et collègues montrent que l'activation de la voie Wnt/ β -caténine lors du priming de LT CD8 naïfs inhibe la prolifération et la différenciation de LT CD8 effecteurs, et induit la génération de cellules mémoires « multipotentes » qu'ils nomment « cellules souches mémoires » (T_{SCM}), ayant de meilleures capacités de réponse secondaire lors d'un second challenge tumoral (Gattinoni et al., Nat Med, 2009).

Une autre étude très récente par Jeannet et collègues suggère que cette voie pourrait influencer la balance SLEC/MPEC suite à une infection par LCMV (Jeannet et al., PNAS, 2010). Dans leur modèle, la réponse primaire des LT CD8 de souris déficientes pour le gène *tcf7* (codant pour la protéine TCF-1) ne semble pas altérée. En revanche, leur réponse secondaire apparaît fortement diminuée, notamment en terme d'expansion cellulaire. Cela est notamment dû à la très faible fréquence de cellules de types MPEC générées en réponse primaire, comme le montre la très forte proportion de cellules KLRG1^{high} présentes. Cela s'accompagne d'une très faible proportion de T_{CM} 50 jours après infection. TCF-1 semble donc avoir un rôle important dans la régulation de la balance SLEC/MPEC.

D'autre part, le rôle de la voie de Wnt et de TCF-1 dans la régulation de l'expression d'Eomes et de l'homéostasie des LT CD8 mémoires a été très récemment décrit dans un modèle d'infection par *Listeria monocytogenes* (Zhou et al., Immunity, 2010). En effet, dans

ce modèle, les LT CD8 déficients pour le gène *tcf7* ont une réponse primaire en partie altérée, et les LT CD8 mémoires générés ont de très faibles capacités de prolifération homéostatique, ce qui a pour origine une expression diminuée de CD122, chaîne β du récepteur à l'IL-15. L'étude montre que la voie de Wnt/TCF-1 est nécessaire pour induire l'expression d'Eomes par les LT CD8 lors de la réponse immunitaire. En absence de signal Wnt, l'expression d'Eomes, facteur important pour l'expression de CD122, est fortement diminuée.

Il apparaît donc que la voie Wnt/ β -caténine joue un rôle important à différents stades de la différenciation des LT CD8, que ce soit lors de la réponse primaire ou dans l'homéostasie des LT CD8 mémoires générés.

3.6.4 Autres facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des LT CD8 mémoires

Il existe une diversité importante de facteurs de transcription dont l'implication dans la génération des LT CD8 mémoires est plus ou moins bien documentée.

Le rôle d'Id2 a récemment été mis en évidence dans la différenciation des LT CD8 mémoires. Ainsi, Cannarile et collègues montrent en 2006 que l'expression d'Id2 est augmentée dans les LT CD8 effecteurs et maintenue dans les LT CD8 mémoires (Cannarile et al., Nat Immunol, 2006). La réponse primaire des LT CD8 *Id2*^{-/-} débute par une prolifération normale puis la dérégulation de certaines molécules impliquées dans l'apoptose comme Bcl-2 et Bim induit la mort progressive des cellules générées. Cela a pour conséquence la diminution de la génération de cellules effectrices et mémoires et l'incapacité pour la souris de contrôler une infection par *Listeria monocytogenes* (Cannarile et al., Nat Immunol, 2006).

Un autre facteur de transcription récemment décrit est Bmi-1 (Heffner et Fearon, PNAS, 2007). Les auteurs montrent que ce facteur de transcription est rapidement exprimé suite à l'engagement du TCR. Ils utilisent ensuite un système de surexpression ou d'inhibition par ARN-interférence pour disséquer ses mécanismes d'action lors de la réponse. Les auteurs montrent ainsi que l'extinction de l'expression de *bmi1* inhibe la prolifération des LT CD8 en réponse primaire, tandis que sa surexpression augmente la prolifération des LT CD8 en réponse primaire ainsi que leur prolifération homéostatique en présence d'IL2 et d'IL7. Ils montrent par ailleurs que Bmi-1 est sélectivement induit dans les MPEC, mettant en évidence

le rôle de ce facteur dans la génération des cellules mémoires, même si les mécanismes impliqués sont pour le moment inconnus.

Un grand nombre d'autres facteurs de transcription ont une expression différente entre cellules naïves, effectrices et mémoires, sans que le rôle dans la différenciation ait été montré (Rutishauser et al., Immunological Reviews, 2010).

3.7 Métabolisme énergétique et différenciation des LT CD8

La différenciation des LT CD8 en effecteurs puis en cellules mémoires s'accompagne de profondes modifications du métabolisme de ces cellules. Cela a été démontré par deux études parues en 2009 et montrant que la différenciation des LT CD8 en effecteurs s'accompagne de la transition d'un métabolisme de type catabolique à un métabolisme de type anabolique. Lors de la différenciation en cellules mémoires, les LT CD8 retrouvent un métabolisme catabolique.

La première démonstration du rôle du métabolisme énergétique dans la différenciation des LT CD8 a été réalisée par Pearce et collègues dans un modèle souris déficientes pour le gène *traf6*. Les auteurs montrent qu'en absence de TRAF6, les LT CD8 prolifèrent normalement et acquièrent des fonctions effectrices en réponse à *Listeria monocytogenes*. En revanche, ils observent que la génération des cellules mémoires est réduite dans ces souris suggérant que les cellules ne survivent pas à la phase de contraction. La comparaison du transcriptome des cellules *traf6*^{-/-} avec des cellules contrôles lors de cette phase met en évidence une dérégulation du métabolisme, notamment en ce qui concerne l'oxydation des acides gras, suggérant qu'un passage d'un métabolisme de type catabolique à un métabolisme de type anabolique pourrait intervenir dans la différenciation des LT CD8 (figure 12). Les auteurs observent que l'administration en phase effectrice de metformine ou de rapamycine, deux drogues capables d'induire l'oxydation lipidique mitochondriale, rétablit la génération de LT CD8 mémoires *traf6*^{-/-}, confirmant ainsi l'importance de cette transition (Pearce et al., Nature, 2009).

La même année, une autre étude expose des résultats similaires (Araki et al., Nature, 2009). Les auteurs s'intéressent aux effets d'un traitement par la rapamycine à différents stades d'une infection par LCMV (figure 13). Ils constatent que l'administration de cette drogue durant la phase d'expansion des LT CD8 effecteurs augmente de façon non

négligeable le nombre de LT CD8 mémoires générés. Cela s'accompagne d'une proportion fortement augmentée de MPEC 8 jours après infection, vraisemblablement responsable de cette importante génération de cellules mémoires. En revanche, le traitement des souris lors de la conversion des cellules du stade effecteur au stade mémoire ne modifie pas le nombre de cellules générées, mais a un effet important sur la vitesse de conversion et les fonctions des cellules mémoires générées. Les auteurs observent en effet que ce traitement accélère fortement la conversion des cellules en LT CD8 mémoires, et que les cellules générées contrôlent plus rapidement une infection secondaire que des cellules contrôles. L'étude montre que la protéine mTOR, cible de la rapamycine, joue un rôle intrinsèque important dans la différenciation des LT CD8.

Ces deux études mettent en évidence le rôle majeur de la transition du catabolisme à l'anabolisme lors de l'activation des cellules naïves puis lors de leur conversion en cellules mémoires, ainsi que le rôle joué par mTOR dans cette conversion. Jonathan Powell montre d'ailleurs que, au cours de la différenciation asymétrique suivant l'activation des LT CD8 naïfs (modèle proposé par Chang et Reiner, figure 8), le complexe mTOR migre de façon préférentielle vers la cellule proximale, cellule qui se différencierait en SLEC (Immunoregulatory Networks, Keystone Symposium, 2011).

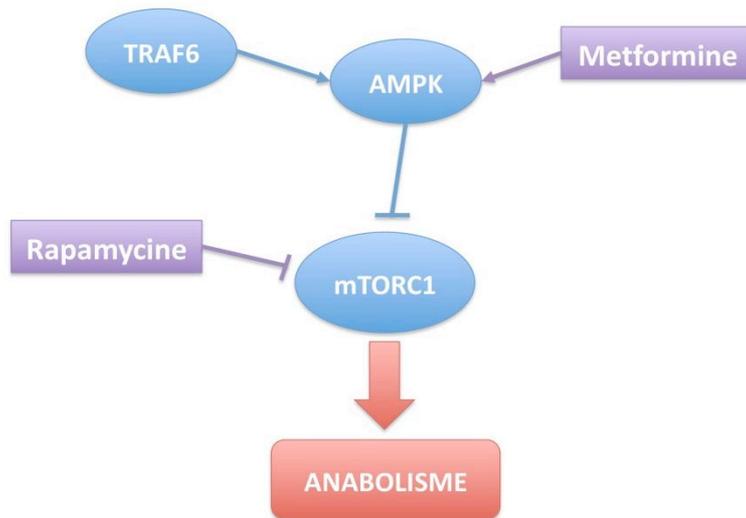


Figure 12 : Schéma simplifié de la voie de signalisation du complexe mTORC1. Les modes d'action de la Rapamycine et de la Metformine sont également indiqués

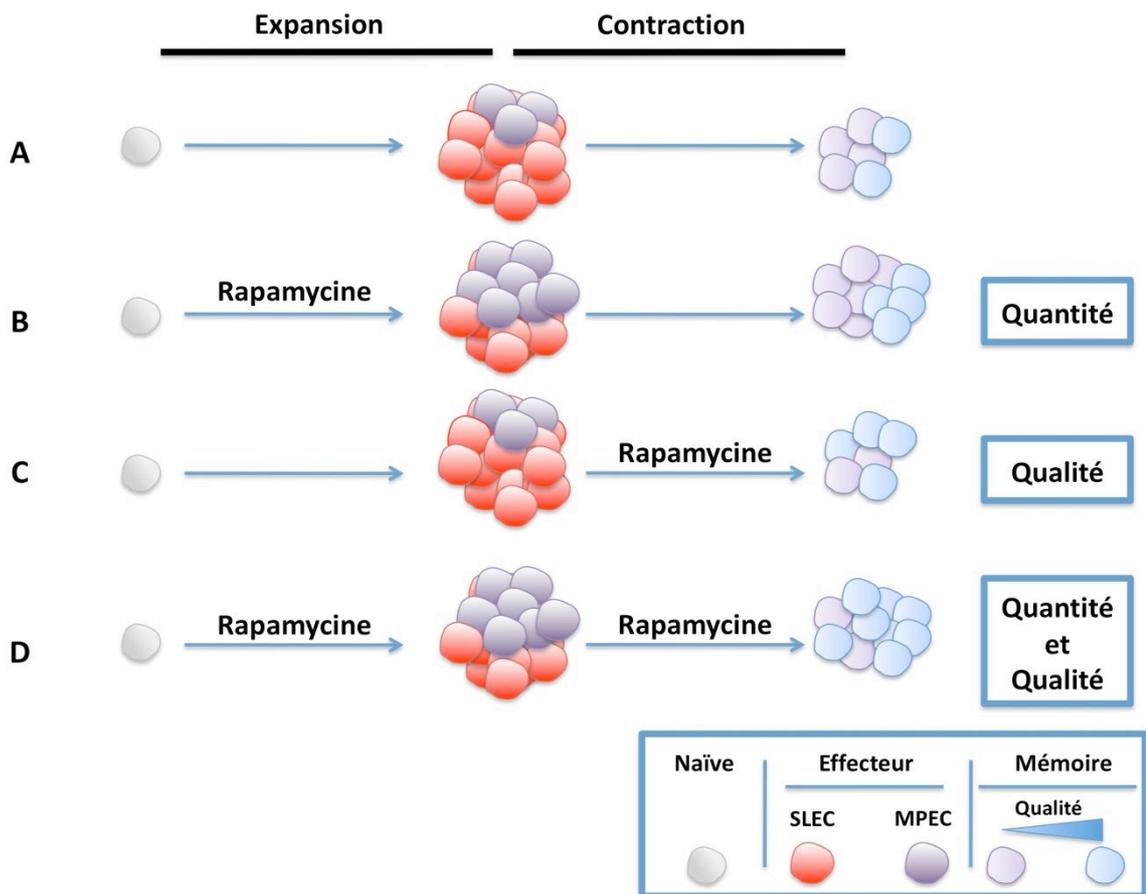


Figure 13 : Effets de la rapamycine sur la différenciation des LT CD8 effecteurs et mémoires. La Rapamycine peut agir à différentes étapes de la différenciation des LT CD8, augmentant la quantité et/ou la qualité des mémoires générées.

Familles	Exemples	
Récepteur de type I	IL-2R IL-4R IL-7R	Récepteurs à chaîne $\gamma\epsilon$
	GM-CSFR IL-3R IL-5R	Récepteurs à chaîne $\beta\epsilon$
	IL-6R LIFR IL-12R	Récepteurs à chaîne gp130
	G-CSFR EpoR	Récepteurs homodimériques
Récepteurs de type II	IFN α R IFN β R IL10R	
Famille des Immunoglobulines	IL-1R IL-18R	
Famille des TNFR	LT β R CD120	
Famille des récepteurs de chimiokines	CCR5 CXCR3 XCR1	
Famille des récepteurs de TGF β	TGF β 1 TGF β 2	

Tableau 2 : familles des cytokines

II- Influence des cytokines γ c sur la biologie des LT CD8

Les cytokines sont des médiateurs solubles des communications cellulaires qui, lorsqu'elles sont secrétées par une cellule peuvent agir de façon autocrine, paracrine ou endocrine. Leurs fonctions sont très diverses : elles peuvent ainsi induire la prolifération cellulaire, la différenciation ou l'apoptose (Wang et al., Annu Rev Immunol, 2009). Elles sont regroupées en six familles selon la structure du récepteur qu'elles engagent : les récepteurs de cytokine de type I, les récepteurs de cytokine de type II, les récepteurs de TNF, les récepteurs de la famille des immunoglobulines, les récepteurs de TGF β , et les récepteurs de chimiokines (Tableau 2).

La famille des récepteurs de cytokines de type I est la plus grande famille. La plupart de ses membres ne signalent pas suite à une homodimérisation : ils sont constitués d'une chaîne commune ayant une fonction de transduction du signal associée à au moins une chaîne ayant une fonction de reconnaissance du ligand parfois associée à une fonction de signalisation. Trois chaînes communes sont connues : la chaîne gp130, la chaîne β c et la chaîne γ c.

Nous décrirons dans cette partie les cytokines liant les récepteurs contenant une chaîne γ c, ces cytokines ayant un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie des LT CD8 naïfs et mémoires mais également dans l'initiation d'une réponse immunitaire efficace.

1- La famille des récepteurs de cytokines contenant une chaîne γ c

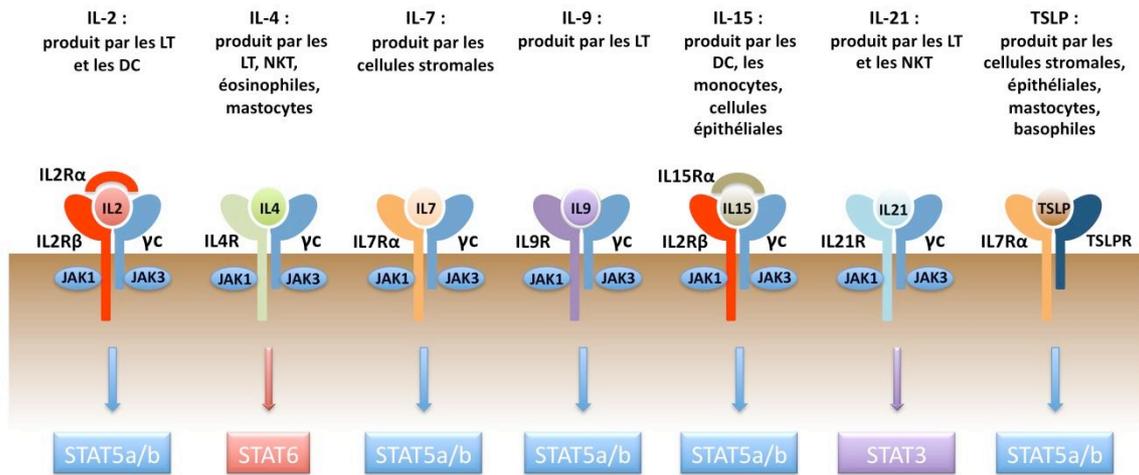
Cette famille contient six membres « classiques » : les récepteurs de l'IL-2, -4, -7, -9, -15 et -21, et un membre atypique, le récepteur de TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin) (Figure 14). Ces cytokines sont classiquement appelées « cytokines γ c », et nous utiliserons donc cette nomenclature dans la suite de cette introduction. La chaîne γ c a initialement été identifiée comme membre du récepteur de l'IL-2, et nommée IL-2R γ (Takeshita et al., Science, 1992). Sa grande importance biologique a été pour la première fois envisagée en 1993 dans une étude de Noguchi et collègues montrant chez l'humain que le développement d'une immunodéficiência sévère combinée (SCID) liée au chromosome X avait pour origine la présence de mutations dans le gène codant pour γ c. Cette maladie est caractérisée notamment par l'absence de lymphocytes T et de NK et par un décès de l'enfant peu après la naissance en absence de transplantation ou d'un placement dans un environnement stérile. Noguchi et

collaborateurs constatent en revanche que les patients souffrant d'une déficience en sécrétion d'IL-2 ont un nombre normal de LT, et font donc l'hypothèse vérifiée par la suite que γ c doit nécessairement participer à la signalisation d'autres cytokines (Noguchi et al., Science, 1993).

Il est aujourd'hui connu que γ c peut s'associer avec différentes chaînes α pour former les récepteurs de l'IL-2, l'IL-4 (Kondo et al., Science, 1993 ; Russell et al., Science, 1993), l'IL-7 (Noguchi et al., Science, 1993 ; Kondo et al., Science, 1994), l'IL-9 (Kimura et al., Int Immunol, 1995), l'IL-15 (Giri et al., EMBO, 1994) et l'IL-21 (Asao et al., J Immunol, 2001). Les récepteurs de l'IL-2 et de l'IL-15 ont la particularité d'être constitués en plus de la chaîne γ c d'une chaîne IL-2R β commune. Nous évoquerons également dans ce chapitre le cas du récepteur de TSLP, constitué de la chaîne α du récepteur de l'IL-7 et d'une chaîne analogue à la chaîne γ c, appelée TSLP-Récepteur (TSLPR) (Pandey et al., Nat Immunol, 2000) (figure 14).

L'ensemble des membres de cette famille transmettent le signal cytokinique par l'intermédiaire de la voie JAK/STAT. La chaîne γ c lie directement JAK3, tandis que les chaînes α des récepteurs lient JAK1, activant des STAT différentes en fonction du récepteur (Figure 14). La voie de signalisation en aval des récepteurs de cette famille est principalement dépendante de STAT5a/STAT5b, à l'exception de l'IL-4R qui signale principalement par l'intermédiaire de STAT6 (Acacia De Sa Pinheiro et al., J Leukocyte Biology, 2007) et de l'IL-21R qui signale principalement par l'intermédiaire de STAT3 (Zeng et al., Blood, 2007). D'autres voies peuvent cependant être activées en aval des récepteurs lors de l'engagement, comme c'est le cas pour l'IL-4R (Figure 15) : il est ainsi connu que, outre la phosphorylation de STAT6, l'engagement de l'IL4R peut induire la phosphorylation du complexe de signalisation IRS (pour Insulin Receptor Substrate), capable alors d'activer la voie de la PI3K/Akt (Keegan et al., Cell, 1994 ; Wurster et al., Mol Cell Biol, 2002 ; Acacia De Sa Pinheiro et al., J Leukocyte Biology, 2007). Nous verrons que l'activation de ces voies de signalisation en aval de l'IL-4R participe directement au maintien de la survie des LT CD8 en augmentant l'expression de molécules comme Bcl-x_L ainsi qu'à l'induction de leur prolifération.

Il existe un grand nombre d'études montrant que ces cytokines influencent fortement le maintien de l'homéostasie des différentes populations de LT CD8 ainsi que les processus de différenciation en cellules effectrices et mémoires. Nous verrons également dans cette partie que les modalités de production de ces cytokines sont variées, en adéquation avec leurs



Modifié d'après Rochman et al., Nat Rev Immunol, 2009

Figure 14 : structure des membres de la famille des récepteurs à chaîne γc et principaux facteurs de transcription en aval

Les cellules productrices des cytokines γc sont également indiquées

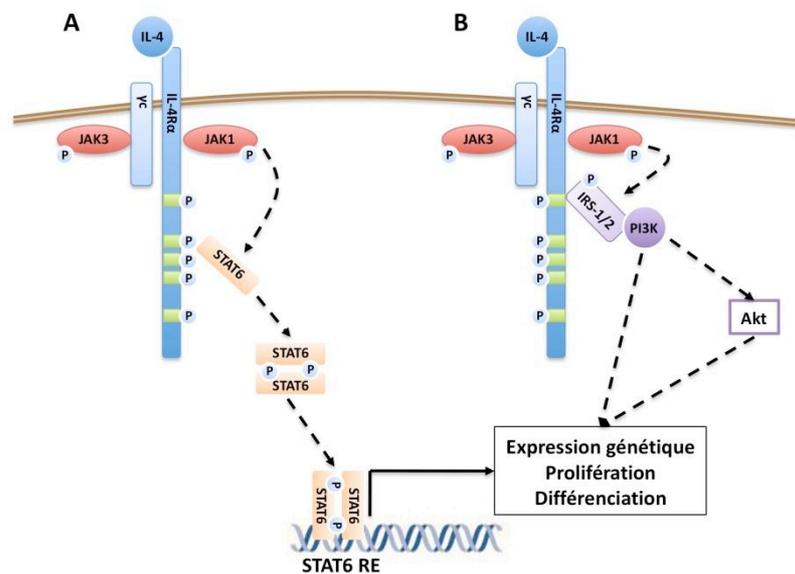


Figure 15 : voies de signalisation en aval du récepteur de l'IL-4, dépendante de STAT6 (A) et du complexe IRS1/2 (B). A : la fixation de l'IL-4 sur son récepteur provoque la phosphorylation de JAK1/3, qui à leur tour phosphorylent des domaines tyrosines de l'IL-4R α et STAT6. L'interaction de STAT6 et de ces domaines provoque la dimérisation de STAT6 et sa translocation vers le noyau. B : l'activation de JAK1/3 provoque la phosphorylation du complexe IRS1/2. Après interaction avec une tyrosine de l'IL-4R α , le complexe IRS1/2 active la PI3K.

rôles multiples dans l'organisme. Nous n'évoquerons en revanche pas le cas de l'IL-9, aucun effet de cette cytokine sur les LT CD8 n'ayant été décrit à ce jour.

2- Effets des cytokines γ c sur les LT CD8 naïfs en conditions homéostatiques

Une fois les étapes de sélection thymique achevées, les LT CD8 migrent via le sang vers les organes lymphoïdes secondaires où ils pourront être activés. Leur survie au sein de ces organes dépend de la présence dans leur environnement de deux types de signaux : la reconnaissance entre TCR et molécules du CMH-I, ainsi que les interactions avec des cytokines. Celles-ci appartiennent principalement à la famille γ c, l'IL-7 étant la plus importante.

Plusieurs études attestent de l'importance des interactions TCR-CMH-I pour la survie des LT CD8 naïfs. Ainsi, une étude de Tanchot et collègues parue en 1997 montre que la survie des LT CD8 naïfs est réduite dans des souris lorsque ces cellules sont privées de contacts CMH/peptide du soi (Tanchot et al., Science, 1997). L'étude de Seddon et collègues a également montré que la délétion de molécules intervenant dans la signalisation du TCR comme Src et Fyn provoquait la mort des LT naïfs (Seddon et al., J Immunol, 2001). Cette mort n'est cependant pas rapide mais progressive (Seddon et al., J Immunol, 2001 ; Labrecque et al., Immunity, 2001).

Nous verrons dans la suite qu'un grand nombre d'études ont également documenté l'importance des cytokines dans le maintien de l'homéostasie des LT, indépendamment des signaux de survie dépendant du TCR.

2.1 L'IL-7 a un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie des LT CD8 naïfs

Le rôle essentiel joué par l'IL-7 lors du développement thymique des LT CD8 puis dans la régulation de l'homéostasie des LT CD8 naïfs a été dévoilé au cours des quinze dernières années. Les travaux de Von Freeden-Jeffry et collègues utilisant des souris invalidées pour le gène *il7* ont montré pour la première fois le rôle de l'IL-7 dans la survie des

LT au cours de la lymphopoïèse : ces souris sont affectées fortement lymphopéniques (Von Freuden-Jeffry et al., J Exp Med, 1995). Par la suite, différentes études ont documenté le rôle de l'IL-7 dans la survie et la prolifération homéostatique des LT CD8 naïfs.

2.1.1 Effets de l'IL-7 sur l'homéostasie des LT CD8 naïfs

Une fois le développement thymique achevé, les LT CD8 rejoignent la population des cellules naïves au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Ils entrent dans une phase quiescente durant laquelle ils prolifèrent peu, mais sont dépendants de signaux pour leur survie. Outre les contacts TCR-CMH, les études de Boise et collègues en 1995, Vella et collègues en 1997 et Rathmell et collègues en 2001 ont montré que l'IL-7 peut fournir les signaux nécessaires à la survie des LT CD8 naïfs *in vitro* (Boise et al., PNAS, 1995 ; Vella et al., J Exp Med, 1997 ; Rathmell et al., J Immunol, 2001). En 2000, Schluns et collègues démontrent à l'aide de souris invalidées pour les gènes *il7* ou *il7ra* que l'IL-7 maintient la survie des LT CD8 naïfs *in vivo* (Schluns et al., Nat Immunol, 2000). Cette étude démontre également que l'IL-7 peut induire la prolifération homéostatique des LT CD8 naïfs *in vivo*. Cela est confirmé par une étude de Boyman et collègues parue en 2008 démontrant que l'injection de complexes IL-7/anti-IL-7 induit la prolifération homéostatique des LT CD8 naïfs (Boyman et al., J Immunol, 2008). Cela pourrait s'expliquer par une présentation *trans* de l'IL-7 par l'anticorps, ou par une dissociation progressive des complexes IL-7/anti-IL-7, permettant une augmentation de la biodisponibilité et de la demi-vie de l'IL-7. L'étude de Sedon et collègues montre que le signal délivré par l'IL-7 peut agir en synergie avec le signal délivré par l'engagement du TCR par des peptides du soi (Sedon et al., J Immunol, 2002). Ces études suggèrent donc que l'IL-7 joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie des LT CD8 naïfs chez l'individu en dehors d'un contexte de réponse immunitaire.

Par ailleurs, l'IL-7 a un rôle important dans la forte prolifération homéostatique lymphocytaire observée lors du transfert de LT CD8 dans des individus lymphopéniques. Il est connu depuis de nombreuses années que la déplétion du compartiment lymphocytaire d'un individu s'accompagne d'une forte expansion de LT CD8 résiduels ou transférés (Fig 15A) (Stutman, Immunol Rev, 1986). Un grand nombre d'études ont mis en évidence il y a une dizaine d'années que cela était notamment une conséquence de l'augmentation de la

disponibilité de l'IL-7 dans ces individus, celui-ci n'étant plus consommé par les LT (Fig 15B). En utilisant des souris déficientes pour l'expression des gènes *il4*, *il7* ou *il15*, Schluns et collègues en 2000 ainsi que Tan et collègues en 2001 montrent que l'initiation de la prolifération de LT CD8 naïfs transférés dans des hôtes rendus lymphopéniques par irradiation est principalement dépendant de l'IL-7 (Schluns et al., Nat Immunol, 2000 ; Tan et al., PNAS, 2001). De façon intéressante, la prolifération induite dans des hôtes lymphopéniques ou dans des souris transgéniques surexprimant l'IL-7 s'accompagne d'une importante différenciation des LT CD8 naïfs en cellules ayant un phénotype de LT CD8 mémoires (Kieper et al., J Exp Med, 2002 ; Burchill et al., J Immunol, 2003).

2.1.2 Modalités de production de l'IL-7

La recherche des cellules productrices de l'IL-7 est rendue difficile par l'impossibilité chez la souris de détecter *in situ* l'IL-7. La plupart des données se basent donc sur l'identification de transcrits codant pour cette cytokine (Surh et al., Immunity, 2008). L'IL-7 est produite au niveau de la moelle osseuse et du thymus, sans que le type cellulaire responsable de cette production n'ait été déterminé (Jiang et al., Cytokine Growth Factor Rev, 2005). En revanche, Link et collègues ont identifié à l'aide de techniques d'hybridation *in situ* les cellules productrices de l'IL-7 au niveau des zones T des ganglions : ils ont ainsi montré que l'IL-7 y est coproduite de façon constitutive avec les chimiokines CCL19 et CCL21 par des cellules fibroblastiques réticulaires (Link et al., Nat Immunol, 2007). Ces cellules ont une structure myofibroblastique et forment une capsule autour des vaisseaux drainant les ganglions. Elles peuvent ainsi délivrer conjointement les signaux d'attraction (CCL19 et CCL21) et de survie des LT CD8. Il est possible que, une fois sécrétée, l'IL-7 reste associée à la matrice extracellulaire des cellules productrices, comme cela a été décrit pour l'IL-2 (Clarke et al., Cytokine, 1995 ; Wrenshall et al., J Immunol, 1999). Ainsi, contrairement à d'autres cytokines, il semble que la production de l'IL-7 ne soit pas dépendante de l'activation d'une réponse immunitaire. En revanche, une forte diminution de la population de LT au sein d'un individu augmente la disponibilité en IL-7 ce qui stimule la prolifération des LT résiduels (Figure 16) (Fry et al., blood, 2001). Un autre mécanisme intervenant dans la stabilité de la disponibilité en IL-7 est la régulation fine de l'expression de l'IL-7R à la surface des LT CD8 naïfs. L'expression de ce récepteur est en effet diminuée suite à la liaison

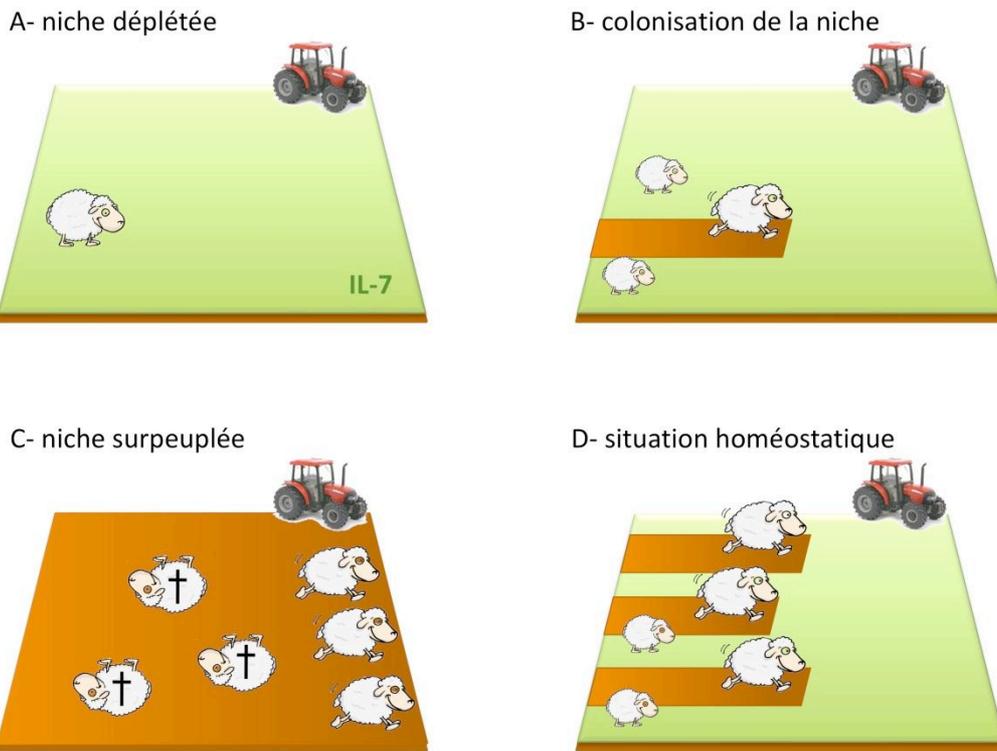


Figure 16 : disponibilité et consommation de l'IL-7.

Dans un hôte dont le compartiment lymphocytaire a été déplété (A), par exemple après irradiation, les LT résiduels prolifèrent en réponse à la grande quantité d'IL-7 disponible pour coloniser de nouveau la niche (B), jusqu'au retour à un équilibre homéostatique (D). Au contraire, dans un hôte dont le nombre de LT est excessif (C), la faible disponibilité en IL-7 a pour conséquence la mort d'un certain nombre de LT, jusqu'au retour à une situation homéostatique (D).

de l'IL-7 ou d'autres cytokines de survie comme l'IL-4 : Les cellules ayant reçu un signal de survie ne peuvent donc plus lier l'IL-7 (Park et al., Immunity, 2004).

2.1.3 Voie de signalisation

L'engagement de l'IL-7R active JAK1 et JAK3, associés respectivement à la chaîne α du récepteur de l'IL-7 et à la chaîne γ_c , ce qui a pour conséquence de recruter et activer STAT5a et STAT5b. Cette activation est suivie de la translocation des dimères STAT5a/STAT5b dans le noyau où sera régulée l'expression de gènes cibles (Rosenthal et al., Cell Immunol, 1997 ; Yu et al., J Leukocyte Biol, 1998). Ainsi, la double délétion de STAT5a et STAT5b ou la délétion de l'IL-7R ont toutes deux pour conséquence une forte altération du développement lymphocytaire (Yao et al., PNAS, 2006). La voie STAT5a/b agit en augmentant l'expression de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Mcl-1, et en inhibant l'expression de protéines pro-apoptotiques comme BAX et BAD (Qin et al., Blood, 2001 ; Kelly et al., J Immunol, 2003).

2.2 Rôle de l'IL-4

2.2.1 Production de l'IL-4

Les sources d'IL-4 dans l'organisme sont multiples : leur identification a notamment été permise par l'utilisation d'une souris rapportrice de l'expression du gène *il4*, la souris « 4get » dont la description a été publiée en 2001 (Mohrs et al., Immunity, 2001). Il est ainsi connu que l'IL-4 est sécrétée *in vivo* par des cellules du système immunitaire inné comme les basophiles, les mastocytes, les éosinophiles (Gessner et al., J Immunol, 2005) et les NKT (Stetson et al., J Exp Med, 2003), ainsi que des cellules du système immunitaire adaptatif comme les LT CD4 helper de type 2 (Th2) (Mohrs et al., Immunity, 2001), les LT CD4 helper folliculaires (T_{FH}) (Reinhardt et al., Nat Immunol, 2009 ; King et al., J Exp Med, 2009) et les lymphocytes B (Wojciechowski et al., Immunity, 2009).

Contrairement à l'IL-7, l'IL-4 n'est pas produit par les cellules de façon constitutive mais est induite par une stimulation.. En ce qui concerne les basophiles, la sécrétion est très rapide, permise par la présence de stocks d'ARNm codant pour l'IL-4 et traduits très rapidement après stimulation (Gessner et al., J Immunol, 2005). Ainsi, l'IL-4 n'agirait sur les LT CD8 que dans un contexte de réponse immunitaire. Deux études de Weinreich et collaborateurs viennent cependant nuancer ce constat : elles suggèrent en effet qu'il existe dans la souris un niveau basal d'IL-4. Nous reviendrons sur ces études dans la partie 2.2.3 (Weinreich et al., Immunity, 2009 ; Weinreich et al., Nat Immunol, 2010).

La présence d'IL-4 est observée dans de nombreux contextes pathologiques dont la dermatite atopique, certaines infections parasitaires et tumeurs (Carvalho et al., Nat Med, 2002 ; De vita et al., J Rheumatol, 1995 ; Conticello et al., J Immunol, 2004 ; Pedroza-Gonzalez et al., J Exp Med, 2011 ; Howell et al., Immunity, 2006).

2.2.2 Impact de l'IL-4 sur les LT CD8 naïfs

Plusieurs études ont montré que l'IL-4 induit la prolifération des LT CD8 naïfs (Tan et al., PNAS, 2001 ; Ueda et al., Int Immunol, 2006 ; Morris et al., J Immunol, 2009). En 2001, Tan et collaborateurs montrent en transférant des LT CD8 naïfs dans des souris *il4^{-/-}* que l'IL-4 intervient dans la prolifération lymphocytaire induite dans des souris lymphopéniques, bien que ce rôle soit moins important que celui de l'IL-7 (Tan et al., PNAS, 2001). Une seconde étude par Ueda et collègues se base sur la capacité des NKT à sécréter de l'IL-4 en réponse à l'engagement de leur TCR (molécule CD1d) par α -GalCer. Les auteurs montrent que l'injection de cette molécule dans des souris sauvages induit la prolifération des LT CD8 naïfs et mémoires. Cette prolifération est dépendante de l'expression par les LT CD8 de l'IL-4Ra et du facteur de transcription STAT6 (Ueda et al., Int Immunol, 2006). Ces deux études sont confirmées par une publication de Morris et collaborateurs parue en 2009. Dans cette étude, les auteurs utilisent notamment un modèle d'infection par le parasite *Nippostrongylus brasiliensis*, infection induisant une réponse de type Th2, et montrent que l'IL-4 produit au cours de ce type d'infection induit la prolifération de LT CD8 naïfs préalablement transférés dans ces souris (Morris et al., J Immunol, 2009). Cette étude suggère donc que l'IL-4 produit au cours d'une infection de type Th2 peut influencer la biologie des LT CD8. Cela est élégamment montré par une étude de Perona-Wright et collaborateurs publiée en 2010

(Perona-Wright et al., Nat Immunol, 2010). Les auteurs utilisent un modèle d'infection par le nématode entérique *Heligmosomoides polygyrus*, infection élicitant également une réponse de type Th2. Afin de tester si lors d'une telle infection, seules les cellules participant à la réponse immunitaire reçoivent un signal de l'IL-4, les auteurs mesurent dans les ganglions drainants le niveau de phosphorylation de STAT6 dans différentes populations cellulaires. Ils montrent que la majorité des lymphocytes présents dans le ganglion reçoivent un signal par l'IL-4 même s'ils ne participent pas à la réponse contre *Heligmosomoides polygyrus* (Perona-Wright et al., Nat Immunol, 2010). Les études de Morris et Perona-Wright montrent donc que lors d'une infection induisant une réponse Th2, l'ensemble des cellules du système immunitaires, dont des LT CD8 ne participant pas directement à la réponse immunitaire, sont affectées par l'IL-4 produit. Cela induit notamment leur prolifération homéostatique.

De plus, plusieurs études ont montré que l'IL-4 induit la survie des LT CD8 naïfs *in vitro* en augmentant l'expression de Bcl-2 et Bcl-x_L de façon STAT6-indépendante (Acacia De Sa Pinheiro et al., J Leukocyte Biology, 2007 ; Marçais et al., J Immunol, 2006 ; Vella et al., J Exp Med, 1997 ; Aronica et al., cytokine, 2000). L'IL-4 a donc un important rôle de soutien de l'homéostasie des LT CD8 naïfs, induisant leur prolifération et maintenant leur survie.

2.2.3 L'IL-4 induit la différenciation des thymocytes et des LT CD8 naïfs en cellules CD8 « innées »

Trois études récentes de Weinreich et collègues (Weinreich et al., Immunity, 2009 ; Weinreich et al., Nat Immunol, 2010) et Vervakakis (Vervakakis et al., Immunity, 2010) ont montré que l'IL-4 agit au niveau du thymus sur les LT CD8 en cours de différenciation. Ils utilisent dans leurs travaux des modèles de délétion des gènes *klf2* ou *Id3* induisant l'expansion d'une population de NKT produisant de l'IL-4. Ces études montrent que dans ce contexte l'exposition de LT CD8 naïfs ou de thymocytes CD8⁺CD4⁻ (CD8SP) à l'IL-4 *in vivo* induit leur différenciation en cellules ayant un phénotype de LT CD8 mémoires. Dans un modèle de chimères de moelle osseuse, ils reconstituent des souris préalablement irradiées à l'aide d'une majorité de cellules provenant de souris *klf2*^{-/-} et une minorité de cellules provenant de souris sauvages. Ils montrent dans ce système qu'une importante population de NKT exprimant le facteur de transcription PLZF et sécrétrice d'IL-4 se développe au sein de

la population *klf2*^{-/-}, et que cela a d'importants effets de type « bystander » sur la population sauvage. En effet, le phénotype des thymocytes CD8SP et des LT CD8 naïfs spléniques ainsi stimulés par l'IL-4 devient en quelques semaines semblable à celui de LT CD8 mémoires : CD44^{high}, CD122^{high}, CXCR3^{high} et IL4-R α ^{high}. De plus, ces cellules acquièrent des fonctions semblables à celles des LT CD8 mémoires générés en réponse à un antigène : elles sont notamment capables de sécréter de l'IFN γ en réponse à une stimulation par une combinaison d'IL-12 et d'IL-18 ou en réponse à une stimulation antigénique. (Weinreich et al., Immunity, 2009 ; Weinreich et al., Nat Immunol, 2010). La génération de LT CD8 « memory-like », rebaptisées depuis cellules CD8 « innées », dans le thymus a été observée par d'autres équipes étudiant des souris déficientes pour les gènes *itk* (Broussard et al., Immunity, 2006 ; Atherly et al., Immunity, 2006) et *crebbp* (Fukuyama et al., Mol Cell Biol, 2009). Weinreich et collègues montrent que ces deux mutations sont également à l'origine du développement important d'une population exprimant PLZF sécrétant de l'IL4 (Weinreich et al., Nat Immunol, 2010). Les mécanismes de différenciation de ces cellules CD8 « innées » sont très peu décrits. Les auteurs montrent dans cette étude que cette différenciation s'accompagne d'une augmentation de l'expression d'Eomes, potentiellement impliqué dans ce mécanisme, bien que cela reste à démontrer (Weinreich et al., Nat Immunol, 2010).

Compte tenu du rôle de l'IL-4 dans ces différents modèles, Weinreich et collègues ont fait l'hypothèse qu'un mécanisme similaire pouvait fonctionner dans les souris sauvages : les souris Balb/c ayant une plus forte proportion de cellules exprimant PLZF que les souris C57Bl/6, il pourrait exister un important niveau basal d'IL-4 dans ces souris générant naturellement des cellules CD8 « innées ». En comparant le phénotype des thymocytes CD8SP dans ces deux lignées, les auteurs montrent que les souris Balb/c ont une forte proportion de cellules ayant un phénotype de cellules mémoire et générées de façon IL-4-dépendante (Weinreich et al., Nat Immunol, 2010). Il existe donc, dans les souris sauvages, une population de cellules CD8 « innées » générées en réponse à l'IL-4 et n'ayant pas été préalablement stimulées par un antigène.

2.3 Rôle de l'IL-15 et de l'IL-21

L'IL-15 et l'IL-21 ont également un rôle dans le maintien de l'homéostasie des LT CD8 naïfs.

En 2003, Berard et collègues montrent que l'ajout d'IL-15 dans le milieu de culture de LT CD8 naïfs purifiés augmente leur survie en induisant l'expression de Bcl-2. Ils montrent par ailleurs qu'au contraire des LT CD8 mémoires, l'IL-15 n'active pas la prolifération des LT CD8 naïfs (Berard et al., J Immunol, 2003). Cela est confirmé chez l'humain par une étude de Wallace et collègues (Wallace et al., Immunology, 2006). En revanche, dans un contexte lymphopénique, Sandau et collègues montrent *in vivo* grâce à l'utilisation d'animaux déficients pour le gène *il15* que la prolifération des LT CD8 naïfs est en partie dépendante de la présence d'IL-15 (Sandau et al., J Immunol, 2007).

En 2006, Stoklasek et collègues montrent que des LT CD8 naïfs de souris OT-I transférés dans des hôtes traités à l'aide de complexes IL-15R α /IL-15 acquièrent un phénotype de LT CD8 effecteurs. Ils sont ainsi capables de lyser *in vivo* des cibles chargées avec le peptide SIINFEKL (l'antigène dont est spécifique le TCR OT-I) de façon beaucoup plus efficace que des LT CD8 naïfs de souris non traitées ou traitées avec l'IL-15 seule, et presque aussi efficace que des LT CD8 effecteurs générés en réponse à un virus VSV-OVA (Stoklasek et al., J Immunol, 2006).

Par ailleurs, Zeng et collègues ont montré dans une étude parue en 2005 que l'IL-15 peut agir en synergie avec l'IL-21 pour augmenter la survie et la division des LT CD8 naïfs *in vitro* (Zeng et al., J Exp Med, 2005), ainsi que leur capacité de sécrétion d'IFN γ . L'IL21 seule augmente également la survie des LT CD8 naïfs *in vitro* (Zeng et al., J Exp Med, 2005). Par ailleurs, Allard et collègues ont montré en 2007 que, de façon semblable à ce qui est observé pour l'IL-7 et l'IL-4, il se développe dans des souris transgéniques exprimant de hauts niveaux d'IL-21 une importante population de LT CD8 ayant un phénotype et des fonctions semblables à des LT CD8 mémoires (Allard et al., Eur J Immunol, 2007).

2.4 Autres cytokines

Bien que le récepteur de l'IL-2 soit faiblement exprimé par les LT CD8 naïfs, une étude de Kamimura et collègues montre en 2007 que l'IL-2 peut avoir d'importants effets sur ces cellules. En effet, de façon semblable aux autres cytokines γ c, l'injection de complexes IL-2/anti-IL-2 induit la prolifération des LT CD8 naïfs et leur différenciation en LT CD8 mémoires (Kamimura et al., J Exp Med, 2007). Ces cellules, bien que moins efficaces que des LT CD8 mémoires générés en réponse à *Listeria monocytogenes*, sont capables de protéger l'hôte lors d'un éventuel second challenge bactérien (Kamimura et al., J Exp Med, 2007).

Par ailleurs, une étude parue en 2008 a permis d'éclairer en partie le rôle de TSLP dans la survie des LT CD8 chez la souris (Rochman et al., J Immunol, 2008). Cette étude montre que le récepteur de TSLP est constitutivement exprimé par les LT CD8 murins et que, *in vitro*, l'adjonction de TSLP au milieu de culture augmente la survie des LT CD8 de façon Bcl-2-dépendante, mais par leur prolifération. De même, *in vivo*, la durée de vie des LT CD8 *tslpr*^{-/-} est diminuée en conditions lymphopéniques ou homéostatiques. Une seconde étude publiée en 2008 montre que le récepteur de TSLP n'est pas exprimé par les LT CD8 humains en conditions homéostatiques, suggérant que le rôle de TSLP dans le maintien de l'homéostasie des LT CD8 diffère entre souris et Homme (Akamatsu et al., Clinical & Experimental Immunology, 2008).

2.5 Différenciation en cellules « memory-like »

Nous avons vu que les cytokines γ c sont capables d'induire la différenciation de LT CD8 naïfs en LT CD8 « memory-like » (Kieper et al., J Exp Med, 2002 ; Burchill et al., J Immunol, 2003 ; Weinreich et al., Immunity, 2009 ; Weinreich et al., Nat Immunol, 2010 ; Verykokakis et al., Immunity, 2010 ; Stoklasek et al., J Immunol, 2006 ; Allard et al., Eur J Immunol, 2007 ; Kamimura et al., J Exp Med, 2007). Les mécanismes de différenciation « cytokine-induite » ne sont pas connus : seule l'augmentation de l'expression d'Eomes en réponse à l'IL-4 a été décrite (Weinreich et al., Immunity, 2009). Cette étude montre que Tbet n'est pas augmenté, ce qui suggère que la population mémoire générée est principalement composée de cellules T_{CM} (voir partie 1), bien que cela n'ait pas été vérifié.

La protection contre des pathogènes conférée par ces cellules « Memory-like » n'a pas non plus été totalement évaluée. Le traitement *in vivo* par des cytokines γ_c de souris ayant préalablement reçu des LT CD8 TCR transgéniques montre que les cellules « memory-like » générées protègent l'hôte de façon plus efficace que des cellules naïves (Stoklasek et al., J Immunol, 2006 ; Kamimura et al., J Exp Med, 2007). Weinreich et collaborateurs ont de plus montrés que les cellules CD8 « innées » générées par l'IL-4 sont capables de produire de l'IFN γ en réponse à une combinaison d'IL-12 et d'IL-18 (Weinreich et al., Nat Immunol, 2010). Elles pourraient ainsi jouer un rôle dans la réponse précoce à un challenge infectieux, agissant en collaboration avec des cellules de l'immunité innée comme les NK.

Un bilan des différents effets des cytokines γ_c sur la biologie des LT CD8 naïfs est proposé dans la figure 17.

3- Effets des cytokines γ_c sur les LT CD8 mémoires en conditions homéostatiques

En 1999, Murali-Krishna et collègues montrent que, contrairement aux LT CD8 naïfs, les LT CD8 mémoires survivent normalement dans des souris déficientes pour le CMH-I, et ne sont donc pas dépendantes des contacts entre TCR et CMH pour leur survie (Murali-Krishna et al., Science, 1999). En revanche, diverses études ont montré que l'homéostasie des cellules mémoires est totalement régulée par les cytokines, et principalement par l'IL-7 et l'IL-15. Cela corrèle avec l'augmentation de l'expression des récepteurs de l'IL-4, -7 et -15 (Tan et al., J Exp Med, 2002). Cependant, compte tenu de la diversité existant dans la population CD8 mémoire, les cytokines nécessaires à la survie et à la prolifération homéostatique des différentes populations peuvent différer.

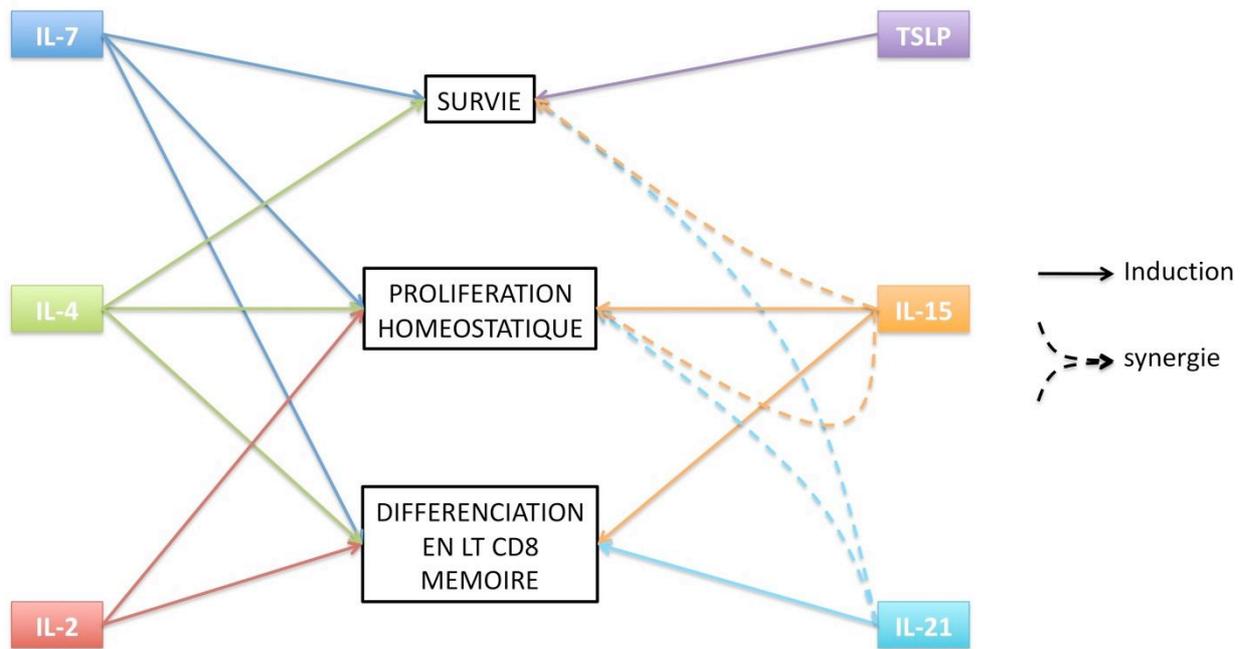


Figure 17 : Bilan des effets des cytokines γ c sur la biologie des LT CD8 naïfs

3.1 L'IL7 et l'IL15 sont les principales cytokines régulatrices de l'homéostasie des LT CD8 mémoires

3.1.1 Démonstration de l'importance de l'IL-7 et de l'IL-15

Les LT CD8 mémoires expriment l'IL-7R α et l'IL-2R β (chaîne β du récepteur de l'IL-15, voir figure 14) plus fortement à leur surface que les LT CD8 naïfs. L'IL-7 et l'IL-15 jouent un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie de la population mémoire.

Plusieurs études ont montré le rôle de l'IL-15 dans la prolifération homéostatique des LT CD8 mémoires. En 1998, une étude de Zhang et collègues montre que l'injection d'IFN de type I dans des souris induit la sécrétion d'IL-15 par les macrophages, et que l'IL-15 ainsi produit induit une forte prolifération des LT CD8 mémoires (Zhang et al., *Immunity*, 1998). Une étude de Kennedy et collègues utilisant des souris déficientes pour le gène *il15* est venue par la suite confirmer ce résultat : les auteurs constatent en effet que, dans ces souris, le nombre de cellules mémoires est fortement réduit (Kennedy et al., *J Exp Med*, 2000). Par ailleurs, les auteurs montrent qu'un traitement de ces souris avec de l'IL-15 restaure la prolifération des LT CD8 mémoires (Kennedy et al., *J Exp Med*, 2000). De plus, des LT CD8 mémoires transférés dans des souris hôtes *il15*^{-/-} ne prolifèrent pas et meurent rapidement (Judge et al., *J Exp Med*, 2002). Enfin, le nombre de LT CD8 mémoires dans les souris *il15* transgéniques est augmenté par rapport à des souris sauvages (Fehniger et al., *J Exp Med*, 2001).

Cependant, l'IL-15 n'est pas l'unique cytokine importante dans la régulation de l'homéostasie des LT CD8 mémoires. L'étude de Tan et collègue en 2002 montre ainsi que les LT CD8 mémoires dépendent également de l'IL-7 pour leur survie. En effet, si la prolifération des LT CD8 mémoires est diminuée dans les souris *il15*^{-/-}, elle l'est aussi dans les souris *il7*^{-/-}. Par ailleurs, la prolifération des LT CD8 mémoires est totalement abrogée dans des souris *il15*^{-/-}*il7*^{-/-} (Tan et al., *J Exp Med*, 2002). Par ailleurs, l'étude de Kieper et collègues suggère, dans un modèle de souris *il7* transgéniques, que les LT CD8 mémoires peuvent proliférer et survivre en présence de grandes quantités d'IL-7 en absence d'IL-15 (Kieper et al., *J Exp Med*, 2002). Cela est confirmé par l'étude de Boyman et collègues qui montre que l'injection de complexes IL-7/anti-IL-7 induit une forte prolifération des LT CD8 mémoires (Boyman et al., *J Immunol*, 2008).

L'IL-7 et l'IL-15 sont donc deux cytokines importantes dans la régulation de l'homéostasie des LT CD8 mémoires. Cependant, tous les LT CD8 mémoires ne sont pas aussi dépendants de ces cytokines pour leur survie.

3.1.2 Hétérogénéité de l'homéostasie des LT CD8 mémoires

Nous avons vu dans la première partie qu'il existe deux principales populations de LT CD8 mémoires : les T_{CM} et les T_{EM}. La plupart des études concernant le rôle de l'IL-7 et de l'IL-15 dans le maintien de l'homéostasie des LT CD8 mémoires ont été réalisées sur des LT CD8 générés naturellement dans la souris, en réponse à des antigènes environnementaux. Ces cellules sont phénotypiquement et fonctionnellement semblables aux cellules générées en réponse à un pathogène. Cependant les T_{CM} générées dans ces conditions sont légèrement différentes des T_{CM} générées en réponse à un pathogène. En effet, si l'IL-7 maintient la survie et l'IL-15 induit la prolifération de ces deux populations, l'IL-15 intervient également dans la survie des T_{CM} naturelles (Becker et al., J Exp Med, 2002 ; Osborne et al., J Exp Med, 2007 ; Carrio et al., Eur J Immunol, 2007 ; Judge et al., J Exp Med, 2002).

Les paramètres contrôlant l'homéostasie des T_{EM} sont mal définis. Cependant, compte tenu de leur tropisme (les T_{EM} sont principalement situées en périphérie, voir partie I), il est probable que la survie et la prolifération de ces cellules soient largement indépendantes de l'IL-7, sécrétée au niveau des organes lymphoïdes, mais dépendent fortement de l'IL-15.

Les facteurs régulant l'homéostasie des LT CD8 mémoires générés en réponse à un pathogène chronique sont eux aussi particuliers. Ces cellules, qui n'expriment à leur surface que de faibles niveaux des récepteurs de l'IL-7 et de l'IL-15, sont faiblement sensibles à ces deux cytokines. En revanche, leur survie est dépendante de contacts TCR-CMH/p réguliers (Wherry et al., PNAS, 2004 ; Shin et al., J Exp Med, 2007). L'homéostasie de ces cellules est donc régulée par des mécanismes proches de ceux rencontrés chez les LT CD8 naïfs.

3.2 L'IL-4 influence la prolifération et les fonctions des LT CD8 mémoires

De même que pour les LT CD8 naïfs, l'IL-4 induit la prolifération homéostatique des LT CD8 mémoires. Cela est montré par les études de Ueda et collègues ainsi que Morris et

collègues (Ueda et al., *Int Immunol*, 2006 ; Morris et al., *J Immunol*, 2009). Ces études montrent par ailleurs que la prolifération induite par l'IL-4 est plus importante pour les LT CD8 mémoires que les LT CD8 naïfs, ce qui est corrélé avec une augmentation de l'expression de l'IL-4R à la surface des LT CD8 mémoires par rapport aux LT CD8 naïfs. Cet effet d'induction de prolifération est confirmé par une étude de Boyman et collègue en 2006 dans laquelle les auteurs montrent que l'injection de complexes IL-4/anti-IL-4 induit la prolifération de LT CD8 mémoires préalablement transférés (Boyman et al., *Science*, 2006).

Bien que cela soit pour le moment peu décrit, l'IL-4 semble également avoir des effets sur les fonctions des LT CD8 mémoires. Ainsi, dans l'équipe, Marçais et collaborateurs ont montré *in vitro* que l'IL-4 inhibe rapidement et de façon réversible la transcription du gène *ccl5* par les LT CD8 mémoires de façon STAT6-dépendante (Marçais et al., *J Immunol*, 2006). Cette inhibition s'accompagne d'une forte diminution de la sécrétion de CCL5 en réponse à une stimulation. L'IL-4 pourrait donc avoir d'importants effets sur les capacités chimio-attractives des LT CD8 mémoires, bien que l'effet de l'IL-4 sur d'autres fonctions des LT CD8 mémoires n'ait pas été évalué.

3.3 Autres cytokines

L'étude de Zeng et collègues montre que, de même que pour les LT CD8 naïfs, l'IL-21 agit en synergie avec l'IL-15 pour augmenter la prolifération des LT CD8 mémoires. Par ailleurs, l'étude montre que la mise en culture de LT CD8 mémoires en présence de ces deux cytokines augmente fortement le nombre de cellules produisant de l'IFN γ suite à une stimulation *in vitro*. Ces deux cytokines agissent donc sur la prolifération et les fonctions effectrices des LT CD8 mémoires (Zeng et al., *J Exp Med*, 2005).

Une autre étude de Nguyen et Weng est venue récemment montrer un rôle de l'IL-21 dans le maintien de la fonctionnalité des LT CD8 mémoires chez l'humain (Nguyen et al., *JLB*, 2010). Une étude préalable de Borowski et collègues a montré que la population mémoire CD8 exprimant CD28 est la plus efficace dans une réponse antivirale (Borowski et al., *J Immunol*, 2007). Nguyen et collaborateurs montrent que l'ajout d'IL-21 dans une culture de LT CD8 mémoires humains en présence d'IL-15 augmente sélectivement la prolifération des LT CD8 CD28⁺ et inhibe leur transition vers un phénotype CD28⁻ (Nguyen et al., *JLB*,

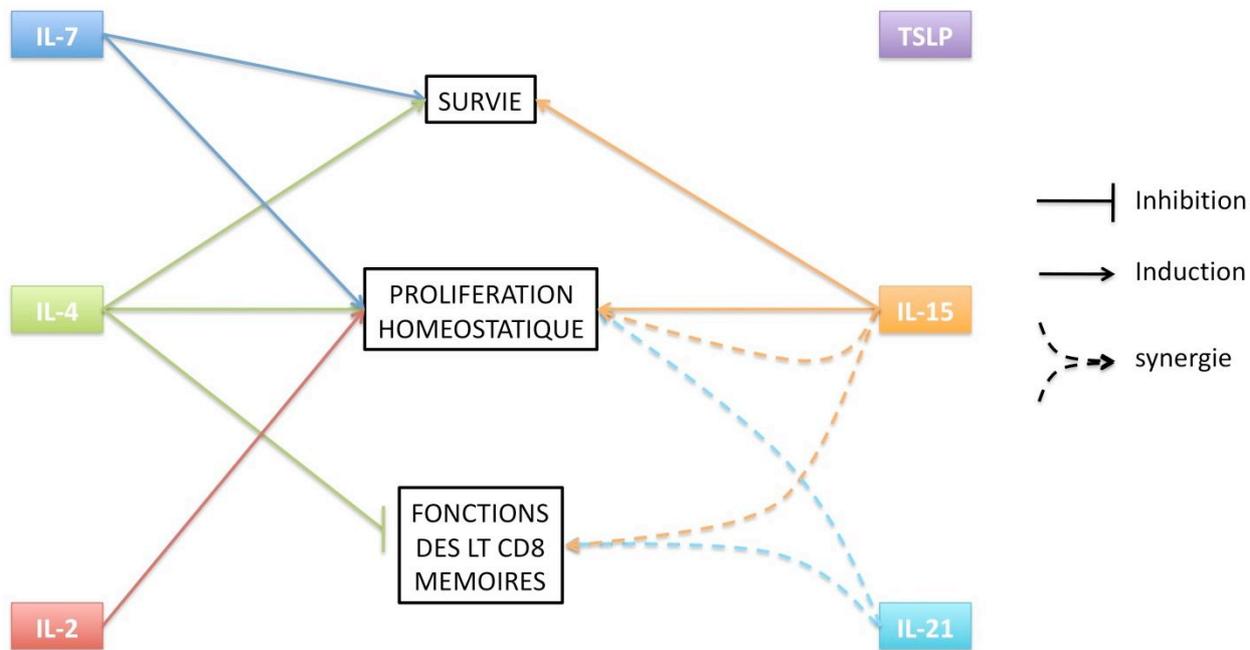


Figure 18 : Bilan des effets des cytokines γ c sur la biologie des LT CD8 mémoires

2010) . Cette étude suggère donc que l'IL-21 agit en synergie avec l'IL-15 pour maintenir la fonctionnalité des LT CD8 mémoires chez l'Homme.

Enfin, l'étude de Boyman et collègues en 2006 montre en utilisant des complexes IL-2/anti-IL2 que l'IL-2 est également capable d'induire la prolifération des LT CD8 mémoires *in vivo* (Boyman et al., Science, 2006).

En revanche, l'effet du TSLP sur l'homéostasie des LT CD8 mémoires n'a, à ce jour, pas été évalué.

Un bilan des différents effets des cytokines γc sur la biologie des LT CD8 mémoire est proposé dans la figure 18.

4- Les cytokines γc influencent fortement la réponse effectrice et la génération des LT CD8 mémoires

L'ensemble des cytokines γc ont d'importantes fonctions dans la modulation de la génération des LT CD8 effecteurs et mémoires. Récemment, une étude de Decaluwe et collègues a décrit la réponse immunitaire de LT CD8 $\gamma c^{-/-}$ lors d'une infection virale par le virus LCMV (Decaluwe et al., PNAS, 2010). Cette étude montre notamment que le nombre d'effecteurs générés et la balance effecteurs à durée de vie réduite/précurseurs de mémoires (SLEC/MPEC) sont fortement influencés par le signal délivré par les cytokines γc , comme nous allons le voir par la suite.

4.1 L'IL-2 affecte la qualité des cellules effectrices et mémoires générées

Si L'IL-2 n'intervient pas en temps que signal 3 lors de l'activation des LT CD8 naïfs, il a récemment été montré que la présence d'IL-2 dans l'environnement au cours de l'expansion cellulaire influence fortement la qualité des LT CD8 mémoires générés, bien que le nombre de cellules mémoires générées ne soit pas affecté (D'souza et al., J Immunol, 2003 ; Yu et al., J Immunol, 2003 ; Kalia et al., Immunity, 2010 ; Pipkin et al., Immunity, 2010 ; Williams et al., Nature, 2006).

En 2010, deux études indépendantes ont permis de mieux comprendre le rôle de l'IL-2 lors de la prolifération des LT activés. Pipkin et collègues utilisent un modèle *in vitro* dans lequel ils activent des LT CD8 en présence de différentes concentrations d'IL-2 (Pipkin et al.,

Immunity, 2010). Ils montrent ainsi que la présence de fortes concentrations d'IL-2 lors de l'activation induit la génération d'effecteurs ayant d'importantes capacités effectrices mais de faibles capacités de différenciation en cellules mémoires. Les cellules générées contiennent en effet de grandes quantités de Gzm-B, Perforine, sécrètent de grandes quantités d'IFN γ et sont fortement cytotoxiques. En revanche, de faibles concentrations d'IL-2 induisent la génération d'effecteurs aux fonctions limitées mais dont une importante proportion ré-exprime l'IL-7R et se différencie en cellules mémoires. Ces données suggèrent donc que, *in vitro*, l'IL-2 participe à la régulation de la balance SLEC/MPEC. Les auteurs confirment ces données *in vivo* en utilisant un modèle chimère de moelle osseuse, irradiant des souris sauvages et les reconstituant avec d'égales quantités de cellules *il2^{+/+}* et *il2^{-/-}*. Ils montrent également *in vitro* et *in vivo* que de fortes concentrations en IL-2 induisent la transcription de Blimp1 au détriment de Bcl-6 ainsi que la transcription du gène codant pour la Perforine de façon Eomes et STAT5 dépendante. Ces données sont confirmées par une étude indépendante de Kalia et collègues dans un modèle d'infection par le virus LCMV (Kalia et al., Immunity, 2010). Bien que tous les LT CD8 acquièrent l'expression de l'IL-2R α après activation, les auteurs constatent que les cellules effectrices générées en réponse au LCMV expriment ce récepteur de façon hétérogène. En comparant les LT CD8 effecteurs exprimant fortement (CD25^{hi}) ou faiblement (CD25^{low}) l'IL-2R α , les auteurs montrent que les cellules CD25^{low}, exposées moins fortement et moins longtemps à l'IL-2, se différencient de façon plus importante en cellules mémoires capables de répondre à une infection secondaire. De plus, les auteurs montrent que les deux populations ont des capacités effectrices peu différentes, bien que les cellules CD25^{hi} expriment Gzm-B plus fortement. Ces capacités différentielles sont accompagnées d'une plus forte expression de Blimp1 par les cellules CD25^{hi}. Ces résultats sont également cohérents avec une étude de Kedzierska et collègues montrant dans un modèle d'infection par le virus Influenza que les LT CD8 effecteurs exprimant faiblement CD25 sont les cellules se différenciant majoritairement en cellules mémoires capables de répondre efficacement à un challenge secondaire (Kedzierska et al., PNAS, 2007). Enfin, le rôle de l'IL-2 dans la différenciation des cellules mémoires est également illustré par une étude de Williams et collègues montrant que des LT CD8 CD25^{-/-} prolifèrent normalement en réponse primaire dans un modèle d'infection au LCMV mais se différencient en cellules mémoires incapables de proliférer en cas de challenge secondaire (Williams et al., Nature, 2006).

L'ensemble de ces données suggèrent que de façon similaire à ce qui est observé pour les concentrations d'IL-12 et d'IFN- γ lors de l'activation des LT CD8 naïfs, la quantité d'IL-2 présente dans l'environnement cellulaire et/ou l'intensité d'expression de l'IL-2R lors de la phase d'expansion clonale ont une forte influence sur la qualité de la mémoire générée.

4.2 L'IL-4 module les fonctions des effecteurs et la génération des cellules mémoires

4.2.1 IL-4 et Th2/Tc2

Lors de l'infection d'un individu, la nature de l'agent pathogène influence fortement la réponse immunitaire qui se développe en induisant précocement la sécrétion de différents types de cytokines par les cellules du système immunitaire innée. Les LT CD4 peuvent alors se différencier en différentes classes de T-helper (Th) en fonction du contexte cytokinique dans lequel ils sont activés (Figure 19). La plupart des études ont longtemps mis en avant l'existence de deux types de cellules Th : les Th1, qui se différencient en réponse à des cytokines dites « Th1 » telles que l'IL-12 ou l'IFN γ , interviennent essentiellement dans la réponse contre les virus et les pathogènes intracellulaires et sécrètent des cytokines telles que l'IFN γ . En revanche, une infection par des parasites ou des bactéries extracellulaires induit la sécrétion de grandes quantités d'IL-4 par les cellules de l'immunité innée de façon précoce : les LT CD4 se différencient alors principalement en cellules de type Th2 (Mosmann et al., *J Immunol*, 1986) qui sécrètent des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. Il a plus récemment été mis en évidence l'existence d'autres types de Th comme les Th9, les Th17 et les T-régulateurs (Treg), dont les fonctions principales sont indiquées sur la figure 19 (Kolls et al., *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010 ; Noelle et al., *Nat Rev Immunol*, 2010 ; Vignali et al., *Nat Rev Immunol*, 2008).

Cette dualité de la réponse CD4 a poussé les chercheurs à émettre l'hypothèse qu'il pourrait également exister deux types de LT CD8 générés lors des réponses immunitaires et ayant des propriétés similaires aux Th1/Th2 : les cellules T-cytotoxiques de type 1 et 2 (Tc1 et Tc2). En 1992, une étude de Seder et collègues suggère que dans certaines conditions d'activation, les LT CD8 effecteurs peuvent produire de l'IL-4 (Seder et al., *J Immunol*, 1992). Plusieurs équipes ont par la suite tenté de définir les meilleures conditions pour induire

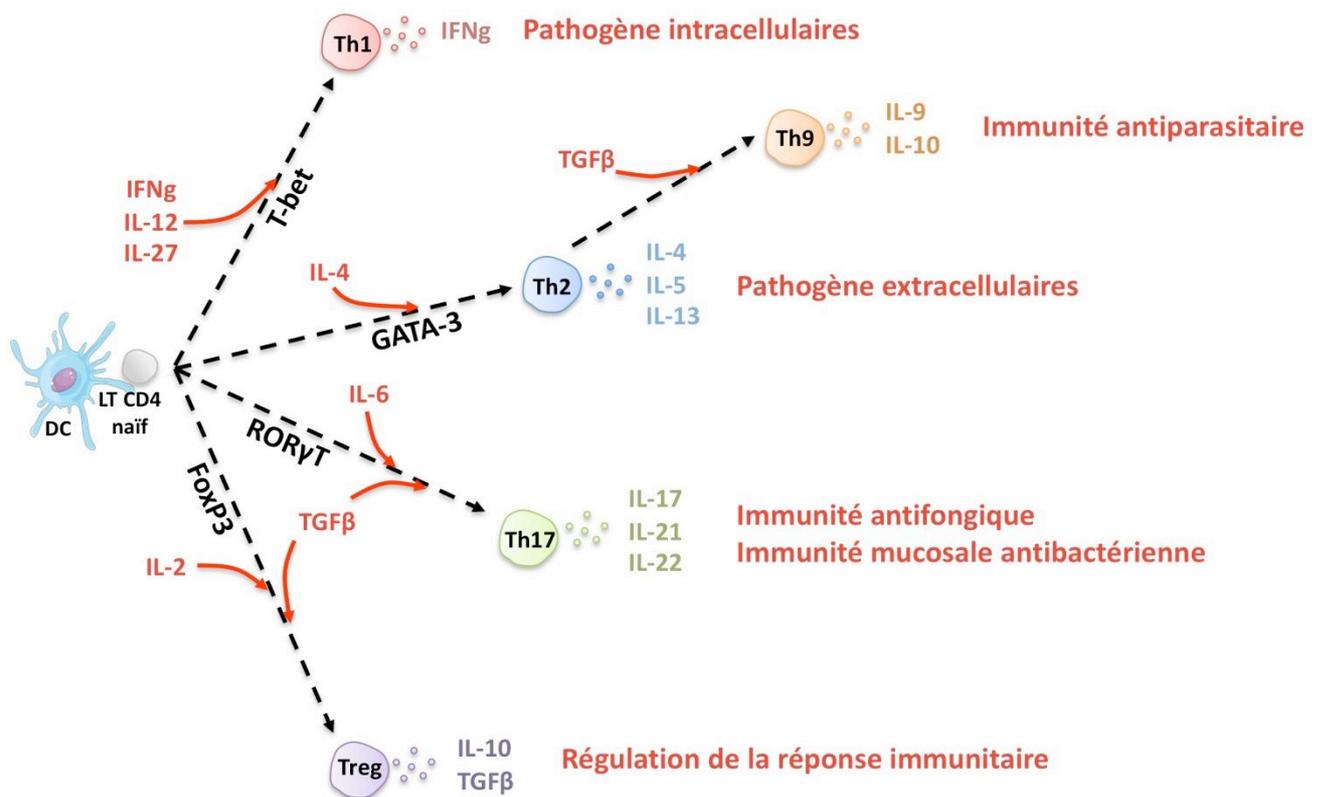


Figure 19 : Voies de différenciation des différents types de T-helpers

Les LT CD4 peuvent se différencier en différents types de Th après activation en fonction de l'environnement cytokinique et sécréter les cytokines nécessaires à leur fonction. Les principaux facteurs de transcription impliqués dans cette différenciation sont également indiqués.

la génération de Tc2 *in vitro* (Noble et al., J Immunol, 1995 ; Chtanova et al., J Immunol, 2001 ; Kemp et al., J Immunol, 2001 ; Kemp et al., Immunology, 2005). Cependant, la diversité des modèles proposés rend difficile l'interprétation de ces différentes études menées dans des conditions *in vitro* (tableau 3). Ces études montrent en revanche qu'il est possible, *in vitro*, de générer des Tc2 sécréteurs d'IL-4. L'existence des cellules Tc2 *in vivo* est constatée dans certaines pathologies chroniques chez l'homme : c'est ainsi le cas dans des pathologies virales (Maggi et al., J Exp Med, 1994), tumorales (Ito et al., Cancer Res, 2005 ; Anichini et al., Blood, 2006), asthmatique (Ying et al., J Immunol, 1997), neurologiques (Ochi et al., J Neuroimmunol, 2001), ou autoimmunes (Inaoki et al., J Clin Immunol, 2003). Cependant, la fonction de ces cellules est à l'heure actuelle mal décrite.

4.2.2 L'IL4 module les fonctions des LT CD8 effecteurs

Les effets de l'IL-4 sur les fonctions des LT CD8 effecteurs ont été étudiés *in vivo* dans des modèles variés (tableau 4). Ces études font en effet appel à des virus recombinant induisant l'expression de l'IL-4 (Aung et al., J Immunol, 2000 ; Jackson et al., J Virol, 2001 ; Rolph et al., Microbes and Infection, 2003), des tumeurs sécrétant de l'IL-4 (Olver et al., Cancer Res, 2006), ou des modèles d'infection par des parasites tel que *Plasmodium Yoelii* (P. *Yoelii*) (Carvalho et al., Nat Med, 2002).

Ces différentes études montrent que l'IL-4 inhibe les capacités cytotoxiques des LT CD8 effecteurs *in vivo* (Aung et al., J Immunol, 2000) et *in vitro* (Jackson et al., J Virol, 2001 ; Rolph et al., Microbes and Infection, 2003 ; Olver et al., Cancer Res, 2006 ; Villacres et al., 1999). Olver et collègues montrent que les LT CD8 effecteurs générés *in vivo* en réponse à des cellules tumorales sécrétant de l'IL-4 expriment plus faiblement Gzm-A, Gzm-B et ont des propriétés cytotoxiques diminuées. En revanche, les sécrétions d'IFN γ et de la

Article	Protocole de génération de Tc2	fonctions
Seder et al. J Immunol 1992	- Activation : 5 jours anti-CD3 + IL-2 + IL-4 - Read-out : re-stimulation anti-CD3 + IL-2	Augmentation de la fréquence de LT CD8 producteurs d'IL-4
Noble et al. J Immunol 1995	- Activation : 6 jours PMA + Ionomycine + IL-2 + IL-4 - Read-out : re-stimulation PMA + Ionomycine 6h	Présence d'ARNm codant pour l'IL-4 dans les LT CD8
Chtanova et al. J Immunol 2001	- Activation : 5 jours anti-CD3 + anti-CD28 + IL-6 + IL-4 Puis 2 jours IL-2 seul - Read-out : re-stimulation anti-CD3 24h Remarque : génération de Tc1 : même protocole sans IL-4	Augmentation de la quantité d'ARNm codant pour l'IL-4 dans les Tc2 comparé aux Tc1 (RT-PCR)
Kemp et al. J Immunol 2001	- Activation 5 jours anti-CD3 + anti-CD28 + IL-6 + IL-2 + IL-4 Puis 2 jours IL-2 seul - Read-out : re-stimulation anti-CD3 24h Ou transfert adoptif de Tc1 ou Tc2 dans des hôtes après greffe de tumeur et comparaison du rejet Remarque : génération de Tc1 : même protocole sans IL-4	Augmentation de la sécrétion d'IL-4 par les Tc2 comparé aux Tc1 (ELISA) Rejet plus efficace des tumeurs par les Tc1 que les Tc2
Kemp et al. Immunology 2005	- Activation 5 jours anti-CD3 + anti-CD28 + IL-6 + IL-2 + IL-4 - Read-out : re-stimulation anti-CD3 24h Remarque : génération de Tc1 : même protocole sans IL-4	Augmentation de la sécrétion d'IL-4 et d'IL-5 par les Tc2 comparé aux Tc1 (ELISA)

Tableau 3 : Génération de Tc2 dans différentes études et fonctionnalité des Tc2 comparée aux Tc1

Perforine ne sont pas altérés (Olver et al., Cancer Res, 2006). De même, les études de Rolf et collègues et Jackson et collègues utilisant respectivement un virus Vaccine recombinant ou un virus Ecmelia recombinant induisant la production d'IL-4 par les cellules infectées montrent une réduction de l'activité cytotoxiques de LT CD8 effecteurs générés, tandis que la sécrétion d'IFN γ n'est pas affectée (Jackson et al., J Virol, 2001 ; Rolph et al., Microbes and Infection, 2003).

Une étude de Carvalho et collaborateurs montre par ailleurs que l'IL-4 secrété par les LT CD4 est indispensable au soutien de la prolifération des LT CD8 activés en réponse à une infection par *P. Yoelii*. Les auteurs montrent que la déplétion des LT CD4 provoque suite à une infection par ce parasite une forte diminution du nombre de LT CD8 effecteurs générés, bien que la prolifération initiale soit identique. Ils observent que ce phénotype est semblable à celui observé dans des souris *stat6*^{-/-} ou *il4*^{-/-} et font la démonstration que l'IL-4 produit par les LT CD4 lors de la réponse primaire contre *P. Yoelii* est indispensable à une prolifération soutenue des LT CD8 (Carvalho et al., Nat Med, 2002).

4.2.3 L'IL-4 intervient dans la génération des LT CD8 mémoires en réponse à *P. Yoelii*

En 2005, Morrot et collègues utilisent un modèle similaire pour mettre en évidence l'importance de l'IL-4 dans le développement de LT CD8 mémoires fonctionnels après une infection par *P. Yoelii* (Morrot et al., J Exp Med, 2005). L'étude montre que le nombre de LT CD8 *il4r*^{-/-} mémoires résidant en périphérie suite à une telle infection est très fortement diminué, tandis que le nombre de cellules mémoires résidant dans les organes lymphoïdes est inchangé. De façon cohérente avec ce phénotype, la réponse à un challenge secondaire par *P. Yoelii* dans ces souris est presque totalement abrogée. Par ailleurs, cela ne s'explique pas par une diminution des fonctions effectrices des LT CD8 mémoires générés : en effet, des LT CD8 *il4r*^{-/-} mémoires transférés dans des souris sauvages sont capables de migrer vers les organes périphériques et de protéger l'hôte contre une infection secondaire. De plus, cet effet est précoce : les auteurs réalisent des expériences de neutralisation de l'IL-4 *in vivo* à différents stades de l'infection qui montrent que l'IL-4 agit sur les LT CD8 dans les premiers jours après l'infection primaire (Morrot et al., J Exp Med, 2005). Finalement, cette étude montre que dans certaines infections, l'IL-4 joue un rôle précoce important sur les LT CD8 en

Modèle	Article	Effet de l'IL-4 sur les LT CD8
Virus recombinant induisant la sécrétion d'IL-4 par les cellules infectées	Aung et al., J Immunol, 2000	- Diminution de la cytotoxicité <i>in vivo</i>
	Rolph et al., Microbes and Infections, 2003	- Diminution de la cytotoxicité <i>in vitro</i> - Niveau d'IFN γ normal
	Jackson et al., J Virol, 2004	- Diminution de la cytotoxicité <i>in vitro</i> - Niveau d'IFN γ normal
Tumeur recombinante sécrétant de l'IL-4	Olver et al., Cancer Res, 2006	- Diminution de la cytotoxicité <i>in vitro</i> - Faibles niveaux de Gzm-A et Gzm-B - niveaux de Perforine et d'IFN γ normaux
Parasite	Carvalho et al., Nat Med, 2002	- Soutien de la prolifération des LT CD8 activés - Régulation de la migration vers la périphérie (foie)

Tableau 4 : Modèles d'étude des effets de l'IL-4 sur les LT CD8 au cours de la différenciation des effecteurs

régulant leurs capacités migratoires vers la périphérie, où elles représentent un important rempart contre l'infection.

4.3 L'IL-21 participe au maintien de la fonctionnalité des effecteurs lors des infections chroniques

En 2009, trois publications mettent en évidence le rôle de l'IL-21 dans le soutien des LT CD8 lors d'infections virales chroniques (Elsaesser et al., Science, 2009 ; Yi et al., Science, 2009 ; Fröhlich et al., Science, 2009). Les auteurs utilisent des modèles d'infection par le virus LCMV dans lesquels l'infection évolue en pathologie chronique contrôlée par l'organisme en 60 jours environ. Le contrôle de l'infection est dépendant des LT CD8, cependant Yi et collègues montrent que les LT CD4 soutiennent les fonctions des LT CD8 en sécrétant une cytokine que les trois études identifient comme étant l'IL-21. En absence d'IL-21 ou lorsque les LT CD8 n'expriment pas le récepteur de l'IL-21, la pathologie n'est pas contrôlée. Les études montrent que cela est dû à une forte diminution du nombre de LT CD8 effecteurs et une réduction de leurs fonctions effectrices en absence de signal IL-21. L'étude d'Elsaesser et collègues montre que l'IL-21 agit également sur les LT CD4 en limitant leur production d'IL-2, ce qui suggère que l'IL-21 et l'IL-2 pourraient avoir des effets antagonistes (Elsaesser et al., Science, 2009). L'IL-21 semble donc indispensable au contrôle des infections chroniques par les LT CD8. En revanche, l'étude de Fröhlich et collègues montre que l'IL-21 n'est pas indispensable à la résolution de l'infection en réponse mémoire : des souris *il21^{-/-}* ayant résolu une infection par une souche non chronique de LCMV sont capables de répondre efficacement contre une infection secondaire par une souche chronique (Fröhlich et al., Science, 2009).

Les études d'Elsaesser et Fröhlich suggèrent que l'IL-21 n'intervient pas dans la réponse contre une infection aiguë par le virus LCMV. Deux études ont par la suite montré que l'IL-21 intervient dans le soutien des fonctions des LT CD8 lors de ce type d'infections (Yi et al., J Immunol, 2010 ; Barker et al., Eur J Immunol, 2010). L'étude de Yi montre en effet qu'en absence d'IL-21, la génération de LT CD8 effecteurs polyfonctionnels est diminuée en réponse primaire et secondaire au virus LCMV souche Armstrong, souche dont l'infection induit une réponse aiguë. En revanche, l'étude montre que l'IL-21 n'intervient pas

dans la différenciation des LT CD8 en cellules mémoires. L'étude de Barker et collègues compare le rôle de l'IL-21 dans la réponse à une infection par le virus Vaccinia à une réponse à une infection par un Adénovirus, deux infections dont la résolution est respectivement indépendante et dépendante de l'aide apportée par les LT CD4. L'étude montre que l'IL-21 intervient uniquement lors de la réponse à l'Adénovirus en soutenant la prolifération des LT CD8 et en retardant leur entrée en apoptose par l'inhibition de l'expression de TRAIL à leur surface. Cependant, l'ensemble de ces études suggère fortement que l'effet de l'IL-21 sur les LT CD8 est plus important en réponse chronique qu'en réponse aiguë.

Plusieurs études ont par ailleurs évalué le rôle de l'IL-21 dans le rejet de tumeurs par les LT CD8. Les études de Hinrich et Moroz montrent que l'IL-21 augmente le rejet par les LT CD8 de tumeurs greffées (Hinrich et al., Blood, 2008 ; Moroz et al., J Immunol, 2004). Les deux études comparent les effets de l'IL-2 et de l'IL-21 dans la réponse anti-tumorale des LT CD8 et montrent que l'IL-21 active l'expansion clonale des LT CD8 en réponse à un challenge tumoral. L'étude de Hinrich et collègues montre par ailleurs que l'IL-21, au contraire de l'IL-2, limite l'acquisition de fonctions effectrices comme la sécrétion de Gzm-B, notamment en inhibant l'expression d'Eomes. En revanche, l'étude de Moroz et collègues suggère que les LT CD8 effecteurs se différenciant en présence d'IL-21 ont des capacités cytotoxiques semblables à celles des LT CD8 générés en présence d'IL-2 en réponse primaire, et supérieures en réponse secondaire. Les deux études utilisant des systèmes tumoraux différents, il est difficile de conclure sur le rôle de l'IL-21 dans l'acquisition des fonctions effectrices des LT CD8. Cependant, les deux études montrent que cette cytokine active le rejet des tumeurs par les LT CD8. Une étude de Sondergaard et collègue dans un modèle d'induction de tumeurs par un chimique dans des souris sauvages, *il21^{-/-}* ou *il21r^{-/-}*, suggère en revanche que l'IL-21 n'intervient pas dans le rejet de ce type de tumeurs (Sondergaard et al., J Immunol, 2009).

4.4 Rôle de l'IL-7 et de l'IL-15

Comme nous l'avons vu dans la première partie, l'expression de l'IL-7R α est rapidement inhibée suite à l'activation des LT CD8 naïfs et sa réexpression est un marqueur de précurseur de cellules mémoires. Il est possible que cette diminution ait pour fonction de maintenir constant le niveau d'IL-7 présent dans l'environnement malgré la forte

augmentation du nombre de cellules dans les organes secondaires suite à la phase de prolifération (figure 1).

Deux études ont montré que cette ré-expression préférentielle de l'IL-7R α par les MPEC n'est suffisante pour induire leur survie et de leur différenciation en cellules mémoires. En effet, Hand et collègues en 2007 et Haring et collègues en 2008 ont montré que l'expression forcée de ce récepteur par les LT CD8 effecteurs lors d'une réponse anti-virale ou anti-bactérienne ne se traduit pas par une augmentation du nombre de cellules mémoires générées, indiquant que l'expression de l'IL-7R α n'est pas suffisante pour induire la génération de cellules mémoires. Ces études montrent par ailleurs que l'expression de l'IL-7R α par les SLEC ne se traduit pas non plus par une meilleure survie de cette population lors de la phase de contraction (Hand et al., PNAS, 2007 ; Haring et al., J Immunol, 2008).

L'IL-15 intervient également dans le soutien de la réponse primaire et mémoire. Oh et collaborateurs montrent en effet, en utilisant l'IL-15 comme adjuvant dans un modèle de réponse au virus Vaccinia, que cette cytokine augmente le nombre de cellules mémoires générées ainsi que leur persistance (Oh et al., PNAS, 2003). Une seconde étude montre que les LT CD8 effecteurs générés en présence d'IL-15 expriment TRAIL et BAX plus faiblement, mais expriment Bcl-x_L plus fortement (Oh et al., PNAS, 2008). Ainsi, l'IL-15 limite la contraction de la réponse des LT CD8 effecteurs. L'IL-15 intervient aussi dans la sélection des clones les plus réactifs au cours de la réponse immunitaire. En effet, Oh et collaborateurs montrent que les LT CD8 activés suite à une interaction de haute affinité expriment de plus forts niveaux d'IL-15R α , ce qui favorise leur survie au cours de la contraction. D'autre part, l'IL-15 induit chez ces clones une plus forte expression des corécepteurs CD8 α et CD8 β , augmentant leur fonctionnalité (Oh et al., PNAS, 2004).

CONCLUSION

Au cours de cette introduction, nous avons vu que la qualité de la population de LT CD8 effecteurs générés suite à l'activation résulte de l'intégration de différents signaux par les LT CD8 naïfs lors de leur activation : la force et la durée de l'interaction TCR/CMH-p, l'engagement de récepteurs de costimulation, et la présence de cytokines inflammatoires dans l'environnement cellulaire. Cependant, la qualité du milieu environnant lors de la phase de prolifération peut également modifier les propriétés des effecteurs. Certaines cytokines de la famille γ_c comme l'IL-2, l'IL-4 ou l'IL-21 ont un rôle important dans la régulation des fonctions des LT CD8 effecteurs générés. Nous avons ainsi vu que l'IL-4 inhibe les propriétés cytotoxiques des LT CD8 effecteurs, tandis que l'IL-21 est indispensable au soutien des fonctions des LT CD8 en cas d'infection chronique.

Par ailleurs, l'intégration de ces signaux régule aussi la qualité de la population de LT CD8 mémoires générée. Nous avons vu que ces cellules ont des caractéristiques particulières leur permettant de répondre plus rapidement et plus efficacement lors d'une seconde rencontre avec l'organisme. Cela a pour origine l'amélioration de deux types de paramètres par rapport aux LT CD8 naïfs : quantitatifs d'une part, puisque les LT CD8 mémoires spécifiques d'un antigène sont présents en fréquence plus élevée, et qualitatifs d'autre part, puisque les LT CD8 mémoires prolifèrent plus rapidement en cas de nouvelle stimulation, et ont des fonctions effectrices améliorées : ils peuvent ainsi éliminer leurs cellules cibles plus rapidement mais également participer à l'amplification de la réponse, notamment par le biais de la sécrétion rapide de chimiokines telles que XCL1 et CCL5. Nous appellerons « fonctions mémoires » dans la suite de cette thèse l'ensemble des fonctions améliorées des LT CD8 mémoires par rapport aux LT CD8 naïfs.

Nous avons également vu que la survie, les capacités de prolifération homéostatique et certaines fonctions mémoires des LT CD8 sont finement régulées par la présence dans l'environnement de différents types de signaux, dont des signaux cytokiniques. Nous avons ainsi vu que le maintien de l'homéostasie des LT CD8, quel que soit leur stade de différenciation, est dépendant de signaux tels que ceux délivrés par les cytokines de la famille γ_c . Tous les membres de cette famille, hormis l'IL-9, interviennent dans le maintien de l'homéostasie des LT CD8, mais certaines données de la bibliographie montrent également ces cytokines régulent l'expression de certaines fonctions effectrices des LT CD8. Ainsi,

l'équipe a montré que l'IL-4 inhibe la sécrétion rapide de la chimiokine CCL5, une des fonctionnalités mémoires.

Notre travail a donc porté sur l'identification des fonctionnalités mémoires des LT CD8 régulées par l'IL-4, ainsi que sur la régulation de l'acquisition de ces fonctions lors de l'activation cellulaire par l'IL-4 et les cytokines de la famille γ c.

RESULTATS

1. Partie 1 : l'IL-4 module les fonctions des LT CD8 mémoires

Negative regulation of NKG2D expression by IL-4 in memory CD8 T cells

Erwan Ventre^{1,2,3}, Lillia Brinza^{1,2,3,°}, Stephane Schicklin^{1,2,3,°}, Julien Mafille^{1,2,3}, Charles-Antoine Coupet^{1,2,3}, Antoine Marçais^{1,2,3}, Sophia Djebali^{1,2,3}, Virginie Jubin^{1,2,3}, Thierry Walzer^{1,2,3} and Jacqueline Marvel^{1,2,3}

°Contributed equally to this work

¹Université de Lyon, France; ²INSERM, U851, 21 avenue Tony Garnier, Lyon, F-69007, France ; ³ *Université Lyon1, UMS3444 / US8, France;*

Corresponding author:

Dr Marvel Jacqueline, PhD, INSERM U851, 21 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon

Tel: 33 (0)4 37 28 23 50, Fax: 33 (0)4 37 28 23 41, e-mail: Jacqueline.marvel@inserm.fr

Abstract

IL-4 is one of the main cytokines produced during Th2 inducing pathologies. This cytokine has been shown to affect a number of immune processes such as T-helper differentiation and innate immune responses. However, the impact of IL-4 on CD8 T cell responses remains unclear. Here, we analyzed the effects of IL-4 on global gene expression profiles of antigen-induced memory CD8 T cells. Gene ontology analysis of this signature revealed that IL-4 regulated most importantly genes associated with immune responses. Moreover, this IL-4 signature overlapped with the set of genes preferentially expressed by memory CD8 T cells over naïve CD8 T cells. In particular, IL-4 down regulated *in vitro* and *in vivo* in a STAT6-dependent manner the memory-specific expression of NKG2D, thereby increasing the activation threshold of memory CD8 T cells. This phenomenon could have an important clinical relevance as patients affected by Th2 pathologies such as parasitic infections or atopic dermatitis often suffer from viral-induced complications possibly linked to inefficient CD8 T cell responses.

Introduction

Immunological memory, a hallmark of the adaptive immune system, is the basis for protection against previously encountered antigens and thus the ultimate goal of vaccination. Long-term CD8 T-cell immunity is provided by an increased number of antigen Ag-specific precursors, which persist over time^{1,2} and display stronger and faster effector functions^{3,4}. Indeed, following activation, the production of certain soluble effectors as well as the display of cytolytic activity is strongly accelerated in memory cells compared to naive cells. We have previously demonstrated that, unlike naive cells, resting memory CD8 T cells produce CCL5/RANTES protein immediately upon TCR triggering⁵. This immediate CCL5 secretion correlates with the maintenance of high levels of stored CCL5 mRNA. These elevated CCL5 mRNA levels have been observed in memory CD8 T cells generated in a variety of systems⁵⁻⁷. They are maintained through constitutive transcription of the *ccl5* gene and increased stabilization of the mRNA⁸. The increased efficiency of memory CD8 responses also results from their lower activation threshold compared to naïve cells. This results from the selection into the memory subset of CD8 T cells expressing TCR with a higher affinity for their cognate MHC-peptide complex, but also from the constitutive expression of surface costimulatory receptors, such as NKG2D⁹. This receptor was first described as an activating receptor expressed at the surface of NK cells^{10,11}, but is also expressed at the surface of activated and memory CD8 T cells, where it can act as a costimulatory receptor¹²⁻¹⁴. Indeed, under limited TCR stimulation engagement of NKG2D increases the proliferation and effector functions of CD8 T cells¹⁵. This costimulatory function of NKG2D contributes to the efficient recall CD8 response against certain viral infections^{16,17} and hence is one of the molecules responsible for the increased responsiveness of memory CD8 T cells.

Numerous studies have focused attention on the role of common gamma chain (γ_c) cytokines, such as IL-7 or IL-15 in memory CD8 T cell persistence¹⁸⁻²⁵. Both cytokines are

essential for memory CD8 T cell homeostasis. More recently, the injection of IL-2/anti-IL-2 Ab complex that increases the IL-2 biological activity was shown to induce the homeostatic proliferation of memory CD8 T cells in mice¹⁸. Unexpectedly a similar approach using IL-4/anti-IL-4 ab complex also induced the proliferation of memory-phenotype CD8 T cells, suggesting a role for IL-4 in the maintenance of memory cells¹⁸. Likewise, proliferation of memory-phenotype CD8 T cells was observed in response to IL-4 produced following NKT activation²⁶. IL-4 acted directly on CD8 T cells as neither *Stat6*- nor *Il4ra*- deficient CD8+ T cells did proliferate when NKT cells were stimulated to produce IL-4²⁶. IL-4 produced by Th2 CD4 cells induced by parasitic infection or allergen were also shown to induce STAT6 phosphorylation²⁷ and homeostatic proliferation of memory phenotype CD8 T cells²⁸. Recently, It has been shown that IL-4 produced by NKT cells drives the differentiation of CD8 single-positive thymocytes into memory-like CD8 T cells that have recently been renamed innate CD8 T cells²⁹⁻³¹. These cytokine-induced innate CD8 T cells display a surface phenotype similar to pathogen-induced memory CD8 T cells, and share certain memory traits such as surface expression of CXCR3 or extemporaneous production of IFN γ in response to TCR-triggering^{30,31}.

IL-4 has been shown to regulate CD8 T cell immune functions as well. For instance, IL-4 has been shown to be essential for the development of a protective anti-malaria CD8 T cell response^{32,33}, in contrast, to other studies where the CD8 mediated protection against viruses or tumours was impaired by IL-4³⁴⁻³⁶. However, the nature of the genes and underlying effector functions regulated by IL-4 in CD8 T cells remain unknown.

To address this issue, we have performed whole genome expression microarray analysis to identify a gene signature that is specifically regulated by IL4 in memory CD8 T cells. To decipher the potential impact of IL-4 on memory functions we have focused on genes that are differentially expressed by memory cells compared to naive cells and that are

involved in the increased responsiveness associated with memory cells. We showed that IL-4 affects the expression of a number of genes associated with memory CD8 T cells among which *Ccl5* and *Nkg2d* and we demonstrated that IL-4 impairs NKG2D mediated costimulation of memory CD8 T cells.

Results

Determination of the IL-4 gene-expression signature in T_{IM} memory CD8 T cells.

To evaluate the impact of IL-4 on memory CD8 T cell functions, we used F5 TCR transgenic CD8 T cells previously stimulated under sterile inflammatory conditions (T_{IM} memory CD8 T cells) as previously described³⁷. Using pan-genomic microarrays, we compared gene expression patterns of sorted T_{IM} either freshly isolated (*ex vivo*) or incubated *in vitro* 20 hours in presence or absence of IL-4. Arrays were analysed as described in the methods. The IL4 gene-expression signature of memory CD8 T cells (thereafter called “IL-4 signature”), corresponding to genes that saw their expression level modified by IL-4 compared to *ex-vivo* and to control *in vitro* incubation, was defined using the analysis procedure described in supplementary figure 1. Among the 245 genes defined using this approach, 81 were down regulated and 164 were up regulated (supplementary table 1). The strength of this signature was demonstrated by its capacity to segregate, by hierarchical clustering, an independent set of arrays performed with T_{IM} memory cells that were treated with IL-4 or not (figure 1A). To provide independent validation of the array analysis we measured, for a subset of genes, changes in gene or protein expression by quantitative real-time PCR or flow cytometry on purified T_{IM} memory CD8 T cells treated with IL-4 (figure 1B). In agreement with array results, *Myb*, *Reck* and *Ccl5* gene expressions were strongly inhibited by IL-4 while *Bcl2* gene expression was up-regulated. Likewise, IL-4R α , GP49a and Eomes protein expression were induced by IL-4 (Figure 1C). We used Fatigo (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>) to find significant enrichment in biological process ontology terms associated with the genes in the IL-4 signature³⁸. IL-4 impacted on the expression of genes involved in multiple biological processes (supplementary table 2), the most significant one being “immune response” with in particular regulation of multiple cytokines/chemokines/cytokine receptors (Lif, Lta, Ccl5, IL2Ra, IL4Ra, IL18bp). A number of genes that are involved in CD8 T cells function or

activation, such as *Ccl5*, *Klrk1*, *Cd55*, *Lyst* or *Trat1*, were also targeted by IL-4 suggesting that CD8 T cell functions might be modified following IL-4 encounter.

Improved effector functions of memory CD8 cells are associated with differential expression of certain genes when compared with naïve cells. Thus, to analyse the impact of IL-4 on the functionality of memory CD8 T cells we searched within the “IL-4 signature” for genes that are specifically associated with memory cells. To establish the T_{IM} memory cells associated gene signature (thereafter called “memory signature”), the gene expression profile of T_{IM} memory CD8 T cells and naïve CD8 T cells were compared. 310 genes differed in their expression level between these two populations (sup table 3). We identified 12 genes shared between the IL-4 and the memory signatures (table 1). In agreement with previous results⁸, we found *Ccl5* to be part of these genes. We also identified the *Klrk1* gene also known as *Nkg2d* that codes for an activating NK cell receptor.

IL-4 regulates NKG2D expression in memory CD8 T cells via a Jak/STAT6-dependent pathway.

NKG2D is expressed by activated and memory CD8 T cells in the mouse and can serve as a costimulatory receptor inducing increased proliferation, IFN γ secretion and cytotoxicity³⁹. Down-regulation of this receptor by IL-4 could thus impair memory CD8 T cell activation. We first sought to confirm the effects of IL-4, *in vitro*, on *Nkg2d* expression by T_{IM} memory CD8 T cells. These cells are generated under inflammatory conditions and are arrested at an early stage of memory differentiation³⁷. In addition, to extend these results to pathogen-induced memory CD8 T cells, we also generated F5 memory CD8 T cells by immunising mice with a recombinant vaccinia virus expressing the NP68 epitope recognised by the F5 TCR⁴⁰. Memory cells generated in response to vaccinia virus belong to the T_{CM} or T_{EM} subset (supplementary figure 2) and therefore will be designated hereafter as T_{CM}/T_{EM}. We measured the expression of NKG2D by these memory subsets using flow cytometry. As depicted in

figure 2A, we observed that NKG2D is expressed by all T_{CM}/T_{EM} and by the majority of T_{IM}. We then measured the effects of IL-4 on *Nkg2d* expression by culturing purified CD8 T cells in presence or absence of IL-4. *Nkg2d* mRNA levels were strongly down-regulated in all memory subsets following a 20 hours incubation with IL-4. *Ccl5* and *Bcl2* mRNA that are respectively down and up regulated by IL-4 in T_{IM} were similarly modified in T_{CM}/T_{EM}. Moreover, at the protein level, NKG2D expression by T_{IM} was also reduced after the incubation with IL-4. However, there was no significant effect of IL-4 on the surface expression of NKG2D in T_{CM}/T_{EM}, suggesting that the half-life of the NKG2D protein in these subset might be longer than in T_{IM}.

IL-4 signals through its receptor IL-4Ra and common γ c chain and activates the JAK1 and JAK3 kinases leading to STAT6 activation. We have previously shown that in memory CD8 T cells *Ccl5* expression is down-regulated by IL-4 in a STAT6-dependant manner⁸. Thus, we investigated if STAT6 was also involved in the regulation of *Nkg2d* expression by IL-4 in T_{IM}. T_{IM} memory cells were generated in F5 WT or F5 *Stat6*^{-/-} mice and the impact of IL-4 on the level of *Nkg2d* mRNA was measured. Results in figure 2D show that IL-4 was unable to induce the down regulation of *Nkg2d* mRNA in *Stat6*-invalidated cells, indicating that *Nkg2d* regulation by IL-4 is dependent on the JAK/STAT6 pathway. This seems to be the case for a large fraction of genes in the IL-4 gene expression signature. Indeed, we found that the IL-4 signature that we identified here was highly significantly enriched in STAT6-regulated genes identified by Wei and colleagues using deep sequencing of promoters bound to immunoprecipitated STAT6 in CD4 T cells (sup table 4)⁴¹.

IL-4 induced innate CD8 T cells do not express NKG2D or CCL5.

To test the impact of IL-4 on CD8 T cells *in vivo*, we injected mice with IL-4/anti-IL-4 mAb complexes (IL-4C). This has been shown to induce memory CD8 T cells proliferation *in*

*in vivo*¹⁸ and to mimic the impact of IL-4 on CD8 T cells that is observed during a Th2 response induced by parasites or allergens²⁸. These complexes are used because recombinant IL-4 has a very short half-life *in vivo* and it has been shown that its association with the anti-IL-4 mAb 11b11 increases both bioavailability and half-life of IL-4 in the mouse⁴². We first monitored the impact of IL-4 on endogenous naïve CD8 T cells. In accordance with previous reports, we found that treating C57Bl/6 mice with IL-4C for 4 or 7 days induced CD8 T cell proliferation as well as an accumulation of CXCR3⁺/CD44^{int} innate CD8 T cells (figure 3A,B). This was associated with a strong up-regulation of Eomes expression (figure 3C), a transcription factor involved in the generation of these innate CD8 T cells in response to IL-4^{31,43}. IL-4 acted directly on CD8 T cells as IL-4 had no effect on CXCR3/CD44/Eomes expression in STAT6 deficient CD8 T cells adoptively transferred into WT recipients (figure 3D, E).

Using adoptive transfers, we showed that IL-4 was also able to drive the differentiation of naïve F5 CD8 cells into memory like CD8 T cells that expressed increased levels of CXCR3 and Eomes (figure 4A). As previously shown by others, this was associated with the acquisition of the capacity to produce IFN γ in response to TCR engagement (figure 4B)³⁰. However, NKG2D and CCL5, two other hallmarks of T_{CM}/T_{EM} memory cells were not up-regulated by innate CD8 T cells (figure 4C), indicating that IL-4 induced Eomes up-regulation leads only to a partial acquisition of CD8 memory properties.

Next, we wanted to determine whether a physiological source of IL-4 could also have an effect on NKG2D/CCL5 expression by memory CD8 T cells *in vivo*. For this, we took advantage of Balb/c mice in which a previous study clearly established that the majority of naturally occurring memory CD8 T cells were induced by constitutive IL-4 production by PLZF-expressing NKT cells and thus are innate CD8 T cells³⁰. The majority of CXCR3⁺CD44^{int} memory-like cells found in Balb/c mice did not express NKG2D or CCL5 (figure 5A) in contrast to naturally occurring memory cells found in C57bl/6 mice (figure

5B). Thus, IL-4C complexes or NKT cell-produced IL-4 induce a restricted memory CD8 T cell differentiation program characterized by the absence of NKG2D and CCL5.

Decreased expression of NKG2D, in vivo, in response to IL-4 is associated with the inhibition of NKG2D-dependent CD8 T cell activation.

Next, we tested the impact of IL-4 on memory CD8 T cells subsets. F5 T_{IM} memory cells were transferred in C57Bl/6 mice or naïve F5 CD8 T cells transferred in C57Bl/6 mice were challenged with vaccinia virus to generate pathogen-specific F5 T_{CM}/T_{EM}. Mice containing F5 memory CD8 T cells were treated with IL-4C for 4 days, the expression of NKG2D and Eomes was then analysed. As shown in figure 6A Eomes was strongly up-regulated by both subsets of memory cells and the MFI of NKG2D was significantly reduced by both subsets (figure 6B). NKG2D has been shown to deliver a costimulatory signal to memory CD8 T cells. This can be best observed when T cells are stimulated in suboptimal conditions. T_{IM} that had been exposed to IL-4C for 4 days *in vivo* were stimulated *in vitro* with the F5-TCR full agonist NP68 (figure 7A) or the partial agonist NP3R (figure 7B) peptide and the fraction of activated cells was quantified by measuring CD107 exposure, a phenomenon previously found to correlate with activation and the cytotoxic activity⁴⁴. To mimic NKG2D engagement, the anti-NKG2D activating mAb A10 was added to the assay⁴⁵. As shown in figure 7 all T_{IM} memory cells exposed CD107 after 4 hours stimulation with the NP68 full agonist in contrast to the NP3R stimulated cells where only a fraction of cells became CD107 positive. Addition of the NKG2D activating antibody restored full activation of NP3R stimulated control Tim, but was unable to induce NKG2D costimulation of IL-4C treated memory cells (figure 7), thus indicating that *in vivo* IL-4 impaired NKG2D-dependent memory CD8 T cell activation.

Discussion

In the present study, we have evaluated the impact of IL-4 on gene expression profile by memory CD8 T cells. To evaluate the functional impact of IL-4 on one memory CD8 function, we focused on a well-described receptor: NKG2D that is also up-regulated by memory CD8 T cells. Originally described as an activating receptor for NK cells, it has been shown that NKG2D acts as a costimulatory receptor for CD8 T cells. A feature of this receptor is that it can be engaged by multiple ligands, not expressed by healthy tissues, that are rapidly induced in stressed cells such as tumour cells^{13,46,47} or cells infected by viruses^{48,49} or bacteria^{50,51}. We show that, *in vitro*, IL-4 inhibits NKG2D mRNA levels in two subsets of ag-induced memory CD8 T cells, T_{IM} induced by peptide priming and T_{CM}/T_{EM} induced in response to virus. This mRNA down-regulation, led to a concomitant decrease in the surface expression of NKG2D by T_{IM} but not T_{CM}/T_{EM}. The lack of NKG2D surface expression decrease, by T_{CM}/T_{EM} memory cells compared to T_{IM}, could result from their higher NKG2D expression levels, although an increased half-life of the protein in these cells, that are more differentiated cells than T_{IM} memory cells, cannot be excluded. This hypothesis is supported by our *in vivo* results showing that surface expression of NKG2D is significantly decreased at the surface of T_{CM}/T_{EM} after a 4 days treatment with IL-4C (figure 6). Using T_{IM} memory cells we demonstrate that the reduction in NKG2D expression is sufficient to inhibit NKG2D-dependent costimulation of memory CD8 T cells. This could impact the efficiency of memory CD8 T cells responses given that a contribution of NKG2D expression by CD8 T cells has been documented in several pathological context such as bacterial or viral infections^{15,17,52,53}. A diversity of signals can inhibit NKG2D expression such as CD4 T cells-derived soluble NKG2D ligands¹² or cytokines: indeed a number of γ c cytokines have been shown to regulate NKG2D expression in several contexts, but these cytokines come in two flavours, inhibitors or inducers. Indeed, IL-4, like IL-21⁵⁴ decreases NKG2D surface expression by CD8 T cells,

in contrast to IL-2 and IL-15 that sustain NKG2D expression by these cells. The fine-tuning of NKG2D expression by a diversity of signals could be essential to avoid CD8 T cell activation in a context of non-pathological cellular-stress as NKG2D engagement by its ligands leads to a decreased CD8 activation-threshold that could favour activation of autoreactive T cells. Indeed, NKG2D expression has been associated with the development autoimmune diseases such as celiac disease⁵⁵ or diabetes⁵⁶.

Innate-memory cells have been shown to develop in the thymus in response to IL-4³⁰. These cells share several features with pathogen-induced memory cells, such as the capacity for immediate IFN γ secretion in response to TCR engagement or the expression of CXCR3. We show that a 4 days IL-4C treatment *in vivo* is sufficient to induce the differentiation of naive CD8 T cells into innate CD8 cells. However, these memory-like cells lack certain hallmarks of the ag-induced memory cells such as CCL5 secretion and NKG2D surface expression. The function of innate CD8 T cells is not fully understood. It has been proposed that they could act as early sensors of an inflammatory environment during primary infection. Recently, Eomes expressing “memory-like” cells rapidly secreting IFN γ upon TCR triggering have been described in the foetal spleen and thymus at 18 weeks of gestation⁵⁷. These cells could play an important role in the newborn immune response, before the maturation of their immune system.

Finally, we showed that IL-4 modulates the expression of genes that are directly involved in memory CD8 T cell functions. Thus several genes involved in the control of cell proliferation such as Cdk6, Tob1 or Klf6, are regulated by IL-4. Expression of several genes, *Cdh1*, *Itgb7*, *Reck* and *Gelsolin*, coding for proteins controlling cell migration are also affected suggesting that IL-4 could impact this capacity of memory CD8 T cells. Cytokine responsiveness could also be modified: interestingly, IL18bp, an inhibitor of IL-18 signalling is induced by IL-4 in memory CD8 T cells. Recently, Balb/c memory-phenotype CD8 T cells have been shown to

produce lower levels of IFN γ compared with C57Bl/6 mice in response to a combination of IL-12/IL-18⁵⁸. This reduced responsiveness of Balb/c memory phenotype CD8 T cells could result from an increased IL-18bp expression in response to the higher basal levels of IL-4 observed in these mice. Finally, we identified several genes coding for proteins that could play a role in leukocyte activation, such as Klrk1, Klrd1, Cd55, Cd84, Trat1, CCL5 or Trem12, suggesting that IL-4 could modify the activation threshold of memory CD8 T cells.

About 1 billion people in the world are chronically infected with parasites^{59,60} that elicit a strong Th2 immune response. The levels of IL-4 associated with these responses are sufficient to affect a number of immune processes, impairing or deviating the immune response of the host. Thus, an impaired CD8 T cells effector response to vaccinia virus has been observed in a *Schistosoma mansoni* infected host^{61,62}. More recently, it has been shown that IL-4 produced during a parasitic infection with *Nippostrongylus brasiliensis* impairs the innate immune response to a bystander infection with *Mycobacterium tuberculosis*⁶³. Individuals suffering from atopic dermatitis, a pathology also associated with a Th2 immune response, are excluded from voluntary smallpox vaccination due to their predisposition to develop eczema vaccinatum^{64,65}. The IL-4 induced decreased antimicrobial peptide secretion by keratinocytes would be one of the potential mechanisms responsible for this increased susceptibility⁶⁴. Finally, it has also been recently described that, in a breast cancer, TSLP produced by epithelial cancer cells can induce the development of Th2 cells that promote tumour growth⁶⁶. Thus, our results suggest that Th2 derived IL-4 could also impact on the function of pre-existing memory CD8 T cells and contribute to the pleiotropic regulation of the immune response associated with Th2 inducing pathologies.

Material and methods

Mice

F5-TCR transgenic mice were provided by Dr. Kioussis (NIMR, London, U.K.) (REF). *Stat6*^{-/-} mice were provided by S. Akira (Osaka University, Osaka, Japan). C57Bl/6 CD45.2, CD57Bl/6 CD45.1 and Balb/c mice were purchased from Charles River laboratories. CD45.1⁺ F5, *Stat6*^{-/-} F5 and GFP⁺ F5 on a C57Bl/6 background were generated by crossing. Mice were bred in our animal facility “Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris” (Lyon, France) in specific pathogen free conditions. All Experimental procedures were approved by an institutional review board: le Comité d'Evaluations Commun au Centre Léon Bérard, à l'Animalerie transit de l'ENS, au PBES et au laboratoire P4.

Peptides

The full agonist NP68 (ASNENMDAM) was used to activate F5 CD8 T cells (ProImmune, Oxford, UK). In some experiments, cells were also activated with the partial agonist NP3R (ASRENMDAM) (Synt:em, France). This altered peptide ligand was generated by mutating the antigenic peptide in amino acid position predicted to interact with the MHC-I groove⁶⁷.

Memory cells generation

T_{IM} were generated by i.p. injecting twice 50nmol of Influenza A nucleoprotein NP₃₆₆₋₃₇₄ in PBS in naïve thymectomized transgenic F5 mice, as previously described⁶⁸. Antiviral Central Memory and Effector Memory CD8 T cells (T_{CM} and T_{EM}) were generated by immunizing naïve GFP⁺ F5 CD8 T cells with a recombinant vaccinia virus including the NP68 epitope as previously described⁴⁰. Analyses were performed 6 weeks after infection.

Cell culture and cell sorting

The medium used for all cultures was DMEM (Invitrogen Life Technologies) supplemented with 6% FCS (Invitrogen Life Technologies), 50µg/mL gentamicin (Invitrogen Life

Technologies), 2mM L-Glutamin (Invitrogen Life Technologies), 10mM HEPES (Invitrogen Life Technologies) and 50 μ M 2-ME (Invitrogen Life Technologies). To measure the effects of IL-4 *in vitro*, cells were cultured 20 hours at a concentration of 3.10⁶ cells/ml in presence or absence of mIL-4 (Peprotech) at a concentration of 10 ng/mL. For qPCR experiments, spleen and lymph nodes' CD8 T cells were purified by magnetic beads depletion as previously described⁶⁹. Purified CD8 T cells were then stained for surface expression of CD44, CD122, CD8, and T_{IM} and antiviral T_{CM}/T_{EM} were sorted by flow cytometry: T_{IM} were CD8⁺/CD44^{intermediate}/CD122^{intermediate} and antiviral T_{CM}/T_{EM} were CD8⁺/CD44^{high}/GFP⁺. Purity was routinely above 99%.

Administration of cytokines and antibodies in vivo

Age- and gender-matched mice received daily intraperitoneal (ip) injections of a rat IgG1 or a mixture of 1.5 μ g rmIL-4 plus 50 μ g of anti-mouse IL-4 mAb 11B11 (rat IgG1). After 4 or 7 days of treatment, spleen was analyzed by flow cytometry as described below.

MAbs and Flow cytometry

All surface staining were performed at 4°C in PBS (Invitrogen) supplemented with 1% FCS (Lonza) and 0.09% NaN₃ (Sigma-Aldrich). All antibodies were from BD-biosciences, eBioscience and R&D systems. The F5-TCR was detected with NP68-conjugated H-2D^b-APC tetramers from ProImmune. Fixation and permeabilization for intracellular cytokine detection was performed using CytoFix/CytoPerm from BD Pharmingen. All analyses were performed using a LSRII (BD biosciences) and sorting using a FACS Aria (BD biosciences).

RT-qPCR experiments

RNA extraction from naïve CD8 T cells and T_{IM} was performed from 3.10⁵ cells using RNA NOW reagent (Ozyme) and from 3.10⁴ antiviral T_{CM} cells using RNeasy Isolation kit (Qiagen). 100ng of RNA was retro-transcribed into cDNA using iScript cDNA Synthesis Kit

(Biorad), and cDNA was analysed by real-time PCR using the Platinum Sybr Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). Relative gene expression was calculated using *ubiquitin* as the endogenous control housekeeping gene. Primers were as follow: UBIQUITIN forward : 5'-AAGAATTCAGATCGGATGACACACT-3' reverse : 5'-GCCACTTGGAGGTTGACACTTT-3'. NKG2D forward: 5'-CCTGGCAGTGGGAAGATGG-3' reverse: 5'-TTGAGCCATAGACAGCACAGG. CCL5 forward: 5'-GCACCTGCCTCACCATATGG-3' reverse: 5'-AGCACTTGCTGCTGGTGTAG-3'. Myb forward : 5'-CATTTGATGGGGTTTGGGCATG-3' reverse: 5'-GCTTCGGCGATGTGGTAATAGG-3'. Reck forward: 5'-CACTAGCTCATAGGCTGACTCC-3' reverse: 5'-GTGTGAGACAGGCACGAGTG-3'. Ccl5 forward 5'-GCACCTGCCTCACCATATGG-3' reverse 5'-AGCACTTGCTGCTGGTGTAG-3'. Bcl2 forward 5'-CCATCTACCGAGCAAGTGG-3' reverse 5'-ATATAGAGATCACATTGAAGCCTTCTT-3'

Microarrays processing and analysis

1.10⁵ sorted naïve CD8 T cells and T_{IM} *ex-vivo* or incubated 20 hours in presence or absence of IL-4 in culture medium supplemented with IL7 10 ng/mL. mRNAs were extracted using RNeasy kit (Qiagen). 50ng of RNA was amplified using MessageAmp II kit (Ambion) and labelled using IVT labeling kit (Affymetrix). cRNA were fragmented and hybridized on GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix). Raw datas were normalized using RMA and analysed using Genespring Gx 10.0 (Agilent Technologies). To find differentially expressed genes, we performed data analyses thanks to the GeneSpring GX software and "affy" and "limma" Bioconductor/R packages. The R scripts were directly called by the GeneSpring editor. The data preprocessing included probe summarization (RMA technology) and quantile normalization. Probesets were filtered by their expression value: at least one expression value of the retained probesets is higher that the 20 percentile of the raw data. All

comparisons of mRNA expression levels between the groups were performed using LIMMA method (moderated t-statistics). To correct for multiple testing, a false-discovery rate (FDR) of 5% was applied.

Figure legends

Figure 1 : Regulation of gene expression by IL-4 in Tim memory CD8 T cells

T_{IM} memory cells were generated as described in the methods

(A) *T_{IM}* memory cells were sorted (Ex-vivo) and treated 20h in presence (IL-4) or absence (medium) of IL-4. RNA was isolated and subjected to Affymetrix Gene Chip expression analysis as described in the methods. The IL-4 gene-expression signature (supplementary table 1) was used to perform a Hierarchical clustering using euclidian centred algorithm of probesets and samples on an independent set of arrays performed with sorted *T_{IM}* CD8 memory cells, not treated (ex-vivo), incubated 20h in medium in absence (Medium) or presence of IL-4 (IL-4). Results are presented as a heatmap. (B,C) *T_{IM}* memory cells were isolated and incubated 20h in presence or absence of IL-4. Total RNA was isolated and mRNA coding for *c-myb*, *reck*, *ccl5* and *bcl2* was quantified by RT-qPCR (B), or cells were stained for IL-4R α , GP49a and Eomes expression and analysed by flow cytometry (C). The expression fold change observed in the microarray experiment between IL-4-treated and control memory cells is indicated for each gene (Array FC). (B) summary of 3 independent experiments. (C) data representative of at least 5 experiments. (B; mean \pm SEM)

Figure 2 : IL-4 inhibits NKG2D expression by memory CD8 T cells in vitro

(A,B,C) *T_{IM}* memory cells and *T_{CM}*/*T_{EM}* memory cells were generated as described in the methods and NKG2D expression was assessed by flow cytometry (A). *T_{IM}* and *T_{CM}*/*T_{EM}* were isolated and incubated in presence or absence of IL-4 for 20h; Total RNA was isolated and mRNA coding for *Nkg2d*, *Ccl5* and *Bcl2* were quantified using RT-qPCR (B), or NKG2D surface expression was measured by flow cytometry (C). (D) *T_{IM}* memory cells were generated by double peptide immunization of thymectomized F5 or F5 x *stat6*^{-/-} mice. *T_{IM}* were then sorted and incubated 20h in presence or absence of IL-4. RNA was isolated and

*Nkg2d mRNA levels were measured using RT-qPCR. (A,C) data are representative of at least 5 experiments. (B,D) summary of 3 independent experiments. (B,C,D; mean ± SEM) (*p<0.05; **p<0.01; paired student t-test)*

Figure 3 : IL-4C treatment induces innate CD8 T Cells generation in the spleen

*C57Bl/6 mice were daily injected IP either with a control IgG1 or a combination of rmlL-4 and anti-IL-4 11B11. After 4 to 7 days of treatment, spleen was removed and CD8 T cells were analysed by flow cytometry. (A) CD8 T cells number in the spleen of control or IL-4C treated mice after 4 or 7 days. (B) CD44 and CXCR3 expression by CD8 T cells from control or IL-4C treated mice after 4 days. (a) and (b) represent respectively the CXCR3⁺/CD44^{int} and the CXCR3⁺/CD44^{int} populations. (C) Eomes expression by CD8 T cells from control or IL-4C treated mice after 4 days. (D) 3.10⁶ CFSE-labelled Stat6^{-/-} CD45.2 CD8 T cells and 3.10⁶ CFSE-labelled WT CD45.1 CD8 T cells were co-transferred into C57Bl/6 CD45.2 recipient mice. After 4 days of IL-4C treatment, spleen was removed and CFSE-positive CD45.2 (Stat6^{-/-}) and CFSE-positive CD45.1 (WT) CD8 T cells were analyzed for CXCR3 and CD44 expression. (a) and (b) are as in B. (E) 3.10⁶ CFSE-labelled Stat6^{-/-} CD45.2 CD8 T cells and 3.10⁶ CFSE-labelled WT CD45.1 CD8 T cells were co-transferred into C57Bl/6 CD45.2 recipient mice. After 4 days of IL-4C treatment, spleen was removed and CFSE-positive CD45.2 (Stat6^{-/-}) and CFSE-positive CD45.1 (WT) CD8 T cells were analyzed for Eomes expression. (A,B,C) data representative of at least 5 independent experiments. (D,E) summary of 3 independent experiments. . (A,B,C,D,E; mean ± SEM) (*p<0.05; **p<0.01; unpaired student t-test)*

Figure 4: IL-4-induced innate CD8 T cells do not express NKG2D and CCL5

3.10⁶ F5 Naive CD8 T cells were transferred into recipient mice that were daily injected IP either with a control IgG1 or a combination of rmlL-4 and anti-IL-4 11B11. After 4 days of treatment, spleen was removed and CD8 T cells were analyzed by flow cytometry. (A) CXCR3

and Eomes expression by F5 naive CD8 T cells from control or IL-4C treated mice. (B) Intracytoplasmic expression of IFN γ in F5 naive CD8 T cells isolated from control or IL-4C treated mice and stimulated 4 hours with NP68. (C) NKG2D and CCL5 expression by naive F5 CD8 T cells from control or IL-4C treated mice. (A,B,C) summary of 3 independent experiments. (A,B,C; mean \pm SEM) (** p <0.01; unpaired student t-test)

Figure 5: Balb/c mice contain high frequency of memory-phenotype CD8 T cells expressing low levels of NKG2D and CCL5

(A) Frequency of naturally occurring memory CD8 T cells in 6 weeks Balb/c and C57Bl/6 mice. (B) NKG2D and CCL5 expression by naturally occurring memory CD8 T cells in 6 months Balb/c or C57Bl/6 mice. (A,B) summary of 3 independent experiments (A,B; mean \pm SEM) (** p <0.01; unpaired student t-test)

Figure 6: IL-4 inhibits NKG2D expression by memory CD8 T cells in vivo

T_{IM} memory cells were generated as described in the method and $3 \cdot 10^6$ sorted T_{IM} memory cells were injected into recipient mice. T_{CM}/T_{EM} were generated as described in the methods. Recipient mice were then daily injected IP either with a control IgG1 or a combination of rmIL-4 and anti-IL-4 11B11. After 4 days of treatment, spleen was removed and CD8 T cells were analyzed by flow cytometry. (A) Eomes expression by T_{IM} memory cells or T_{CM}/T_{EM} cells from control or IL-4C treated mice after 4 days. (B) NKG2D expression by T_{IM} memory cells or T_{CM}/T_{EM} cells from control or IL-4C treated mice after 4 days. (A,B) summary of 4 independent experiments (A,B; mean \pm SEM) (* p <0.05; ** p <0.01; unpaired student t-test)

Figure 7: IL-4 inhibits NKG2D-dependant costimulation of memory CD8 T cells

T_{IM} memory cells were generated as described in the method. $3 \cdot 10^6$ sorted T_{IM} memory cells were then sorted and injected into recipient mice that were treated daily with a control IgG1 or a combination of rmIL-4 and anti-IL-4 mAb for 4 days. T_{IM} were then recovered and

stimulated in vitro with the F5 TCR full agonist NP68 or the partial agonist NP3R in presence or absence of the NKG2D activating antibody A10 (@NKG2D) for 4 hours. CD107a expression by stimulated T_{IM} memory cells was then assessed using flow cytometry. (A) data representative of 3 independent experiments. (B) summary of 3 independent experiments (B; mean \pm SEM) ($p < 0.05$; unpaired student t-test)*

Supplementary figure 1: determination of the gene expression signatures

Two gene-expression signatures are defined in our paper: the IL-4 gene-expression signature of memory CD8 T cells (Supplementary table 1) and the T_{IM} memory cells gene-expression signature (Supplementary table 2). All the lists of differentially expressed data were obtained with the Limma method analysis (Linear models for microarray analysis⁷⁰). To correct for occurrence of false positives the p-values of the Limma analysis were adjusted with the FDR method, correcting the multiple testing⁷¹. Finally, a cut-off of 0.05 was used for the adjusted p-values. IL-4 gene-expression signature of memory CD8 T cells. To obtain this signature we used the microarrays performed with the T_{IM} memory CD8 T cells in ex vivo, control and IL-4 conditions. The list of probesets differentially expressed between the IL-4 and the control condition (502 probesets) and the list of probesets differentially expressed between the IL-4 and the ex vivo condition (5506 probesets) were intersected to obtain a list of 332 common probesets, having coherent logFC (up-regulated or down-regulated in both comparisons). This list of probesets was summarized to finally propose a list of 245 genes. For summarization we retained only one probeset per gene, the one having the highest absolute logFC. The T_{IM} memory gene-expression signature, composed of 310 genes, is the summarized list of the 402 probesets differentially expressed between the ex vivo T_{IM} memory CD8 T cells and the ex vivo naïve CD8 T cells.

Supplementary figure 2: CD62L profile of the T_{CM}/T_{EM} memory population generated 45 days after infection with vaccinia virus

T_{CM}/T_{EM} were generated as described in the methods. All cells are $CD44^{hi}$ and belong to the T_{CM} ($CD62^{+}$) or T_{EM} ($CD62L^{-}$) subsets.

Table 1: T_{IM} memory cells associated genes that are modulated by IL-4

To identify the Genes shared between the IL-4-gene expression signature and the T_{IM} memory cells associated-gene signature we performed a Venn diagram between the two signatures. The 14 genes belonging to the T_{IM} memory cells associated gene expression signature that are modulated by IL-4 are shown, with additional information the Entrez Id and the fold change observed in the two comparisons performed (a minus symbol is added to indicate a down regulation).

Supplementary Table 1: IL-4 gene expression signature of memory CD8 T cells

The list of 245 gene symbols defining the IL-4 gene expression signature of memory CD8 T cells is presented here with additional information as the gene description, the Entrez Id and the fold change observed in the two comparisons performed (a minus symbol is added to indicate a down regulation).

Supplementary Table 2: Functional analysis of the IL4 signature

Functional annotation and functional analysis of genes forming the IL4 signature were performed with the Babelomics Platform (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>) and FatiGO, the Babelomics tool for the enrichment test. The Gene Ontology terms are regrouped in families. In a family of terms, genes appearing in a higher order functional category were not included in the more specific categories. In each list of genes the down-regulated ones are colored in red.

Supplementary Table 3: T_{IM} memory cells associated gene-expression signature

The list of 310 gene symbols defining T_{IM} memory cells associated gene-expression signature is presented here with additional information as the gene description, the Entrez Id and the fold change observed in the two comparisons performed (a minus symbol is added to indicate a down regulation).

Supplementary Table 4: IL-4 gene-expression signature is enriched in genes regulated by STAT6

We used data from CD4 study^{A1} to confirm the link between the Stat6 transcription factor and our IL4 signature genes. Chip⁺ are the genes identified by chip-seq as presenting a binding site for Stat6 transcription factor in their promoters. Chip⁺ are thus genes directly regulated by Stat6. Reg⁺ are the genes identified using microarray data as being differentially expressed between WT-Th2 and STAT6KO-Th2 conditions (genes presenting a two-fold increase). Reg⁺ are thus genes regulated by Stat6 (directly or non-directly).

Our IL-4 signature is significantly enriched in stat6 bound genes in comparison with a random gene list (Chi2-test, pvalue < 2.2e-16).

Acknowledgments

The authors wish to thank S. Dussurgey and T. Andrieu for cell sorting (AniRA - Cytométrie en Flux), B. Blanquier (AniRA - Analyse Génétique et Vectorologie) and the staff from the Animal house (PBES) for their assistance (UMS3444). The authors wish to thank HB, A. McMichael and DY Teoh for providing the VV-NP68 virus. This work was supported by grants from INSERM, PLATINE and FINOVI. EV is supported by a fellowship from the Ligue Nationale Contre le Cancer.

References

1. Tough DF, Sprent J. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J Exp Med*. 1994;179:1127-1135.
2. Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, et al. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity*. 1998;8:177-187.
3. Pihlgren M, Arpin C, Walzer T, et al. Memory CD44(int) CD8 T cells show increased proliferative responses and IFN-gamma production following antigenic challenge in vitro. *Int Immunol*. 1999;11:699-706.
4. Veiga-Fernandes H, Walter U, Bourgeois C, McLean A, Rocha B. Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat Immunol*. 2000;1:47-53.
5. Walzer T, Marcais A, Saltel F, Bella C, Jurdic P, Marvel J. Cutting edge: immediate RANTES secretion by resting memory CD8 T cells following antigenic stimulation. *J Immunol*. 2003;170:1615-1619.
6. Dorner BG, Steinbach S, Huser MB, Kroczek RA, Scheffold A. Single-cell analysis of the murine chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES and ATAC/lymphotactin by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2003;274:83-91.
7. Swanson BJ, Murakami M, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P. RANTES production by memory phenotype T cells is controlled by a posttranscriptional, TCR-dependent process. *Immunity*. 2002;17:605-615.
8. Marcais A, Tomkowiak M, Walzer T, Coupet CA, Ravel-Chapuis A, Marvel J. 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;36:2745-2754.
9. Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, Raulet DH. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity*. 2002;17:19-29.
10. Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999;285:727-729.
11. Wu J, Song Y, Bakker AB, et al. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*. 1999;285:730-732.
12. Cerboni C, Ardolino M, Santoni A, Zingoni A. Detuning CD8+ T lymphocytes by down-regulation of the activating receptor NKG2D: role of NKG2D ligands released by activated T cells. *Blood*. 2009;113:2955-2964.
13. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. 2002;419:734-738.
14. Roberts AI, Lee L, Schwarz E, et al. NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J Immunol*. 2001;167:5527-5530.
15. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol*. 2001;2:255-260.

16. Jonjic S, Polic B, Krmpotic A. Viral inhibitors of NKG2D ligands: friends or foes of immune surveillance? *Eur J Immunol.* 2008;38:2952-2956.
17. Walsh KB, Lanier LL, Lane TE. NKG2D receptor signaling enhances cytolytic activity by virus-specific CD8⁺ T cells: evidence for a protective role in virus-induced encephalitis. *J Virol.* 2008;82:3031-3044.
18. Boyman O, Kovar M, Rubinstein MP, Surh CD, Sprent J. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science.* 2006;311:1924-1927.
19. Goldrath AW, Sivakumar PV, Glaccum M, et al. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8⁺ T cells. *J Exp Med.* 2002;195:1515-1522.
20. Judge AD, Zhang X, Fujii H, Surh CD, Sprent J. Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *J Exp Med.* 2002;196:935-946.
21. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med.* 2000;191:771-780.
22. Kieper WC, Tan JT, Bondi-Boyd B, et al. Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8⁺ T cells. *J Exp Med.* 2002;195:1533-1539.
23. Lodolce JP, Boone DL, Chai S, et al. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity.* 1998;9:669-676.
24. Marks-Konczalik J, Dubois S, Losi JM, et al. IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:11445-11450.
25. Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity.* 1998;8:591-599.
26. Ueda N, Kuki H, Kamimura D, et al. CD1d-restricted NKT cell activation enhanced homeostatic proliferation of CD8⁺ T cells in a manner dependent on IL-4. *Int Immunol.* 2006;18:1397-1404.
27. Perona-Wright G, Mohrs K, Mohrs M. Sustained signaling by canonical helper T cell cytokines throughout the reactive lymph node. *Nat Immunol.* 2010;11:520-526.
28. Morris SC, Heidorn SM, Herbert DR, et al. Endogenously produced IL-4 nonredundantly stimulates CD8⁺ T cell proliferation. *J Immunol.* 2009;182:1429-1438.
29. Vervakakis M, Boos MD, Bendelac A, Kee BL. SAP protein-dependent natural killer T-like cells regulate the development of CD8(+) T cells with innate lymphocyte characteristics. *Immunity.* 2010;33:203-215.
30. Weinreich MA, Odumade OA, Jameson SC, Hogquist KA. T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8⁺ T cells. *Nat Immunol.* 2010;11:709-716.
31. Weinreich MA, Takada K, Skon C, Reiner SL, Jameson SC, Hogquist KA. KLF2 transcription-factor deficiency in T cells results in unrestrained cytokine production and upregulation of bystander chemokine receptors. *Immunity.* 2009;31:122-130.
32. Carvalho LH, Sano G, Hafalla JC, Morrot A, Curotto de Lafaille MA, Zavala F. IL-4-secreting CD4⁺ T cells are crucial to the development of CD8⁺ T-cell responses against malaria liver stages. *Nat Med.* 2002;8:166-170.

33. Morrot A, Hafalla JC, Cockburn IA, Carvalho LH, Zavala F. IL-4 receptor expression on CD8⁺ T cells is required for the development of protective memory responses against liver stages of malaria parasites. *J Exp Med*. 2005;202:551-560.
34. Bot A, Holz A, Christen U, et al. Local IL-4 expression in the lung reduces pulmonary influenza-virus-specific secondary cytotoxic T cell responses. *Virology*. 2000;269:66-77.
35. Jackson RJ, Ramsay AJ, Christensen CD, Beaton S, Hall DF, Ramshaw IA. Expression of mouse interleukin-4 by a recombinant ectromelia virus suppresses cytolytic lymphocyte responses and overcomes genetic resistance to mousepox. *J Virol*. 2001;75:1205-1210.
36. Kemp RA, Ronchese F. Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity. *J Immunol*. 2001;167:6497-6502.
37. Mbitikon-Kobo FM, Vocanson M, Michallet MC, et al. Characterization of a CD44/CD122^{int} memory CD8 T cell subset generated under sterile inflammatory conditions. *J Immunol*. 2009;182:3846-3854.
38. Al-Shahrour F, Diaz-Uriarte R, Dopazo J. FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics*. 2004;20:578-580.
39. Markiewicz MA, Carayannopoulos LN, Naidenko OV, et al. Costimulation through NKG2D enhances murine CD8⁺ CTL function: similarities and differences between NKG2D and CD28 costimulation. *J Immunol*. 2005;175:2825-2833.
40. Cottalorda A, Mercier BC, Mbitikon-Kobo FM, et al. TLR2 engagement on memory CD8(+) T cells improves their cytokine-mediated proliferation and IFN-gamma secretion in the absence of Ag. *Eur J Immunol*. 2009;39:2673-2681.
41. Wei L, Vahedi G, Sun HW, et al. Discrete roles of STAT4 and STAT6 transcription factors in tuning epigenetic modifications and transcription during T helper cell differentiation. *Immunity*. 2010;32:840-851.
42. Finkelman FD, Madden KB, Morris SC, et al. Anti-cytokine antibodies as carrier proteins. Prolongation of in vivo effects of exogenous cytokines by injection of cytokine-anti-cytokine antibody complexes. *J Immunol*. 1993;151:1235-1244.
43. Lee YJ, Jameson SC, Hogquist KA. Alternative memory in the CD8 T cell lineage. *Trends Immunol*. 2011;32:50-56.
44. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods*. 2003;281:65-78.
45. Ho EL, Carayannopoulos LN, Poursine-Laurent J, et al. Costimulation of multiple NK cell activation receptors by NKG2D. *J Immunol*. 2002;169:3667-3675.
46. Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol*. 2002;169:4098-4102.
47. Pende D, Rivera P, Marcenaro S, et al. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res*. 2002;62:6178-6186.
48. Welte SA, Sinzger C, Lutz SZ, et al. Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *Eur J Immunol*. 2003;33:194-203.

49. Rolle A, Mousavi-Jazi M, Eriksson M, et al. Effects of human cytomegalovirus infection on ligands for the activating NKG2D receptor of NK cells: up-regulation of UL16-binding protein (ULBP)1 and ULBP2 is counteracted by the viral UL16 protein. *J Immunol.* 2003;171:902-908.
50. Vankayalapati R, Garg A, Porgador A, et al. Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol.* 2005;175:4611-4617.
51. Tieng V, Le Bouguenec C, du Merle L, et al. Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:2977-2982.
52. Hessmann M, Rausch A, Ruckerl D, et al. DAP10 contributes to CD8(+) T cell-mediated cytotoxic effector mechanisms during Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunobiology.* 2011;216:639-647.
53. Rausch A, Hessmann M, Holscher A, et al. Interleukin-15 mediates protection against experimental tuberculosis: a role for NKG2D-dependent effector mechanisms of CD8+ T cells. *Eur J Immunol.* 2006;36:1156-1167.
54. Burgess SJ, Marusina AI, Pathmanathan I, Borrego F, Coligan JE. IL-21 down-regulates NKG2D/DAP10 expression on human NK and CD8+ T cells. *J Immunol.* 2006;176:1490-1497.
55. Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, et al. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity.* 2004;21:357-366.
56. Ogasawara K, Hamerman JA, Ehrlich LR, et al. NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunity.* 2004;20:757-767.
57. Min HS, Lee YJ, Jeon YK, et al. MHC class II-restricted interaction between thymocytes plays an essential role in the production of innate CD8+ T cells. *J Immunol.* 2011;186:5749-5757.
58. Bou Ghanem EN, Nelson CC, D'Orazio SE. T cell-intrinsic factors contribute to the differential ability of CD8+ T cells to rapidly secrete IFN-gamma in the absence of antigen. *J Immunol.* 2011;186:1703-1712.
59. Bethony J, Brooker S, Albonico M, et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet.* 2006;367:1521-1532.
60. Kamal SM, El Sayed Khalifa K. Immune modulation by helminthic infections: worms and viral infections. *Parasite Immunol.* 2006;28:483-496.
61. Actor JK, Marshall MA, Eltoum IA, Buller RM, Berzofsky JA, Sher A. Increased susceptibility of mice infected with Schistosoma mansoni to recombinant vaccinia virus: association of viral persistence with egg granuloma formation. *Eur J Immunol.* 1994;24:3050-3056.
62. Actor JK, Shirai M, Kullberg MC, Buller RM, Sher A, Berzofsky JA. Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:948-952.
63. Potian JA, Rafi W, Bhatt K, McBride A, Gause WC, Salgame P. Preexisting helminth infection induces inhibition of innate pulmonary anti-tuberculosis defense by engaging the IL-4 receptor pathway. *J Exp Med.* 2011;208:1863-1874.

64. Howell MD, Gallo RL, Boguniewicz M, et al. Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. *Immunity*. 2006;24:341-348.
65. Kawakami Y, Tomimori Y, Yumoto K, et al. Inhibition of NK cell activity by IL-17 allows vaccinia virus to induce severe skin lesions in a mouse model of eczema vaccinatum. *J Exp Med*. 2009;206:1219-1225.
66. Pedroza-Gonzalez A, Xu K, Wu TC, et al. Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast tumor growth by promoting type 2 inflammation. *J Exp Med*. 2011;208:479-490.
67. Young AC, Zhang W, Sacchettini JC, Nathenson SG. The three-dimensional structure of H-2Db at 2.4 Å resolution: implications for antigen-determinant selection. *Cell*. 1994;76:39-50.
68. Pihlgren M, Dubois PM, Tomkowiak M, Sjogren T, Marvel J. Resting memory CD8+ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro. *J Exp Med*. 1996;184:2141-2151.
69. Walzer T, Arpin C, Beloeil L, Marvel J. Differential in vivo persistence of two subsets of memory phenotype CD8 T cells defined by CD44 and CD122 expression levels. *J Immunol*. 2002;168:2704-2711.
70. Smyth G. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology*. 2004;3.
71. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 1995;57:289-300.

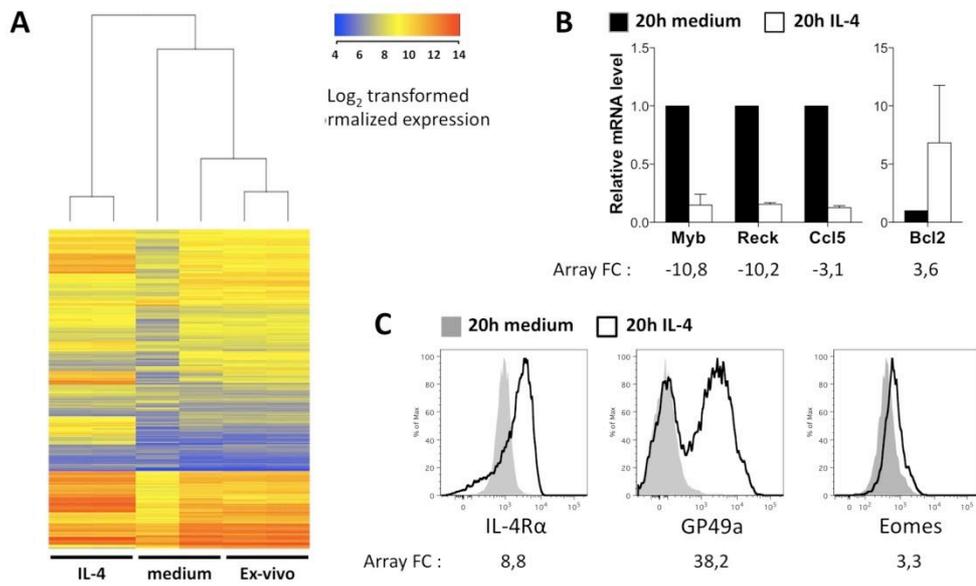


Figure 1, Ventre et al.

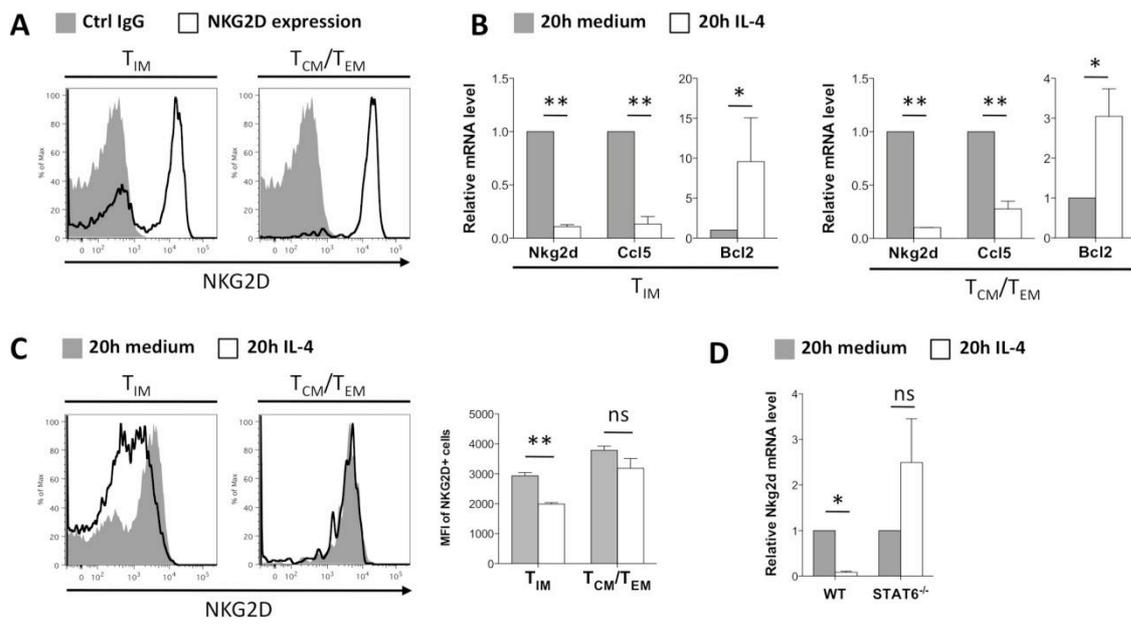


Figure 2, Ventre et al.

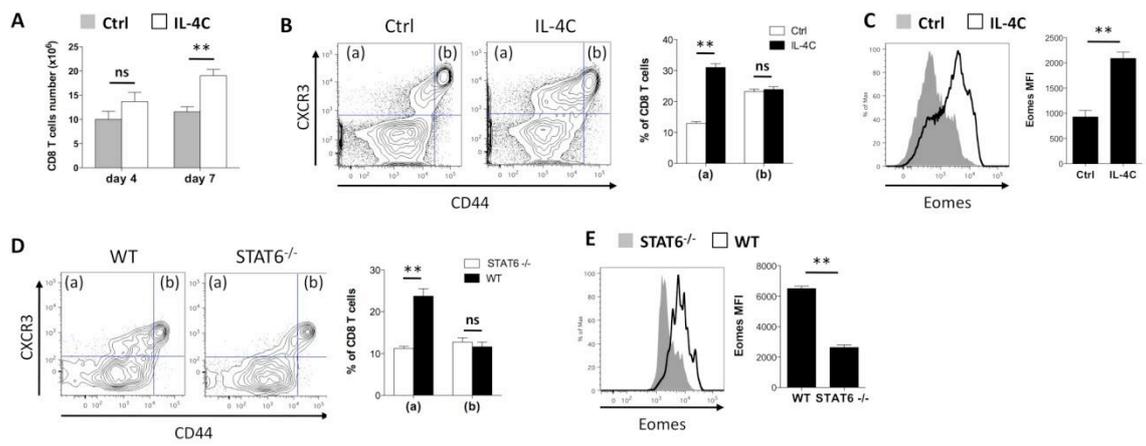


Figure 3, Ventre et al.

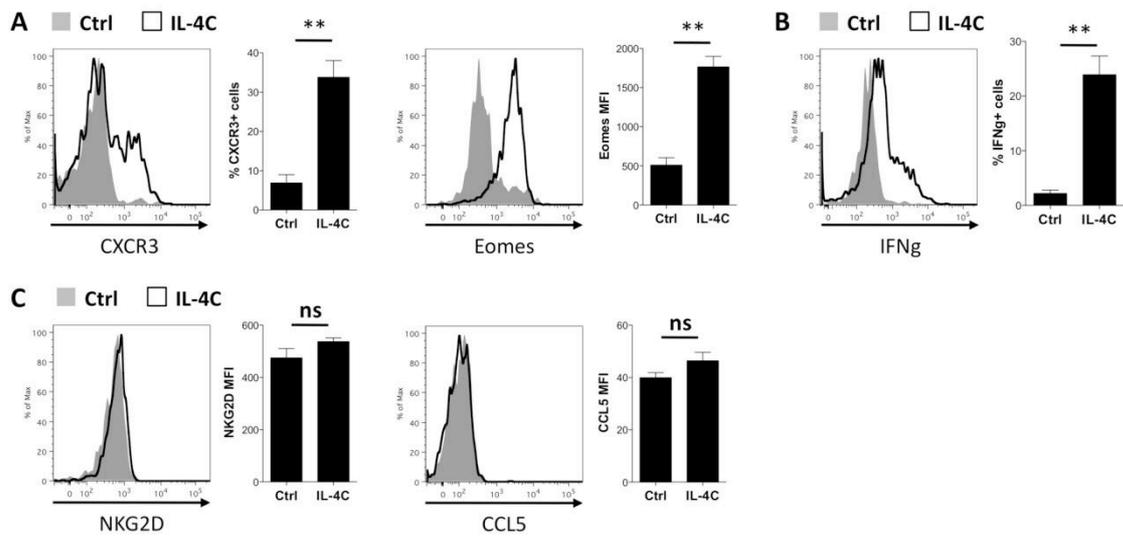


Figure 4, Ventre et al.

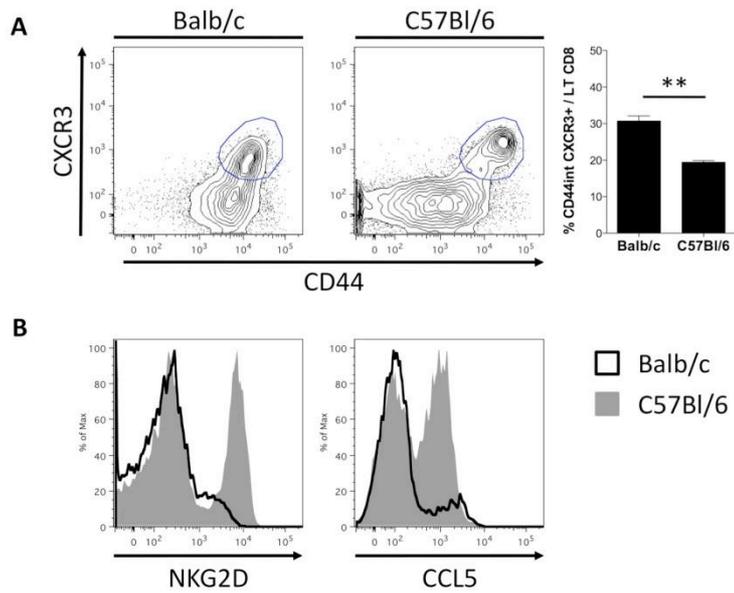


Figure 5, Ventre et al.

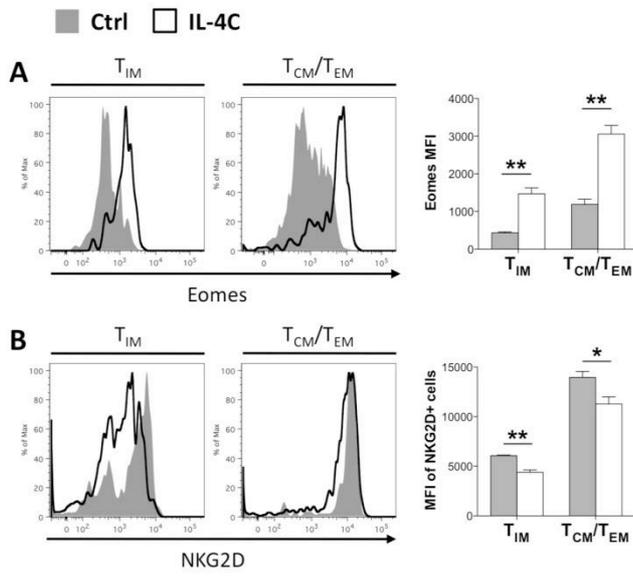
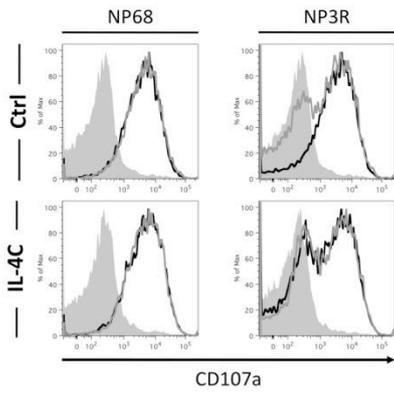


Figure 6, Ventre et al.

A ■ Unstimulated Ctrl □ +@NKG2D □ No @NKG2D



B □ +@NKG2D ■ No @NKG2D

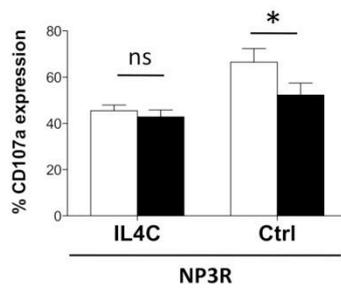
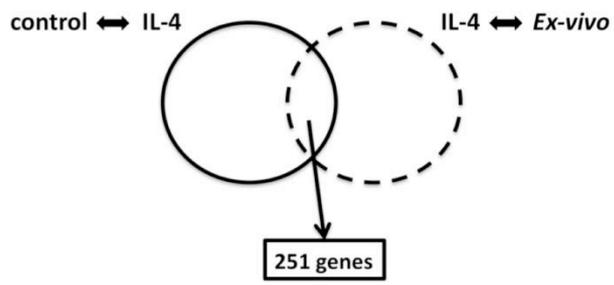


Figure 7, Ventre et al.



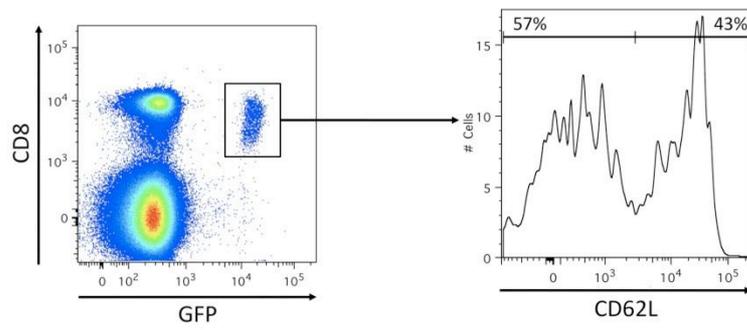
Experimental setup

T_{IM} Ex-vivo : *Ex-vivo*

T_{IM} 20h medium : *Control*

T_{IM} 20h medium + IL-4 : *IL-4*

Supplementary figure 1, Ventre et al.



Supplementary figure 2, Ventre et al.

Gene Symbol	Gene ID	FC IL-4 / Control	FC T_{IM} / Naive
Map3k8	26410	6,0	3,2
Ifit1	15957	5,7	-4,0
Trat1	77647	5,5	-9,3
Smpdl3b	100340	3,3	2,7
Gsn	227753	3,3	-4,8
Cdh1	12550	3,1	11,6
C230098021Rik	102153	2,0	-2,5
Arsb	11881	-2,2	2,1
Frat2	212398	-2,2	-2,0
Ccl5	20304	-3,1	69,8
Atp1b1	11931	-3,2	-2,5
Klrk1	27007	-3,5	7,8

Table 1, Ventre et al.

Supplementary table 1, Ventre et al.

Gene Symbol	Gene Description	Gene EntrezID	FC IL-4 / Control	FC IL-4 / Ex-vivo
D630039A03Rik	RIKEN cDNA D630039A03 gene	242484	42,3	56,9
Cbr3	carbonyl reductase 3	109857	40,9	23,8
Gadd45g	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	23882	27,9	3,7
Pros1	protein S (alpha)	19128	22,9	26,7
Slc2a6	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6	227659	18,6	18,9
Metrn1	meteorin, glial cell differentiation regulator-like	210029	17,1	6,6
Il2ra	interleukin 2 receptor, alpha chain	16184	15,1	6,8
Fam19a3	family with sequence similarity 19, member A3	329731	14,8	16,8
Cdk6	cyclin-dependent kinase 6	12571	14,2	5,9
Ncoa7	nuclear receptor coactivator 7	211329	12,2	19,1
H2-DMa	histocompatibility 2, class II, locus DMa	14998	11,0	12,3
Sft2d2	SFT2 domain containing 2	108735	9,7	6,8
36769	septin 4	18952	8,9	19,4
Iigp1	interferon inducible GTPase 1	60440	8,0	7,4
Rragd	Ras-related GTP binding D	52187	7,7	9,9
G0s2	G0/G1 switch gene 2	14373	7,6	11,3
Acat2	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	110460	7,6	5,1
Socs2	suppressor of cytokine signaling 2	216233	7,2	9,8
Rtp4	receptor transporter protein 4	67775	7,1	4,5
Zbp1	Z-DNA binding protein 1	58203	7,1	5,1
Cst7	cystatin F (leukocystatin)	13011	7,0	2,2
Xbp1	X-box binding protein 1	22433	7,0	2,9
Tcrg-C	T-cell receptor gamma, constant region	432729	6,8	5,9
H2-DMb2	histocompatibility 2, class II, locus Mb2	15000	6,6	4,9
Prnp	prion protein	19122	6,5	5,4
Gbp2	guanylate binding protein 2	14469	6,5	4,1
Map3k8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	26410	6,0	2,1
Trem12	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 2	328833	5,9	2,1
Ifit1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	15957	5,7	6,8
Il4ra	interleukin 4 receptor, alpha	16190	5,6	2,3
Trat1	T cell receptor associated transmembrane adaptor 1	77647	5,5	7,5
Wdr59	WD repeat domain 59	319481	5,2	3,3
BC024814	NA	239706	5,0	5,4
Cnp	2,3-cyclic nucleotide 3 phosphodiesterase	12799	4,7	8,8
N4bp1	NEDD4 binding protein 1	80750	4,5	6,0
Prss2	protease, serine, 2	22072	4,3	2,6
Baiap3	BAI1-associated protein 3	545192	4,2	1,9
Tep1	telomerase associated protein 1	21745	4,2	4,2
Ncoa3	nuclear receptor coactivator 3	17979	4,1	2,3
Hsd11b1	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	15483	4,0	1,7
Kcnk5	potassium channel, subfamily K, member 5	16529	4,0	1,9

Lta	lymphotoxin A	16992	3,9	4,0
5830468F06Rik	RIKEN cDNA 5830468F06 gene	76082	3,9	11,2
Lyst	lysosomal trafficking regulator	17101	3,8	3,7
A2ld1	AIG2-like domain 1	223267	3,8	5,6
Hipk2	homeodomain interacting protein kinase 2	15258	3,8	4,8
Sulf2	sulfatase 2	72043	3,8	3,2
Stat2	signal transducer and activator of transcription 2	20847	3,7	3,0
Ppp3cc	protein phosphatase 3, catalytic subunit, gamma isoform	19057	3,7	3,6
Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2	12043	3,6	5,2
Fam26f	family with sequence similarity 26, member F	215900	3,6	6,2
Tmlhe	trimethyllysine hydroxylase, epsilon	192289	3,5	3,3
Mvd	mevalonate (diphospho) decarboxylase	192156	3,4	4,1
Ifi47	interferon gamma inducible protein 47	15953	3,4	3,4
Pdlim4	PDZ and LIM domain 4	30794	3,4	6,2
Ncoa2	nuclear receptor coactivator 2	17978	3,3	2,1
Irgm1	immunity-related GTPase family M member 1	15944	3,3	2,3
S100a1	S100 calcium binding protein A1	20193	3,3	3,0
Eomes	eomesodermin homolog (Xenopus laevis)	13813	3,3	2,8
Smpd13b	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3B	100340	3,3	3,6
Cacnb1	calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit	12295	3,3	6,6
Gsn	gelsolin	227753	3,3	3,8
Rasgrp1	RAS guanyl releasing protein 1	19419	3,3	2,6
Tbcd	tubulin-specific chaperone d	108903	3,2	2,2
Susd3	sushi domain containing 3	66329	3,2	4,5
Myo6	myosin VI	17920	3,2	10,4
Xaf1	XIAP associated factor 1	327959	3,2	4,2
2010005H15Rik	RIKEN cDNA 2010005H15 gene	76770	3,1	2,1
Rab19	RAB19, member RAS oncogene family	19331	3,1	3,4
Actn2	actinin alpha 2	11472	3,1	2,7
Cdh1	cadherin 1	12550	3,1	2,7
Socs1	suppressor of cytokine signaling 1	12703	3,0	3,2
Entpd1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	12495	3,0	2,7
Nsmce1	non-SMC element 1 homolog (S. cerevisiae)	67711	3,0	3,2
Plac8	placenta-specific 8	231507	3,0	2,0
Hs6st1	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1	50785	3,0	1,9
Tube1	epsilon-tubulin 1	71924	2,9	3,6
Zfp141	zinc finger protein 141	434178	2,9	4,1
Prps1	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	19139	2,8	1,7
Ddc	dopa decarboxylase	13195	2,8	5,6
Plcx1	phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 1	403178	2,8	5,3
Sh2d2a	SH2 domain protein 2A	27371	2,7	1,7
Dhx58	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58	80861	2,6	1,8
Glpr2	GLI pathogenesis-related 2	384009	2,6	3,1
S100a13	S100 calcium binding protein A13	20196	2,6	2,7
MyIpf	myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle	17907	2,6	2,1

Tmem173	transmembrane protein 173	72512	2,5	3,3
Arhgap26	Rho GTPase activating protein 26	71302	2,5	1,8
BC057079	NA	230393	2,5	2,1
Lif	leukemia inhibitory factor	16878	2,5	1,8
B4galt5	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 5	56336	2,5	2,2
Scand1	SCAN domain-containing 1	19018	2,4	2,4
Gata1	GATA binding protein 1	14460	2,4	1,8
Casp6	caspase 6	12368	2,3	3,0
Il18bp	interleukin 18 binding protein	16068	2,3	1,8
Ikzf4	IKAROS family zinc finger 4	22781	2,3	4,1
Sh3bp5	SH3-domain binding protein 5 (BTK-associated)	24056	2,3	1,8
Znhit2-ps	zinc finger, HIT domain containing 2	29805	2,3	2,6
Loh12cr1	loss of heterozygosity, 12, chromosomal region 1 homolog (human)	67774	2,3	1,8
Igtp	interferon gamma induced GTPase	16145	2,3	2,0
Phlpp1	PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 1	98432	2,3	2,6
Dapp1	dual adaptor for phosphotyrosine and 3-phosphoinositides 1	26377	2,3	2,0
Ldhd	lactate dehydrogenase D	52815	2,3	1,8
Rnf169	ring finger protein 169	108937	2,3	2,5
Ikzf3	IKAROS family zinc finger 3	22780	2,3	2,2
Hmg20b	high mobility group 20 B	15353	2,2	2,5
Tnfrsf18	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18	21936	2,2	1,7
Mcm2	minichromosome maintenance deficient 2 mitotin (<i>S. cerevisiae</i>)	17216	2,2	1,8
Sdf4	stromal cell derived factor 4	20318	2,2	1,8
Ndufv3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 3	78330	2,2	1,9
4933412E12Rik	RIKEN cDNA 4933412E12 gene	71086	2,2	3,0
Tmem41b	transmembrane protein 41B	233724	2,2	1,7
Cndp2	CNDP dipeptidase 2 (metallopeptidase M20 family)	66054	2,2	2,2
Ddr1	discoidin domain receptor family, member 1	12305	2,2	3,6
Pole2	polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)	18974	2,2	2,3
Mvp	major vault protein	78388	2,2	2,5
Suz12	suppressor of zeste 12 homolog (<i>Drosophila</i>)	52615	2,2	2,2
Tcof1	Treacher Collins Franceschetti syndrome 1, homolog	21453	2,2	1,8
Mbd2	methyl-CpG binding domain protein 2	17191	2,2	2,0
Lrp8	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	16975	2,1	2,2
Wars	tryptophanyl-tRNA synthetase	22375	2,1	2,0
Parp9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	80285	2,1	2,2
Fam105b	family with sequence similarity 105, member B	432940	2,1	1,9
Uba7	ubiquitin-like modifier activating enzyme 7	74153	2,1	1,8
Fdps	farnesyl diphosphate synthetase	110196	2,1	1,6
Agpat3	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	28169	2,1	1,6
Pppde2	PPPDE peptidase domain containing 2	28075	2,1	1,6
F2r	coagulation factor II (thrombin) receptor	14062	2,1	1,9
Psmb10	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 10	19171	2,1	1,6

Aco2	aconitase 2, mitochondrial	11429	2,0	1,7
Shf	Src homology 2 domain containing F	435684	2,0	1,9
Tap1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	21354	2,0	2,3
Fam176b	family with sequence similarity 176, member B	230752	2,0	2,8
Acat1	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1	110446	2,0	2,1
C230098O21Rik	RIKEN cDNA C230098O21 gene	102153	2,0	1,5
BC035044	NA	232406	1,9	1,6
Gm672	predicted gene 672	269037	1,9	2,0
1110014N23Rik	RIKEN cDNA 1110014N23 gene	68505	1,9	1,7
Wdr46	WD repeat domain 46	57315	1,9	1,8
Ust	uronyl-2-sulfotransferase	338362	1,9	2,2
Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase	13360	1,9	2,0
Fam108a	family with sequence similarity 108, member A	216169	1,9	1,8
Runx1	runt related transcription factor 1	12394	1,9	2,1
Katnb1	katanin p80 (WD40-containing) subunit B 1	74187	1,9	1,5
Gemin5	gem (nuclear organelle) associated protein 5	216766	1,9	1,5
Bik	BCL2-interacting killer	12124	1,8	2,0
En2	engrailed 2	13799	1,8	1,6
Dbnl	drebrin-like	13169	1,8	1,6
Cnot3	CCR4-NOT transcription complex, subunit 3	232791	1,8	1,8
Ifi35	interferon-induced protein 35	70110	1,8	1,7
Bak1	BCL2-antagonist/killer 1	12018	1,8	1,7
Os9	amplified in osteosarcoma	216440	1,8	1,7
Nosip	nitric oxide synthase interacting protein	66394	1,8	2,2
Tor1a	torsin family 1, member A (torsin A)	30931	1,7	1,5
Cyth1	cytohesin 1	19157	1,7	1,5
Clcn5	chloride channel 5	12728	1,7	1,4
Ap1s1	adaptor protein complex AP-1, sigma 1	11769	1,7	1,7
Hspa14	heat shock protein 14	50497	1,6	1,5
Cnpy2	canopy 2 homolog (zebrafish)	56530	1,6	1,4
Gnb5	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 5	14697	1,6	1,3
Lrmp	lymphoid-restricted membrane protein	16970	1,6	1,4
Snai3	snail homolog 3 (Drosophila)	30927	1,6	1,6
Tspan9	tetraspanin 9	109246	1,5	1,4
2310045N01Rik	RIKEN cDNA 2310045N01 gene	72368	1,5	1,3
Myb	myeloblastosis oncogene	17863	-10,9	-20,1
Reck	reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs	53614	-10,3	-5,5
Neur13	neuralized homolog 3 homolog (Drosophila)	214854	-7,9	-6,4
H2-Ob	histocompatibility 2, O region beta locus	15002	-7,8	-7,0
Klrd1	killer cell lectin-like receptor, subfamily D, member 1	16643	-6,9	-3,3
Acpl2	acid phosphatase-like 2	235534	-6,0	-4,4
Slc20a1	solute carrier family 20, member 1	20515	-5,4	-3,2
Lypd6b	LY6/PLAUR domain containing 6B	71897	-5,3	-6,1
5930433N17Rik	RIKEN cDNA 5930433N17 gene	399623	-5,0	-2,1
Ahnak	AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)	66395	-4,9	-9,8
1110059G02Rik	RIKEN cDNA 1110059G02 gene	68786	-4,0	-2,0
Tbc1d4	TBC1 domain family, member 4	210789	-4,0	-2,1

St3gal6	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6	54613	-4,0	-3,6
Cpm	carboxypeptidase M	70574	-3,7	-4,7
Esf1	ESF1, nucleolar pre-rRNA processing protein, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	66580	-3,6	-2,7
Eya2	eyes absent 2 homolog (<i>Drosophila</i>)	14049	-3,6	-4,8
Rangap1	RAN GTPase activating protein 1	19387	-3,6	-3,4
Klf6	Kruppel-like factor 6	23849	-3,6	-4,7
Pde7a	phosphodiesterase 7A	18583	-3,6	-2,7
Klrk1	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1	27007	-3,5	-5,2
Cd55	CD55 antigen	13136	-3,5	-2,0
Rps6ka5	ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 5	73086	-3,5	-3,1
Arhgap5	Rho GTPase activating protein 5	11855	-3,3	-1,8
Atp8b4	ATPase, class I, type 8B, member 4	241633	-3,3	-3,3
Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	20304	-3,1	-3,0
Brd8	bromodomain containing 8	78656	-3,0	-2,1
4930431H11Rik	RIKEN cDNA 4930431H11 gene	73785	-3,0	-2,0
Cd84	CD84 antigen	12523	-2,9	-2,3
Sypl	synaptophysin-like protein	19027	-2,9	-4,1
Ggta1	glycoprotein galactosyltransferase alpha 1, 3	14594	-2,9	-2,2
Emb	embigin	13723	-2,9	-5,9
Slc4a7	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7	218756	-2,8	-2,0
D330027G24Rik	RIKEN cDNA D330027G24 gene	399584	-2,7	-4,4
Rcbtb2	regulator of chromosome condensation (RCC1) and BTB (POZ) domain containing protein 2	105670	-2,7	-2,2
Pydc4	RIKEN cDNA E030037K03 gene	623121	-2,7	-2,1
Celf2	CUGBP, Elav-like family member 2	14007	-2,6	-2,5
App	amyloid beta (A4) precursor protein	11820	-2,6	-3,1
Zc3h13	zinc finger CCCH type containing 13	67302	-2,5	-2,1
Lef1	lymphoid enhancer binding factor 1	16842	-2,5	-1,8
Rnf144a	ring finger protein 144A	108089	-2,5	-2,6
Rcn3	reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain	52377	-2,5	-2,0
Mir17hg	microRNA host gene 1 (non-protein coding)	75957	-2,5	-2,4
Bin1	bridging integrator 1	30948	-2,4	-3,4
Atp1b1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	11931	-2,4	-2,1
Pde8a	phosphodiesterase 8A	18584	-2,4	-1,9
Fbxw7	F-box and WD-40 domain protein 7	50754	-2,4	-1,7
Sdad1	SDA1 domain containing 1	231452	-2,4	-2,3
Cdk17	cyclin-dependent kinase 17	237459	-2,4	-2,4
Ogdh	oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide)	18293	-2,3	-1,7
Btbd11	BTB (POZ) domain containing 11	74007	-2,3	-2,8
Hvcn1	Hvcn1 hydrogen voltage-gated channel 1	74096	-2,3	-3,0
Haa0	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	107766	-2,3	-2,1
1700017B05Rik	RIKEN cDNA 1700017B05 gene	74211	-2,3	-3,8
Atp10d	ATPase, class V, type 10D	231287	-2,3	-2,1
Tob1	transducer of ErbB-2.1	22057	-2,3	-3,8
Frat2	frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 2	212398	-2,2	-3,7
Itgb7	integrin beta 7	16421	-2,2	-2,2
Arsb	arylsulfatase B	11881	-2,2	-2,7

Spata13	spermatogenesis associated 13	219140	-2,1	-2,8
Sh3kbp1	SH3-domain kinase binding protein 1	58194	-2,1	-1,9
Hmgcs1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	208715	-2,1	-1,9
Rnf145	ring finger protein 145	74315	-2,1	-1,8
Hs3st3b1	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3B1	54710	-2,1	-2,1
Dtx4	deltex 4 homolog (Drosophila)	207521	-2,1	-2,3
Lats2	large tumor suppressor 2	50523	-2,1	-2,0
B3gnt2	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2	53625	-2,1	-2,6
6430527G18Rik	RIKEN cDNA 6430527G18 gene	238330	-2,1	-2,3
Fam107b	family with sequence similarity 107, member B	66540	-2,0	-3,3
Ldlrap1	low density lipoprotein receptor adaptor protein 1	100017	-2,0	-1,9
Pgm2l1	phosphoglucomutase 2-like 1	70974	-2,0	-2,0
3830612M24	NA	330635	-2,0	-1,8
Ivns1abp	influenza virus NS1A binding protein	117198	-2,0	-2,2
Capn7	calpain 7	12339	-2,0	-2,5
Acot9	acyl-CoA thioesterase 9	56360	-1,9	-2,0
Stk17b	serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)	98267	-1,9	-3,2
Mrpl38	mitochondrial ribosomal protein L38	60441	-1,9	-1,6
Nup153	nucleoporin 153	218210	-1,9	-1,5
Rab11fip4	RAB11 family interacting protein 4 (class II)	268451	-1,9	-1,8
Fam38a	family with sequence similarity 38, member A	234839	-1,8	-1,6
Nr3c1	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1	14815	-1,7	-1,6
Daam1	dishevelled associated activator of morphogenesis 1	208846	-1,7	-1,6

Supplementary table 2, Ventre et al.

GO Id	Go term	Gene names	Adj pval
GO:0006955	immune response	Bcl2, Ccl5, Cd55, Dbnl, Dhx58, Gadd45g, Gata1, Gbp2, H2-DMa, H2-DMb2, H2-Ob, Il18bp, Il2ra, Il4ra, Irgm1, Klrk1, Lif, Lta, Lyst, Myb, Mylpf, Runx1, Tap1, Tmem173, Trat1	1,47E-05
GO:0006952	defense response	Casp6, Cnp, F2r, Ifi47, Rangap1	0,0155421
GO:0002520	immune system development	Bak1, Bcl2, Ccl5, Cdk6, Gadd45g, H2-DMa, Il2ra, Il4ra, Lif, Lta, Myb, Runx1	0,0493782
GO:0046649	lymphocyte activation	Gata1, Klrk1, Lyst, Trem12	0,0104286
GO:0007160	cell-matrix adhesion	Actn2, Bcl2, Cdk6, Ddr1, Itgb7, Myb	0,0377474
GO:0006915	apoptosis	App, Bak1, Bcl2, Bik, Casp6, Cdh1, Eya2, F2r, Gadd45g, Gata1, Gsn, Hipk2, Il2ra, Klrk1, Lta, Lyst, Myb, Nr3c1, Prnp, Runx1, Sh3kbp1, Shf, Stk17b, Tmem173, Tnfrsf18, Xaf1	0,0052449
GO:0007049	cell cycle	App, Bak1, Bcl2, Bin1, Cdk6, G0s2, Gadd45g, Gata1, Hipk2, Hmg20b, Katnb1, Lats2, Lif, Lta, Map3k8, Mcm2, Myb, Reck, Runx1, Xaf1	0,0349434
GO:0045595	regulation of cell differentiation	Bcl2, Casp6, Ccl5, Cdk6, Eomes, Gata1, H2-DMa, Il2ra, Il4ra, Lif, Myb, Runx1, Socs2, Tob1	0,0351664
GO:0016126	sterol biosynthetic process	Dhcr7, Fdps, Hmgcs1, Mvd	0,0388589
GO:0051084	'de novo' posttranslational protein folding	H2-DMa, H2-DMb2, Tor1a	0,0376711
GO:0010035	response to inorganic substance	Bcl2, Casp6, Gata1, Gsn, Haa0, Hvcn1, Lef1, Nr3c1, Prnp	0,0060662
GO:0009966	regulation of signal transduction	App, Cyth1, F2r, Hipk2, Lef1, Lif, Lta, Mbd2, Myb, Ncoa3, Nr3c1, Rasgrp1, Slc20a1, Socs1, Socs2, Spata13, Tbc1d4, Tob1, Trat1	0,0493782
GO:0001775	cell activation	Bak1, Bcl2, Entpd1, F2r, Gadd45g, Gata1, H2-DMa, Il2ra, Il4ra, Klrk1, Lta, Lyst, Myb, Runx1, Trem12	0,0052449
GO:0016044	cellular membrane organization	Ap1s1, App, Bak1, Bcl2, Bin1, Clcn5, Dbnl, Gata1, Ldlrap1, Lrp8, Myb, Myo6, Sh3kbp1	0,0086711
GO:0006897	endocytosis	Ap1s1, App, Bin1, Clcn5, Dbnl, Gata1, Ldlrap1, Lrp8, Myb, Myo6, Sh3kbp1	0,0055128
GO:0002684	positive regulation of immune system process	Cd55, Gata1, H2-DMa, Il2ra, Il4ra, Klrk1, Lyst, Myb, Runx1, Trat1	0,019439
GO:0048872	homeostasis of number of cells	Bak1, Bcl2, Cdk6, F2r, Il2ra, Myb, Runx1	0,0388589
GO:0050808	synapse organization	App, Cdh1, F2r, Gata1, Myo6	0,0401457

Supplementary table 3, Ventre et al.

Gene Symbol	Gene Description	Gene EntrezID	FC TIM / Naive
Ifng	interferon gamma	15978	252,8
Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	20304	69,8
Cxcr3	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	12766	43,5
Tbx21	T-box 21	57765	28,5
Fasl	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	14103	26,7
H2-Q10	histocompatibility 2, Q region locus 10	15007	26,3
S100a6	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	20200	19,9
Asns	asparagine synthetase	27053	15,9
Cdh1	cadherin 1	12550	11,6
Cd44	CD44 antigen	12505	8,2
Cxcr5	chemokine (C-X-C motif) receptor 5	12145	8,0
Klrl1	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1	27007	7,8
Camk2n1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	66259	7,6
Ppm1j	protein phosphatase 1J	71887	7,5
Prss12	protease, serine, 12 neurotrypsin (motopsin)	19142	6,9
Nt5e	5 nucleotidase, ecto	23959	6,3
Hopx	HOP homeobox	74318	6,0
Klrc1	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1	16641	5,9
Naip2	NLR family, apoptosis inhibitory protein 2	17948	5,8
Il18rap	interleukin 18 receptor accessory protein	16174	5,8
Serpina3g	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G	20715	5,7
Art3	ADP-ribosyltransferase 3	109979	5,6
Mdfic	MyoD family inhibitor domain containing	16543	5,5
Ctla4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	12477	5,2
Ctsf	cathepsin F	56464	4,9
Zdhhc2	zinc finger, DHHC domain containing 2	70546	4,6
Ms4a6d	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6D	68774	4,4
C1qtnf4	C1q and tumor necrosis factor related protein 4	67445	4,4
Sdcbp2	syndecan binding protein (syntenin) 2	228765	4,3
Plekha8	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 8	231999	4,3
Gpr183	G protein-coupled receptor 183	321019	4,0
Ptpn13	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13	19249	3,9
Tmem180	transmembrane protein 180	75146	3,9
Kcnk6	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily K, member 6	52150	3,9
Cyfip1	cytoplasmic FMR1 interacting protein 1	20430	3,9
Mtmr7	myotubularin related protein 7	54384	3,9
Ripk4	receptor-interacting serine-threonine kinase 4	72388	3,8
Crmp1	collapsin response mediator protein 1	12933	3,7
Dnaja4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4	58233	3,7
Ang	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	11727	3,7
Ddr1	discoidin domain receptor family, member 1	12305	3,7
Endod1	endonuclease domain containing 1	71946	3,7
Gm5124	predicted pseudogene 5124	331392	3,7

6330512M04Rik	RIKEN cDNA 6330512M04 gene	320802	3,6
Slpi	secretory leukocyte peptidase inhibitor	20568	3,6
Casp1	caspase 1	12362	3,4
Bmpr1a	bone morphogenetic protein receptor, type 1A	12166	3,3
Rab20	RAB20, member RAS oncogene family	19332	3,2
Enpp1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	18605	3,2
1110067D22Rik	RIKEN cDNA 1110067D22 gene	216551	3,2
Pde2a	phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated	207728	3,2
Pde8a	phosphodiesterase 8A	18584	3,2
Map3k8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	26410	3,2
Dmrta1	doublesex and mab-3 related transcription factor like family A1	242523	3,1
Tspan31	tetraspanin 31	67125	3,1
Clstn1	calsyntenin 1	65945	3,1
Runx2	runt related transcription factor 2	12393	3,0
6330509M05Rik	RIKEN cDNA 6330509M05 gene	102913	3,0
Naip5	NLR family, apoptosis inhibitory protein 5	17951	3,0
Prkcz	protein kinase C, zeta	18762	2,9
BC013712	NA	230787	2,9
Chst11	carbohydrate sulfotransferase 11	58250	2,9
Inpp1	inositol polyphosphate phosphatase-like 1	16332	2,9
Cd200r4	CD200 receptor 4	239849	2,9
Ier3	immediate early response 3	15937	2,9
Car11	carbonic anhydrase 11	12348	2,8
Sntb2	syntrophin, basic 2	20650	2,8
Smpdl3b	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3B	100340	2,7
Irak3	interleukin-1 receptor-associated kinase 3	73914	2,6
Sidt1	SID1 transmembrane family, member 1	320007	2,6
Serpnb6a	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6a	20719	2,6
Tmbim1	transmembrane BAX inhibitor motif containing 1	69660	2,6
Gcat	glycine C-acetyltransferase (2-amino-3-ketobutyrate-coenzyme A ligase)	26912	2,5
6530402F18Rik	RIKEN cDNA 6530402F18 gene	76220	2,5
Bank1	B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1	242248	2,5
Klh15	kelch-like 5 (Drosophila)	71778	2,5
Dcxr	dicarbonyl L-xylulose reductase	67880	2,5
Hip1	huntingtin interacting protein 1	215114	2,5
Nuak2	NUAK family, SNF1-like kinase, 2	74137	2,4
Zfp296	zinc finger protein 296	63872	2,4
Rabgap1l	RAB GTPase activating protein 1-like	29809	2,4
Smyd1	SET and MYND domain containing 1	12180	2,4
Rhob	ras homolog gene family, member B	11852	2,3
St14	suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma)	19143	2,3
Myadm	myeloid-associated differentiation marker	50918	2,3
Rnf128	ring finger protein 128	66889	2,3
Tmem159	transmembrane protein 159	233806	2,3
LOC641050		641050	2,3
Dpp7	dipeptidylpeptidase 7	83768	2,3
Mt2	metallothionein 2	17750	2,3
Kctd17	potassium channel tetramerisation domain containing 17	72844	2,3
Pglyrp1	peptidoglycan recognition protein 1	21946	2,3
Dapk2	death-associated protein kinase 2	13143	2,3

Gm4980	predicted gene 4980	245190	2,2
Psen2	presenilin 2	19165	2,2
Plat	plasminogen activator, tissue	18791	2,2
Coro2a	coronin, actin binding protein 2A	107684	2,2
Ddx43	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 43	100042356	2,2
Csf2ra	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)	12982	2,2
Ttc39b	tetratricopeptide repeat domain 39B	69863	2,2
Ncf4	neutrophil cytosolic factor 4	17972	2,1
Sbf2	SET binding factor 2	319934	2,1
Arsb	arylsulfatase B	11881	2,1
2010111I01Rik	RIKEN cDNA 2010111I01 gene	72061	2,1
Phf21b	PHD finger protein 21B	271305	2,1
Pld2	phospholipase D2	18806	2,1
Cd86	CD86 antigen	12524	2,1
Ank	progressive ankylosis	11732	2,1
Rhoc	ras homolog gene family, member C	11853	2,1
Prkce	protein kinase C, epsilon	18754	2,0
Ccdc50	coiled-coil domain containing 50	67501	2,0
Acsbg1	acyl-CoA synthetase bubblegum family member 1	94180	2,0
Rnase4	ribonuclease, RNase A family 4	58809	1,9
Dennd5a	DENN/MADD domain containing 5A	19347	1,9
EG218444	NA	218444	1,9
BB166591	NA	99458	1,9
Map3k9	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 9	338372	1,8
Lgr4	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4	107515	1,8
Prdm1	PR domain containing 1, with ZNF domain	12142	1,8
Slc36a3	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 3	215332	1,8
Ust	uronyl-2-sulfotransferase	338362	1,8
Notch4	Notch gene homolog 4 (Drosophila)	18132	1,7
Ostf1	osteoclast stimulating factor 1	20409	1,7
BC021614	NA	225884	1,7
Actn3	actinin alpha 3	11474	1,7
Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	17260	1,7
Prrt4	proline-rich transmembrane protein 4	101359	1,7
Plekhm3	pleckstrin homology domain containing, family M, member 3	241075	1,6
Spry2	sprouty homolog 2 (Drosophila)	24064	1,6
Fat1	FAT tumor suppressor homolog 1 (Drosophila)	14107	1,6
Epor	erythropoietin receptor	13857	1,6
Mll2	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2	381022	1,6
Grasp	GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1)-associated scaffold protein	56149	1,6
Grid2	glutamate receptor, ionotropic, delta 2	14804	1,6
Arhgap28	Rho GTPase activating protein 28	268970	1,6
Chic1	cysteine-rich hydrophobic domain 1	12212	1,6
6430548M08Rik	RIKEN cDNA 6430548M08 gene	234797	1,6
Zfp503	zinc finger protein 503	218820	1,5
Rag1	recombination activating gene 1	19373	1,5
Ank1	ankyrin 1, erythroid	11733	1,5
Serpina4-ps1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 4, pseudogene 1	321018	1,5
Tbkbp1	TBK1 binding protein 1	73174	1,5

Unc5c	unc-5 homolog C (<i>C. elegans</i>)	22253	1,5
Abcb10	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 10	56199	1,5
Sox4	SRY-box containing gene 4	20677	-31,8
Tnfsf11	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	21943	-17,5
Ptpla	protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine), member a	30963	-11,7
Ccr9	chemokine (C-C motif) receptor 9	12769	-11,7
Tcf4	transcription factor 4	21413	-10,6
AI131651	NA	98858	-10,1
Ptprf	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	19268	-9,6
Trat1	T cell receptor associated transmembrane adaptor 1	77647	-9,3
Cd81	CD81 antigen	12520	-9,0
Ikzf2	IKAROS family zinc finger 2	22779	-8,9
Mtss1	metastasis suppressor 1	211401	-8,7
Basp1	brain abundant, membrane attached signal protein 1	70350	-8,2
Tubb2b	tubulin, beta 2B	73710	-7,8
Dleu2	deleted in lymphocytic leukemia, 2	328425	-7,2
2810410L24Rik	RIKEN cDNA 2810410L24 gene	100042332	-6,3
Dapk1	death associated protein kinase 1	69635	-5,7
Itm2a	integral membrane protein 2A	16431	-5,6
Armcx4	armadillo repeat containing, X-linked 4	102910	-5,5
Xkrx	X Kell blood group precursor related X linked	331524	-5,4
Emp1	epithelial membrane protein 1	13730	-5,1
Prickle1	prickle homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	106042	-5,1
Timp2	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	21858	-4,8
Baz2b	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B	407823	-4,8
Gsn	gelsolin	227753	-4,8
Bend5	BEN domain containing 5	67621	-4,3
AA414768	ubiquitin-conjugating enzyme E2Q (putative) 2 pseudogene	245350	-4,1
Ifit1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	15957	-4,0
Apcdd1	adenomatosis polyposis coli down-regulated 1	494504	-4,0
Magi3	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 3	99470	-3,9
Serinc5	serine incorporator 5	218442	-3,8
Ldhb	lactate dehydrogenase B	16832	-3,8
Wnt5b	wingless-related MMTV integration site 5B	22419	-3,8
Ramp1	receptor (calcitonin) activity modifying protein 1	51801	-3,6
Ranbp6	RAN binding protein 6	240614	-3,4
1190002N15Rik	RIKEN cDNA 1190002N15 gene	68861	-3,4
Ctsc	cathepsin C	13032	-3,4
Armcx3	armadillo repeat containing, X-linked 3	71703	-3,4
Laptm4b	lysosomal-associated protein transmembrane 4B	114128	-3,3
Tsc22d1	TSC22 domain family, member 1	21807	-3,2
Frm4a	FERM domain containing 4A	209630	-3,2
Adcy6	adenylate cyclase 6	11512	-3,1
Cnn3	calponin 3, acidic	71994	-3,1
Cxzc5	CXXC finger 5	67393	-3,1
Kbtbd7	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 7	211255	-3,1
Gtf2ird1	general transcription factor II I repeat domain-containing 1	57080	-3,0
Tcf7l2	transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box	21416	-3,0
Zfp397	zinc finger protein 397	69256	-2,9

Calcr1	calcitonin receptor-like	54598	-2,9
Zdhhc14	zinc finger, DHHC domain containing 14	224454	-2,8
Plcb4	phospholipase C, beta 4	18798	-2,8
Ampd1	adenosine monophosphate deaminase 1	229665	-2,8
Dennd2c	DENN/MADD domain containing 2C	329727	-2,7
Aldh1b1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1	72535	-2,7
Atrnl1	attractin like 1	226255	-2,7
Ankrd50	ankyrin repeat domain 50	99696	-2,7
1700020I14Rik	RIKEN cDNA 1700020I14 gene	66602	-2,6
Egln3	EGL nine homolog 3 (<i>C. elegans</i>)	112407	-2,6
Pdgfrb	platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	18596	-2,6
Gramd1c	GRAM domain containing 1C	207798	-2,6
Chst15	carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O) sulfotransferase 15	77590	-2,6
Wls	wntless homolog (<i>Drosophila</i>)	68151	-2,5
C230098O21Rik	RIKEN cDNA C230098O21 gene	102153	-2,5
Zfp790	zinc finger protein 790	233056	-2,5
Tox	thymocyte selection-associated high mobility group box	252838	-2,5
Nedd4	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4	17999	-2,5
Atp1b1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	11931	-2,5
C730026J16	NA	331006	-2,5
Aldh2	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	11669	-2,5
Spred1	sprouty protein with EVH-1 domain 1, related sequence	114715	-2,5
Ephx1	epoxide hydrolase 1, microsomal	13849	-2,4
Tnik	TRAF2 and NCK interacting kinase	665113	-2,4
Zw10	ZW10 homolog (<i>Drosophila</i>), centromere/kinetochore protein	26951	-2,4
Gnb4	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 4	14696	-2,4
Tmem164	transmembrane protein 164	209497	-2,4
Mcart6	mitochondrial carrier triple repeat 6	67062	-2,4
Megf9	multiple EGF-like-domains 9	230316	-2,4
Afap1	actin filament associated protein 1	70292	-2,3
Dscc1	defective in sister chromatid cohesion 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	72107	-2,3
Haus6	HAUS augmin-like complex, subunit 6	230376	-2,3
Rps6ka5	ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 5	73086	-2,3
Tspan6	tetraspanin 6	56496	-2,3
Fry	furry homolog (<i>Drosophila</i>)	320365	-2,3
Zfp830	zinc finger protein 830	66983	-2,3
Eif2ak3	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3	13666	-2,3
Nhsl1	NHS-like 1	215819	-2,3
Zfp709	zinc finger protein 709	236193	-2,2
Vangl2	vang-like 2 (van gogh, <i>Drosophila</i>)	93840	-2,2
Zfp422	zinc finger protein 422	67255	-2,2
Sbk1	SH3-binding kinase 1	104175	-2,2
Oas3	2-5 oligoadenylate synthetase 3	246727	-2,2
Otud1	OTU domain containing 1	71198	-2,2
Fbxl3	F-box and leucine-rich repeat protein 3	50789	-2,2
Brwd3	bromodomain and WD repeat domain containing 3	382236	-2,2
Kif13a	kinesin family member 13A	16553	-2,1
Pdlim5	PDZ and LIM domain 5	56376	-2,1

Cdkn2aip	CDKN2A interacting protein	70925	-2,1
Tceal1	transcription elongation factor A (SII)-like 1	237052	-2,1
Pard6g	par-6 partitioning defective 6 homolog gamma (C. elegans)	93737	-2,1
Sh3rf1	SH3 domain containing ring finger 1	59009	-2,1
AU023617	NA	101769	-2,1
Psd3	pleckstrin and Sec7 domain containing 3	234353	-2,0
Usp27x	ubiquitin specific peptidase 27, X chromosome	54651	-2,0
Cerk	ceramide kinase	223753	-2,0
Zbed4	zinc finger, BED domain containing 4	223773	-2,0
Ctdspl2	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase like 2	329506	-2,0
Plekhf2	pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 2	71801	-2,0
Smo	smoothed homolog (Drosophila)	319757	-2,0
Snap23	synaptosomal-associated protein 23	20619	-2,0
Mpp6	membrane protein, palmitoylated 6 (MAGUK p55 subfamily member 6)	56524	-2,0
Lamp2	lysosomal-associated membrane protein 2	16784	-2,0
Frat2	frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 2	212398	-2,0
Mex3d	mex3 homolog D (C. elegans)	237400	-2,0
Csnk1e	casein kinase 1, epsilon	27373	-2,0
Mtf2	metal response element binding transcription factor 2	17765	-2,0
Fli1	Friend leukemia integration 1	14247	-1,9
Wdr26	WD repeat domain 26	226757	-1,9
LOC552908	NA	552908	-1,9
Ccnj	cyclin J	240665	-1,9
Gabbr2	gamma-aminobutyric acid (GABA) C receptor, subunit rho 2	14409	-1,9
Cdk12	cyclin-dependent kinase 12	69131	-1,9
Aqp11	aquaporin 11	66333	-1,9
Trim25	tripartite motif-containing 25	217069	-1,9
Sgk3	serum/glucocorticoid regulated kinase 3	170755	-1,9
Zcchc12	zinc finger, CCHC domain containing 12	72693	-1,9
Mpp7	membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7)	75739	-1,9
3110073H01Rik	RIKEN cDNA 3110073H01 gene	73201	-1,9
Twsg1	twisted gastrulation homolog 1 (Drosophila)	65960	-1,9
Gria3	glutamate receptor, ionotropic, AMPA3 (alpha 3)	53623	-1,8
Gpd2	glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial	14571	-1,8
Slc7a6os	solute carrier family 7, member 6 opposite strand	66432	-1,8
Magee1	melanoma antigen, family E, 1	107528	-1,8
Pygl	liver glycogen phosphorylase	110095	-1,8
Bcor	BCL6 interacting corepressor	71458	-1,8
Mgat5	mannoside acetylglucosaminyltransferase 5	107895	-1,8
Bach1	BTB and CNC homology 1	12013	-1,8
Mcoln3	mucopolipin 3	171166	-1,8
Yipf6	Yip1 domain family, member 6	77929	-1,8
Zfp68	zinc finger protein 68	24135	-1,8
Ube2e2	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 2 (UBC4/5 homolog, yeast)	218793	-1,8
Phf8	PHD finger protein 8	320595	-1,8
Ilf2	interleukin enhancer binding factor 2	67781	-1,8
Fbxo3	F-box protein 3	57443	-1,8
Cnot6	CCR4-NOT transcription complex, subunit 6	104625	-1,8

Map3k2	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2	26405	-1,8
Zcchc8	zinc finger, CCHC domain containing 8	70650	-1,8
Terf1	telomeric repeat binding factor 1	21749	-1,7
Sbno1	sno, strawberry notch homolog 1 (Drosophila)	243272	-1,7
Cdc26	cell division cycle 26	66440	-1,7
Gcc1	golgi coiled coil 1	74375	-1,7
5530601H04Rik	RIKEN cDNA 5530601H04 gene	71445	-1,7
Abcf3	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 3	27406	-1,7
Wwp1	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1	107568	-1,7
Dnajc6	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6	72685	-1,7
Zbtb33	zinc finger and BTB domain containing 33	56805	-1,7
Dgke	diacylglycerol kinase, epsilon	56077	-1,7
Brdt	bromodomain, testis-specific	114642	-1,7
Ube2d3	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)	66105	-1,7
Strn	striatin, calmodulin binding protein	268980	-1,7
Zhx3	zinc fingers and homeoboxes 3	320799	-1,7
Ung	uracil DNA glycosylase	22256	-1,6
Armcx1	armadillo repeat containing, X-linked 1	78248	-1,6
5031439G07Rik	RIKEN cDNA 5031439G07 gene	223739	-1,6
Dcun1d1	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 1 (S. cerevisiae)	114893	-1,6
1110034A24Rik	RIKEN cDNA 1110034A24 gene	109065	-1,5
Tacc3	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	21335	-1,5
Golph3	golgi phosphoprotein 3	66629	-1,5

ANNEXE 1

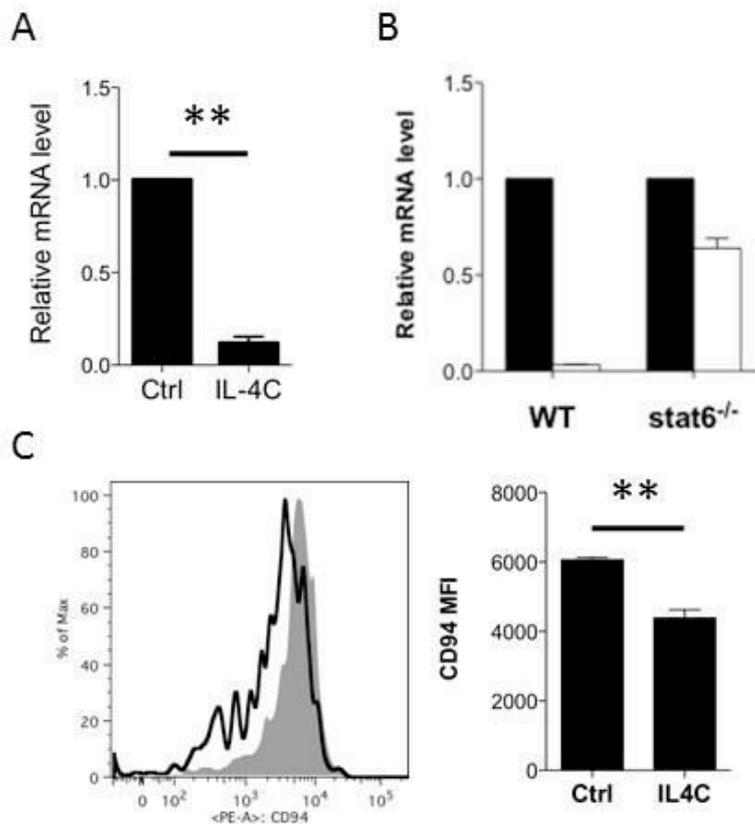


Figure 20 : IL-4 inhibits CD94 expression by memory CD8 T cells in a STAT6-dependant manner

T_{IM} and TCM/TEM were generated as described in the methods

A- T_{IM} were isolated and incubated in presence or absence of IL-4 for 20h; Total RNA was isolated and mRNA coding for Cd94 was quantified using RT-qPCR

B- T_{IM} memory cells were generated by double peptide immunization of thymectomized F5 or F5 x STAT6^{-/-} mice. T_{IM} were then sorted and incubated 20h in presence or absence of IL-4. RNA were isolated and Cd94 mRNA levels were measured using RT-qPCR

C- T_{CM}/T_{EM} were generated as described in the methods. Mice were then daily injected IP either with a control IgG1 or a combination of rml-4 and anti-IL-4 11B11. After 4 days of treatment, spleen was removed and CD8 T cells were analyzed by flow cytometry

ANNEXE 2

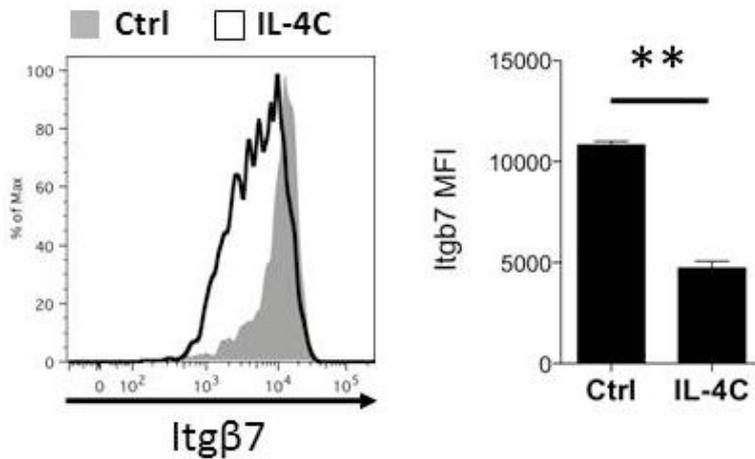


Figure 21: IL-4-induced innate CD8 T cells express low levels of Itgb7

3.10^6 F5 Naive CD8 T cells were transferred into recipient mice that were daily injected IP either with a control IgG1 or a combination of rIL-4 and anti-IL-4 11B11. After 4 days of treatment, spleen was removed and CD8 T cells were analyzed by flow cytometry

2. Partie 2 : l'IL-4 et les cytokines γ c affectent l'acquisition de fonctions effectrices par les LT CD8 effecteurs et mémoires

Les LT CD8 effecteurs expriment à leur surface des récepteurs costimulateurs et coinhibiteurs participant à la régulation du seuil d'activation en réponse à une stimulation du TCR. Parmi ces récepteurs, plusieurs membres de la famille des récepteurs NK ont été décrits, tels que NKG2D et CD94/NKG2A. Ces récepteurs ne sont pas exprimés à la surface des LT CD8 naïfs chez la souris mais leur expression est induite à la surface des LT CD8 effecteurs et mémoires. NKG2D a été plusieurs fois décrits dans la littérature comme délivrant un signal costimulateur aux LT CD8. CD94/NKG2A délivre un signal inhibiteur aux NK mais sa fonction à la surface des LT CD8 est controversée : l'engagement de NKG2A inhibe les fonctions effectrices des LT CD8 effecteurs générés en réponse à un virus Influenza ou un polyomavirus, mais pas celles des LT CD8 effecteurs générés en réponse au virus LCMV (Moser et al., Nat Immunol, 2002 ; Zhou et al., J Immunol, 2008 ; Miller et al., J Immunol, 2002).

Par ailleurs, les LT CD8 effecteurs ont des fonctions effectrices leur permettant de répondre efficacement lors d'une réponse immunitaire. Ils sont capables de lyser leurs cellules cibles grâce à leurs propriétés cytotoxiques ou à l'engagement des récepteurs de mort. D'autre part, ils peuvent sécréter des cytokines qui participent au ralentissement de l'infection et à l'amplification de la réponse immunitaire. Elles peuvent notamment sécréter XCL1, une chimiokine impliquée dans l'attraction des DC exprimant le marqueur CD8 α . Ces DC sont connues pour être les plus efficaces pour faire de la présentation croisée des antigènes et ainsi activer les LT CD8. Les LT CD8 effecteurs sécrètent également la chimiokine CCL5, qui pourrait avoir un rôle dans l'attraction d'acteurs de la réponse immunitaire.

Les travaux précédents nous ont permis de caractériser l'impact de l'IL-4 sur les LT CD8 naïfs et mémoires quiescents. Nous avons notamment montré que l'IL-4 inhibe l'expression de CCL5 et NKG2D par ces cellules. Dans un deuxième axe d'étude, nous avons voulu étudier l'impact de l'IL-4 sur l'acquisition de ces fonctions par les LT CD8 effecteurs et mémoires. Nous avons également étudié l'impact d'autres cytokines de la famille γ c. L'impact de TSLP et de l'IL-9, deux cytokines ayant peu d'effets sur la biologie des LT CD8 n'a pas été évalué dans cette étude.

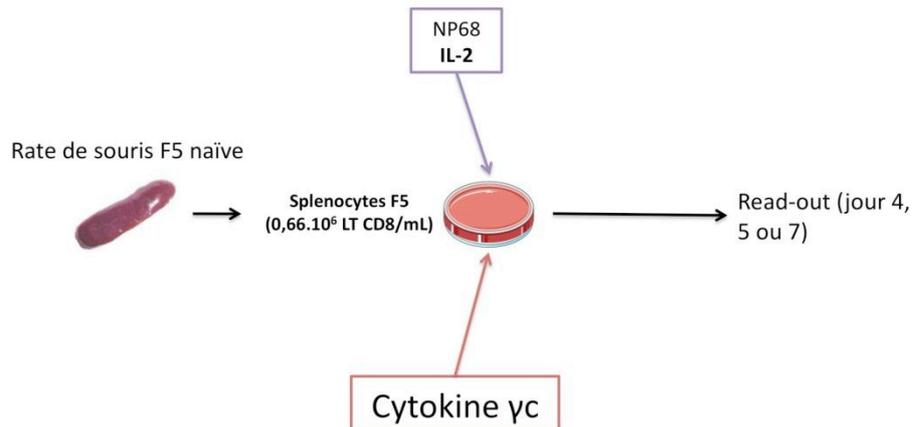


Figure 22 : Modèle d'activation des LT CD8 F5 utilisé

Les splénocytes de souris F5 naïves sont incubés à la concentration de $0,66 \cdot 10^6$ LT CD8/mL dans du milieu DMEM contenant 6% de SVF en présence du peptide NP68 (10nM) et d'IL-2 (200 U/mL). Les cytokines recombinantes : IL-4 (20 ng/mL), IL-7 (10 ng/mL), IL-15 (20 ng/mL) et IL-21 (25 ng/mL) sont ajoutées dès le début de la culture.

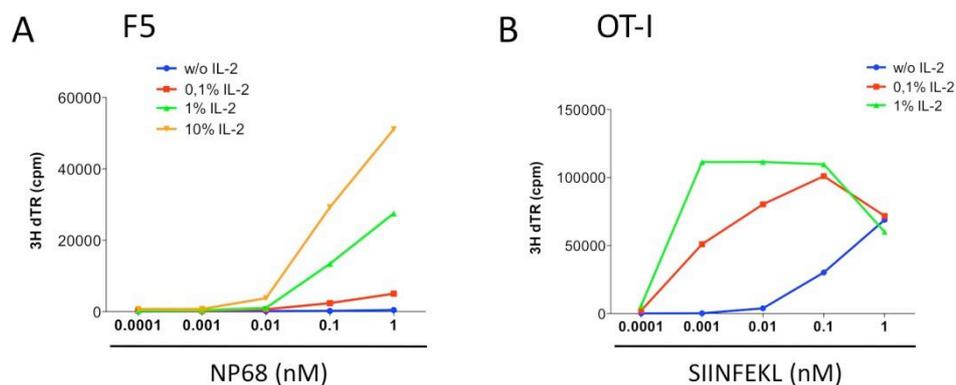


Figure 23 : Activation des LT CD8 F5 et OT-I en présence d'IL-2

Les splénocytes de souris F5 et OT-I naïves sont incubés à la concentration de $0,66 \cdot 10^6$ LT CD8/mL dans du milieu DMEM contenant 6% de SVF, en présence de différentes concentrations de peptide NP68 (A) et SIINFEKL (B), et de différentes concentrations d'IL-2. (w/o IL-2 : sans IL-2)

1. Système Expérimental

Pour analyser l'impact des cytokines γ c sur les fonctions des LT CD8 effecteurs, nous avons utilisé un modèle d'activation *in vitro* de LT CD8 F5 naïfs par le peptide NP68 en présence d'IL-2 (figure 22).

La présence d'IL-2 dans le milieu de culture est nécessaire au soutien de la prolifération des LT CD8 F5. En effet, sans IL-2, la stimulation des LT CD8 par le peptide NP68 n'induit qu'une faible prolifération abortive et ne générant pas de cellules effectrices (figure 23A). Cet apport n'est pas nécessaire dans tous les modèles de souris transgéniques pour le TCR : ainsi, l'activation de LT CD8 naïfs OT-I par le peptide SIINFEKL dans les mêmes conditions sans IL-2 induit leur prolifération (figure 23B). Ces différences reflètent une plus grande dépendance vis-à-vis d'un help-CD4 des CD8 F5 par rapport aux CD8 OT1.

Nos résultats montrent que l'ajout d'une cytokine γ c dans le milieu de culture lors de l'activation n'induit pas de différence significative de l'activation des cellules et de la prolifération qui en résulte. En effet, un nombre identique de LT CD8 effecteurs est récupérés 5 jours après activation (figure 24). Nous avons donc, dans la suite de l'étude, exprimé nos résultats en pourcentage d'expression d'un marqueur et non en nombre de cellules exprimant ce marqueur.

5 jours après activation, environ 90% des cellules présentes dans les cultures sont des LT CD8. L'ensemble des figures présentées dans la suite de l'étude montrent les résultats obtenus sur les LT CD8.

2. Résultats

2.1 L'IL-4 et l'IL-21 régulent l'expression de récepteurs NK par les LT CD8 effecteurs

La figure 25A montre que la présence d'IL-4 dans le milieu de culture lors de l'activation inhibe l'expression de NKG2D par les LT CD8 effecteurs 5 jours après activation. Nos résultats montrent également que l'IL-4 inhibe l'expression de CD94/NKG2ACE à la surface des LT CD8 effecteurs (figure 25B). Ce résultat montre que l'IL-4 inhibe l'expression des récepteurs NK à la surface des LT CD8 mémoires en conditions homéostatiques (partie 1)

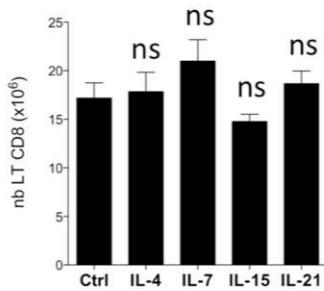


Figure 24 : Nombre de LT CD8 effecteurs générés 5 jours après activation

Les LT CD8 ont été activés comme indiqué dans la figure 1 et comptés 5 jours après activation

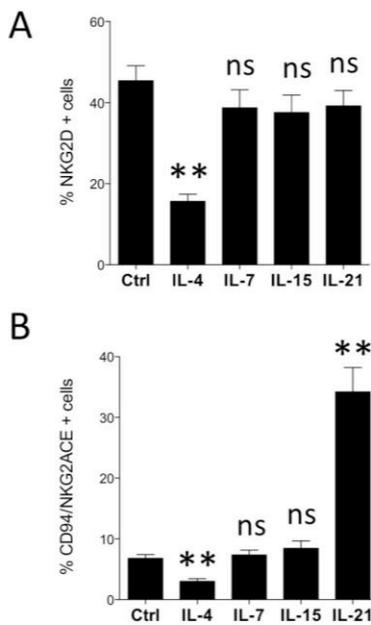


Figure 25 : L'IL-4 et l'IL-21 régulent l'expression de récepteurs NK par les LT CD8 effecteurs

Les LT CD8 ont été activés comme indiqué dans la figure 1. L'expression de NKG2D et CD94/NKG2ACE à la surface des LT CD8 5 jours après activation a été mesurée par cytométrie en flux. Les anticorps ont été fournis par R&D systems (anti-NKG2D) et eBioscience (anti-CD94 et anti-NKG2ACE)

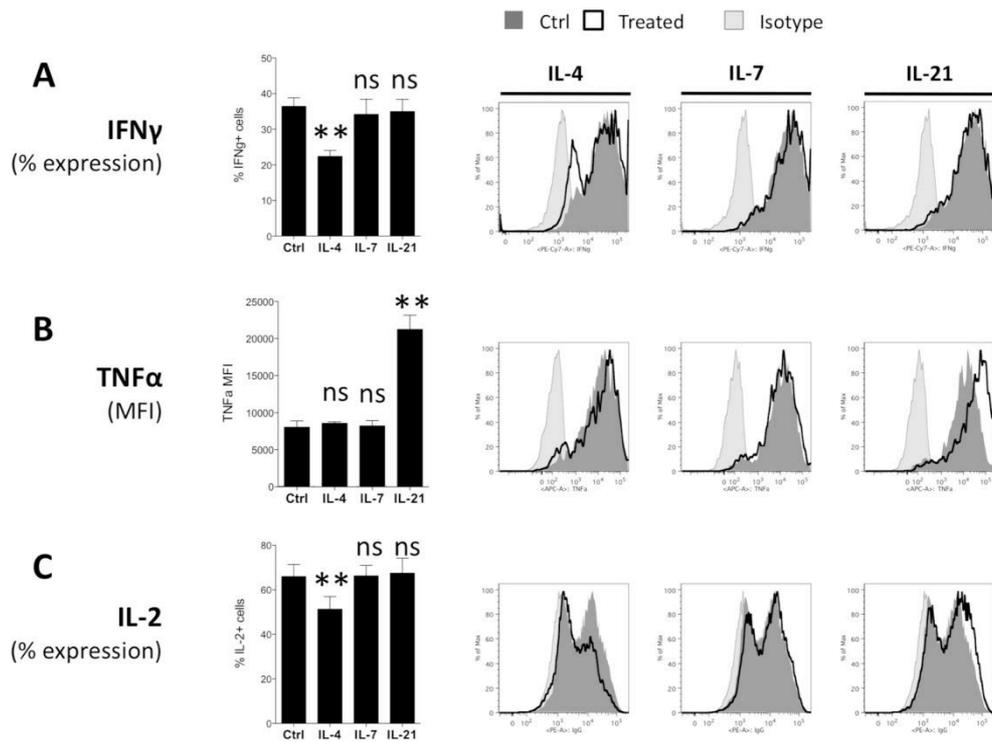


Figure 26 : L'IL-4 et l'IL-21 affectent les capacités de sécrétion de cytokines et la polyfonctionnalité des LT CD8 effecteurs

Les LT CD8 ont été activés comme indiqué dans la figure 1. Après 5 jours d'activation, les LT CD8 ont été lavés et 1.10^6 LT CD8 ont été restimulés 4h à la concentration de 1.10^6 cellules/mL par le peptide NP68 (10 nM) en présence de Golgi Stop. Leur contenu en IL-2 (A), TNF α (B) et IFN γ (C) a été mesuré par cytométrie en flux, après un marquage réalisé à l'aide du kit Cytofix/Cytoperm de BD Bioscience. Les anticorps ont été fournis par eBioscience

mais peut également abroger l'acquisition de l'expression de ces récepteurs à la surface des LT CD8 effecteurs lors de l'activation cellulaire.

Notre analyse montre également que, parmi les autres cytokines γ c testées, seule l'IL-21 régule l'expression de récepteurs NK : l'expression de CD94/NKG2ACE est fortement induite à la surface des LT CD8 effecteurs générés en présence de cette cytokine (figure 25B). En revanche, l'expression de NKG2D n'est pas affectée. L'IL-7 et l'IL-15 n'ont pas d'effet sur l'expression de ces récepteurs dans notre système.

L'IL-4 et l'IL-21 sont donc deux cytokines régulatrices de l'expression de récepteurs impliqués dans la modulation du seuil d'activation des LT CD8 effecteurs et mémoires. Nous avons, dans la suite de l'étude, focalisé notre attention sur ces deux cytokines. Nous avons également étudié, comme contrôle, le rôle d'une cytokine γ c dont le rôle a principalement été décrit dans la régulation de l'homéostasie des LT CD8 : l'IL-7.

2.2 L'IL-4 et l'IL-21 affectent les capacités de production cytokinique des LT CD8 effecteurs

La sécrétion de cytokines et de chimiokines participant à la résolution de l'infection et à l'amplification de la réponse immunitaire est une fonction effectrice très importante des LT CD8 effecteurs et mémoires. Afin de d'évaluer les effets de l'IL-4, l'IL-7 et l'IL-21 sur les capacités de sécrétion de cytokines de LT CD8 effecteurs, Nous avons mesuré leur contenu en IL-2, IFN γ et TNF α suite à une nouvelle rencontre avec l'antigène (figure 26). Après 5 jours d'activation *in vitro*, les LT CD8 effecteurs générés dans les différentes conditions ont été lavés et restimulés. La figure 26 montre que l'IL-4 et l'IL-21 ont des effets très différents sur les capacités de production de cytokines des LT CD8 effecteurs. Nos résultats montrent que seul l'IL-4 diminue la proportion de LT CD8 effecteurs produisant de l'IL-2 ou de l'IFN γ (figure 26A et 26C) mais n'affecte pas la proportion de cellules produisant TNF α (données non montrées), ni le contenu en TNF α de ces cellules (figure 26B). Au contraire, la présence d'IL-21 dans les cultures n'affecte pas la production d'IL-2 ou d'IFN γ , mais augmente la MFI de la coloration anti-TNF α , ce qui suggère une production accrue de cette cytokine par ces CD8 effecteurs (figure 26B). Nos résultats montrent par ailleurs que l'IL-7 ne modifie pas la sécrétion de ces trois cytokines par les LT CD8 effecteurs.

La capacité de protection contre un pathogène conférée par les LT CD8 est étroitement liée à leur polyfonctionnalité, c'est à dire à leur capacité à coproduire plusieurs cytokines.

Nous avons mesuré la polyfonctionnalité des LT CD8 effecteurs générés à jour 5. Les résultats présentés dans la figure 27 montrent que l'IL-4 diminue fortement la proportion de cellules co-sécrétant l'IFN γ , TNF α et l'IL-2 à jour 5 tandis que l'IL-21 et l'IL-7 n'affectent pas la proportion de cellules polyfonctionnelles. De plus, la proportion de cellules sécrétant 2 cytokines est très peu affectée par ces trois cytokines. Ces résultats suggèrent donc que l'IL-4 pourrait inhiber la génération de lymphocytes T CD8 mémoires polyfonctionnels.

Finalement, ces résultats montrent que l'IL-4 inhibe fortement les capacités de sécrétion cytokinique des LT CD8 effecteurs, tandis que l'IL-21 augmente fortement la capacité de sécrétion de TNF α de ces cellules.

2.3 L'IL-4 et l'IL-21 régulent les capacités de sécrétion de chimiokines par LT CD8 effecteurs

Nous avons vu dans la première partie que l'IL-4 inhibe l'expression du gène *Ccl5* dans les LT CD8 mémoires en conditions homéostatiques. Nous avons testé si l'acquisition de la capacité de production de chimiokines telles que CCL5, CCL3 et XCL1 par les LT CD8 est également inhibée par l'IL-4 ou d'autres cytokines γ c lors de la différenciation des LT CD8 en effecteurs.

Nos résultats montrent que l'IL-4 diminue fortement la production de chimiokines par les LT CD8 effecteurs (figure 28). En effet, la proportion de LT CD8 produisant CCL5 et XCL1 est fortement diminuée lorsque les cellules sont activées en présence d'IL-4 (figure 28A et 28B). La production de CCL3 est également diminuée, bien que très faiblement (figure 28C). L'IL-21 modifie également la sécrétion de chimiokines, bien que plus sélectivement que l'IL-4. En effet, la présence d'IL-21 dans le milieu de culture diminue la proportion de cellules produisant CCL5, mais n'a pas d'effets sur la production de XCL1 et de CCL3 (figure 28). Enfin, l'IL-7 n'a pas d'effet sur la production de chimiokines par les LT CD8 effecteurs. Afin de vérifier si les LT CD8 activés en présence d'IL-4 et d'IL-21 présentent effectivement un défaut de sécrétion de chimiokines, nous avons procédé à des expériences de dosages par ELISA de surnageant de culture de LT CD8 effecteurs stimulés 4 heures avec le peptide NP68. Comme présenté dans la figure 29, et de façon cohérente avec nos observations en cytométrie en flux, l'IL-4 inhibe fortement la sécrétion de CCL5 et de XCL1 après restimulation, tandis que l'IL-21 n'affecte que la sécrétion de CCL5. L'IL-4 pourrait donc

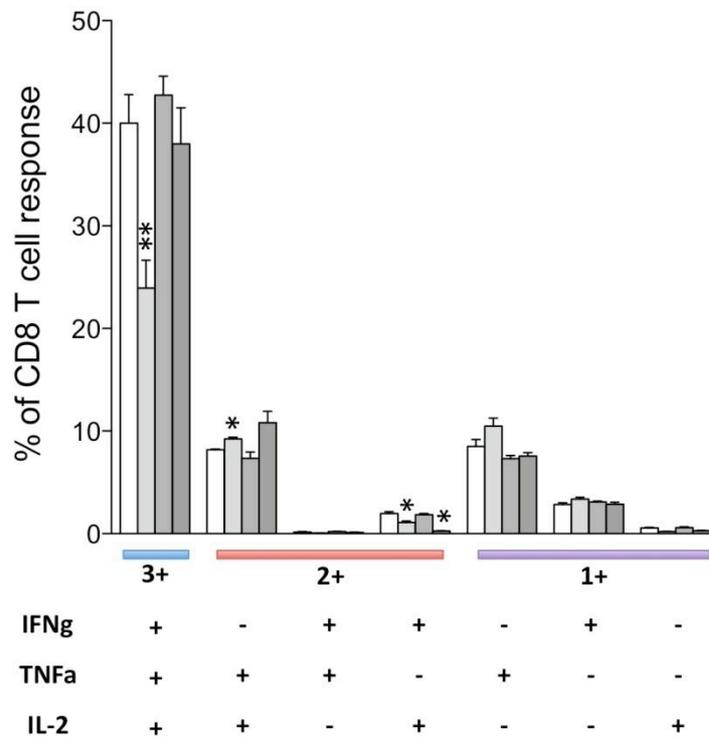


Figure 27 : L'IL-4 affecte la polyfonctionnalité des LT CD8 effecteurs

Les LT CD8 ont été activés comme indiqué dans la figure 1. Après 5 jours d'activation, les LT CD8 ont été lavés et 1.10^6 LT CD8 ont été restimulés 4h à la concentration de 1.10^6 cellules/mL par le peptide NP68 (10 nM) en présence de Golgi Stop, Leur contenu en IL-2 (A), TNF α et IFN γ a été mesuré par cytométrie en flux, après un marquage réalisé à l'aide du kit Cytofix/Cytoperm de BD Bioscience. Sont indiqués ici les pourcentages de cellules répondeuses sécrétant 3 (3+), 2 (2+) ou 1 (1+) cytokine après 5 jours d'activation. Les anticorps ont été fournis par eBioscience

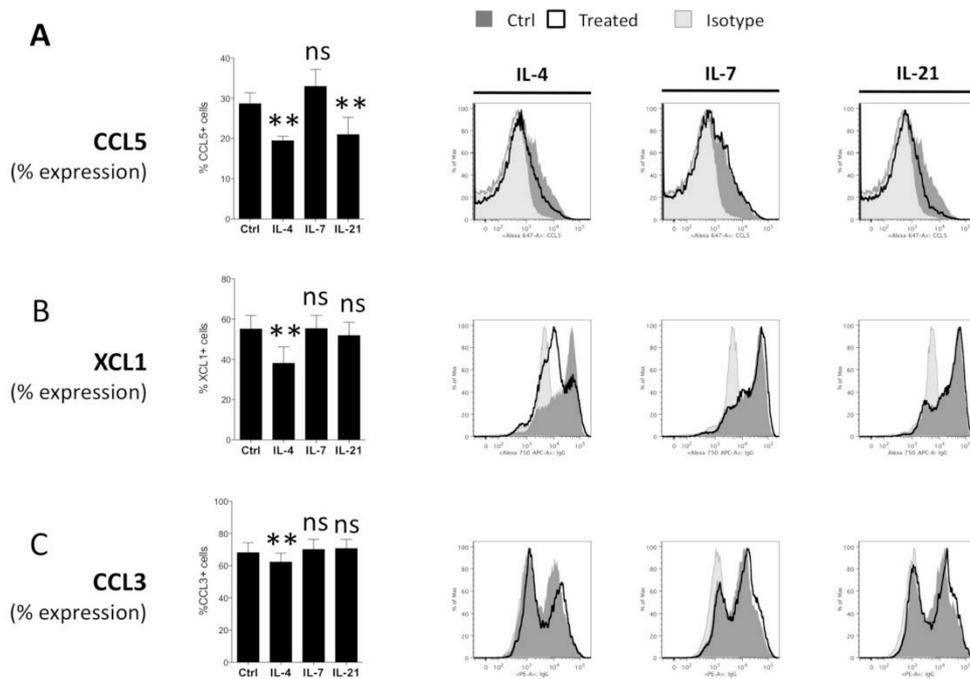


Figure 28 : Les cytokines γc affectent la production de chimiokines par les LT CD8 effecteurs

Les LT CD8 ont été activés comme indiqué dans la figure 1. Après 5 jours d'activation, les LT CD8 ont été lavés et 1.10^6 LT CD8 ont été restimulés 4h à la concentration de 1.10^6 cellules/mL par le peptide NP68 (10 nM) en présence de Golgi Stop. Leur contenu en CCL5 (A), XCL1 (B) et CCL3 (C) a été mesuré par cytométrie en flux, après un marquage réalisé à l'aide du kit Cytofix/Cytoperm de BD Bioscience. Les anticorps ont été fournis par eBioscience

être un inhibiteur majeur des capacités de chimioattraction des LT CD8, l'IL-21 n'inhibant cette capacité que partiellement.

Nos résultats montrent donc que l'IL-4 affecte fortement les capacités de sécrétion de cytokines et chimiokines par les LT CD8 effecteurs et est donc un régulateur majeur de l'acquisition de cette fonction par les LT CD8 effecteurs. L'effet de l'IL-21 est moins clair : la présence de cette cytokine lors de l'activation augmente la production de TNF α , mais inhibe la sécrétion de CCL5.

2.4 L'IL-4 et l'IL-21 modulent l'expression de récepteurs de cytokines par les LT CD8 effecteurs

Nous avons ensuite étudié si la présence de cytokines γ c dans le milieu lors de l'activation affecte la sensibilité des LT CD8 effecteurs à d'autres cytokines. Pour cela, nous avons mesuré le niveau d'expression de la chaîne α des récepteurs de l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-7 à la surface des LT CD8 effecteurs générés en présence des cytokines testées. Nos résultats indiquent que la présence d'IL-4 et d'IL-21 dans l'environnement module l'expression de ces récepteurs (figure 30).

En effet, la présence d'IL-21 dans l'environnement lors de l'activation inhibe l'expression du récepteur de l'IL-2, tandis que l'expression des récepteurs de l'IL-4 et de l'IL-7 est augmentée en présence de cette cytokine (Figure 30). Cela suggère que l'IL-21 pourrait modifier la sensibilité des LT CD8 effecteurs aux stimuli cytokiniques environnementaux. Nous avons également observé que l'IL-4 augmente les expressions des récepteurs de l'IL-2 et l'IL-4 à la surface des LT CD8 (figures 30A et 30C). En revanche, l'expression des récepteurs de cytokines n'est pas modifiée par la présence d'IL-7.

Plusieurs études ont montré que les niveaux d'expression de certains récepteurs comme l'IL-2Ra et l'IL-7Ra corrèlent avec le potentiel de différenciation des LT CD8 effecteurs en cellules mémoires. En effet, il a été récemment montré que les LT CD8 effecteurs exprimant de faibles niveaux d'IL-2Ra sont les plus susceptibles de se différencier en cellules mémoires (Kalia et al., *Immunity*, 2010 ; Pipkin et al., *Immunity*, 2010). Par ailleurs, les LT CD8 mémoires ré-exprimant préférentiellement l'IL-7Ra après activation sont également ceux qui ont le plus grand potentiel de différenciation en LT CD8 mémoires (Kaech et al., *Nat Immunol*, 2003 ; Sarkar et al., *JEM*, 2008). La modulation d'expression de

ces récepteurs pourrait donc suggérer une modification du potentiel de différenciation en cellules mémoire des effecteurs générés en présence d'IL-21 ou d'IL-4.

2.5 L'IL-4 et l'IL-21 modifient le potentiel de différenciation des LT CD8 effecteurs en cellules mémoires et affecte les cellules mémoires générées.

Nous avons montré que l'IL-4 et l'IL-21 affectent l'expression de différents marqueurs des lymphocytes T CD8 effecteurs. Afin de vérifier l'impact de ces modifications sur la différenciation des cellules en LT CD8 mémoires, nous avons utilisé un système de transfert qui permet d'évaluer le potentiel de différenciation en cellules mémoires des cellules effectrices ainsi que l'analyse des caractéristiques des LT CD8 mémoires générés. Une première expérience préliminaire a été effectuée. Des LT CD8 activés 4 jours en présence d'IL-4, d'IL-7 ou d'IL-21 ont été transférés dans des souris C57Bl/6 et nous avons étudié la génération de cellules mémoires 6 semaines après transfert (figure 31). De façon surprenante, le nombre de cellules mémoires générées dans la condition IL-4 et la condition IL-21 sont très fortement diminués (figure 31A). Ce résultat suggère donc que la présence d'IL-4 et d'IL-21 dans le milieu d'activation limite la différenciation des LT CD8 effecteurs en précurseurs de cellules mémoires. La présence d'IL-7 n'a en revanche pas montré d'impact sur la génération de cellules mémoires (figure 31A).

Par ailleurs, nous avons étudié l'expression de NKG2D et CCL5 dans les cellules mémoires générées (figures 31B et 31C). Nos résultats montrent que la présence d'IL-4 lors de l'activation diminue l'expression de NKG2D par les cellules mémoires générées, mais n'a aucune influence sur l'expression de CCL5. En revanche, l'IL-21 induit la génération de cellules mémoires exprimant de faibles niveaux de CCL5. Par ailleurs, de façon surprenante, nos résultats montrent que ces cellules mémoires expriment également de faibles niveaux de NKG2D, bien que les LT CD8 effecteurs générés en présence d'IL-21 expriment un niveau normal de NKG2D à leur surface (figure 25A). La présence d'IL-7 lors de l'activation n'a en revanche pas d'effet sur l'expression de NKG2D et CCL5 par les LT CD8 mémoires générés.

Nos résultats montrent donc que la présence d'IL-4 et d'IL-21 dans le milieu de culture lors de l'activation limite la différenciation des LT CD8 effecteurs en cellules mémoires et inhibe l'acquisition de capacités effectrices caractéristiques de ces cellules comme l'expression de NKG2D et CCL5.

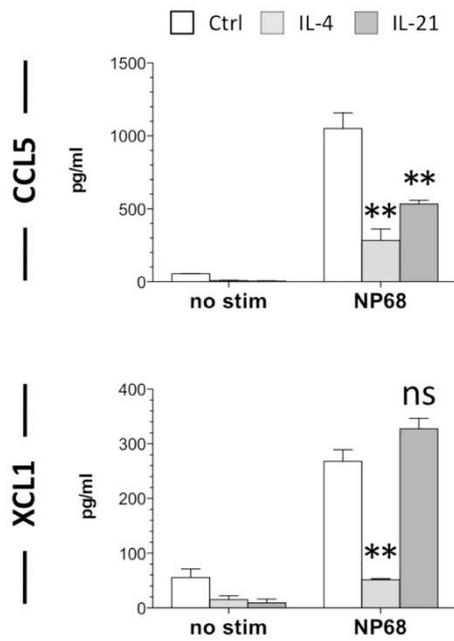


Figure 29 : L'IL-4 et l'IL-21 affectent la capacité de sécrétion de CCL5 et XCL1 par les LT CD8 effecteurs

Les LT CD8 ont été activés comme indiqué dans la figure 1.

Après 5 jours d'activation, les LT CD8 ont été lavés puis $2 \cdot 10^5$ cellules ont été restimulées 4h à la concentration de $1 \cdot 10^6$ cellules/mL par le peptide NP68 (10 nM) en plaque 96 puits. Les concentrations de CCL5 et XCL1 présentes dans le surnageant ont été dosées par ELISA (kit R&D systems).

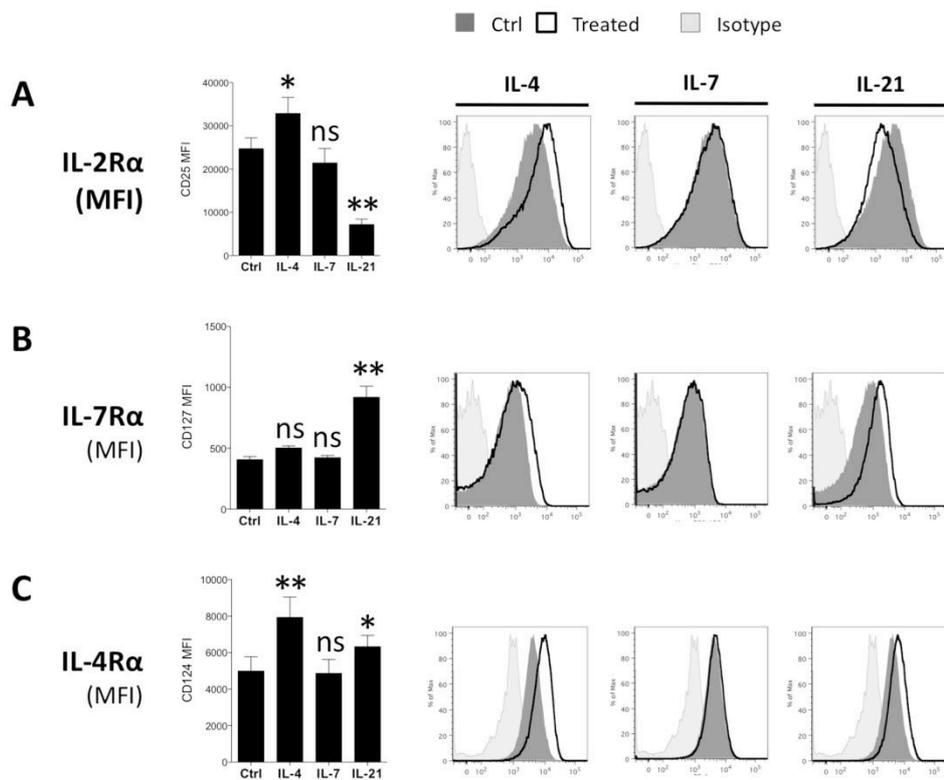


Figure 30 : L'IL-4 et l'IL-21 régulent l'expression de récepteurs de cytokines par les LT CD8

Les LT CD8 ont été activés comme indiqué dans la figure 1.

A- L'expression de l'IL-2Rα, l'IL-4Rα, et l'IL-7Rα à la surface des LT CD8 5 jours après activation a été mesurée par cytométrie en flux

B- Modulation de l'expression de l'IL-4Rα à la surface des LT CD8 effecteurs générés en présence d'IL-4 et/ou d'IL-21. Les données sont exprimées en pourcentage de variation d'expression par rapport à la condition contrôle. Les anticorps ont été fournis par eBioscience

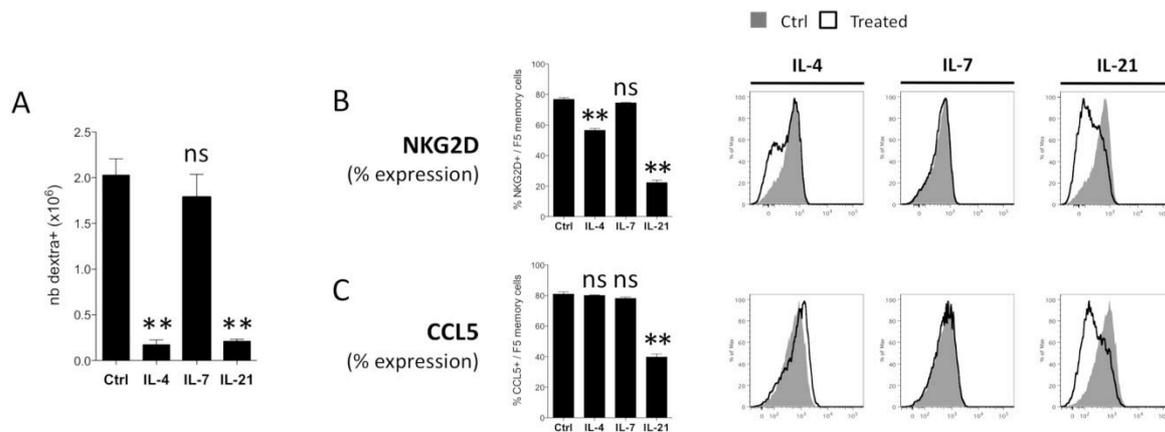


Figure 31 : L'IL-4 et l'IL-21 affectent la différenciation des LT CD8 effecteurs en LT CD8 mémoires

Les LT CD8 ont été activés comme indiqué dans la figure 1. 4 jours après activation, 3.10^6 LT CD8 activés ont été transférés par voie intraveineuse dans des souris receveuses. 6 semaines après transfert, les rates des souris receveuses ont été analysées.

A- Nombre de LT CD8 F5 mémoires présents dans la rate 6 semaines après transfert des LT CD8 générés dans les différentes conditions d'expérience.

B- Expression de NKG2D par les LT CD8 mémoires générés 6 semaines après transfert des LT CD8 générés dans les différentes conditions d'expérience. L'anticorps anti-NKG2D a été fourni par R&D systems

C- Expression de CCL5 par les LT CD8 mémoires générés 6 semaines après transfert des LT CD8 générés dans les différentes conditions d'expérience. L'anticorps anti-CCL5 a été généré au laboratoire

3. Discussion : modèle d'activation et rôle de l'IL-2

Afin d'évaluer les effets des cytokines γ c sur la génération de LT CD8 effecteurs, nous avons utilisé un modèle *in vitro* d'activation par le peptide NP68 en présence d'IL-2. La présence de cette cytokine dans le milieu d'activation est à prendre en compte pour l'interprétation des résultats.

Nous utilisons cette cytokine afin de soutenir la prolifération des LT CD8 activés. Sans IL-2, les cellules sont activées mais la prolifération qui en résulte est abortive. Cependant, il nous faut envisager plusieurs types d'interactions entre les cytokines utilisées dans l'étude. D'une part, nous ne pouvons écarter la possibilité que certains effets observés résultent d'interactions entre les voies de signalisation de l'IL-2 et celles des cytokines γ c. Evaluer de tels effets nécessiterait l'utilisation d'un autre modèle, dans lequel l'IL-2 n'est pas nécessaire à la prolifération des cellules activées.

D'autre part, il faut également envisager la possibilité d'une modification de la sensibilité des LT CD8 à l'IL-2 par les cytokines testées. A ce titre, les résultats obtenus concernant les variations d'expression de la chaîne α du récepteur de l'IL-2 sont particulièrement intéressants : nous avons en effet constaté que la présence d'IL-21 dans l'environnement des LT CD8 lors de l'activation diminue fortement l'expression de l'IL-2R α . Cette observation confirme des résultats publiés par Hinrichs et collègue (Hinrichs et al., Blood, 2008). Dans cet article, les auteurs montrent que la présence d'IL-2 dans l'environnement lors de l'activation induit l'expression d'Eomes et de Gzm-B par les LT CD8 effecteurs. Ils montrent de plus cette expression est inhibée par l'ajout d'IL-21 dans le milieu lors de l'activation. Toutefois les auteurs ne déterminent pas s'il s'agit d'interactions « moléculaires » entre les deux voies de signalisation ou si les effets observés ont pour origine la diminution de l'expression du récepteur de l'IL-2 induite par l'IL-21. L'étude de Elsaesser et collègues montre que, lors d'une infection par une souche chronique du virus LCMV, l'IL-21 soutient les fonctions effectrices des LT CD8 notamment en diminuant la sécrétion d'IL-2 par les LT CD4 (Elsaesser et al., Nature, 2009). L'ensemble de ces résultats suggère que l'IL-21 diminue fortement le signal délivré par l'IL-2 aux LT CD8 lors de la réponse immunitaire, ce qui pourrait limiter leur différenciation en effecteurs « terminaux ».

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les LT CD8 sont des cellules de l'immunité adaptative indispensables à la protection de l'organisme contre les pathogènes et à l'élimination de cellules tumorales. Suite à une première infection, ils peuvent se différencier en cellules mémoires capables de répondre très rapidement lors d'une nouvelle rencontre avec l'antigène. Cette accélération de la réponse a pour origine l'amélioration d'un certain nombre de capacités : d'une part, les LT CD8 mémoires spécifiques d'un antigène sont présents en fréquence plus élevée que les LT CD8 naïfs, ce qui permet une expansion plus rapide suite à une infection secondaire. D'autre part, ils ont des fonctions améliorées leur permettant d'éliminer plus rapidement leurs cellules cibles et d'amplifier la réponse immunitaire. Parmi ces fonctions améliorées, nous avons montré au cours de ma thèse que les LT CD8 mémoires sécrètent plus fortement la chimiokine XCL1 que les LT CD8 naïfs (Croizat et al., JEM, 2010). La fonction de XCL1 a été récemment documentée : deux études ont montré que XCR1, unique récepteur de XCL1, est un marqueur conservé entre espèces des DC capables de faire de la cross-présentation et donc de participer à l'activation des LT CD8 (Dorner et al., Immunity, 2009 ; Croizat et al., JEM, 2010). Les LT CD8 mémoires seraient donc capables après activation de produire de grandes quantités de XCL1 ce qui aurait pour conséquence une importante amplification de la réponse immunitaire.

La majorité de ces caractéristiques propres aux LT CD8 mémoires, que nous nommerons « fonctionnalités mémoires » dans la suite de la discussion, peuvent être régulées par des signaux très divers, notamment cytokiniques. L'équipe a ainsi montré que l'expression du gène *cc15* est inhibée de façon réversible par l'IL-4 (Marçais et al., J Immunol, 2006). S'il a récemment été décrit que l'IL-4 induit *in vivo* la prolifération des LT CD8 mémoires, les effets de l'IL-4 sur d'autres fonctions de ces cellules n'ont pas été documentés (Boyman et al., Science, 2006 ; Ueda et al., Int Immunol, 2006 ; Morris et al., J Immunol, 2009).

Nous avons, dans cette étude, tenté d'identifier les effets de l'IL-4 sur les LT CD8 mémoires. Nous avons pour cela utilisé une approche par microarray nous permettant d'identifier la signature d'expression génique de l'IL-4 sur ces cellules. Nos résultats montrent que l'IL-4 affecte l'expression de nombreux gènes impliqués dans des fonctions des LT CD8 mémoires telles que leur métabolisme, leurs capacités migratoires, mais également leurs fonctions effectrices. Nous nous sommes particulièrement intéressés au récepteur NKG2D, dont la fonction à la surface des LT CD8 a été assez largement documentée. Par ailleurs, nous avons montré que, *in vivo*, l'IL-4 induit la différenciation de cellules naïves en

cellules CD8 « innées » ayant certaines propriétés de cellules mémoires mais dont les capacités fonctionnelles sont limitées.

1- L'IL-4 régule une grande diversité de fonctions des LT CD8 mémoires.

1.1 Signature IL-4

Notre approche par microarray nous a permis d'identifier la signature des gènes régulés par l'IL-4 dans les LT CD8 mémoires. L'expression de gènes impliqués dans un grand nombre de fonctions est régulée, ce qui suggère que l'IL-4 pourrait avoir un effet pléiotropique sur les LT CD8.

Il est connu que l'IL-4 induit la prolifération des LT CD8 *in vivo* (Boyman et al., Science, 2006 ; Morris et al., J Immunol, 2009 ; Ueda et al., Int Immunol, 2006). Plusieurs gènes codant pour des protéines intervenant dans la régulation de la prolifération cellulaire apparaissent dans la signature de l'IL-4, tels que *tob1*, *klf6* ou *cdk6*. *Tob1*, dont l'expression est diminuée par l'IL-4, code pour une protéine fortement exprimée par les LT quiescents et anergiques, mais son expression est diminuée après activation : il pourrait agir notamment en inhibant la prolifération cellulaire (Tzachanis et al., Nat Immunol, 2001). L'expression de *Klf6* est également diminuée : KLF6 est un inhibiteur de la prolifération cellulaire agissant en inhibant l'activité du facteur de transcription c-Jun (Slavin et al., Oncogene, 2004). Enfin, *cdk6*, dont l'expression est augmentée par l'IL-4, code pour une cycline fortement exprimée dans les LT CD8 mémoires et qui intervient dans l'induction de la prolifération homéostatique de ces cellules (Veiga-Fernandes et al., Nat Immunol, 2004). La régulation de l'expression de ces gènes par l'IL-4 va donc dans le sens d'une induction de la prolifération des LT CD8 mémoires, en accord avec la littérature. Nos résultats pourraient donc permettre d'avancer des mécanismes impliqués dans l'induction de la prolifération des LT CD8 par l'IL-4.

L'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la migration cellulaire est également régulée par l'IL-4. D'une part, l'expression de *cdh1*, gène codant pour l'e-cadhérine, est augmentée. Il s'agit d'une protéine d'adhésion intercellulaire agissant

notamment via des interactions homotypiques. Elle est principalement exprimée par les tissus épithéliaux, au sein desquels elle a un rôle important dans le maintien de l'architecture tissulaire (Takeichi et al., Science, 1991, Larue et al., PNAS, 1994). Cependant, son expression a également été décrite à la surface de plusieurs populations de DC (Riedl et al., Blood, 2000 ; Jiang et al., Immunity, 2007 ; Siddiqui et al., Immunity, 2010). Une forte expression de cette protéine à la surface des LT CD8 pourrait augmenter leur résidence dans des tissus épithéliaux tels que les tissus intestinaux. Par ailleurs, notre analyse montre que l'expression du gène *itgb7* est diminuée. Les intégrines sont exprimées à la surface cellulaire sous forme d'hétérodimères composés d'une chaîne α et d'une chaîne β . L'Intégrine- $\beta 7$ est principalement associée à l'intégrine- $\alpha 4$ à la surface des LT CD8, et joue un rôle important dans la migration des LT CD8 naïfs vers les patches de Peyer, et des LT CD8 effecteurs vers les muqueuses lors d'une réponse immunitaire (Lefrançois et al., JEM, 1999). L'IL-4 pourrait donc fortement moduler les capacités migratoires des LT CD8 mémoires.

D'autre part, outre *nkg2d*, plusieurs gènes codant pour des protéines intervenant dans l'activation des fonctions effectrices des LT CD8 font partie de cette signature. Nous avons notamment identifié le gène *klrd1*, codant pour la protéine CD94. Celle-ci peut s'associer à la surface des LT CD8 avec deux récepteurs, NKG2A et NKG2C. Le récepteur CD94/NKG2A délivre un signal inhibiteur chez les NK. Son rôle à la surface des LT CD8 est en revanche soumis à controverse, et a été étudié uniquement à la surface des LT CD8 effecteurs. Exprimé à la surface des LT CD8 effecteurs lors d'une réponse au virus LCMV, le récepteur CD94/NKG2A ne semble pas avoir de rôle inhibiteur, tandis que l'engagement de ce récepteur inhibe la cytotoxicité et la sécrétion cytokinique de LT CD8 effecteurs générés en réponse au virus Influenza ou à un Polyomavirus (Moser et al., Nat Immunol, 2002 ; Zhou et al., J Immunol, 2008 ; Miller et al., J Immunol, 2002). Le récepteur CD94/NKG2C est un récepteur activateur, mais son expression est peu documentée à la surface des LT CD8 chez la souris (Arlettaz et al., EJI, 2004 ; Vance et al., JEM, 1999). Il est intéressant de constater que les gènes *nkg2d* et *cd94* sont voisins au sein du complexe de gène NK (figure 32). Il est donc possible que ces gènes soient co-régulés par l'IL-4, via un mécanisme régulateur commun.

Le logiciel en ligne COXPRESSdb permet d'analyser des données de co-expression à partir des données de microarray publiées dans la littérature, et représente donc une première approche pour valider cette hypothèse de co-régulation : l'utilisation du logiciel montre en effet que les expressions des gènes *nkg2d* et *cd94* sont très fortement corrélées.

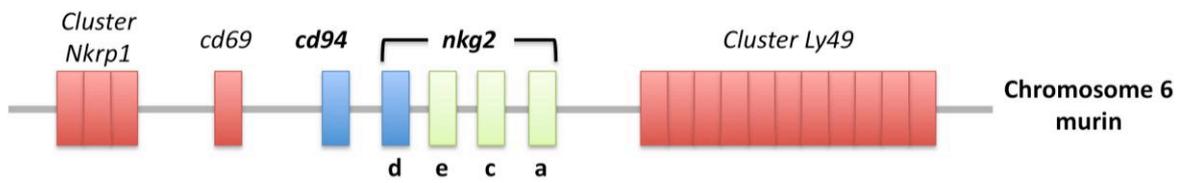


Figure 32 : le complexe de gènes NK. Les gènes *cd94* et *nkg2d* sont très proches au sein de ce complexe.

L'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines principalement décrites pour leur rôle dans l'immunité innée telles que CD55 et CD84 est diminuée. CD55, également connu sous le nom de DAF1, est exprimé à la surface cellulaire et agit comme inhibiteur de l'activation du complément. Il a également été décrit qu'il peut agir en tant que récepteur costimulateur des lymphocytes T lorsqu'il est engagé par son ligand, CD97, à la surface d'un APC (Spendlove et al., Adv Exp Med Biol, 2010). Une autre étude montre cependant que la réponse des LT CD8 est augmentée dans des souris CD55^{-/-} comparé à des souris sauvages, suggérant un rôle inhibiteur de CD55 à la surface des LT CD8. Ces données contradictoires rendent donc difficile l'interprétation du rôle de CD55 à la surface de ces cellules (Fang et al., J Immunol, 2007). CD84, membre de la famille des protéines SLAM, au même titre que d'autres récepteurs activateurs comme 2B4 (CD244), est impliqué dans l'activation des NK (Wang et al., J Immunol, 2010) et des macrophages (Sintes et al., J Leukoc Biol, 2010), et pourrait donc avoir une fonction similaire à la surface des LT CD8.

D'autre part, la signature d'expression génique de l'IL-4 que nous avons identifiée montre que l'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines principalement décrites pour leur rôle dans l'immunité adaptative est augmentée. C'est notamment le cas du gène *trem12*, codant pour le récepteur TLT-2, dont l'expression est fortement augmentée. Ce récepteur est encore peu étudié mais il est exprimé de façon constitutive à la surface des LT CD8 chez la souris et aurait une fonction costimulatrice (Hashiguchi et al., PNAS, 2008). D'autre part, l'expression du gène *Trat1* est également augmentée. Ce gène code pour une protéine, TRIM, capable de s'associer au récepteur co-inhibiteur CTLA-4 dans le cytoplasme des cellules, et de réguler l'expression de cette molécule à la surface cellulaire. Il a ainsi été montré que la surexpression de TRIM induit une forte augmentation de l'expression de CTLA-4 à la surface cellulaire de lignées T et de PBL humains, ce qui s'accompagne d'une forte diminution de la prolifération et de la sécrétion cytokinique des LT en réponse à une stimulation in vitro (Valk et al., Immunity, 2006). Notre résultat suggère donc que l'IL-4 pourrait également inhiber les fonctions des LT CD8 mémoires par l'intermédiaire de l'induction de l'expression de récepteurs inhibiteurs comme CTLA-4 à la surface cellulaire. Autre gène codant pour une protéine impliquée dans les fonctions des LT CD8, le gène *map3k8* est également induit par l'IL-4. Map3k8 est une kinase également appelée Tpl2. Une étude de Tsatsanis et collègues suggère que, dans les LT CD8, Tpl2 pourrait diminuer le signal TCR et agir comme suppresseur de tumeur dans les LT CD8 activés de façon chronique (Tsatsanis et al., PNAS, 2008). L'augmentation de l'expression de ce gène par l'IL-

4 suggère donc de nouveau que cette cytokine pourrait diminuer la capacité des LT CD8 à être stimulés. Enfin, la signature d'expression génique de l'IL-4 montre de plus que l'expression du gène *lyst* est augmentée. LYST est un régulateur du trafic lysosomal, également impliqué dans les réactions de fission/fusion des membranes lysosomales. Une mutation dans le gène diminue fortement la cytotoxicité des LT et des NK, ce qui est associé au développement du syndrome Chediak Higashi, se développant principalement en raison des faibles capacités cytotoxiques des NK et des LT CD8 effecteurs (Jessen et al., Blood, 2011). L'induction de l'expression de ce gène dans les LT CD8 mémoires par l'IL-4 pourrait donc être associée avec une modification des capacités cytotoxiques de ces cellules.

Finalement, la signature d'expression génique que nous avons identifiée suggère que de nombreuses fonctions des LT CD8 mémoires, dont leurs fonctions effectrices, sont régulées par la présence d'IL-4 dans l'environnement. Afin de confirmer *in vitro* et *in vivo* que l'IL-4 affecte les fonctions des LT CD8 mémoires, nous avons focalisé notre travail sur l'étude du gène *klrk1*, codant pour le récepteur NKG2D.

1.2 L'IL-4 régule l'expression de NKG2D et CD94 *in vitro* et *in vivo*

Nous avons par la suite décidé de nous intéresser principalement à un gène codant pour un récepteur intervenant directement dans les « fonctionnalités mémoires » : *klrk1* ou *nkg2d*. Le récepteur NKG2D a originellement été décrit chez les NK : son engagement induit chez ces cellules l'activation des capacités cytotoxiques et la sécrétion cytokinique. En ce qui concerne les LT CD8 mémoires, le rôle de NKG2D a été controversé mais la communauté scientifique s'accorde à présent sur le fait que NKG2D agit comme récepteur costimulateur : son engagement n'induit pas le déclenchement des capacités cytotoxiques des LT CD8, mais diminue le seuil d'activation des LT CD8 en réponse à une stimulation du TCR. Cette différence de fonction de NKG2D entre cellules NK et LT CD8 mémoires a pour origine l'existence de deux isoformes de NKG2D : les LT CD8 expriment à leur surface uniquement une isoforme longue (NKG2DL), tandis que les NK expriment également une isoforme courte (NKG2DS). Ces deux isoformes s'associent à la surface cellulaire à deux adaptateurs différents : NKG2DL s'associe à DAP10, possédant dans sa partie intracytoplasmique des motifs YINM, tandis que NKG2DS peut s'associer à DAP10 mais également DAP12, possédant dans sa partie intracytoplasmique des motifs ITAM (Rabinovitch et al.,

Immunogenetics, 2006). Ainsi, les signaux délivrés par les deux isoformes sont différents : suffisants pour activer les NK pour NKG2DS, mais délivrant uniquement un signal costimulateur aux LT CD8 pour NKG2DL (Diefenbach et al., Nat Immunol, 2002). De plus, nous avons étudié certains effets de l'IL-4 sur l'expression de *cd94*, gène codant pour une autre molécule décrite à la surface des NK et s'associant principalement à NKG2A à la surface des LT CD8 (annexe 1).

Nous avons dans un premier temps étudié l'expression de NKG2D par les LT CD8 mémoires et montré que ce récepteur est exprimé par la majorité des T_{IM} et la totalité des T_{CM}/T_{EM} générés en réponse à une infection par le virus vaccinia. Nous avons montré que, *in vitro*, l'IL-4 inhibe en 20 heures l'expression du gène *nkg2d* dans les T_{IM} et les T_{CM}/T_{EM}. Cela se traduit chez les T_{IM} par une diminution de l'expression de surface de ce récepteur. En revanche, nous n'avons pas observé de diminution significative de l'expression de NKG2D à la surface des T_{CM}/T_{EM} en 20 heures. Ces cellules expriment, basé sur la MFI, de 3 à 5 fois plus de NKG2D à leur surface que les T_{IM}. Une période de 20 heures n'est peut-être pas suffisante pour induire une disparition complète de la protéine à la surface cellulaire. Alternativement, les T_{CM}/T_{EM} étant des cellules mémoires plus différenciées que les T_{IM}, il est possible que la demi-vie de la protéine à leur surface soit plus importante. Les T_{IM} sont des cellules mémoires ayant un degré de différenciation limité et pourraient ainsi être plus « modelables ». Par ailleurs, nous avons vérifié que l'IL-4 diminue également la quantité d'ARNm de CD94 présente dans les T_{IM} (annexe 1). CD94 étant peu exprimé à la surface des T_{IM}, nous n'avons pas observé de modification significative de l'expression de cette protéine à la surface cellulaire en réponse à l'IL-4.

Nous avons par la suite souhaité vérifier que l'IL-4 agissait directement sur les lymphocytes T CD8 pour inhiber l'expression de *nkg2d* et *cd94*. STAT6 étant le facteur de transcription principal en aval du récepteur de l'IL-4, nous avons évalué l'effet de l'IL-4 sur des T_{IM} purifiés déficients pour le gène *stat6*. L'effet d'inhibition de l'expression de *nkg2d* par l'IL-4 est totalement aboli dans ces cellules et fortement réduit pour *cd94*, ce qui montre que l'IL-4 agit directement sur les LT CD8.

Afin de valider nos résultats dans un modèle *in vivo*, nous avons utilisé un procédé consistant à injecter l'IL-4 recombinante complexée avec un anticorps monoclonal anti-IL-4. Ce procédé a été décrit pour la première fois en 1993 par Finkelman et collègues (Finkelman et al., J Immunol, 1993). Les cytokines recombinantes ont une faible demi-vie dans la souris : Jones et collègues ont ainsi évalué que la demi-vie de l'IL-3 dans la souris se situe entre 5 et

15 minutes (Jones et al., Blood, 1993). Afin de remédier à ce problème, elles sont injectées complexées à un anticorps dans la souris, ce qui a pour conséquence d'augmenter la demi-vie et la biodisponibilité des cytokines dans la souris. En effet, les complexes se dissocient progressivement dans la souris, maintenant une concentration stable de cytokine dans la souris pendant une période importante (Finkelman et al., J Immunol, 1993). Il est également possible que ces complexes fonctionnent de manière analogue à ce qui est observé pour l'IL-15 : cette cytokine est en effet présentée en *trans* par la chaîne IL-15R α (Dubois et al., Immunity, 2002 ; Sandau et al., J Immunol, 2004 ; Dubois et al., J Immunol, 2008). Il est donc possible que, de la même manière, l'anticorps présente la cytokine recombinante à l'IL-4R. Ces complexes ont été utilisés avec succès avec l'IL-2, l'IL-4 ou l'IL-7 (Boyman et al., Science, 2006 ; Cho et al., JEM, 2007 ; Boyman et al., J Immunol, 2008 ; Létourneau et al., PNAS, 2010).

La prolifération des LT CD8 mémoires induite par les complexes IL-4/anti-IL-4 est similaire à celle observée en réponse à l'IL-4 sécrétée lors d'une infection par *Nippostrongylus brasiliensis* (Morris et al., J Immunol, 2009). Ainsi, ce procédé artificiel permet de mimer l'effet qu'aurait l'IL-4 produit lors d'une réponse de type Th2 sur des LT CD8 bystander. Il serait cependant intéressant de confirmer ces résultats dans un modèle d'infection par un pathogène élicitant une réponse Th2.

Nos résultats montrent que, *in vivo*, l'IL-4 inhibe l'expression de NKG2D à la surface des T_{IM}. Cependant, nous avons également observé en 4 jours une diminution significative de l'expression de NKG2D à la surface des T_{CM}/T_{EM}. Cela renforce l'hypothèse selon laquelle la demi-vie de NKG2D dans les T_{CM}/T_{EM} est plus longue que dans les T_{IM}. En effet, un traitement de 20 heures *in vitro* inhibe l'expression du gène mais pas l'expression à la surface des T_{CM}/T_{EM}, tandis que 4 jours de traitement *in vivo* affectent également l'expression de surface. Nos résultats montrent également que l'expression de CD94 à la surface des LT CD8 mémoires est diminuée par l'IL-4 dans ces conditions.

Finalement, nous avons vérifié que cette diminution d'expression de NKG2D à la surface des LT CD8 mémoires s'accompagne d'une diminution du signal costimulateur induit par l'engagement de NKG2D. Nos résultats confirment donc que la présence d'IL-4 dans l'environnement des LT CD8 mémoires inhibe l'expression de ce récepteur costimulateur impliqué dans la détection du stress cellulaire.

Le récepteur NKG2D a la particularité de pouvoir être engagé par une grande diversité de ligands, toujours faiblement ou non exprimés par les tissus sains, mais dont l'expression

peut être induite en réponse à un stress infectieux ou génotoxique. En 2005, Gasser et collaborateurs ont ainsi décrit l'expression de ligands de NKG2D à la surface cellulaire en réponse à l'activation de la voie d'endommagement de l'ADN, participant ainsi au signalement de cellules potentiellement dangereuses pour l'organisme (Gasser et al., *Nature*, 2005). Le rôle de NKG2D dans la détection et l'élimination des tumeurs par les NK a été abondamment décrit, notamment par l'équipe de David Raulet (Diefenbach et al., *Nat Immunol*, 2000 ; Diefenbach et al., *Nature*, 2001 ; Guerra et al., *Immunity*, 2008). La détection du stress par NKG2D est également importante pour la fonction des LT CD8 : l'expression de NKG2D par les LT CD8 joue en effet un rôle dans la résolution de certaines infections virales ou bactériennes ainsi que dans certaines réponses anti-tumorales (Diefenbach et al., *Nature*, 2001 ; André et al., *International Journal of Cancer*, 2011 ; Walsh et al., *J Virol*, 2008 ; Hessmann et al., *Immunobiology*, 2011 ; Rausch et al., *EJI*, 2006 ; Groh et al., *Nat Immunol*, 2001).

L'IL-4 n'est pas l'unique régulateur de l'expression de ce récepteur. L'IL-21, autre cytokine de la famille γ c, inhibe l'expression de NKG2D à la surface des LT CD8 en conditions homéostatiques (Burgess et al., *J Immunol*, 2006). Il a également été décrit que les LT CD4 peuvent réguler l'expression de NKG2D à la surface des LT CD8 par l'intermédiaire de la sécrétion de ligands de NKG2D, engageant le récepteur et provoquant son internalisation (Cerboni et al., *Blood*, 2009). La diversité des signaux capables d'inhiber l'expression de NKG2D est en lien direct avec l'important rôle que joue ce récepteur dans la détection du stress cellulaire. Nous décrivons ici que l'IL-4 inhibe l'expression de ce récepteur costimulateur : la décroissance du seuil d'activation des LT CD8 associée à l'engagement de NKG2D par un de ses ligands dans un contexte de développement tumoral ou infectieux serait ainsi inhibée.

Une régulation fine de l'expression de NKG2D suggérée par ces résultats pourrait être importante pour éviter une activation des LT CD8 dans un contexte de stress cellulaire « non pathologique » qui pourrait contribuer au développement de pathologies autoimmunes. En effet, le rôle de NKG2D dans le développement de certaines pathologies comme la maladie céliaque est bien décrit. Une autre cytokine, l'IL-15, est sécrétée en grandes quantités au cours de cette pathologie, ce qui a pour conséquence de modifier la voie de signalisation de NKG2D/DAP10 : le récepteur délivre dans ces conditions un signal activateur aux LT CD8 et non plus un signal costimulateur, induisant la destruction de l'épithélium intestinal par ces cellules (Meresse et al., *Immunity*, 2004). Le rôle de NKG2D dans le développement du

diabète chez la souris NOD a également été décrit. Les cellules pancréatiques de ces souris expriment en effet fortement les ligands de NKG2D (Ogasawara et al., *Immunity*, 2004). De façon intéressante, il a été montré que l'expression sélective de l'IL-4 par les cellules pancréatiques sécrétrices d'insuline inhibe le développement du diabète dans ces souris. De même, l'injection de DC modifiées génétiquement pour sécréter de l'IL-4 inhibent le développement de diabète auto-immun (Mueller et al., *JEM*, 1996 ; Creusot et al., *Mol Ther*, 2010). La régulation de NKG2D par l'IL-4 que nous décrivons pourrait donc être un mécanisme impliqué dans la modulation de la réponse CD8 dans des contextes inflammatoires propices au développement de réponse auto-immune.

1.3 Génération de cellules CD8 « innées » en réponse à l'IL-4 dans la rate

Nous avons caractérisé l'effet de l'IL-4 sur les LT CD8 *in vivo* en utilisant notre modèle d'injection de complexes IL-4C. Plusieurs articles ont récemment montré que, chez les souris déficientes pour les gènes *klf2*, *id3*, *itk* ou *crebbp*, une population de cellules NKT exprimant le facteur de transcription PLZF et sécrétant de grandes quantités d'IL-4 se développe au sein du thymus (Weinreich et al., *Immunity*, 2009 ; Weinreich et al., *Nat Immunol*, 2010 ; Verykokakis et al., *Immunity*, 2010). L'IL-4 ainsi produit induit la différenciation des thymocytes CD8SP en cellules « CD8 innées », ayant des propriétés proches de celles des LT CD8 mémoires. Ces cellules ont un phénotype CD44^{hi}CD122^{hi}CXCR3⁺, elles expriment un niveau élevé d'Eomes, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des LT CD8 mémoires et, de façon semblable aux LT CD8 mémoires, sécrètent l'IFN γ très rapidement suite à une stimulation du TCR (Weinreich et al., *Immunity*, 2009 ; Weinreich et al., *Nat Immunol*, 2010). Par la suite, les auteurs vérifient ces résultats dans le contexte de la souris Balb/c. En effet, le thymus de ces souris contient naturellement un grand nombre de cellules NKT exprimant le facteur de transcription PLZF et sécrétant de l'IL-4. Ils montrent que la fréquence de cellules CD8 « innées » dans le thymus des souris Balb/c est beaucoup plus importante que dans des souris C57Bl/6. Ce résultat montre que les cellules CD8 « innées » générées en réponse à l'IL-4 sont détectables également dans un contexte physiologique, bien que leur rôle soit à ce jour inconnu.

Nous avons montré que, en 4 jours, l'IL-4 induit également la différenciation de LT CD8 naïfs en cellules CD8 « innées » dans la rate. Ces cellules expriment CXCR3, des

niveaux intermédiaires de CD44, et sécrètent très rapidement de l'IFN γ en réponse à une stimulation antigénique. Elles acquièrent d'autres caractéristiques phénotypiques des LT CD8 mémoires : elles perdent notamment l'expression de l'intégrine $\beta 7$ (annexe 2). Cependant, nous avons montré que ces cellules n'acquièrent pas l'expression de CCL5 et de NKG2D, qui font pourtant partie des marqueurs spécifiques de cellules CD8 mémoires induites par une stimulation antigénique, ce qui suggère que ces cellules ont de plus faibles « fonctionnalités mémoires ». Nous avons vérifié l'absence d'expression de CCL5 et de NKG2D dans le contexte de la souris Balb/c et montré que les LT CD8 spléniques de ces souris contiennent une grande fréquence de cellules CD8 de phénotype mémoire exprimant de faibles niveaux de NKG2D et de CCL5. Ce qui suggère qu'il s'agit soit de cellules CD8 « innées » ou de LT CD8 mémoires générés par engagement du TCR et dont l'expression de CCL5 et de NKG2D a été inhibée par l'IL-4. La moins grande « fonctionnalité mémoire » de ces cellules CD8 est également suggérée par une étude récente de Bou Ghanem et collègues montrant que les LT CD8 de phénotype mémoire de la souris Balb/c sécrètent de plus faibles quantités d'IFN γ que ceux de la souris C57Bl/6 en réponse à une stimulation par une combinaison d'IL-12/IL-18 (Bou Ghanem et al., J Immunol, 2011). Ce résultat est peut être la conséquence de l'action de l'IL-4 sur les CD8 de phénotype mémoire dans les souris Balb/c. En effet, nous avons montré, dans notre signature d'expression génique que l'IL-4 induit fortement l'expression du gène *il18bp*. La protéine IL-18bp est sécrétée par les LT CD8 et interfère avec la voie de signalisation de l'IL-18 en inhibant la liaison de la cytokine avec son récepteur. Il est possible que les cellules CD8 « innées » générées en réponse à l'IL-4 dans les souris Balb/c sécrètent d'importantes quantités d'IL-18bp, ce qui les rendrait moins sensible à une combinaison d'IL-12 et d'IL-18.

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que les cellules CD8 « innées », bien que partageant certaines fonctions des LT CD8 mémoires comme la sécrétion extemporanée d'IFN γ en réponse à une stimulation du TCR, ne partagent pas l'ensemble des capacités associées à la « fonctionnalité mémoire » des LT CD8 mémoires induites par une immunisation antigénique.

De façon intéressante, plusieurs études ont montré que certains tissus de la souris Balb/c expriment à leur surface des ligands de NKG2D à des niveaux beaucoup plus importants que ceux observés chez les souris C57Bl/6 (Nomura et al., J Biochem, 1996). Compte tenu de la forte proportion de cellules de phénotype mémoire exprimant de faibles niveaux de CCL5 et de NKG2D dans ces souris, il est possible que l'expression élevée d'IL4

et l'augmentation du niveau d'expression des ligands de NKG2D par les tissus sains soit le résultat d'un mécanisme de co-évolution.

La fonction précise de ces cellules CD8 « innées » n'a pas été clairement identifiée. N'ayant pas été activées par une infection primaire, il paraît peu probable qu'elles aient un rôle prépondérant dans une éventuelle réponse à un antigène. Il a été proposé que, chez le nourrisson, le système immunitaire étant immature, ces cellules agissent comme un pool de cellules mémoires. Récemment, Min et collègues ont montré qu'il existe dans le thymus et la rate du fœtus à 18 mois de gestation une population de cellules T CD8⁺ exprimant le facteur de transcription Eomes et capables de sécréter de l'IFN γ rapidement en réponse à une stimulation du TCR (Min et al., J Immunol, 2011). Cette population décline ensuite rapidement et n'est plus présente chez le nourrisson de 3 mois. Ces cellules pourraient être les homologues de la population CD8 « innée » observée chez la souris et avoir un rôle important dans la réponse immunitaire du fœtus. De façon intéressante, comme observé dans les souris Balb/c, il a été décrit que certains tissus fœtaux expriment de forts niveaux de ligands de NKG2D (Götherström et al., Cytotherapy, 2011 ; Apps et al., Hum Reprod, 2008). L'expression de NKG2D par ces cellules CD8⁺Eomes⁺ n'est pas connue, mais il est possible, là encore, que des mécanismes d'adaptation limitent cette expression pour éviter l'apparition de pathologies autoimmunes chez le fœtus.

1.4 L'IL-4 régule la réponse de nombreux acteurs du système immunitaire.

Diverses données bibliographiques montrent que, outre son rôle dans la différenciation des LT CD4 en cellules Th2, l'IL-4 exerce un rôle régulateur sur de nombreux acteurs de la réponse immunitaire. D'une part, il a été montré que la réponse innée des kératinocytes contre une infection virale est réduite en présence d'IL-4 (Howell et al., Immunity, 2006). Les kératinocytes sont capables de contenir une infection virale par le biais de la sécrétion du peptide antimicrobien LL-37. Howell et collègues montrent que dans un contexte de dermatite atopique, la présence de forts niveaux de cytokines Th2 comme l'IL-4 et l'IL-13 inhibe fortement la sécrétion de LL-37 (Howell et al., Immunity, 2006), réduisant considérablement les capacités de résolution d'une infection virale par l'organisme. D'autre part, l'IL-4 régule la fonctionnalité des macrophages : une étude récente de Potran et collègues a notamment

montré que l'IL-4 produit durant une réponse Th2 contre le ver *Nippostrongylus brasiliensis* diminue la réponse anti-tuberculeuse médiée par les macrophages dans les poumons (Potian et al., JEM, 2011). L'IL-4 est également un important régulateur de l'homéostasie des lymphocytes B, induisant leur survie et leur prolifération homéostatique (Parry et al., J Immunol, 1996 ; Minshall et al., J Immunol, 1997).

Ici, nous avons évalué les effets de l'IL-4 sur les LT CD8 : plusieurs études récentes suggèrent que l'IL-4 produit durant une réponse de type Th2 peut affecter des LT CD8 bystander, le contexte infectieux le plus étudié étant l'infection par un parasite. Ainsi, L'étude de Perona-Wright et collègues a montré de façon élégante que lors d'une infection par le ver entérique *Heligmosomoides polygyrus*, les niveaux d'IL-4 produits par la réponse Th2 sont suffisants pour induire la phosphorylation de STAT6 et l'augmentation de l'expression de l'IL-4R α chez l'ensemble des LB, des LT CD4 ainsi que des LT CD8 des ganglions drainants. Cela montre que, lors d'une telle infection, les LT CD8 présents dans le ganglion drainant sont affectés par l'IL-4 produit lors de la réponse immunitaire, bien que ces cellules ne participent pas directement à la réponse. Les auteurs ne mesurent en revanche pas les modifications des fonctions des LT CD8 du ganglion induites par l'IL-4. Cette étude est venue confirmer des résultats préalablement établis par Morris et collaborateurs dans le cadre d'une infection par le ver *Nippostrongylus brasiliensis*. L'ensemble des études concernant les effets de l'IL-4 sur la biologie des LT CD8 a conclu à une induction de la prolifération des LT CD8 par l'IL-4 *in vivo*, ainsi qu'à un maintien de leur survie *in vitro*. Cependant, les effets de l'IL-4 sur les fonctions des LT CD8 mémoires n'ont pas été évalués. Identifier et comprendre de tels effets semble pourtant primordial, notamment au regard du nombre de personnes infectées de façon chronique par des parasites dans le monde. En effet, deux études évaluent à un nombre compris entre 1.10^9 et $1,5.10^9$ le nombre de personnes atteintes par de telles infections en 2006, soit environ 1/5^{ième} de la population mondiale (Bethony et al., Lancet, 2006 ; Kamal et al., Parasite Immunol, 2006). Ces infections induisent dans la plupart des cas des réponses de type Th2 produisant des niveaux d'IL-4 susceptibles d'affecter les LT CD8 bystander, ainsi que d'autres cellules du système immunitaire. Des LT CD4 Th2 sécréteurs d'IL-4 sont également détectés dans l'environnement de certaines tumeurs (Aspord et al., JEM, 2007 ; Pedroza-Gonzalez et al., JEM, 2011). Cela s'explique notamment par la sécrétion de TSLP par certaines cellules tumorales, induisant l'expression de OX40L à la surface des DC infiltrant les tumeurs. Ces DC induisent la différenciation des LT CD4 environnants en cellules sécrétrices de cytokines Th2 (Pedroza-Gonzalez et al., JEM, 2011). Nos résultats

suggèrent que les LT CD8 infiltrant ces tumeurs dont l'environnement est riche en cytokines Th2 pourraient avoir des fonctions effectrices limitées, rendant la réponse immunitaire moins efficace.

1.5 Perspectives

Dans une première approche visant à évaluer les effets de l'IL-4 sur la fonctionnalité des LT CD8 lors d'une infection secondaire, nous avons réalisé des expériences de rappel de LT CD8 mémoires traités *in vivo* par l'IL-4C par un virus recombinant H1N1-NP68 (figure 33).

Dans ce protocole d'immunisation seul les CD8 F5 NP68-spécifique mémoires activés par VV-NP68 sont restimulés par H1N1-NP68. Par ailleurs H1N1-NP68 induit une réponse primaire CD8. Nous avons évalué, dans ces expériences préliminaires, les contributions relatives des LT CD8 F5 mémoires et des LT CD8 naïfs endogènes à la réponse immunitaire dans la rate et les poumons suite au traitement par l'IL-4. Nos premiers résultats suggèrent que l'IL-4 favorise la participation des LT CD8 naïfs lors d'une réponse secondaire. Nous observons en effet une forte augmentation du nombre de LT CD8 endogènes répondant au virus dans la rate et les poumons. Nous tentons actuellement de déterminer si cela est dû à une augmentation des capacités des LT CD8 endogènes ou à une inhibition de la réponse des LT CD8 mémoires.

Dans un deuxième temps, l'utilisation d'un modèle d'infection élicitant une réponse de type Th2 afin de valider nos résultats dans un contexte physiologique pourrait être intéressante, car elle permettrait de montrer directement que, lors d'une telle infection, les fonctions des LT CD8 mémoires sont affectées. Les modèles d'infection par des vers entériques tels que *Heligmosomoides polygyrus* ou *Nippostrongylus brasiliensis* sont couramment utilisés, et il a déjà été montré dans ces systèmes que l'IL-4 produit induit la prolifération des LT CD8 bystander dans les ganglions drainants (Morris et al., J Immunol, 2009 ; Parona-Wright et al., Nat Immunol, 2010).

Il serait intéressant, dans ce modèle, de montrer que les fonctions que nous avons identifiées comme étant affectées par l'IL-4 dans la signature d'expression génique, telles que les capacités migratoires et les fonctions effectrices, sont effectivement modifiées *in vivo*.

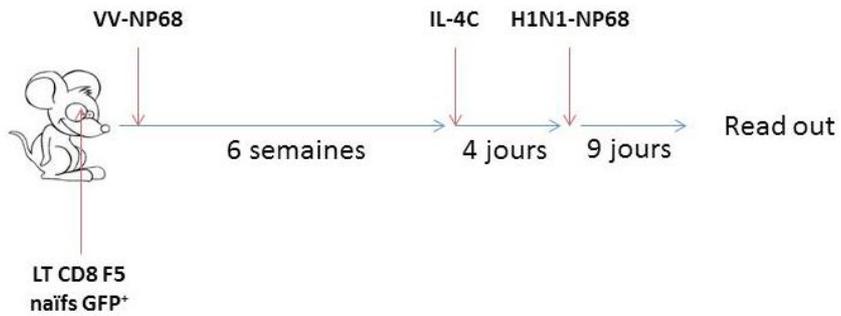


Figure 33 : modèle d'étude de la réponse secondaire de LT CD8 traités *in vivo* par l'IL-4.

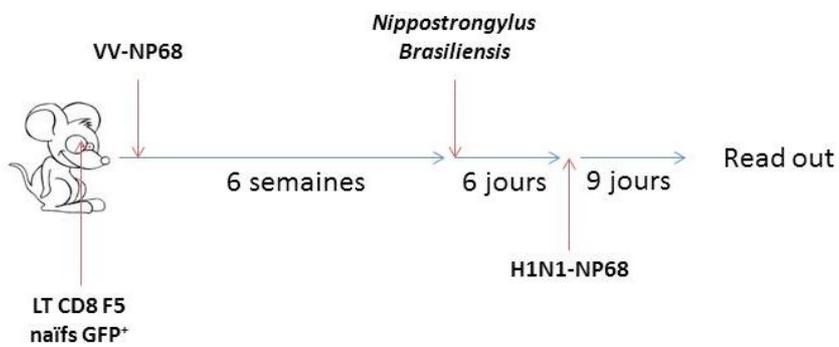


Figure 34 : modèle d'étude de la réponse des LT CD8 en cas de co-infection par un virus vaccinia et un parasite induisant une réponse Th2.

D'autre part, en utilisant ce modèle, nous pourrions évaluer la réponse secondaire des LT CD8 lors d'une co-infection entre un parasite et un virus en utilisant le protocole présenté dans la figure 34.

2. L'activation de LT CD8 en présence de cytokines γ c affecte fortement les fonctions des LT CD8 effecteurs générés et leur différenciation en cellules mémoires

Nous avons vu dans la première partie que l'IL-4 peut, en conditions homéostatiques, réguler l'expression de certaines « fonctionnalités mémoires » des LT CD8 mémoires. Nous avons, dans une deuxième partie, étudié si l'IL-4 ainsi que d'autres cytokines de la famille γ c régulent l'acquisition de ces fonctionnalités par les LT CD8 effecteurs et mémoires.

Certaines données bibliographiques montrent déjà que l'IL-4 peut modifier la fonctionnalité des LT CD8 effecteurs : nous avons ainsi vu dans l'introduction bibliographique qu'il a déjà été montré *in vivo* et *in vitro* que l'IL-4 inhibe les propriétés cytotoxiques des LT CD8 effecteurs générés en réponse à une infection virale ou à des tumeurs. Cependant, l'étude des effets de l'IL-4 sur la génération des LT CD8 effecteurs a principalement été réalisée dans le cadre d'une différenciation de LT CD8 naïfs en cellules Tc1/Tc2. L'induction et la caractérisation des CD8 Tc2 a été réalisée principalement *in vitro* dans des systèmes d'activation variés rendant difficile l'intégration des résultats. En effet, les lymphocytes Tc2 générés sont hétérogènes du point de vue de leurs propriétés. Ils sont toujours producteurs d'IL-4 mais selon les systèmes ont une production d'IFN γ et une capacité cytotoxique plus ou moins diminuée. L'existence de ces sous-populations *in vivo* a été peu étudiée. Des Tc2, capables de sécréter de l'IL-4 sont identifiés dans certaines pathologies humaines, mais leur fonction est à l'heure actuelle mal comprise. Les CD8 effecteurs générés dans nos conditions de culture ne produisent pas d'IL-4 ce qui suggère qu'elles ne se différencient pas en Tc2 (données non montrées).

Les résultats obtenus dans cette partie nous ont permis d'identifier l'IL-4 et l'IL-21 comme régulateurs de l'acquisition de fonctions effectrices par les LT CD8 effecteurs. Nos résultats préliminaires suggèrent qu'elles pourraient également agir sur les capacités de différenciation en cellules mémoires.

2.1 Les cytokines γ modulent l'acquisition de fonctions par les LT CD8 effecteurs

Au travers de notre étude, nous avons constaté que la présence d'IL-4 dans l'environnement des LT CD8 lors de leur activation inhibe fortement la fonction des effecteurs générés. D'une part, la proportion de cellules productrices d'IFN γ ou d'IL-2 est diminuée, ce qui s'accompagne de la diminution de la proportion de cellules polyfonctionnelles. Ce résultat suggère que les capacités de protection conférées par les LT CD8 effecteurs générée en présence d'IL-4 sont diminuées. De plus, nos résultats montrent que l'IL-4 diminue également la proportion de LT CD8 effecteurs produisant des chimiokines telles que CCL5 et XCL1, ce qui se traduit par une forte diminution de la sécrétion de ces cytokines dans l'environnement cellulaire suite à une stimulation du TCR. Compte tenu du rôle de XCL1 dans l'attraction des DC CD8 α^+ , capables de faire de la présentation croisée des antigènes aux LT CD8, nos résultats suggèrent que l'IL-4 pourrait considérablement réduire la capacité des LT CD8 effecteurs à amplifier une réponse immunitaire. Le rôle de CCL5 est moins clair, mais cette chimiokine pourrait également participer à l'amplification de la réponse immunitaire. Des données obtenues dans l'équipe par C.A. Coupet suggèrent également que CCL5 pourrait intervenir dans la régulation de la prolifération des LT CD8. Nous avons également montré que la présence d'IL-4 lors de l'activation se traduit par une forte diminution de l'expression de corécepteurs tels que NKG2D ou CD94/NKG2A, ce qui suggère que la sensibilité des LT CD8 effecteurs aux stimuli extérieurs de type « innés » est également réprimée.

D'autre part, nous avons testé si l'IL-4 est le seul membre de la famille des cytokines γ à affecter l'acquisition de fonctions effectrices par les LT CD8. Nous avons montré que L'IL-15 ne modifie pas l'expression des récepteurs NK, et que l'IL-7 n'a pas d'effet sur l'acquisition des fonctions des LT CD8 effecteurs. En revanche, nos résultats montrent que L'IL-21 augmente fortement le contenu en TNF α des LT CD8 effecteurs et inhibe la production de CCL5. De plus, nous avons observé que l'expression de CD94/NKG2ACE est fortement augmentée à la surface des LT CD8 activés en présence de cette cytokine. Cela a également été montré par une étude récente de Cho et collègues montrant que l'IL-21 induit l'expression du dimère CD4/NKG2A à la surface des LT CD8 effecteurs (Cho et al., blood, 2011).

Finalement, nos résultats montrent que les cytokines γc affectent les fonctions des LT CD8 de deux façons. D'une part, elles sont capables de modifier la biologie des LT CD8 à l'état homéostatique : nous avons vu dans la première partie que c'est le cas de l'IL-4, capable d'inhiber l'expression de certaines fonctions mémoires comme l'expression de NKG2D ou de CCL5. Nous avons également vu, dans l'introduction bibliographique que l'IL-7, l'IL-15 et l'IL-21 agissent également sur les LT CD8 en conditions homéostatiques, induisant leur prolifération, maintenant leur survie, et modifiant certaines de leurs fonctions effectrices.

D'autre part, nous venons de voir que les cytokines γc ont également la capacité d'abroger ou d'induire l'acquisition de certaines fonctions lors de l'activation des LT CD8 naïfs : l'IL-4 inhibe l'acquisition des capacités de production de CCL5 et XCL1 notamment, l'IL-21 inhibe l'acquisition des capacités de production de CCL5 et augmente celles de production de TNF α . Il serait intéressant, dans la suite de cette étude, d'étudier les mécanismes impliqués dans ces deux types de régulation afin de vérifier si les voies de signalisation engagées sont identiques.

2.2 La génération de cellule mémoires

Nous avons également testé si la présence de cytokines γc dans l'environnement lors de l'activation des LT CD8 naïfs affecte l'acquisition des fonctions améliorées des LT CD8 mémoires, ou « fonctionnalités mémoires ». Pour cela, nous avons utilisé un modèle d'activation *in vitro* pendant 4 jours en présence d'une cytokine γc suivie d'un transfert *in vivo*. Nos résultats préliminaires montrent que la présence de cytokines γc lors de l'activation modifie non seulement l'acquisition des fonctions par les LT CD8 effecteurs, mais également les fonctions des LT CD8 mémoires générés. En effet, nous avons observé que les LT CD8 mémoires se différenciant à partir d'effecteurs générés en présence d'IL-4 expriment de faibles niveaux de NKG2D, tandis que les LT CD8 mémoires se différenciant à partir d'effecteurs générés en présence d'IL-21 expriment de faibles niveaux de NKG2D et de CCL5. Ces résultats montrent donc que l'environnement rencontré par les LT CD8 naïfs lors de leur activation a de importantes conséquences sur la réponse primaire, mais également sur la réponse des cellules mémoires générées en cas de nouvelle rencontre avec l'antigène. Cette propriété n'est cependant pas générale, puisque les LT CD8 Effecteurs générés en présence d'IL-4 expriment faiblement CCL5 mais que les LT CD8 mémoires se différenciant à partir

de ces cellules expriment cette chimiokine, ce qui n'est pas le cas pour l'IL-21. Cela suggère que les mécanismes intervenant dans la régulation de l'expression de CCL5 par ces deux cytokines sont distincts. A. Marçais a montré dans l'équipe que l'inhibition de la transcription du gène *ccl5* dans les LT CD8 mémoires est réversible (Marçais et al., J Immunol, 2006). En effet, la transcription du gène reprend immédiatement après retrait de l'IL-4 du milieu. Il est donc possible que la régulation de l'expression de CCL5 dans LT CD8 effecteurs par l'IL-4 soit transitoire, ce qui expliquerait que la protéine est présente dans les LT CD8 mémoires générés. Nous n'avons pas étudié la régulation de *ccl5* par l'IL-21 mais les mécanismes impliqués induisent potentiellement une répression définitive de l'expression de cette chimiokine dans les LT CD8.

Par ailleurs, nos résultats montrent que l'IL4 et de l'IL-21 affectent l'expression de l'IL-2Ra et l'IL-7Ra, deux récepteurs dont l'intensité d'expression corrèle avec le potentiel de différenciation en LT CD8 mémoires des cellules effectrices (Kalia et al., Immunity, 2010 ; Pipkin et al., Immunity, 2010 ; Kaech et al., Nat Immunol, 2003 ; Sarkar et al., JEM, 2008). Nous avons donc fait l'hypothèse que la présence de ces cytokines dans l'environnement cellulaire pourrait modifier le potentiel de différenciation en cellules mémoires des LT CD8 effecteurs. Nos résultats préliminaires montrent un impacte sur le nombre de LT CD8 mémoires présents dans les souris receveuses 6 semaines après transfert. Ce résultat, à confirmer, est en accord avec les résultats publiés décrivant le potentiel de l'IL-21 à réguler la différenciation en cellules mémoire. Allard et collègues ont ainsi décrit que la surexpression de l'IL-21 dans un modèle de souris transgénique induit la différenciation des LT CD8 naïfs en LT CD8 « Memory-like » ayant un phénotype et des fonctions semblables aux LT CD8 mémoires induites par une stimulation antigénique. Ces cellules sécrètent en effet rapidement l'IFN γ en réponse à une stimulation du TCR et ont exprimé à leur surface de hauts niveaux de CD44 et de l'IL-15R α (CD122). Par ailleurs, Yi et collègues montrent que les LT CD8 mémoires se différenciant à partir de LT CD8 *il21^{-/-}* stimulés in vivo par une souche chronique du virus LCMV ont des fonctions réduites et un phénotype de cellules mémoires « épuisées » : elles sécrètent de faibles niveaux d'IL-2, TFN α et IFN γ et expriment fortement CD43 et PD-1 à leur surface (Yi et al., Science, 2009). Ces données, ainsi que nos résultats, suggèrent donc que l'IL-21 affecte la différenciation des mémoires, ainsi que l'établissement des fonctionnalités mémoires de ces cellules. Les mécanismes impliqués dans cette régulation sont peu connus, mais l'étude d'Hinrichs et collègues suggère que l'IL-21 pourrait retarder la différenciation des LT CD8, notamment en inhibant l'expression d'Eomes, facteur de

transcription impliqué dans la différenciation des LT CD8 en cellules mémoires (Hinrichs et al., Blood, 2008)

2.3 Interactions IL-4/IL-21

Nos résultats montrent que l'IL-21 augmente l'expression de l'IL-4Ra à la surface des LT CD8 effecteurs. Cela suggère que l'IL-21 pourrait augmenter la sensibilité des LT CD8 effecteurs pour l'IL-4, et que ces deux cytokines pourraient avoir des effets régulateurs synergiques, notamment sur certaines fonctions effectrices des LT CD8. Cependant, des expériences préliminaires n'ont pas permis d'observer d'augmentation d'un effet de l'IL-4 sur les fonctions des LT CD8 ou de coopération entre ces deux cytokines lorsqu'elles sont présentes conjointement dans le milieu de culture.

Plusieurs données bibliographiques montrent que l'IL-21 peut agir en coopération avec d'autres cytokines. L'IL-21 agit en effet en synergie avec l'IL-15 et l'IL-7 pour promouvoir la survie et la prolifération homéostatique des LT CD8 ainsi que leurs capacité de sécrétion d'IFN γ (Zeng et al., JEM, 2005). Par ailleurs, l'IL-4 et l'IL-21 induisent de façon synergique la prolifération et la survie des lymphocytes B (Konforte et al., J Immunol, 2009 ; Jin et al., J Leuk Biol, 2006), mais coopèrent également pour réguler l'activation de ces cellules (Saito et al., Immunobiology, 2008). Il est donc possible que l'IL-21 et l'IL-4 agissent de façon coopérative sur les LT CD8.

2.3 Perspectives

Nous poursuivons cette étude avec plusieurs objectifs. Dans un premier temps, nous souhaitons étudier plus précisément la biologie des LT CD8 effecteurs et mémoires générés dans nos différentes conditions d'activation. Nous souhaitons notamment étudier si les capacités cytotoxiques des LT CD8 effecteurs et mémoires générés sont affectées. Nous étudierons pour cela les capacités de lyse de cellules EL4 chargées avec le peptide NP68. D'autre part, nous étudierons les capacités effectrices des cellules mémoires générées à partir des LT CD8 naïfs activés en présence des cytokines γc , en utilisant la cytométrie en flux ainsi que la technologie Luminex.

Dans un deuxième axe d'étude, nous souhaitons vérifier l'hypothèse selon laquelle l'IL-21 retarde l'acquisition d'un potentiel de différenciation en LT CD8 mémoires (figure 35). Pour cela, nous utiliserons un protocole de transfert de LT CD8 après différents temps d'activation *in vitro* en présence ou absence d'IL-21. Nous pourrions également étudier plus précisément les mécanismes impliqués dans ce phénomène, en nous basant notamment sur les données de microarray générées par Hinrichs et collègues comparant des LT CD8 activés *in vitro* en présence ou absence d'IL-21.

Nous avons vu dans l'introduction bibliographique que le programme de différenciation des LT CD8 en cellules effectrices et mémoires est très dépendant des conditions environnementales au moment de l'activation, avant la première division. Parmi les cytokines de la famille γ_c , seule l'IL-21 a été décrite comme pouvant avoir une fonction de signal 3 *in vitro*, bien que cette étude utilise des LT CD8 OT-I et de fortes concentration d'IL-21 (Casey et al., J Immunol, 2007). Nous pourrions, dans un dernier axe d'étude, vérifier si les cytokines γ_c agissent comme « signal 3 » lors de l'activation, induisant ainsi un programme de différenciation particulier, ou si elles agissent lors de la prolifération des LT CD8 activés en modifiant leurs propriétés. Pour cela, nous utiliserons un modèle d'activation de LT CD8 F5 purifiés activés par des DC maturées et chargées par le peptide NP68, ce qui nous permettra de mieux contrôler les paramètres d'activation des LT CD8. Nous pourrions alors vérifier cette hypothèse en ajoutant la cytokine étudiée dans le milieu de culture à différents temps d'activation.

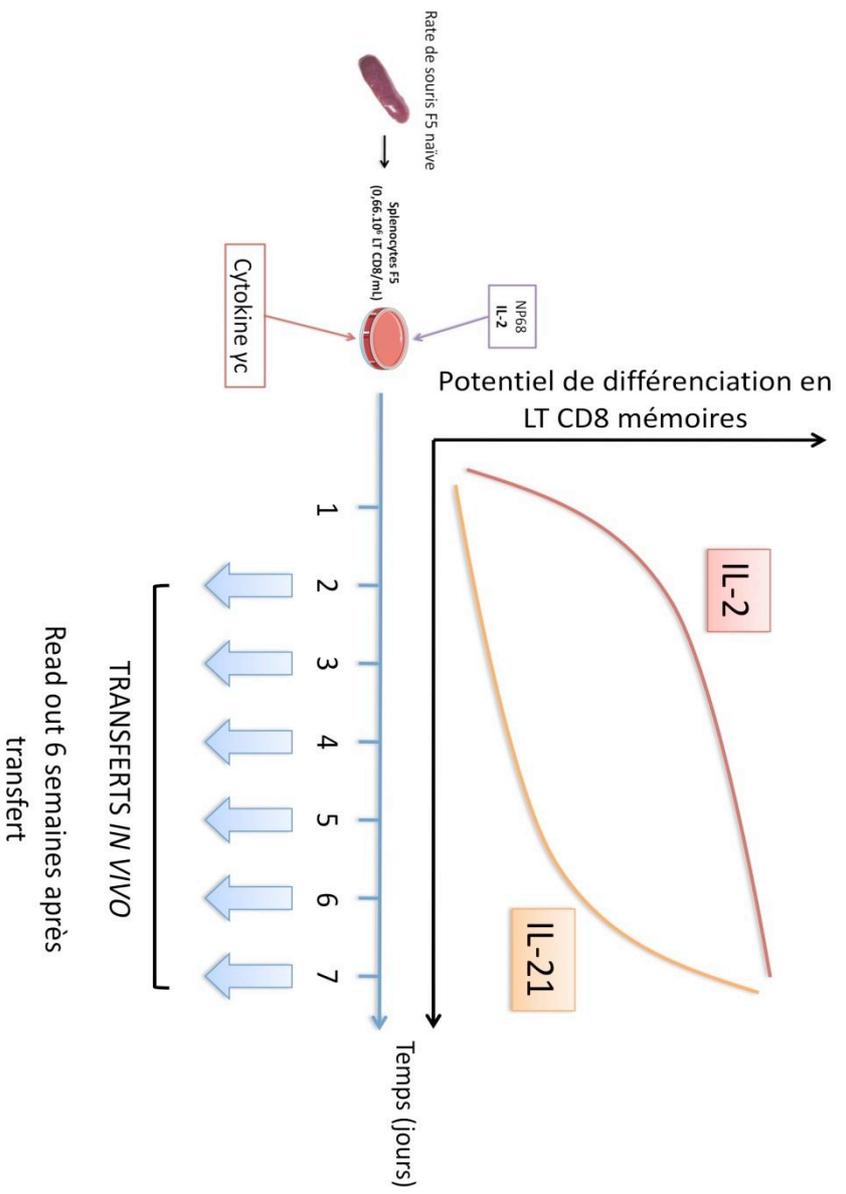


Figure 35 : Modèle d'étude du potentiel de différenciation en cellules mémoires de LT CD8 activés en présence de cytokines yc

CONCLUSION

Les effets régulateurs de l'IL-4 sur les LT CD8 ont longtemps été ignorés : les seuls effets clairement établis jusque là étaient des effets d'induction de survie et de prolifération homéostatique, bien que certaines données suggéraient que les fonctions des LT CD8 puissent également être affectées. Pourtant, environ 1 milliard d'êtres humains souffrent d'une infection par un parasite élicitant une réponse de type Th2 durant laquelle de grandes quantités d'IL-4 sont produites, et qui pourraient donc avoir un impact important sur les fonctions des LT CD8 et leurs capacités à répondre à une infection virale concomitante. La détermination des fonctions affectées par l'IL-4 dans ces cellules pourraient donc avoir une relevance clinique importante.

Notre étude a permis de recenser l'ensemble des gènes dont l'expression est modifiée dans les LT CD8 mémoires en réponse à l'IL-4, mettant en évidence que nombre de fonctionnalités mémoires pourraient être affectées. Parmi celle-ci, nous avons montré que l'IL-4 régule l'expression de NKG2D, un récepteur ayant un rôle important dans la détection des cellules infectées ou tumorales par les LT CD8.

Nous avons également montré, dans un deuxième axe d'étude, que l'IL-4 et d'autres cytokines de la famille γc comme l'IL-21 sont capables de modifier considérablement l'acquisition de certaines fonctions effectrices par les LT CD8 effecteurs, mais également par les LT CD8 mémoires.

A la suite de cette thèse, nous étudierons plus précisément quelles sont les fonctions modulées par l'IL-4 et les cytokines γc dans les LT CD8, ainsi que les mécanismes moléculaires mis en jeu par cette régulation.

ANNEXE 3

The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 α ⁺ dendritic cells

Karine Crozat,^{1,2,3} Rachel Guiton,^{1,2,3} Vanessa Contreras,⁴ Vincent Feuillet,^{5,6} Charles-Antoine Dutertre,^{5,6} Erwan Ventre,^{7,8,9} Thien-Phong Vu Manh,^{1,2,3} Thomas Baranek,^{1,2,3} Anne K. Storset,¹⁰ Jacqueline Marvel,^{7,8,9} Pierre Boudinot,⁴ Anne Hosmalin,^{5,6} Isabelle Schwartz-Cornil,⁴ and Marc Dalod^{1,2,3}

¹Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Université de la Méditerranée, Parc scientifique et technologique de Luminy, 13288 Marseille, France

²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U631, 13288 Marseille, France

³Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR6102, 13288 Marseille, France

⁴Virologie et Immunologie Moléculaires, UR892 Institut National de La Recherche Agronomique, 78352 Jouy-en-Josas, France

⁵Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS, UMR 8104, 75014 Paris, France

⁶INSERM, U1016, 75014 Paris, France

⁷Université de Lyon, 69365 Lyon, France

⁸INSERM, U851, 69365 Lyon, France

⁹Université Lyon 1, IFR128, 69365 Lyon, France

¹⁰Norwegian School of Veterinary Science, N-0033 Oslo, Norway

Human BDCA3⁺ dendritic cells (DCs) were suggested to be homologous to mouse CD8 α ⁺ DCs. We demonstrate that human BDCA3⁺ DCs are more efficient than their BDCA1⁺ counterparts or plasmacytoid DCs (pDCs) in cross-presenting antigen and activating CD8⁺ T cells, which is similar to mouse CD8 α ⁺ DCs as compared with CD11b⁺ DCs or pDCs, although with more moderate differences between human DC subsets. Yet, no specific marker was known to be shared between homologous DC subsets across species. We found that XC chemokine receptor 1 (XCR1) is specifically expressed and active in mouse CD8 α ⁺, human BDCA3⁺, and sheep CD26⁺ DCs and is conserved across species. The mRNA encoding the XCR1 ligand chemokine (C motif) ligand 1 (XCL1) is selectively expressed in natural killer (NK) and CD8⁺ T lymphocytes at steady-state and is enhanced upon activation. Moreover, the *Xcl1* mRNA is selectively expressed at high levels in central memory compared with naive CD8⁺ T lymphocytes. Finally, XCR1^{-/-} mice have decreased early CD8⁺ T cell responses to *Listeria monocytogenes* infection, which is associated with higher bacterial loads early in infection. Therefore, XCR1 constitutes the first conserved specific marker for cell subsets homologous to mouse CD8 α ⁺ DCs in higher vertebrates and promotes their ability to activate early CD8⁺ T cell defenses against an intracellular pathogenic bacteria.

CORRESPONDENCE

Dr. Marc Dalod:
dalod@ciml.univ-mrs.fr

Abbreviations used: CCR, CC chemokine receptor; FDG, fluorescein di- β -D-galactopyranoside; *Lm*, *Listeria monocytogenes*; NJ, neighbor joining; pDC, plasmacytoid DC; T_{CM}, central memory CD8⁺ T lymphocyte; T_{IM}, inflammatory memory CD8⁺ T cell; XCL1, chemokine (C motif) ligand 1; XCR1, XC chemokine receptor 1.

DCs are central to immune defenses in mammals. In mice, three subsets of DCs are resident of lymphoid organs (Crozat et al., 2010). Plasmacytoid DCs (pDCs) are professional producers of

IFN- α and - β , contributing to immune defenses against viruses (Baranek et al., 2009). CD11b⁺ DCs preferentially prime CD4⁺ T cells and promote humoral immunity (Carter et al., 2006; Dudziak et al., 2007). CD8 α ⁺ DCs are endowed with a unique efficiency in priming CD8⁺ T cells and in cross-presenting exogenous antigens (Carter et al., 2006; Dudziak et al., 2007).

Part of this work was presented as an abstract/poster at the September 2009 European Congress of Immunology in Berlin (Crozat, K., Guiton, R., Bessou, G., Robbins, S.H., and Dalod, M. 2009. PA11/33. Identification of a chemotactic pathway in the mouse CD8 α ⁺ DC subset that is putatively conserved in human BDCA3⁺ DC. *Eur. J. Immunol.* 39: Tuesday, Poster Sessions:S359).

R. Guiton, V. Contreras, V. Feuillet, and C.-A. Dutertre contributed equally to this paper.

A. Hosmalin and I. Schwartz-Cornil contributed equally to this paper.

© 2010 Crozat et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-NonCommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

CD8 α^+ DCs are required for the natural induction of strong CD8 $^+$ T cell responses against tumors (Hildner et al., 2008; Sancho et al., 2008) or West Nile virus (Hildner et al., 2008). Specific delivery of vaccine antigens to CD8 α^+ DCs is especially efficient for vaccination against intracellular pathogens or tumors (Bonifaz et al., 2004; Nchinda et al., 2008). Therefore, identification of human DC subsets functionally homologous to mouse CD8 α^+ DCs (CD8 α^+ -type DCs) should be a major step forward for the design of innovative vaccination or immunotherapeutic strategies against cancer or infections (Croizat et al., 2010). So far, no conserved marker has been identified to specifically and unambiguously define CD8 α^+ -type DCs in several mammalian species. Although human BDCA3 $^+$ and mouse CD8 α^+ DCs express the C-type lectin CLEC9A, which is known to be involved in cross-presentation in mice, this marker is also found on some human CD14 $^+$ monocytes and on mouse pDCs (Caminschi et al., 2008; Huysamen et al., 2008; Sancho et al., 2008). It is of note that no orthologue of CLEC9A has been identified yet in non mammalian vertebrate species.

We have recently performed comparative genomics studies of human, mouse, and sheep DC subsets to help identify potential homologies between these cell types across mammalian species (Robbins et al., 2008; unpublished data). We found that human blood BDCA3 $^+$ DCs share a specific gene signature with mouse CD8 α^+ DCs and proposed that they could be human professional cross-presenting DCs (Robbins et al., 2008; Croizat et al., 2010). In this paper, we demonstrate that human BDCA3 $^+$ DCs are more potent than their BDCA1 $^+$ counterparts or than pDCs for CD8 $^+$ T cell activation through antigen cross-presentation. We established elsewhere that sheep lymph CD26 $^+$ DCs (Eparaud et al., 2004) are also equivalents to mouse CD8 α^+ DCs based on gene expression and functions such as superior efficacy for

presentation of soluble antigen to CD8 $^+$ T cells (unpublished data). In this paper, we identify the XC chemokine receptor 1 (XCR1) as the first universal marker specifically expressed by the CD8 α^+ -type DCs from three different mammalian species: ovine CD26 $^+$ DCs, mouse CD8 α^+ DCs, and human BDCA3 $^+$ DCs. We show that the *Xcr1* gene is present and well conserved in all higher vertebrates from reptiles to human. The ligand of XCR1, chemokine (C motif) ligand 1 (XCL1), is specifically expressed by activated NK and CD8 $^+$ T cells in mouse and human. We show that *Xcl1* mRNA is stored selectively in memory CD8 $^+$ T cells, allowing them to rapidly produce high levels of this chemokine upon stimulation. Finally, we show that XCR1 $^{-/-}$ mice have decreased CD8 $^+$ T cell responses to *Listeria monocytogenes* (*Lm*) associated with higher bacterial loads early after infection. Overall, our study strongly suggests an important and conserved role in mammals for XCR1 in the cross talk between NK or CD8 $^+$ T cells and CD8 α^+ -type DCs, identifying this molecule as a novel tool to survey and target the DCs endowed with the best cross-presentation capacity across species.

RESULTS

Human BDCA3 $^+$ DCs are functional homologues of mouse CD8 α^+ DCs for cross-presentation

To assess the cross-presentation capacity of human BDCA3 $^+$ DCs, we purified these cells together with other types of DCs. BDCA1 $^+$ DCs, BDCA3 $^+$ DCs, and pDCs were magnetically enriched from PBMCs by negative selection and then positively sorted by flow cytometry as depicted in Fig. 1 A. The purity of sorted cells was >95% as observed by postsorting FACS reanalysis. Sorted HLA-A2 $^+$ DC subsets were cultured with apoptotic uninfected, or chronically HIV-infected, H9 cells in the presence of maturation stimuli, poly I:C for

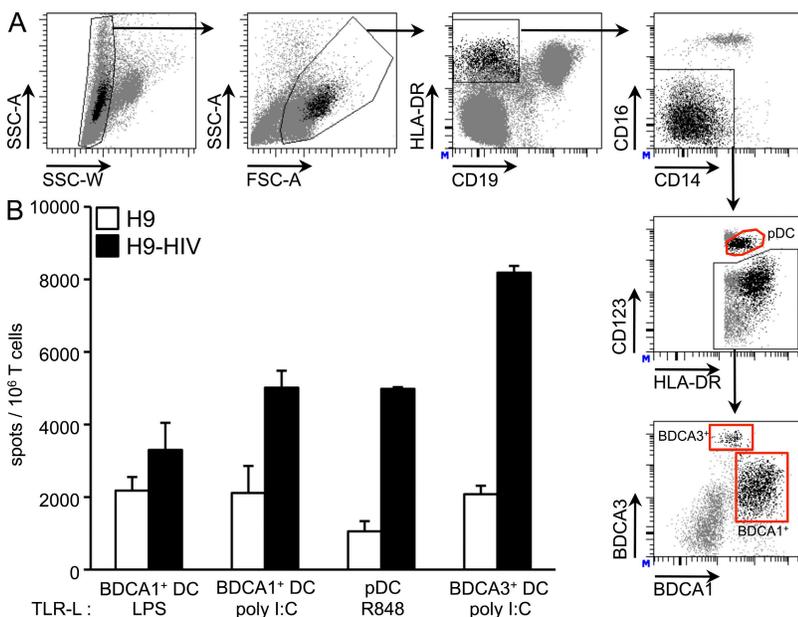


Figure 1. Human blood BDCA3 $^+$ DCs are endowed with a higher cross-presentation ability than BDCA1 $^+$ DCs and pDCs. (A) Sorting of DC populations from PBMCs. First, CD3 and CD14-depleted PBMCs were gated based on SSC-W and SSC-A to exclude cellular doublets and on FSC-A and SSC-A. Next, CD19 $^-$ HLA-DR $^+$ events and CD14 $^-$ CD16 $^-$ events were sequentially selected. HLA-DR $^+$ CD123 hi events, corresponding to pDCs, were then sorted and the remaining events falling in the HLA-DR $^+$ CD123 $^{lo/-}$ were distinguished for BDCA1 $^+$ DC and BDCA3 $^+$ DC sorting. Sorting gates are delineated by red lines. (B) Cross-presentation assay with human DCs. Purified BDCA1 $^+$ DCs, BDCA3 $^+$ DCs, and pDCs were cultured with apoptotic cells at a 1:1 ratio for 16 h in the presence of maturation signal, 100 ng/ml LPS, 10 μ g/ml poly I:C, or 10 μ M R848 as indicated. After loading, DCs were extensively washed and used (5,000/well) in a 16-h IFN- γ ELISPOT assay with HIV-specific CD8 $^+$ T cells lines as effectors (15,000/well). Data are presented as the mean and range of duplicate wells for one representative experiment of at least two.

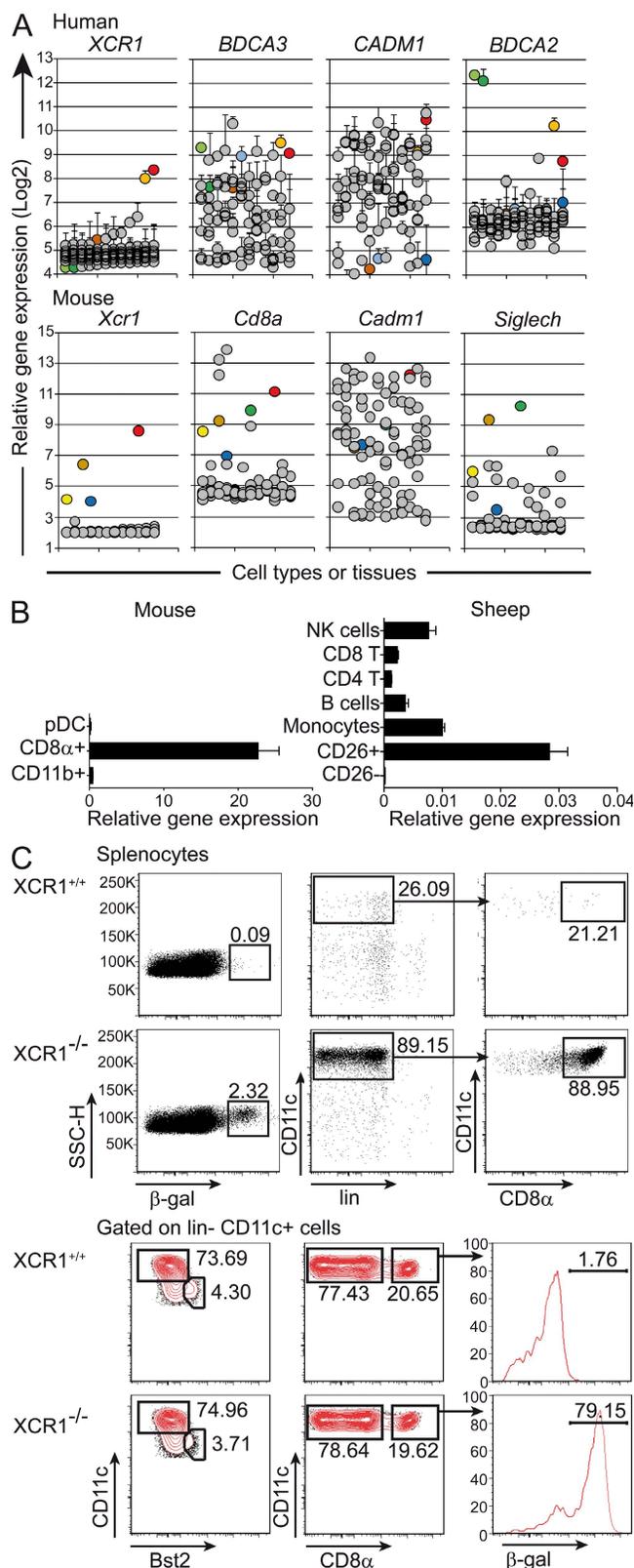


Figure 2. *Xcr1* gene expression by different subsets of immune cells isolated from mice, human, and sheep. (A) Microarray analysis of the expression of the *XCR1*, *THBD* (*BDCA3*), *CADM1*, and *LILRA4* (*BDCA2*)

BDCA3⁺ DCs, LPS or poly I:C for *BDCA1*⁺ DCs, and R848 for pDCs. They were then cultured with an HIV-1 Pol-specific CD8⁺ T cell line. To avoid viral replication, experiments were performed in the presence of Saquinavir, an HIV protease inhibitor (Hoeffel et al., 2007). *BDCA3*⁺ DCs induced 40% more IFN- γ ELISPOTs than poly I:C-stimulated *BDCA1*⁺ DCs or R848-stimulated pDCs and 60% more as compared with LPS-stimulated *BDCA1*⁺ DCs (Fig. 1 B). Therefore, as expected from their gene expression profile (Robbins et al., 2008; Crozat et al., 2010), human *BDCA3*⁺ DCs had higher cross-presentation capacities than other human blood DC subsets and represent functional homologues of mouse CD8 α ⁺ DCs for cross-presentation.

***XCR1* is selectively expressed by mouse CD8 α ⁺, human *BDCA3*⁺, and sheep CD26⁺ DCs**

Based on gene chip analyses, the expression of the *XCR1* gene is a selective marker for both human *BDCA3*⁺ DCs and mouse CD8 α ⁺ DCs when compared with a large panel of cell types, including other DC subsets, a variety of other leukocytes and of nonhematopoietic cells, and all types of tissue (Fig. 2 A). This contrasts with the markers currently used to identify these DC subsets, which are more broadly expressed as clearly evident for *BDCA3* in human or *CADM1* in human

human genes and of the *Xcr1*, *Cd8a*, *Cadm1*, and *Siglech* mouse genes in 96 different cell types or tissues, in human (top) and mouse (bottom), respectively. The human data were retrieved from the GEO database, normal tissues and cell types from the GSE7307 dataset, PBMC-derived macrophages from GSE4883, monocyte-derived DCs from GSE7509, monocyte-derived macrophages from GSM213500, and alveolar macrophages from GSE2125, and blood and tonsil DC subsets were retrieved from the E-TABM-34 dataset (Lindstedt et al., 2005) of the EBI Array-Express database. The data for the other leukocyte subsets directly isolated from normal human blood were described previously (Du et al., 2006; Robbins et al., 2008) and can be downloaded from <http://www-microarrays.u-strasbg.fr/files/datasetsE.php>. The data for the mouse were downloaded from the BioGPS public database (<http://biogps.gnf.org>). Green circles, pDCs (dark, blood; light, tonsil); red circles, mouse spleen CD8 α ⁺ DCs and human blood *BDCA3*⁺ DCs; orange circles, human tonsil *BDCA3*⁺ DCs; blue circles, mouse spleen CD11b⁺ DCs or human *BDCA1*⁺ DCs (dark, blood; light, tonsil); brown circles, mouse spleen; yellow circles, mouse lymph nodes; gray, all other cell types and tissues. Results are expressed as mean and SD for at least three independent values for most human data points. (B) *Xcr1* expression determined by real-time PCR on sorted mouse spleen DC subsets and sheep leukocytes. Mouse DCs were defined as lin⁻CD11c⁺Bst2⁺ for pDCs, lin⁻CD11c⁺Bst2⁻CD8 α ⁺ for CD8 α ⁺ DCs, and CD8 α ⁻ for CD11b⁺ DCs. Results are representative of at least two independent experiments. Sheep skin lymph CD1b⁺CD26⁺ and CD1b⁺CD26⁻ DCs were sorted by flow cytometry to >99% purity. Sheep CD4⁺ T, CD8⁺ T, NK, and B cells were purified from afferent lymph, and CD14⁺ monocytes from blood, by flow cytometry sorting to >95% purity. Results are mean \pm SEM of triplicate real-time RT-PCR reactions and they are representative of two different sheep for lymphocytes and of three different sheep for DCs. (C) β -galactosidase expression in splenocytes from *XCR1*^{+/+} and *XCR1*^{-/-} mice. β -galactosidase expression was assessed by FDG staining. The results are shown from one mouse representative of at least eight animals studied in four independent experiments.

and mouse (Fig. 2 A). Further extending this striking convergent observation in mouse and human DCs, we found that in a distant mammalian species, i.e., sheep, the *XCR1* gene was also selectively expressed in the CD8 α^+ -like skin lymph CD26 $^+$ DC (Fig. 2 B). Thus, among the genes differentially expressed between DC subsets in a conserved manner across the three mammalian species examined, the *XCR1* gene stands out as the most discriminating marker for mouse spleen CD8 α^+ DCs, human blood BDCA3 $^+$ DCs, and sheep lymph CD26 $^+$ DCs (Fig. 2, A and B). This is also the case for tonsil BDCA3 $^+$ DCs (Fig. 2 A, orange circle). *Xcr1* mRNA was also selectively expressed in CD11c $^+$ SIRP α^- CD24 $^+$ cells from BM FLT3-L cultures (Fig. 3 A), which correspond to a subset of in vitro-derived DCs equivalent to spleen CD8 α^+ DCs which can be referred to as eCD8 α^+ DCs (Naik et al., 2005).

To assess XCR1 protein expression pattern on mouse leukocytes, we resorted to a reporter/knockout mouse strain expressing the β -galactosidase enzyme under the control of the *Xcr1* promoter. When total spleen leukocytes were isolated from XCR1 $^{-/-}$ mice and stained for β -galactosidase activity using fluorescein di- β -D-galactopyranoside (FDG) as a substrate, >80% of the cells that stained positive with FDG were CD8 α^+ DCs, and >75% of CD8 α^+ DCs were FDG $^+$ (Fig. 2 C). Thus, *Xcr1* was confirmed to be expressed selectively by the majority of mouse CD8 α^+ DCs. Altogether, these results showed that XCR1 is a conserved and very discriminating marker for the identification of mouse, ovine, and human CD8 α^+ -type DCs.

XCR1 protein is active on mouse CD8 α^+ , human BDCA3 $^+$, and sheep CD26 $^+$ DCs

We then performed transwell migration assays with recombinant XCL1 and mixtures of the three subsets of mouse spleen DCs (Fig. 4 A) or their in vitro equivalents derived in BM FLT3-L cultures (Fig. 3 B). In both instances, XCL1 induced the specific migration of CD8 α^+ -type DCs. Moreover, only XCR1 $^{+/+}$ and XCR1 $^{+/-}$ CD8 α^+ or eCD8 α^+ DCs were responsive to XCL1 (Fig. 3 B and Fig. 4 A), but not their XCR1 $^{-/-}$ counterparts, demonstrating that XCR1 is required for DC responses to XCL1. We then performed transwell assays with enriched DC preparations from human blood and sheep lymph. Only human BDCA3 $^+$ DCs and sheep CD26 $^+$ DCs, and none of the other leukocyte subsets tested, were found to migrate in response to XCL1 (Fig. 4 A). Therefore, XCR1 is required for DC responses to XCL1, and its engagement induces the selective motility of mouse, ovine, and human CD8 α^+ -type DCs.

Xcl1 mRNA is stored in quiescent NK cells and memory CD8 $^+$ T lymphocytes

XCL1 is produced and secreted specifically by activated mouse and human NK and CD8 $^+$ T cells (Müller et al., 1995; Dorner et al., 2002), whereas no XCL1 protein is detected by intracellular staining in quiescent mouse NK cells (Dorner et al., 2002). The *Xcl1* gene is specifically expressed

in NK and CD8 $^+$ T cells already at steady state not only in mouse and human (Fig. 4 B) but also in sheep (Fig. 4 C). Moreover, similar to what we previously reported for CCL5 (Walzer et al., 2003), we show that *XCL1* mRNA is selectively expressed to high levels in antiviral central memory CD8 $^+$ T lymphocytes (T $_{CM}$ s) and, to a lesser extent, in memory T cells induced by sterile inflammatory conditions (inflammatory memory CD8 $^+$ T cells [T $_{IM}$ s]; Fig. 4 D). Cytokine secretion profiling of the mouse CD8 $^+$ T cell subsets demonstrated a rapid and higher level secretion of XCL1 by T $_{IM}$ after antigen-specific reactivation in vitro compared with naive CD8 $^+$ T cells (unpublished data). The selective expression of *Xcl1* in mouse T $_{CM}$ was confirmed independently by mining published mouse microarray datasets retrieved through the GEO database (Sarkar et al., 2008; Fig. S1 A). Therefore, *XCL1* mRNA is specifically expressed at steady state in NK and, to a lesser extent, CD8 $^+$ T cells, further induced in these cell types upon activation, including during viral infections in mouse and human (Fig. S1; Hycza et al., 2007; Sarkar et al., 2008), and stored in T $_{CM}$. Hence, XCR1 expression is likely integral to the unique potency of CD8 α^+ -type DCs for interaction with NK and CD8 $^+$ T cells.

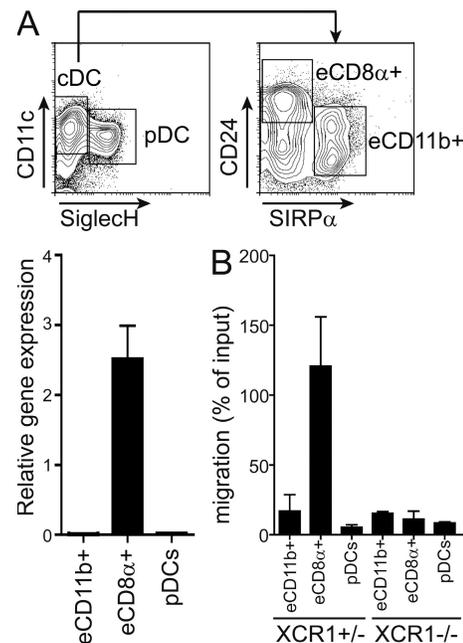


Figure 3. XCR1 expression and functions on mouse DC subsets from BM FLT3-L cultures. (A) DC subsets from FLT3-L BM cultures from C57BL/6Ncr1 mice were sorted and examined by real-time PCR for expression of the *Xcr1* gene. (B) Transwell assay on DC subsets derived from FLT3-L cultures of XCR1 $^{+/+}$ and XCR1 $^{-/-}$ BM cells. Results are representative of two experiments and expressed as mean \pm SEM from duplicate wells for each data point. eCD8 α^+ : FLT3-L BM-DC equivalents to spleen CD8 α^+ DCs and defined as SIRP α^- CD24 $^+$ CD11c $^+$ cells. eCD11b $^+$: FLT3-L DC equivalents to spleen CD11b $^+$ DCs and defined as SIRP α^+ CD24 $^-$ CD11c $^+$ cells. pDC: FLT3-L BM-pDC defined as CD11c low Siglech $^-$ H $^+$ cells.

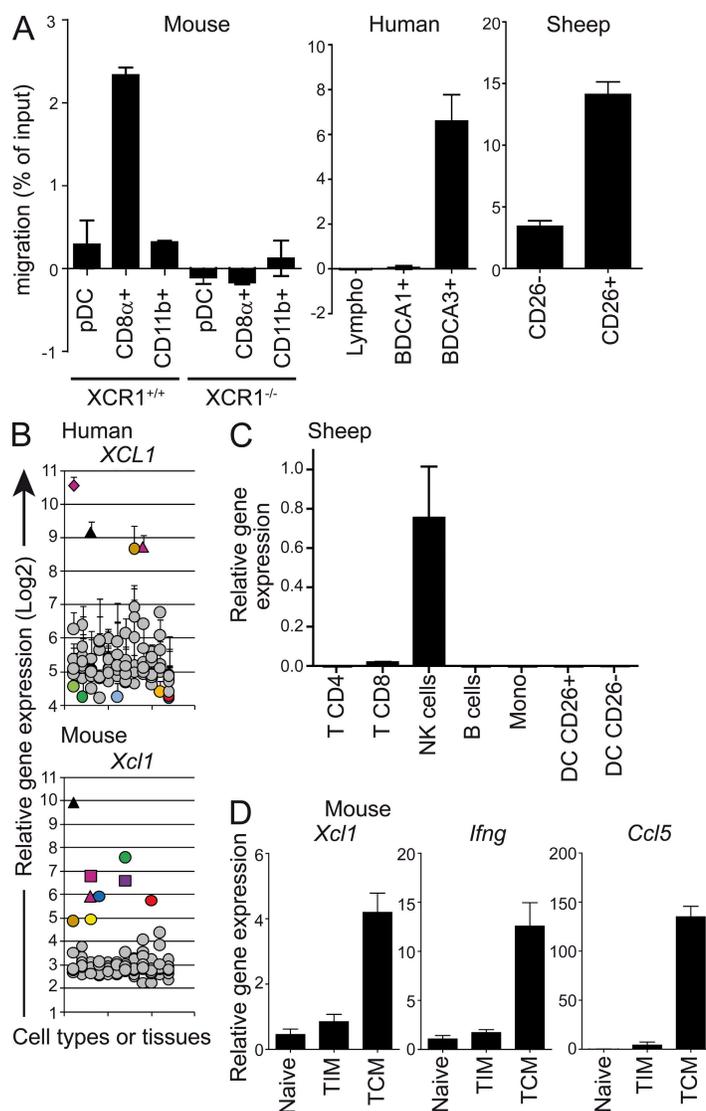


Figure 4. XCR1 is functionally active on mouse CD8 α^+ , human BDCA3 $^+$, and sheep CD26 $^+$ DCs, and *Xcl1* mRNA is stored in quiescent NK cells and memory CD8 $^+$ T lymphocytes.

Transwell migration assay on enriched human blood DCs or lymphocytes, sheep lymph CD26 $^+$ versus CD26 $^-$ DCs, and splenic DCs from XCR1 $^{-/-}$ and C57BL/6NCR1 (XCR1 $^{+/+}$) mice. Results are representative of at least two independent experiments for each species and expressed as mean \pm SEM from duplicate wells for each data point. (B) Expression of the *XCL1* gene in human and mouse cell types and tissues, based on the same gene chips data as used in Fig. 1 A, with the following additions: black triangles, NK cells; purple triangles, resting peripheral CD8 $^+$ T cells; purple diamond, anti-CD3 activated human T cells; purple square, mouse CD8 $^+$ thymocytes; violet square, mouse CD4 $^+$ thymocytes. Results are expressed as mean and SD for at least three independent values for most human data points. (C) Expression of the *XCL1* gene in sheep leukocytes as assessed by real-time PCR on the same lymph or blood cells as shown in Fig. 2. Results are mean \pm SEM of triplicate real-time RT-PCR reactions, and they are representative of two different sheep for lymphocytes and of three different sheep for DCs. (D) Results of *Xcl1* gene expression in mouse CD8 $^+$ T cell subsets. *Xcl1* expression was measured by real-time PCR on sorted naive or T_{IM} or antiviral T_{CM} CD8 $^+$ T cell subsets. Expression of *Ccl5* and *Ifng* were also evaluated as controls, as the genes are expressed to higher levels in memory CD8 $^+$ T cells (Walzer et al., 2003). Results are represented as mean \pm SD for mean values from duplicate real-time PCR reactions performed on mRNAs from naive T cells or from T_{IM} from three individual mice each, and from T_{CM} from four individual pools of seven mice.

true orthologues of the mammalian *Xcr1* gene (Fig. 5 A and Fig. S2), which was confirmed by synteny (Fig. 5, B and C). The multiple genes found in fish probably derive from the complex history of fish genomes that have been marked by large duplication events, fast evolution, and extensive genome rearrangements (Ravi and Venkatesh, 2008). It is remarkable that both stickleback *Xcr1* co-orthologues are closely linked to paralogues of the marker *FYCO1*, which is also encoded in the close neighborhood of mammalian *Xcr1* (Fig. 5 B-C). This conserved synteny indicates that the stickleback *Xcr1*-like genes indeed constitute valid co-orthologues of the mammalian receptor. Hence, XCR1 is a promising candidate marker to identify, isolate, study, and possibly target CD8 α^+ -type DCs in all vertebrates.

XCR1 promotes induction of CD8 $^+$ T cell responses and control of bacterial load in vivo early during *Lm* infection

CD8 α^+ DCs, but not CD11b $^+$ DCs or pDCs, isolated from mice infected with *Lm* present bacterial antigens for the priming of naive CD8 $^+$ T cells (Belz et al., 2005). Treatment of *Lm*-infected mice with pertussis toxin compromises the later activation of adoptively transferred antibacterial CD8 $^+$ T cells (Aoshi et al., 2008). Pertussis toxin is a nonspecific inhibitor of G proteins that is widely used to inhibit chemokine receptor signaling. Thus, it was suggested that a chemokine receptor expressed on DCs is required to enable them to induce CD8 $^+$ T cell responses to *Lm* infection. We reasoned that XCR1 could contribute to this process. Therefore,

Xcr1 is conserved in vertebrates and may be an ancient marker for CD8 α^+ -type DCs.

Sequences similar to the *Xcr1* locus are available from many mammals including all the species with a full genome assembly. Only one gene per species was found, located in the same genomic region as several CC chemokine receptors (CCRs). A unique *Xcr1* sequence was also identified from genomes of birds and the Anole lizard. Several sequences similar to *Xcr1* were present in teleost fish, such as zebrafish and stickleback, but only one in others like Fugu. The *Xcr1* sequence is well conserved in all eutherian species examined (>75% identity with the human sequence), in marsupials (~70% identity), in birds and reptiles (60–65% identity), and in fish (50–60% identity; Fig. S2). These sequences were aligned with those of several human CCRs, and phylogenetic analyses were performed using different methods. Trees reconstructed were congruent and demonstrated that the *Xcr1*-like sequences found in the different vertebrate taxa are

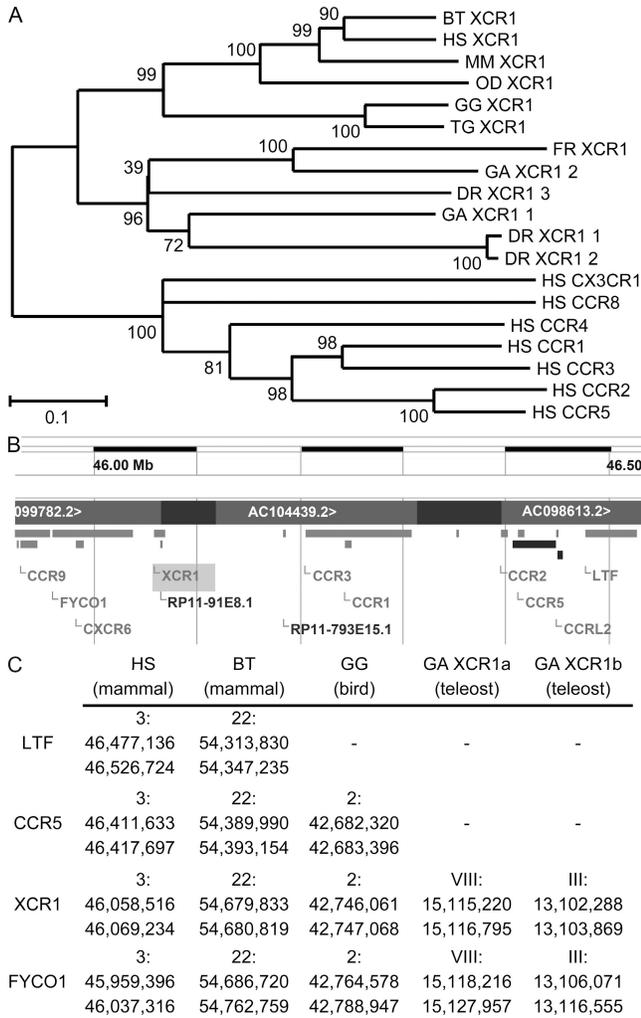


Figure 5. Xcr1 evolution in vertebrates. (A) Neighbor-joining (NJ) phylogenetic analysis. Xcr1 sequences from selected vertebrate species were extracted from the Ensembl databases and aligned with relevant human CCR sequences using ClustalW. The evolutionary history was inferred using the NJ method. The bootstrap consensus tree inferred from 1,000 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed. The percentages of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (complete deletion option). There were a total of 267 positions in the final dataset. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4 (Tamura et al., 2007). Abbreviations for species are: HS, *Homo sapiens* (Ensembl ID: ENSG00000173578); BT, *Bos taurus* (ENS-BTAG00000020019); MM, *Mus musculus* (ENSMUSG00000060509); FR, *Fugu rubripes* (ENSTRUG00000012394); GG, *Gallus gallus* (ENS-GALG00000011735); MD, *Monodelphis domestica* (ENS-MODG00000024025); TG, *Taeniopygia guttata* (ENSTGUG00000004516); DR, *Danio rerio* (ENS-DARG000000054847, ENS-DART00000007124, and ENS-DART000000074943); and GA, *Gasterosteus aculeatus* (ENS-GACG00000011742 and ENS-GACG00000017177). Human CCR IDs are as follows: CX3CR1 (ENSG00000168329); CCR8 (ENSG00000179934); CCR4

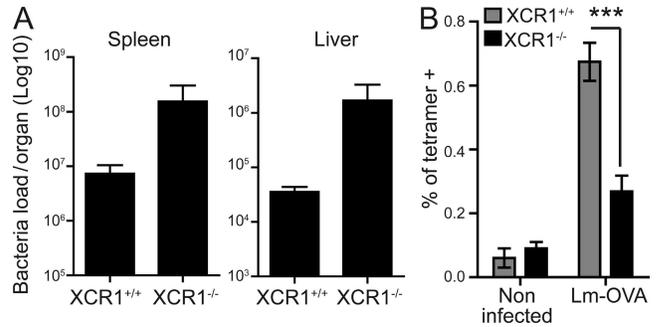


Figure 6. XCR1 deficiency affects *Lm* control and antibacterial CD8⁺ T cell responses early after infection. (A) Bacterial loads in the spleen and liver of XCR1^{-/-} versus XCR1^{+/+} mice at day 3 after infection. Results are represented as mean ± SEM for three animals per group and from one representative experiment out of two. (B) Frequency of anti-OVA(SIINFELK) tetramer⁺ cells within total spleen CD8⁺ T lymphocytes from *Lm*-OVA-infected mice at day 4 after infection. Results are represented as mean ± SEM from two independent experiments pooled for statistical analysis. ***, P < 0.005 using an unpaired Mann-Whitney non parametric test, eight mice per group.

we challenged XCR1^{-/-} and XCR1^{+/+} mice with *Lm* to evaluate the impact of XCR1 deficiency on the control of the bacteria load and on the induction of CD8⁺ T cell responses (Fig. 6). As compared with XCR1^{+/+} mice, XCR1^{-/-} animals infected with WT *Lm* displayed a log increase in their bacteria loads measured in livers and spleens at day 3 after inoculation (Fig. 6 A). There was still a trend toward higher bacterial loads in the spleen and liver of XCR1^{-/-} mice at day 4 after inoculation, although it was weaker than at day 3 (unpublished data). Because anti-*Lm* CD8⁺ T cell responses are readily detectable at 3–4 d after infection (Khanna et al., 2007), their alteration in XCR1^{-/-} animals could contribute to the higher bacterial replication in these animals. To compare the levels of anti-*Lm* CD8⁺ T cell responses between XCR1^{-/-} and XCR1^{+/+} mice, they were infected with a recombinant *Lm* strain expressing the ovalbumin antigen (*Lm*-OVA), and anti-OVA CD8⁺ T cells were enumerated by MHC class I tetramer staining at day 4 after inoculation. XCR1^{-/-} mice exhibited significantly fewer anti-*Lm* CD8⁺ T cells than XCR1^{+/+} animals (Fig. 6 B). Thus, these data suggest that XCR1 activity in CD8α⁺ DCs allows them to more efficiently induce antigen-specific CD8⁺ T cell responses and, hence, promote bacteria control early after infection with *Lm*.

(ENSG00000183813); CCR1 (ENSG00000163823); CCR3 (ENSG00000183625); CCR2 (ENSG00000121807); and CCR5 (ENSG00000160791). (B) Map of the human genes in the vicinity of the XCR1 gene. (C) Conserved synteny retrieved in different vertebrates in the neighborhood of Xcr1. Abbreviations for species are the same as in A. The locations of the genes are given as the number of the corresponding chromosome (for mammals and birds) or linkage group (for teleost), followed by a colon and the position of the sequence in base pairs on the chromosome/group.

DISCUSSION

The demonstration that human blood BDCA3⁺ DCs isolated ex vivo are more potent than their BDCA1⁺ counterparts or pDCs for antigen cross-presentation and CD8⁺ T cell activation fulfills our prediction, based on our comparative genomics studies, that human BDCA3⁺ DCs represent, in this respect, a functional homologue of mouse CD8 α ⁺ DCs and an interesting target for the design of innovative vaccination or immunotherapeutic strategies against infections by intracellular pathogens or cancer (Robbins et al., 2008; Crozat et al., 2010). More generally, our results demonstrate a common specialization of mouse CD8 α ⁺, human BDCA3⁺, and sheep CD26⁺ DCs for CD8⁺ T cell activation through cross-presentation of exogenous antigens and identical high selective expression of XCR1 by these cells that is consistent with the role of this molecule in the promotion of the interactions between CD8 α ⁺-like DCs and CD8⁺ T cells. These results establish a definitive proof of concept that validates our comparative genomics approach to hunt for conserved functions based on conserved molecular pathways for DC subsets across several mammalian species (Robbins et al., 2008; Crozat et al., 2010). This work exemplifies how critical knowledge can be gained to understand important immunological processes by using comparisons between species as a tool and by developing tight collaborations between teams working with different animal models. In particular, this work illustrates the utility of nonprimate animal models for understanding human immunology, provided that a rational approach is followed to help focusing on conserved biological processes and molecular functions.

Based on gene chip analyses, we previously reported that mouse CD8 α ⁺ DCs specifically expressed the *Xcr1* gene, to high levels, whereas none of the other leukocyte subsets examined did. Indeed, in the Supplemental material of our paper (Robbins et al., 2008), we reported *Xcr1* as the third most specific gene for mouse CD8 α ⁺ DCs in our analyses. This result was confirmed and significantly extended by Dorner et al. (2009). Indeed, these authors additionally reported that XCR1 engagement induces calcium mobilization specifically in CD8 α ⁺ DCs and that XCL1 responses are required for the induction of optimal primary CD8⁺ T cell responses by CD8 α ⁺ DCs in response to soluble model antigens in vitro and in vivo. No functional ProbeSet specific for the human *XCR1* gene had been identified on the Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array until very recently. XCR1 was, therefore, not reported by us (Robbins et al., 2008) or by Dorner et al. (2009) to be specifically expressed in human BDCA3⁺ DCs. However, by mapping on the human genome all individual orphan ProbeSets that were giving a high and specific signal only in human BDCA3⁺ DCs as compared with other blood leukocyte subsets, we identified that the 1561226_at ProbeSet mapped to the human XCR1 gene, which was later confirmed by the November 2009 update of the Ensembl genome browser. Hence, we demonstrate in this paper, for the first time, to the best of our knowledge, a conserved specific expression and activity of XCR1 on

CD8 α ⁺-type DCs derived in vitro in mouse BM FLT3-L cultures or isolated ex vivo from human and sheep. In our hands, XCL1 did not induce any maturation of DCs, either alone or in combination with IFN- γ , and did not seem to affect TLR-induced maturation of DCs in vitro (unpublished data). We confirm the specific expression of XCR1 ligands in NK cells and CD8⁺ T lymphocytes in mouse and human and extend it to sheep. We show that *Xcl1* mRNA is stored in quiescent NK cells and antiviral memory CD8⁺ T lymphocytes. We show that XCR1 promotes the induction of CD8⁺ T cell responses and the control of bacterial load in vivo early during *Lm* infection. Our phylogenetic analyses show the presence of a unique and well conserved XCR1 orthologue in all higher vertebrates from reptiles to human. Altogether, these observations strongly suggest that the XCL1→XCR1 chemotactic pathway constitutes one of the critical and conserved molecular bases promoting selective and efficient cross talk between CD8 α ⁺-type DCs and CD8⁺ T lymphocytes as well as NK cells.

In summary, our results demonstrate a functional homology between mouse CD8 α ⁺, sheep CD26⁺, and human BDCA3⁺ DCs and identify XCR1 as the best candidate to date for the identification of CD8 α ⁺-type DCs in all vertebrates, with a very narrow expression pattern highly restricted to these cell types. In addition, we show that, contrary to the molecules classically used to identify CD8 α ⁺-like DCs, XCR1 is not a mere phenotypical marker of these cells but actually contributes to confer on them their exquisite ability for CD8⁺ T cell activation. Thus, our study brings significant advances toward the generation of a unifying phenotypic and functional view of mammalian DC subsets, with major implications both for basic and applied immunology. Our findings open a way for the general survey by immunohistofluorescence of the anatomical location of CD8 α ⁺-type DCs and for their specific targeting in vivo for vaccination against intracellular pathogens or tumors threatening human or domestic animal health.

MATERIALS AND METHODS

Cell purification and culture for human DC subset cross-presentation assay. For each experiment, $>500 \times 10^6$ PBMCs were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (GE Healthcare) from peripheral blood cytopheresis residues obtained from normal healthy volunteer donors through the Etablissement Français du Sang according to the French ethics committee on human experimentations, within a convention with Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Primary DCs (BDCA1⁺ DCs, BDCA3⁺ DCs, and pDCs) were isolated from PBMCs depleted of CD3⁺ and CD14⁺ cells using CD3⁺ and CD14⁺ MACS microbeads and an AutoMACS (Miltenyi Biotec). Enriched cells were labeled and DCs were sorted on a FACSARIA flow cytometer (BD) as events negative for CD14, CD16, and CD19 and positive for HLA-DR and BDCA1 for BDCA1⁺ DCs, HLA-DR and BDCA3 for BDCA3⁺ DCs, or HLA-DR and CD123 for pDCs. The following antibodies were used: HLA-DR-PerCp (G46-6), CD14-PE-Cy7 (M5E2), CD16-APC-H7 (3G8; all obtained from BD), CD19-ECD (J3-119; Beckman Coulter), BDCA1-Pacific Blue (L161; BioLegend), BDCA3-APC (AD5-14H12), and CD123-PE (AC145; both obtained from Miltenyi Biotec). Cell sorting gave a purity $>95\%$. CD8⁺ primary T cell lines specific for the HLA-A2-restricted HIV-Pol₄₇₆₋₈₄ epitope

were generated as previously described (Hoeffel et al., 2007) using PBMCs from HLA-A2⁺ HIV⁺ individuals from a cohort study with the approval of Cochin Hospital's ethics committee. They were cultured in the presence of 1 μ M Pol₄₇₆₋₄₈₄ in complete medium (CM; RPMI 1640–GlutaMAX containing 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 1% nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, and 10 mM Hepes buffer; Life Technologies) + 5% human serum (BioWest) and maintained for 4 wk at 0.7×10^6 – 10^6 cells/ml, adding 10 U/ml IL-2 (Roche) twice a week. Uninfected (American Type Culture Collection; HTB-176) or chronically infected (American Type Culture Collection; CRL-8543) HLA-A2⁺ H9 cells were UV-irradiated (400 mJ/cm² at 312 nm) to induce their apoptosis and incubated at 10^6 cells/ml for 2 h in CM + 10% FCS (Invitrogen). Purified BDCA-1⁺ DCs, BDCA-3⁺ DCs, and pDCs were cultured with apoptotic cells at a 1:1 ratio for 16 h in the presence of a maturation signal, 100 ng/ml LPS (Sigma-Aldrich), or 10 μ g/ml poly I:C (InvivoGen) or 10 μ M R848 (InvivoGen) in CM + 5% human AB serum. After loading, DCs were extensively washed and used (5,000/well) in a 16-h IFN- γ ELISPOT assay with HIV-specific CD8⁺ T cell lines as effectors (15,000/well). All cultures were performed in the presence of 1 μ M Saquinavir (Roche), an HIV-protease inhibitor, to avoid HIV replication (Hoeffel et al., 2007).

Animals. C57BL/6Ncr1 mice were provided by Charles River. XCR1^{-/-} mice (B6.129P2-Xcr1^{tm1Dgen}/J mice; MGI:3604538) were generated by Deltagen. Frozen XCR1^{+/-} embryos were provided by The Jackson Laboratory for strain reviviscence in the Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (CIML). In these mice, the β -galactosidase is expressed under the *Xcr1* promoter and in place of *Xcr1*, which permits a detection of the natural expression pattern of *Xcr1*. All mice were kept under pathogen-free conditions in the CIML animal care facility. Mouse experiments were conducted in accordance with institutional guidelines for animal care and use (French Provence Ethical Committee Protocol no. 04/2005 and US Office of Laboratory Animal Welfare Assurance A5665-01). Sheep were cannulated at the Center of Research in Interventional Imaging, Institut National de La Recherche Agronomique-Assistance Publique Hôpitaux de Paris (Jouy en Josas, France) for collecting precapular skin afferent lymph as previously described (Schwartz-Cornil et al., 2006), and the sheep were housed in the Domestic Animal Experimental Unit INRA (Paris-Sud ethic committee no. 08002A, Jouy en Josas, France).

Memory CD8⁺ T cell generation. T_{IM}s were generated by intraperitoneal injection of 50 nmol influenza A nucleoprotein NP366-374 in PBS in naive thymectomized transgenic F5 mice (Mbitikon-Kobo et al., 2009). Antiviral T_{CM}s were generated by immunizing F5 mice with a recombinant vaccinia virus including the NP68 epitope as previously described (Cottalorda et al., 2009). Spleens and lymph nodes were collected 6 wk after infection for cell preparation as described in the next section.

Cell preparation, staining, and cell sorting for real-time PCR or transwell migration assay. Mouse splenocytes were prepared and DC subsets sorted as described previously (Robbins et al., 2008). CD8⁺ T cells purified from mouse spleen and lymph nodes were stained for surface expression of CD44, CD8, and F5 TCR (Walzer et al., 2002). Naive CD8⁺ T cells, T_{IM}, and antiviral T_{CM} were sorted by flow cytometry as CD8⁺/CD44^{low}, CD8⁺/CD44^{int}, and CD8⁺/CD44^{high}/F5 TCR⁺, respectively. β -Galactosidase enzyme activity in splenocytes from XCR1^{-/-} mice was revealed using FDG as a substrate according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). In brief, FDG was diluted in warm distilled water at 2 mM, and cells were mixed 1:1 with the substrate. After an incubation of one minute at 37°C, cells were placed on ice, and the enzymatic reaction was terminated by adding ice-cold PBS. Cells were stained with a marker of viability and promptly acquired by flow cytometry. Sheep CD4⁺ T, CD8⁺ T, NK, and B cells were enriched from afferent lymph, and monocytes were enriched from blood. Sheep leukocytes were stained with mouse mAbs against CD1b (clone TH97A; Parsons et al., 1991), CD26 (CC69; Gliddon and Howard, 2002), CD8 α (CACT80C; MacHugh and Sopp, 1991), CD4

(ST4; Hopkins, 1991), CD14 (CAM36A; Berthon and Hopkins, 1996), and NKp46 (AKS4). AKS4 was produced against bovine NKp46 according to a previously described protocol (Storset et al., 2004), and it cross-reacts with ovine NK cells defined as CD16⁺/CD14⁻ blood leukocytes (Elhrouzi-Younes et al., 2010). NKp46 has been shown to be the best discriminating and conserved marker for NK cell identification in mammals (Storset et al., 2004; Walzer et al., 2007). The DU2-104 mAb is used to characterize all B cells in sheep (Press et al., 1993). Sheep cells were reacted with 2 μ g/ml of primary antibodies, stained with fluorochrome-conjugated purified Ig directed to specific mouse isotypes, and sorted by FACS with >95% purity.

Microarray and real-time PCR experiments. The generation and analysis of microarray data for mouse and human DC subsets were described elsewhere (Robbins et al., 2008; Zucchini et al., 2008). All datasets used are public and their references for download from databases are given in the legends of figures. A compendium of human hgu133plus2 Affymetrix .CEL files was established, using Bioconductor (release 2.5) in the R statistical environment (version 2.10.1). This consisted of the quality control assessment using the AffyPLM package (Bolstad et al., 2004; e.g., visual examination of hybridization chip images, relative log expression, and normalized unscaled standard errors plots) and the robust multichip analysis normalization (Irizarry et al., 2003) with the Affy package. Normalized log₂ scaled values were then averaged among replicate arrays for each probe, and standard deviations were calculated. For real-time PCR experiments, total RNA was prepared with either the RNA NOW reagent (Biogentex) for mouse CD8⁺ T cells or the RNeasy Isolation kit (QIAGEN) for mouse DCs. RNA was reverse transcribed into cDNA with the QuantiTect reverse transcription kit (QIAGEN), and the cDNA was analyzed by real-time PCR using the Power SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems). Primers were as follows: mouse *Xcr1*, 5'-CTCAGCCTTGTGGGTAA-CAGC-3' and 5'-ACAGGCAGTAGACAGGAGAAC-3'; mouse *Ccl5*, 5'-GCACCTGCCTCACCATATGG-3' and 5'-AGCACTTGCT-GCTGGTGTAG-3'; mouse *Ifng*, 5'-CCAGCGCCAAGCATTCAAT-GAG-3' and 5'-GACAATCTTCCCCACCCC-3'; mouse *ubiquitin*, 5'-AAGAATTGAGATCGGATGACACACT-3' and 5'-GCCACTT-GGAGGTTGACACTTT-3'; sheep *XCR1*, 5'-TGCCATCTTCCA-CAAGGTGTT-3' and 5'-ACGAGGCGAGGAACCA-3'; sheep *XCL1*, 5'-TGAGCCAGAGCAAGCCTACA-3' and 5'-TCACTACCCAGT-CAGGGTCCACA-3'; and sheep *GAPDH*, 5'-CACCATCTTCCAG-GAGCGAG-3' and 5'-CCAGCATCACCCCACTTGAT-3'. Relative gene expression was calculated using the $\Delta\Delta$ Ct method with *b-actin* for mouse DCs, ubiquitin for mouse CD8⁺ T cells, and *GAPDH* for sheep leukocytes as the endogenous control housekeeping genes.

Transwell migration assay. Mouse DCs were obtained by density gradient enrichment from splenocytes or derived in vitro from BM Flt3-L cultures as previously described (Sjölin et al., 2006). Human DCs were enriched using the human Blood Dendritic Cell Isolation kit II (Miltenyi Biotec). Sheep DCs were enriched by density gradient. Cells were resuspended in migration medium (0.5% BSA in RPMI) and distributed in the upper chamber of a 24 Transwell system insert (5- μ m pore size; Corning). The lower chamber was filled with migration medium alone or containing 300 ng/ml of mouse recombinant XCL1 (R&D Systems) for mouse cells, 500 ng/ml of human recombinant XCL1 (R&D Systems) for human cells, and 100 ng/ml of recombinant mouse XCL1 for sheep cells. Cells were incubated for 3–4 h at 37°C in 5% CO₂. A constant number of polybead polystyrene microspheres (Polyscience) was added in each lower chamber before harvesting migrated cells. Migrated cells were then stained and analyzed by flow cytometry. A constant event of microspheres for each well was acquired to evaluate the absolute number of cells recovered after migration. The percentage of migrated cells was calculated by the following formula for each subset: [number of cells having migrated in response to XCL-1 – number of cells having migrated spontaneously]/[total number of input cells] \times 100. All experiments were performed with duplicate wells.

Multianalyte profiling in supernatant from mouse CD8⁺ T cells. 2×10^5 sorted naive CD8⁺ T cells and T_{IM} were stimulated for 6 h with the NP68 peptide at a concentration of 10 nM in 200 μ l of medium. Supernatants were analyzed using Rodent MAP 1.0 (Rules Based Medicine).

Infections with *Lm*. The *Lm* WT strain 10403S and the *Lm* strain that had been engineered to express OVA (*Lm*-OVA; gift from Grégoire Lauvau, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY) were prepared from clones grown from organs of infected mice. Stocks of bacteria were kept frozen at -80°C . For infections, a sample of the frozen stock was grown to a logarithmic phase ($\text{OD}_{600} = 0.05\text{--}0.15$) in broth heart infusion (BHI) medium (Sigma-Aldrich), diluted in PBS, and injected into the retroorbital vein. Bacterial loads in organs were evaluated after infection of mice with one LD₅₀ of WT *Lm* (5×10^4 bacteria). CD8⁺ T cell responses were measured in animals infected with 0.1 LD₅₀ of *Lm*-OVA (5×10^3 bacteria). The dose of *Lm* injected was confirmed by CFU counting of the inoculum. To measure bacterial titers, spleens and livers were harvested at day 3 and dissociated on nylon meshes in 5 ml of dissociation buffer (0.2% NP-40). Serial dilutions were performed and plated onto BHI agar plates. For analysis of *Lm*-specific CD8⁺ T cell responses at day 4, OVA-specific CD8⁺ T cells were readily detected using OVA-iTag-H-2K^b-SIINFEKL PE-conjugated MHC class I tetramers (Beckman Coulter).

Phylogenetic analysis. 12 representatives of XCR1 sequences were retrieved from Ensembl genome assemblies of relevant vertebrate species. No good candidate for XCR1 counterpart was found in other phyla. Chromosomal locations were obtained from Ensembl (November 2009 release). Conserved synteny was searched manually in Ensembl and with the Genomicus tool (<http://www.dyogen.ens.fr/genomicus/cgi-bin/search.pl>). The amino acid sequences of XCR1 domain were aligned using ClustalW and Mega4 programs. Any site at which the alignment introduces a gap in any sequence was excluded, and a comparable set of sites was therefore used for the phylogenetic analyses. The phylogenetic analysis was made using two methods: NJ and parsimony using the MEGA 4 program (Tamura et al., 2007).

Online supplemental material. Fig. S1 documents the expression pattern of *XCL1* in mouse NK cells, mouse T_{CM}, and human CD8⁺ T cells during viral infections. Fig. S2 shows the alignment of XCR1 protein sequences and the Maximum Parsimony phylogenetic analysis of *Xcr1* evolution in vertebrates. Online supplemental material is available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20100223/DC1>.

We thank Michel Bonneau (Centre de Recherche en Imagerie Interventionnelle, Jouy en Josas, France) for the sheep surgery, Céline Urien for excellent technical support, the Domestic Animal Experimental Unit (UCEA, Institut National de La Recherche Agronomique, Jouy en Josas, France) for sheep care, the Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (CIML) staff of the mouse care facilities and the flow cytometry core facility for assistance, and Grégoire Lauvau (Albert Einstein College of Medicine, New York, USA) for providing the *Lm* strains. We thank Lene Vimeux (Centre National de la Recherche Scientifique [CNRS] UMR 8104) for generating T cell lines, and Antonio Cosma, Sabrina Guenounou, Thibault Andrieu, and Roger Le Grand (flow cytometry cell sorting core facility of the Commissariat à l'Énergie Atomique [CEA] in Fontenay aux Roses, France). We thank Bernard Charley and Bernard Malissen for critical reading of the manuscript.

This work was supported by Association pour la recherche sur le cancer (postdoctoral fellowship to K. Crozat and research grants to M. Dalod and to J. Marvel), CNRS (postdoctoral fellowship to R. Guiton), Agence nationale de recherches sur le SIDA et les hépatites virales (fellowship to C.-A. Dutertre), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Jeune Chercheur fellowship to V. Feuillet), Ligue nationale contre le cancer (fellowship to E. Ventre), institutional grants to CIML, and the Agence nationale de la recherche program Genanimal 2006 (research grant to I. Schwartz-Cornil).

The authors declare no competing financial interests.

Submitted: 2 February 2010

Accepted: 23 April 2010

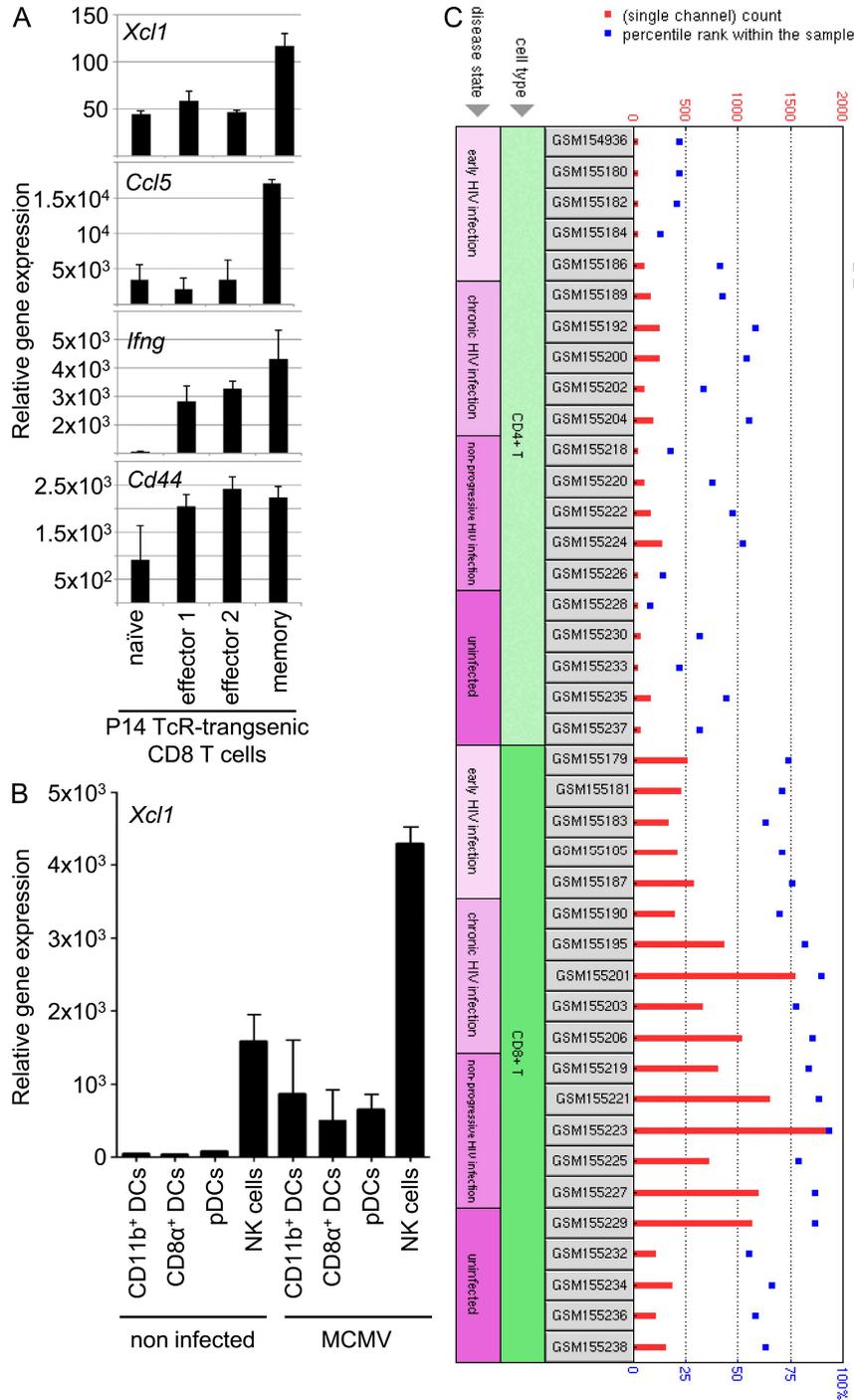
REFERENCES

- Aoshi, T., B.H. Zinselmeyer, V. Konjufca, J.N. Lynch, X. Zhang, Y. Koide, and M.J. Miller. 2008. Bacterial entry to the splenic white pulp initiates antigen presentation to CD8⁺ T cells. *Immunity*. 29:476–486. doi:10.1016/j.immuni.2008.06.013
- Baranek, T., N. Zucchini, and M. Dalod. 2009. Plasmacytoid dendritic cells and the control of herpesvirus infections. *Viruses*. 1:383–419. doi:10.3390/v1030383
- Belz, G.T., K. Shortman, M.J. Bevan, and W.R. Heath. 2005. CD8alpha⁺ dendritic cells selectively present MHC class I-restricted noncytolytic viral and intracellular bacterial antigens in vivo. *J. Immunol.* 175:196–200.
- Berthon, P., and J. Hopkins. 1996. Ruminant cluster CD14. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 52:245–248. doi:10.1016/0165-2427(96)05568-7
- Bolstad, B.M., F. Collin, K.M. Simpson, R.A. Irizarry, and T.P. Speed. 2004. Experimental design and low-level analysis of microarray data. *Int. Rev. Neurobiol.* 60:25–58. doi:10.1016/S0074-7742(04)60002-X
- Bonifaz, L.C., D.P. Bonnyay, A. Charalambous, D.I. Dargume, S. Fujii, H. Soares, M.K. Brimnes, B. Molledo, T.M. Moran, and R.M. Steinman. 2004. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J. Exp. Med.* 199:815–824. doi:10.1084/jem.20032220
- Caminschi, I., A.I. Proietto, F. Ahmet, S. Kitsoulis, J. Shin Teh, J.C. Lo, A. Rizzitelli, L. Wu, D. Vremec, S.L. van Dommelen, et al. 2008. The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood*. 112:3264–3273. doi:10.1182/blood-2008-05-155176
- Carter, R.W., C. Thompson, D.M. Reid, S.Y. Wong, and D.F. Tough. 2006. Preferential induction of CD4⁺ T cell responses through in vivo targeting of antigen to dendritic cell-associated C-type lectin-1. *J. Immunol.* 177:2276–2284.
- Cottalorda, A., B.C. Mercier, F.M. Mbitikon-Kobo, C. Arpin, D.Y. Teoh, A. McMichael, J. Marvel, and N. Bonnefoy-Bérard. 2009. TLR2 engagement on memory CD8(+) T cells improves their cytokine-mediated proliferation and IFN- γ secretion in the absence of Ag. *Eur. J. Immunol.* 39:2673–2681. doi:10.1002/eji.200939627
- Crozat, K., R. Guiton, M. Williams, S. Henri, T. Baranek, I. Schwartz-Cornil, B. Malissen, and M. Dalod. 2010. Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets. *Immunol. Rev.* 234:177–198. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00868.x
- Dorner, B.G., A. Scheffold, M.S. Rolph, M.B. Huser, S.H. Kaufmann, A. Radbruch, I.E. Flesch, and R.A. Kroczeck. 2002. MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN- γ as type 1 cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99:6181–6186. doi:10.1073/pnas.092141999
- Dorner, B.G., M.B. Dorner, X. Zhou, C. Opitz, A. Mora, S. Güttler, A. Hutloff, H.W. Mages, K. Ranke, M. Schaefer, et al. 2009. Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8⁺ T cells. *Immunity*. 31:823–833. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.027
- Du, X., Y. Tang, H. Xu, L. Lit, W. Walker, P. Ashwood, J.P. Gregg, and F.R. Sharp. 2006. Genomic profiles for human peripheral blood T cells, B cells, natural killer cells, monocytes, and polymorphonuclear cells: comparisons to ischemic stroke, migraine, and Tourette syndrome. *Genomics*. 87:693–703. doi:10.1016/j.ygeno.2006.02.003
- Dudziak, D., A.O. Kamphorst, G.F. Heidkamp, V.R. Buchholz, C. Trumpheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H.W. Lee, C.G. Park, et al. 2007. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science*. 315:107–111. doi:10.1126/science.1136080
- Elhrouzi-Younes, J., P. Boysen, D. Pende, A.K. Storset, Y. Le Vern, F. Laurent, and F. Drouet. 2010. Ovine CD16+/CD14- blood lymphocytes present all the major characteristics of natural killer cells. *Vet. Res.* 41:4. doi:10.1051/vetres/2009052
- Epardaud, M., M. Bonneau, F. Payot, C. Cordier, J. Mégret, C. Howard, and I. Schwartz-Cornil. 2004. Enrichment for a CD26hi SIRP- subset in lymph dendritic cells from the upper aero-digestive tract. *J. Leukoc. Biol.* 76:553–561. doi:10.1189/jlb.0404223
- Gliddon, D.R., and C.J. Howard. 2002. CD26 is expressed on a restricted subpopulation of dendritic cells in vivo. *Eur. J. Immunol.* 32:1472–1481.

- doi:10.1002/1521-4141(200205)32:5<1472::AID-IMMU1472>3.0.CO;2-Q
- Hildner, K., B.T. Edelson, W.E. Purtha, M. Diamond, H. Matsushita, M. Kohyama, B. Calderon, B.U. Schraml, E.R. Unanue, M.S. Diamond, et al. 2008. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science*. 322:1097–1100. doi:10.1126/science.1164206
- Hoeffel, G., A.C. Ripoche, D. Matheoud, M. Nascimbeni, N. Escriou, P. Lebon, F. Heshmati, J.G. Guillet, M. Gannagé, S. Caillat-Zucman, et al. 2007. Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*. 27:481–492. doi:10.1016/j.immuni.2007.07.021
- Hopkins, J. 1991. Workshop studies on the ovine CD4 homologue. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 27:101–102. doi:10.1016/0165-2427(91)90087-S
- Huysamen, C., J.A. Willment, K.M. Dennehy, and G.D. Brown. 2008. CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes. *J. Biol. Chem.* 283:16693–16701. doi:10.1074/jbc.M709923200
- Hyrca, M.D., C. Kovacs, M. Loutfy, R. Halpenny, L. Heisler, S. Yang, O. Wilkins, M. Ostrowski, and S.D. Der. 2007. Distinct transcriptional profiles in ex vivo CD4+ and CD8+ T cells are established early in human immunodeficiency virus type 1 infection and are characterized by a chronic interferon response as well as extensive transcriptional changes in CD8+ T cells. *J. Virol.* 81:3477–3486. doi:10.1128/JVI.01552-06
- Irizarry, R.A., B.M. Bolstad, F. Collin, L.M. Cope, B. Hobbs, and T.P. Speed. 2003. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* 31:e15. doi:10.1093/nar/gng015
- Khanna, K.M., J.T. McNamara, and L. Lefrançois. 2007. In situ imaging of the endogenous CD8 T cell response to infection. *Science*. 318:116–120. doi:10.1126/science.1146291
- Lindstedt, M., K. Lundberg, and C.A. Borrebaeck. 2005. Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *J. Immunol.* 175:4839–4846.
- MacHugh, N.D., and P. Sopp. 1991. Individual antigens of cattle. Bovine CD8 (BoCD8). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 27:65–69. doi:10.1016/0165-2427(91)90081-M
- 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, et al. 2009. Characterization of a CD44/CD122int memory CD8 T cell subset generated under sterile inflammatory conditions. *J. Immunol.* 182:3846–3854. doi:10.4049/jimmunol.0802438
- Müller, S., B. Dorner, U. Korthäuer, H.W. Mages, M. D'Apuzzo, G. Senger, and R.A. Kroczek. 1995. Cloning of ATAC, an activation-induced, chemokine-related molecule exclusively expressed in CD8+ T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 25:1744–1748. doi:10.1002/eji.1830250638
- Naik, S.H., A.I. Proietto, N.S. Wilson, A. Dakic, P. Schnorrer, M. Fuchsberger, M.H. Lahoud, M. O'Keeffe, Q.X. Shao, W.F. Chen, et al. 2005. Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8-dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J. Immunol.* 174:6592–6597.
- Nchinda, G., J. Kuroiwa, M. Oks, C. Trumppfeller, C.G. Park, Y. Huang, D. Hannaman, S.J. Schlesinger, O. Mizenina, M.C. Nussenzweig, et al. 2008. The efficacy of DNA vaccination is enhanced in mice by targeting the encoded protein to dendritic cells. *J. Clin. Invest.* 118:1427–1436. doi:10.1172/JCI34224
- Parsons, K.R., C.J. Howard, and P. Sopp. 1991. Immunohistology of workshop monoclonal antibodies to the bovine homologue of CD1. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 27:201–206. doi:10.1016/0165-2427(91)90101-H
- Press, C.M., W.R. Hein, and T. Landsverk. 1993. Ontogeny of leucocyte populations in the spleen of fetal lambs with emphasis on the early prominence of B cells. *Immunology*. 80:598–604.
- Ravi, V., and B. Venkatesh. 2008. Rapidly evolving fish genomes and teleost diversity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18:544–550. doi:10.1016/j.gde.2008.11.001
- Robbins, S.H., T. Walzer, D. Dembélé, C. Thibault, A. Defays, G. Bessou, H. Xu, E. Vivier, M. Sellars, P. Pierre, et al. 2008. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol.* 9:R17. doi:10.1186/gb-2008-9-1-r17
- Sancho, D., D. Mourão-Sá, O.P. Joffre, O. Schulz, N.C. Rogers, D.J. Pennington, J.R. Carlyle, and C. Reis e Sousa. 2008. Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J. Clin. Invest.* 118:2098–2110. doi:10.1172/JCI34584
- Sarkar, S., V. Kalia, W.N. Haining, B.T. Konieczny, S. Subramaniam, and R. Ahmed. 2008. Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J. Exp. Med.* 205:625–640. doi:10.1084/jem.20071641
- Schwartz-Cornil, I., M. Epardaud, and M. Bonneau. 2006. Cervical duct cannulation in sheep for collection of afferent lymph dendritic cells from head tissues. *Nat. Protoc.* 1:874–879. doi:10.1038/nprot.2006.147
- Sjölin, H., S.H. Robbins, G. Bessou, A. Hidmark, E. Tomasello, M. Johansson, H. Hall, F. Charifi, G.B. Karlsson Hedestam, C.A. Biron, et al. 2006. DAP12 signaling regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis and down-modulates their function during viral infection. *J. Immunol.* 177:2908–2916.
- Storset, A.K., S. Kulberg, I. Berg, P. Boysen, J.C. Hope, and E. Dissen. 2004. NKp46 defines a subset of bovine leukocytes with natural killer cell characteristics. *Eur. J. Immunol.* 34:669–676. doi:10.1002/eji.200324504
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596–1599. doi:10.1093/molbev/msm092
- 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.
- Walzer, T., M. Bléry, J. Chaix, N. Fuseri, L. Chasson, S.H. Robbins, S. Jaeger, P. André, L. Gauthier, L. Daniel, et al. 2007. Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:3384–3389. doi:10.1073/pnas.0609692104
- Zucchini, N., G. Bessou, S.H. Robbins, L. Chasson, A. Raper, P.R. Crocker, and M. Dalod. 2008. Individual plasmacytoid dendritic cells are major contributors to the production of multiple innate cytokines in an organ-specific manner during viral infection. *Int. Immunol.* 20:45–56. doi:10.1093/intimm/dxm119

SUPPLEMENTAL MATERIAL

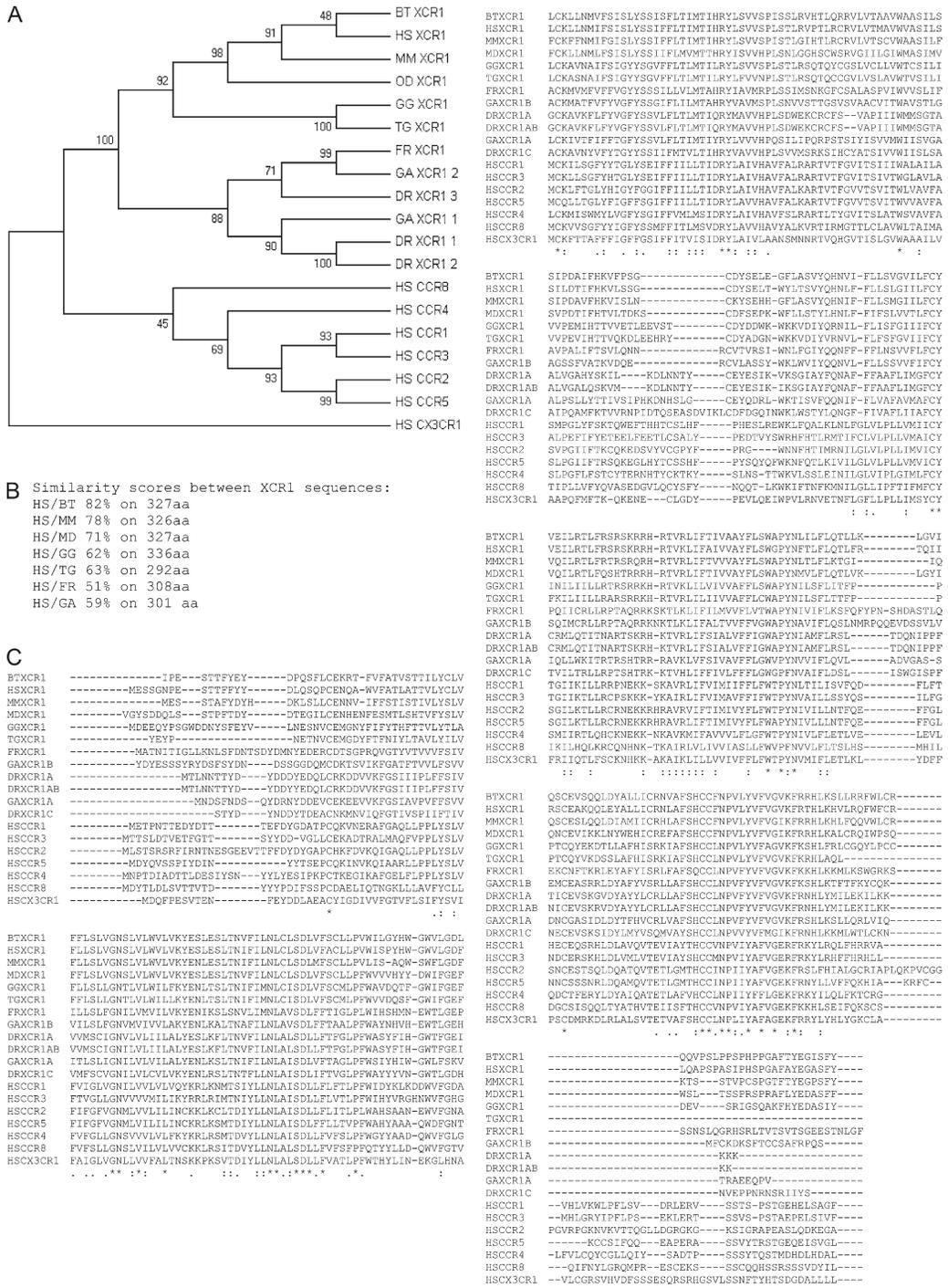
Crozat et al., <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20100223/DC1>



Downloaded from jem.rupress.org on May 17, 2010

Figure S1. XCL1 expression during viral infections in mouse T_{CM}, in mouse NK cells, and in human T cells. (A) Expression of *Xcl1*, *Ccl5*, *Ifng*, and *Cd44* in naïve versus effector 1 (Klrg1^{int}), effector 2 (Klrg1^{high}), or memory P14 TcR-transgenic CD8⁺ T cells isolated from uninfected (naïve T cells) versus day-4.5 (effector T cells) or day-60–120 (memory T cells) LCMV-infected mice. Analysis of the GEO dataset GSE10239 is shown (Sarkar et al. 2008. *J Exp Med*. doi:10.1084/jem.20071641). Results are expressed as mean \pm SD from three independent values for each cell population. (B) Expression of *Xcl1* in spleen DC subsets and NK cells from uninfected versus day-1.5 MCMV-infected mice, from our previously described GEO dataset GSE9810 (Zucchini et al. 2008. *Int Immunol*. doi:10.1093/intimm/dxm119). Results are expressed as mean \pm SEM from two independent values for each cell population. (C) Expression of XCL1 in CD4⁺ or CD8⁺ T cells isolated from the blood of healthy or HIV-1-infected individuals with different clinical profiles from the GEO Profiles tool of the National Center for Biotechnology Information website and based on the GEO dataset GSE6740 (Hyrca et al. 2007. *J. Virol*. doi:10.1128/JVI.01552-06).

[AQ5]



Downloaded from jem.rupress.org on May 17, 2010

Figure S2. Alignment of XCR1 protein sequences and Maximum Parsimony phylogenetic analysis of Xcr1 evolution in vertebrates. (A) The evolutionary history was inferred using the Maximum Parsimony method. The most parsimonious tree with length = 1,370 is shown. The percentages of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) are shown next to the branches. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (complete deletion option). There were a total of 267 positions in the final dataset, out of which 222 were parsimony informative. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4 (Tamura et al. 2007. *Mol. Biol. Evol.* doi:10.1093/molbev/msm092). (B) Similarity scores of the same XCR1 protein sequences from different vertebrate species with that of the human XCR1 sequence, based on the alignments shown in C. See Abbreviation definitions in the Fig. 5 legend.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

Acacia De Sa Pinheiro et al. IL-4 induces a wide-spectrum intracellular signaling cascade in CD8+ T cells. *Journal of Leukocyte Biology* (2007) vol. 81 (4) pp. 1102-1110

Ahmed and Gray. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* (1996) vol. 272 (5258) pp. 54-60

Akamatsu et al. Human TSLP directly enhances expansion of CD8 +T cells. *Clinical & Experimental Immunology* (2008) vol. 154 (1) pp. 98-106

Akondy et al. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. *J Immunol* (2009) vol. 183 (12) pp. 7919-30

Albert et al. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat Immunol* (2001) vol. 2 (11) pp. 1010-7

Allard et al. Overexpression of IL-21 promotes massive CD8+ memory T cell accumulation. *Eur J Immunol* (2007) vol. 37 (11) pp. 3069-77

Almeida et al. Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and

clonal turnover. *J Exp Med* (2007) vol. 204 (10) pp. 2473-85

André et al. Impaired tumor rejection by memory CD8 T cells in mice with NKG2D dysfunction. *Int J Cancer* (2011) pp.

Anichini et al. Skewed T-cell differentiation in patients with indolent non-Hodgkin lymphoma reversed by ex vivo T-cell culture with gammacytokines. *Blood* (2006) vol. 107 (2) pp. 602-9

Apps et al. Natural-killer cell ligands at the maternal-fetal interface: UL-16 binding proteins, MHC class-I chain related molecules, HLA-F and CD48. *Hum Reprod* (2008) vol. 23 (11) pp. 2535-48

Araki et al. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* (2009) vol. 460 (7251) pp. 108-12

Arlettaz et al. Activating CD94:NKG2C and inhibitory CD94:NKG2A receptors are expressed by distinct subsets of committed CD8+ TCR alpha lymphocytes. *Eur J Immunol* (2004) vol. 34 (12) pp. 3456-64

Aronica et al. IL-4-dependent induction of BCL-2 and BCL-X(L) in activated T lymphocytes through a STAT6- and pi 3-kinase-independent pathway. *Cytokine* (2000) vol. 12 (6) pp. 578-87

Arstila et al. A direct estimate of the human alpha T cell receptor diversity. *Science* (1999) vol. 286 (5441) pp. 958-61

Asao et al. Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol* (2001) vol. 167 (1) pp. 1-5

Aspord et al. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *J Exp Med* (2007) vol. 204 (5) pp. 1037-47

Atherly et al. The Tec family tyrosine kinases Itk and Rlk regulate the development of conventional CD8+ T cells. *Immunity* (2006) vol. 25 (1) pp. 79-91

Aung and Graham. IL-4 diminishes perforin-mediated and increases Fas ligand-mediated cytotoxicity *In vivo*. *J Immunol* (2000) vol. 164 (7) pp. 3487-93

B

Bachmann et al. Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. *Eur J Immunol* (1999) vol. 29 (1) pp. 291-9

Badovinac et al. Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after

dendritic-cell vaccination. *Nat Med* (2005) vol. 11 (7) pp. 748-56

Badovinac et al. CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat Immunol* (2004) vol. 5 (8) pp. 809-17

Balzano et al. CTLA-4 and CD28: similar proteins, neighbouring genes. *Int J Cancer Suppl* (1992) vol. 7 pp. 28-32

Banerjee et al. Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8+ T cells to compete for the memory cell niche. *J Immunol* (2010) vol. 185 (9) pp. 4988-92

Barber et al. Cutting edge: rapid *in vivo* killing by memory CD8 T cells. *J Immunol* (2003) vol. 171 (1) pp. 27-31

Barker et al. Critical role for IL-21 in both primary and memory anti-viral CD8+ T-cell responses. *Eur J Immunol* (2010) vol. 40 (11) pp. 3085-3096

Becker et al. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med* (2002) vol. 195 (12) pp. 1541-8

Berard et al. IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. *J Immunol* (2003) vol. 170 (10) pp. 5018-26

Berg et al. Memory CD8+ T cells provide innate immune protection against

Listeria monocytogenes in the absence of cognate antigen. *J Exp Med* (2003) vol. 198 (10) pp. 1583-93

Berg et al. Contribution of CD8+ T cells to innate immunity: IFN-gamma secretion induced by IL-12 and IL-18. *Eur J Immunol* (2002) vol. 32 (10) pp. 2807-16

Berlin et al. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* (1993) vol. 74 (1) pp. 185-95

Bertram et al. 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) vol. 168 (8) pp. 3777-85

Bethony et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet* (2006) vol. 367 (9521) pp. 1521-32

Betts et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* (2006) vol. 107 (12) pp. 4781-9

Beuneu et al. Visualizing the Functional Diversification of CD8+ T Cell Responses in Lymph Nodes. *Immunity* (2010) vol. 33 (3) pp. 412-423

Beveridge et al. Immunisation with BCG and recombinant MVA85A induces long-lasting, polyfunctional Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ memory T lymphocyte populations. *Eur J Immunol* (2007) vol. 37 (11) pp. 3089-100

Blander and Medzhitov. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* (2006) vol. 440 (7085) pp. 808-12

Blattman et al. Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo. *Nat Med* (2003) vol. 9 (5) pp. 540-7

Blattman et al. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med* (2002) vol. 195 (5) pp. 657-64

Bleul et al. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* (1996) vol. 184 (3) pp. 1101-9

Boise et al. Growth factors can enhance lymphocyte survival without committing the cell to undergo cell division. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) vol. 92 (12) pp. 5491-5

Boismenu et al. Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. *J Immunol* (1996) vol. 157 (3) pp. 985-92

Bonder et al. Use of CD44 by CD4+ Th1 and Th2 lymphocytes to roll and adhere. *Blood* (2006) vol. 107 (12) pp. 4798-806

Borowski et al. Memory CD8+ T cells require CD28 costimulation. *J Immunol* (2007) vol. 179 (10) pp. 6494-503

Borthwick et al. Selective migration of highly differentiated primed T cells across human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Soc Trans* (1997) vol. 25 (2) pp. 258S

Bou Ghanem et al. T Cell-Intrinsic Factors Contribute to the Differential Ability of CD8+ T Cells To Rapidly Secrete IFN- in the Absence of Antigen. *J Immunol* (2011) vol. 186 (3) pp. 1703-1712

Bouso et al. Individual variations in the murine T cell response to a specific peptide reflect variability in naive repertoires. *Immunity* (1998) vol. 9 (2) pp. 169-78

Boyman et al. IL-7/anti-IL-7 mAb complexes restore T cell development and induce homeostatic T Cell expansion without lymphopenia. *J Immunol* (2008) vol. 180 (11) pp. 7265-75

Boyman et al. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science* (2006) vol. 311 (5769) pp. 1924-7

Bromley et al. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* (2001) vol. 19 pp. 375-96

Broussard et al. Altered development of CD8+ T cell lineages in mice deficient for the Tec kinases Itk and Rlk. *Immunity* (2006) vol. 25 (1) pp. 93-104

Burgess et al. IL-21 down-regulates NKG2D/DAP10 expression on human NK and CD8+ T cells. *J Immunol* (2006) vol. 176 (3) pp. 1490-7

C

Campbell et al. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* (1999) vol. 400 (6746) pp. 776-80

Cannarile et al. Transcriptional regulator Id2 mediates CD8+ T cell immunity. *Nat Immunol* (2006) vol. 7 (12) pp. 1317-25

Carrio et al. Non-redundant role for IL-7R signaling for the survival of CD8+ memory T cells. *Eur J Immunol* (2007) vol. 37 (11) pp. 3078-88

Carvalho et al. IL-4-secreting CD4+ T cells are crucial to the development of CD8+ T-cell responses against malaria liver stages. *Nat Med* (2002) vol. 8 (2) pp. 166-70

Casey and Mescher. IL-21 promotes differentiation of naive CD8 T cells to a unique effector phenotype. *J Immunol* (2007) vol. 178 (12) pp. 7640-8

Casrouge et al. Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J Immunol* (2000) vol. 164 (11) pp. 5782-7

Cerboni et al. Detuning CD8+ T lymphocytes by down-regulation of the activating receptor NKG2D: role of NKG2D ligands released by activated T cells. *Blood* (2009) pp. 33

Chang et al. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* (2007) vol. 315 (5819) pp. 1687-91

Chang et al. IL-12 priming during in vitro antigenic stimulation changes properties of CD8 T cells and increases generation of effector and memory cells. *J Immunol* (2004) vol. 172 (5) pp. 2818-26

Cho et al. Calcineurin-dependent negative regulation of CD94/NKG2A expression on naive CD8+ T cells. *Blood* (2011) vol. 118 (1) pp. 116-28

Cho et al. An intense form of homeostatic proliferation of naive CD8+ cells driven by IL-2. *J Exp Med* (2007) vol. 204 (8) pp. 1787-801

Cho et al. Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) vol. 96 (6) pp. 2976-81

Christensen et al. Role of CD28 co-stimulation in generation and maintenance of virus-specific T cells. *International Immunology* (2002) vol. 14 (7) pp. 701-11

Chtanova et al. Gene microarrays reveal extensive differential gene expression in both CD4(+) and CD8(+) type 1 and type 2 T cells. *J Immunol* (2001) vol. 167 (6) pp. 3057-63

Clarke et al. Interaction of interleukin 7 (IL-7) with glycosaminoglycans and its biological relevance. *Cytokine* (1995) vol. 7 (4) pp. 325-30

Conticello et al. IL-4 protects tumor cells from anti-CD95 and chemotherapeutic agents via up-regulation of antiapoptotic proteins. *J Immunol* (2004) vol. 172 (9) pp. 5467-77

Creusot et al. A short pulse of IL-4 delivered by DCs electroporated with modified mRNA can both prevent and treat autoimmune diabetes in NOD mice. *Mol Ther* (2010) vol. 18 (12) pp. 2112-20

Crotty et al. Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat Immunol* (2010) vol. 11 (2) pp. 114-20

Crozat et al. The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 + dendritic cells. *J Exp Med* (2010) vol. 207 (6) pp. 1283-1292

Cui et al. Effects of Signal 3 during CD8 T cell priming: Bystander production of IL-12 enhances effector T cell expansion but promotes terminal differentiation. *Vaccine* (2009) vol. 27 (15) pp. 2177-87

Curtsinger et al. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol* (2005) vol. 174 (8) pp. 4465-9

D

D'Souza and Lefrançois. IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *J Immunol* (2003) vol. 171 (11) pp. 5727-35

Darrah et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med* (2007) vol. 13 (7) pp. 843-50

Day et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* (2006) vol. 443 (7109) pp. 350-4

De Vita et al. Local cytokine expression in the progression toward B cell malignancy in Sjögren's syndrome. *J*

Rheumatol (1995) vol. 22 (9) pp. 1674-80

Decaluwe et al. Gamma(c) deficiency precludes CD8+ T cell memory despite formation of potent T cell effectors. *Proc Natl Acad Sci USA* (2010) vol. 107 (20) pp. 9311-6

Diefenbach et al. Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol* (2002) vol. 3 (12) pp. 1142-9

Diefenbach et al. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* (2001) vol. 413 (6852) pp. 165-71

Diefenbach et al. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* (2000) vol. 1 (2) pp. 119-26

Dorner et al. Selective Expression of the Chemokine Receptor XCR1 on Cross-presenting Dendritic Cells Determines Cooperation with CD8+ T Cells. *Immunity* (2009) vol. 31 (5) pp. 823-833

Dorner et al. Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells. *Immunity* (2009) vol. 31 (5) pp. 823-33

Dorner et al. MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) vol. 99 (9) pp. 6181-6

Dorner et al. Purification, structural analysis, and function of natural ATAC, a cytokine secreted by CD8(+) T cells. *J Biol Chem* (1997) vol. 272 (13) pp. 8817-23

Dubois et al. Preassociation of IL-15 with IL-15R alpha-IgG1-Fc enhances its activity on proliferation of NK and CD8+/CD44high T cells and its antitumor action. *J Immunol* (2008) vol. 180 (4) pp. 2099-106

Dubois et al. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. *Immunity* (2002) vol. 17 (5) pp. 537-47

E

Edele et al. Cutting edge: instructive role of peripheral tissue cells in the imprinting of T cell homing receptor patterns. *J Immunol* (2008) vol. 181 (6) pp. 3745-9

Elsaesser et al. IL-21 Is Required to Control Chronic Viral Infection. *Science* (2009) vol. 324 (5934) pp. 1569-1572

Elsaesser et al. IL-21 Is Required to Control Chronic Viral Infection. *Science* (2009) vol. 324 (5934) pp. 1569-1572

F

Fang et al. Complement-dependent enhancement of CD8+ T cell immunity to lymphocytic choriomeningitis virus infection in decay-accelerating factor-deficient mice. *J Immunol* (2007) vol. 179 (5) pp. 3178-86

Fehniger et al. Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells. *J Exp Med* (2001) vol. 193 (2) pp. 219-31

Finkelman et al. Anti-cytokine antibodies as carrier proteins. Prolongation of in vivo effects of exogenous cytokines by injection of cytokine-anti-cytokine antibody complexes. *J Immunol* (1993) vol. 151 (3) pp. 1235-44

Fischer et al. BH3-only protein Puma contributes to death of antigen-specific T cells during shutdown of an immune response to acute viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) vol. 105 (8) pp. 3035-40

Froelich et al. New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J Biol Chem* (1996) vol. 271 (46) pp. 29073-9

Fröhlich et al. IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. *Science* (2009) vol. 324 (5934) pp. 1576-80

Fry et al. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood* (2001) vol. 97 (10) pp. 2983-90

Fujii et al. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J Exp Med* (2004) vol. 199 (12) pp. 1607-18

Fukuyama et al. Histone acetyltransferase CBP is vital to demarcate conventional and innate CD8+ T-cell development. *Molecular and Cellular Biology* (2009) vol. 29 (14) pp. 3894-904

Fuse et al. CD80 and CD86 control antiviral CD8+ T-cell function and immune surveillance of murine gammaherpesvirus 68. *J Virol* (2006) vol. 80 (18) pp. 9159-70

G

Gasser et al. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* (2005) vol. 436 (7054) pp. 1186-90

Gattinoni et al. Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and

generates CD8+ memory stem cells. *Nat Med* (2009) vol. 15 (7) pp. 808-13

Gessner et al. Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *J Immunol* (2005) vol. 174 (2) pp. 1063-72

Giancarlo et al. Migratory response of human natural killer cells to lymphotactin. *Eur J Immunol* (1996) vol. 26 (12) pp. 3238-41

Gilles et al. Tumor necrosis factor alpha negatively regulates hepatitis B virus gene expression in transgenic mice. *J Virol* (1992) vol. 66 (6) pp. 3955-60

Giri et al. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J* (1994) vol. 13 (12) pp. 2822-30

Götherström et al. Fetal and adult multipotent mesenchymal stromal cells are killed by different pathways. *Cytotherapy* (2011) vol. 13 (3) pp. 269-78

Grakoui et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* (1999) vol. 285 (5425) pp. 221-7

Groh et al. Costimulation of CD8 α beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-

infected cells. *Nat Immunol* (2001) vol. 2 (3) pp. 255-60

Guerra et al. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* (2008) vol. 28 (4) pp. 571-80

H

Hamilton et al. The generation of protective memory-like CD8+ T cells during homeostatic proliferation requires CD4+ T cells. *Nat Immunol* (2006) vol. 7 (5) pp. 475-81

Hand et al. 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 USA* (2007) vol. 104 (28) pp. 11730-5

Haring et al. Constitutive expression of IL-7 receptor alpha does not support increased expansion or prevent contraction of antigen-specific CD4 or CD8 T cells following *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* (2008) vol. 180 (5) pp. 2855-62

Hashiguchi et al. Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) vol. 105 (30) pp. 10495-500

Heffner and Fearon. Loss of T cell receptor-induced Bmi-1 in the KLRG1(+)

senescent CD8(+) T lymphocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* (2007) vol. 104 (33) pp. 13414-9

Hendriks et al. CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J Exp Med* (2003) vol. 198 (9) pp. 1369-80

Hendriks et al. CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol* (2000) vol. 1 (5) pp. 433-40

Henson et al. KLRG1 signaling induces defective Akt (ser473) phosphorylation and proliferative dysfunction of highly differentiated CD8+ T cells. *Blood* (2009) vol. 113 (26) pp. 6619-28

Hernández et al. Uncoupling of proliferative potential and gain of effector function by CD8(+) T cells responding to self-antigens. *J Exp Med* (2002) vol. 196 (3) pp. 323-33

Hessmann et al. DAP10 contributes to CD8(+) T cell-mediated cytotoxic effector mechanisms during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunobiology* (2011) vol. 216 (5) pp. 639-47

Hikono et al. Activation phenotype, rather than central- or effector-memory phenotype, predicts the recall efficacy of memory CD8+ T cells. *J Exp Med* (2007) vol. 204 (7) pp. 1625-36

Hikono et al. T-cell memory and recall responses to respiratory virus infections. *Immunol Rev* (2006) vol. 211 pp. 119-32

Hinrichs et al. IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8+ T cells for adoptive immunotherapy. *Blood* (2008) vol. 111 (11) pp. 5326-5333

Hinrichs et al. IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8+ T cells for adoptive immunotherapy. *Blood* (2008) vol. 111 (11) pp. 5326-33

Hirata et al. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is a physiological ligand for E-selectin in mediating T helper 1 lymphocyte migration. *J Exp Med* (2000) vol. 192 (11) pp. 1669-76

Howell et al. Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. *Immunity* (2006) vol. 24 (3) pp. 341-8

Hurlstone and Clevers. T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J* (2002) vol. 21 (10) pp. 2303-11

Huster 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 USA* (2004) vol. 101 (15) pp. 5610-5

I

Ichii et al. Bcl6 is essential for the generation of long-term memory CD4+ T cells. *International Immunology* (2007) vol. 19 (4) pp. 427-33

Ichii et al. Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8+ T cells. *J Immunol* (2004) vol. 173 (2) pp. 883-91

Ichii et al. Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* (2002) vol. 3 (6) pp. 558-63

Iezzi et al. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* (1998) vol. 8 (1) pp. 89-95

Inaoki et al. The frequency of type 2 CD8+ T cells is increased in peripheral blood from patients with psoriasis vulgaris. *J Clin Immunol* (2003) vol. 23 (4) pp. 269-78

Intlekofer et al. Anomalous Type 17 Response to Viral Infection by CD8+ T Cells Lacking T-bet and Eomesodermin. *Science* (2008) vol. 321 (5887) pp. 408-411

Intlekofer et al. Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8+ T cells. *J Exp Med* (2007) vol. 204 (9) pp. 2015-21

Intlekofer et al. Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol* (2005) vol. 6 (12) pp. 1236-44

Iyoda et al. The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med* (2002) vol. 195 (10) pp. 1289-302

J

Jabbari and Harty. Secondary memory CD8+ T cells are more protective but slower to acquire a central-memory phenotype. *J Exp Med* (2006) vol. 203 (4) pp. 919-32

Jackson et al. Expression of mouse interleukin-4 by a recombinant ectromelia virus suppresses cytolytic lymphocyte responses and overcomes genetic resistance to mousepox. *J Virol* (2001) vol. 75 (3) pp. 1205-10

Jacob and Baltimore. Modelling T-cell memory by genetic marking of memory T cells in vivo. *Nature* (1999) vol. 399 (6736) pp. 593-7

Janssen et al. CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* (2005) vol. 434 (7029) pp. 88-93

Janssen et al. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in

CD8+ T lymphocytes. *Nature* (2003) vol. 421 (6925) pp. 852-6

Jeannot et al. Essential role of the Wnt pathway effector Tcf-1 for the establishment of functional CD8 T cell memory. *Proc Natl Acad Sci USA* (2010) vol. 107 (21) pp. 9777-82

Jessen et al. Subtle differences in CTL cytotoxicity determine susceptibility to hemophagocytic lymphohistiocytosis in mice and humans with Chediak-Higashi syndrome. *Blood* (2011) pp.

Jiang et al. Qualitative and quantitative characteristics of rotavirus-specific CD8 T cells vary depending on the route of infection. *J Virol* (2008) vol. 82 (14) pp. 6812-9

Jiang et al. Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. *Immunity* (2007) vol. 27 (4) pp. 610-24

Jin and Malek. Redundant and unique regulation of activated mouse B lymphocytes by IL-4 and IL-21. *Journal of Leukocyte Biology* (2006) vol. 80 (6) pp. 1416-23

Johnston et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* (2009) vol. 325 (5943) pp. 1006-10

Jones and Ziltener. Enhancement of the biologic effects of interleukin-3 in vivo by anti-interleukin-3 antibodies. *Blood* (1993) vol. 82 (4) pp. 1133-41

Joshi and Kaech. Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation. *J Immunol* (2008) vol. 180 (3) pp. 1309-15

Joshi et al. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* (2007) vol. 27 (2) pp. 281-95

Judge et al. Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *J Exp Med* (2002) vol. 196 (7) pp. 935-46

Jung et al. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* (2002) vol. 17 (2) pp. 211-20

K

Kaech and Wherry. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. *Immunity* (2007) vol. 27 (3) pp. 393-405

Kaech et al. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived

memory cells. *Nat Immunol* (2003) vol. 4 (12) pp. 1191-8

Kalia et al. Prolonged interleukin-2Ralpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* (2010) vol. 32 (1) pp. 91-103

Kallies et al. Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses. *Immunity* (2009) vol. 31 (2) pp. 283-95

Kallies et al. Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. *Nat Immunol* (2006) vol. 7 (5) pp. 466-74

Kamal and El Sayed Khalifa. Immune modulation by helminthic infections: worms and viral infections. *Parasite Immunol* (2006) vol. 28 (10) pp. 483-96

Kamimura and Bevan. Naive CD8+ T cells differentiate into protective memory-like cells after IL-2 anti IL-2 complex treatment in vivo. *J Exp Med* (2007) vol. 204 (8) pp. 1803-12

Kedzierska et al. Location rather than CD62L phenotype is critical in the early establishment of influenza-specific CD8+ T cell memory. *Proc Natl Acad Sci USA* (2007) vol. 104 (23) pp. 9782-7

Kedzierska et al. Quantification of repertoire diversity of influenza-specific

epitopes with predominant public or private TCR usage. *J Immunol* (2006) vol. 177 (10) pp. 6705-12

Keefe et al. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* (2005) vol. 23 (3) pp. 249-62

Keegan et al. An IL-4 receptor region containing an insulin receptor motif is important for IL-4-mediated IRS-1 phosphorylation and cell growth. *Cell* (1994) vol. 76 (5) pp. 811-20

Keller et al. Expression of Costimulatory Ligand CD70 on Steady-State Dendritic Cells Breaks CD8+ T Cell Tolerance and Permits Effective Immunity. *Immunity* (2008) vol. 29 (6) pp. 934-946

Kemp et al. The phenotype of type 1 and type 2 CD8+ T cells activated in vitro is affected by culture conditions and correlates with effector activity. *Immunology* (2005) vol. 115 (3) pp. 315-24

Kemp and Ronchese. Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity. *J Immunol* (2001) vol. 167 (11) pp. 6497-502

Kennedy et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* (2000) vol. 191 (5) pp. 771-80

Kersh et al. Rapid demethylation of the IFN-gamma gene occurs in memory but not naive CD8 T cells. *J Immunol* (2006) vol. 176 (7) pp. 4083-93

Kieper et al. Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8+ T cells. *J Exp Med* (2002) vol. 195 (12) pp. 1533-9

Kimura et al. Sharing of the IL-2 receptor gamma chain with the functional IL-9 receptor complex. *International Immunology* (1995) vol. 7 (1) pp. 115-20

King and Mohrs. IL-4-producing CD4+ T cells in reactive lymph nodes during helminth infection are T follicular helper cells. *J Exp Med* (2009) vol. 206 (5) pp. 1001-7

Kohonen-Corish et al. Immunodeficient mice recover from infection with vaccinia virus expressing interferon-gamma. *Eur J Immunol* (1990) vol. 20 (1) pp. 157-61

Kolls and Khader. The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* (2010) vol. 21 (6) pp. 443-8

Kolumam 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) vol. 202 (5) pp. 637-50

Kondo et al. Functional participation of the IL-2 receptor gamma chain in IL-7 receptor complexes. *Science* (1994) vol. 263 (5152) pp. 1453-4

Kondo et al. Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science* (1993) vol. 262 (5141) pp. 1874-7

Konforte et al. IL-21: an executor of B cell fate. *J Immunol* (2009) vol. 182 (4) pp. 1781-7

Kündig et al. Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity* (1996) vol. 5 (1) pp. 41-52

Kunkel et al. Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med* (2000) vol. 192 (5) pp. 761-8

L

Labrecque et al. How much TCR does a T cell need?. *Immunity* (2001) vol. 15 (1) pp. 71-82

Lanzavecchia and Sallusto. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat Immunol* (2001) vol. 2 (6) pp. 487-92

Larue et al. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* (1994) vol. 91 (17) pp. 8263-7

Lefrançois et al. The role of beta7 integrins in CD8 T cell trafficking during an antiviral immune response. *J Exp Med* (1999) vol. 189 (10) pp. 1631-8

Létourneau et al. IL-2/anti-IL-2 antibody complexes show strong biological activity by avoiding interaction with IL-2 receptor alpha subunit CD25. *Proc Natl Acad Sci USA* (2010) vol. 107 (5) pp. 2171-6

Lieberman et al. Dressed to kill? A review of why antiviral CD8 T lymphocytes fail to prevent progressive immunodeficiency in HIV-1 infection. *Blood* (2001) vol. 98 (6) pp. 1667-77

Link et al. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol* (2007) vol. 8 (11) pp. 1255-65

Lotfi et al. Eosinophilic granulocytes and damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs): role in the inflammatory response within tumors. *J Immunother* (2007) vol. 30 (1) pp. 16-28

M

MacDonald et al. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* (2009) vol. 17 (1) pp. 9-26

MacLeod et al. CD4 memory T cells divide poorly in response to antigen because of their cytokine profile. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) vol. 105 (38) pp. 14521-6

Maggi et al. Th2-like CD8+ T cells showing B cell helper function and reduced cytolytic activity in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Exp Med* (1994) vol. 180 (2) pp. 489-95

Manders et al. BCL6b mediates the enhanced magnitude of the secondary response of memory CD8+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* (2005) vol. 102 (21) pp. 7418-25

Mao et al. Eomesodermin, a target gene of Pou4f2, is required for retinal ganglion cell and optic nerve development in the mouse. *Development* (2008) vol. 135 (2) pp. 271-80

Marcais et al. Cell-autonomous CCL5 transcription by memory CD8 T cells is regulated by IL-4. *J Immunol* (2006) vol. 177 (7) pp. 4451-7

Marcais 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) vol. 36 (10) pp. 2745-54

Martins and Calame. Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* (2008) vol. 26 pp. 133-69

Martins et al. Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function. *Nat Immunol* (2006) vol. 7 (5) pp. 457-65

Masopust et al. Stimulation history dictates memory CD8 T cell phenotype: implications for prime-boost vaccination. *J Immunol* (2006) vol. 177 (2) pp. 831-9

Masopust et al. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* (2001) vol. 291 (5512) pp. 2413-7

Matter et al. Virus-induced polyclonal B cell activation improves protective CTL memory via retained CD27 expression on memory CTL. *Eur J Immunol* (2005) vol. 35 (11) pp. 3229-39

Mbitikon-Kobo et al. Characterization of a CD44/CD122int memory CD8 T cell subset generated under sterile inflammatory conditions. *J Immunol* (2009) vol. 182 (6) pp. 3846-54

McAdam et al. B7 costimulation is critical for antibody class switching and CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte

generation in the host response to vesicular stomatitis virus. *J Virol* (2000) vol. 74 (1) pp. 203-8

Medzhitov et al. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* (1997) vol. 388 (6640) pp. 394-7

Meresse et al. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* (2004) vol. 21 (3) pp. 357-66

Mescher et al. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev* (2006) vol. 211 pp. 81-92

Miller et al. Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) vol. 100 (5) pp. 2604-9

Miller et al. CD94/NKG2 expression does not inhibit cytotoxic function of lymphocytic choriomeningitis virus-specific CD8+ T cells. *J Immunol* (2002) vol. 169 (2) pp. 693-701

Miller et al. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* (2002) vol. 296 (5574) pp. 1869-73

Min et al. MHC class II-restricted interaction between thymocytes plays an essential role in the production of innate CD8+ T cells. *J Immunol* (2011) vol. 186 (10) pp. 5749-57

Minshall et al. IL-4 and insulin-like growth factor-I inhibit the decline in Bcl-2 and promote the survival of IL-3-deprived myeloid progenitors. *J Immunol* (1997) vol. 159 (3) pp. 1225-32

Mintern et al. Cutting edge: Tissue-resident memory CTL down-regulate cytolytic molecule expression following virus clearance. *J Immunol* (2007) vol. 179 (11) pp. 7220-4

Mittrücker et al. Role of CD28 for the generation and expansion of antigen-specific CD8(+) T lymphocytes during infection with *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* (2001) vol. 167 (10) pp. 5620-7

Mohrs et al. Analysis of type 2 immunity in vivo with a bicistronic IL-4 reporter. *Immunity* (2001) vol. 15 (2) pp. 303-11

Molon et al. T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* (2005) vol. 6 (5) pp. 465-71

Mora et al. Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues. *J Exp Med* (2005) vol. 201 (2) pp. 303-16

Moroz et al. IL-21 enhances and sustains CD8+ T cell responses to achieve durable tumor immunity: comparative evaluation of IL-2, IL-15, and IL-21. *J Immunol* (2004) vol. 173 (2) pp. 900-9

Morris et al. Endogenously produced IL-4 nonredundantly stimulates CD8+ T cell proliferation. *J Immunol* (2009) vol. 182 (3) pp. 1429-38

Morrot et al. IL-4 receptor expression on CD8+ T cells is required for the development of protective memory responses against liver stages of malaria parasites. *J Exp Med* (2005) vol. 202 (4) pp. 551-60

Moser et al. CD94-NKG2A receptors regulate antiviral CD8(+) T cell responses. *Nat Immunol* (2002) vol. 3 (2) pp. 189-95

Mosmann et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* (1986) vol. 136 (7) pp. 2348-57

Motyka 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) vol. 103 (3) pp. 491-500

Mousavi et al. OX40 costimulatory signals potentiate the memory commitment of effector CD8+ T cells. *J*

Immunol (2008) vol. 181 (9) pp. 5990-6001

Moutaftsi et al. Correlates of protection efficacy induced by vaccinia virus-specific CD8+ T-cell epitopes in the murine intranasal challenge model. *Eur J Immunol* (2009) vol. 39 (3) pp. 717-22

Mueller et al. Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* (1996) vol. 184 (3) pp. 1093-9

Müller et al. Cloning of ATAC, an activation-induced, chemokine-related molecule exclusively expressed in CD8+ T lymphocytes. *Eur J Immunol* (1995) vol. 25 (6) pp. 1744-8

Murali-Krishna et al. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* (1999) vol. 286 (5443) pp. 1377-81

N

Narni-Mancinelli et al. Memory CD8+ T cells mediate antibacterial immunity via CCL3 activation of TNF/ROI+ phagocytes. *J Exp Med* (2007) vol. 204 (9) pp. 2075-87

Nguyen and Weng. IL-21 preferentially enhances IL-15-mediated homeostatic proliferation of human CD28+ CD8 memory T cells throughout the adult age

span. *Journal of Leukocyte Biology* (2010) vol. 87 (1) pp. 43-9

Nguyen 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) vol. 30 (2) pp. 683-8

Noble et al. IFN-gamma and IL-4 regulate the growth and differentiation of CD8+ T cells into subpopulations with distinct cytokine profiles. *J Immunol* (1995) vol. 155 (6) pp. 2928-37

Noelle and Nowak. Cellular sources and immune functions of interleukin-9. *Nat Rev Immunol* (2010) vol. 10 (10) pp. 683-687

Noguchi et al. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* (1993) vol. 262 (5141) pp. 1877-80

Nomura et al. Genomic structures and characterization of Rae1 family members encoding GPI-anchored cell surface proteins and expressed predominantly in embryonic mouse brain. *J Biochem* (1996) vol. 120 (5) pp. 987-95

Northrop et al. Cutting edge: chromatin remodeling as a molecular basis for the enhanced functionality of memory CD8 T cells. *J Immunol* (2008) vol. 181 (2) pp. 865-8

Nurieva et al. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* (2009) vol. 325 (5943) pp. 1001-5

Nussbaum and Whitton. The contraction phase of virus-specific CD8+ T cells is unaffected by a pan-caspase inhibitor. *J Immunol* (2004) vol. 173 (11) pp. 6611-8

O

Obar et al. CD4+ T cell regulation of CD25 expression controls development of short-lived effector CD8+ T cells in primary and secondary responses. *Proc Natl Acad Sci USA* (2010) vol. 107 (1) pp. 193-8

Ochi et al. Tc1/Tc2 and Th1/Th2 balance in Asian and Western types of multiple sclerosis, HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and hyperIgEaemic myelitis. *Journal of Neuroimmunology* (2001) vol. 119 (2) pp. 297-305

Ogasawara et al. NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunity* (2004) vol. 20 (6) pp. 757-67

Oh et al. IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) vol. 105 (13) pp. 5201-6

Oh et al. IL-15/IL-15Ralpha-mediated avidity maturation of memory CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004) vol. 101 (42) pp. 15154-9

Oh et al. Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) vol. 100 (6) pp. 3392-7

Olver et al. Tumor-derived interleukin-4 reduces tumor clearance and deviates the cytokine and granzyme profile of tumor-induced CD8+ T cells. *Cancer Res* (2006) vol. 66 (1) pp. 571-80

Osborne et al. Impaired CD8 T cell memory and CD4 T cell primary responses in IL-7R alpha mutant mice. *J Exp Med* (2007) vol. 204 (3) pp. 619-31

Ostermann et al. JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol* (2002) vol. 3 (2) pp. 151-8

P

Pandey et al. Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin. *Nat Immunol* (2000) vol. 1 (1) pp. 59-64

Park et al. Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel

mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity* (2004) vol. 21 (2) pp. 289-302

Parry et al. Hypercross-linking surface IgM or IgD receptors on mature B cells induces apoptosis that is reversed by costimulation with IL-4 and anti-CD40. *J Immunol* (1994) vol. 152 (6) pp. 2821-9

Pavić et al. Participation of endogenous tumour necrosis factor alpha in host resistance to cytomegalovirus infection. *J Gen Virol* (1993) vol. 74 (Pt 10) pp. 2215-23

Pearce et al. Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature* (2009) vol. 460 (7251) pp. 103-7

Pearce and Shen. Generation of CD8 T cell memory is regulated by IL-12. *J Immunol* (2007) vol. 179 (4) pp. 2074-81

Pearce et al. Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* (2003) vol. 302 (5647) pp. 1041-3

Pedroza-Gonzalez et al. Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast tumor growth by promoting type 2 inflammation. *J Exp Med* (2011) vol. 208 (3) pp. 479-490

Pedroza-Gonzalez et al. Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast

tumor growth by promoting type 2 inflammation. *J Exp Med* (2011) vol. 208 (3) pp. 479-90

Pellegrini 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 USA* (2003) vol. 100 (24) pp. 14175-80

Perona-Wright et al. Sustained signaling by canonical helper T cell cytokines throughout the reactive lymph node. *Nature Publishing Group* (2010) vol. 11 (6) pp. 520-526

Pham et al. A Default Pathway of Memory CD8 T Cell Differentiation after Dendritic Cell Immunization Is Deflected by Encounter with Inflammatory Cytokines during Antigen-Driven Proliferation. *J Immunol* (2009) vol. 183 (4) pp. 2337-2348

Pham et al. A default pathway of memory CD8 T cell differentiation after dendritic cell immunization is deflected by encounter with inflammatory cytokines during antigen-driven proliferation. *J Immunol* (2009) vol. 183 (4) pp. 2337-48

Pihlgren et al. Memory CD44(int) CD8 T cells show increased proliferative responses and IFN-gamma production following antigenic challenge in vitro. *International Immunology* (1999) vol. 11 (5) pp. 699-706

Pipkin et al. Interleukin-2 and Inflammation Induce Distinct Transcriptional Programs that Promote the Differentiation of Effector Cytolytic T Cells. *Immunity* (2010) vol. 32 (1) pp. 79-90

Plunkett et al. The loss of telomerase activity in highly differentiated CD8+CD28-CD27- T cells is associated with decreased Akt (Ser473) phosphorylation. *J Immunol* (2007) vol. 178 (12) pp. 7710-9

Podack et al. Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc Natl Acad Sci USA* (1985) vol. 82 (24) pp. 8629-33

Poltorak et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* (1998) vol. 282 (5396) pp. 2085-8

Potian et al. Preexisting helminth infection induces inhibition of innate pulmonary anti-tuberculosis defense by engaging the IL-4 receptor pathway. *J Exp Med* (2011) pp. 1-12

Precopio et al. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *J Exp Med* (2007) vol. 204 (6) pp. 1405-16

Prlic and Bevan. Exploring regulatory mechanisms of CD8+ T cell contraction. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) vol. 105 (43) pp. 16689-94

Prlic et al. Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8+ T cell response. *J Exp Med* (2006) vol. 203 (9) pp. 2135-43

Q

Qin et al. Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression of the bcl-2 and c-myc genes in cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood* (2001) vol. 98 (9) pp. 2778-83

R

Rabinovich et al. NKG2D splice variants: a reexamination of adaptor molecule associations. *Immunogenetics* (2006) vol. 58 (2-3) pp. 81-8

Rathmell et al. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J Immunol* (2001) vol. 167 (12) pp. 6869-76

Rausch et al. Interleukin-15 mediates protection against experimental tuberculosis: a role for NKG2D-dependent effector mechanisms of CD8+ T cells. *Eur J Immunol* (2006) vol. 36 (5) pp. 1156-67

Ravkov et al. Immediate early effector functions of virus-specific CD8+CCR7+ memory cells in humans defined by HLA

and CC chemokine ligand 19 tetramers. *J Immunol* (2003) vol. 170 (5) pp. 2461-8

Reinhardt et al. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol* (2009) vol. 10 (4) pp. 385-393

Reiss et al. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med* (2001) vol. 194 (10) pp. 1541-7

Reya and Clevers. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* (2005) vol. 434 (7035) pp. 843-50

Riedl et al. Ligation of E-cadherin on in vitro-generated immature Langerhans-type dendritic cells inhibits their maturation. *Blood* (2000) vol. 96 (13) pp. 4276-84

Roberts et al. Differential contributions of central and effector memory T cells to recall responses. *J Exp Med* (2005) vol. 202 (1) pp. 123-33

Rochford et al. Differential effects of CD28 costimulation upon cytokine production by CD4+ and CD8+ T cells. *Immunobiology* (2004) vol. 209 (7) pp. 513-22

Rochman and Leonard. The role of thymic stromal lymphopoietin in CD8+ T

cell homeostasis. *J Immunol* (2008) vol. 181 (11) pp. 7699-705

Rolph and Ramshaw. Interleukin-4-mediated downregulation of cytotoxic T lymphocyte activity is associated with reduced proliferation of antigen-specific CD8+ T cells. *Microbes Infect* (2003) vol. 5 (11) pp. 923-32

Rosenthal et al. IL-2 and IL-7 induce heterodimerization of STAT5 isoforms in human peripheral blood T lymphoblasts. *Cell Immunol* (1997) vol. 181 (2) pp. 172-81

Rosette et al. The impact of duration versus extent of TCR occupancy on T cell activation: a revision of the kinetic proofreading model. *Immunity* (2001) vol. 15 (1) pp. 59-70

Rubinstein et al. IL-7 and IL-15 differentially regulate CD8+ T-cell subsets during contraction of the immune response. *Blood* (2008) vol. 112 (9) pp. 3704-12

Russell et al. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* (1993) vol. 262 (5141) pp. 1880-3

Rutishauser and Kaech. Generating diversity: transcriptional regulation of effector and memory CD8 T-cell differentiation. *Immunol Rev* (2010) vol. 235 (1) pp. 219-33

Rutishauser et al. Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity* (2009) vol. 31 (2) pp. 296-308

S

Saito et al. Effective collaboration between IL-4 and IL-21 on B cell activation. *Immunobiology* (2008) vol. 213 (7) pp. 545-55

Sallusto et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* (1999) vol. 401 (6754) pp. 708-12

Sambhi et al. Local production of tumor necrosis factor encoded by recombinant vaccinia virus is effective in controlling viral replication in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991) vol. 88 (9) pp. 4025-9

Sandau et al. IL-15 is required for sustained lymphopenia-driven proliferation and accumulation of CD8 T cells. *J Immunol* (2007) vol. 179 (1) pp. 120-5

Sandau et al. Cutting edge: transpresentation of IL-15 by bone marrow-derived cells necessitates expression of IL-15 and IL-15R alpha by the same cells. *J Immunol* (2004) vol. 173 (11) pp. 6537-41

Sanders et al. Human memory T lymphocytes express increased levels of three cell adhesion molecules (LFA-3, CD2, and LFA-1) and three other molecules (UCHL1, CDw29, and Pgp-1) and have enhanced IFN-gamma production. *J Immunol* (1988) vol. 140 (5) pp. 1401-7

Sarkar et al. Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J Exp Med* (2008) vol. 205 (3) pp. 625-40

Sarkar et al. Strength of stimulus and clonal competition impact the rate of memory CD8 T cell differentiation. *J Immunol* (2007) vol. 179 (10) pp. 6704-14

Sauer et al. Functional size of complement and perforin pores compared by confocal laser scanning microscopy and fluorescence microphotolysis. *Biochim Biophys Acta* (1991) vol. 1063 (1) pp. 137-46

Scaffidi et al. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* (2002) vol. 418 (6894) pp. 191-5

Schluns et al. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* (2000) vol. 1 (5) pp. 426-32

Seddon and Zamoyska. TCR signals mediated by Src family kinases are essential for the survival of naive T cells.

J Immunol (2002) vol. 169 (6) pp. 2997-3005

Seder et al. CD8+ T cells can be primed in vitro to produce IL-4. *J Immunol* (1992) vol. 148 (6) pp. 1652-6

Shahinian et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* (1993) vol. 261 (5121) pp. 609-12

Shimizu et al. Regulated expression and binding of three VLA (beta 1) integrin receptors on T cells. *Nature* (1990) vol. 345 (6272) pp. 250-3

Shin and Wherry. CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Current Opinion in Immunology* (2007) vol. 19 (4) pp. 408-15

Shin et al. Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *J Exp Med* (2007) vol. 204 (4) pp. 941-9

Siddiqui et al. E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis. *Immunity* (2010) vol. 32 (4) pp. 557-67

Sintes et al. Mouse CD84 is a pan-leukocyte cell-surface molecule that modulates LPS-induced cytokine secretion by macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* (2010) vol. 88 (4) pp. 687-97

Slavin et al. A new role for the Kruppel-like transcription factor KLF6 as an inhibitor of c-Jun proto-oncoprotein function. *Oncogene* (2004) vol. 23 (50) pp. 8196-205

Søndergaard et al. Endogenous IL-21 restricts CD8+ T cell expansion and is not required for tumor immunity. *J Immunol* (2009) vol. 183 (11) pp. 7326-36

Spendlove and Sutavani. The role of CD97 in regulating adaptive T-cell responses. *Adv Exp Med Biol* (2010) vol. 706 pp. 138-48

Stetson et al. Constitutive Cytokine mRNAs Mark Natural Killer (NK) and NK T Cells Poised for Rapid Effector Function. *J Exp Med* (2003) vol. 198 (7) pp. 1069-1076

Stoklasek et al. Combined IL-15/IL-15Ralpha immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo. *J Immunol* (2006) vol. 177 (9) pp. 6072-80

Strasser et al. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* (2009) vol. 30 (2) pp. 180-92

Strasser and Pellegrini. T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends in Immunology* (2004) vol. 25 (11) pp. 610-5

Stutman. Postthymic T-cell development. *Immunol Rev* (1986) vol. 91 pp. 159-94

Sullivan et al. Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) vol. 100 (26) pp. 15818-23

Sun et al. CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nat Immunol* (2004) vol. 5 (9) pp. 927-33

Suresh et al. Role of CD28-B7 interactions in generation and maintenance of CD8 T cell memory. *J Immunol* (2001) vol. 167 (10) pp. 5565-73

Surh and Sprent. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* (2008) vol. 29 (6) pp. 848-62

Sutton et al. Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. *Immunity* (2003) vol. 18 (3) pp. 319-29

Sutton et al. Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J Exp Med* (2000) vol. 192 (10) pp. 1403-14

T

Takeichi. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* (1991) vol. 251 (5000) pp. 1451-5

Takemoto et al. Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8+ T cell differentiation. *J Immunol* (2006) vol. 177 (11) pp. 7515-9

Takeshita et al. Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor. *Science* (1992) vol. 257 (5068) pp. 379-82

Tan 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) vol. 195 (12) pp. 1523-32

Tan et al. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) vol. 98 (15) pp. 8732-7

Tan 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) vol. 163 (9) pp. 4859-68

Tanchot et al. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naïve or memory T cells. *Science* (1997) vol. 276 (5321) pp. 2057-62

Tivol et al. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* (1995) vol. 3 (5) pp. 541-7

Trapani et al. A clathrin/dynamin- and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death. *J Cell Biol* (2003) vol. 160 (2) pp. 223-33

Tsatsanis et al. Tpl2 and ERK transduce antiproliferative T cell receptor signals and inhibit transformation of chronically stimulated T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) vol. 105 (8) pp. 2987-92

Tunayaplin et al. Direct repression of prdm1 by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J Immunol* (2004) vol. 173 (2) pp. 1158-65

Tzachanis et al. Tob is a negative regulator of activation that is expressed in anergic and quiescent T cells. *Nat Immunol* (2001) vol. 2 (12) pp. 1174-82

U

Ueda et al. CD1d-restricted NKT cell activation enhanced homeostatic proliferation of CD8+ T cells in a manner dependent on IL-4. *International Immunology* (2006) vol. 18 (9) pp. 1397-404

V

- Valk et al. T cell receptor-interacting molecule acts as a chaperone to modulate surface expression of the CTLA-4 coreceptor. *Immunity* (2006) vol. 25 (5) pp. 807-21
- van de Wetering et al. WNT signaling and lymphocyte development. *Cell* (2002) vol. 109 Suppl pp. S13-9
- van der Merwe et al. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med* (1997) vol. 185 (3) pp. 393-403
- van Gisbergen et al. Protective CD8 T cell memory is impaired during chronic CD70-driven costimulation. *J Immunol* (2009) vol. 182 (9) pp. 5352-62
- Vance et al. Recognition of the class Ib molecule Qa-1(b) by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells. *J Exp Med* (1999) vol. 190 (12) pp. 1801-12
- Veiga-Fernandes and Rocha. High expression of active CDK6 in the cytoplasm of CD8 memory cells favors rapid division. *Nat Immunol* (2004) vol. 5 (1) pp. 31-7
- Veiga-Fernandes et al. Response of naïve and memory CD8⁺ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat Immunol* (2000) vol. 1 (1) pp. 47-53
- Vella et al. Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) vol. 95 (7) pp. 3810-5
- Vella et al. Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: stat6 is probably not required for the effect of IL-4. *J Exp Med* (1997) vol. 186 (2) pp. 325-30
- Verykokakis et al. SAP Protein-Dependent Natural Killer T-like Cells Regulate the Development of CD8⁺ T Cells with Innate Lymphocyte Characteristics. *Immunity* (2010) pp. 1-13
- Vignali et al. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* (2008) vol. 8 (7) pp. 523-32
- Villacres and Bergmann. Enhanced cytotoxic T cell activity in IL-4-deficient mice. *J Immunol* (1999) vol. 162 (5) pp. 2663-70
- Viola and Lanzavecchia. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* (1996) vol. 273 (5271) pp. 104-6

von Freeden-Jeffry et al. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* (1995) vol. 181 (4) pp. 1519-26

W

Wallace et al. Prolonged exposure of naïve CD8+ T cells to interleukin-7 or interleukin-15 stimulates proliferation without differentiation or loss of telomere length. *Immunology* (2006) vol. 119 (2) pp. 243-53

Walsh et al. NKG2D Receptor Signaling Enhances Cytolytic Activity by Virus-Specific CD8+ T Cells: Evidence for a Protective Role in Virus-Induced Encephalitis. *J Virol* (2008) vol. 82 (6) pp. 3031-3044

Walzer et al. Cutting edge: immediate RANTES secretion by resting memory CD8 T cells following antigenic stimulation. *J Immunol* (2003) vol. 170 (4) pp. 1615-9

Wang et al. Cutting edge: The adapters EAT-2A and -2B are positive regulators of CD244- and CD84-dependent NK cell functions in the C57BL/6 mouse. *J Immunol* (2010) vol. 185 (10) pp. 5683-7

Wang et al. Structural biology of shared cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* (2009) vol. 27 pp. 29-60

Waterhouse et al. A central role for Bid in granzyme B-induced apoptosis. *J Biol Chem* (2005) vol. 280 (6) pp. 4476-82

Waterhouse et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science* (1995) vol. 270 (5238) pp. 985-8

Way and Wilson. Cutting edge: immunity and IFN-gamma production during *Listeria monocytogenes* infection in the absence of T-bet. *J Immunol* (2004) vol. 173 (10) pp. 5918-22

Weinreich et al. T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8+ T cells. *Nat Immunol* (2010) pp. 1-9

Weinreich et al. KLF2 transcription-factor deficiency in T cells results in unrestrained cytokine production and upregulation of bystander chemokine receptors. *Immunity* (2009) vol. 31 (1) pp. 122-30

Wensveen et al. Apoptosis threshold set by Noxa and Mcl-1 after T cell activation regulates competitive selection of high-affinity clones. *Immunity* (2010) vol. 32 (6) pp. 754-65

Wensveen et al. Apoptosis Threshold Set by Noxa and Mcl-1 after T Cell Activation Regulates Competitive Selection of High-Affinity Clones. *Immunity* (2010) vol. 32 (6) pp. 754-765

Wherry et al. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* (2007) vol. 27 (4) pp. 670-84

Wherry et al. HIV-specific CD8 T cells express low levels of IL-7Ralpha: implications for HIV-specific T cell memory. *Virology* (2006) vol. 353 (2) pp. 366-73

Wherry et al. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004) vol. 101 (45) pp. 16004-9

Wherry et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* (2003) vol. 4 (3) pp. 225-34

Wherry et al. The induction of virus-specific CTL as a function of increasing epitope expression: responses rise steadily until excessively high levels of epitope are attained. *J Immunol* (1999) vol. 163 (7) pp. 3735-45

Williams et al. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* (2006) vol. 441 (7095) pp. 890-3

Willinger et al. Human naive CD8 T cells down-regulate expression of the WNT pathway transcription factors lymphoid enhancer binding factor 1 and transcription factor 7 (T cell factor-1) following antigen encounter in vitro and

in vivo. *J Immunol* (2006) vol. 176 (3) pp. 1439-46

Wojciechowski et al. Cytokine-producing effector B cells regulate type 2 immunity to *H. polygyrus*. *Immunity* (2009) vol. 30 (3) pp. 421-33

Wojciechowski et al. Bim mediates apoptosis of CD127(lo) effector T cells and limits T cell memory. *Eur J Immunol* (2006) vol. 36 (7) pp. 1694-706

Wrenshall and Platt. Regulation of T cell homeostasis by heparan sulfate-bound IL-2. *J Immunol* (1999) vol. 163 (7) pp. 3793-800

Wurster et al. Stat6 and IRS-2 cooperate in interleukin 4 (IL-4)-induced proliferation and differentiation but are dispensable for IL-4-dependent rescue from apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* (2002) vol. 22 (1) pp. 117-26

X

Y

Yajima et al. IL-15 regulates CD8+ T cell contraction during primary infection. *J Immunol* (2006) vol. 176 (1) pp. 507-15

Yao et al. Stat5a/b are essential for normal lymphoid development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* (2006) vol. 103 (4) pp. 1000-5

Yi et al. IL-21 Deficiency Influences CD8 T Cell Quality and Recall Responses following an Acute Viral Infection. *J Immunol* (2010) vol. 185 (8) pp. 4835-4845

Yi et al. A Vital Role for Interleukin-21 in the Control of a Chronic Viral Infection. *Science* (2009) vol. 324 (5934) pp. 1572-1576

Ying et al. Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4+ and CD8+ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. *J Immunol* (1997) vol. 158 (7) pp. 3539-44

Yoshida et al. Bcl6 controls granzyme B expression in effector CD8+ T cells. *Eur J Immunol* (2006) vol. 36 (12) pp. 3146-56

Young et al. The pore-forming protein (perforin) of cytolytic T lymphocytes is immunologically related to the components of membrane attack complex of complement through cysteine-rich domains. *J Exp Med* (1986) vol. 164 (6) pp. 2077-82

Young et al. The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin 1) from cytotoxic T cells: structural, immunological, and functional similarities. *Science* (1986) vol. 233 (4760) pp. 184-90

Yu et al. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell

lineage commitment. *Immunity* (2009) vol. 31 (3) pp. 457-68

Yu et al. Efficient induction of primary and secondary T cell-dependent immune responses in vivo in the absence of functional IL-2 and IL-15 receptors. *J Immunol* (2003) vol. 170 (1) pp. 236-42

Yu et al. Characterization of cytokine differential induction of STAT complexes in primary human T and NK cells. *Journal of Leukocyte Biology* (1998) vol. 64 (2) pp. 245-58

Z

Zabel et al. Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp Med* (1999) vol. 190 (9) pp. 1241-56

Zehn et al. Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature* (2009) vol. 458 (7235) pp. 211-4

Zeng et al. The molecular basis of IL-21-mediated proliferation. *Blood* (2007) vol. 109 (10) pp. 4135-42

Zeng et al. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J Exp Med* (2005) vol. 201 (1) pp. 139-48

Zhang et al. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* (1998) vol. 8 (5) pp. 591-9

Zhou et al. Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity* (2010) vol. 33 (2) pp. 229-40

Zhou et al. Cutting edge: engagement of NKG2A on CD8+ effector T cells limits immunopathology in influenza pneumonia. *J Immunol* (2008) vol. 180 (1) pp. 25-9