Université Paris V Descartes
12, rue de l'Ecole de Médecine
75270 Paris
Cedex 06

Equipe Alain Trautmann et Georges Bismuth
Institut Cochin
Département Immunologie et Hématologie
27, rue du Faubourg Saint Jacques
75014 Paris

Thèse de Doctorat en Sciences de l'Université Paris V – Descartes

Ecole Doctorale Biochimie, Biothérapies, Biologie Moléculaire et Infectiologie

Spécialité : IMMUNOLOGIE

Présentée par Quitterie LARGETEAU

Pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université Paris V Descartes

Régulation de la quiescence et de la migration des lymphocytes T par Fam65b, une nouvelle cible transcriptionnelle de FOXO1

Soutenue le 22 novembre 2012,

Devant le jury composé de :

Marc Delpech	Président
Jacqueline Marvel	Rapporteur
Marcel Deckert	Rapporteur
Yann Kerdiles	Examinateur
Marianne Mangeney	Directrice de thèse

Remerciements

Je voulais écrire en gros : merci
Puis je me suis lancée
Et il y en a pour quatre pages…

Je tiens tout d'abord à remercier chacun des membres de mon jury : au professeur Marc Delpech pour le présider, à Jacqueline Marvel, Marcel Deckert et Yann Kerdiles pour le décorticage de mon travail et leur participation à ma soutenance.

A Marianne, ma directrice de thèse.
L'important, c'est le chemin emprunté et que l'on ne soit pas le même au début et à la fin de celui-ci. Voilà mon souvenir d'une conversation dans un train entre Rennes et Paris, quelques temps avant que je commence à rédiger ce manuscrit. Bien évidemment, je me rappelle aussi de la liste des manip en prévision. Quoi qu'il en soit, le chemin n'a pas été évident, mais nous avons appris. Je tiens plus particulièrement à te remercier pour les derniers mois de ma thèse où j'ai vraiment apprécié ton soutien et nos échanges scientifiques et non scientifiques. Avant de partir, promis, je tâche de compléter mes cahiers de manip et après j'irai me « border » !

Aux « origines » des Trautmuth, merci pour votre accueil et pour cette équipe !
A Georges, pour ta disponibilité dès que je pointe le bout de mon nez dans ton bureau, pour tes conseils et remarques à chaque étape de ma thèse, pour tes blagues tous les midis avec la bande de jeunes, pour tes visites à 16h à l'ouverture du paquet de gâteaux, pour ton amour du FACScan.
A Alain, pour ta passion de la recherche, mais aussi ton investissement à la défendre qui a compté dans mon choix de rejoindre ce labo. Pour ta relecture de mon manuscrit et ton implication à faire progresser les doctorants. Pour l'ambiance que tu distilles et ton appel au mégaphone : « Séminaire ».
A Clotilde, pour tes conseils et remarques scientifiques et non scientifiques, mais aussi pour l'action des Apprentis Chercheurs à laquelle j'ai eu le plaisir de participer.
A Manu, pour ta disponibilité, pour m'avoir enseigné l'art de trancher les ganglions et le décapsulage d'une bonbonne d'oxygène !
A Jérôme, pour tes précieux conseils en biochimie, pour ses repas partagés les midis, pour ses cogitations sur Fam65b.

A la pièce 305b, son bureau des « jeunes » et son tube de colle indécrochable au plafond. Depuis que je m'y suis installée, tu en as vu du monde. Des jeunes et des moins jeunes d'ailleurs.
A Monique Semichon, mon initiatrice à la biologie moléculaire et en négociation réussie d'un virage « vie active » à « retraite », toute aussi active finalement !
A Delphine, pour tes pingouins, tes bas design, ton cours de surf et ton appétit pour le MacDo ! Merci pour ce talent de décontractant pendant ma rédaction.
A Laura, à ce bien sympathique partage de bureau, à cette soirée d'ouverture de maison d'édition où même si nous n'avons pas tout compris, nous avons au moins pu apprécier ce fabuleux champagne.
A Hélène, à ta porte toujours ouverte, à ce petit déjeuner avec baguette toute fraîche, à Mulan, au suricate vahiné, à nos moments de rires et de danses, à ta multitude d'anecdotes.
A Florent, au temps passé à regarder mes données et à me conseiller, à nos duels de chansons nazes à mettre insidieusement dans la tête des autres, à notre bowling de bonbonnes d'eau, aux gauffres ch'tis.

A Fabienne, ma chère Fabienne. Mon point de repère laborantin. Tu en as supporté avec moi dans les parages. J'ai aussi eu mon lot de « Larget, tout est de ta faute » ! Un réel plaisir. Merci pour toute ton aide pratique dans les manip au quotidien. Mais aussi, parce que tu es bien plus que ça. Tu as été un soutien professionnel et personnel pour moi, une source d'écoute et de conseils quelques soient les milliers de questions que je t'exposais. Tu m'as même appris à utiliser ma boîte à couture de poche, même si tu as, par dépit, défait tout ce que j'avais fait.
A François, à nos heures de discussions avant, pendant et après le labo, qu'elles soient scientifiques, philosophiques, politiques, religieuses, artistiques, personnelles ou comparatives du positionnement des mains de bonhommes lego versus playmobiles. A ces délires, à notre voisinage de bureau laborantin, à cette amitié.
A Chloé. Mon acolyte de bureau et plus encore. Rencontre géniale. Tu es là à tout instant : pour m'entendre rabacher mes histoires avec Fam65b, toutes les fois où je débarque à l'IMIC, pour supporter mes lancers incessants de tout objet potentiellement volatiles, pour toutes les fois où je t'ai enfermé en P1, pour écouter toutes les choses farfelues passant dans mon cerveau, ou toutes mes peines, pour mon bazar en constante expansion, pour mes essais de télépathie. Pour ta participation et ton imagination à tous les coups fourrés savamment orchestré au labo, pour nos jeux, pour nos courses au micro-onde, nos blagues téléphoniques. Pour le jour où tu gloussais de savoir que je devais présenter un oral au congrès en Crête, jusqu'à ce que tu te rendes compte que toi aussi. Pour tes prouesses avec Word. Pour toutes nos sorties et nos vacances. A ta peur de la junGLe birmane, à ta capacité d'orientation restreinte au siège avant droit d'une voiture, pour ton conseil de soutenir le jour de ma thèse et j'en passe. Je ne vois qu'une conclusion : après ta thèse, faut qu'on re-partage un bureau !

A l'attraction du bureau 305b et les visiteurs incessants qu'il voyait défiler !
A Céline O., pour tes problèmes techniques, tes jetés réguliers de dilutions neuves d'anticorps, ta fête des voisins (ou soupe populaire) et tes babka.
A Claire, et son dynamisme, durant ma première année dans le labo. Merci aussi pour la momie Jackson léguée à pablo, puis à moi.
A Maxime-Eliott (tu ne m'en voudras pas pour cette fois), à cette chanson que tu m'as inspiré, à ton esthétique vestimentaire et aux pourrissages réciproques de bureau.
A Jeanne, à ces derniers mois où j'ai pu apprécié de travailler avec toi, à cette découverte de la Bièvre, à ta leçon sur l'aston martin pour vaincre mon ignorance.
A Ana, à ton interprétation latino de besoin de rien, envie de toi !
A Céline C., à ta disponibilité et tes précieux conseils techniques et théoriques sur les FoxOs, à ta position « assise » si particulière après une journée de biblio, à ton jeu allemand où il faut dire chtop à la fin, pour toutes les fois où ta langue fourche et tous ces quiproquos si drôles dans lesquels tu te retrouves. Cette année, pour toi, c'est la bonne !
A Houcine, pour toutes les choses bizarres qui te passent par la tête à la seconde, tes glissades sur poubelle, tes accents selon l'humeur, ton côté people, ta pharmacie, tes théories, ton rangement avec photos animalières de nos anticorps.
A Shu-fang, pour ton écoute et nos discussions, pour ce resto chinois où même sans manger on pleure à cause du piment, pour ton accueil chez toi et pour ce drôle de jeu à plumes.
A Elisa, compagnon laborantin et depuis copine de chorale, à ta réserve de gâteaux, à la façon dont tu prononces Tim Burton, à cette petite crêperie fort sympathique, au fait que je parle en « italien » au cytomètre... Réserves moi une petite place à Padou car je viendrai t'y voir !
A Nadège, à ton écoute sans faille même entre deux sprints, à ta disponibilité scientifique (autour de lasagnes à 22h) et non scientifique, à ton précieux soutien, à tes quiches journalières, à ta mousse au chocolat, à tes prestations sur pistes de dance, à tes blagues quotidiennes, à ton p'tit Damien et ces sympathiques visites au labo !
A Arnaud D., à tes venues régulières dans le bureau et à mes venues régulières dans le tien, à la bouteille de blanc apportée lorsqu'un 1 événement par seconde défilait à une heure

déraisonnable, à cette petite sortie improvisée après s'être retrouvé errant à Cochin toujours à une heure déraisonnable et surtout à ton précieux soutien tout au long de ma thèse.
A Sandrine, à l'hématologie qui nous a fait connaître, à ton aide pour les chip, à tout ton blabla sur l'épigénétique and co (je dois même peut être pouvoir présenter tes données de thèse !), à cette tarte au citron que tu ne me pardonneras pas, à ce base-ball laborantin de jours fériés, à ce premier symposium, à cette présence constante tout au long de ma thèse.
A Pablo, mon binôme ! Partenaire de Fam65b et de raclette. On en a passé du temps à causer de cette sacré protéine et de ces frasques. Merci, car tu m'as rendu cette thèse plus facile et beaucoup plus marrante, je dois dire. Je n'aurai voulu la passer avec personne d'autre. Merci pour tes attentions et tes vannes quotidiennes. Pour ces discussions dans le P2, puis le P1, puis au congèl, puis dans le bureau et dans la salle à manger de réunion. Merci d'avoir écrit une page de plus de remerciements que moi.
A ma Lulu, ma pipelette préférée. A ton gâteau au chocolat, le plus consistant au monde, à tes gigantesques salades quotidiennes, à ce gâteau horrible que tu as laissé pourrir dans notre frigo. Merci pour toutes nos discussions scientifiques ou non, nos fous rires, nos mojitos et nos croque-madame, toutes ces soirées improvisées. Pour ce catcheur mexicain que tu incarnais si bien, combattant le jedi que j'étais. Pour ton écoute et tes encouragements. Pour ton amitié.

A mes collaborateurs, chez lesquels j'ai finalement passé une bonne partie de ma thèse.
A Corinne, pour m'avoir grand ouvert les portes de ton laboratoire et pour tout l'investissement dont tu as fait preuve sur mon projet. Ce fut un réel plaisir pour moi de travailler à tes côtés.
A Sylvain, et à tout ce que tu m'a appris techniquement et théoriquement sur la mémoire lymphocytaire T. Mais aussi, à cette amitié qui s'est alors créée.
A Agnès Legrand, merci pour ton accueil et ta disponibilité qui m'ont permis de réaliser une manip clé.
A Agnès Lebon, pour tes enseignements théoriques et pratiques que j'ai beaucoup apprécié et qui m'ont été très utiles. Merci pour ta disponibilité et tes conseils.
A Karin et Frédéric et à notre collaboration sur cet intriguant projet de la lymphotoxine β. Merci pour votre accueil et nos discussions.

A tous les cochinois que j'ai eu le plaisir de cotôyer et qui font le cœur de ce chouette Institut.
Aux personnes des plateformes techniques qui simplifient et améliorent le travail quotidien : plus particulièrement à l'équipe de l'animalerie, de la plateforme de cytométrie, du séquençage, de la laverie et de l'imagerie. Le sécrétariat du 5ème aussi et Jean, notamment lors de mes nombreuses visites lors de notre pénurie de glace !
Aux jeunes de JeCCo qui agrémentent sacrèment le quotidien de la thèse, à ceux de la Confédération des Jeunes Chercheurs avec qui j'ai pu partager des idées et des actions : et plus particulièrement au 8ème étage de Roussy (dont un nous a rejoint : bienvenue Arnaud P.), au 6ème étage, aux exilés d'Hardy.
Au groupe Gfi-1B, rencontré en Master 1, à Dominique et Benoît pour nos rencontres autour d'un bon repas à se raconter les dernières nouvelles.

A Voahangy. Tu m'as ouvert ton laboratoire et tu n'as cessé de m'accompagner depuis. Merci de ce soutien, de ces rencontres, de ces restos réguliers, de ces précieux conseils et encouragements depuis ma recherche de master 2 jusqu'à ma fin de thèse. Tu as été un des piliers professionnel et personnel de ces dernières années. Merci pour ton honnêteté, pour tes rires, pour ton attention, pour… l'apprentissage du P3 ! Merci pour cette chère amitié.

A François. Merci pour tous tes conseils et l'investissement que tu as démontré à mon égard. Ils m'ont assurèment permis d'avancer. Merci aussi pour m'avoir donné la chance d'encadrer avec toi les travaux pratiques d'une génération de master 2 en immunologie.

A tous ceux qui font de la Science sous une autre forme que la recherche et, plus particulièrement, au groupe du département des Sciences de la vie du Palais de la Découverte.
Une mention toute particulière à toi Steph. Travailler avec toi au Palais à été tout simplement génial. Une bouffée d'oxygène dans mon quotidien de « thésarde ». Je te remercie pour la liberté que tu m'as accordée, les projets que nous avons pu réaliser, l'apprentissage régulier, les rires aussi, pour cet apéro-soirée sur les quais de Seine. Merci pour ta bonne humeur, pour ton dynamisme et ton bureau, aussi en bazar que le mien !

A toutes ces personnes qui en dehors du labo m'ont écouté, encouragé et bien fait rire !
A Pauline et Nico, mes camarades de master 2 et compagnons de thèse, à tous nos moments…
A la fine équipe de géosciences : Tiphanie, Sophie, Gaël, Nico Se., Yoram, Nico L. et Nico Sa.
A Fabien et Floriane, mes fidèles complices, à cette écoute, à ces leçons d'économie, à ce partage de nos livres favoris
A Ingrid et Laurent, dont la maison, bien que toujours en travaux et plus qu'animée, est le lieu où j'aime venir déconnecter.
A Julien, mon coloc et partenaire du quotidien, à ta verte attitude, à tes problèmes d'aire carré d'un rectangle, à ce toutouyoutou, à notre resto japonais, à notre week end à Prague. Merci à appartager.com pour avoir permis cette chouette rencontre. C'est à ton tour maintenant. Rappelles toi : le doctorat, c'est ma joie !

A ceux qui étaient là au début et ne sont pas là à la fin. Parce que même un passage compte bien plus qu'on ne l'imagine.

A Picard, à Olivia ruiz, à mon tableau Velleda et au logement parisien

A ma famille, Largeteau et Laparade,
Pour toutes les fois où vous avez désespérèment essayer d'expliquer ce que je faisais
Pour toutes ces fois où vous souhaitiez savoir si « ça avançe la thèse ? » et que je vous envoyai paître
Pour ces bons repas, ces franches rigolades, ces gentils agacements et ce soutien, silencieux ou non, mais sans faille
Au Frère et à la Sœur, toujours près de moi, pour notre musique savante avec ustensiles de cuisine (bon sang, que ça décontracte), pour notre théorie de l'embêtable (vous ai-je déjà parlé de la théorie des gens qui tombent ?), pour cette lessive avalée, pour cette capacité hors norme à faire des rimes
A mon père et à ma mère, à qui je dédie ma thèse si elle doit l'être, car je n'en serai pas là sans vous. Et je ne dis pas ça uniquement parce que, biologiquement parlant, c'est un fait ! Je vous aime très fort. Malgré les diverses tares génétiques que vous m'avez gentiment transmises, je vous remercie pour votre curiosité débordante, votre ouverture d'esprit, votre honneteté et votre générosité. J'en suis drôlement fière. A vous d'être fiers de votre fille et de son pavé de 200 pages sur un drôle de truc nommé Fam65b.

Résumé

Les lymphocytes T (LT) perçoivent et intègrent en permanence des signaux solubles et cellulaires, conditionnant leur comportement et leur devenir. A l'état de repos, les propriétés des LT reposent sur tout un réseau moléculaire caractéristique, au sein duquel les facteurs de transcription FoxOs ont un rôle majeur. En effet, ces derniers sont impliqués dans le maintien de la quiescence et de la capacité circulatoire des LT, de par le profil transcriptionnel qu'ils induisent. De ce fait, l'inactivation de l'activité transcriptionnelle des facteurs FoxOs est un processus fondamental de l'activation et de l'expansion lymphocytaire T.

Nous avons identifié le gène *Fam65b* comme une nouvelle cible transcriptionnelle des facteurs FoxOs. Le gène *Fam65b* code pour deux protéines : l'isoforme 1 et l'isoforme 2. Nous avons montré que FOXO1 peut se lier sur des séquences consensus présentes dans les promoteurs de chaque isoforme et induire leur transcription. Ceci se traduit, physiologiquement, par une diminution de l'expression de Fam65b au cours de l'activation des LT, en corrélation avec l'exclusion nucléaire de FOXO1. Une analyse fonctionnelle, réalisée in vitro à l'aide de LT humains dans lesquels nous avons modulé l'expression de Fam65b, nous a permis de mettre en évidence que cette protéine module le seuil d'activation des LT. En effet, l'inhibition de son expression à l'aide de siRNA permet à des LT de proliférer en réponse à des stimulations suboptimales du récepteur à l'antigène (TCR), alors que l'expression d'une forme constitutive inhibe la prolifération. Enfin, nous avons constaté que l'expression de Fam65b dans des cellules en prolifération, telle la lignée Jurkat, induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et, à terme, la mort cellulaire. Fam65b est donc un effecteur moléculaire de la quiescence induit par le facteur de transcription FOXO1.

Au vu de ces résultats, nous avons étudié *in vivo* le rôle de Fam65b sur le déroulement d'une réponse immune. A l'aide de shRNA, nous avons inhibé l'expression de Fam65b dans le modèle de souris transgénique pour le TCR spécifique de l'antigène HY. Nous avons ainsi pu observer que l'inhibition de l'expression de Fam65b n'affecte pas significativement la réponse primaire. En revanche, lors d'une réponse secondaire, l'inhibition de l'expression de Fam65b est associée à des capacités renforcées d'élimination de l'antigène. Enfin, mon travail, a permis de mettre en évidence que, physiologiquement chez l'homme, comme chez la souris, Fam65b est plus faiblement exprimé dans les LT mémoires que dans les LT naïfs. Ces deux populations étant considérées comme quiescentes, Fam65b pourrait donc être un marqueur fonctionnel de la mémoire lymphocytaire T.

Parallèlement, nous avons montré que Fam65b contrôle d'autres propriétés fondamentales des LT. En effet, Fam65b inhibe partiellement les capacités d'adhésion, de polarisation et de migration des LT. Nous avons pu établir que cette inhibition résulte, au niveau moléculaire, d'un blocage de l'activité de la Rho-GTPase RhoA.

Mes travaux de thèse ont contribué à mettre en évidence une nouvelle voie de contrôle de l'état de repos des LT par les facteurs FoxOs: Foxo1 régule l'expression de la cible Fam65b qui joue le rôle de frein à l'activation des LT par une stimulation du TCR. Fam65b participe donc au maintien en quiescence des LT. De plus, il régule également le seuil d'activation de la voie RhoA contrôlant, par ce biais, les fonctions circulatoires des LT. Fam65b constitue ainsi un nouveau lien fonctionnel entre deux familles majeures, contrôlant la physiologie des LT : les Rho-GTPases et les FoxOs.

Sommaire

Table des figures *11*

Liste des abréviations *12*

Avant-propos *13*

Introduction **15**

I. Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des LT CD8⁺ en présence et en absence d'antigène *17*

Encart n°1 : Régulation et activité de la voie PI3-kinase 22

II. La quiescence et sa rupture *23*

II.1. Caractéristiques de l'état de quiescence des LT CD8⁺ naïfs et mémoires 23

II.1.1. La migration 23

II.1.1.a. Le guidage 23

II.1.1.b. Adressage des LT 25

II.1.2. La survie 28

II.1.2.a. L'IL7, signal crucial de la survie des LT quiescents 28

II.1.2.b. D'autres signaux participent au maintien de la survie de façon dépendante du stade de différenciation des LT 31

II.1.3. Le métabolisme 32

II.1.4. Le cycle cellulaire 34

II.1.5. Structure de la chromatine 36

II.2. Régulation de la quiescence des LT CD8⁺ au cours d'une réponse immune 38

II.2.1. Modifications phénotypiques et fonctionnelles associées à l'activation/expansion des LT 38

II.2.2. Modifications phénotypiques et fonctionnelles associées à la phase de contraction 40

II.2.3. Modifications phénotypiques et fonctionnelles associées à la différenciation en LT mémoires 43

III. Les facteurs FoxOs *47*

III.1. Régulation de l'activité transcriptionnelle des FoxOs 48

III.1.1. Contrôle de la localisation subcellulaire des FoxOs 48

III.1.1.a. La phosphorylation des FoxOs 48

III.1.1.b. D'autres modifications post-traductionnelles ciblent les FoxOs 51

III.1.2. Régulation de l'expression des FoxOs 53

III.1.2.a. Régulation transcriptionnelle des facteurs FoxOs 53

III.1.2.b. Régulation de l'expression protéique des FoxOs 54

III.1.3. Régulation des activités des FoxOs *via* l'interaction avec des co-facteurs 56

III.2. Régulation des propriétés lymphocytaire T par les FoxOs 59

III.2.1. La quiescence 59

III.2.1.a. Apport des études in vitro 59

III.2.1.b. Apport des études in vivo 61

III.2.2. L'apoptose 62

III.2.3. La survie 64

III.2.4. La circulation 66

III.2.5. La différenciation des LT CD8⁺ 68

III.2.6. Discussion générale sur le rôle des FoxOs dans la physiologie des LT CD8⁺ 70

IV. Identification d'une nouvelle cible transcriptionnelle putative de FOXO1 : Fam65b *74*

Encart n°2 : Les Rho GTPases : régulation de leurs activités et effets biologiques 77

Résultats **79**

V. Fam65b, nouvelle cible transcriptionnelle de FOXO1, contrôle la migration des LT en régulant la voie de signalisation RhoA *81*

VI. Fam65b, nouvel effecteur de la quiescence des LT induite par FOXO1 ..... *121*

Discussion **155**

VII. Fam65b : un effecteur de FoxO1 régulant la quiescence et la migration des LT *157*

VII.1. Régulation de l'expression de Fam65b 157

VII.2. Mécanismes d'action de Fam65b 158

VII.2.1. Fam65b est-il une GEF, une GAP, une GDI ? 158

VII.2.2. Mécanisme moléculaire de la régulation de l'inhibition de RhoA par Fam65b 160

VII.3. Régulation fonctionnelle par Fam65b 163

VII.3.1. Fam65b régule le seuil d'activation des LT 163

VII.3.2. Fam65b, un effecteur de la quiescence 164

VII.3.3. Expression modérée de Fam65b dans les LT mémoires : conséquences fonctionnelles 165

VII.3.4. Fam65b : un effecteur des FoxOs dans la différenciation et la fonctionnalité des LT mémoires ? 167

VII.3.5. Fam65b régule la capacité migratoire des LT 168

VII.3.6. Fam65b : un effecteur de FoxO1 qui inhibe la migration ? 170

Bibliographie **173**

Table des figures

Figure 1 : Evolution du nombre de LT spécifiques d'un antigène au cours d'une réponse primaire. *19*
Figure 2 : Propriétés des LT mémoires comparées aux LT naïfs *20*
Figure 3: Schéma simplifié de la voie PI3K en aval d'une stimulation TCR *22*
Figure 4: Régulation de la mobilité des LT par la présence de S1P *24*
Figure 5: Homing des LT dans les ganglions lymphatiques *27*
Figure 6: Régulation de la survie en aval de l'IL7R *30*
Figure 7: Métabolisme catabolique des LT quiescents *32*
Figure 8: Mécanismes moléculaires impliqués dans la progression de la phase G0/G1 du cycle à la phase S *35*
Figure 9: Régulation de l'expression de gènes entre les LT naïfs et les LT mémoires *37*
Figure 10: Modèles principaux proposés pour la différenciation des LT mémoires *43*
Figure 11: Signaux et mécanismes sous-jacents à la balance entre SLECs et MPECs *44*
Figure 12: La phosphorylation des FoxOs par Akt induit leur liaison à la protéine chaperonne 14-3-3, aboutissant à leur exclusion nucléaire *50*
Figure 13: Principales modifications post-traductionnelles régulant l'activité des facteurs FoxOs *52*
Figure 14: Mécanismes possibles de régulation transcriptionnelle par les FoxOs *58*
Figure 15: Les facteurs FoxOs sont des acteurs majeurs du contrôle spatio-temporel d'une réponse immune et de l'homéostasie des LT *67*
Figure 16: Quantité de transcrits mesurée par RT-PCR quantitative dans des cellules de la lignée leucémique Jurkat infectée par une forme constitutivement active de FOXO1 comparée à celle mesurée dans des cellules infectées par un vecteur contrôle. *75*
Figure 17: L'expression de Fam65b est induite dans des cellules Jurkat exprimant une forme constitutivement active de FOXO1 ..... *75*
Figure 18: Quelques mécanismes de régulation des Rho GTPases *77*
Figure 19: Mécanisme d'action de Fam65b *162*

Liste des abréviations

AMPK : AMP-activated kinase
Atg5 : autophagy protein 5
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
Cdk : cyclin dependant kinase
DC : cellule dendritique
FoxOs : Forkhead box O
GAP : GTPase Activating Protein
GDI : guanine nucleotide dissociation inhibitors
GDP : guanosine diphosphate
GEF : Guanine exchange factor
GTP : guanosine triphosphate
ICAM-1 : intercellular adhesion molecule 1
IFN : interféron
ILX : interleukine X
ILXR : récepteur à l'interleukine X
Klf2 : kruppel like factor 2
LCMV : lymphocytic choriomeningitis virus
LFA-1 : lymphocyte function associated antigen 1
LKB1 : liver kinase B1
LT : lymphocyte T
MPEC : memory precursor effector cells
mTor : mammalian target of rapamycin
OLS : organes lymphoïdes secondaires
PDK1 : 3-phosphoinositide-dependent kinase
PH : pleckstrin homology
PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase
PIP2 : phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate
PIP3 : phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate
PTEN : phosphatase and tensin homologue
SGK : serum/glucocorticoid regulated kinase
SLEC : short-lived effector cells
TCR : récepteur à l'antigène
Tcm : lymphocytes T mémoires centraux
Tem : lymphocytes T mémoires effecteurs
TNF : tumor necrosis factor

Avant-propos

Une réponse immune s'articule autour de deux grandes étapes étroitement dépendantes l'une de l'autre. La réponse innée, non spécifique de l'antigène, est opérationnelle immédiatement après le début de l'infection. Elle possède notamment la capacité d'alerter et d'activer les cellules de l'immunité adaptative, hautement spécifique de l'antigène. Cette mise en route se fait au sein de structures spécialisées appelées organes lymphoïdes secondaires (OLS) et est lente à se mettre en place. Le lymphocyte T (LT) est l'un des acteurs majeurs de l'immunité adaptative : il évolue d'une phase de quiescence, pendant laquelle il parcourt l'organisme à la recherche de l'antigène spécifique, à une phase d'activation/prolifération qui se déroule dans les OLS. Les facteurs de transcription FoxOs, en co-régulant l'expression de gènes impliqués dans la quiescence et la mobilité des LT, jouent un rôle prépondérant dans l'ensemble de ces processus.

Mon sujet de thèse a porté sur l'étude de la protéine Fam65b. Ce travail a permis de mettre en évidence que Fam65b, une cible transcriptionnelle de FoxO1, contrôle à la fois le seuil d'activation des LT en réponse à une stimulation du TCR, mais également en réponse aux chimiokines. Nous avons également montré que le mécanisme moléculaire mis en jeu par Fam65b pour inhiber la migration, résulte de l'inhibition de l'activité de la Rho GTPase RhoA. Ces résultats ont, d'une part, mis à jour un nouvel effecteur moléculaire de Foxo1 dans la régulation de la quiescence et la mobilité des LT. D'autre part, ils permettent également d'établir un lien moléculaire entre ces deux grands acteurs de la signalisation que sont FOXO1 et RhoA. L'ensemble de ces données fait l'objet de deux publications, dont l'une est en révision à *Journal of Immunology*, et l'autre est en cours de rédaction.

Avant de présenter les résultats obtenus, j'introduirai tout d'abord les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des LT $CD8^+$ quiescents, en comparant cet état dans les LT $CD8^+$ naïfs et les LT $CD8^+$ mémoires. Ensuite, j'évoquerai des paramètres importants de la régulation des facteurs impliqués dans la quiescence lors d'une réponse immune. Enfin, j'exposerai les mécanismes de régulation des facteurs FoxOs et leur(s) activité(s) dans un contexte lymphocytaire T.

INTRODUCTION

I. Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des LT CD8$^+$ en présence et en absence d'antigène

Les LT naïfs, n'ayant pas encore rencontrés leurs antigènes spécifiques, sont considérés comme des cellules au repos. La caractérisation de ces cellules peut néanmoins être affinée. Les LT naïfs sont de petites cellules, non prolifératives et présentant une activité métabolique modérée de type catabolique. Ils peuvent se maintenir pendant plusieurs semaines dans le compartiment périphérique, c'est-à-dire les zones hors moelle osseuse et thymus (Von Boehmer, 1993; Tough and Sprent, 1994). A un instant T, ils sont principalement retrouvés dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS), à savoir les ganglions lymphatiques, la rate et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (GALT). Ils sillonnent continuellement ces différentes zones, qu'ils rejoignent *via* les vaisseaux sanguins et/ou lymphatiques (Braun et al., 2011).

Au sein du pool lymphocytaire T, la fréquence de LT CD8$^+$ naïfs, spécifiques d'un antigène donné, est évaluée à une centaine de clones en moyenne chez la souris, de 10^3 à 10^5 chez l'homme (Blattman et al., 2002; Kedzierska et al., 2006; Alanio et al., 2010). La spécificité de reconnaissance antigénique des LT est assurée par l'expression à leur surface de récepteurs à l'antigène (TCR) capables de reconnaître un antigène particulier. Pour se faire, l'antigène doit être apprêté sous forme de peptide et associé à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. L'acteur majeur de la présentation antigénique à l'origine de l'activation des LT naïfs est la cellule dendritique (DC). La majorité des DC, impliquées dans l'activation des LT naïfs, provient du site de l'infection, où elles ont capté l'antigène. Les DC, chargées en antigène, migrent au sein de l'OLS drainant l'infection, où elles présentent l'antigène apprêté aux LT naïfs. L'activation d'un LT implique non seulement la stimulation du TCR (signal 1), mais également celle de molécules de co-stimulation (signal 2) et de récepteurs aux cytokines inflammatoires (signal 3). Ces différents signaux aboutissent au déclenchement d'un nombre important de voies de transduction intracellulaires, dont la voie PI3K/Akt qui nous intéresse plus particulièrement dans ce manuscrit (cf. Encart n°1). En 24 heures de stimulation en moyenne, le LT est engagé dans un programme de prolifération massive associé à un processus de différenciation en LT effecteurs (Henrickson et al., 2008a, 2008b). Cette phase est appelée l'expansion clonale.

Lors de cette étape, les LT naïfs subissent un bouleversement radical de leurs propriétés. Le passage de l'état de repos à l'état activé et prolifératif s'accompagne d'une augmentation de volume du LT et d'un changement d'activité métabolique qui devient anabolique. Cette adaptation métabolique intervient du fait de la hausse de la demande énergétique nécessaire à la prolifération rapide et massive (Pearce, 2010). L'activation et la prolifération des LT impliquent un arrêt temporaire de leur migration et leur rétention conjointe dans l'OLS. Ceci est favorable à une stimulation optimale des LT et à la production d'un grand nombre de LT effecteurs.

Ceci nous amène à une autre propriété fondamentale acquise lors de l'expansion clonale qui est la capacité effectrice. Les LT $CD8^+$ sont capables de produire des cytokines permettant d'amplifier la réponse, mais aussi de contrôler une infection par exemple, tels que l'IFNγ (interféron γ) et le TNFα (tumor necrosis factor α). Ils expriment également les ligands de récepteurs à domaine de mort (FasL) et produisent des molécules cytotoxiques (granzyme et perforine) ; l'ensemble permettant d'éliminer les cellules infectées (Anikeeva and Sykulev, 2011). A nouveau, ces évènements s'accompagnent d'un changement de capacité migratoire. Les LT effecteurs ont perdu l'aptitude à circuler au sein des OLS et migrent vers le site de l'infection, souvent des tissus non lymphoïdes inflammés. Cette redistribution est favorable à l'exécution des fonctions effectrices par les LT au site adéquat et au contrôle et/ou à l'élimination des cellules infectées (Marelli-Berg et al., 2008).

Une fois le pic de l'expansion clonale atteint, la phase de contraction est engagée. Elle est caractérisée par la diminution drastique du nombre de LT $CD8^+$ spécifiques de l'antigène. 90 à 95% des LT activés meurent par apoptose durant cette étape permettant le retour à l'équilibre homéostatique du système. Le corollaire de cette observation est que 5 à 10% d'entre eux subsistent après le contrôle ou l'élimination de l'infection. Ces cellules sont qualifiées de LT mémoires (Figure 1).

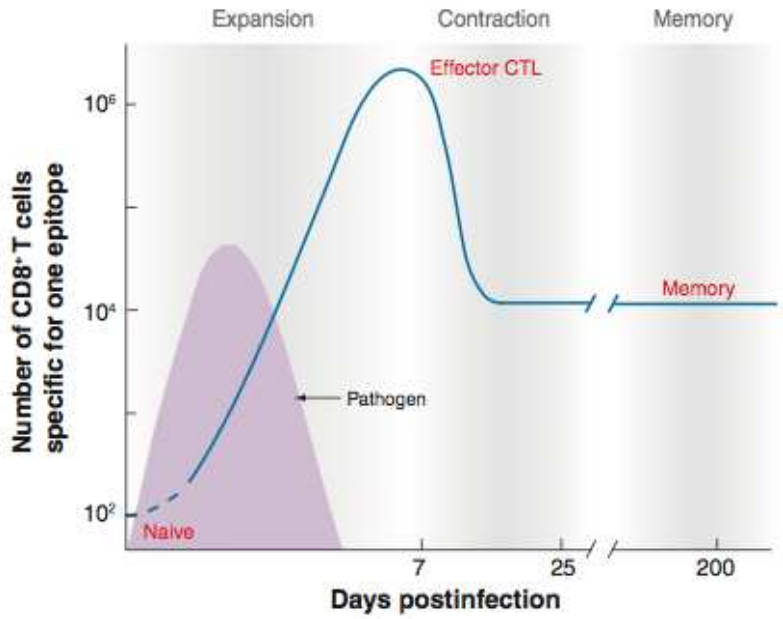


Figure 1 : Evolution du nombre de LT spécifiques d'un antigène au cours d'une réponse primaire.
D'après (Williams and Bevan, 2007).

Les LT mémoires sont de petite taille et présentent un métabolisme de type catabolique, ce qui permet de les définir comme des cellules quiescentes. Bien qu'en apparence non prolifératives, ces cellules s'auto-renouvellent lentement. Ce processus qualifié de prolifération homéostatique soulève l'ambiguïté de la définition du mot quiescence, attribué souvent aussi bien aux LT naïfs qu'aux LT mémoires. Cet auto-renouvellement, combiné à une capacité de survie prolongée, assure la subsistance des LT mémoires, et ce, potentiellement plusieurs années (Hammarlund et al., 2003). Les LT mémoires sont également caractérisés par leur capacité à mener une réponse plus efficace lors d'une nouvelle rencontre avec l'antigène correspondant. Cette amélioration implique des paramètres quantitatifs et qualitatifs. Tout d'abord, la fréquence des LT mémoires est plus élevée que celle observée initialement pour des LT naïfs de même spécificité (Blattman et al., 2002). De plus, ils sont capables d'entrer en cycle plus rapidement que les LT naïfs (Veiga-Fernandes et al., 2000). Ceci aboutit à une expansion clonale plus précoce et de plus grande ampleur lors d'une réponse secondaire. Ensuite, les LT mémoires sont capables d'exercer des fonctions effectrices variées plus vite que les LT naïfs, permettant une élimination plus efficace des cellules portant l'antigène (Cho et al., 1999; Pihlgren et al., 1999). Enfin, un dernier paramètre à prendre en compte est la capacité de circulation multiple des LT mémoires. D'une part, ils sillonnent les OLS, impliquant la possibilité de génération d'une nouvelle expansion clonale aboutissant à une

vague de LT effecteurs et mémoires. D'autre part, ils peuvent se localiser dans les tissus non lymphoïdes et notamment directement dans les zones où l'infection primaire a eu lieu, fournissant une protection immédiate en cas de nouvelle infection (Sallusto et al., 1999; Masopust et al., 2001) (Figure 2).

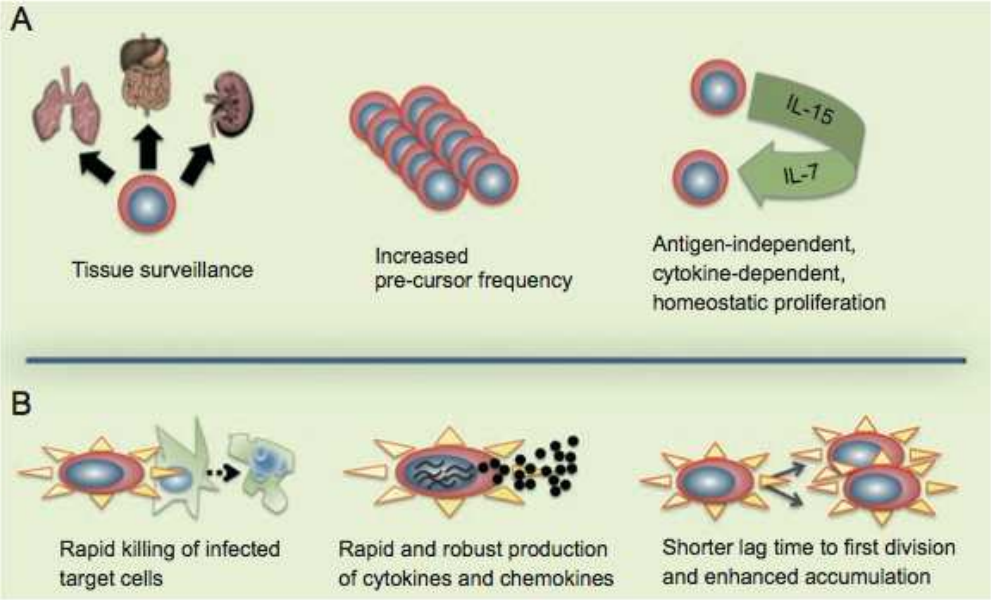


Figure 2 : Propriétés des LT mémoires comparées aux LT naïfs

A. Caractéristiques des LT mémoires en absence d'antigène.

B. Caractéristiques des LT mémoires en présence d'antigène.

D'après (DiSpirito and Shen, 2010).

Comme suggéré préalablement, la population des LT mémoires est, en réalité, très hétérogène. L'ensemble des critères précédemment cités permet de décrire plusieurs sous-populations parmi les LT mémoires. La classification la plus commune sépare la population mémoire en deux, selon des critères de capacité circulatoire et fonctionnelle : les LT mémoires centraux (Tcm) et les LT mémoires effecteurs (Tem). Alors que les Tcm sont cantonnés presque exclusivement à une circulation dans les OLS, les Tem, quant à eux, sont majoritairement retrouvés dans les tissus non lymphoïdes. En revanche, et les Tcm et les Tem sont détectés dans le sang et la rate, à ceci près que les Tem sont concentrés dans la pulpe rouge (compartiment sanguin) de la rate et les Tcm dans la pulpe blanche (zone lymphoïde) (Sallusto et al., 1999; Masopust et al., 2001). Lors d'une deuxième rencontre avec l'antigène (réponse secondaire), les Tem présentent une activité effectrice immédiate et au site de l'infection. Les Tcm, quant à eux, sont à l'origine d'une forte et rapide expansion clonale, génératrice d'une vague de LT effecteurs et mémoires (Sallusto et al., 1999; Masopust et al., 2001). Aujourd'hui, cette classification implique, elle aussi, de nouvelles subdivisions basées non seulement sur les critères définissant les Tcm et les Tem, mais également sur des propriétés telles que la longévité. La caractérisation des différentes sous-populations de LT mémoires, ainsi que les mécanismes donnant lieu à leurs différenciations, fait l'objet d'actives études, que je n'aborderai pas dans mon manuscrit. (Masopust and Picker, 2012).

Dans la suite de l'exposé, lorsque je traiterai des LT mémoires, je considérerai principalement les Tcm qui partagent de fortes similitudes avec les LT naïfs. A ceci près que certaines études, ayant été réalisées à partir de LT spléniques, travaillent en réalité sur un mélange de Tcm et de Tem.

Encart n°1 : Régulation et activité de la voie PI3-kinase

La voie de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) est activée en aval d'une variété de couples ligands/récepteurs. Le cas le plus étudié est l'induction de cette voie en aval de récepteur à activité tyrosine kinase tel que le TCR (Figure 3). Dans ce contexte, elle est soutenue par un signal émanant de la molécule de co-stimulation CD28 constitutivement exprimée par les LT (Garçon et al., 2008). La voie PI3K est également induite en aval des récepteurs aux facteurs de croissance et des récepteurs aux cytokines, principalement ceux appartenant à la famille des récepteurs aux interleukines de type 1 composée de l'IL2, l'IL4, l'IL7, l'IL9, l'IL15 et l'IL21. Ils ont pour point commun d'être constitués de plusieurs sous unités dont l'une est la chaine commune γ (γc ou CD132) (Overwijk and Schluns, 2009; Rochman et al., 2009). Il est important de noter que ces récepteurs sont exprimés différentiellement sur les sous-populations de LT $CD8^+$ et ils n'induisent pas tous le même degré d'activation de la voie PI3K. Le signal IL2 permet de maintenir un plus haut niveau de PIP3 comparé à l'IL15 (Cornish et al., 2006). D'autre part, certains récepteurs aux chimiokines possèdent eux aussi la capacité d'activer la PI3K. Il s'agit de récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G hétérotrimériques (Reif et al., 2004).

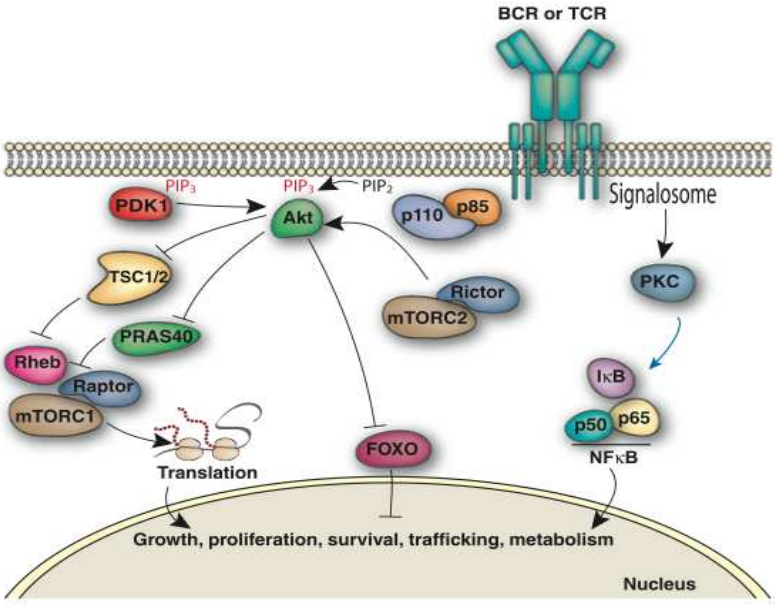


Figure 3: Schéma simplifié de la voie PI3K en aval d'une stimulation TCR

La stimulation du TCR induit le recrutement de la PI3K, composée de la sous-unité régulatrice p85α et de la sous-unité catalytique p110δ. Elle catalyse la transformation du PIP2 (phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate). Plusieurs protéines sont alors recrutées à la membrane *via* leur domaine PH (pleckstrin homology domain) liant le PIP3. C'est le cas notamment de la kinase Akt, mais aussi de la famille des kinases SGK (serum/glucocorticoid regulated kinase) (Park, 1999; Fabre et al., 2005). Pour leur complète activation, elles sont alors phosphorylées par le complexe mTorC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) et la kinase PDK1 (3-phosphoinositide-dependent kinase), cette dernière étant elle aussi recrutée à la membrane par son domaine PH (Sarbassov et al., 2005; Nirula, 2006). D'autres effecteurs peuvent être activés en aval de la PI3K tels que les kinases de la famille Tec et certaines protéines activatrices des Rho-GTPases (GEF pour guanine exchange factor) dont les facteurs Vav.

La kinase Akt contrôle elle-même l'activation de différents effecteurs dont le complexe mTorC1 qui favorise notamment la capture de nutriments par la cellule (Delgoffe and Powell, 2009). Une autre cible particulière de cette kinase nous intéresse particulièrement dans le cadre de ce manuscrit. En effet, Akt inhibe l'activité des facteurs FoxOs (Forkhead Box O) impliqués dans le maintien de la quiescence des LT. *D'après (Fruman and Bismuth, 2009)*

II. La quiescence et sa rupture

La quiescence au sens strict est définie par deux paramètres : l'activité métabolique de la cellule et sa position dans le cycle cellulaire. Pour autant, le terme quiescence est souvent utilisé pour décrire le statut des LT naïfs et mémoires en absence d'antigène. Loin d'être un état par défaut, la quiescence est activement maintenue par un réseau moléculaire intracellulaire interactif. La transition d'un état quiescent à un état activé d'un LT implique notamment une rupture de cet état de quiescence. L'activation forte de la voie PI3K constitue l'un des supports moléculaires de cette transition.

II.1. Caractéristiques de l'état de quiescence des LT CD8⁺ naïfs et mémoires

II.1.1. La migration

Les LT naïfs et les LT mémoires sont des cellules circulantes : elles sillonnent continuellement les différents OLS de l'organisme, empruntant notamment pour se faire les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Cette exclusivité d'adressage est rendue possible par une combinaison de molécules de surface, que je vais présenter à présent.

II.1.1.a. Le guidage

Le guidage des LT résulte principalement de l'expression de récepteur aux chimiokines et de la présence de leurs ligands qui orientent le déplacement du LT. Le CCR7 est la molécule clé de la circulation des LT vers et dans les OLS. C'est un récepteur à 7 domaines transmembranaires exprimé majoritairement par les LT naïfs et les Tcm. Les ligands du CCR7 sont les chimiokines CCL19 et CCL21 produites principalement par les cellules stromales de la zone T, où se concentrent les LT au sein des OLS (Bromley et al., 2008). Cette chimio-attraction des LT exprimant le CCR7 par les chimiokines CCL19/CCL21 explique justement le recrutement des LT dans les OLS et plus spécifiquement dans la zone T. La migration des LT au sein de la zone T reste dépendante du CCR7, comme cela a été montré au laboratoire dans un contexte de tranches de ganglions ex-vivo (Asperti-Boursin et al., 2007).

L'autre récepteur aux chimiokines crucial dans la circulation des LT quiescents est S1P1, clé moléculaire de la sortie des LT des ganglions lymphatiques. C'est également un récepteur à 7 domaines transmembranaires, dont le ligand est une molécule lipidique chimioattractante nommé S1P. De fortes concentrations de S1P sont détectables dans la lymphe et de façon plus prononcée encore dans le sang. S'il est connu que ce sont les plaquettes et les érythrocytes qui

le produisent dans le sang, il est seulement montré que ce sont des cellules résistantes aux radiations qui en sont à l'origine dans la lymphe (Pappu et al., 2007). Dans le ganglion, à l'inverse, la concentration en S1P est très faible notamment du fait de la présence d'une S1P lyase (Schwab et al., 2005). La chimio-attraction des LT, exprimant S1P1 et attirés par S1P, peut donc entraîner un déplacement de ces cellules du ganglion vers la lymphe et, à terme, vers le sang. Le rôle essentiel de l'interaction S1P-S1P1 dans la sortie des LT des ganglions lymphatiques a notamment été mis en évidence par le transfert adoptif de thymocytes matures n'exprimant pas S1P1. Ces derniers s'accumulent alors dans les ganglions (Pham et al., 2008).

L'expression membranaire de ces récepteurs aux chimiokines est régulée par l'intensité des signaux perçus. Ainsi, une internalisation du récepteur après stimulation par son ligand est généralement observée (Hanyaloglu and Zastrow, 2008). Il a par exemple été montré que l'internalisation du CCR7 s'effectue *via* des vésicules de clathrine, le ligand étant dégradé dans les lysosomes, tandis que le récepteur est recyclé à la membrane plasmique (Otero et al., 2006). Au sein du ganglion, l'expression de CCR7 à la surface des LT diminue progressivement du fait de la présence en grande quantité de son ligand. Le même type de régulation d'expression pourrait expliquer le rôle joué par S1P1 dans la sortie des LT des ganglions. En effet, la grande quantité de S1P présente dans le sang, en comparaison de celle détectée dans les ganglions, pourrait expliquer, en absence d'antigène, la plus forte expression de S1P1 à la surface des LT ganglionnaires et donc leur déplacement des ganglions vers les vaisseaux (Figure 4).

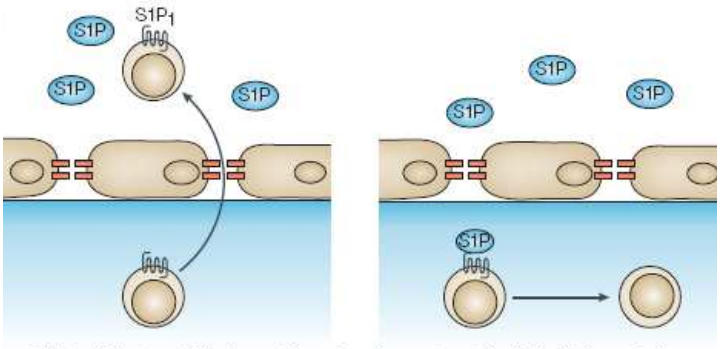


Figure 4: Régulation de la mobilité des LT par la présence de S1P

D'après (Rosen and Goetzl, 2005).

Des différences existent entre les LT naïfs et les LT mémoires en terme de molécules nécessaires à la migration, dont je vais donner ici quelques exemples. Les LT naïfs et les LT mémoires expriment le récepteur aux chimiokines CXCR4, dont le ligand CXCL12 (ou SDF-1) est présent dans les ganglions et plus particulièrement à l'interface de la zone T et de la zone B. Une étude suggère que l'expression du CXCR4 permet l'accès aux ganglions de LT mémoires générés *in vitro* et non de LT naïfs (Scimone et al., 2004). Deux autres exemples impliquent la régulation de l'expression d'une chimiokine et non celle de son récepteur. Les LT mémoires expriment la chimiokine XCL1 contrairement aux LT naïfs. Celle-ci permet le recrutement sélectif des DC $CD8\alpha^+$ qui sont très performantes pour effectuer de la présentation croisée des antigènes chez la souris et chez l'homme (Dorner et al., 2009; Crozat et al., 2010). Enfin, les LT mémoires expriment plus rapidement la chimiokine CCL5 en réponse à une stimulation antigénique que les LT naïfs. Ceci est dû à un stockage important d'ARNm de CCL5 dans les LT mémoires. Ceci pourrait permettre d'attirer plus rapidement sur place d'autres acteurs de la réponse immunitaire (Swanson et al., 2002; Walzer et al., 2003). Ces données démontrent que le réseau moléculaire en place dans les LT mémoires diffère de celui observé dans les LT naïfs. Il agit à deux niveaux : en régulant de manière intrinsèque les capacités circulatoires des LT, mais aussi en contrôlant la migration d'autres acteurs cellulaires de l'immunité. L'ensemble participe à la plus grande efficacité de la réponse générée par des LT mémoires.

II.1.1.b. Adressage des LT

L'entrée des LT dans les OLS est un processus séquentiel dépendant d'interactions moléculaires sélectives. Les acteurs centraux de ce processus sont les molécules d'adhésion d'une part et les récepteurs aux chimiokines d'autre part. D'un point de vue mécanistique, ce phénomène, appelé homing ou écotaxie, est particulièrement bien décrit pour les LT dans les ganglions lymphatiques périphériques (ex: ganglions inguinaux, brachiaux, axillaires). Les LT gagnent le cœur d'un ganglion au niveau de micro-vaisseaux sanguins spécialisés nommés HEV (High Endothelial Veinules). Le flux sanguin y est beaucoup plus faible et favorise alors l'occurrence d'interactions moléculaires entre les cellules endothéliales et les LT, nécessaires à l'entrée de ces derniers (Andrian and Mempel, 2003).

La molécule d'adhésion clé de l'entrée d'un LT dans un ganglion est la L-sélectine (ou CD62L). Elle constitue le premier contact avec l'endothélium et permet l'attachement du LT sur cette surface. Elle est exprimée sur les LT naïfs, mais aussi sur les Tcm. Il s'agit d'une molécule d'adhésion transmembranaire appartenant à la famille des lectines de type C. Ses ligands sont des addressines exprimées à la surface des HEV nommées PNAd (peripheral

lymph node addressine), telles que CD34 et Glycam-1 (Glycosylated Cell Adhesion Molecule 1). L'absence d'expression de CD62L induit une forte diminution du nombre de LT dans les ganglions périphériques provenant d'un défaut sévère d'adhésion sur les HEV (Arbonés et al., 1994). Il est intéressant de noter qu'une petite proportion de LT conserve la capacité d'entrée dans les ganglions lymphatiques. Ceci peut s'expliquer par le fait que d'autres mécanismes minoritaires peuvent y être associés. L'attachement CD62L/PNAd est faible et insuffisant, bien que nécessaire, pour entraîner un arrêt ferme sur les cellules endothéliales (Warnock et al., 1998). Il favorise un ralentissement des LT qui, sous la pression du flux sanguin, vont se mettre à rouler lentement le long de l'endothélium. Cette phase est nommée « rolling ».

La deuxième molécule d'adhésion majoritairement impliquée dans le homing intra-ganglionnaire est l'intégrine hétéro-dimérique LFA-1 (lymphocyte function associated antigen 1) ($\alpha_L\beta_4$). Elle intervient dans un second temps pour permettre l'arrêt stable des LT sur l'endothélium. Elle est exprimée par les LT naïfs et les LT mémoires et reconnaît le ligand ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) notamment exprimé sur les cellules endothéliales. Les LT circulants du sang exposent des formes au repos de ces intégrines caractérisées par une conformation de faible affinité pour le ligand. Leur activation s'effectue *via* deux procédés : par augmentation d'affinité pour le ligand, ainsi que par un mouvement latéral dans la membrane menant à leur agrégation dans une zone restreinte et une augmentation de l'avidité globale (Hogg et al., 2011). Le premier permet l'arrêt des LT à la surface de l'endothélium, puis le deuxième favorise l'adhésion stable des cellules. *In vivo* dans un modèle murin où le gène codant pour LFA-1 a été invalidé, le homing intra-ganglionnaire des LT est sévèrement affecté (Berlin-Rufenach et al., 1999). L'activation de l'intégrine LFA-1, permettant l'arrêt et l'adhésion ferme des LT à la surface de l'endothélium, nécessite la stimulation préalable de la cellule par un récepteur aux chimiokines.

Le récepteur aux chimiokines impliqué dans le homing intra-ganglionnaire des LT n'est autre que le CCR7. Il agit cette fois comme un signal d'activation du LT. Dans ce contexte, les chimiokines CCL19/CCL21 perçues sont produites par les cellules stromales entourant les HEV et diffusent vers la surface luminale des HEV, transitant par les cellules endothéliales (Baekkevold et al., 2001; Carlsen et al., 2005). Notons que chez la souris CCL21 pourrait également être produite par les cellules endothéliales des HEV dans lesquels des ARNm codant cette protéine ont été détectés par hybridation in situ (Gunn et al., 1998). La phase de rolling pourrait permettre l'accumulation suffisante de signaux chimiokiniques ou la détection d'une zone riche en chimiokines sur l'endothélium par les LT, préparant l'arrêt complet de ces derniers. En effet, dans un modèle murin où les gènes codant pour CCL19 et CCL21 sont

invalidés, le modèle plt/plt, on observe un blocage de l'arrêt des LT sur l'endothélium, réversible par injection de CCL21. Il est intéressant de noter que le rolling n'est en rien affecté dans ces expériences (Stein et al., 2000). L'arrêt des LT à la surface des HEV est principalement permis par la fonction de signalisation du CCR7. Elle a pour conséquence l'activation des intégrines permettant l'arrêt et l'adhésion ferme des LT sur l'endothélium (Figure 5).

La phase suivant l'adhésion ferme, est nommée transmigration et a pour finalité le franchissement des vaisseaux sanguins. Elle est rendue possible par la polarisation du LT suite, elle aussi, à la stimulation du récepteur CCR7. Ainsi, la cellule acquière une polarité antéro-postérieure caractérisée par un large lamellipode plat à l'avant et un uropode étroit à l'arrière. Les LT migrent alors le long de la face luminale des cellules endothéliales (crawling) pour finir par pénétrer au sein du ganglion (extravasation). De façon intéressante, une étude *in vitro* suggère que les LT mémoires transmigrent plus efficacement que les LT naïfs au travers d'une barrière endothéliale stimulée pour mimer un état inflammatoire. Ceci pourrait être imputé à leur meilleure capacité à produire de fins filipodes facilitant leur adhésion et leur progression (Shulman et al., 2009).

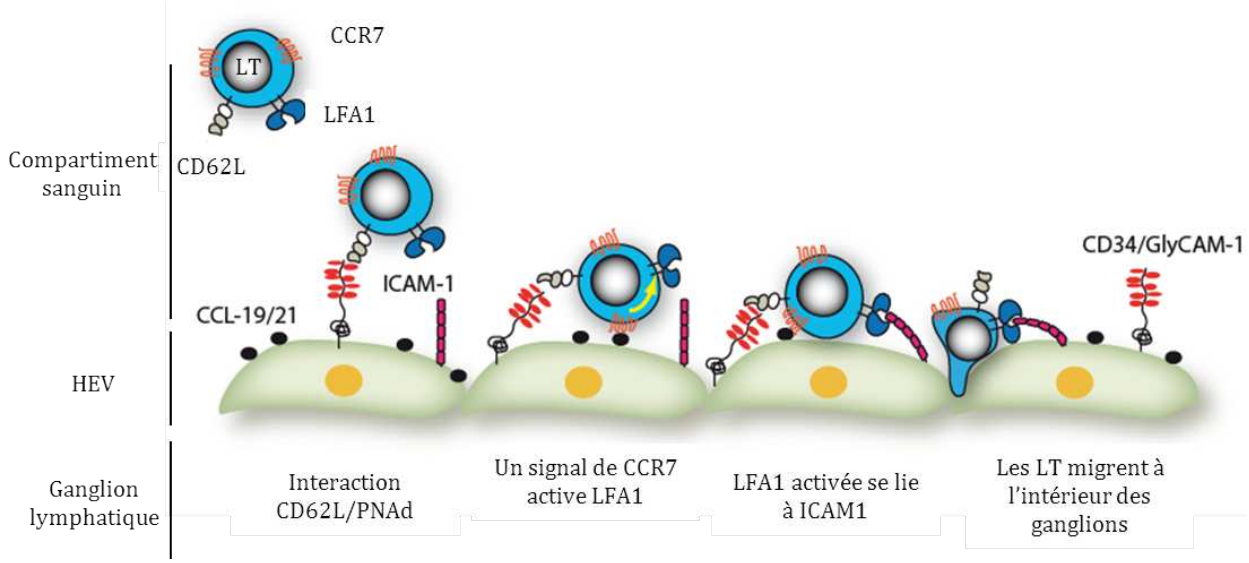


Figure 5: Homing des LT dans les ganglions lymphatiques

L'un des facteurs de transcription clé de la propriété de circulation des LT est Klf2 (Krüppel like factor 2). Il est exprimé dans des LT naïfs et dans les LT mémoires (Grayson et al., 2001). Klf2 régule l'expression des gènes CD62L, CCR7 et S1P1. Par ailleurs, il a été impliqué dans l'inhibition de l'expression de récepteurs aux chimiokines inflammatoires tels

que CCR5 (Sebzda et al., 2008). Ainsi, Klf2 favorise la circulation des LT au sein des OLS et semble, parallèlement, pouvoir inhiber la localisation des LT dans les tissus non lymphoïdes (Carlson et al., 2006; Bai et al., 2007). L'ensemble de ces données implique que la régulation même de Klf2 participe au contrôle de la capacité migratoire des LT. Nous verrons que les facteurs FoxOs sont des acteurs centraux de cette régulation.

II.1.2. La survie

La survie des LT est soutenue par des interactions avec des facteurs solubles cytokiniques et/ou d'une stimulation du TCR par les antigènes du soi. La signalisation en aval de cette double stimulation (cytokines et TCR) est très finement régulée afin de ne pas donner lieu à une prolifération lymphocytaire intempestive. Elle peut toutefois induire une prolifération dans certains contextes, tels que la lymphopénie, afin de maintenir l'homéostasie. Dans l'idée de comparer des LT naïfs et des LT mémoires issus d'une réponse spécifique à l'antigène, je ne présenterai ici que les mécanismes démontrés dans un système physiologique au repos.

II.1.2.a. L'IL7, signal crucial de la survie des LT quiescents

La cytokine clé du contrôle de la survie des LT quiescents est l'IL7. Elle est produite par les cellules stromales présentes dans la zone T des OLS où sont recrutés les LT. En effet, il a été montré que la co-culture *in vitro* de ces cellules stromales et de LT promeut la survie de ces derniers. Ce maintien est inhibé si l'on bloque le signal IL7 (Link et al., 2007). Les LT naïfs et mémoires expriment son récepteur spécifique, l'IL7R. Ce dernier appartient à la famille des récepteurs aux interleukines de type 1 composées de l'IL2, l'IL4, l'IL9, l'IL15 et l'IL21. Les récepteurs de ces interleukines ont pour point commun d'être constitués de plusieurs sous unités dont l'une est la chaine commune γ (γc ou CD132). La spécificité de l'IL7R est assurée par sa chaîne α (IL7Rα ou CD127) (Overwijk and Schluns, 2009; Rochman et al., 2009).
De nombreux travaux attestent du rôle primordial de l'IL7 dans la survie des LT naïfs et des LT mémoires. Les LT survivent moins bien lorsqu'un anticorps monoclonal bloquant l'IL7 est injecté (Vivien et al., 2001). Des LT déficients en IL7R transférés dans un hôte sauvage survivent également beaucoup moins bien (Schluns et al., 2000). Par ailleurs, alors que l'invalidation de l'IL7R n'affecte pas la différenciation de LT naïfs en LT mémoires spécifiques d'un antigène, ces derniers disparaissent progressivement du fait d'un défaut de survie (Carrio et al., 2007; Osborne et al., 2007).

L'ensemble de ces résultats soulève un point particulièrement intéressant dans le cadre de la description de l'état de quiescence d'un LT. L'expression du CCR7 par les LT leur permet d'accéder aux zones T où est exclusivement produite l'IL7, facteur de survie des LT exprimant l'IL7R. Ainsi, la circulation des LT est indispensable pour qu'ils puissent percevoir des signaux de survie. Il existe donc une dépendance vitale des LT quiescents à circuler dans les compartiments T des OLS. Ceci est notamment évident dans les modèles murins invalidés pour les gènes CD62L, CCR7 ou Klf2 où le nombre de LT diminue. Dans les LT quiescents, il existe donc un couplage entre survie et migration.

La signalisation en aval de l'IL7R implique deux voies majoritaires : la voie PI3K et la voie Jak (Janus kinase)/Stat (signal transducer and activator of transcription), et plus particulièrement, Jak1/Jak3 et Stat5 (Pallard et al., 1999). Ces deux voies de signalisation régulent la survie cellulaire en inhibant la voie mitochondriale de l'apoptose : elles induisent une régulation positive de l'expression des molécules anti-apoptotiques Bcl2 (B cell lymphoma 2) et MCL1 (myeloid cell leukemia sequence 1), ainsi qu'une inhibition des molécules pro-apoptotiques Bid (bH3-interacting domain death agonist), Bim (Bcl2 interacting merdiator of cell death) et Bad (Bcl2 antagonist of cell death) (Figure 6). Des preuves expérimentales obtenues *in vivo* confortent ces mécanismes de régulation. Ainsi, le croisement d'un modèle murin où le gène de l'IL7R a été invalidé avec un modèle transgénique pour Bcl2 restaure le nombre de LT présents en périphérie (Akashi K et al 1997, Marakovsky E et al 1997). Notons cependant que la surexpression de Bcl2 ne suffit pas à restaurer totalement le compartiment T en absence du signal IL7. Ceci peut notamment refléter le rôle du signal IL7 dans le métabolisme du glucose (Cf. Chapitre II/1.3). Des résultats comparables ont été obtenus avec un modèle de souris déficiente pour le gène Bim (Pellegrini et al 2004).
Cette balance entre facteurs pro et anti-apoptotiques est également effective dans les LT mémoires puisque ces cellules expriment fortement Bcl2 et la molécule pro-apoptotique Bax par exemple (Bcl-2-associated X protein) (Grayson et al., 2001). Cependant, leurs expressions sont plus fortes dans les LT mémoires que dans les LT naïfs. L'expression même de l'IL7R est très légèrement plus forte dans les LT mémoires. Ceci suggère une mise en place du réseau moléculaire permettant le maintien en quiescence, spécifique à chaque sous-population de LT.

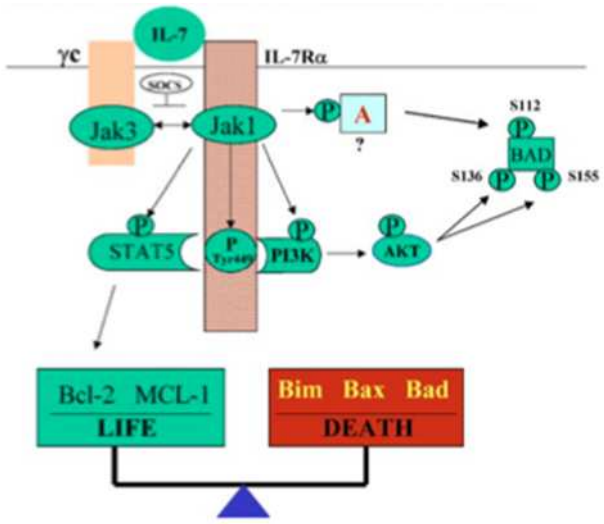


Figure 6: Régulation de la survie en aval de l'IL7R

D'après (Jiang et al., 2005)

La régulation de la signalisation par l'IL7R se fait par un contrôle de l'expression de sa chaine spécifique. En présence du ligand IL7, on constate une diminution de l'expression membranaire de l'IL7R dû à un arrêt de la transcription du gène codant la chaîne α. Ceci implique notamment la liaison du répresseur transcriptionnel GFI1 (Growth factor independent 1) sur le promoteur de l'IL7Rα et la répression de sa transcription subséquente (Park et al., 2004). Cette diminution transitoire de l'expression de l'IL7R favorise la perception du signal IL7 et donc la survie d'un plus grand nombre de LT. Ce mécanisme pourrait participer à assurer la polyclonalité du compartiment T.

Le contrôle de l'expression de l'IL7Rα implique d'autres acteurs moléculaires dont les facteurs FoxOs que j'évoquerai ultérieurement. Je tiens à discuter ici du rôle du facteur de transcription FoxP1, membre de la famille Forkhead, dans le maintien de la quiescence des LT. L'invalidation du gène codant FoxP1 aboutit à une légère augmentation de l'expression de l'IL7Rα. Dans ces conditions, le signal IL7 perçu par les LT naïfs n'est plus uniquement un signal de survie, mais entraîne également leur prolifération/différenciation (Feng et al., 2010, 2011). Il est donc envisageable que l'expression et l'activité de FoxP1 participe au maintien de la quiescence des LT, en régulant intrinsèquement le seuil de prolifération/différentiation des LT induit par l'IL7.

II.1.2.b. D'autres signaux participent au maintien de la survie de façon dépendante du stade de différenciation des LT

Selon le stade de différenciation du LT, l'environnement fournit d'autres signaux nécessaires à la survie de ces cellules. La survie des LT naïfs nécessite un signal supplémentaire impliquant des interactions cellulaires directes : l'engagement du TCR par des complexes CMH/peptide du soi. Ces complexes sont exposés à la surface des cellules stromales (classe I) ou des cellules présentatrices d'antigène (classe II). Dans un modèle murin où le cluster génique codant le CMH de classe I est absent, un défaut de survie des LT $CD8^+$ est observable (Takada and Jameson, 2009). Ceci a été également démontré pour les LT $CD4^+$ dont la survie dépend d'interactions TCR/peptide du soi/CMH de classe II (Martin et al., 2006).

Ce signal n'est pas impliqué dans la survie des LT mémoires (Murali-Krishna et al., 1999; Wiehagen et al., 2010), tout au moins ceux générés après une infection aigüe. Par ailleurs, bien que longtemps débattu, il est aujourd'hui admis que la présence de l'antigène spécifique n'est pas nécessaire à leur survie (Lau et al., 1994). Notons que les Tcm et les Tem nécessitent des signaux différents pour leur survie. Ceux présentés ici concernent principalement les Tcm circulant au sein des OLS.

Une autre cytokine est impliquée dans la subsistance à long terme de cette population mémoire : l'IL15. Bien qu'elle semble participer à la survie des LT mémoires, elle régule principalement le lent auto-renouvellement (ou prolifération homéostatique) de ces cellules. Cette particularité tranche véritablement avec les propriétés des LT naïfs et sous-tend leur maintien à très long terme. Cela vaut également aux LT mémoires d'être comparés de plus en plus souvent avec les cellules souches. L'IL15 est produite par une variété de cellules non lymphoïdes comme les FRC ou des macrophages, mais aussi par des cellules lymphoïdes comme les DC activées. L'IL15R possède non seulement la chaîne commune γ, mais partage en plus sa chaîne β avec l'IL2R. Cette dernière est plus exprimée sur les LT mémoires que sur les LT naïfs. La spécificité de ce récepteur vient donc de sa chaîne α. Ainsi, dans un modèle murin déficient en IL15 ou en IL15Rα, le nombre de cellules mémoires générées après infection n'est pas affecté, mais décroit au cours du temps *via* un défaut de leur capacité à proliférer. De la même façon que l'IL7R, la signalisation en aval de l'IL15R implique une régulation des membres de la famille Bcl2 (Becker et al., 2002; Yajima et al., 2002). Ainsi, le rôle de l'IL15 est partiellement redondant de celui de l'IL7, mais surtout complémentaire. En effet, le défaut en terme de nombre de LT $CD8^+$ mémoires est plus prononcé dans un modèle déficient pour l'IL15 injecté avec un anticorps bloquant l'IL7 (Goldrath et al., 2002).

Notons que d'autres cytokines sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie des LT mémoires tels que l'IL2, rendant ce processus plus complexe qu'il n'y paraît ici (Ku et al., 2000).

II.1.3. Le métabolisme

L'activité métabolique des LT quiescents (naïfs et mémoires dans ce cas), bien que modeste, est suffisante pour soutenir des propriétés fondamentales de ces cellules telles que la survie et la migration. Les LT captent à bas bruit du glucose, des acides aminés et des acides gras qui constituent la matière première permettant de générer de grandes quantités d'ATP (adénosine triphosphate) dans leurs mitochondries. Cette transformation se fait *via* le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative, ainsi qu'une glycolyse modérée. Les cellules conservent aussi un stock de précurseurs biosynthétiques, pour le renouvellement des membranes par exemple (Michalek and Rathmell, 2010) (Figure 7). Le maintien de ce phénotype est entièrement dépendant de signaux extérieurs perçus par les récepteurs aux cytokines, le TCR et les récepteurs aux chimiokines. La disponibilité en nutriments passe alors en second plan. La régulation du métabolisme est ainsi directement couplée à des signaux fondamentaux pour d'autres propriétés des LT, comme la migration et la survie. En l'absence de ces signaux, les LT sont incapables de capter le glucose extracellulaire et de maintenir une activité catabolique, et ce même en présence de nutriments. Ceci conduit à l'atrophie cellulaire et éventuellement à l'apoptose des LT (Rathmell et al., 2000).

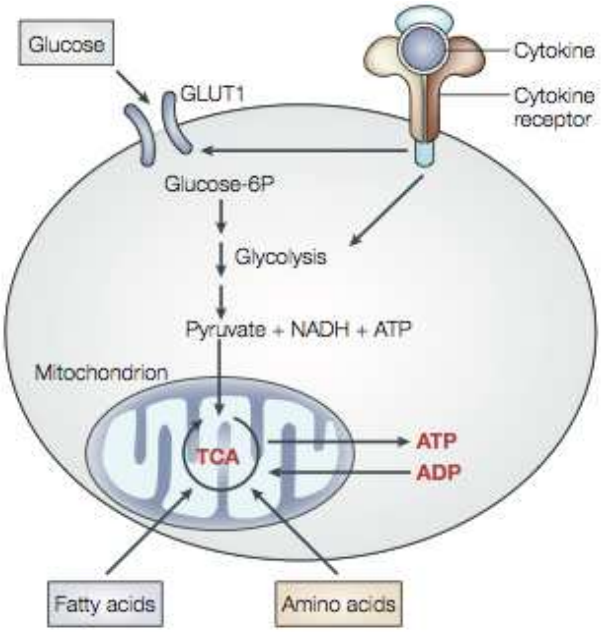


Figure 7: Métabolisme catabolique des LT quiescents

D'après (Fox et al., 2005).

L'interleukine 7 (IL7) est particulièrement importante pour le maintien de l'activité métabolique des LT en quiescence exprimant l'IL7R (Rathmell et al., 2001; Jacobs et al., 2010). En aval de l'IL7R, les voies PI3K et Jak/Stat agissent à nouveau conjointement pour supporter l'apport énergétique nécessaire aux cellules. Le maintien d'une stimulation de l'IL7R par son ligand induit progressivement une activation modérée et persistante de la protéine Akt par Stat5 *via* un mécanisme non identifié. Akt, alors activé, régule le trafic intracellulaire du transporteur de glucose Glut1, promouvant sa localisation membranaire et la capture de glucose extracellulaire. La légère stimulation du TCR régule, quant à elle, Glut1 au niveau transcriptionnel (Wofford et al., 2008). La voie PI3K/Akt est aussi activée en aval des récepteurs aux chimiokines suggérant un rôle potentiel de ce signal dans ces processus. Cependant, il est probable que ces récepteurs affectent indirectement le métabolisme des LT, de par leur rôle dans la migration dirigée de ces cellules vers des zones riches en signaux cytokiniques.

L'autophagie, c'est-à-dire la dégradation de constituants protéiques cytosoliques par digestion lysosomale, a également un rôle important dans la survie des LT. En effet, l'invalidation du gène codant l'Atg5 (autophagy protein), protéine impliquée dans la formation de l'autophagosome, diminue le nombre de LT périphériques. De plus, les LT $CD8^+$ restants en périphérie sont très sensibles à la mort par apoptose (Pua et al., 2007). Il est possible d'imaginer que lorsque les LT quiescents ne sont pas au contact de leurs signaux de survie, dans les vaisseaux notamment, et/ou lorsque leur expression de l'IL7R est diminuée, l'apport énergétique soit issu de l'autophagie. De plus, l'autophagie régule la quantité de mitochondries présentes au sein d'un LT, ce qui affecte notamment la balance des membres de la famille Bcl2 (Pua et al., 2009).

Peu d'études se sont attachées à comparer plus finement l'activité métabolique entre les LT naïfs et les LT mémoires. Très récemment, une équipe a observé de claires différences entre ces deux populations en comparant la capacité mitochondriale à produire de l'énergie supplémentaire, utilisable par la cellule en conditions de stress ou d'activité intense. Cette capacité peut être induite par l'IL15 dans les LT mémoires, où elle y est plus développée que dans les LT naïfs. Ceci se traduit au moins à deux niveaux : quantitativement par un plus grand nombre de mitochondries et qualitativement par l'expression favorisée de molécules impliquées dans l'oxydation des lipides (van der Windt et al., 2012). D'ailleurs, une étude récente montre que l'induction d'un régime métabolique de type oxydation des lipides est

nécessaire à la génération des LT mémoires (Pearce et al., 2009). Deux acteurs principaux ont pour l'instant été impliqués : l'AMPK (AMP-activated kinase) et mTor (mammalian target of rapamycin), respectivement dans l'oxydation des lipides et la glycolyse. Ainsi, l'activation de l'AMPK, par la metformine[1], promeut la génération des LT mémoires et la protection qu'ils confèrent en réponse secondaire. Ce phénotype est également observé suite à l'inhibition de mTor par la rapamycine[2] utilisée à faible dose dans les huit premiers jours d'une réponse immune ou à forte dose à partir du pic de l'expansion clonale (Pearce et al., 2009; Araki et al., 2009). Il est envisageable que ces adaptations métaboliques des LT mémoires soient nécessaires au maintien et à la réponse secondaire plus rapide de ces cellules.

L'AMPK semble avoir un rôle important dans le maintien de la quiescence non seulement des LT mémoires mais aussi des LT naïfs. Elle peut être activée en conditions de stress par une sérine/thréonine kinase nommée LKB1 (liver kinase B1). Dans un modèle murin où le gène codant LKB1 est invalidé, une faible proportion de LT $CD8^+$ est détectée en périphérie, notamment suite à un défaut de développement dans le thymus. Ces LT captent de fortes quantités de glucose et présentent un haut niveau d'activité glycolytique. De plus, ils présentent un phénotype activé, exprimant le marqueur d'activation CD69, et sont capables de produire de l'IFNγ (MacIver et al., 2011). Ceci soulève donc un lien étroit entre métabolisme et maintien en quiescence des LT $CD8^+$.

II.1.4. Le cycle cellulaire

Les cellules quiescentes sont classiquement considérées en phase G0 du cycle cellulaire. La progression en phase G1 implique plusieurs complexes contenant une kinase dont l'activité dépend de la présence et de l'association à une cycline particulière (CDK pour cyclin dependant kinase). Ainsi, les cyclines de type D associées aux CDK4 et CDK6 initient la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb), facteur inhibiteur de la progression en cycle. Ces complexes peuvent en parallèle séquestrer certains inhibiteurs du cycle, dont p21 et p27 de la famille Cip/Kip. Plus tardivement en G1, le complexe cycline E/CDK2, entre autre du fait de la levée d'inhibition d'activité imposé par les protéines Cip-Kip, phosphoryle pRB sur des sites additionnels. Ceci entraîne la dissociation de pRb des facteurs de

[1] La metformine est une drogue utilisée en thérapie comme anti-diabétique.

[2] La rapamycine est utilisée en thérapie comme drogue immunosuppressive.

transcription de la famille E2F, permettant la transcription de gènes indispensables à l'entrée en phase S (Sherr and Roberts, 1999) (Figure 8).

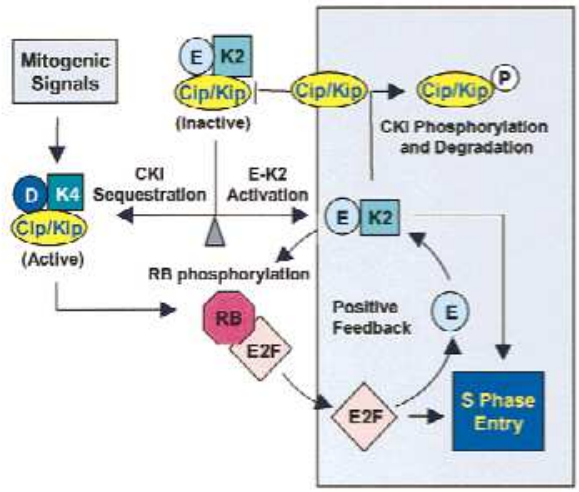


Figure 8: Mécanismes moléculaires impliqués dans la progression de la phase G0/G1 du cycle à la phase S
D'après (Sherr and Roberts, 1999).

Une mise en place différente de ce réseau moléculaire existe entre les LT naïfs et les LT mémoires. Il est démontré qu'une quantité importante de complexes cycline D/CDK6 est pré-synthétisée et déjà assemblée dans les LT mémoires, contrairement aux LT naïfs. Cependant, ils sont séquestrés dans le cytoplasme où ils ne peuvent induire la progression dans le cycle. De plus, l'expression de l'inhibiteur de cycle $p27^{Kip1}$ est beaucoup plus faible dans les LT mémoires comparés aux LT naïfs. Des expériences d'immuno-précipitation ont d'ailleurs montré que, dans ce cas, p27 est préférentiellement associé aux complexes cycline D/CDK (Grayson et al., 2001; Veiga-Fernandes and Rocha, 2003). En plus de cette régulation spécifique d'acteurs moléculaires directement impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, une étude montre que certains gènes exprimés dans la réplication et la réparation de l'ADN sont davantage transcrits dans les LT mémoires comparés aux LT naïfs. C'est également le cas pour des gènes impliqués dans la voie de dégradation protéique *via* le protéasome comme l'ubiquitine ligase mdm2, connu pour son rôle promoteur de la dégradation de l'inhibiteur de cycle p53 (Latner et al., 2004). Ces dispositifs concède donc aux LT mémoires un statut en G1 qui leur permettraient d'entrer rapidement en phase S, d'où l'idée d'un seuil de stimulation plus bas à atteindre pour que les LT mémoires entrent en cycle. Ces mécanismes pourraient participer à l'établissement et la réalisation de la prolifération homéostatique des LT mémoires. Ceci conditionnerait aussi l'entrée en cycle, en réponse à une stimulation antigénique. En effet, une étude corrèle cet état plus avancé dans le cycle des LT mémoires à

une phase G1 plus courte et une entrée en division plus rapide (Veiga-Fernandes et al., 2000). Ceci pourrait expliquer le temps plus court observé entre la reconnaissance de l'antigène et le début de l'expansion clonale lors d'une réponse secondaire. Notons que bien qu'il semble admis que les LT mémoires entrent plus rapidement en cycle, des études montrent que la vitesse de division n'est pas affectée (Stock et al., 2006; Whitmire et al., 2008).

Le maintien des LT mémoires en stade G1 nécessite des signaux extérieurs. Une étude récente pose des bases intéressantes dans cette réflexion. Le maintien des LT mémoires dans un stade plus avancé du cycle cellulaire que des LT naïfs nécessitent des signaux *via* certaines molécules de co-stimulation: CD27 et 4-1BB, membres de la superfamille des récepteurs au TNF (tumor necrosis factor). Les ligands de ces récepteurs sont notamment exprimés à la surface des DC. La suppression de ces signaux, *via* l'inhibition de la voie PI3K/Akt, induit une modification du phénotype de ces LT mémoires qui acquièrent un phénotype naif (Allam et al., 2009). Ainsi, la quiescence au sens strict des LT naïfs et des LT mémoires se fait grâce à la mise en place d'un réseau intracellulaire interactif propre à chacun. Dans le cas des LT mémoires, le maintien en quiescence de type G1 nécessite en plus l'intervention de signaux extérieurs, bloquant une éventuelle réversion en quiescence de type G0.

II.1.5. Structure de la chromatine

L'état de quiescence des LT naïfs et des LT mémoires varie également par la structure de leur chromatine (Figure 9). Ces différences épigénétiques font notamment intervenir la méthylation des îlots CpG présents sur l'ADN et l'acétylation des histones. Notons que d'autres types de modifications peuvent également affecter les histones telles que la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination (Weng et al., 2012).

Je vais ici prendre comme exemple le gène codant l'IFNγ. La sécrétion plus rapide de cette cytokine par les LT mémoires par rapport aux LT naïfs a notamment pour origine une modification de la méthylation du gène. En effet, celui-ci est fortement méthylé, et dans ce cas réprimé, dans les LT naïfs. En revanche, dans les LT mémoires, le gène codant l'IFNγ est constitutivement partiellement déméthylé. Ce statut est d'ailleurs transmis aux cellules filles. Suite à l'activation, ce gène est très rapidement entièrement déméthylé, conduisant à une transcription rapide de l'IFNγ (Fitzpatrick et al., 1999; Kersh et al., 2006). De plus, une autre étude montre qu'une augmentation de l'acétylation des histones du locus de l'IFNγ est impliquée dans la production rapide de cette cytokine par les LT $CD8^+$ mémoires (Northrop et al., 2008). Le point important, souligné par cet exemple, est que le contrôle de la quiescence

au niveau transcriptionnel se fait à deux niveaux. D'une part, il implique l'action de facteurs de transcription et, d'autre part, des modifications de la chromatine. Notons que d'autres gènes, non impliqués dans des fonctions effectrices directes, font aussi l'objet de variations épigénétiques entre les divers stades de différenciation des LT $CD8^+$, comme par exemple l'IL2 ou le CCR5 (DiSpirito and Shen, 2010).

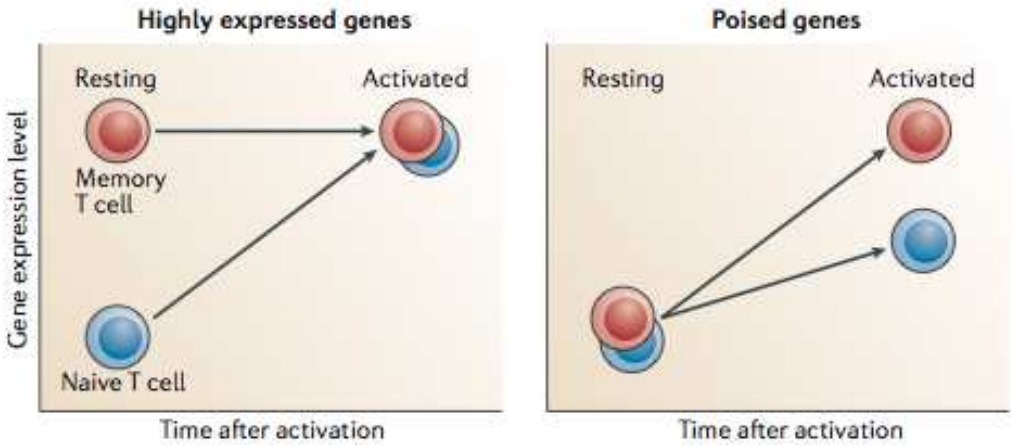


Figure 9: Régulation de l'expression de gènes entre les LT naïfs et les LT mémoires
Certains gènes sont d'emblée plus exprimés dans les LT mémoires. D'autres voient leur expression augmenter plus rapidement et/ou plus fortement après une stimulation antigénique. Ceci peut être le fait de modifications de la chromatine à différents locus.
D'après (Weng et al., 2012)

II.2. Régulation de la quiescence des LT CD8⁺ au cours d'une réponse immune

Du chapitre précédent se dégage deux idées essentielles. D'une part, l'état de quiescence des LT CD8⁺, loin d'être passif, est activement maintenu. Il s'appuie sur un réseau interactif et dynamique d'acteurs moléculaires membranaires et intracellulaires. D'autre part, la quiescence des LT naïfs et des LT mémoires n'est pas identique. Ceci résulte de spécificités des réseaux moléculaires sous-jacents propres à chaque stade de différenciation. Lors de la rencontre avec l'antigène, un changement drastique s'opère au sein des LT quiescents menant à leur entrée en cycle, ainsi qu'à leur différenciation en cellules effectrices. L'activation lymphocytaire T est donc associée à une rupture de la quiescence. Ceci implique deux évènements majeurs : d'une part, la mise en place d'un réseau moléculaire pro-activation et, d'autre part, l'inhibition du programme de quiescence. Les mécanismes impliqués dans le retour à l'équilibre homéostatique sont moins bien compris. Toujours est-il que la fin de réponse est caractérisée par une mort massive par apoptose et la survie d'un petit pool des LT ayant été activés.

II.2.1. Modifications phénotypiques et fonctionnelles associées à l'activation/expansion des LT

La rencontre entre un LT quiescent et une DC présentant l'antigène spécifique aboutit à la formation de la synapse immunologique, structure dynamique dans le temps et l'espace. Cette zone de contact intègre la majorité des signaux activateurs : l'antigène, les molécules de co-stimulation et les cytokines inflammatoires (respectivement signal 1, 2 et 3). Le tout remodèle en profondeur les propriétés des LT.

Tout d'abord, la stimulation efficace des LT implique un changement précoce et transitoire de leur comportement migratoire dépendant de l'activation de la voie PI3K/Akt et de mTor. CD62L est non seulement régulé par le clivage de sa partie extracellulaire rapidement après l'activation du LT, mais également par un arrêt de la transcription de son gène. Conjointement, l'expression des récepteurs aux chimiokines CCR7 et S1P1 est également diminuée (Sinclair et al., 2008). L'ensemble corrèle avec une diminution de l'expression de Klf2 dès les premières heures d'activation. Ce dernier point a notamment été montrée *in vivo* après infection par le virus LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus)(Grayson et al., 2001). D'autres mécanismes sont également à l'œuvre, dont certains lient directement l'acquisition de marqueur d'activation et l'inhibition de molécules exprimées par les LT quiescents. Le relargage d'IFN de type I précocement au cours de la réponse entraîne l'augmentation

d'expression du marqueur d'activation CD69. Ce dernier contrôle négativement l'expression de S1P1 (Shiow et al., 2006). L'ensemble favorise non seulement l'arrêt des LT prolongeant leur contact avec la DC, mais aussi leur rétention dans l'OLS propice à la prolifération/différenciation des cellules activées.

Parallèlement, la nécessité en signaux de survie est modifiée dans ces LT. En effet, l'expression de l'IL7R diminue au cours de l'activation des LT, ce qui corrèle avec la réduction de l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl2 (Grayson et al., 2001; Kaech et al., 2003). Ceci implique une plus grande sensibilité à l'apoptose en absence de signaux de survie adéquat. En parallèle, apparaît transitoirement l'expression de l'IL2R (Kaech et al., 2003). L'IL2 est la cytokine importante de cette phase de croissance cellulaire/expansion clonale et influe la différenciation des LT en cellules effectrices et mémoires (Malek and Castro, 2010). Dans les LT, son expression est induite par une combinaison de signaux activateurs (notamment *via* les facteurs de transcription NFAT et AP-1), mais également par la levée de la répression imposée par le co-activateur transcriptionnel Tob1 (transducer of ErbB2).
Tob1 est fortement exprimé dans les LT quiescents. Il inhibe l'expression de cdk2 et de la cycline E. Parallèlement, il favorise l'expression de $p27^{KIP1}$. De plus, Tob1 peut former un complexe avec certains membres de la famille des facteurs de transcription Smad et, en se fixant sur une séquence inhibitrice du promoteur de l'IL2, réprime la transcription de ce dernier. Ceci corrèle donc avec un maintien de la cellule à l'état de quiescence. La déplétion de Tob1 n'induit par la prolifération spontanée des LT. En revanche, elle permet leur prolifération en aval de la stimulation du TCR seul. La co-stimulation fournit par la molécule CD28 ou la stimulation par la cytokine IL2 n'est plus nécessaire à ce processus. Ainsi, Tob1 impose la présence d'un signal de co-stimulation ou cytokinique pour l'entrée en cycle des LT. L'engagement du TCR et du CD28 provoque la diminution de l'expression de Tob1 en aval des MAPkinases et donc la dé-répression de la transcription de l'IL2. (Tzachanis et al., 2001).

Cette croissance et prolifération massive nécessitent une adaptation des voies métaboliques à l'œuvre dans la cellule, s'orientant vers un régime anabolique. En effet, le besoin en énergie est considérable pour augmenter la synthèse protéique et lipidique nécessaire. L'activation forte de la PI3K et des effecteurs Akt et mTor est un mécanisme central permettant cet apport (Jacobs et al., 2008). L'activation prononcée de la voie PI3K est également détectée en aval de récepteurs aux cytokines tels que l'IL2R (Cornish et al., 2006). Elle participe à l'inactivation de facteurs de quiescence tels que Klf2 et les FoxOs dont nous

reparlerons plus tard. Ce signal est nécessaire à la différenciation en LT effecteurs. En effet, un défaut de la génération de LT cytotoxiques est observé dans un modèle murin où le gène codant la chaîne α du récepteur à l'IL2 a été invalidé (Pipkin et al., 2010). Notons que la différenciation en LT cytotoxiques peut également nécessiter la présence d'autres cytokines telles que l'IL12 (Takemoto et al., 2006). Il serait intéressant de relier ces signaux au processus de rupture de quiescence.

Enfin, les mécanismes de sortie suite à la différentiation en LT effecteurs restent mal compris. Néanmoins, il a été montré que l'expression de S1P1 est nécessaire à la sortie du ganglion des LT. Ayant perdu l'expression de CD62L et CCR7, les LT effecteurs n'ont plus la capacité d'entrer dans les OLS. En parallèle, ces cellules expriment des combinaisons de récepteurs aux chimiokines inflammatoires et molécules d'adhésion, spécifiques de tissus périphériques inflammés. L'invalidation du gène *Klf2* corrèle, par exemple, avec l'expression de récepteurs aux chimiokines inflammatoires tels que CCR5 (Sebzda et al., 2008). Il est donc envisageable que l'inhibition de certains facteurs impliqués dans la circulation des LT quiescents permette leur adressage vers le site de l'infection.

En conclusion, la mise en place des phases d'activation et d'expansion clonale nécessite « une extinction » du/des programme(s) permettant de maintenir la quiescence, parallèlement à l'enclenchement du programme d'activation en réponse l'antigène. Ainsi, la rupture de quiescence est un paramètre important de l'activation des LT quiescents, qu'ils soient naïfs ou mémoires.

II.2.2. Modifications phénotypiques et fonctionnelles associées à la phase de contraction

La phase de contraction permet le retour à l'équilibre homéostatique *via* la mort par apoptose de 90 à 95% des LT spécifiques de l'antigène. Les facteurs qui déclenchent ce processus sont encore mal compris.

La phase de contraction pourrait être la résultante du déclenchement d'un programme d'inhibition de l'activation. Ceci pourrait être le fait de l'expression de molécules inhibitrices type PD-1 ou de la présence de cytokines type TGF-β. Prenons pour exemple la molécule de co-stimulation CTLA-4, un homologue de CD28 capable de se lier aux mêmes ligands, qui est

exprimée à la surface des LT deux à trois jours après activation. Cette protéine a été impliquée dans l'inhibition de l'activation et de la prolifération au cours de l'expansion (Walunas et al., 1994). Il est envisageable que l'expression de CTLA-4 et sa signalisation bloquent les signaux de survie induits par le TCR et CD28, ce qui pourrait participer à la mort des LT dans le contexte peu décrit d'une fin de réponse.

Il a été suggéré que l'élimination de l'antigène puisse être directement impliquée dans le déclenchement de la phase de contraction. Cependant, cette hypothèse est notamment infirmée par une étude dans laquelle des souris on été traitées par un antibiotique 24 heures après avoir été infectées par Listeria monocytogenes. Ce traitement n'affecte ni l'initiation ni la cinétique de la phase de contraction (Badovinac et al., 2002).

Une autre hypothèse donne un rôle actif à l'inflammation dans la régulation de la phase de contraction, et plus particulièrement à l'IFNγ. Ainsi, dans un modèle de souris déficiente pour l'IFNγ, la mort cellulaire est nettement diminuée lors de la phase de contraction (Badovinac et al., 2000). De plus, une faible inflammation, caractérisée notamment par une production limitée d'IFNγ, en début de réponse aboutit à une quasi absence de phase de contraction (Badovinac et al., 2004). Ceci suggère que la phase de contraction peut également être contrôlée précocemment au cours de la réponse.

Enfin, il a été proposé que la déprivation en facteurs de survie des LT $CD8^+$ puisse induire la mort cellulaire caractéristique de la phase de contraction. Ainsi, la présence d'un signal IL15 ou IL2 durant la phase de contraction protège les cellules de la mort (Blattman et al., 2003; Yajima et al., 2006). Notons que cette hypothèse n'est pas encore totalement admise. Une étude montre par exemple que la modification du rapport nombre de cellules/quantité de ressources disponibles n'affecte pas la phase de contraction (Prlic and Bevan, 2008).

La déprivation en signaux de survie est notamment responsable de l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose *via* l'induction de la molécule pro-apoptotique Bim. Or, il a été montré que Bim joue un rôle crucial dans la phase de contraction. En effet, son invalidation entraîne une accumulation de LT en fin de réponse après infection virale ou bactérienne (Hildeman et al., 2002; Pellegrini, 2003). L'expression de Bim ne variant pas, il est proposé que la diminution de l'expression de Bcl2 au cours de l'activation modifie la balance mort/survie des LT, qui, en fin de réponse, bascule vers l'apoptose induite par Bim (Grayson et al., 2001; Hildeman et al., 2002).

Une autre protéine a été suggérée comme impliquée dans la phase de contraction qui cette fois fait intervenir la voie extrinsèque d'induction de l'apoptose : Fas (Strasser et al.,

2009). Cependant, l'invalidation du gène codant pour cette molécule ne semble pas affecter la phase de contraction (Pellegrini, 2003). Ceci peut être expliqué par le fait qu'en fin de réponse, la diminution de la charge en pathogène entraîne une plus faible stimulation du TCR. Or, Fas a été majoritairement impliqué dans le mécanisme d'AICD, c'est-à-dire de mort induite suite à l'activation du LT. Des études récentes suggèrent en fait que Fas aurait un rôle de soutien de Bim dans l'induction de la phase de contraction dans le cas d'infections chroniques (Green, 2008).

La phase de contraction pourrait aussi être vue comme résultant de la réexpression des facteurs de quiescence. Au lieu de favoriser un retour en quiescence, l'expression de ces facteurs dans un contexte de cellules activées, voire en prolifération, pourrait entraîner le déclenchement d'un arrêt de la prolifération et, éventuellement, d'un programme de mort. On serait face à une sorte d'impossibilité de la cellule à conjuguer les signaux de prolifération et de quiescence. Regardons de plus près certains facteurs de quiescence.

Le facteur de quiescence Klf2 est à nouveau exprimé dès le pic de l'expansion clonale d'une réponse immune, comme observé à jour 8 post infection par le virus LCMV (Grayson et al., 2001). Il a été observé *in vitro* que l'expression forcée et non régulée de Klf2 dans des cellules prolifératives (en l'occurrence une lignée cellulaire) aboutit à un arrêt de leur prolifération (Buckley et al., 2001; Wu and Lingrel, 2004). Cependant, l'absence d'expression de Klf2 ne semble pas affecter la cinétique d'une réponse immune *in vivo* (Takada et al., 2011).

Un autre exemple est l'inhibiteur du cycle $p27^{KIP1}$, qui est notamment une cible transcriptionnelle de Klf2. Il a été montré *in vivo* que l'invalidation du gène codant $p27^{KIP1}$ entraîne un délai dans l'enclenchement de la phase de contraction. De plus, elle améliore quantitativement et qualitativement l'efficacité d'une réponse secondaire (Singh et al., 2010a). $p27^{KIP1}$ semble donc agir comme un régulateur négatif de la réponse immune : il favorise un retour à l'équilibre en fin de réponse. Ceci peut également être rapproché du fait qu'*in vitro*, dans une lignée cellulaire T, une déprivation en cytokine entraîne un arrêt de prolifération induit par $p27^{KIP1}$ qui peut précéder une apoptose induite par Bim (Dijkers et al., 2002).

Ainsi, il est envisageable qu'une certaine combinaison de facteurs de quiescence puisse dans des LT activés et/ou en prolifération, induire un arrêt de leur prolifération découlant potentiellement sur un programme de mort. Ceci s'effectuerait en conjonction des autres éléments impliqués dans la phase de contraction évoqués ci-dessus.

II.2.3. Modifications phénotypiques et fonctionnelles associées à la différenciation en LT mémoires

La fin d'une réponse immune est également caractérisée par la subsistance de 5 à 10% des LT activés qui représentent le pool de cellules mémoires. La différenciation en LT mémoires fait elle aussi intervenir de nombreuses hypothèses.

La plupart de ces hypothèses sont des variantes de deux modèles principaux non exclusifs au vu des diverses observations expérimentales : le modèle de différenciation linéaire et le modèle de différenciation ramifiée (Gerlach et al., 2010; Manjunath et al., 2001) (Figure 10). Le premier implique une différenciation progressive des LT passant d'un état naïf, à un état effecteur puis mémoire. Le modèle de différenciation ramifiée, quant à lui, suggère que les LT mémoires émergent directement des LT naïfs, au même titre que les LT effecteurs. Une des variantes de ce modèle implique une première division cellulaire asymétrique, engendrant une répartition inégale des composants intracellulaires dans les cellules filles. La cellule dérivant du pôle apical, c'est-à-dire du côté où s'est formée la synapse immunologique, présente des caractéristiques de LT effecteurs. Inversement, la cellule dérivant du pôle basal s'apparente à un LT mémoire (Chang et al., 2007).

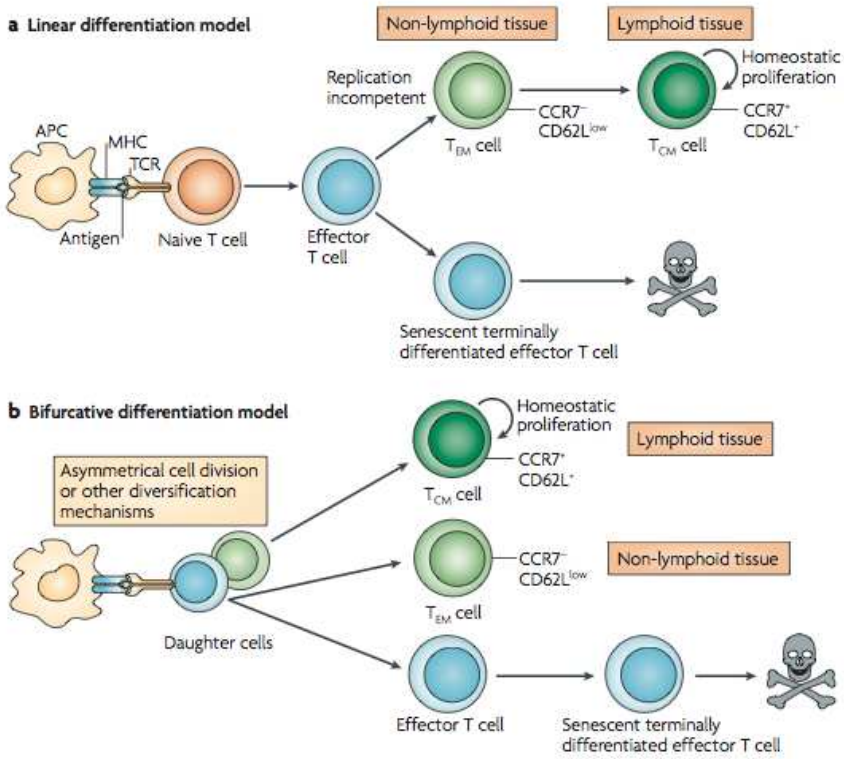


Figure 10: Modèles principaux proposés pour la différenciation des LT mémoires

D'après (Ahmed et al., 2009)

L'intégration des signaux 1, 2 et 3 d'activation a un rôle crucial dans la génération de LT effecteurs ou de LT mémoires. Les modulations spatiales et temporelles de ces signaux, ainsi que leur nature, participent à la régulation de cette balance LT effecteurs/LT mémoires. Elles induisent une grande diversité au sein des LT effecteurs au pic de l'expansion clonale. En effet, deux populations ont été décrites à ce stade : les SLECs (short-lived effector cells) et les MPECs (memory precursor effector cells). Les premiers sont à l'origine des LT effecteurs à courte durée de vie, tandis que les seconds sont à l'origine des LT mémoires (Figure 11). Différents paramètres peuvent donc affecter la génération de LT effecteurs *versus* LT mémoires. Une stimulation prononcée et/ou répétée du TCR, ainsi qu'une forte inflammation (IFNγ, IL12 par exemple) favorisent par exemple la génération de SLECs. L'inverse incline davantage la balance du côté d'une différenciation en MPECs, de même qu'une diminution de la durée de l'infection (Badovinac et al., 2004; Sarkar et al., 2007; Cui et al., 2009). De plus, certaines molécules de co-stimulation peuvent aussi intervenir, comme OX-40 qui favorise la génération de LT mémoires (Mousavi et al., 2008). Enfin, la coordination des différents signaux est aussi très importante dans l'établissement de cette balance. Ainsi, la stimulation du TCR et la perception de signaux inflammatoires par le LT doit s'établir de façon quasi simultanée pour favoriser la génération de LT effecteurs tardifs (Sarkar et al., 2008; Pham et al., 2009).

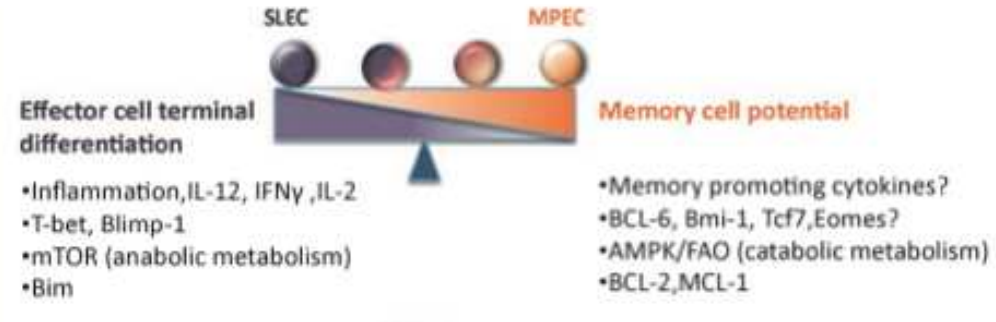


Figure 11: Signaux et mécanismes sous-jacents à la balance entre SLECs et MPECs
D'après (Cui and Kaech, 2010)

Outre les signaux extracellulaires, l'expression et l'activité d'un réseau moléculaire intracellulaire interactif influencent également la balance LT effecteurs/LT mémoires. Prenons pour exemple deux facteurs de transcription qui ont été particulièrement étudiés du fait de leur rôle dans la régulation des fonctions effectrices des LT $CD8^+$ et dans la différenciation en LT mémoires. Il s'agit de T-bet et Eomes, deux membres de la famille des

facteurs de transcription à «boîte T». Ils agissent de façon coopérative pour induire les fonctions effectrices des LT $CD8^+$ et leur différenciation en LT mémoires. T-bet favorise la génération d'effecteurs à courte vie et de Tem, tandis qu'Eomes est propice à la génération des Tcm (Cui and Kaech, 2010).

Il semble que la protéine mTor joue un rôle sur cette balance T-bet/Eomes, favorisant une différenciation en LT effecteurs (Rao et al., 2010). En effet, il a été montré que l'inhibition de mTor par la rapamycine est propice à la formation de LT mémoires. L'implication de mTor dans ces processus est cependant plus complexe qu'évoquée. En effet, la génération de LT mémoires est favorisée lorsque l'activité de mTor est inhibée par une faible dose de rapamycine dans les huit premiers jours d'une réponse immune ou par une forte dose à partir du pic de l'expansion clonale (Araki et al., 2009). Ces données sont à rapprocher du rôle des facteurs cytokiniques IL2 et IL15. *In vitro*, la culture de cellules stimulées par l'antigène dans un milieu riche en IL15, ou avec une faible dose d'IL2, conduit à leur différentiation en Tcm. L'inverse est observé pour une forte dose d'IL2 (Manjunath et al., 2001). Ceci corrèle avec la différence d'intensité d'activation de la voie PI3K en aval des récepteurs à l'IL15 et à l'IL2 (Cornish et al., 2006; Sinclair et al., 2008). Ainsi, l'IL2 induit une plus forte activation de la PI3K et donc de mTor, ce qui favoriserait une différenciation en LT effecteurs. Réciproquement, l'IL15 induit une plus faible activation de la voie PI3K menant à une activité modérée de mTor, propice à une différenciation en LT mémoires.

La différenciation en LT mémoires pourrait résulter d'une régulation particulière des facteurs impliqués dans la quiescence dans une petite population de LT activés et/ou LT effecteurs au cours de la réponse. Peu d'observations permettent à l'heure actuelle d'étoffer cette hypothèse. Néanmoins, voici quelques pistes de réflexion.

Dans un modèle murin infecté par le virus LCMV, les premiers jours d'activation des LT sont associés à une diminution drastique des facteurs de quiescence Klf2, Bcl2 et $p27^{KIP1}$. A jour 8 après infection, les LT effecteurs ré-expriment Klf2, Bcl2, mais aussi $p27^{KIP1}$. Au stade mémoire, les LT expriment fortement Klf2 et Bcl2, mais pas $p27^{KIP1}$ (Grayson et al., 2001). Par ailleurs, au pic d'expansion clonale, une faible proportion des LT exprime à nouveau l'IL7R, ce qui corrèle avec l'expression de Bcl2. Ces cellules semblent être les précurseurs des LT mémoires (MPECs) qui survivront à la phase de contraction (Kaech et al., 2003).

Une autre observation en faveur d'une régulation complexe du réseau des effecteurs de la quiescence dans la différentiation en LT mémoires provient des observations d'une modulation de l'intensité d'activation de la PI3K en aval des récepteurs en cytokines. En effet,

cette activation module l'activité et l'expression d'un certain nombre de facteurs de quiescence, comme Klf2 et les FoxOs dont nous reparlerons. On pourrait envisager que la différenciation en LT mémoires favorisée par un signal IL15 passe également par une activation modérée de la voie PI3K. Elle impliquerait, par conséquent, une inhibition partielle ou qualitativement différente du programme de quiescence. En revanche, en présence d'IL2, le programme de quiescence serait totalement inhibé, favorisant ainsi la différenciation en LT effecteurs.

Evoquons à présent, à nouveau la protéine mTor, conjointement avec la protéine AMPK, pour son rôle dans la régulation de la différenciation en LT mémoires par un contrôle du métabolisme. Comme on l'a vu, l'inhibition de mTor et l'activation de l'AMPK favorise la transition d'un régime anabolique à un régime catabolique. Il est également envisageable que le régime catabolique soit constamment maintenu dans un petit pool cellulaire au cours de la réponse immune, caractérisant ainsi les futurs LT mémoires. Des facteurs impliqués dans la quiescence pourraient tout à fait participer à la régulation de la différenciation en LT mémoires d'un point de vue métabolique.

Après avoir comparé les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de deux populations de LT quiescents, les LT naïfs et les LT mémoires, et montré les mécanismes moléculaires qui permettent le maintien actif de cet état, j'ai donc développé quelques points concernant les rôles de cette machinerie au cours de la réponse des LT $CD8^+$. Je vais, à présent, présenter plus en détail une famille de protéines impliquée dans le maintien de la quiescence : les facteurs de transcription FoxOs.

III.Les facteurs FoxOs

Les facteurs FoxOs[3] (Forkhead box O) appartiennent à la famille des facteurs de transcription Forkhead caractérisée par un domaine de liaison à l'ADN d'une centaine d'acides aminés. Ce domaine, lui même appelé domaine *Forkhead*, a permis l'identification des membres de cette famille de la levure à l'homme. Il est formé de trois hélices α, trois brins β et de deux larges boucles, d'où son autre appellation « winged helix domain » (Clark et al., 1993; Obsil and Obsilova, 2011a). La sous-famille FoxO (Forkhead box subgroup O) comprend quatre membres chez les mammifères : FoxO1 (FKHR), FoxO3 (FKHRL1), FoxO4 (AFX) et FoxO6 (Wang et al., 2009). Le domaine *Forkhead* des FoxOs interagit spécifiquement avec des motifs consensus de type 5'-GTAAA(T/C)AA-3', initialement décrit pour leur homologue DAF16 du nématode *Caenorhabditis elegans*. Il peut aussi se fixer sur les séquences de réponse à l'insuline (IRS), 5'-(C/A)(A/C)AAA(C/T)AA-3', avec une plus faible affinité (Brent et al., 2008; Obsil and Obsilova, 2011a). Les facteurs FoxOs sont exprimés dans un large panel d'organes excepté FoxO6 dont l'expression est restreinte au système nerveux central (Furuyama et al., 2000). Il est d'ailleurs régulé par des mécanismes différents des autres FoxOs (Jacobs et al., 2003; van der Heide et al., 2005). FoxO1 et FoxO3 sont les facteurs FoxOs les plus exprimés dans le système immunitaire. En terme de spécificité d'organes, FoxO1 est majoritairement détecté dans la rate et les ganglions, alors que FoxO3 est principalement retrouvé dans le thymus et la moelle osseuse. En terme de spécificité cellulaire, les LT et les LB expriment préférentiellement FoxO1, tandis que les cellules de l'immunité innée contiennent davantage de FoxO3 (Dejean et al., 2011). Par la suite, j'utiliserai le terme FoxOs pour évoquer à la fois FoxO1, FoxO3a et FoxO4.

Les facteurs FoxOs ont la particularité de combiner deux types de fonctions. Ils exercent, d'une part, une activité de régulateur transcriptionnel dans le noyau. Ce sont des facteurs de transcription: ils induisent spécifiquement la transcription de plusieurs gènes cibles. En plus, ils ont été récemment décrits comme facteurs de remodelage de la chromatine, les rapprochant à ce titre de la sous-famille A des facteurs Forkhead. D'autre part, ils possèdent une activité promotrice de l'autophagie dans le cytoplasme de la cellule. N'étant que peu documenté à l'heure actuelle, je n'aborderai que succinctement le rôle de régulateur

[3] Notons ici que par convention ces protéines sont désignées par une écriture en lettres majuscules chez l'homme, alors que chez la souris la première lettre est en majuscule et les suivantes en minuscules (par exemple FOXO1 chez l'homme et Foxo1 chez la souris), l'acronyme FoxO avec « ox » en minuscules indiquant que l'on parle de ces facteurs de manière générale.

chromatinien des FoxOs, ainsi que leur rôle cytosolique dans la suite de ce chapitre. Dans un premier temps, je vais décrire de quelles façons l'activité transcriptionnelle des FoxOs est contrôlée dans les LT. Je ferai appel à des observations obtenues dans d'autres modèles cellulaires pour exposer certains concepts pertinents, potentiellement transposables dans les LT. Dans un second temps, je développerai les propriétés cellulaires dans lesquelles l'activité transcriptionnelle des FoxOs est impliquée en présentant les résultats obtenus dans un contexte de LT.

III.1. Régulation de l'activité transcriptionnelle des FoxOs

Dans des cellules quiescentes, et notamment les LT, les protéines FoxOs sont majoritairement nucléaires (Brunet et al., 1999; Fabre et al., 2005). Ils ont ainsi la possibilité d'activer/réprimer la transcription d'une panoplie de gènes que j'évoquerai dans le prochain chapitre. Ils ont également l'opportunité d'influer le remodelage de la chromatine. Le rôle de facteur de transcription des FoxOs étant établi depuis plus longtemps, la plupart des études portant sur la régulation de l'activité transcriptionnelle des FoxOs se sont concentrées sur cet aspect. Le contrôle de l'activité transcriptionnelle des facteurs FoxOs s'effectue à plusieurs niveaux. Tout d'abord, il s'effectue sur leur capacité de liaison à l'ADN et leur localisation subcellulaire. Ces deux paramètres sont souvent conjointement régulés et impliquent tout un échafaudage de modifications post-traductionnelles. A plus long terme, l'activité transcriptionnelle des FoxOs peut être régulée par un contrôle de l'expression même de ces facteurs. Enfin, la transcription, en elle-même, induite par les facteurs FoxOs peut s'effectuer de manière directe ou impliquer des interactions avec des co-facteurs. Ceci est également le cas pour son activité de remodelage de la chromatine. J'ajouterai également à cela l'activité cytosolique des FoxOs qui, bien qu'indépendante de la transcription, nécessite aussi des co-facteurs. Reprenons à présent dans le détail chacun des points énoncés.

III.1.1. Contrôle de la localisation subcellulaire des FoxOs

III.1.1.a. La phosphorylation des FoxOs

Le mécanisme de régulation le mieux connu affecte la localisation subcellulaire des FoxOs. Celle-ci est régulée en aval des récepteurs à l'antigène, mais aussi en aval de récepteurs aux cytokines et aux chimiokines dans un contexte lymphocytaire T et B (Stahl et al., 2002; Yusuf et al., 2004; Charvet et al., 2006; Ticchioni et al., 2007; Harada et al., 2010). Regardons de plus près les éléments démontrés dans les LT. Il a été observé au laboratoire que la formation de conjugués LT humains-DC en présence d'antigène aboutit à l'exclusion nucléaire

prolongée de FoxO1 via l'activation de la voie PI3K/Akt. Ceci s'accompagne donc d'un arrêt de son activité transcriptionnelle et autorise l'activation et la prolifération des LT (Fabre et al., 2005). Ce mécanisme a également été mis en évidence pour FOXO3 et FOXO4. Plus précisément, Akt, mais aussi la famille SGK, une fois activées par la PI3K, se transloquent dans le noyau où elles peuvent phosphoryler les FoxOs sur deux résidus sérines et un résidu thréonine conservés (Nakae et al., 1999; Biggs et al., 1999; Kops et al., 1999; Brunet et al., 2001). Les deux sites du côté N-terminal constituent un point d'ancrage typique de la protéine chaperonne 14-3-3. Une fois lié l'un à l'autre, une franche déstabilisation de la liaison FoxO/ADN est observée, aboutissant à l'export nucléaire et à la rétention cytoplasmique des FoxOs (Brunet et al., 1999). Notons que la délocalisation des FoxOs par 14-3-3 implique également un masquage du domaine *Forkhead* et de séquences de localisation nucléaire (NLS), ainsi qu'une exposition de séquences d'export nucléaire (Rena et al., 2001; Brunet et al., 2002; Obsilova et al., 2005; Silhan et al., 2009) (Figure 12).

D'autres phosphorylations, influant la localisation des facteurs FoxOs, ont été décrites dans d'autres modèles cellulaires. L'idée, ici, n'est pas de faire une liste exhaustive des modifications encourues par chaque membre du sous-groupe FoxOs dans des cellules non lymphoïdes. Il est plutôt question d'appréhender le fait qu'il existe une sommation de phosphorylations possibles, plus ou moins interconnectées, qui garantissent ensemble un fin contrôle de l'activité transcriptionnelle des FoxOs selon les stimuli extracellulaires. L'activité des kinases CK1 et DYRK1A, en conjonction avec les phosphorylations induites par Akt/SGK, favorisent l'export nucléaire par la machinerie d'export spécialisée GTPase Ran/exportine Crm1 (Chromosomal region maintenance protein)(Woods et al., 2001; Rena, 2002). Autre exemple, CDK2 et CDK1 (cyclin dependant kinase), protéines clés de la progression dans le cycle cellulaire, peuvent phosphoryler FOXO1 sur la S_{249} et entraîner son inactivation du fait de sa localisation cytoplasmique. Cette phosphorylation est abrogé en cas de dommages à l'ADN et favorise une localisation nucléaire des FoxOs ; ceci pouvant conduire à l'apoptose des cellules endommagées (Huang et al., 2006; Liu et al., 2008). Il est important de noter qu'une étude sur CDK1 a montré l'effet inverse de cette kinase, c'est-à-dire favorisant la localisation nucléaire et l'activation de FOXO1. La différence provient peut-être du fait que, cette fois-ci, il s'agit d'un modèle cellulaire non tumoral (Yuan et al., 2008). Cette régulation en réseau peut favoriser un contrôle spatial (selon la localisation des kinases par exemple) et temporel (*via* une phosphorylation dépendante d'une autre notamment) des FoxOs, fournissant une réponse adaptée aux stimuli. Par ailleurs, bien qu'il soit très probable qu'un réseau complexe

et semblable existe aussi dans les LT, le dernier exemple permet de garder à l'esprit que toutes les données ne sont pas transposables d'un modèle cellulaire à un autre.

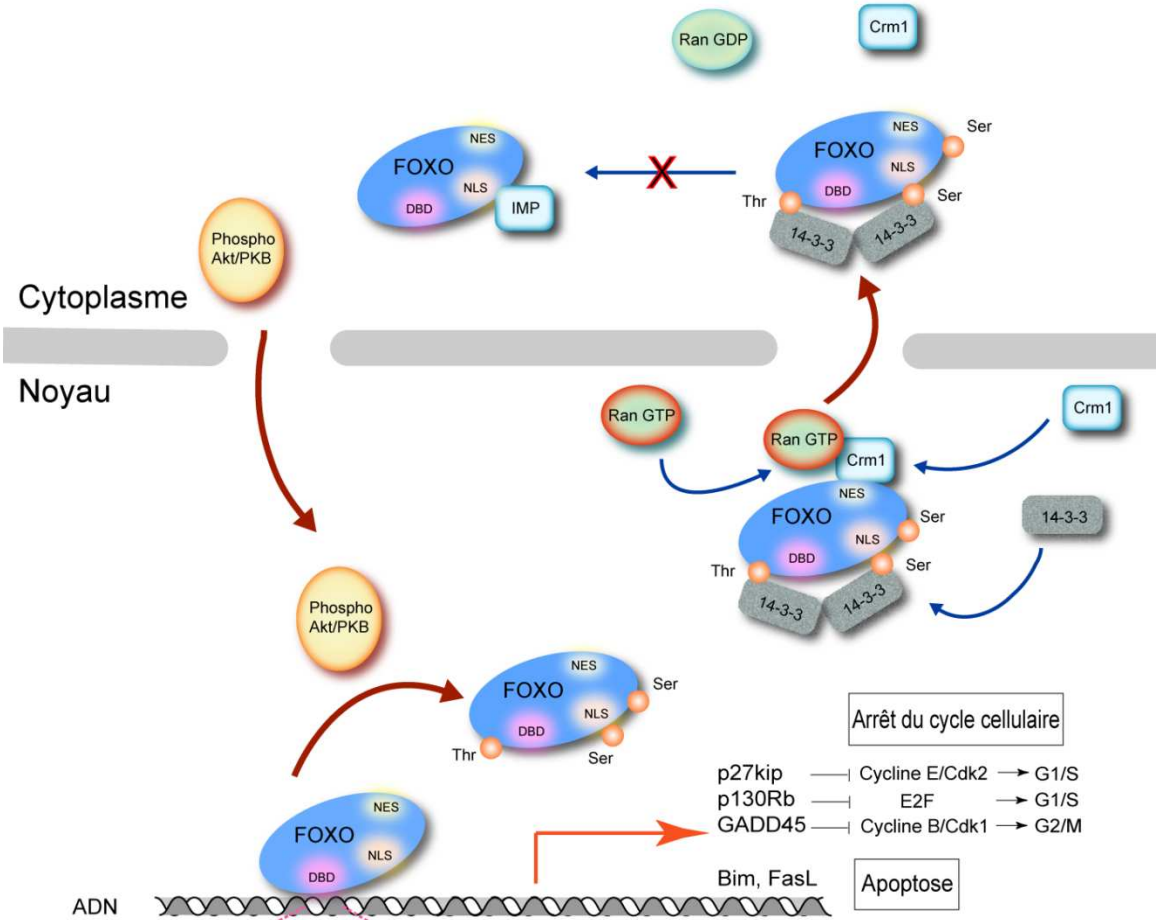


Figure 12: La phosphorylation des FoxOs par Akt induit leur liaison à la protéine chaperonne 14-3-3, aboutissant à leur exclusion nucléaire

Le parcours inverse des FoxOs, c'est-à-dire du cytoplasme au noyau, est également finement régulé par un ensemble de modifications post-traductionnelles décrits dans des systèmes non lymphoïdes. La seule phosphatase clairement actrice de ce phénomène, connue à l'heure actuelle, est PP2A (Yan et al., 2008). Elle dé-phosphoryle par exemple FOXO3 sur les résidus T_{32} et S_{253}, le dissociant alors de 14-3-3 (Singh et al., 2010b). De façon plus inattendue, des kinases participent aussi à cette localisation nucléaire. La famille des kinases JNK en est un exemple en cas de stress oxydatif notamment ou de privation en facteurs de croissance (Essers et al., 2004; Shen et al., 2010; Wang et al., 2012b). Une autre observation implique la kinase MST-1 (mammalian Ste20-like kinase) suite à un stress oxydatif. Elle phosphoryle la sérine 207 de FOXO3, hautement conservé dans le domaine *Forkhead*, entraînant la dissociation du complexe cytoplasmique FOXO3/14-3-3. Ceci conduit à la translocation

nucléaire de FOXO3 et à la reprise de son programme transcriptionnel (Lehtinen et al., 2006). Un travail récent montre *in vivo* que l'absence d'expression de MST-1 dans des LT corrèle entre autre avec une localisation majoritairement cytoplasmique de FOXO3, mais aussi, étonnamment, avec une diminution de la quantité protéique de Foxo1 et de Foxo3. Le tout affecte la survie des LT naïfs (Choi et al., 2009; Nehme et al., 2012).

Le point essentiel que je souhaite souligner ici est l'existence d'une hiérarchisation des stimuli extérieurs intégrée au niveau d'une gamme de modifications post-traductionnelles engendrées, le tout régulant l'activité des FoxOs. L'insuline et les facteurs de croissance entraînent l'apparition de modifications post-traductionnelles, orientant vers une séquestration cytoplasmique des FoxOs. Un signal de stress oxydatif, quant à lui, avec son panel de phosphorylations engendrées impose une localisation nucléaire des FoxOs. Lors d'expériences menées en présence d'insuline/facteurs de croissance et d'un stress oxydatif, les FoxOs se localisent dans le noyau, et ce malgré la présence de modifications post-traductionnelles fonctionnellement contradictoires. Il existe donc une hiérarchie des modifications post-traductionnelles. Dans le cas présent, ceci assure une réactivation rapide des facteurs FoxOs lors d'un stress cellulaire pour adapter la réponse cellulaire à ce contexte critique.

III.1.1.b. D'autres modifications post-traductionnelles ciblent les FoxOs

Outre les phosphorylations, d'autres modifications post-traductionnelles peuvent moduler la localisation des FoxOs. Le niveau d'acétylation de lysines particulières de ces protéines joue par exemple un rôle important dans ce processus. Cette balance implique d'une part des acétylases dont la plus connue est l'acétylase CBP/p300 (cAMP-Responsive Element-Binding protein) qui est majoritairement nucléaire. D'autre part, elle requière des membres de la famille des désacétylases sirtuins qui peuvent être nucléaires et cytoplasmiques (SIRT1, 2 et 3). Je ne donnerai ici qu'un exemple de leurs rôles permettant de relever un concept intéressant dans la compréhension de la régulation de l'activité des FoxOs. Lors d'un stress oxydatif, les protéines FoxOs se localisent dans le noyau et peuvent être acétylées par CBP/p300. La désacétylase Sirt1 peut alors former un complexe avec les FoxOs et provoquer leurs désacétylations. Dans ce contexte, elle favorise la liaison à l'ADN des FoxOs et la transcription des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. A l'inverse, elle inhibe celle de gènes induisant la mort cellulaire (Brunet et al., 2004; Horst et al., 2004; Motta et al., 2004; Daitoku et al., 2004). Ceci soulève une idée intéressante pour la suite : la présence des FoxOs dans le noyau, du fait d'une combinaison de toutes ces

modifications post-traductionnelles, ne présage pas d'une activité transcriptionnelle uniforme à un instant t sur tous leurs gènes cibles. L'acétylation/désacétylation, couplée aux autres modifications, offre un niveau de régulation complémentaire permettant des variations plus fine, spécifique de gènes, en fonction du stimulus ou de la cinétique. Des exemples de ce type de régulation différentielle de gènes cibles sont également connus dans les LT et je reviendrai sur ce point dans le chapitre sur les fonctions des facteurs FoxOs.

Le dernier point que je vais exposer démontre l'intrication de modifications de nature différentes dans le contrôle de l'activité des FoxOs. FOXO1 peut être méthylé sur plusieurs résidus arginines par la protéine PRMT1 (protein arginine methyltransferase). *In vitro* et *in vivo*, cette méthylation bloque directement la phosphorylation de FOXO1 sur la S_{253}, aboutissant à sa rétention dans le noyau (Yamagata et al., 2008). Dans cette optique, il est important de considérer qu'il existe d'autres types de modifications post-traductionnelles des FoxOs, dont je vais aborder un dernier exemple : l'ubiquitination. Suite à un stress oxydatif, FOXO4 peut être mono-ubiquitinylée entraînant alors sa relocalisation nucléaire et sa reprise d'activité transcriptionnelle (Horst et al., 2006). Il est intéressant de noter que certains résidus mono-ubiquitinés sont aussi les cibles de l'acétylation par p300/CBP suggérant une compétition entre ces deux modifications post-traductionnelles. Un autre détail intriguant est que cette ubiquitination est exercée par l'E3 ligase MDM2, dont nous allons voir dans le paragraphe suivant que des effets très différents ont été décrits pour les autres FoxOs (Brenkman et al., 2008). Quoi qu'il en soit, une claire dépendance entre les diverses modifications existe, suggérant le large panel de réponses que peuvent proposer les FoxOs face à la complexité environnementale (Figure 13).

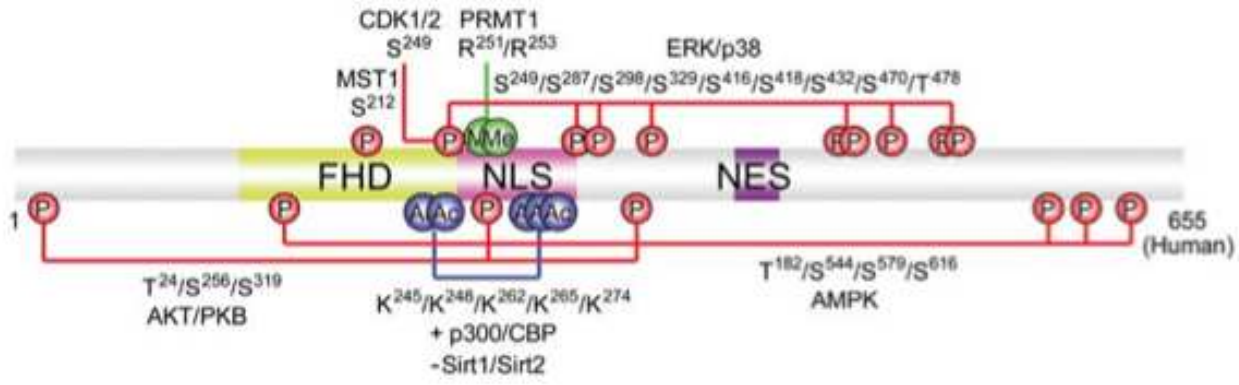


Figure 13: Principales modifications post-traductionnelles régulant l'activité des facteurs FoxOs

FoxO1 est ici pris pour exemple.

D'après (Zhao et al., 2011)

III.1.2. Régulation de l'expression des FoxOs

La régulation de l'activité des FoxOs telle que précédemment présentée peut être renforcée par un contrôle de leurs propres expressions. Ces processus sont généralement plus longs à se mettre en place, mais efficace à plus long terme. Ils s'exercent à plusieurs niveaux : par un contrôle de la transcription des FoxOs et par celui de leurs expressions protéiques.

III.1.2.a. Régulation transcriptionnelle des facteurs FoxOs

L'expression des FoxOs implique une régulation au niveau de la transcription même de ces facteurs. Dans les populations lymphocytaires, quelques données récentes attestent ce type de mécanismes. De façon très intéressante, l'expression de Foxo1 et Foxo3 est régulée positivement par liaison du facteur de transcription STAT3 sur des séquences consensus dans des LT naïfs $CD4^+$. Ce contrôle étroit semble avoir un rôle crucial dans la quiescence et l'activation des LT que j'évoquerai ultérieurement (Oh et al., 2011). Les facteurs E2A et EBF1 peuvent quant à eux reconnaître des séquences particulières sur le locus de FoxO1 et affecter le développement de LB. De même, suite à un dommage à l'ADN, p53, facteur impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose notamment, peut se lier directement au promoteur de Foxo3 et le transactiver dans des thymocytes notamment (Renault et al., 2011). D'autres facteurs de transcription impliqués dans des fonctions similaires à celles des facteurs FoxOs présentent cette capacité d'induction de la transcription de ces derniers. Par exemple, il a été montré qu'E2F-1 stimule positivement la transcription basale de FOXO1 et FOXO3 par liaison directe dans une lignée de neuroblastomes. Cette régulation n'est pas à l'œuvre dans tous les types cellulaires testés dans l'étude (Nowak et al., 2007). Les FoxOs eux-mêmes possèdent la capacité de réguler leurs propres transcriptions, impliquant alors une boucle de régulation positive. Le promoteur de FOXO1 possède un site consensus reconnaissable par le domaine *Forkhead* et liant effectivement non seulement FOXO1 mais aussi FOXO3, qui le transactive en retour. FOXO3 peut également activer la transcription de FOXO4 (Papadia et al., 2008; Essaghir et al., 2009). Notons aussi que des membres d'autres sous-groupes de la famille Fox peuvent réguler la transcription des FoxOs (Berry et al., 2008).

Outre les facteurs de transcription, d'autres protéines peuvent affecter la transcription des gènes FoxOs, dont voici un exemple. En cas de carence en nutriments équivalent à un faible niveau d'AMP, l'AMPK est activée et engage l'adaptation du régime métabolique cellulaire. Il a été notamment montré qu'elle peut phosphoryler FOXO3 et entraîner une reprise de l'activité transcriptionnelle de ce dernier (Greer et al., 2007). Le point important ici

est qu'en combinaison avec des glucocorticoïdes, elle régule également positivement la transcription de FOXO3. Ce dernier peut alors augmenter lui même sa propre transcription, se liant à son propre promoteur (Lützner et al., 2012). Cette voie s'oppose clairement à la voie PI3K/Akt/SGK plaçant FOXO3 au cœur d'une balance entre anabolisme/catabolisme voire, au final, d'une balance survie/mort.

Plusieurs observations laissent à penser qu'il existe bel et bien une régulation de l'expression même des FoxOs dans les LT et qu'une boucle de régulation positive est tout à fait envisageable. En effet, la quantité des transcrits Foxo3 est réduite dans des LT murins activés par un anti-CD3 pendant 24 heures. Cette diminution est encore plus forte en combinant cette stimulation avec un anti-CD28 et/ou de l'IL2. Ceci corrèle notamment avec une forte activation de la voie PI3K/Akt en aval de ces signaux, aboutissant à l'exclusion nucléaire et donc l'inactivation des FoxOs. Dans l'idée d'une boucle de régulation positive, les FoxOs exclus ne peuvent donc plus activer leur propre transcription. D'autres facteurs sont probablement impliqués dans cette régulation. De plus, les auteurs observent qu'un signal IL2 seul, contrairement à un signal *via* le CD28 seul, est suffisant pour diminuer drastiquement la quantité d'ARNm Foxo3. Ceci peut être dû au fait que la stimulation du CD28, seul, active peu la voie PI3K/Akt, ce signal permet surtout de soutenir l'activation de cette voie amorcée par un signal *via* le TCR. Etonnamment, en absence d'activation par le CD3, la stimulation conjointe du CD28 et de l'IL2 n'affecte aucunement la quantité de transcrits de Foxo3 (Lin et al., 2004). Une autre étude montre que la quantité protéique de FoxO1 est plus faible dans des LT humains mémoires que dans des LT naïfs, suggérant une régulation des FoxOs au cours de la différenciation des LT (Allam et al., 2009). Il serait intéressant de confirmer ces données en prenant soin d'identifier précisément le statut d'expression (et d'activité) des FoxOs en fonction des divers signaux environnementaux perçus et du stade de différenciation du LT.

III.1.2.b. Régulation de l'expression protéique des FoxOs

L'expression protéique des FoxOs est régulée à plusieurs niveaux : par un contrôle de la traduction des transcrits FoxOs et par un contrôle de la dégradation des protéines FoxOs.

Un mécanisme très récent de régulation de l'expression des FoxOs fait appel à un contrôle post-transcriptionnel par des miRNA. Les miRNA sont de courtes séquences d'acides ribonucléiques capables de s'apparier spécifiquement à un ARNm entraînant l'arrêt de la transcription ou la dégradation de ce dernier. Le miR-182, par exemple, est exprimé par des LT $CD4^+$ activés, *via* un processus dépendant d'une stimulation par l'IL2. Il est impliqué dans le blocage de l'expression protéique de Foxo1 favorisant l'expansion clonale des LT (Stittrich

et al., 2010). Un autre miRNA, le miR-155, est, lui aussi, notamment exprimé au cours de l'activation des LT. Il cible et diminue l'expression protéique de Foxo3 dans la lignée T humaine Jurkat et dans des LT murins (Yamamoto et al., 2011). Ces petites molécules ajoutent donc un niveau de contrôle supplémentaire de l'expression des FoxOs.

Le mécanisme de régulation de l'expression des FoxOs le mieux décrit implique une dégradation protéolytique des FoxOs suite à leur localisation/rétention cytoplasmique. L'exclusion nucléaire de FOXO1 induite par Akt, et principalement la phosphorylation de la S_{256}, mène à sa poly-ubiquitination sur des résidus lysine par le complexe protéolytique contenant l'ubiquitine ligase E3 Skp2 (S-phase kinase-associated protein 2) (Huang et al., 2005). Ceci aboutit à la dégradation de FOXO1, et des FoxOs en général, par la voie du protéasome (Matsuzaki et al., 2003; Plas and Thompson, 2003; Aoki et al., 2004). Notons que des données récentes expose un rôle de 14-3-3 dans la protection de FOXO3 face à la déphosphorylation et à la dégradation protéique (Dobson et al., 2011). Quoi qu'il en soit, skp2 a probablement aussi un rôle important dans les LT. En effet, il a récemment été montré que l'inhibition de l'expression de skp2 dans des LT murins est associée à une augmentation de la quantité de protéines, mais aussi d'ARNm, de Foxo1 et Foxo3, influant drastiquement le profil transcriptionnel des cellules (Wang et al., 2012a). Par ailleurs, une autre étude démontre une diminution de l'expression protéique des FoxOs dans des LT $CD4^+$ *via* un processus skp2 dépendant dans un modèle murin n'exprimant plus la GTPase of immunity-associated protein 5 (Gimap5). Le tout est associé à un défaut de survie des LT et une polarisation des LT en Th17 associé à des désordres inflammatoires (Aksoylar et al., 2012). D'autres voies de dégradation protéique ont été décrites par ailleurs. La kinase de IκB-b (IKKb), régulateur clé de la voie NFκB, peut phosphoryler FOXO3 sur la S_{644}, le maintenant ainsi dans le cytoplasme, aboutissant à la poly-ubiquitination de ce facteur et à sa dégradation subséquente par le protéasome (Hu et al., 2004). MDM2, précédemment évoqué, peut aussi par poly-ubiquitination engendrer la dégradation protéique de FOXO1 et FOXO3. Ceci est notamment décelé après la phosphorylation et l'export nucléaire des FoxOs par les protéines Erk ou P53 (Asada et al., 2007; Yang et al., 2008; Fu et al., 2009). Il est étonnant que p53, facteur impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose, inhibe l'activité transcriptionnelle des FoxOs qui favorise ce type de fonctions. Cependant, il a été montré que p53 peut inhiber sa propre expression en induisant la transcription de MDM2 (Jin and Levine, 2001). Selon le signal et l'environnement, comme en absence de stress cellulaire ou lors d'un retour à l'équilibre après un stress, une boucle de rétrocontrôle négatif peut donc se mettre en place

participant alors au blocage de l'activité des facteurs de quiescence. Globalement, les mécanismes régulant la balance entre rétention et dégradation sont peu connus. Ils pourraient dépendre de la force ou de la durée du stimulus, voire d'une combinaison particulière de signaux externes.

III.1.3. Régulation des activités des FoxOs *via* l'interaction avec des co-facteurs

Comme énoncé plus haut, les FoxOs sont des facteurs de transcription capables de réguler directement la transcription d'un certain nombre de gènes (Figure 14). Ce point sera développé dans le détail dans le prochain chapitre. Une étude suggère, en plus, un rôle original de Foxo1 dans le remodelage de la chromatine, et notamment son ouverture, suite à la fixation de domaines situés aux deux extrémités de la protéine (Hatta and Cirillo, 2007). Ceci peut potentialiser la transactivation de gènes, notamment de part le recrutement de complexes spécialisés.

De façon intéressante, pour ces deux fonctions, l'activité des facteurs FoxOs peut être opérationnelle *via* le recrutement de co-facteurs (Figure 14). Le complexe d'acétylation CBP/p300 joue par exemple un rôle ambigu sur ce plan. L'acétylation directe des FoxOs a plutôt tendance à inhiber la capacité de transactivation des FoxOs du fait d'une liaison à l'ADN perturbée (Fukuoka et al., 2003; Matsuzaki et al., 2005; Qiang et al., 2010). Cependant, son recrutement comme co-facteur des FoxOs entraîne une tout autre activité, d'acétylation des histones notamment. Cette modulation, de la chromatine entre autre, favorise la transactivation de gènes par FoxOs (Perrot and Rechler, 2005; Yang et al., 2009; Li et al., 2009). Cette dualité d'action pourrait introduire une régulation temporelle ou une spécificité génique de l'activité transcriptionnelle des FoxOs.

Un autre concept intéressant, relatif à la facette facteur de transcription des FoxOs, est la séquestration de co-activateurs communs à d'autres facteurs de transcription. Ceci est le modèle proposé par exemple pour la β-caténine qui peut interagir soit avec FoxO1, soit avec le T-cell factor (TCF) de la voie Wnt et participer à la transactivation de gènes cibles de chaque facteur de transcription. En réponse à un stress oxydatif ou une carence métabolique, la β-caténine est majoritairement retrouvée en complexe avec FoxO1, privant ainsi Wnt de ce co-activateur (Almeida et al., 2007; Kwon et al., 2010; Cardone et al., 2012). Par cet intermédiaire, les FoxOs peuvent donc affecter d'autres voies de signalisation majeures. Ceci est tout à fait imaginable dans les LT, notamment *via* la β-caténine vu la grande conservation de cette voie dans plusieurs modèles.

Enfin, les FoxOs peuvent interagir également directement avec d'autres facteurs de transcription pour promouvoir ou réprimer la transcription de gènes particuliers. Dans la plupart des cas les sites de fixation de ces facteurs sont proches l'un de l'autre sur le locus cible. Ainsi, par exemple, les interactions FoxO/Runx3 et FoxO/Smad3/Smad4 induisent la transcription du gène Bim et p21 respectivement (Yamamura et al., 2006; Gomis et al., 2006; Wang et al., 2011). L'interaction FoxO/Smad est notamment formée suite à une stimulation par le transforming growth factor-β (TGF-β), ce qui laisse à penser qu'elle pourrait avoir un rôle important notamment en fin de réponse immune pour un retour à l'équilibre homéostatique. Il en va de même pour les facteurs de transcription STATs (Oh et al., 2012). Par ailleurs, l'association à ce complexe du facteur FoxG, autre membre de la famille Forkhead, transforme ce complexe en répresseur transcriptionnel (Seoane et al., 2004). Ceci est d'autant plus intéressant que les FoxOs sont plus généralement décrits pour leurs rôles activateurs de la transcription. Un dernier exemple fait part d'un autre mode d'interaction entre p53 et FoxO3. En effet, en réponse à une carence en nutriments, FoxO3 peut lier directement p53 entraînant la dé-répression de la transcription du gène codant Sirt1 (Nemoto et al., 2004). Bien qu'il y ait d'autres facteurs impliqués, ceux cités précédemment, de part leur importance au cours d'une réponse immune, mériteraient d'être étudiés pour leurs interactions avec les FoxOs au sein de LT.

Bien que non lié à l'activité transcriptionnelle, le fait que FOXO1 présente une activité cytosolique est une observation qui élargit notre conception du fonctionnement des FoxOs. En effet, il a été montré qu'en réponse à un stress oxydatif ou une carence en sérum, FOXO1 se localise dans le noyau notamment *via* la phosphorylation par les kinases JNK. Il pourrait d'ailleurs y être maintenu par mono-ubiquitination. En absence de cette mono-ubiquitination, FOXO1 peut être acétylé par le complexe CBP/p300. Cette forme peut être désacétylée par la suite ou localement seulement, mais, alternativement, elle peut être dirigée vers le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, FOXO1 peut être désacétylé par Sirt2. Cependant, en conditions de stress oxydatif ou de privation en sérum, FOXO1 acétylé peut interagir librement avec la protéine Atg7. Ce complexe est capable, par un mécanisme inconnu, d'induire le processus d'autophagie, c'est-à-dire la dégradation de constituants protéiques cytosoliques par digestion lysosomale (Zhao et al., 2010). L'ensemble de ce processus souligne la complexité de ce réseau de modifications post-traductionnelles et en fonction l'identification du devenir de la cellule. L'intensité ou la durée du signal doit probablement affecter leur mise en place. L'autre point important est que la conception des FoxOs actifs

uniquement dans le noyau est révisée par cette nouvelle observation qui vient étoffer les fonctions associées aux facteurs FoxOs.

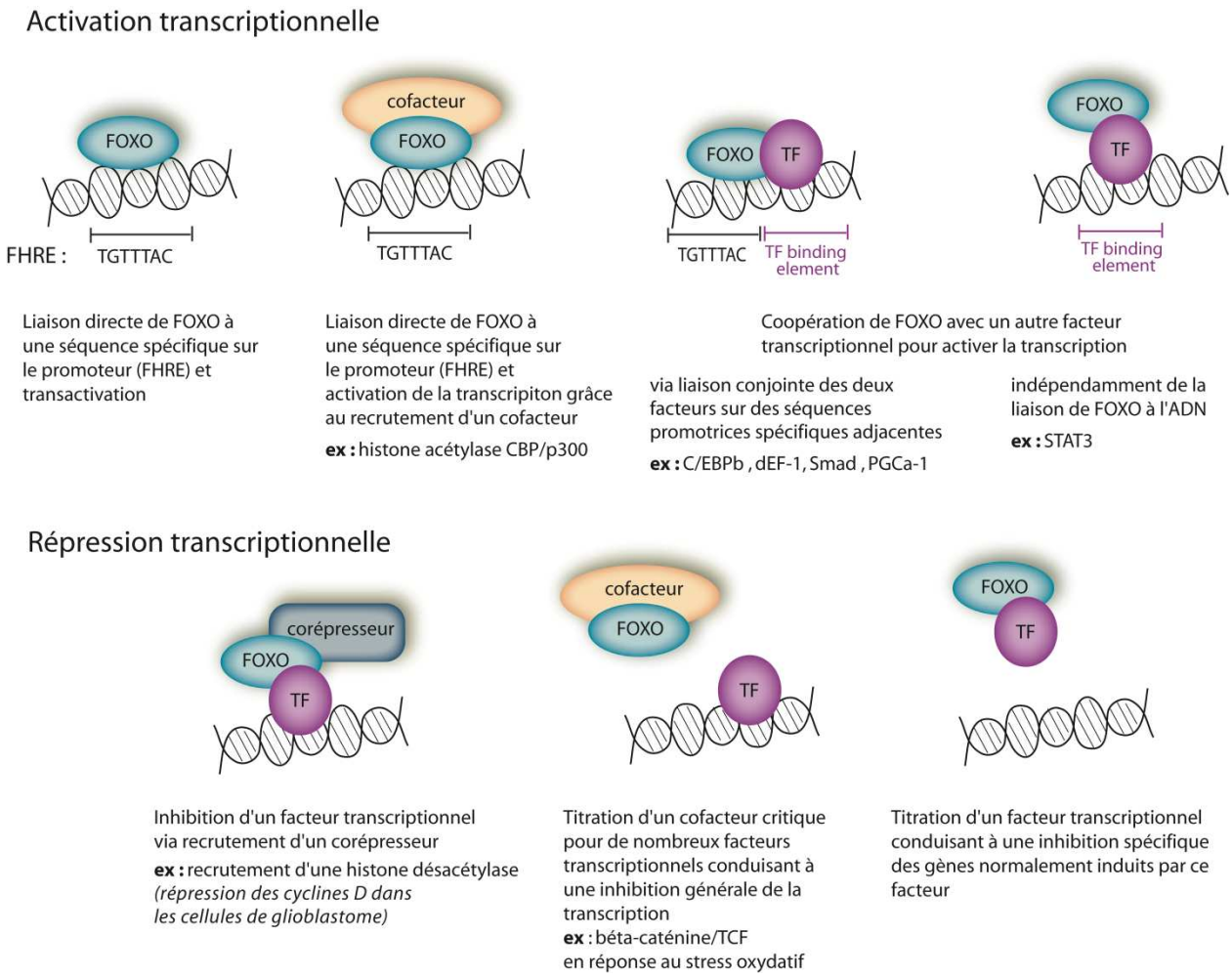


Figure 14: Mécanismes possibles de régulation transcriptionnelle par les FoxOs

FHRE : ForkHead Response Element; TF : Facteur de Transcription

D'après (Birkenkamp and Coffer, 2003).

III.2. Régulation des propriétés lymphocytaire T par les FoxOs

L'état et le devenir des LT $CD8^+$ dépend de toutes les stimulations extérieures qu'ils perçoivent, que ce soit un signal antigénique, de co-stimulation ou cytokinique, mais aussi plus largement, la présence d'autres facteurs de croissance, de nutriments, de stress oxydatif etc. Les facteurs FoxOs composent avec ces signaux et modifient notamment de manière intrinsèque les cellules, régulant une grande partie des propriétés lymphocytaires T. Je vais donc à présent replacer le rôle des facteurs de transcription FoxOs dans le cadre des propriétés des LT énoncées en première partie. J'intégrerai, enfin, l'ensemble de ces données pour tenter de discuter du rôle des FoxOs dans la régulation de la physiologie des LT.

III.2.1. La quiescence

III.2.1.a. Apport des *études in vitro*

Comme discuté plus tôt, la quiescence se réfère à une activité métabolique anabolique modérée, une croissance et une prolifération cellulaire très limitée (cf. Chap II/1.3). Peu de données sont disponibles sur le lien direct entre les FoxOs et le métabolisme énergétique dans les LT, contrairement à d'autres modèles cellulaires. La majorité des travaux impliquent principalement un rôle de mTor en aval de la PI3K, ou d'autres protéines comme l'AMPK. Néanmoins, il a été montré au laboratoire que la transfection de LT humains primaires avec un mutant constitutivement actif de FOXO1 inhibe leur croissance suite à la reconnaissance de l'antigène (Fabre et al., 2005). Ceci suggère un rôle inhibiteur de FOXO1 sur ces paramètres.

La démonstration de l'implication des facteurs FoxOs dans la régulation du cycle cellulaire chez les mammifères provient majoritairement d'études réalisées *in vitro* avec des vecteurs permettant d'exprimer des formes mutées des FoxOs. Si les mécanismes sous-jacents à cette régulation sont bien documentés dans des modèles cellulaires non lymphoïdes, les travaux dans les LT sont plus rares. FoxO1 et Foxo3 ont été impliqués dans ces processus. Le défaut d'activation de la voie PI3K observé dans des LT murins déficients pour la GEF vav1, induisant une constante activation de Foxo1, provoquent un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1. Ceci est associé à une absence de diminution d'expression de l'inhibiteur des CDK : $p27^{KIP1}$ (Charvet et al., 2006). Parallèlement, une étude montre dans la lignée T murine CTLL-2 qu'une carence en IL-2 induit un blocage des cellules en phase G0/G1 du cycle. Cet arrêt peut être mimé, en présence d'IL2, par le traitement avec des inhibiteurs de la PI3K ou par la surexpression d'une forme constitutivement nucléaire et active de Foxo3. Le blocage de la progression en cycle induit par Foxo3 passe par l'activation de la transcription de $p27^{kip1}$ (Stahl et al., 2002). FOXO4 semble lui aussi avoir un rôle dans l'induction d'un arrêt du cycle

cellulaire *via* l'expression de $p27^{KIP1}$, lorsqu'il est surexprimé sous forme sauvage dans des cellules Jurkat (Medema et al., 2000).

D'autres gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire voient leurs expressions inhibées par FOXO3 et FOXO4, tels que la cycline D1 et la cycline D2 (Schmidt et al., 2002). Ces données ne sont pour l'instant pas confirmées dans un modèle lymphocytaire, de même que celles démontrant l'activation de la transcription par FOXO3 et FOXO4 de p130/Rb. Ce dernier séquestre le facteur transcriptionnel E2F-4 nécessaire à l'entrée des cellules en phase G1 (Kops et al., 2002b). Un éventuel rôle sur la transcription de la cycline D3 n'a pas été montré, car aucune étude n'a encore été faite dans des lignages hématopoïétiques où la cycline D3 est principalement exprimée. De façon intéressante, un travail montre que le maintien d'un statut mémoire en G1 par un LT $CD8^+$ implique une inactivation et une diminution de l'expression protéique de Foxo1. Cette régulation de Foxo1 est notamment maintenue par la signalisation en aval du CD27 et du 4-1BB, activant notamment la voie PI3K/Akt. En absence de cette signalisation, les LT $CD8^+$ retournent en G0 (Allam et al., 2009). Notons également que chez l'homme, la phosphorylation constitutive de FOXO3 dans les T_{CM} sur les trois sites de phosphorylation par Akt est associée à une prolifération accrue par rapport aux T_{EM} (Riou et al., 2007). Il est possible que le statut plus avancé dans le cycle des LT mémoires, et a fortiori des Tcm, soit activement maintenu entre autre par la diminution d'expression/activité des FoxOs. En effet, ceci pourrait conduire, par exemple, à l'augmentation d'expression de la cycline D3 dans les LT mémoires et une inhibition moins sévère de pRb. L'absence d'expression de $p27^{KIP1}$ pourrait, au moins partiellement, également en découler. Dans ces conditions, la régulation négative des FoxOs favoriserait l'abaissement du seuil d'entrée en prolifération caractéristique des LT mémoires. Elle serait aussi nécessaire pour maintenir une quiescence de type LT mémoire et non LT naïf.

L'utilisation d'autres modèles cellulaires a aussi montré que les FoxOs peuvent affecter le cycle cellulaire dans des phases plus tardives. Les FoxOs régulent la transcription de gènes cibles impliqués dans la résistance au stress, tels que GADD45 (Growth arrest and DNA damage inducible protein 45) qui bloque les cellules en G2/M et stimule la réparation de l'ADN (Tran et al., 2002). Par ailleurs, ils régulent également des gènes qui participent à la détoxification des dérivés réactifs à l'oxygène ou ROS, tels que la catalase et la superoxyde dismutase (Kops et al., 2002a). Ce profil transcriptionnel dépendant des facteurs FoxOs maintient activement un état de quiescence qu'il serait intéressant de vérifier dans les LT.

Lors d'une rencontre avec l'antigène spécifique, les LT sont soumis à un nombre considérable de divisions dans un temps court, ce qui peut entraîner un certain nombre de dommages notamment au niveau de la réplication de l'ADN. Les facteurs FoxOs pourraient donc participer à l'optimisation de ces processus, en fonction des signaux perçus localement dans l'entourage d'une cellule.

III.2.1.b. Apport des études in vivo

La caractérisation du rôle de Foxo3 *in vivo* chez la souris par invalidation génétique témoigne d'une complexité du rôle des FoxOs dans la quiescence. Un premier travail montre que la délétion de Foxo3 (gene trap targeting strategy) est à l'origine d'un léger désordre inflammatoire et d'une lymphoprolifération, visible à la taille accrue des OLS, déclenchés au bout de seize semaines. Les LT $CD4^+$ sont la principale cause de ces phénomènes et présentent une capacité supérieure de prolifération et de production de cytokines à celles des cellules contrôles, *via* une activation de la voie NFκB. En effet, on constate une chute en terme d'ARN et de protéines d'IκBβ et IκBε, inhibiteurs de l'activité transcriptionnelle de NFκB Le phénotype de ces cellules n'est pas dû à une modification de leur résistance à l'apoptose. Ainsi, il semble que Foxo3 puisse également réprimer des voies cruciales dans l'activation des LT, par exemple en induisant la transcription de l'inhibiteur de NFκB : IκB. Foxo3 pourrait donc avoir un rôle dans le maintien de la quiescence des LT (Lin et al., 2004). Néanmoins, une étude plus récente utilisant deux autres modèles de délétion génique de Foxo3 ne confirme pas ce phénotype. Ainsi, les LT dépourvus de Foxo3, issus de souris âgées de 8 à 10 semaines cette fois, ne présentent aucune anomalie particulière (Dejean et al., 2009a; Gubbels Bupp et al., 2009). Ceci dit, dans tous les cas, aucune prolifération spontanée des LT n'est détectée. C'est également le cas dans des modèles murins où Foxo1 ou une combinaison Foxo1 et Foxo3 ont été spécifiquement invalidés dans les LT (Kerdiles et al., 2009; Gubbels Bupp et al., 2009; Ouyang et al., 2009a, 2010). De plus, pour s'affranchir totalement de la nature partiellement redondante des FoxOs, l'invalidation conditionnelle simultanée de *Foxo*1, *Foxo*3a et *Foxo*4 a été réalisée dans tous les tissus. Ces souris développent véritablement des lymphomes à partir de 5 mois et 75% d'entre elles sont toujours saines à plus d'un an. L'efficacité de la délétion génomique semble néanmoins corrélée au mauvais pronostic (Paik et al., 2007). La conclusion de ces résultats *in vivo* ne réfute pas pour autant les données obtenues à partir des expériences in vitro. En effet, d'autres acteurs environnementaux sont probablement impliqués dans une fonction aussi importante pour l'intégrité de l'organisme que l'est la quiescence des LT. Ceci complique donc l'étude intégrée de ces phénomènes, dans laquelle la

levée d'un élément régulateur peut ne pas être suffisante pour affecter drastiquement le phénotype. Par ailleurs, la durée d'une invalidation génique voit aussi évoluer le phénotype (modèle knock-out inductible versus constant).

A cet égard, il est intéressant de noter que les modèles murins où le gène Foxo1 est spécifiquement invalidé dans les LT présentent une proportion de LT $CD44^{hi}$ plus élevée. Ceci est vrai dans un modèle knock-out constant ou quelques mois après l'invalidation dans un modèle inductible (Kerdiles et al., 2009; Ouyang et al., 2009a; Gubbels Bupp et al., 2009). Ces cellules ont été générées en absence de stimulation classique par les signaux 1, 2 et 3 et sont alors appelées cellules à phénotype mémoire. Une hypothèse pour expliquer leur ampleur dans ces modèles murins est une prolifération homéostatique induite par l'IL15, du fait de la pénurie de LT naïfs matures. Le tout pourrait être en effet assimilé aux évènements visibles en conditions lymphopéniques. Cependant, ce n'est probablement pas la seule explication possible puisque d'une part l'expression de l'IL15R est classiquement induite au cours de l'activation T. D'autre part, cette augmentation du phénotype mémoire-activé n'est pas visible dans un contexte monoclonal (OT-II), ni dans un contexte de délétion inductible à court terme (Kerdiles et al., 2009; Ouyang et al., 2009a). Ainsi, il y a nécessairement d'autres explications et un délai nécessaire à l'apparition de ce phénotype. Notons que Foxo3, quant à lui, ne semble pas affecter la prolifération homéostatique de LT mémoires générés après la rencontre avec l'antigène spécifique (Sullivan et al., 2012a). Il serait intéressant de savoir si la différence vient du membre des FoxOs concernés ou d'un statut mémoire différent selon l'origine de leur différenciation. Enfin, il faut aussi considérer le fait que tous les travaux présentant un rôle des FoxOs dans le maintien de la tolérance au soi peuvent être source de réponses quant à l'apparition de ce phénotype activé/mémoire des LT. Ils ne seront cependant pas développés ici sortant du cadre de ce manuscrit.

III.2.2. L'apoptose

Les facteurs FoxOs ont également été impliqués dans la régulation de l'apoptose. En effet, dans le modèle précédent décrit de Stahl et *al*., la déprivation en IL-2, l'inhibition de la voie PI3K ou l'activation de FOXO3 induisent la transcription de Bim menant à une forte apoptose des cellules. Notons ici que dans certains modèles, l'arrêt du cycle cellulaire induit par $p27^{kip1}$ précède l'apoptose induite par Bim (Dijkers et al., 2002). L'activation de FOXO3 suite à une carence en IL-2 a également été montrée dans des LT primaires. Dans ce contexte, l'apoptose induite *via* FOXO3 est associée à une induction directe de la transcription de Bim et

de PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) par FOXO3 (You et al., 2006). Ainsi, il semble que la phosphorylation et l'inactivation de FOXO3 est essentielle pour un signal de survie efficace délivré par l'IL2. Ceci est d'ailleurs conforté par le fait que chez l'homme, la phosphorylation constitutive de FOXO3 dans les T_{CM} sur les trois sites de phosphorylation par Akt est associée à une résistance à l'apoptose accrue par rapport aux T_{EM}. Cet avantage semble dû au moins en partie à une expression réduite de la protéine pro-apoptotique Bim, et serait aussi dépendant de la kinase IKK (Riou et al., 2007). De plus, l'inactivation accrue de FOXO3 est directement associée à la meilleure survie des LT mémoires chez des patients qui contrôlent naturellement la réplication du virus HIV (Grevenynghe et al., 2008). D'autres membres de la famille des molécules Bcl2 régulant l'apoptose pourraient être des cibles indirectes des FoxOs dans les LT. Il a notamment été montré que FOXO4 induit aussi l'expression de BCL6, un répresseur transcriptionnel dont l'une des cibles est la protéine anti-apoptotique Bcl-XL activée notamment en aval de la PI3K (Tang et al., 2002; Jones et al., 2000). L'autre grande voie d'induction d'apoptose implique le récepteur à domaine de mort Fas. La transfection d'un mutant constitutivement actif de FOXO3 dans une lignée T Jurkat provoque l'apoptose de ces cellules par un mécanisme dépendant de Fas. Il semble que FOXO3 peut induire la transcription de Fas, mais ceci n'a pas été encore démontré dans les LT ou ne semble pas être impliqué dans l'apoptose des LT induite après une privation en cytokine (Brunet et al., 1999; Dijkers et al., 2002; Stahl et al., 2002).

Ainsi, les facteurs FoxOs sont à l'interface entre les deux voies majeures d'induction de l'apoptose : la voie mitochondriale impliquant les facteurs de la famille Bcl2 et la voie extrinsèque notamment induite en aval de la signalisation du récepteur à domaine de mort Fas. Par ailleurs, l'observation que FOXO1 est moins exprimé et principalement cytoplasmique dans des LT humains mémoires suggère que ceci pourrait favoriser la résistance à l'apoptose/une meilleure survie de ces cellules. Ceci suggère également une mise en place de ces mécanismes différente entre les LT naïfs et les LT mémoires. Enfin, ces données *in vitro* permettent de proposer le modèle suivant : la phase de contraction durant laquelle la plupart des LT effecteurs meurent par apoptose requière l'activation des FoxOs. Ce processus prendrait place du fait de la diminution des facteurs de survie cytokiniques disponibles et l'importance des signaux de stress type ROS provoquant l'entrée des FOxOs dans le noyau. Il est également possible d'imaginer que les FoxOs conjointement avec les facteurs Stat favorise la contraction induite par l'IFNγ. Néanmoins, une étude récente montre que Foxo3 n'affecte a priori pas la phase de contraction *in vivo* (Sullivan et al., 2012a). Il serait

intéressant d'identifier le rôle de la redondance des FoxOs dans ce contexte. De plus, le retour à l'homéostasie est un processus finement régulé par une diversité d'acteurs, ce qui complique son analyse *in vivo* comme nous avons pu le voir dans le chapitre II de cette introduction.

III.2.3. La survie

Paradoxalement à ce qui vient d'être écrit, Foxo3 peut également induire la transcription de gènes favorables à la survie des LT. En effet, des études démontrent clairement que Pink1 (phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase 1) et GILZ (Glucocorticoid-induced leucine zipper) sont des cibles transcriptionnelles directes de Foxo3 et sont notamment induites suite à la déprivation en IL-2 de cellules murines CTLL-2. La première prolonge la survie des LT par des mécanismes de résistance au stress oxydatif, tandis que la deuxième inhibe transitoirement l'apoptose induite suite à une privation en cytokine (Mei et al., 2009; Asselin-Labat et al., 2004). Ainsi, Foxo3 semble être impliqué dans une balance entre survie et mort des LT. Ceci pourrait être fonction de la durée, de l'intensité et de la sommation à un instant donné ou dans le temps des signaux initiateurs, de façon à répondre de manière adaptée à l'environnement. Il est possible de proposer le modèle suivant : une cellule peut être soumise à un/des stress à un instant donné, tel qu'une carence en signaux de survie, un stress oxydatif, des dommages à l'ADN. A court terme, les FoxOs favorisent la préservation de l'intégrité cellulaire et/ou la réparation des dommages causés à la cellule. A plus long terme, si ces dommages s'accumulent et/ou que le contexte environnemental reste défavorable, les FoxOs pourraient alors induire la mort cellulaire.

En absence de stress particulier, le rôle majeur des facteurs FoxOs dans la survie des LT quiescents est imputé à FoxO1. Cette observation a été apportée par les études *in vivo* qui démontre son rôle de régulateur direct de la transcription de la chaîne α de l'IL7R (Kerdiles et al., 2009; Ouyang et al., 2009b) (Figure 15). En effet, l'invalidation de FOXO1 dans les LT est associée à une diminution de l'expression de l'IL7Rα et de sa signalisation subséquente, aboutissant à une expression moindre de la molécule anti-apoptotique Bcl2. Ceci participe à la déplétion du compartiment T périphérique dans des modèles murins déficients en Foxo1. Le croisement d'une telle souris avec une souris transgénique pour l'IL7R restaure la survie des LT périphériques dans le modèle murin transgénique pour le TCR OT-II (Ouyang et al., 2009b).

Le contrôle de l'expression de l'IL7R est très complexe et implique différentes molécules régulatrices autre que Foxo1. Ceci dépend des signaux perçus par la cellule, ainsi que de son état de différenciation (cf. chapitre II). Nous avons déjà évoqué le rôle inhibiteur du facteur Foxp1 sur l'expression de l'IL7Rα. Le point intéressant à ce sujet est que ce facteur se lie sur la même région enhancer du promoteur de l'IL7Rα que Foxo1 (Feng et al., 2010). Il existe donc probablement une compétition entre ces deux facteurs. Cette étude suggère en plus que la diminution de l'expression de l'IL7Rα en absence de Foxo1 est en partie dépendante d'une répression par Foxp1. L'IL7 est un signal de survie crucial non seulement pour les LT naïfs, mais également pour les LT mémoires comme présentés précédemment. D'ailleurs, ces deux populations expriment fortement l'IL7R. Cependant, la quantité de protéines FoxOs est plus faible dans les LT mémoires que dans les LT naïfs. Ceci suggère l'existence de mécanismes de régulation de l'IL7Rα différents entre ces cellules. A ce sujet, une étude montre que l'état du locus de l'IL7Rα varie selon l'état de différenciation de la cellule et elle s'attache à décrire dans ce contexte la balance GABPα/Gfi-1 (Chandele et al., 2008). Il est alors possible de proposer le modèle suivant. Dans les LT naïfs, le répresseur transcriptionnel Gfi-1 n'est pas exprimé. Le locus de l'IL7Rα est acétylé et une quantité modérée de GABPα est lié au promoteur. Foxo1, quant à lui, est fortement exprimé et actif et transcrit le gène de l'IL7Rα. Dans les MPECs, Gfi-1 est exprimé mais se lie très faiblement au promoteur de l'IL7Rα. GABPα est fortement fixé sur le promoteur de l'IL7Rα et les histones sont acétylés. Il est possible que ce mécanisme soit important non seulement pour la génération des LT mémoires, mais également pour leur maintien. La question du rôle de Foxo1, faiblement exprimé dans les LT mémoires, reste ouverte. Une étude montre que la survie à long terme de LT mémoires invalidés pour le gène Foxo1 est altérée (Rao et al., 2012). Ceci montre que Foxo1 est important dans le mécanisme de survie des LT mémoires. Tout d'abord, il est possible que la faible quantité de Foxo1 soit suffisante pour une transcription efficace de l'IL7Rα. Une autre hypothèse est que Foxo1 favorise le recrutement de co-facteurs, par exemple GABPα, et qu'ensemble, ils activent la transcription du gène. Il se pourrait également que Foxo1, par son rôle de facteur de remodelage de la chromatine, favorise l'ouverture de la chromatine au niveau du locus de l'IL7Rα dans les LT mémoires. Ceci est cohérent avec le fait que de nombreuses modifications épigénétiques semblent influencer le phénotype des LT mémoires et sont, en plus, transmissibles au cours de leur auto-renouvellement.

III.2.4. La circulation

La démonstration de l'implication de la famille FoxOs dans la circulation des LT quiescents est relativement récente. Ce rôle des FoxOs n'avait pas été envisagé au préalable se révélant être une particularité du modèle lymphocytaire. Parmi les facteurs FoxOs, FoxO1 est l'acteur principal de cette propriété et il agit à deux niveaux. D'une part, il influe sur l'expression de molécules de surface directement impliquées dans la migration des LT et le homing ganglionnaire. D'autre part, il régule l'expression de facteurs intracellulaires qui participent au contrôle de ces processus.

Il a été montré au laboratoire dans des expériences de puces à ADN que l'expression d'un mutant constitutivement actif de FOXO1 dans la lignée leucémique Jurkat induit la transcription de CD62L, du CCR7 et de S1P1 (Fabre et al., 2008a). Ces résultats ont par la suite été confirmés *in vivo* dans plusieurs modèles murins d'invalidation conditionnelle ou constitutive de FOXO1. Dans ces conditions, le nombre de LT naïfs dans les ganglions lymphatiques est considérablement réduit, notamment du fait d'une perte d'expression de CD62L et de CCR7. Des expériences de transfert adoptif identifient clairement un défaut de homing des LT Foxo1$^{-/-}$ dans les ganglions lymphatiques (Kerdiles et al., 2009; Gubbels Bupp et al., 2009; Ouyang et al., 2009b). Notons ici qu'il est difficile de montrer *in vivo* la relevance du contrôle de S1P1 par FOXO1 dans la sortie des LT matures des ganglions dans la mesure où FOXO1 régule déjà leur entrée (Figure 15).

L'ensemble de ces études montre également la régulation transcriptionnelle du facteur de transcription Klf2 par FOXO1. Cette régulation est directe puisque FOXO1 est capable de se lier sur un site consensus présent dans le promoteur de Klf2 (Fabre et al., 2008a). Plusieurs études ont démontrées un rôle clair de Klf2 dans la capacité circulatoire des LT *via* le contrôle direct de la transcription des gènes codant CD62L et S1P1 (Carlson et al., 2006; Bai et al., 2007). Le schéma global semble donc être le suivant : FOXO1 active directement la transcription de Klf2, qui en retour induit la transcription des gènes CD62L et S1P1. La régulation de CCR7 semble plus complexe puisque des LT invalidés pour le gène Klf2 ne présente pas de modifications de la quantité de transcrits du CCR7, en revanche l'expression protéique de ce dernier est diminuée (Carlson et al., 2006). Il pourrait exister des mécanismes de régulation post-traductionnelle du CCR7 par Klf2. L'absence de couplage de la régulation du CCR7, d'une part, et de CD62L et Klf2, d'autre part, est également attestée pour FOXO1. En effet, lors d'une privation en cytokines induisant une activation des FoxOs, l'expression du CCR7 n'est pas augmentée, contrairement à celle de CD62L et Klf2 (Kerdiles et al., 2009). Ceci

laisse à penser que des mécanismes annexes de régulation permettent à FoxO1 de contrôler la transcription de CCR7 de manière indirecte.

L'inhibition de l'activité des FoxOs au cours de l'activation lymphocytaire est donc nécessaire pour inhiber l'expression de Klf2, CD62L, CCR7 et S1P1. Ceci limite la circulation des LT activés et effecteurs au sein des OLS, favorisant non seulement une activation/expansion optimale des LT, mais aussi leur migration vers le site de la perturbation (Figure 15). Par ailleurs, Klf2 a été impliqué dans l'inhibition de l'expression de récepteurs aux chimiokines inflammatoires tels que CCR5 (Sebzda et al., 2008). Ainsi, la faible expression de Klf2 dans les LT activés/effecteurs favorise leur localisation dans des tissus non lymphoïdes. Il serait intéressant de savoir si FoxO1 participe ou non à ce processus et éventuellement de façon indépendante de Klf2.

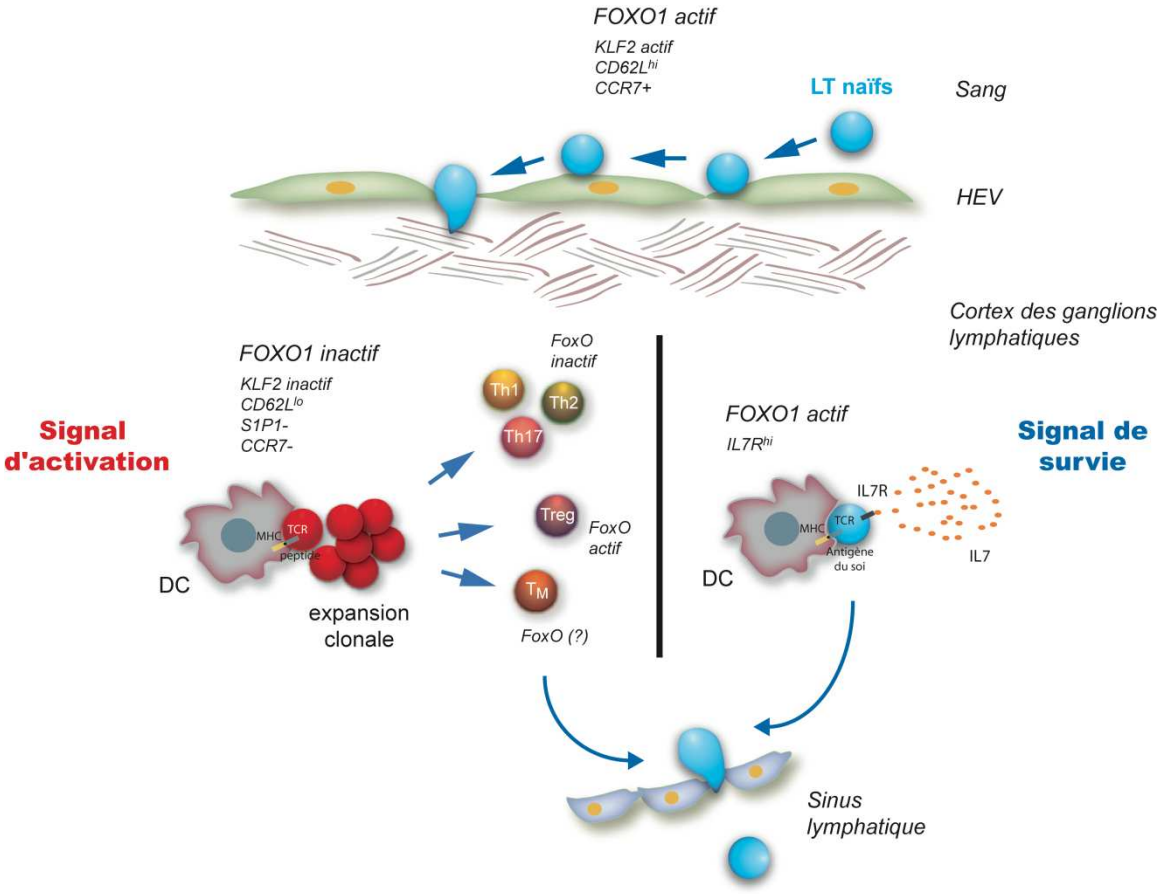


Figure 15: Les facteurs FoxOs sont des acteurs majeurs du contrôle spatio-temporel d'une réponse immune et de l'homéostasie des LT

III.2.5. La différenciation des LT CD8+

Des études très récentes impliquent les facteurs FoxOs dans la régulation du devenir des LT CD8+ au cours d'une réponse immune. La stimulation *in vitro* de LT murins, avec l'antigène OVA, la molécule de co-stimulation B7.1 et l'IL12 (favorisant une différenciation en LT effecteurs), est associée à une inactivation de Foxo1 par exclusion nucléaire et dégradation protéique. Cette inhibition est nécessaire à l'expression du facteur de transcription T-bet, favorisant la mise en place d'une réponse effectrice avec notamment une forte production d'IFNγ et granzyme B. En effet, Foxo1 semble avoir la capacité de réprimer la transcription du gène codant pour T-bet de manière indirecte (Rao et al., 2012). Notons que ce dernier point a été également démontré en aval d'une stimulation par le TGFβ dans un autre travail (Kerdiles et al., 2010). Parallèlement, Foxo1 peut se lier directement sur le promoteur du facteur de transcription Eomesodermine (eomes) et induire sa transcription. En conséquence, l'activité transcriptionnelle de Foxo1 promeut l'acquisition d'un phénotype mémoire par les LT, de par la nature de ces gènes cibles tels que eomes, CD62L et IL7Rα (Rao et al., 2012). Ces résultats sont cohérents avec le fait que l'activation constitutive d'Akt (les FoxOs sont alors inactivés) met en place un programme transcriptionnel en faveur d'une différenciation en LT effecteurs à courte durée de vie et inversement (Macintyre et al., 2011; Kim et al., 2012).

Deux équipes se sont intéressées au rôle de Foxo3 au cours d'une réponse immune *in vivo*. Une première étude a montré que la délétion du gène Foxo3 dans tous les tissus aboutit à une expansion clonale des LT CD8+ de plus grande ampleur suite à une infection par le virus LCMV. Cette accumulation de LT CD8+ est permise par une augmentation du nombre de DC ainsi que de leur production d'IL6, favorisant la survie des LT *via* une augmentation de leur expression en protéines anti-apoptotiques Bcl2 et Bcl-x_L (Dejean et al., 2009a). Récemment, un autre groupe a montré, a contrario, que Foxo3 pouvait réguler la réponse des LT CD8+ de manière intrinsèque. La délétion de Foxo3 dans tous les tissus ou uniquement dans les LT impose une expansion clonale de plus grande ampleur des LT CD8+ spléniques suite à une infection par LCMV. Cette accumulation de LT CD8+ spécifique de l'antigène est, a priori, due à une réduction de l'apoptose et non une augmentation de la prolifération. A long terme, un plus grand nombre de LT CD8+ spécifiques subsistent également bien que la phase de contraction ne soit pas affectée. Le contrôle du titre viral lors d'une infection chronique par LCMV est de ce fait favorisé par la délétion de Foxo3 (Sullivan et al., 2012a, 2012b). Ainsi, Foxo3 limite l'amplitude d'une réponse T CD8+, ainsi que l'apparition des cellules MPECs dont émergeront les cellules mémoires à longue durée de vie. Je tiens à souligner ici que le modèle

murin employé par *Sullivan et al.* est le même que celui utilisé par *Lin et al.*, le seul présentant une lymphoprolifération tardive des LT en absence de Foxo3. Il existe donc une réelle différence non identifiée entre ces modèles qui influence drastiquement les phénotypes observés dans les LT. Quoi qu'il en soit de plus amples études sont donc nécessaires pour analyser l'implication extrinsèque et intrinsèque de Foxo3 dans une réponse immune.

Foxo1 semble pouvoir jouer un rôle dans la différenciation mémoire de par le panel de gènes qu'il induit. Foxo3, quant à lui, paraît influer principalement l'accumulation des LT spécifiques de l'antigène au cours de la réponse, aboutissant à terme à un plus grand nombre de LT mémoires spécifiques. La question alors soulevée est l'impact de ces facteurs sur la fonctionnalité des LT mémoires lors d'une re-stimulation. La délétion de Foxo3 ne semble pas affecter qualitativement la réponse des LT mémoires générés dans ce contexte, en terme de production d'IFNγ par exemple. En revanche, la délétion de Foxo1 affecte non seulement la survie à long terme des LT mémoires, mais également leur capacité lors d'une réponse secondaire. En effet, ces cellules présentent un défaut important d'expansion et de fonctions effectrices, comme la production d'IFNγ. Il serait intéressant de savoir si Foxo1 affecte directement les fonctions des LT mémoires lors d'une réponse secondaire ou si ceci est dû à la manière dont ces cellules ont été générées *in vitro*. Il est également possible que la délétion prolongée de Foxo1 affecte l'état général d'une cellule (propriété de survie, de résistance au stress, d'induction d'apoptose) la rendant non répondeuse en cas de stimulation antigénique.

Notons ici qu'une partie de la littérature implique également les facteurs FoxOs dans la différenciation des LT $CD4^+$. Bien que n'étant pas l'intérêt premier de ce manuscrit, je voudrais juste souligner quelques points à ce sujet. Les facteurs FoxOs régulent la balance de différenciation entre LT régulateurs et LT effecteurs (Figure 15). Des études ont permis de montrer un rôle fondamental de Foxo1 et Foxo3 dans le développement et la fonction des LT régulateurs (Ouyang et al., 2009b; Kerdiles et al., 2010). Ce contrôle s'effectue notamment par la régulation directe de la transcription du facteur Foxp3, facteur de transcription clé du développement et du fonctionnement des LT régulateurs (Harada et al., 2010; Ouyang et al., 2010). Parallèlement, Foxo1 est requis en aval d'un signal TGF-β pour inhiber l'expression du facteur T-bet qui est impliqué dans la différenciation en LT $CD4^+$ de type Th1.

III.2.6. Discussion générale sur le rôle des FoxOs dans la physiologie des LT CD8+

L'ensemble de ces données confirme un rôle primordial de FoxO1 dans le contrôle de l'homéostasie du pool lymphocytaire T. En effet, il sous-tend parfaitement le concept de dépendance vitale à la circulation des LT quiescents pour leur survie, évoqué dans le chapitre II ; le tout pouvant être régulé au niveau d'une même molécule Foxo1. En effet, ce facteur permet l'expression du CCR7 favorisant la localisation des LT dans des zones riches en IL-7, que ces cellules peuvent capter *via* une régulation de l'IL7R par Foxo1. Il est évident que ce schéma est simplifié puisque nous avons vu que la régulation de ces récepteurs implique d'autres acteurs moléculaires. La quantité d'IL7 disponible, ainsi que la possibilité d'interaction avec des complexes CMH/peptide du soi sont des signaux de survie cruciaux pour les LT naïfs. Les LT mémoires, eux, sont sensibles à des signaux IL-7 et IL-15 pour leur survie (cf. Chapitre II). Ces types de signaux activent modérément la voie PI3K/Akt et la voie Jak/Stat aboutissant à une diminution transitoire de l'expression de l'IL7Rα. Les LT concernés présentent alors une capacité de compétition moindre pour l'IL7. Il est possible d'imaginer que ce mécanisme soit impliqué dans le maintien de la diversité du répertoire des LT (cf. Chapitre II). En conséquence, FoxO1 semble être un facteur intrinsèque clé de régulation de deux grandes caractéristiques du pool lymphocytaire T énoncées au départ : le maintien du nombre de cellules et la polyclonalité.

L'activation modérée de la voie PI3K en aval des signaux de survie participe aussi au maintien du métabolisme anabolique des LT quiescents. Ceci crée un couplage direct entre les récepteurs cruciaux pour les propriétés des LT, tel que le récepteur aux chimiokines pour la circulation, et l'apport d'énergie nécessaire à leurs réalisations. De ce point de vue là, l'impact de la PI3K semble plutôt s'exercer *via* la protéine mTor (cf. Chapitre II). Il est possible que, lors de la circulation des LT dans les vaisseaux, ces cellules utilisent la petite quantité d'énergie disponible pour leur fonctionnement. On pourrait également imaginer, en se basant sur le travail de *Zhao et al.* que l'activité des FoxOs, pleinement restaurée en absence de signaux de survie, favorise l'acquisition d'énergie par une autophagie transitoire. Notons que si le contexte environnemental favorise une autophagie prononcée, le rôle des FoxOs pourrait basculer de facteur de survie à facteur induisant l'apoptose.

La régulation de la quiescence et de la circulation par les FoxOs favorise la rencontre entre un LT et la CPA portant l'antigène spécifique et le déclenchement d'une réponse en conséquence. Lors d'un contact LT-DC portant l'antigène spécifique, de nombreux signaux sont perçus par le LT *via* le TCR, les molécules de co-stimulation et les récepteurs aux

cytokines (IL2R, IL12R notamment). Ceci engendre une forte activation de la voie PI3K/Akt aboutissant notamment à l'inactivation et l'exclusion nucléaire drastique des FoxOs. Le programme transcriptionnel des FoxOs est alors éteint, au profit d'un autre permettant une activation lymphocytaire T efficace *via* un arrêt de la migration de ces cellules et leur entrée en cycle. De plus, cela lève une voie de répression du facteur de transcription T-bet, crucial à la différenciation en LT effecteurs. Des éléments de réflexion pour la compréhension de cette balance proviennent d'un modèle où Akt est activée de façon sous-optimale du fait de l'absence de phosphorylation par PDK1 qui ne peut être recrutée à la membrane par le PIP3. Dans ces conditions, on observe une phosphorylation/inactivation partielle de Foxo1/Foxo3 sur les sites T24/T32 respectivement. En réponse à une stimulation antigénique et cytokinique, ces cellules conservent une capacité de croissance et de prolifération. Par contre, elles n'acquièrent pas le profil d'expression classique de T effecteurs en terme de molécules impliquées dans le homing : elles expriment toujours fortement Klf2, CD62L, CCR7 et S1P1 (Waugh et al., 2009). Ceci est également le cas dans un modèle où la sous-unité p110δ de la PI3K est privée de son domaine catalytique fonctionnel (Sinclair et al., 2008). En conséquence, la force des signaux initiateurs pourrait guider la mise en place d'une réponse et notamment, ici, par un mécanisme de contrôle garantissant une activation optimale et la prolifération de LT avant l'acquisition de la faculté à rejoindre les tissus affectés. Les facteurs FoxOs constituent donc un point central d'intégration d'une variété de signaux successivement perçus au cours d'une réponse. A chaque instant, la modulation fine de leurs activités transcriptionnelles participe à la progression de la réponse.

En présence de signaux de stress, les facteurs FoxOs vont réguler une fine balance entre progression en cycle arrêt et apoptose. Ce contrôle est dépendant du FoxO considéré, du type cellulaire et de la nature et intensité des signaux perçus par les cellules. Il est possible de proposer le modèle suivant. Selon l'état de différenciation de la cellule, le rôle des FoxOs serait d'inhiber l'entrée en cycle (maintien de la quiescence des LT) ou de l'arrêter (dans le cas de cellules prolifératives). Lorsque les signaux de stress persistent, quand un certain nombre de dommages ont été accumulés ou en présence de signaux de nature particulière, les FoxOs pourraient faire pencher la balance en faveur de l'apoptose de la cellule. Cette complexité de régulation peut être sous-tendue par les divers modes de contrôle de la transcription génique par les FoxOs. Par exemple, l'activité transcriptionnelle des FoxOs peut être directe ou nécessiter la présence de co-facteurs. Une étude a mis en évidence ce phénomène en comparant le profil transcriptionnel d'une lignée exprimant une forme constitutivement

active de FOXO1 à celle contenant la même protéine mais incapable de se lier à l'ADN (mutation H215R dans le domaine *Forkhead*). Dans ces conditions, le mutant H215R n'a plus la faculté d'induire l'expression des gènes pro-apoptotiques, mais conserve celle de transcrire les gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (Ramaswamy et al., 2002). Ceci peut s'expliquer par l'interaction de FOXO avec des cofacteurs pour activer un panel de gènes à défaut d'un autre, comme décrit précédemment pour le cofacteur Sirt-1 (Brunet et al., 2004).

Dans ces conditions, il est légitime de questionner le rôle des facteurs FoxOs dans la différenciation en LT effecteurs versus LT mémoires. D'autant plus que, les premiers sont soumis en fin de réponse à une apoptose massive, alors que les seconds persisteront à long terme. Tout d'abord, il est possible que localement les LT ne perçoivent pas les mêmes signaux, d'où une activation différentielle des FoxOs et bien sûr d'autres acteurs. Ceci pourrait orienter progressivement la différenciation des cellules. Deuxièmement, l'aspect temporel est à prendre en compte. En effet, certaines études montrent que des LT mémoires pourraient émerger indépendamment d'une différenciation en LT effecteurs préalables. On peut alors imaginer qu'une activation modérée de la voie PI3K/Akt favorise l'apparition de LT mémoires. Ceci pourrait être le cas en début de réponse, lorsqu'un fort environnement stimulateur n'est pas encore en place, ou fin de réponse, lorsque cet environnement a largement décru. La cinétique de combinaison des signaux pourrait aussi en être à l'origine. Cette hypothèse semble d'ailleurs cohérente avec dans ce cas le maintien d'une capacité prolifération et celui de l'expression des marqueurs de circulation dans les OLS, l'ensemble étant typique d'un phénotype Tcm. En fin de réponse, la déprivation en facteurs de survie ou la forte concentration de ROS pourraient être radicale pour les LT activés, en expansion du fait du rôle des FoxOs dans l'apoptose dans ce type de conditions. En périphérie, l'élimination de l'antigène, la disparition de signaux de survie, la forte concentration d'IFNγ ou de molécules suppressives (type TGFβ) pourrait restaurer l'activité des FoxOs, menant à l'apoptose des LT. La complexité des mécanismes de régulation des FoxOs pourrait sous-tendre la fine régulation entre apoptose et persistance. En effet, il est important de rappeler que l'induction d'un panel de gènes plutôt qu'un autre par les FoxOs dépend non seulement de sa localisation subcellulaire, de son expression, mais aussi de ses partenariats avec divers cofacteurs. Par ailleurs, son rôle de régulateur du remodelage de la chromatine étoffe la complexité mais aussi la flexibilité de la présence et de l'activité du réseau moléculaire induit. Le programme moléculaire induit par les FoxOs, ainsi que leur(s) activité(s) pourraient

participer à la mise en place de la diversité des voies de différenciation des LT $CD8^+$ et/ou être un marqueur de l'état de différenciation.

Ainsi, les facteurs FoxOs semblent impliqués dans un grand nombre de fonctions des LT et parfois de façon a priori contradictoire. Plusieurs paramètres peuvent participer à l'explication de ces phénomènes. Tout d'abord, il existe une redondance fonctionnelle uniquement pour certaines propriétés cellulaires entre les FoxOs. Ensuite, la multiplicité des mécanismes de régulation de l'activité des facteurs FoxOs permet une adaptation locale et temporelle à chaque contexte environnemental. Troisièmement, les FoxOs présentent en réalité plusieurs niveaux d'actions : dans le cytosol, mais aussi dans le noyau où il agit comme régulateur de la chromatine et comme facteur de transcription. Enfin, la nature très variée des gènes cibles des FoxOs est un exemple flagrant de leur large panel d'action. C'est dans le cadre de ce dernier point que s'insère mon travail de thèse.

IV. Identification d'une nouvelle cible transcriptionnelle putative de FOXO1 : Fam65b

Des travaux antérieurs menés au laboratoire ont montré que la stimulation antigénique de LT humains primaires entraîne une forte activation de la voie PI3K/Akt, aboutissant à l'exclusion nucléaire du facteur FOXO1 (Fabre et al., 2005). Le panel de gènes induit par FOXO1 étant dépendant du contexte cellulaire, ce travail a été poursuivi par l'analyse du transcriptome de FOXO1 dans les LT. Ainsi, des expériences de puces à ADN ont été réalisées au laboratoire afin d'identifier des cibles transcriptionnelles de FOXO1 dans un modèle de cellules T leucémiques Jurkat. Cette lignée cellulaire est caractérisée par l'absence d'expression de l'enzyme PTEN (Phosphatase and TENsin homolog), catalysant la déphosphorylation du PIP3 en PIP2. En absence de PTEN, l'accumulation de PIP3 entraîne une activation constitutive d'Akt et, ainsi, une exclusion nucléaire permanente des FoxOs. Ainsi, dans des cellules leucémiques Jurkat, les facteurs FoxOs, localisés dans le cytoplasme, ne peuvent exercer leur activité de régulateurs transcriptionnels. L'idée a donc été de faire exprimer une forme de FOXO1 mutée sur les trois résidus phosphorylés par Akt (FOXO1-TM) qui reste, ainsi, confinée dans le noyau. N'étant ainsi pas soumis à une régulation par Akt, FOXO1-TM exerce constitutivement son activité transcriptionnelle.

Contre toute attente, les gènes connus pour être des cibles transcriptionnelles de FOXO1, dans d'autres modèles cellulaires, se sont révélés faiblement induits dans un contexte lymphocytaire T. C'est le cas par exemple des gènes codant pour les protéines Bim et $p27^{KIP1}$. Par contre, FOXO1 induit préférentiellement un ensemble de gènes impliqués dans la circulation des LT, tels que CD62L, CCR7et S1P1 (Fabre et al., 2008a) (Figure 16). Ces données ont été par la suite confirmées *in vivo* par d'autres équipes, démontrant physiologiquement que la régulation de ces gènes par FoxO1 affecte le homing ganglionnaire des LT (Kerdiles et al., 2009; Ouyang et al., 2009b; Gubbels Bupp et al., 2009). Ces résultats montrent que les facteurs FoxOs régulent conjointement la quiescence et la mobilité des LT. L'idée est donc que le contrôle moléculaire commun de la migration et de la quiescence permet à un LT d'atteindre les zones propices à la rencontre avec les cellules présentatrices d'antigène. Ceci fait d'autant plus sens, que lors de l'activation, l'extinction de ce contrôle implique simultanément l'arrêt et l'activation du LT. Les facteurs FoxOs semblent donc être un nœud de cette régulation, favorable au déclenchement d'une réponse immune efficace lorsque nécessaire.

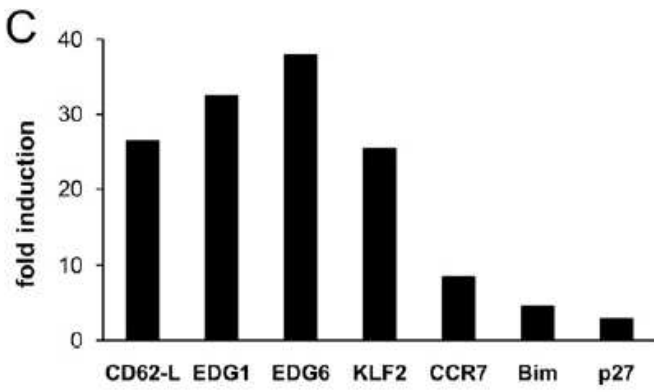


Figure 16: Quantité de transcrits mesurée par RT-PCR quantitative dans des cellules de la lignée leucémique Jurkat infectée par une forme constitutivement active de FOXO1 comparée à celle mesurée dans des cellules infectées par un vecteur contrôle.
(Fabre et al., 2008)

Mon travail a porté sur l'étude d'une nouvelle cible, *Fam65b,* qui fait parti des gènes les plus fortement induits dans notre analyse du transcriptome induit par FOXO1 dans les LT (Figure 17).

Gene	Description	Fold increase
LTB	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3) (LTB), transcript variant 1, mRNA [NM_002341]	15.8
SELL	selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1) (SELL), mRNA [NM_000655]	13.6
Fam65b	mRNA for KIAA0386 gene, partial cds. [AB002384]	13.1
THC2002539	Unknown	10.7
EDG6	endothelial differentiation, G-protein-coupled receptor 6, mRNA [NM_003775]	8.1
EDG1	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor 1, mRNA [NM_001400]	7.8

Figure 17: L'expression de Fam65b est induite dans des cellules Jurkat exprimant une forme constitutivement active de FOXO1

Les quelques travaux disponibles dans la littérature impliquent Fam65b dans des modifications morphologiques associés aux processus de fusion cellulaire au cours du développement placentaire, musculaire et neuronal. Ainsi, le développement du placenta nécessite une fusion des cytotrophoblastes pour former des syncitiotrophoblastes. Ce processus de fusion est précédé d'une hausse des ARNm de *Fam65b* (Dakour et al., 1997). De même, une augmentation de l'expression de *Fam65b* est observée au cours de la différenciation musculaire, lorsque les myoblastes fusionnent en syncitia. Réciproquement, l'inhibition de son expression par la technique d'interférence à ARN implique un défaut de fusion des myoblastes (Yoon et al., 2007). Ces résultats ont été confirmés dans des cellules musculaires de caille où l'expression de Fam65b favorise la formation de myotubes (Hirayama and Kim, 2008). Fam65b semble également pouvoir réguler le cytosquelette. En effet, la surexpression de Fam65b dans des cellules musculaires provoque la formation de protrusions membranaires, riches en actine ou en tubuline (Yoon et al., 2007).

Une autre approche globale, menée indépendamment au laboratoire, a été réalisée afin d'identifier les partenaires protéiques des Rho GTPases. Cette famille de protéines est étudiée par l'équipe pour son implication dans l'activation et la mobilité des LT (cf. Encart n°2). La réalisation de ce crible double hybride a permis de mettre en évidence une interaction directe entre Fam65b et les Rho GTPases.

Fam65b est donc une cible transcriptionnelle de FOXO1, qui interagit avec les Rho GTPases et qui modifie la morphologie cellulaire par son rôle sur le cytosquelette (Yoon et al). Ces différents éléments nous ont amené, dans un premier temps, à étudier le rôle de Fam65b sur la mobilité des LT. Dans un second temps, nous avons exploré son rôle sur la prolifération.

Encart n°2 : Les Rho GTPases : régulation de leurs activités et effets biologiques

Les GTPases de la famille Rho sont des acteurs moléculaires essentiels de la signalisation cellulaire. Les Rho GTPases les plus étudiées dans un contexte lymphocytaire T sont : Rac, Cdc42 et RhoA. Elles sont activées en aval de divers signaux issus du récepteur à l'antigène, des molécules de co-stimulation, des récepteurs aux cytokines et des récepteurs aux chimiokines. Les Rho GTPases alternent, en effet, entre deux conformations : une forme inactive couplée au GDP et une forme active couplée au GTP qui est capable de se lier et d'activer diverses protéines effectrices. Trois classes de protéines régulent l'équilibre entre ces deux conformations (Figure 18).
Les voies de signalisation contrôlées par les GTPases de la famille Rho impliquent de multiples effecteurs. La GTPase Rac1, par exemple, est connu pour son rôle dans la polymérisation de l'actine *via* son effecteur Wave qui active le complexe Arp2/3 de nucléation de l'actine. Ce complexe peut également être activé en aval de la GTPase Cdc42 *via* son effecteur Wasp. RhoA, quant à elle, est notamment impliquée dans la contraction de la myosine *via* son effecteur ROCK, jouant un rôle fondamental dans la formation de l'uropode. Ainsi, les Rho GTPases participent à de nombreuses propriétés des LT, telles que l'adhésion, la polarisation, la migration, l'activation, la progression dans le cycle cellulaire et la régulation de l'expression de gènes spécifiques (Rougerie and Delon, 2012).

Des interactions ont été décrites entre les voies Rho GTPases et PI3K. Certains facteurs promouvant le chargement en GTP (GEF) des GTPases Rac/Rho possèdent un domaine PH capables de lier le PIP3 produit par les PI3K. Cette liaison pourrait favoriser le recrutement localisé des GEF dans des régions membranaires spécifiques et /ou moduler leur activité. Vav1 est un exemple de GEF, activée en aval de la PI3K, qui a un rôle crucial dans l'activation des LT. Enfin, des études suggèrent que les Rho GTPases peuvent également agir en amont de la voie PI3K/Akt, avec un rôle activateur de Rac et inhibiteur de RhoA démontré dans les LT. Ce dernier point reste néanmoins à confirmer (Cantrell, 2003a, 2003b).

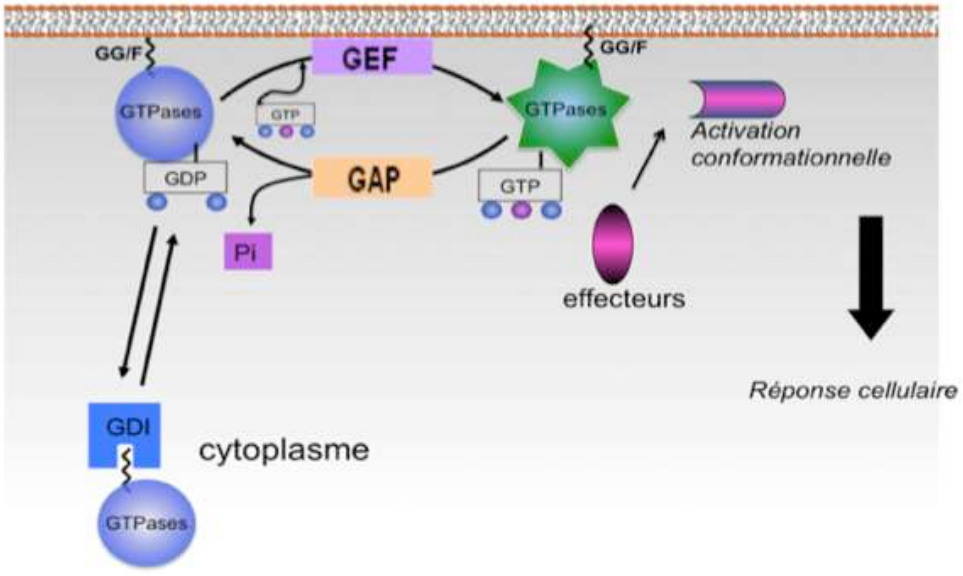


Figure 18 : Quelques mécanismes de régulation des Rho GTPases.
Les Rho GTPases canoniques alternent entre une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP. Les GEF, localisées pour la plupart à la membrane cellulaire, favorise l'activation des Rho GTPases. Les GAP catalysent l'hydrolyse du GTP et inactive ainsi les Rho GTPases. Les GDI, quant à elles, se fixent sur les Rho GTPases et, en les séquestrant dans le cytoplasme, inhibent leur activation. Les Rho GTPases actives se lient à leurs effecteurs et induisent chez eux des changements de conformation qui les activent à leur tour.

RESULTATS

V. Fam65b, nouvelle cible transcriptionnelle de FOXO1, contrôle la migration des LT en régulant la voie de signalisation RhoA

L'une des propriétés fondamentales des LT quiescents est leur capacité à sillonner l'organisme, passant d'un OLS à un autre, en empruntant notamment les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Un rôle primordial du facteur FoxO1 a été rapporté dans ces processus, et plus particulièrement dans le homing ganglionnaire. En effet, FoxO1 régule l'expression de molécules de surface clés de l'entrée dans les ganglions comme CD62L, CCR7 et S1P1, et ce notamment *via* l'expression du facteur de transcription Kfl2.
Dans le travail présenté ici, nous démontrons que Fam65b est une cible transcriptionnelle de FoxO1. Une étude précise du locus *fam65b in silico*, nous permet d'établir que l'expression de chacune des deux isoformes de Fam65b est sous le contrôle de son propre promoteur et que chacun de ces deux promoteurs possède des sites de réponse au facteur de transcription FOXO1. La fonctionnalité de ces deux promoteurs, ainsi que la présence des sites de fixation de FOXO1, sont vérifiées à l'aide de tests luciférase et d'expériences d'immuno-précipitation de la chromatine.
Afin d'étudier le rôle de Fam65b dans la capacité migratoire des LT, nous avons utilisé la technique d'interférence à ARN dans des LT primaires humains. La comparaison *in vitro* des LT, exprimant ou non Fam65b, nous permet de mettre en évidence que Fam65 régule négativement le seuil d'activation des LT en réponse à une stimulation par la chimiokine CCL19. Ceci se traduit par une augmentation de l'adhésion, de la polarisation et de la migration des LT n'exprimant pas Fam65b. Ces données sont, en partie, confirmées *in vivo* dans un modèle xénobiotique original, faisant appel à la microscopie intravitale.
Au niveau moléculaire, nous établissons grâce à une approche par double hybride, confirmée par des expériences de pull down, que les deux isoformes de Fam65b sont des ligands de la RhoGTPase RhoA. La fixation de Fam65b sur RhoA se fait par l'intermédiaire d'un domaine compris entre les acides aminés 54 à 113 de Fam65b et elle est indépendante de l'état d'activation de RhoA. Enfin, nous démontrons que cette interaction dans des LT primaires est inhibée très rapidement (2 min) en présence de la chimiokine CCL19.
Au niveau mécanistique, nous montrons, à l'aide de protéines recombinantes, que la présence de Fam65b inhibe le chargement de RhoA en GTP, obtenu en présence du domaine DBS, domaine actif commun à une majorité des GEF. Ce résultat est confirmé dans des LT primaires humains exprimant ou non Fam65b (siRNA). En effet, nous constatons que la quantité de RhoA actif est plus importante dans des LT n'exprimant pas Fam65b. Enfin, nous montrons qu'un mutant de Fam65b, dépourvu du domaine de fixation à RhoA, n'inhibe plus la migration des LT.
Nous avons donc identifié une nouvelle cible de FoxO1 dans les LT, qui abaisse de façon tonique le seuil d'activation des LT et en réponse à une stimulation par la chimiokine CCL19. Nous avons montré que cette inhibition résulte de la régulation négative de l'activation de la Rho GTPase RhoA. L'ensemble de ces données, nous permet donc d'établir un lien moléculaire entre deux molécules (FoxO et RhoA), dont la coordination est impliquée dans le contrôle de la migration. Ainsi, Fam65b est un nouvel « effecteur » de FoxO1 dans la régulation de la mobilité des LT.

Ce travail est actuellement en révision.

Fam65b is a new transcriptional target of FOXO1 that regulates RhoA signaling for T lymphocyte migration

Pablo Rougerie,[*,3] Quitterie Largeteau,[*,3] Laura Megrelis,[*,3] Florent Carrette,[*,1] Thomas Lejeune,[*,2] Lara Toffali,[§] Barbara Rossi,[§] Mahel Zeghouf,[¶] Jacqueline Cherfils,[¶] Gabriela Constantin,[§] Carlo Laudanna,[§] Georges Bismuth,[*] Marianne Mangeney,[*,4] and Jérôme Delon[*4,5]

[*]Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes, Paris, France.

[§]Department of Pathology, Division of General Pathology, University of Verona, Verona, Italy.

[¶]Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, Centre National de la Recherche Scientifique, Centre de Recherche de Gif, Gif-sur-Yvette, France.

Present addresses:

[1]The Scripps Research Institute, Department of Immunology and Microbial Science, La Jolla, California, USA.

[2]SBIGeM, CEA/Saclay, Gif-sur-Yvette, France.

[3]P.R., Q.L. and L.M. contributed equally to this work.

[4]M.M. and J.D. contributed equally to this work.

[5]Correspondence: jerome.delon@inserm.fr; Ph: (33)-1-40-51-66-40; Fax: (33)-1-40-51-65-55.

Running title: Identification of a FOXO1-induced RhoA down-modulator.

Forkhead box Os (FOXOs) transcription factors favor both T cell quiescence and trafficking through their control of the expression of genes involved in cell cycle progression, adhesion and homing. Here, we report the characterization of the product of the *fam65b* gene, as a new target of FOXO1. We show that Fam65b binds the small GTPase RhoA *via* a non canonical domain and represses its activity by decreasing its GTP loading and consequently negatively regulates chemokine responses such as adhesion, morphological polarisation and migration. Therefore, these results show the existence of a new functional link between FOXO1 and RhoA pathways. We propose that the FOXO1 target Fam65b tonically dampens chemokine-induced migration by repressing RhoA activity.

INTRODUCTION

Efficient T-cell adaptive immune responses take place in secondary lymphoid organs such as lymph nodes (LN). Thus, circulating T lymphocytes have to leave the blood stream to home in LN through high endothelial venules (HEVs) and perform their surveillance task. This motile behavior necessitates a tight control of expression of some cell surface proteins such as the adhesive molecules CD62L and LFA-1, and the CCR7 chemokine receptor (1). In addition, many signaling pathways responsible for profound alterations in T lymphocyte morphology are activated during this migratory process and during motility inside LN (2).

Using a large scale study of the genes that are specifically controlled by FOXO1 in human T cells, we have previously shown that FOXO1 regulates a much larger set of genes than previously expected. In addition to controlling a specific category of genes involved in T lymphocyte quiescence and survival, FOXO1 also controls expression of the CD62L and CCR7 homing receptors (3). These results have been largely confirmed in murine systems (reviewed in (4)). However, no putative transcriptional targets of FOXO1 involved in the control of signals transduced downstream these homing receptors have been identified so far.

Here, we describe the function of a new gene controlled by FOXO1 called *fam65b* that fulfils such a function. In resting T cells, we report that Fam65b negatively regulates adhesion, polarisation and migration. Mechanistically, we show that Fam65b represses these responses by inhibiting RhoA activity, a GTPase particularly important for cell migration (5). This shows the existence of a novel and unsuspected link between FOXO1 and RhoA pathways. Taken together, our results demonstrate that Fam65b is a target gene of FOXO1 that regulates the triggering threshold of RhoA-dependent chemokine responses.

Materials and Methods

In silico *analysis*

The following publicly accessed databases were used: BLAST, UniGene, *GeneCards, GeneAtlas,* Clustal, Pfam, InterProScan, PSORT II Prediction, Panther and PROSITE

. Accession numbers are: *fam65b* (UGID:1775160); Fam65b isoform 1 (Fam65b(1), 140 kDa, NP_055537.2); Fam65b isoform 2 (Fam65b(2), 85 kDa, NP_056948.2).

qRT-PCR

Total RNA was prepared using RNeasy mini kit (Qiagen). cDNA was produced with the Advantage RT-for-PCR kit (Clontech Laboratories) using 1 µg of total RNA and random hexamer priming in a final volume of 20 µl. Real-time quantitative PCR was performed by using the LightCycler FastStart DNA Master plus SYBRGreen kit (Roche Diagnostics). Genes of interest were detected using primers that had been designed with the Oligo6 software (Molecular Biology Insights) and optimized to generate a single amplicon of 80–130 nucleotides. The sequences of the primers used in qRT-PCR experiments are the following: *ppia* (F): 5'- GGT GAC TTC ACA CGC CAT AAT G -3'; *ppia* (R): 5'- ACA AGA TGC CAG GAC CCG TAT -3'; *fam65b* (F): 5'-GCG GAG TTT AAC CTC AGC AG-3'; *fam65b* (R): 5'-CCT TCA GGT GTG ACT TTG GC-3'; *iso1*(F): 5'- GTC CCC TTC ACC CAA GT-3'; *iso1*(R): 5'- GGG TTC TCT GGC ATA TAA AAG-3'; *iso2*(F): 5'- CGC AAG AAT GCAT ACA AAC-3'; *iso2*(R): 5'- GAA GGC AGT TTG AGC GA-3'.

Luciferase assays

The FOXO1 enhancer in the *iso1* (130 650-131 815) and *iso2* promoter region (164 220-165 360) was amplified from human genomic DNA using the following set of primers: *iso1*-KpnI: 5'-ATACATGGTACCATGTTCCCTTTCGGCTAATGTCTCA-3' and *iso1*-BglII: 5'-ATGTATAGATCTGACGGCTCCTTGTCATGTCAGGGGC-3; *iso2*-KpnI: 5'-ATACATGGTACCGTCAAATTGAGTACAGAAAGAACAG-3' and *iso2*-BglII: 5'-ATGTATAGATCTCTCAAAGCTACGCGAAGCAGCTCAG-3'). DNA was amplified for 30

cycles (94°C 30 s, 68°C 30 s) in 2× buffer with 1.5 mM $MgCl_2$, 0.25 mM dNTPs, 0.5 µM each primer, 100 ng genomic DNA, and 5 U *pfx platinium* (Invitrogen) in a total volume of 50 µl. The amplified sample was digested with KpnI and BglII and introduced into the pGL3 vector (Promega) opened by the same enzymes. Jurkat T antigen cells ($5x10^6$/well) were co-transfected with Firefly luciferase reporter construct (5 µg), CMV-Renilla luciferase reporter construct (0.1 µg) and *FOXO1(3A)-GFP*. 24 h after transfection, cells were lysed in passive cell lysis buffer (500 µl) and luciferase activity was assayed using the Dual-Luciferase Reporter assay system (Promega) as *per* the manufacturer's instructions.

Constructs

The pEGFP-C3-RhoAN19 constructs was provided by M.R. Philips (New York University School of Medicine, USA). The FOXO1(3A)-GFP and FOXO1(3A, H215R)-GFP plasmids were previously described (3, 6). Fam65b(2) was PCR-amplified using a V5-tagged fam65b vector (7) as a template; the PCR fragment was then introduced into pEGFP-N1 vector (Clontech). Fam65b(1) was PCR-amplified using T lymphocyte cDNA as a template and similarly introduced into pEGFP-N1. V5-tagged Fam65b(2) truncated mutants were described (7).

ChIP assays

JTag cells infected with lentiviral vectors encoding GFP or FOXO1(3A)-GFP were used three days later for some ChIP experiments performed with the Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay kit (Millipore) according to the manufacturer's instructions. Anti-GFP and control irrelevant rabbit IgG were purchased from Abcam. DNA was extracted using a phenol/chloroform method. PCR reactions were conducted using the ampliTaq Gold kit with Gene Amp using the following parameters: 30 cycles (94°C 30 s, 58°C 1 min, 72°C 1.5 min) and the indicated primers (Supplemental Fig. 2B, C). Migration of PCR products was then performed with 2.5% agarose gels.

Yeast two-hybrid screen

Yeast two-hybrid screening was performed by Hybrigenics (Paris, France) using full-length Fam65b(2) as bait to screen a random-primed human $CD4^+$ $CD8^+$ thymocytes cDNA library.

Cells

Human PBT were purified from the blood of healthy donors as described (8). Jurkat and 293T cells were cultivated in complete RPMI medium.

DNA and RNAi transfections

293T cells were transfected with Lipofectamine2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. 2.10^6 Jurkat T antigen cells were nucleofected with 4 µg DNA using the Amaxa system (Lonza) (kit V, program X001). 5.10^6 PBT per cuvette were nucleofected with 10 µg DNA of the indicated construct using Amaxa and the U14 program. For RNAi experiments, 2.10^6 PBT per cuvette were nucleofected with 2 µl of a 100 µM solution of OTP smartpool RNAi (Dharmacon) directed against human Fam65b or non-targeting sequences as a control. Cells were rested for 10 min in RPMI at 37 °C and then supplemented with complete RPMI medium containing human AB serum and 5 U/ml IL-7. Cells were then tested for functional experiments 3 days after nucleofection when the level of Fam65b knock-down was maximal.

Biochemistry

Protein expression levels of Fam65b were analysed by Western blot as described (8). Both Fam65b isoforms were revealed by immunoblotting with anti-FAM65b (Abnova). Other blotting antibodies were anti-RhoA (Cytoskeleton) and anti-β actin (Sigma) followed by goat-anti-mouse-HRP (BioRad) incubation and ECL revelation.

For pull-down assays, beads containing GST-tagged RhoA (Cytoskeleton) were incubated with 1 mM GDP or 0.2 mM GTPγS in the presence of 15 mM EDTA at 30 °C for 15 min and then locked in the GDP or GTPγS -bound conformation by supplementing 60 mM $MgCl_2$. They were then added to the cleared lysate of Fam65b-GFP -expressing 293T cells in the following buffer: 100

mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% NP-40, 10% glycerol, 2 mM $MgCl_2$ in the presence of Complete protease inhibitors. For pull-down assays on PBT, 5.10^7 cells were stimulated with 200 ng/ml CCL19 for different times and the lysates were similarly submitted to a pull-down assay using 5 μg GST or GST-RhoA coated on glutathione beads. Alternatively, His-RhoA or His-RhoAL63 proteins (Cytoskeleton) were loaded on LiquiChip® Penta-His beads (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and put in presence of GST-Fam65b(2) recombinant protein (Abnova) in PBS containing 1% BSA. All samples were then agitated for 1h, washed and processed as described above. Membranes were blotted with anti-GFP (living colors, Molecular Probes), anti-V5 (Invitrogen), anti-His (Invitrogen), anti-Fam65b (Abnova) or anti-GST (Amersham) antibodies. Goat anti-mouse or anti-rabbit antibodies (BioRad) conjugated to HRP were then used and membranes were revealed by ECL.

RhoA activation assay

RhoA-GTP levels were measured using the G-LISA™ RhoA activation assay (Cytoskeleton). PBT stimulated or not with CCL19 (200 ng/ml) for 30 sec were lysed for 30 min with occasional stirring in the following lysis buffer in the presence of complete protease inhibitors: 50 mM Hepes, 1% Triton-X100, 0.5% deoxycholate, 0.05% SDS, 500 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA, 20 mM Benzamidine. Protein concentrations were quantified according to the manufacturer's recommendations. Equal amounts of proteins were added in triplicate to a 96-well plate coated with the RhoA binding domain of Rhotekin and incubated at 4 °C for 1 hour. Wells containing only some lysis buffer were used as blank samples. After washing, the amount of RhoA-GTP bound to each well was revealed by an anti-RhoA antibody followed by a secondary HRP-labeled antibody and detection of HRP. Signals were measured with a microplate spectrophotometer by quantifying absorbance at 490 nm.

Nucleotide Exchange Kinetics Assay

Nucleotide exchange activity on 2 μM of RhoA was measured with or without 2 μM of Dbs using a RhoGEF exchange assay kit (Cytoskeleton, Inc.) according to the manufacturer instructions, except that 6His-RhoA was produced in our laboratory (9). Fluorescence measurements were performed at 25 ˚C in a 384-well plate using a FlexStation 3 (Molecular Devices) with excitation and emission wavelengths of 360 and 440 nm, respectively. The exchange reaction was initiated by addition of Dbs, with or without 0.6 μM of recombinant Fam65b (Abnova) and monitored for 30 min. k_{obs} were calculated by fitting the fluorescence changes to a single exponential, using the Prism 5 software (GraphPad Software, Inc.).

Flow cytometry

PBT were stimulated at 37 °C with 100 ng/ml CCL19 for different times, fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, permeabilised with 0.1% saponin and incubated with phalloidin-TRITC (Sigma). The F-actin content was then measured in each sample by flow cytometry using a FACScan (Becton Dickinson). JTag cells nucleofected with GFP, FOXO1-GFP, FOXO1(3A)-GFP or FOXO1(3A, H215R)-GFP were similarly processed for flow cytometry using an anti-Fam65b antibody (Santa Cruz).

Immunocytochemistry

PBT unstimulated or stimulated with 100 ng/ml CCL19 for different times, were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 mins, permeabilised with 0.1% Triton-X100 and incubated with a combination of phalloidin-Alexa-Fluor350 (Invitrogen), anti-moesin (C-15, Santa Cruz) and anti-Fam65b (Antibody Research, Inc. or Santa Cruz). Because we have confirmed that PFA fixation does not work for RhoA staining (10), anti-RhoA (26C4, Santa Cruz) immunofluorescence was performed using a 10% *trichloroacetic acid (TCA) fixation method together with a P-ERM (Cell Signaling Technology) staining to localize the uropod. Unfortunately, Fam65b staining does not work with TCA fixation which precludes the possibility of performing a RhoA-Fam65b co-staining.*

DAPI stainings (blue) were used in some cases to stain the nucleus. Primary antibodies were revealed by FITC- or Texas Red- conjugated anti-rabbit, anti-mouse or anti-goat IgG antibodies (Jackson ImmunoResearch). T lymphocytes were then allowed to sediment, mounted on glass coverslips using FluorSave^{TM} Reagent (Calbiochem) and imaged by confocal microscopy.

Adhesion assays

For under-flow adhesion assays, CT or Fam65b KD T cells were resuspended at 10^6/ml in standard adhesion buffer (PBS, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 % FCS, pH 7.2). Cellular adhesive interactions were studied in underflow conditions with the BioFlux 200 system (Fluxion Biosciences). A 48-well plate microfluidics was first co-coated overnight at room temperature with human E-selectin (5 µg/ml; R&D system) and human ICAM-1 (5 µg/ml; R&D system) in PBS. Before use, microfluidic channels were washed with PBS, coated with 2 µM CCL19 in PBS for 3 h at room temperature and the assay was done at a wall shear stress force of 2 dyne/cm^2. After extensive washing of channels with adhesion buffer, the behavior of interacting lymphocytes was recorded on digital drive with a fast CCD videocamera (25 frames/sec, capable of 1/2 subframe 20 msec recording) and analyzed subframe by subframe. Single areas of 0.2 mm^2 were recorded for at least 120 sec. Interactions of 20 msec or longer were considered significant and scored. Lymphocytes that remained firmly adhesive for at least 1 sec were considered fully arrested. Cells arrested for at least 1 sec or 10 sec were scored.

In vivo lymphocyte arrest on blood vessels endothelial cells was studied by intravital microscopy as described (11). Briefly, CT or Fam65b KD T cells (in DMEM without sodium bicarbonate supplemented with 20 mM HEPES, 5 % FCS, pH 7.1) were labelled with either CMFDA (1 min at 37 °C) or CMTMR (3 min at 37 °C). 15 x 10^6 labelled cells were injected i.v. in the tail vein of C57BL/6J mice. *In situ* video-microscopic analyses were carried out in Peyer's patches HEVs. Experiments were recorded on digital videotape with a high sensitive fast SIT videocamera (25

frames / sec). Cell behavior was analysed over a period of 20-30 min starting 2 min after i.v. injection. T lymphocytes that remained firmly arrested for at least 10 sec were scored.

Polarization

T cell polarization assays and the analysis of the 4 categories of morphological changes elicited by CCL19 stimulation were performed as described (12).

Migration

Nucleofected PBT were placed on the upper chamber of a 5-µm diameter transwell (Nunc). Different concentrations of CCL19 were put in the lower chamber and the cells were allowed to migrate for 3 hours. Lymphocytes that had reached the lower chamber were then harvested, put in a FACScan tube together with an equal amount of flow check fluorspheres (Beckman Coulter). The number of migrating cells was analysed by flow cytometry relative to the number of beads.

Statistics

Means +/- SE are shown when indicated. Statistically significant differences between groups were assessed with the Student's *t* test calculated with KaleidaGraph.

Results

Fam65b is induced by FOXO1

We initially identified *fam65b* as a major response gene of FOXO1 by microarray experiments in human T lymphocytes (3). Fam65b (Family with sequence similarity 65 member b) also called fam65b, has two paralogs (Fam65a and Fam65c), all three molecules being well conserved from Zebra fish to humans (Supplemental Fig. 1A), especially in their N-terminal regions. In humans, this gene is located on chromosome 6 and encodes two isoforms (Supplemental Fig. 1B). A UniGene search for the distribution of the transcripts indicated that *fam65b* mRNA levels are particularly high in blood cells and adult tissues of hematopoietic origin such as the secondary lymphoid organs (Supplemental Fig. 1C).

As presented in supplemental figure 2, the *fam65b* gene encodes two mRNA isoforms resulting from two alternative promoters that give rise to two proteins. To further characterize the regulation of Fam65b expression by FOXO1, we designed PCR primers amplifying specifically each isoform, and followed their expression in the Jurkat T cell line expressing a constitutively active nuclear form of FOXO1 (FOXO1(3A)). As shown in figure 1A, Jurkat cells expressing FOXO1(3A) exhibited a 4.5 ± 0.1 and 6.5 ± 3 (mean ± S.E.M.) fold increase in Fam65b isoform 1 (iso1) and isoform 2 (iso2) transcript levels respectively, as measured by qRT-PCR. In the same context, the H215R mutant, which does not bind DNA, induced only a marginal increase of 2 ± 0.1 for isoform 1 and 1.75 ± 0.35 for isoform 2 in transcript levels.

In order to better identify the role of FOXO1 on *fam65b* transcription, we analysed the regulation of each *fam65b* transcript by its own promoter. To determine whether FOXO1 directly controlled *fam65b* gene transcription, we searched for evolutionary conserved FOXO1-binding site in the two *fam65b* promoters with the Genomatix program. We found one putative FOXO1 site within the 500 pb of iso1 promoter region and four within iso2 that were conserved between mouse and human (Supplemental Fig. 2B, C). To further demonstrate that FOXO1 does indeed regulate Fam65b expression, luciferase reporter plasmids of *fam65b* were constructed for each promoter and

co-transfected with FOXO1(3A) vector into Jurkat cells. The results showed that, as the FOXO1 content increased, the luciferase activity of isoform 1 promoter (3.5 ± 0.4) and isoform 2 promoter (8.9 ± 0.9) was significantly increased (Fig. 1B). To investigate further whether FOXO1 directly binds these DNA elements, we used Jurkat cells transduced with FOXO1(3A) fused with GFP or GFP alone to perform chromatin immunoprecipitation experiments. For the promoter of isoform 1, a genomic fragment containing the FOXO1 site but not an irrelevant sequence is selectively enriched with anti-GFP antibody only in FOXO1(3A)-transduced cells (Fig. 1C). For the isoform 2 promoter, only the most proximal 5' fragment is detected with anti-GFP in FOXO1(3A)-transduced cells, demontrating that only this site is active in T lymphocytes for regulating isoform 2 expression by FOXO1. These findings demonstrate that the two isoforms of Fam65b are direct FOXO1 targets in T cells.

We next aimed at determining whether FOXO1 control of *fam65b* transcription allows Fam65b expression. We show that only the constitutively active form of FOXO1 is able to induce Fam65b expression (Fig. 1D). The wild type form of FOXO1 fails to induce Fam65b expression because we show that it localises in the cytosol. This is most certainly due to the fact that the Jurkat cell line that lacks expression of the lipid phosphatase PTEN exhibits a tonic inactivation of both its endogenous and overexpressed FOXO1 proteins (3).

Altogether, these results demonstrate that FOXO1 directly controls *fam65b* transcription and consequently, the expression of this protein in T lymphocytes.

Fam65b negatively regulates adhesion, polarization and migration upon chemokine stimulation

In unstimulated T cells, we and others have previously shown that FOXO1 controls the expression of CCR7 which binds the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 (3, 13). CCR7 is crucial for lymph node homing (14) or during intra-nodal motility (15-17). Because we demonstrate here that

FOXO1 also controls Fam65b expression in resting T lymphocytes, we next tested whether Fam65b plays a role in CCL19 responses.

Using a RNAi approach (Supplemental Fig. 3A), we first tested whether Fam65b plays a role in T cell adhesion upon CCL19 stimulation. Adhesion under flow upon chemokine stimulation elicits a rapid inside-out mechanism of integrin activation that supports a quick cell arrest that might be followed by additional mechanisms to stabilize adhesion (18). Under-flow adhesion assays were conducted for control (CT) and Fam65b knocked-down (KD) T lymphocytes visualised in microfluidic channels coated with CCL19, E-selectin and ICAM-1. The behavior of CT and KD T cells is quantified in Fig. 3A. KD T cells have a lower tendency to exhibit rolling (Fig. 2A, *left*) and reciprocally show an increased propensity to adhere briefly (Fig. 2A, *middle*) or more stably (Fig. 2A, *right*). We next aimed at evaluating the adhesive role of Fam65b in the complexity of an *in vivo* situation under physiological shear stress forces. We used a validated xenobiotic setting that consists in imaging the microcirculation of human T cells in the Peyer's patches HEVs of anesthetized mice by intravital microscopy (11). In these conditions, Fam65b depletion increases the percentage of stably arrested T lymphocytes (Fig. 2B). Therefore, Fam65b negatively regulates T lymphocyte adhesion, both *in vitro* and *in vivo*.

We then analysed the capacity of Fam65b KD cells to polarize morphologically upon CCL19 stimulation as described (12). Interestingly, even without any chemokine stimulation, Fam65b KD cells tend to spontaneously polarize slightly more than control cells (Fig. 2C). After CCL19 stimulation, twice as many KD cells progressed toward the fully polarized stage compared to control cells (Fig. 2C).

As polarity establishment is considered to be a prerequisite for optimal migration (19, 20), we next aimed at testing a role for Fam65b in T cell migration. We observed in transwell assays that KD cells had a higher ability to migrate toward CCL19 than control cells (Fig. 2D). This effect was quite dramatic at sub-optimal CCL19 concentration as the sole Fam65b depletion was able to turn

immobile cells into lymphocytes efficiently migrating 4 times above the baseline level (Fig. 2D*, middle*), a phenomenon most likely due to the higher fraction of polarized cells.

Altogether, these results show that Fam65b inhibits T cell adhesion, polarisation and migration.

Fam65b is a new partner of RhoA

In our initial attempt to delineate the signaling pathways regulated by Fam65b, several independent observations pointed toward the RhoA GTPase. (i) A remarkable aspect is that the T cell functions reported above, in which Fam65b has an inhibitory role, have been reported to depend on RhoA activity, whereas actin polymerization in primary T lymphocytes is controlled neither by RhoA nor by Fam65b (Supplemental Fig. 3B) (21-25). (ii) An *in silico* approach using Panther classification system for phylogenetically related proteins identified Fam65b as a molecule related to the RhoA partner PKN (26, 27) (PTHR15829). (iii) A yeast two-hybrid screen set up for identifying Fam65b partners identified the small GTPase RhoA as a possible candidate for Fam65b binding.

In order to confirm this interaction, we realized a series of pull-down assays. As shown in figure 3A and B, both Fam65b isoforms strongly interact with RhoA in an inactive GDP-bound form as well as an active GTP-bound form. Titering down the amount of RhoA-GDP or RhoA-GTP in this assay still maintained similar binding to Fam65b (Fig. 3C), irrespective of the type of nucleotide loaded. Association of Fam65b with wild-type RhoA or the constitutively active mutant RhoAL63 was also detected purely *in vitro,* demonstrating a direct association between Fam65b and RhoA (Fig. 3D).

We next attempted to identify the Fam65b region responsible for RhoA binding. A series of truncated Fam65b mutants was tested in a pull-down assay for interaction with RhoA. N-terminal deletion of the first 54 amino acids maintained the ability of this mutant to bind RhoA (Fig. 3E). However, removal from amino acid 113 and beyond completely abrogated RhoA interaction. Conversely, deletion of the last 101 amino acids did not affect binding to RhoA. We conclude that

Fam65b binds RhoA through the 54-113 region of Fam65b, a protein segment predicted to display a coiled-coil structure.

In addition, we could detect an interaction between RhoA and endogenous Fam65b in the lysates of primary human T cells (Fig. 3F). Interestingly, this association was the strongest in unstimulated T lymphocytes and was transiently decreased upon CCL19 stimulation. This result indicates that CCL19 stimulation transiently frees RhoA from the inhibitory effect of Fam65b, most likely to allow appropriate RhoA activation once the T cell has been stimulated.

Fam65b inhibition of migration depends on RhoA binding

We next aimed at determining whether the Fam65b-RhoA interaction could account for the effect of Fam65b on T cell migration.

We first checked whether RhoA controls T cell migration as described for many other cell types (5). This was verified in our system for T cell migration elicited by CCL19 signaling using a dominant negative mutant of RhoA. The inhibition of RhoA activity elicited a 63 % inhibition of T cell migration (Fig. 4A).

In addition, overexpression of full-length Fam65b inhibited T cell migration whereas the Δ113 mutant, that does not bind RhoA, did not show such an effect (Fig. 4B). This result confirms the inhibitory effect of Fam65b on chemokine-induced migration, and unveils the requirement for the RhoA binding region of the protein for this inhibition.

This indicates that Fam65b needs to interact with RhoA for inhibiting T cell migration.

Fam65b inhibits RhoA activity

The functional effects of Fam65b on migration could thus arise from an inhibition of the activity of its partner RhoA. To further test this hypothesis, we directly measured the content of active GTP-bound RhoA in Fam65b-KD or control cells. The results show that resting KD cells had a higher content in RhoA-GTP that did not increase substantially after chemokine stimulation contrary to

control T cells (Fig. 5A), indicating that Fam65b acts as a factor that tonically inhibits the RhoA pathway in unstimulated T lymphocytes. This could explain that in the absence of Fam65b, we observed an increase in chemokine-independent polarization and migration. We conclude that Fam65b inhibits RhoA activity by decreasing the T cell RhoA-GTP content.

In order to delineate the molecular mechanism by which Fam65b inhibits RhoA activity, we performed an *in vitro* nucleotide exchange assay to measure the kinetics of RhoA GTP loading by the Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF) domain of the RhoGEF Dbs in the presence of Fam65b. In a solution containing fluorescent GTP, we could observe a slow and passive loading of GTP on RhoA that was largely independent of the presence of Fam65b (Fig. 5B, *left*). However, addition of recombinant Dbs accelerated GTP loading as expected. Interestingly, the presence of Fam65b slowed down the exchange rate of Dbs on RhoA, as shown by a 5-times reduction in the k_{obs} value (Fig. 5B, *right*).

Therefore, we conclude that Fam65b down-modulates the exchange reaction that GEFs perform on RhoA and consequently, dampens levels of active RhoA in T cells.

Discussion

Here, we report that the transcription factor FOXO1 does not only regulate the expression of homing receptors as previously demonstrated (3), but also controls an important signaling pathway involved in T cell migration. We have found that Fam65b, a phylogenetically well-conserved protein, takes part in the cooperativity between the FOXO1 and RhoA modules in order to modulate T cell motility. Our work provides important information regarding this new protein: we demonstrate that Fam65b is induced by FOXO1 and represses RhoA activity.

It is puzzling to note that FOXO1 seems to have opposite effects on motility as it induces expression of CD62L and CCR7 that favor homing and expression of Fam65b that inhibits migration. It is not clear at the moment whether this paradox constitutes for FOXO1 a way of finely regulating motility. Alternatively, our *in vivo* data demonstrate a negative role for Fam65b in T cell adhesion to HEVs. This could allow FOXO1 to indirectly promote homing again by avoiding T cells to exhibit too strong adhesive properties that would maintain them otherwise stuck onto blood vessels. The use of a mouse model deficient for Fam65b should allow us to test this possibility.

We show that Fam65b markedly affects adhesion, polarization and migration upon chemokine exposure although it does so without exhibiting obvious changes in its subcellular localization (Supplemental Fig. 4A). This is in agreement with the fact that Fam65b can interact with RhoA independently of the type of nucleotide it bears and that the total pool of RhoA is distributed on both sides of a polarised T cell (Supplemental Fig. 4B) (10). We report here that Fam65b exerts a tonic inhibition on RhoA activity. Together with other necessary signaling pathways triggered upon chemokine stimulation, the depletion in Fam65b is thus likely to account for the advantage exhibited by the KD cells to polarize and migrate. Interestingly, we also show that Fam65b-RhoA interaction decreases upon CCL19 stimulation, suggesting that the loss of Fam65b control on RhoA activity is likely to allow for RhoA activation in normal conditions.

Fam65b is an unexpected regulator of RhoA. Indeed, it does not contain any known consensus domain found in typical RhoA interactants such as GAP (GTPase Activating Protein) and GEF proteins. It does not present any sequence similarity with GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) proteins either. In addition, as effectors can discriminate between the GDP- and GTP-bound forms of Rho GTPases, Fam65b does not belong to this class of Rho partners. Interestingly, previous papers have reported possible new mechanisms for RhoA regulation. The unrelated F11L (28) and Memo (29) proteins that do not contain any canonical domain of interaction with RhoA were indeed described as RhoA partners and regulators. Although the three proteins do not share any obvious sequence identity, these results indicate that RhoA activity can be controlled by thus far unrecognized mechanisms. We show here that Fam65b inhibits the exchange reaction performed by GEFs on RhoA. It would be interesting to determine whether these three non canonical RhoA partners, i.e. F11L, Memo and Fam65b, share a similar regulatory mechanism on RhoA.

Fam65b has previously been shown to be up-regulated during placenta and muscle cell differentiation and to induce membrane protrusions necessary for cell-cell fusion (7, 30, 31). In fact, it is the 54-113 portion of the protein that is required for this morphological effect in myoblasts (7). Interestingly, we show that this particularly well conserved region related to PKN is necessary to bind RhoA, suggesting that the effect of Fam65b on myoblast fusion may depend on its ability to interact with RhoA and to inhibit its activity. Consistent with this model, others have shown that a decrease in RhoA-GTP content was indispensable to allow myoblast fusion (32). Therefore, we consider most likely that Fam65b behaves as an inducible repressor of RhoA activity to allow cell-cell fusion during muscle or placenta formation is most likely.

In conclusion, we have identified here a new RhoA down-modulator whose expression is tightly controlled by FOXO1. Although our data have been obtained in T lymphocytes, the mechanisms uncovered in these cells may be of much wider significance in other cell types for

contributing to other cell-specific functions. We have shown that Fam65b acts as a brake for T cell migration, and therefore represents a new target by which FOXO1 can regulate motile processes.

Acknowledgements

We thank E. Gussoni, S.M. Hedrick and M.R. Philips for providing reagents or mice; F. Campo-Paysaa for help with the phylogeny analysis; R.N. Germain, E. Gussoni, A. Trautmann, C. Randriamampita, E. Donnadieu and C. Charvet for discussions and critical reading of the manuscript.

Funding support

This work was supported by Inserm, CNRS and Ligue Nationale contre le Cancer; G.C. was supported by the European Research Council grant NEUROTRAFFICKING 261079; P.R., Q.L. and L.M. were supported by fellowships from the Ministry of Research and Higher Education. F.C. was supported by a fellowship from Association pour la Recherche sur le Cancer.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Fam65b expression is controlled by FOXO1. (**A**) Jurkat cells transduced with GFP, FOXO1(3A)-GFP or FOXO1(3A, H215R)-GFP were analyzed 48 hrs later for *fam65b* isoform 1 or 2 transcript levels by qRT-PCR. Data are from three independent experiments. (**B**) Jurkat cells were co-transfected with a construct encoding FOXO1(3A)-GFP together with a luciferase reporter plasmid containing the putative FOXO1 enhancer in *fam65b* isoform 1 or 2 promoters and an internal *Renilla* luciferase reporter construct driven by the CMV promoter. 24 h post transfection, cells were lysed and *Firefly* and *Renilla* luciferase activities were measured. Data are shown as means of two independent experiments conducted in triplicate. (**C**) Chromatin proteins in Jurkat cells infected with GFP (control) or FOXO1(3A)-GFP were cross-linked to DNA and immunoprecipitated using anti-GFP or non immune rabbit IgG control. Eluted DNAs were diluted for PCR and amplified DNA fragments using specific primers (supplemental Fig. 2) were resolved on gel. (**D**) Flow cytometry analysis of Fam65b expression in Jurkat cells transfected with plasmids encoding GFP, FOXO1-GFP, FOXO1(3A)-GFP or FOXO1(3A, H215R)-GFP. Left: examples of dot plots. Top right: Overlays of Fam65b expression gated in cells expressing GFP (plain black histogram), FOXO1-GFP (grey line), active FOXO1(3A)-GFP (black line) and active FOXO1(3A, H215R)-GFP (grey dotted line). Bottom right: Mean fluorescence intensities of Fam65b expression in the different transfectants (means +/- SE from six independent experiments).

FIGURE 2. Fam65b inhibits T cell adhesion, polarization and migration upon chemokine stimulation. (**A**) Under-flow adhesion to ICAM-1 was tested in PBT transfected with control (CT) or Fam65b (KD) RNAi. The % of cells exhibiting rolling (*left*), or arrest for at least 1 sec (*middle*) or 10 sec (*right*) is shown. Means +/- SE from seven independent experiments. (**B**) The % of control (CT) or Fam65b-depleted (KD) PBT that arrested at least 10 sec on Peyer's patches HEVs *in vivo* were quantified (means +/- SE from ten microscopic fields obtained in four mice). (**C**) PBT transfected with control (CT, left) or Fam65b (KD, right) RNAi were stimulated or not with 100

ng/ml CCL19 for 8 mins, fixed and stained for F-actin. Each cell was scored into one of the four categories previously described (12): weak homogenous actin (black), mislocalized actin (white), polarized actin (light grey) and fully polarized with a uropod (dark grey). For each category, one example of the F-actin staining depicted with an inverted black and white scale is shown as an illustration. One example out of three experiments is shown. (**D**) PBT transfected with CT or Fam65b (KD) RNAi were tested for migration to different concentrations of CCL19 in a 3-hour transwell assay. One representative experiment out of three is presented.

FIGURE 3. Fam65b interacts with RhoA. Lysates from 293T cells transfected with Fam65b(1)-GFP (**A**) or Fam65b(2)-GFP (**B**) were subjected to a pull-down assay using beads bearing GST alone or 8 μg GST-RhoA loaded with GDP or GTPγS. wcl: whole cell lysate. (**C**) The lysate from 293T cells transfected with Fam65b(2)-GFP was incubated in a pull-down assay with 9, 3 or 1 μg GST-RhoA beads loaded with GDP or GTPγS. The RhoA-Fam65b association was tested by Western blot in the different conditions. (**D**) Human recombinant Fam65b(2) tagged with GST was added to beads loaded with no protein, His-RhoA (28 kD) or His-RhoAL63 (22 kD). Direct protein-protein interaction was analysed by pull-down assay. Note that both recombinant RhoA proteins have slightly different molecular weight due to a small irrelevant amino acid stretch present between the His tag and the RhoA sequence of the wild type protein. (**E**) Left panel: The deletion mutants of Fam65b(2) are schematically represented. Right panel: Lysates from 293T cells transfected with Fam65b(2)-V5 FL (Full Length) or different deletion mutants in N- or C-terminal were submitted to a pull-down assay using GST-RhoA beads. For each transfectant, the first lane shows the wcl fraction and the second lane shows the amount of Fam65b(2) FL or mutant bound to RhoA. Each panel shows a representative experiment of at least three independent assays. (**F**) Lysates from PBT stimulated for different times with 200 ng/ml CCL19 were submitted to a pull-down assay using GST or GST-RhoA beads (top two panels). Fam65b in the whole cell lysate

fraction is shown as a loading control (bottom panel). One experiment representative of three independent ones is shown.

FIGURE 4. The role of Fam65b in T cell migration depends on RhoA binding. (**A**) PBT transfected with GFP or GFP-RhoAN19 were tested as described previously in a transwell assay. The percentages of migratory T cells were normalized to the GFP-transfected population in each experiment set to 100. Data are from two independent experiments (**p*=0.039). (**B**) PBT transfected with empty vector (EV), full-length (FL) Fam65b(2) or Nt-Fam65b(2)Δ113 (Δ113) were similarly tested in a migration assay. Data obtained for each condition was normalised to the migration index obtained in EV-transfected T cells set to 100. Data are from eight donors (**p*=0.02; ***p*=0.005).

FIGURE 5. Fam65b inhibits RhoA activity. (**A**)

PBT transfected with CT or Fam65b (KD) RNAi were stimulated or not with 200 ng/ml CCL19 for 30 sec. The active RhoA-GTP content was measured for each condition in triplicate by the G-LISA^{TM} method. Data from three independent experiments are shown (n.s.: not significant; ***p*=0.0317; ****p*=0.0075). (**B**) Recombinant RhoA and Fam65b were placed alone or in combination in wells of a 384-well plate. Recombinant Dbs was then added and the plate was put in a FlexStation to read the evolution of RhoA GTP loading by fluorescence (*left*). Means +/- SE of k_{obs} values for RhoA+Dbs (n=8) or RhoA+Dbs+Fam65b (n=6) (*right*) (**p*=0.014).

Figure 1

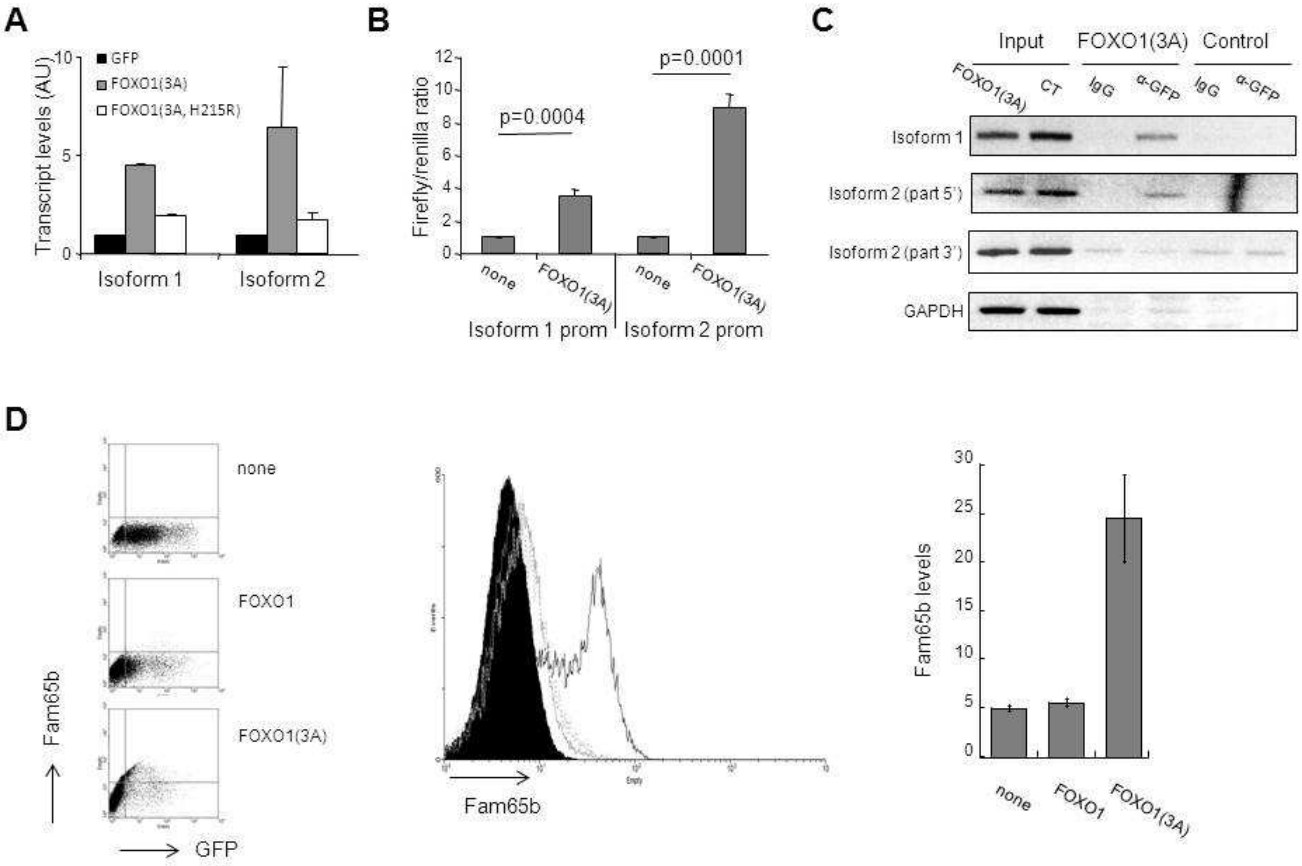

A
Transcript levels (AU)
GFP
FOXO1(3A)
FOXO1(3A, H215R)
Isoform 1
Isoform 2
B
Firefly/renilla ratio
p=0.0004
p=0.0001
none
FOXO1(3A)
Isoform 1 prom
Isoform 2 prom
C
Input
FOXO1(3A)
Control
CT
IgG
α-GFP
Isoform 1
Isoform 2 (part 5')
Isoform 2 (part 3')
GAPDH
D
none
FOXO1
FOXO1(3A)
Fam65b
GFP
Fam65b
Fam65b levels

Figure 2

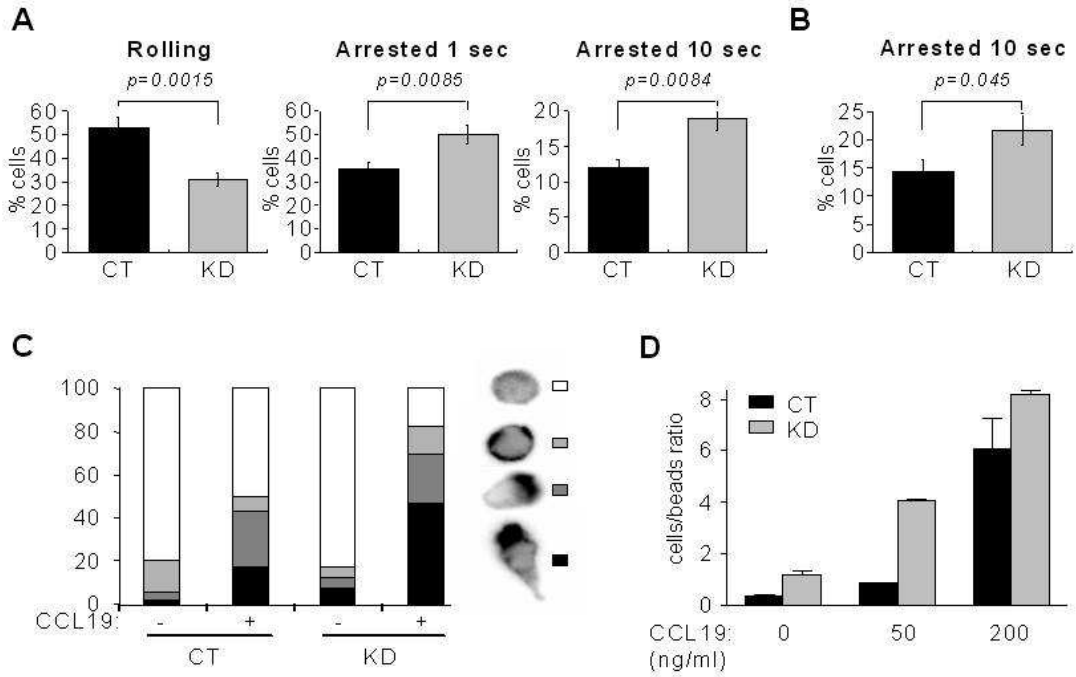

A
Rolling
p=0.0015
Arrested 1 sec
p=0.0085
Arrested 10 sec
p=0.0084
% cells
CT
KD
B
Arrested 10 sec
p=0.045
C
CCL19:
D
cells/beads ratio
CCL19: (ng/ml)
0
50
200

Figure 3

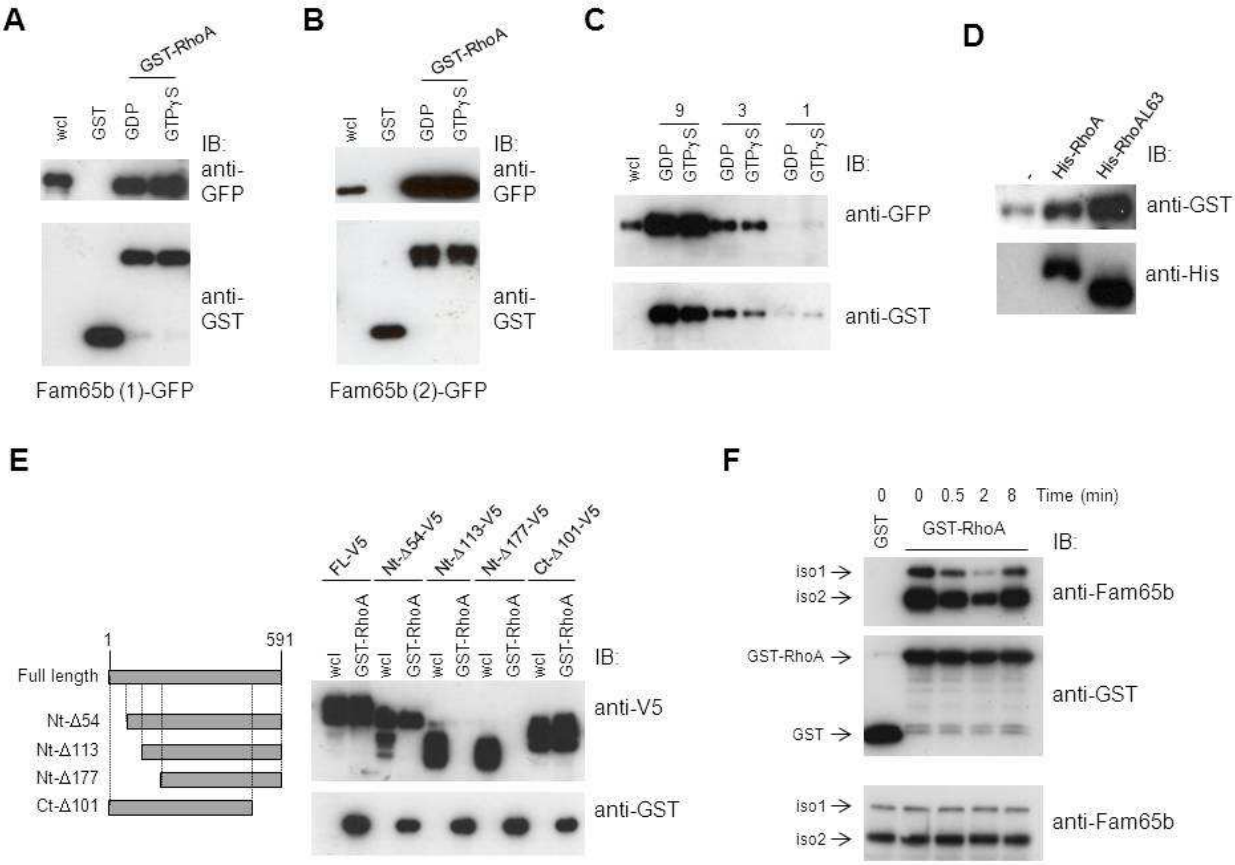

A
GST-RhoA
wcl
GST
GDP
GTPγS
IB:
anti-GFP
anti-GST
Fam65b (1)-GFP
B
GST-RhoA
wcl
GST
GDP
GTPγS
IB:
anti-GFP
anti-GST
Fam65b (2)-GFP
C
9
3
1
wcl
GDP
GTPγS
GDP
GTPγS
GDP
GTPγS
IB:
anti-GFP
anti-GST
D
His-RhoA
His-RhoAL63
IB:
anti-GST
anti-His
E
1
591
Full length
Nt-Δ54
Nt-Δ113
Nt-Δ177
Ct-Δ101
FL-V5
Nt-Δ54-V5
Nt-Δ113-V5
Nt-Δ177-V5
Ct-Δ101-V5
wcl
GST-RhoA
IB:
anti-V5
anti-GST
F
0
0
0.5
2
8
Time (min)
GST
GST-RhoA
IB:
iso1
iso2
anti-Fam65b
GST-RhoA
GST
anti-GST
iso1
iso2
anti-Fam65b

Figure 4

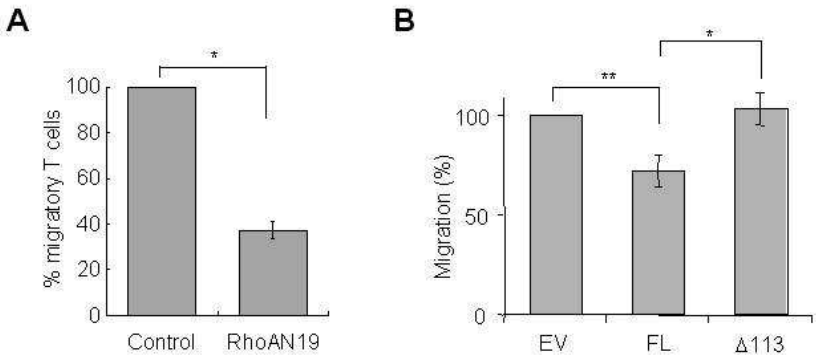
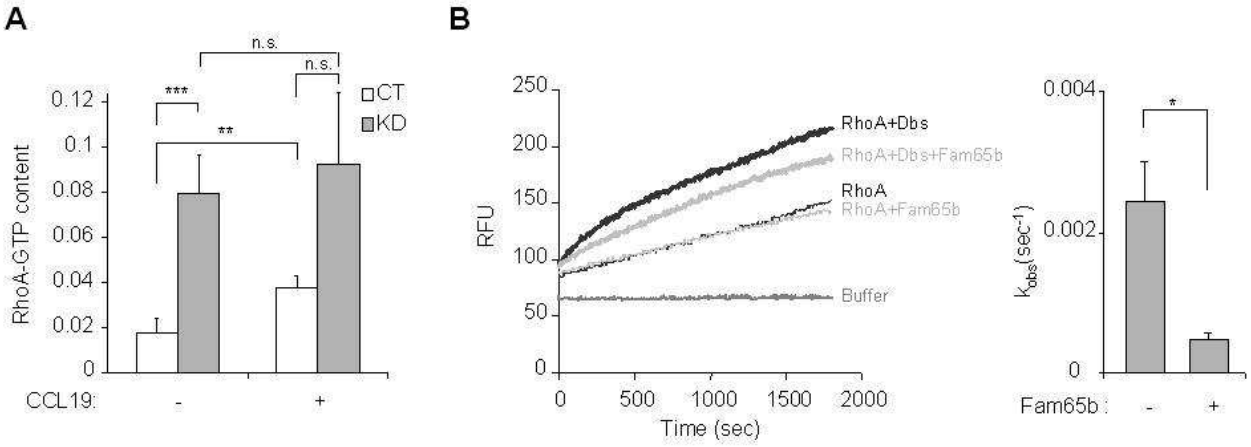

A
B
*
100
80
60
40
20
0
% migratory T cells
Control
RhoAN19
**
*
100
50
0
Migration (%)
EV
FL
Δ113

Figure 5


A
n.s.
n.s.
***
**
CT
KD
RhoA-GTP content
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
CCL19:
-
+
B
250
200
150
100
50
0
RFU
RhoA+Dbs
RhoA+Dbs+Fam65b
RhoA
RhoA+Fam65b
Buffer
0
500
1000
1500
2000
Time (sec)
0.004
0.002
0
K_{obs} (sec^{-1})
*
Fam65b :
-
+

Supplemental Data

Supplemental Fig. 1: *In silico* analysis of Fam65b.

(*A*) Phylogenetic tree for Fam65b. Fam65b (red) is conserved from Zebra fish to humans. Its two homologs (Fam65a in green; Fam65c in blue) are also expressed in the same species. (*B*) The two Fam65b isoforms expressed by alternative splicing of the same gene are schematically represented. The dashed segment in isoform 1 corresponds to a unique amino acid sequence encoded by an exon that is not found in isoform 2. (*C*) EST profile of *fam65b.* Relative distribution of *fam65b* transcripts in various adult human tissues or organs reported by UniGene. No transcript was found in the following: adrenal gland, bladder, bone, cervix, ear, esophagus, heart, larynx, mouth, nerve, ovary, parathyroid, salivary gland and umbilical cord.

Supplemental Fig. 2: Schematic representation of the initial locus of the human *fam65b* gene.

(*A*) Positions of the two promoter regions, transcription initiation sites (arrows), exons and the two *fam65b* 5′ end transcripts detected. Sequences of promoter 1 (*B*) and 2 (*C*) are shown. Predicted FOXO1 sites are depicted with bold blue letters. Sequences of the primers used for the ChIP experiments are underlined.

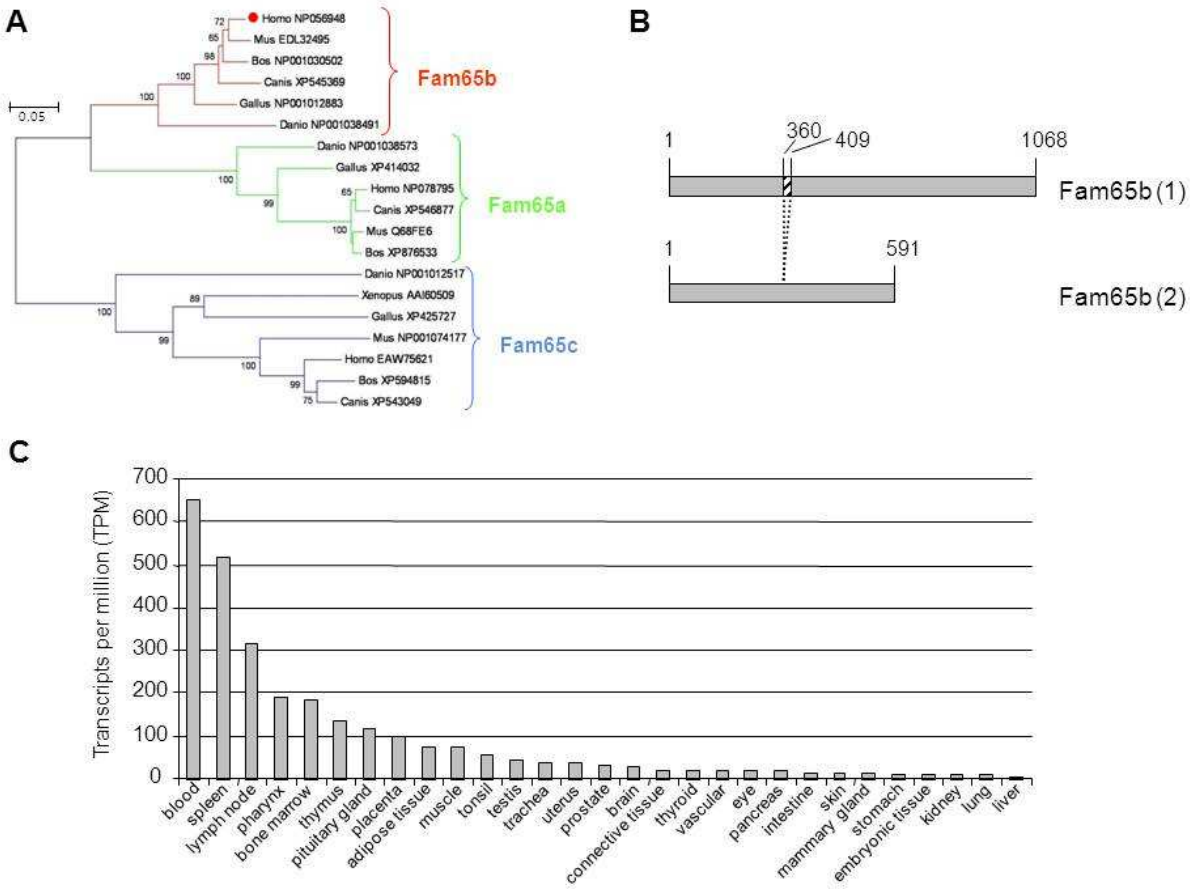
Supplemental Fig. 3: Fam65b knocked-down (KD) T cells exhibit normal actin polymerization upon CCL19 stimulation.

(*A*) The efficiency of Fam65b KD in human PBT was checked by immunoblotting with anti-Fam65b, anti-β actin and anti-RhoA. (*B*) Actin polymerization in CT or Fam65b KD T cells stimulated during different times with CCL19 (100 ng/ml) was measured. No statistical difference between CT and KD was observed.

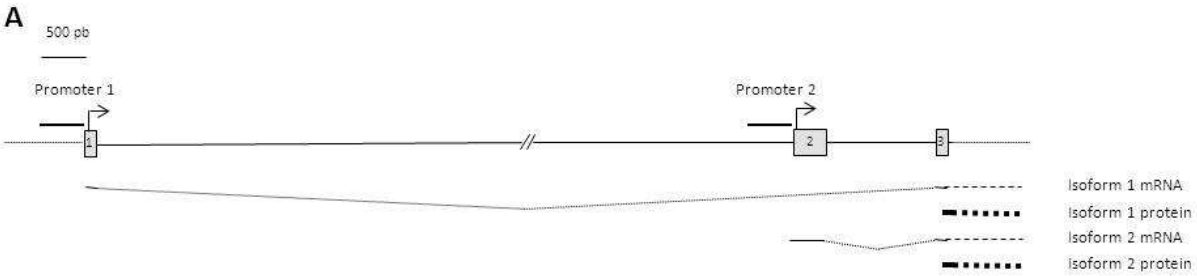
Supplemental Fig. 4: Fam65b is homogenously distributed in chemokine-polarized T cells.

(*A*) PBT were unstimulated (time 0, top) or stimulated with 100 ng/ml CCL19 for 8 mins (bottom), fixed in PFA, and co-stained for moesin (red) and Fam65b (green). (*B*) PBT were stimulated with 100 ng/ml CCL19 for 8 mins, fixed with TCA and stained for RhoA (green), P-ERM (red) and DAPI (blue). The transmitted-light visible picture is shown in the left panel. Images are from three independent experiments.

Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2



B

Promoter 1

```
ATGTTCCCTTTCGGCTAATGTCTCAGCTCACTGATTATTACTGATCCTTTC
ACAAGGTGACTGAATCTCAAGTGGTGTGGGAGGGAGTGGATGTGTCTTGTG
GTACTATTCTAGTTAACATATTCTAAATACACAAATTTATTCATTATGATCA
CTTAACAGATGAGGAGACTGAGGCATAGCAGGGAATCCCTATGTAAGGATG
GAGACTGAGTCAGGACCTTTTCCCTGGGTCCTTGTCGACTCCCAGTTCCAT
ACAGTTTCCACTCCAAAAGCCCTTTTTTGGGAATGTCTGTCTATCAGGCA
GACCCATGCTTTCCCCACAGGAAACCTTTATCATTCAAATCCACCAGAACA
AAATAAAAAACAATTCTCTTTCTGCCATCTTTATGAGAGCTGTGTCCAAAG
CAGCCCCGGTAGAGAGAGTGCCCTACAAAGCAGCCCTCTTCAGCGGGGCTT
TCCAGCACAACCCTTGCCGTGGGCAGCCAACCTCACCCTCACACCGCCCCC
ACCCCATACACCACCGCCTCATTTTTTTCAATGCACAGCCCAGCTTGTATG
AAAGATCCCAAAAGGTTAGCTGAAAGGGCCTTTCCTTGCCTCGGCTCCTTT
CCTCTGCCCTCTCCCTCCAGCGCGCTGGATCCACCGGGCTCGCTCCCCGGC
GCGATTCCACGGGTCACTCGAAAGCTGCCGCGCCAGCTCTTGCAAAGGAGC
CTGGCGTGCCGGCGATCAGCTGGAAGCAGGCACCGAAGCGCAGCCTCCTGG
AGTTGGGCTGAAGTAGCTGTCAAGCAGCTGTCTCCACCGCCCTCCCCTCC
CAGCACAAGTGACGCCGCCGGCCCCCGCGCCGCGCCTCCCCCTCCTCACGG
CTCCCGCCCCTCCGCCCGCTCCGCCGCTCTAGCTCCGCGCTCCGCCACCCT
CGCGCCCGCCAGCCCCGCAACTTCACCCCGCGCGCCGCAGCTGCTGCGAGC
GGACGCGGCAGGGCAGCCGGCGCTGGGGACAGCTCGCGTCCACCCGACTTC
CTCCCGGGGTCCCCTTCACCCAAGTGAGCCAGCTCAGGCTGTCTGCAAAGC
CGGAGGTGC
```

exon 1

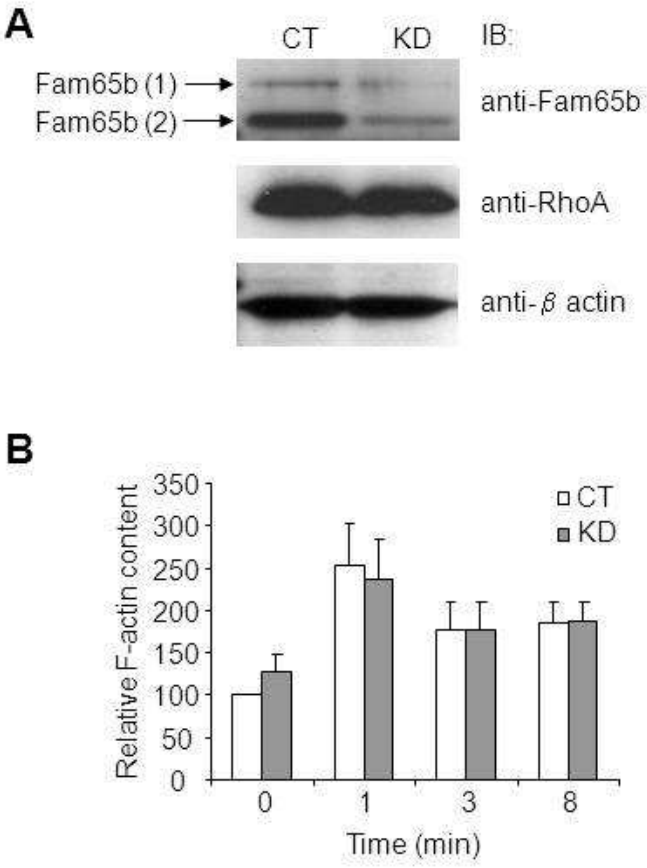
C

Promoter 2

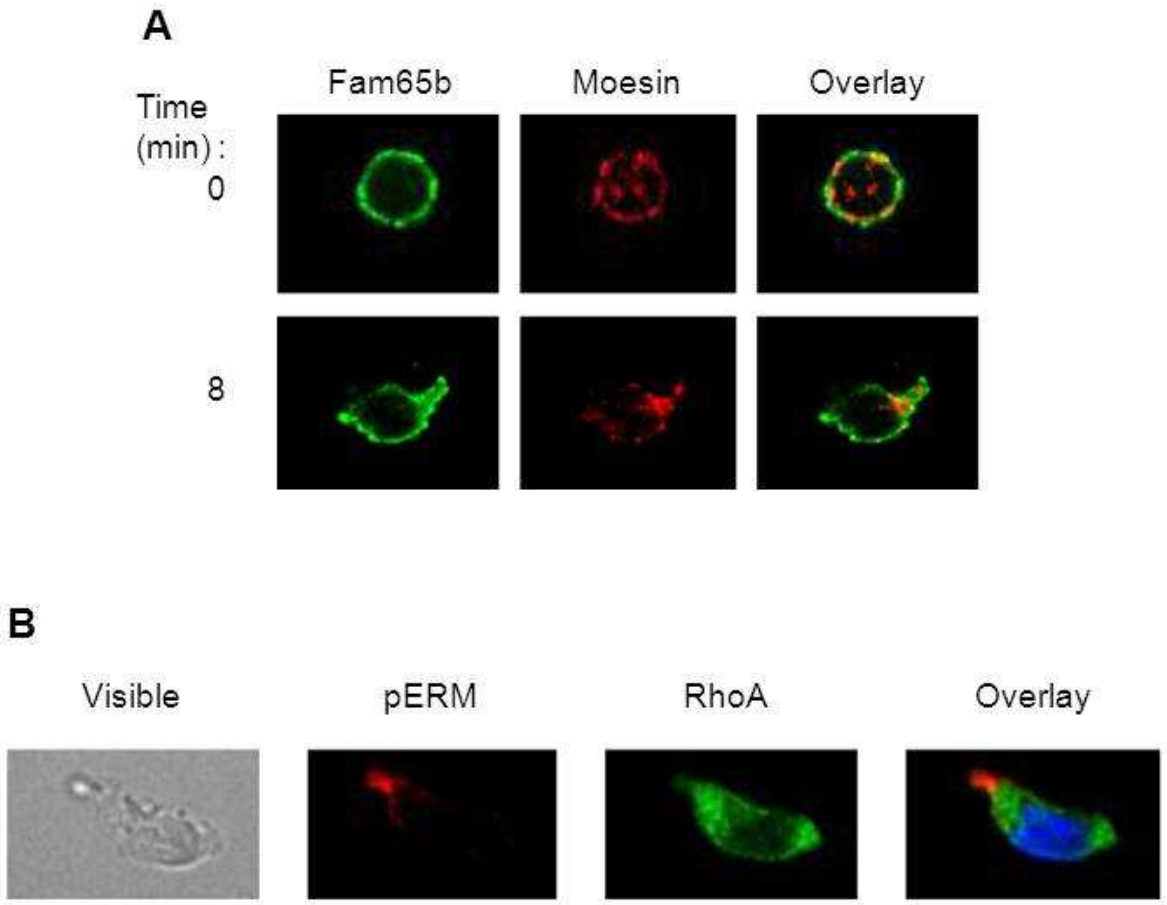
```
GTCAAATTGAGTACAGAAAGAACAGAAATATTAAGAAAGCATGATAGTTTATT
ACAAGTTTGCATGGCATACAGTGATACCACAGGCATGCTTTATGAACCTAAGA
AAGATCCCCTTAAAGAAATGTAGACAGATTTCTCAGTAACCAGCAGAGAGGCAC
AGAGGAGAACCTCATTAAGCATTAAAGGAATTGTTAAATATAGTGAACCCCAA
GTTTCTCTTCAAAGAATCAGTATGTCAGTACGTTCAGGTCTCCTATTCTTTGA
TTCTCCATTTTAAAGTTTAACTTTCTGGTTCTCTTCGTCTCCTTGCTCCTAGT
TTCAGTAAACAGCATTCCCACCAGTCCTAATCAGTAGTTCACATTTGTTCCCC
TGGTCACCTGCTTCATCGTGACTCATCCCAGTCACCTGTTGGACCTGAGTCAC
CCCTGGTCACCTGCTCTGACCTAAGTCACCTTTAGTTACCTGTTCCTAACCGT
CCTTCCTGCCAAACTACCCACCCCACCACTGTGGCTCATACCCCTACTCTCTT
TAAAATAGCCAATCAGAATTAGCTTAGACTGTGCGGTCCAACCCTAGCCAATA
GGGGAACGACACAGCAGTAGGGCCATGCTTCAGGAATAAGAACTCCTGCCCCT
CCCCTGTCCAAGTGTGGTCTCACCATTACTCCATTCATAAGTTGCACCCTTAT
ATAGAAGTAAAAATTGCCTTGCTGAGAAAATTAAATTTATGTTTGATGTGCTAT
TTCCTTGTGGCATCAAAATTTATTTATAACAGAATTAGGAGTTTTTTGAGCC
TTGAGGCTGGGAAGAGTAACCAGAGAGAACCTTATCTGCACTTGCATTTTGT
CTAACCATTTGTGCCCTACATATTACTTTTACTGCTCATACGTACTTCGTCAT
TACTTCTAAAATTCTGGAGAATGCCCTAAAATGTAAGCTGCTCCTCCCCAGGT
AGTATGGGATTTGCATCTCACCCAGATGAAAGAGCAAGCCGATTGCCATACCT
GTAGCCAAGTGAGTCAGCACCTGTACCTCGCAAGAATGCATACAAACTCCAGG
GCTGCTCTCTCCTGGAGAGG
```

exon 2

Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 4



References

1. *Campbell, D. J., C. H. Kim, and E. C. Butcher. 2003. Chemokines in the systemic organization of immunity. Immunol Rev 195:58-71.*

2. *Cahalan, M. D., and I. Parker. 2008. Choreography of cell motility and interaction dynamics imaged by two-photon microscopy in lymphoid organs. Annu Rev Immunol 26:585-626.*

3. *Fabre, S., F. Carrette, J. Chen, V. Lang, M. Semichon, C. Denoyelle, V. Lazar, N. Cagnard, A. Dubart-Kupperschmitt, M. Mangeney, et al. 2008. FOXO1 regulates L-Selectin and a network of human T cell homing molecules downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. J Immunol 181:2980-2989.*

4. *Carrette, F., S. Fabre, and G. Bismuth. 2009. FOXO1, T-cell trafficking and immune responses. Adv Exp Med Biol 665:3-16.*

5. *Ridley, A. J., M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons, and A. R. Horwitz. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. Science 302:1704-1709.*

6. *Fabre, S., V. Lang, J. Harriague, A. Jobart, T. G. Unterman, A. Trautmann, and G. Bismuth. 2005. Stable activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the T cell immunological synapse stimulates Akt signaling to FOXO1 nuclear exclusion and cell growth control. J Immunol 174:4161-4171.*

7. *Yoon, S., M. J. Molloy, M. P. Wu, D. B. Cowan, and E. Gussoni. 2007. C6ORF32 is upregulated during muscle cell differentiation and induces the formation of cellular filopodia. Dev Biol 301:70-81.*

8. *Faure, S., L. I. Salazar-Fontana, M. Semichon, V. L. Tybulewicz, G. Bismuth, A. Trautmann, R. N. Germain, and J. Delon. 2004. ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. Nat Immunol 5:272-279.*

9. *Bouquier, N., S. Fromont, J. C. Zeeh, C. Auziol, P. Larrousse, B. Robert, M. Zeghouf, J. Cherfils, A. Debant, and S. Schmidt. 2009. Aptamer-derived peptides as potent inhibitors of the oncogenic RhoGEF Tgat. Chem Biol 16:391-400.*

10. *Takesono, A., S. J. Heasman, B. Wojciak-Stothard, R. Garg, and A. J. Ridley. 2010. Microtubules regulate migratory polarity through Rho/ROCK signaling in T cells. PLoS ONE 5:e8774.*

11. *Bolomini-Vittori, M., A. Montresor, C. Giagulli, D. Staunton, B. Rossi, M. Martinello, G. Constantin, and C. Laudanna. 2009. Regulation of conformer-specific activation of the integrin LFA-1 by a chemokine-triggered Rho signaling module. Nat Immunol 10:185-194.*

12. *Real, E., S. Faure, E. Donnadieu, and J. Delon. 2007. Cutting edge: Atypical PKCs regulate T lymphocyte polarity and scanning behavior. J Immunol 179:5649-5652.*

13. *Kerdiles, Y. M., D. R. Beisner, R. Tinoco, A. S. Dejean, D. H. Castrillon, R. A. DePinho, and S. M. Hedrick. 2009. Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. Nat Immunol 10:176-184.*

14. *Gunn, M. D., K. Tangemann, C. Tam, J. G. Cyster, S. D. Rosen, and L. T. Williams. 1998. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 95:258-263.*

15. *Asperti-Boursin, F., E. Real, G. Bismuth, A. Trautmann, and E. Donnadieu. 2007. CCR7 ligands control basal T cell motility within lymph node slices in a phosphoinositide 3-kinase-independent manner. J Exp Med 204:1167-1179.*

16. *Okada, T., and J. G. Cyster. 2007. CC chemokine receptor 7 contributes to Gi-dependent T cell motility in the lymph node. J Immunol 178:2973-2978.*

17. *Worbs, T., T. R. Mempel, J. Bolter, U. H. von Andrian, and R. Forster. 2007. CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo. J Exp Med 204:489-495.*

18. *Alon, R., and M. L. Dustin. 2007. Force as a facilitator of integrin conformational changes during leukocyte arrest on blood vessels and antigen-presenting cells. Immunity 26:17-27.*

19. *Krummel, M. F., and I. Macara. 2006. Maintenance and modulation of T cell polarity. Nat Immunol 7:1143-1149.*

20. *Thelen, M., and J. V. Stein. 2008. How chemokines invite leukocytes to dance. Nat Immunol 9:953-959.*

21. *Cantrell, D. A. 2003. GTPases and T cell activation. Immunol Rev 192:122-130.*

22. *Giagulli, C., E. Scarpini, L. Ottoboni, S. Narumiya, E. C. Butcher, G. Constantin, and C. Laudanna. 2004. RhoA and z PKC control distinct modalities of LFA-1 activation by chemokines: critical role of LFA-1 affinity triggering in lymphocyte in vivo homing. Immunity 20:25-35.*

23. *Vielkind, S., M. Gallagher-Gambarelli, M. Gomez, H. J. Hinton, and D. A. Cantrell. 2005. Integrin regulation by RhoA in thymocytes. J Immunol 175:350-357.*

24. *Pasvolsky, R., V. Grabovsky, C. Giagulli, Z. Shulman, R. Shamri, S. W. Feigelson, C. Laudanna, and R. Alon. 2008. RhoA is involved in LFA-1 extension triggered by CXCL12 but not in a novel outside-in LFA-1 activation facilitated by CXCL9. J Immunol 180:2815-2823.*

25. *Rougerie, P., and J. Delon. 2012. Rho GTPases: Masters of T lymphocyte migration and activation. Immunol Lett 142:1-13.*

26. *Amano, M., H. Mukai, Y. Ono, K. Chihara, T. Matsui, Y. Hamajima, K. Okawa, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1996. Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N. Science 271:648-650.*

27. *Watanabe, G., Y. Saito, P. Madaule, T. Ishizaki, K. Fujisawa, N. Morii, H. Mukai, Y. Ono, A. Kakizuka, and S. Narumiya. 1996. Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhophilin as targets of small GTPase Rho. Science 271:645-648.*

28. *Valderrama, F., J. V. Cordeiro, S. Schleich, F. Frischknecht, and M. Way. 2006. Vaccinia virus-induced cell motility requires F11L-mediated inhibition of RhoA signaling. Science 311:377-381.*

29. *Zaoui, K., S. Honore, D. Isnardon, D. Braguer, and A. Badache. 2008. Memo-RhoA-mDia1 signaling controls microtubules, the actin network, and adhesion site formation in migrating cells. J Cell Biol 183:401-408.*

30. *Dakour, J., H. Li, and D. W. Morrish. 1997. PL48: a novel gene associated with cytotrophoblast and lineage-specific HL-60 cell differentiation. Gene 185:153-157.*

31. *Hirayama, E., and J. Kim. 2008. Identification and characterization of a novel neural cell adhesion molecule (NCAM)-associated protein from quail myoblasts: relationship to myotube formation and induction of neurite-like protrusions. Differentiation 76:253-266.*

32. *Charrasse, S., F. Comunale, Y. Grumbach, F. Poulat, A. Blangy, and C. Gauthier-Rouviere. 2006. RhoA GTPase regulates M-cadherin activity and myoblast fusion. Mol Biol Cell 17:749-759.*

VI. Fam65b, nouvel effecteur de la quiescence des LT induite par FOXO1

Les PI3K contrôlent un réseau coordonné de molécules et de facteurs de transcription responsables de la régulation spatio-temporelle de la réponse des LT à l'antigène. La production massive de PIP3 dans le LT suite à la rencontre avec l'antigène participe à la rupture du statut quiescent de la cellule notamment *via* l'inhibition de l'activité des facteurs FoxOs.
Nous montrons ici que la régulation transcriptionnelle de Fam65b par FOXO1, se traduit *in vitro* et *in vivo* par une diminution de l'expression de Fam65b après stimulation du TCR. Des tests luciférase, réalisés dans des LT primaires humains, montrent que l'activité des deux promoteurs de Fam65b décroît après activation du TCR. Cette activité peut être maintenue par l'expression d'une forme constitutivement active de FOXO1.
Afin d'étudier le rôle de Fam65b dans l'activation et la prolifération des LT, nous avons utilisé la technique d'interférence à ARN dans des LT primaires humains. La comparaison *in vitro* des LT, exprimant ou non Fam65b, nous permet de mettre en évidence que Fam65 régule négativement le seuil d'activation des LT en réponse à une stimulation du TCR. Nous constatons également que le maintien de l'expression de Fam65b dans des LT, inhibe la prolifération. Donc l'inhibition de l'expression de Fam65b semble être un pré requis à toute prolifération.
Enfin, nous observons dans la lignée leucémique humaine Jurkat, que l'expression de Fam65b dans des cellules proliférantes induit un arrêt en G2/M du cycle cellulaire, voire la mort des cellules. Nous observons, de façon corrélative, les mêmes résultats par surexpression d'un mutant dominant négatif de RhoA.
Afin d'analyser les conséquences d'une modulation de l'expression de Fam65b sur la réponse immune dans un contexte plus intégré, nous avons utilisé le modèle de souris transgénique pour le TCR HY. Nous observons que l'inhibition de l'expression de Fam65b n'affecte pas significativement la réponse primaire. En revanche, lors d'une réponse secondaire, l'inhibition de l'expression de Fam65b est associée à des capacités renforcées d'élimination de l'antigène.
Enfin, mon travail, a permis de mettre en évidence que physiologiquement chez l'homme, comme chez la souris, Fam65b est plus faiblement exprimé dans les LT mémoires que dans les LT naïfs.
L'ensemble de ce travail nous a donc permis de montrer que Fam65b est un frein à l'activation induite par le TCR et que l'inhibition de son expression est nécessaire pour rompre l'état de quiescence des LT. Fam65b est donc un des nombreux acteurs moléculaires de la quiescence, régulé par FoxO1.

Ce travail est actuellement en finition.

Fam65b is an effector of FoxO1 in the control of the quiescence

of naïve and memory T cells

Quitterie Largeteau,[1] Jeanne Froehlich,[1] Pablo Rougerie,[1] Sylvain Meunier,[2] Georges Bismuth,[1] Agnès Lebon,[1] Corinne Tanchot,[2] Jérôme Delon [1, †] and Marianne Mangeney [1, †,*]

[1]Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes, Paris, France.

[2]INSERM U970 Paris Cardiovascular Research Center, Université Paris Descartes, Paris, France.

[†]M.M. and J.D. contributed equally to this work.

[*]Correspondence: marianne.mangeney@inserm.fr

Ph: (33)-1-40-51-66-40

Fax: (33)-1-40-51-65-55.

Running title: Fam65b, a quiescence effector induced by FoxO1.

SUMMARY

The FoxO1 transcription factor is inactivated by phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/Akt signaling upon T cell receptor triggering. This general and early block in FOXO1-mediated transcription upon antigen recognition regulates major functions of T lymphocytes, such as cell cycling, apoptosis, migration, and differenciation. We show here that Fam65b is a transcriptional target of FoxO1 in T cells, and is indeed downregulated *in vitro* and *in vivo* during T cell activation. We also demonstrate that Fam65b expression level sets the activation threshold of primary T lymphocytes and that Fam65b downregulation is a prerequisite for T cell proliferation. Furthermore, we show that the forced expression of Fam65b in Jurkat cells induces a cell cycle arrest in G2/M and cell death. In addition, in a secondary immune response *in vivo*, Fam65b knocked-down T lymphocytes eliminate the antigen more efficiently than control T cells. Altogether, these data define Fam65b as a FoxO1-dependent regulator of the T cell activation threshold.

INTRODUCTION

An antiviral immune responses strongly depends on the elimination of infected cells by CD8 T lymphocytes. Recognition of complexes of antigenic peptide and major histocompatibility complex class I by the T cell receptor (TCR) triggers a rapid cell proliferation of naive CD8 T cells and thus an increase in the number of antigen-specific T cells, and a differentiation of these cells into effector cytotoxic T lymphocytes (CTLs). After the expansion phase, the effector population undergoes a substantial contraction, during which 90−95% of the antigen-specific cells die. Despite this considerable cell death, there are more antigen-specific cells remaining at the end of the immune response than before the infection. These cells are memory CD8 T cells, which, if appropriately maintained, are responsible for host protection from reinfection through vigorous recall responses. The efficacy of memory responses is due not only to an increase in the frequency of antigen-specific lymphocytes but also to qualitative differences between naive and memory T cells. The mechanism by which antigen-specific CD8 T cells become committed to the memory cell lineage is still a matter of debate (reviewed in 1 and 2).

Class O Forkhead factor (FoxO) are important T lymphocyte quiescence factors that are present at high levels in the nucleus of naïve or resting cells (3). Transcriptional activity of FoxO1 and FoxO3 contributes to maintenance of naïve or resting T lymphocytes in a quiescent state by up-regulating the expression of several genes, such as $p27^{kip1}$, $p21^{CIP}$, KLF2, which promote cell cycle arrest (4). However, upon TCR engagement, activation of the PI3K/AKT pathway phosphorylates FoxOs, inducing their exclusion from the nucleus by the 14.3.3 scaffolding protein and thereby relieving the block on T cell activation imposed by FoxO protein (3, 5)**.** FoxO1 is also involved in other aspects of immune responses. Efficient T-cell adaptive immune responses take place in secondary lymphoid organs such as lymph nodes (LN). Thus, circulating T lymphocytes have to leave the blood stream to home in LN through high endothelial venules (HEVs) to perform their surveillance task. This motile behavior necessitates a tight control of the expression of several cell

surface proteins, namely the adhesive molecules CD62L and LFA-1, and the CCR7 chemokine receptor (6). A number of studies have reported that expression of homing molecules, essential for trafficking of T cells, is coordinately regulated by FoxO1 (4, 7-9). Thus, the two missions of a naive T cell, “travel and stay at rest”, might be viewed as the two sides of the same “FoxO medal”. It might also be speculated that the exact opposite orders, “stay here and cycle”, are also simultaneously given to the T cell when this FoxO1 control is “off” after antigen recognition and PI3K activation. More recently, FoxO1 and FoxO3 have been implicated in the differentiation process leading to memory T cells (10-13). While it has been described that the invalidation of Foxo3 led to an increased number of memory T cells during a LCMV infection (12, 13), recent reports have shown that transcriptional activity of Foxo1 promotes memory T cell differentiation by regulating the balance of two transcription factors T-bet and Eomes that respectively favor effector and memory T cells differentiation (10, 11).

Here, we report that FoxO1 regulates the expression of the *Fam65b* gene (also known as *KIAA0386*, *PL48*, *Diff40, Diff48* or *C6ORF32*) in primary T lymphocytes. Fam65b has previously been shown to be up-regulated during placenta and muscle differentiation, inducing membrane protrusions necessary for cell-cell fusion (14). In this paper, we analyze the functional consequences of Fam65b expression during T cell activation both *in vitro* and *in vivo*. We show that Fam65b controls the activation threshold of T lymphocytes and in particular CD8 T cell responses.

RESULTS

Fam65b is a target of FOXO1

We previously demonstrated that the two *fam65b* isoforms are under the control of FOXO1 (15). To analyze the consequences of this controlled expression, we examined first if the nuclear exclusion of FOXO1 responsible for an arrest of its transcriptional activity observed in T cells upon TCR triggering results in a decrease of *fam65b* expression. Fam65b expression was quantified by western blot, following *in vitro* stimulation of primary T lymphocytes with anti-CD3 and CD28 coated beads. As depicted in figure 1A, the observed decrease of the two Fam65b isoforms is in line with a general and early block in FOXO1-mediated transcription upon antigen recognition (3). In order to test whether this regulation occurred in physiological conditions, we used TCR transgenic mice whose T lymphocytes were activated by *in vivo* immunization. $CD4^+$ T cells from 5C.C7 mice differentiate into rapidly cycling effector cells within a few days after encounter of their antigen (pigeon cytochrome c, PCC). Purified T lymphocytes from immunized mice exhibited a marked decrease in Fam65b expression levels compared to lymphocytes from unimmunized mice (Figure 2B). To clearly demonstrate that the down regulation of Fam65b expression is the result of the arrest in FoxO1 transcriptional activity, we performed luciferase assays in T cells following TCR activation. Each promotor was transfected in primary T lymphocytes with or without a vector coding for an active form of FOXO1 (FOXO1-TM). 24 hours after transfection, the cells were activated with antiCD3/CD28 beads for 8 hours, and then luciferase assays were performed. As shown in figure 1C, the luciferase activities depending on the promotors for isoforms 1 and 2 were significantly decreased after TCR activation except in the presence of an active form of FOXO1, as expected. One can thus conclude that Fam65b expression is controlled by FoxO1 in the physiological context of T cell activation.

Fam65b controls T cell proliferation

As Fam65b is a target of FoxO1 in T cells, and FoxO1 is one of the master transcription factors involved in quiescence (reviewed in (16), we next addressed the role of Fam65b in T

lymphocyte proliferation using an RNA interference (RNAi) approach. A substantial reduction in Fam65b expression in primary human peripheral blood T cells could be obtained with this technique (supplementary figure 1A). Next, we assessed the consequences of Fam65b knocked-down on antiCD3/CD28-induced proliferation, by analysing CellTrace violet dilution in both control and knocked down (KD) T lymphocytes. As shown in figure 2A, KD cells proliferated at sub-optimal doses of anti-CD3/CD28 beads that were unable to induce proliferation of control T lymphocytes expressing Fam65b. Conversely, we compared the proliferation of primary T lymphocytes over-expressing or not Fam65b. As shown in figure 2B, expression of Fam65b totally inhibited the proliferation induced by TCR activation, even at supra-optimal doses of anti-CD3 and CD28 beads. Thus, manipulating the level of expression of Fam65b modified the T cell activation threshold, suggesting that Fam65b acts as a brake that must be released for T cells to become fully activated.

To decipher the cellular mechanism of the proliferation block induced by Fam65b, we performed cell cycle analysis of Jurkat cells transfected with expression constructs coding for GFP alone as a control, or for Fam65b isoform 1 or 2 fused to GFP. As we have previously demonstrated that Fam65b interacts with RhoA GTPase, and inhibited its function (15), we followed Jurkat cells proliferation after transfection of vectors coding for the two isoforms of Fam65b, and a dominant negative form of RhoA. As shown in figure 2C, expression of the two isoforms of Fam65b in Jurkat cells or in primary T lymphocytes induced a potent inhibition of T cell proliferation. Analysis of cell cycle demonstrated that Fam65b expression induced a block at the G2/M state (figure 2D) without apparition of multinucleated cells (data not shown). We observed that expression of a dominant negative form of RhoA leads to the same result, e.g. inhibition of cell proliferation and G2/M arrest. An annexin V labelling revealed that Jurkat cells expressing Fam65b not only ceased dividing, but also died. The observation that all cell lines that we tested do not express Fam65b is consistent with the notion that sustained cell proliferation and Fam65b expression are not

compatible (data not shown). All these results demonstrated that Fam65b is an efficient regulator of T lymphocyte proliferation.

Fam65b expression and memory T cells phenotype

As Fam65b regulates the T cell activation threshold, we next examined the consequences of a modulation of its expression on the development of an immune response. For this purpose, we used the well calibrated model of HY CD8 transgenic T cells: both limited number of male cells expressing the HY antigen and HY TCR transgenic T cells are transferred in a recipient mouse. The male cells are eliminated by the transgenic T cells, and this elimination is followed by the appearance of a population of long-lived resting memory T lymphocytes (17, 18). To examine the importance of Fam65b in such a response, we modulated its expression with a retrovirus expressing a Fam65b targeting shRNA coupled with GFP (supplemental figure 1B). This retrovirus, or control virus, were used to infect HY specific transgenic CD8 T cells. Transduced T cells were adoptively transferred into recipient chimeric mice. This system allowed us to evaluate the consequence of Fam65b expression on the potential of CD8 T cell to differentiate in memory T lymphocytes. In an initial set of experiments, we compared the number of HY CD8 T lymphocytes recovered from spleen sixty days after injection of transduced T lymphocytes. At this time point, T lymphocytes are in a non proliferating quiescent state. We found that GFP HY cells, transduced with the Fam65b targeting retrovirus, present a capacity to differentiate equivalent to that of control GFP infected cells (Figure 3A). We next examined the effects of Fam65b inhibition during a secondary response. To address this question, we purified and sorted HY CD8 GFP T lymphocytes at day sixty following stimulation by HY target cells, and injected these T cells into a new chimera. As shown in figure 3B, inhibition of Fam65b expression did not alter the number of HY CD8 T lymphocytes recovered at day 5 after injection. However, analysis by PCR of HY antigen elimination in recipient mice demonstrated that secondary Fam65b-depleted HY CD8 T lymphocytes were more efficient for eliminating the HY antigen. Thus, Fam65b depletion enhanced the quality of the HY-induced CD8 T cells response.

Altogether, these results suggest that the qualitatively enhanced response of memory T cells could at least in part be due to a decreased level of expression of Fam65b in quiescent memory T cells. To further evaluate this question, we measured Fam65b expression levels in naïve (before immunization), activated (7 days after immunization) and memory (60 days after immunization) in HY-specific CD8 T lymphocytes purified from the spleen (Figure 4A). At day 7, expanding T lymphocytes expressed low levels of Fam65b, whereas at day 60, quiescent memory T lymphocytes reexpressed Fam65b, albeit to a lesser extent than their naïve counterparts. Similar results were obtained with CD8 T cells purified from lymph nodes (data not shown). We next attempted to generalize this observation by comparing Fam65b expression levels in CD45RA and CD45RO subpopulations purified from human peripheral blood cells. Indeed, we observed that, both at transcripts and proteins levels, Fam65b was expressed at a higher level in naïve CD45RA cells than in activated/memory CD45RO cells (Figure 4B and 4C). These results clearly establish that a reduced level of Fam65b expression is a hallmark of the memory differentiation state of CD8 T cells, compared to naïve T cells.

DISCUSSION

In this manuscript, we have shown that Fam65b is an effector of the FoxO1 transcription factor for the control of T cell proliferation. We have first shown that *fam65b* is a direct transcriptional target of FoxO1, which controls its down-regulation during T cell activation. This down-regulation is a prerequisite for cell division, as forced expression of Fam65b blocked the proliferative response of T cells upon TCR triggering. Accordingly, Fam65b could not be detected in spontaneously proliferating T cell lines, and its forced expression led to a cell cycle arrest in the G2/M phase, and to cell death. Conversely, inhibiting Fam65b expression allowed T cell activation at otherwise subthreshold doses of anti-CD3/anti-CD28 antibodies. Strikingly, the known low activation threshold of quiescent memory T cells correlated with a low Fam65b expression level, and decreasing this level led to a more efficient secondary immune response.

The implication of FoxO1 in the quiescence of T cells is actively studied. FoxO proteins maintain naïve or resting T cells in the G_0 phase of the cell cycle by up-regulating the expression of cell cycle inhibitors, such as p27kip1, Gadd45, cyclin E, and p130 (19). FoxOs also regulate T cell quiescence by controlling secondary transcription factors (reviewed in 16). Lin et al have shown that FoxOs induce expression of IκB, a protein that interacts with and sequesters NF-κB in the cytoplasm (20), thereby inhibiting the expression of the growth factor IL-2 (21, 22). In addition, KLF2 is a transcription factor whose expression is directly regulated by Foxo, and which controls T cell quiescence (4). Cellular localization experiments demonstrate that Fam65b is cytoplasmic (14), and hence not a transcription factor. In addition, Fam65b controls the cell cycle at the G2/M phase. Whether this control is direct, or results from the regulation of cellular pathways, has to be explored. We have previously shown that Fam65b interacts with RhoA, and inhibits its GTPase activity (15). As RhoA can strikingly potentiate TCRα/β-mediated responses in primary lymphocytes both *in vitro* and *in vivo*, and is required for proper mitosis completion (23, 24), it is tempting to suppose that at least part of Fam65b effects result from RhoA inhibition.

Our data establish that Fam65b down-regulation is strictly required for T cell proliferation. On one hand, Fam65b blocks the proliferation of quiescent T lymphocytes upon TCR triggering. On the other hand, in proliferating T cell lines, Fam65b expression leads to a block in the G2/M phase of the cell cycle, and then to cell death. Be it confirmed in normal T cells, this death-inducing capacity could play a role in the physiology of the T cell response. Upon ligand recognition and cell activation, a robust proliferation program must be initiated to stimulate a few $CD8^+$ T cell clones to generate effector cells. The sizeable expansion of the T cell pool is followed by a contraction phase in which most effectors cells die by apoptosis. The kinetics of Fam65b re-expression after initiation of an immune response is compatible with a functional importance of this molecule in the triggering of the contraction phase.

We have also shown that Fam65b regulates the activation threshold of T lymphocytes. This could be responsible for at least part of the phenotypes observed in $Foxo1^{-/-}$ mice. The major phenotype observed in T cells of $Foxo1^{-/-}$ mice is a defect in homeostasis. Naïve T cell survival/homeostasis depends in particular upon two signalling pathways, the IL7/IL7R pathway and stimulation of TCR by self antigens. Ouyang et al. have demonstrated that IL7R is a transcriptional target of FoxO1, which is therefore a major regulator of the first pathway. The TCR signal induced by self antigens contributes to survival of T cells in the absence of overt activation. The spontaneous activated phenotype observed in $Foxo1^{-/-}$ mice could result in part from the absence of Fam65b, relieving a brake to activation by self antigens.

In the same line, the enhanced responsiveness of quiescent memory T cells could at least in part result from their decreased expression of Fam65b. Indeed, our data show that Fam65b interferes with the functional capacity of memory T lymphocytes to respond to re-stimulations. It would be of interest to assay for a likely similar role of Fam65b in the primary response in vivo. In conclusion,

in the complex network of regulations that contribute to shape efficient immune responses, we have shown that Fam65b constitutes a novel and important node, regulating both T cell quiescence/proliferation, memory and migration, all under the control of FoxO,

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Constructs

Fam65b isoform2 was PCR amplified with a forward primer containing *NdeI* (5'-ATACATCATATGTTGGTAGGATCCCAGTCTTTTTCGC-3') and a reverse primer containing *XhoI* site (5'-ATGTATCTCGAGCTTTTTTAGAATATCATCCAAATTCA TGACT-3') using V5-tagged c6orf32 vector (14) provided by E. Gussoni (Children's Hospital, Boston, USA) as a template; the PCR fragment was *NdeI/XhoI*-restricted and introduced into pEGFP-N1 vector (clontech) opened at the same sites. c6orf32 (isoform1) was PCR amplified with a forward and reverse primer containing *BglII* site (forward: 5'-ATACATCATATGTTGGTAGGATCCCAGTCTTTTTCGC-3', reverse: 5'-ATGT ATCTCGAGCTTTTTTAGAATATCATCCAAATTCATGACT-3') using T lymphocyte cDNA as a template; the PCR fragment was *BglII*-restricted and introduced into *BglII*-restricted pEGFP-N1 vector (clontech). The FOXO1TM-GFP and FOXO1TM H215R-GFP plasmids was previously described (3).

Cells

Human PBT were purified from the blood of healthy donors and cultivated as described (3). Jurkat and 293T cells were cultivated in complete RPMI medium.

Luciferase assays

The FOXO1 enhancer in the *isoform 1* (130 650-131 815) and *isoform 2* promoter region (164 220-165 360) was amplified from human genomic DNA using respectively one set of primers *iso1*-KpnI: 5'-ATACATGGTACCATGTTCCCTTTCGGCTAATGTCTCA-3' and *iso1*-BglII: 5'-ATGTATAGATCTGACGGCTCCTTGTCATGTCAGGGGC-3; *iso2*-KpnI: 5'-ATACATGGTACCGTCAAATTGAGTACAGAAAGAACAG-3' and *iso2*-BglII: 5'-ATGTATAGATCTCTCAAAGCTACGCGAAGCAGCTCAG-3'). DNA was amplified for 30 cycles (94°C 30 s, 68°C 30 s) in 2× buffer with 1.5 mM $MgCl_2$, 0.25 mM dNTPs, 0.5 µM each primer, 100 ng genomic DNA, and 5 U *pfx platinium* (Invitrogen) in a total volume of 50 µl. The amplified sample was restricted with KpnI and BglII and introduced into the pGL3 vector (Promega) opened by the same enzymes. T lymphocytes ($5x10^6$/well) were co-transfected with Firefly luciferase reporter construct (5 µg), CMV-Renilla luciferase reporter construct (0.1 µg) and

in some condition FOXO1TM-GFP (5µg). 24 h after transfection, cells were activated with antiCD3CD28 beads. After 8 hours of activation, cells were lysed in passive cell lysis buffer (500 µl) and luciferase activity was assayed using the Dual-Luciferase Reporter assay system (Promega) as *per* the manufacturer's instructions.

Quantification of Fam65b expression by qRT-PCR. Total RNA was prepared using RNeasy mini kit (Qiagen). cDNA was produced with the Advantage RT-for-PCR kit (Clontech Laboratories) using random hexamer priming. Real-time quantitative PCR was performed by using the LightCycler FastStart DNA Master plus SYBRGreen kit (Roche Diagnostics). Fam65b was detected using specific primers designed to amplify both isoform transcripts. The sequences of the primers used in qRT-PCR experiments are indicated in the following table:

Name	sequence
ppia (F)	5'- GGT GAC TTC ACA CGC CAT AAT G -3'
ppia (R)	5'- ACA AGA TGC CAG GAC CCG TAT -3'
fam65b (F)	5'-GCG GAG TTT AAC CTC AGC AG-3'
fam65b (R)	5'-CCT TCA GGT GTG ACT TTG GC-3'

Cell proliferation assay

Cells (10^6) were washed twice with 1ml PBS PBT were loaded with 0.5 µM Cell Trace (Invitrogen), probe for 20 min at 37°C in the dark. After one wash in PBS containing 10% FCS, cells were stimulated with anti-CD3/CD28 beads (Invitrogen) for 4 days. Proliferation shown as CellTrace dilution was measured by flow cytometry (Deckton Dikinson).

Cell cycle analysis by Flow cytometry

Cell cycle status was determined using flow cytometric analysis. Cells (2×10^6) were washed twice with 1ml PBS and fixed (4% formaldehyde in PBS) for 10 minutes at room temperature. Cells were pelleted (300*g*, 5 minutes) and washed once with 1ml PBS before being re-suspended in permeabilisation buffer (1 mM EDTA, 0,1% Saponine in PBS) and stored for 10 minutes at room temperature. Cells were stained at room temperature in the dark by propidium iodide staining

(50µg/ml), in labelling buffer (20mM hepes, 160mMNaCl, 1mM EGTA and 0.2mg/ml RNAse A) for 30 minutes. Cells were before immediate analysis by flow cytometry (Beckman Coulter).

Flow cytometry analysis for apoptosis determination

Annexin V labelling was performed using the Annexin V-PE (Invitrogen). Following treatment, cells were harvested by centrifugation (6,000 g, 10 min) and washed twice with PBS. 10^6 cells were re-suspended in 500-µl binding buffer and stained with 5-µL PE-labeled Annexin for 10 min at room temperature in the dark. After further washes with PBS, cells were subjected to cytometer analysis.

DNA and RNAi transfections

293T cells were transfected with Lipofectamine2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. PBT ($5x10^6$ cells) were nucleofected with 10 µg DNA of the indicated construct using the Amaxa system (Lonza) and the U14 program. For RNAi experiments, $2x10^6$ PBT per cuvette were nucleofected with 2 µl of a 100 µM solution of OTP smartpool RNAi (Dharmacon) directed against human Fam65b or non-targeting sequences as a control. Cells were rested for 10 min in RPMI at 37 °C and then supplemented with complete RPMI medium containing human AB serum and 5 U/ml IL-7. Cells were then tested for functional experiments 3 days after nucleofection when the level of Fam65b knocked-down was maximal.

Mice

C57Bl/6 mice, CD3-ε-deficient (CD3-$\varepsilon^{-/-}$) mice (25), female Rag2-deficient (Rag2$^{-/-}$) mice expressing a TCR-αβ transgene (Tg) specific for the male antigen HY restricted to MHC class I D^b (Rag-2$^{-/-}$ $CD8^+$ Tg mice) (26), B10.A-5C.C7-Rag2$^{-/-}$ mice expressing a TCR transgene specific for the pigeon cytochrome c (PCC) bound to class II I-E^k (Rag-2$^{-/-}$ $CD4^+$ Tg mice), and CD3-$\varepsilon^{-/-}$-PCC transgenic mice expressing the PCC antigen under the control of a MHC class I promoter and an immunoglobulin enhancer (27) were all bred at the Center for the Development of Advanced Experimental Techniques, Orléans, France.

Immunization protocols

To generate CD8 immune responses, female mice were immunized with male cells by adoptive transfer. Briefly, female CD3-$\varepsilon^{-/-}$ mice were irradiated and co-injected with $0.5x10^6$ male bone marrow (BM) cells together with $4.5x10^6$ female BM cells from CD3-$\varepsilon^{-/-}$ mice. Three days later, $0.5x10^6$ purified lymph node (LN) CD8 TCR anti-HY Tg T cells from Rag2$^{-/-}$ CD8$^+$ Tg female mice, with or without retroviral infection, were injected with an equal number of purified LN CD4 T cells (from C57BL/6 female mice) into chimeric CD3-$\varepsilon^{-/-}$ mice. To generate CD4 immune response, 10^6 LN CD4 TCR anti-PCC Tg T cells (from Rag2$^{-/-}$ CD4$^+$ Tg mice) were injected i.v. into CD3-$\varepsilon^{-/-}$ PCC mice.

Mice were assessed at different time after immunization; during the expansion phase (day 4); at the peak of the response (effector phase: day 7) and at the memory phase for CD8$^+$ T cells (day 60). CD8$^+$ and CD4$^+$ T cells were isolated from the spleen or LN, respectively. They were first enriched after depletion of B cells and macrophages by using a mixture of monoclonal antibodies and magnetic sorting with coated Dynabeads (Dynal) and further purified by positive selection using CD8-biotinylated or CD4-biotinylated antibodies and beads directly coupled to streptavidin (Miltenyi Biotech). The purity of the different cell populations was around 99%, as determined by surface staining with the following MoAbs: Allophycocyanin (APC)-labeled anti-CD90.2; Pacific Blue-labeled anti-CD8, Fluor780-labeled anti-CD4; PerCP Cyanine 5.5-labeled anti-CD3, biotin-labeled anti-T3.70 (anti-TCR-α Tg) revealed by Pacific Orange labeled Streptavidin. Flow cytometry was performed with a FACSCanto cytometer and data files were analysed using FlowJo software (Becton Dickinson).

Lentiviral infections

Lentiviral production was obtained by transient calcium-phosphate co-transfection of the 293T cell line with the TRIPΔU3-EF1α vector, the p8.91 encapsidation vector (ΔVprΔVifΔVpuΔNef), and a vesicular stomatitis virus-G protein (VSV-G) envelop expression plasmid (pHCMV-G). Fresh medium was added after 24 h at 37°C. The culture supernatant containing viral particles was

collected 48 h posttransfection. Virion particles were concentrated by ultracentrifugation and the resulting pellet was resuspended in PBS and frozen at −80°C under 20 µl of aliquots until use.

Before lentiviral transduction, T cells purified from spleen were activated for 24 h in 24-wells plate (10^6/well) with coated anti-CD3/anti-CD28 (Invitrogen) in the presence of IL-2 (30U/ml). Stimulated T cells were then incubated with lentiviral vector particles. After a 24-h exposure to virus at 37°C, fresh RPMI medium with IL-2 was added. 48-h post-infection cells were injected to mouse.

Quantification of number of male cells by qPCR

For that purpose, we quantified, by real-time PCR (7900 HT; Applied Biosystem), using Sybergreen (Warrington Applied Biosystems), genomic DNA coding for *Zfy-1* (Zinc finger protein Y-linked) gene present at one copy per male cell and *hprt* (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) gene present at two copies per male and female cells, as reporter gene. Primers used were the following: *Zfy-1*, (forward) 5′-ggatagtgaccagattgttg-3′ and (reverse) 5′-tgaggttgacgtaataccag-3′; *hprt*, (forward) 5′-aaggacctctcgaagtgttg-3′ and (reverse) 5′-gtactcattatagtcaagggc-3′. Primers were designed to achieve similar amplification efficiency and produce amplicons of similar size. Briefly, DNA was extracted from 2×10^6 spleen cells. Due to the small number of male cells among total cells, a different dilution of genomic DNA was used to detect *Zfy-1* and *hprt*. A 5 ng genomic DNA was used for *hprt* gene and 20 ng for *Zfy-1*, allowing us to determine an optimal threshold cycle (C_t) comprising of between 20 and 22 for *hprt* gene and 24 and 36 for *Zfy-1* gene. For each sample, real-time PCR was performed in triplicate and in the same run for both genes to avoid extrinsic variation. The number of male cells per million total cells was calculated using the following: $2 \times 2^{(Ct_{hprt} - Ct_{Zfy\text{-}1})} \times (d_{hprt}/d_{Zfy\text{-}1}) \times 10^6$, where *d* is the dilution of genomic DNA.

Quantification of Fam65b expression by Western Blot

Protein expression levels of Fam65b were analysed by Western blot. T cells were washed in cold PBS and lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 % Triton-X100, 0.5 %

deoxycholate, 0.1 % SDS, 2 mM EDTA) supplemented with Complete protease inhibitors (Roche) for 30 min at 4 °C under occasional stirring. Samples were then centrifuged at 14.000 rpm for 10 min. The pellet was discarded and protein concentration in the supernatant was quantified with the Bradford assay. SDS loading buffer was added to each sample and then boiled at 100 °C for 5 min. An equal amount of proteins was loaded on 12 % Tris-Gly gels. After migration and transfer on a PVDF membrane (Amersham), a blocking step was performed with 5% milk in Tween-TBS buffer. Both Fam65b isoforms were revealed by immunoblotting with anti-Fam65b (Abnova) or with a custom-made rabbit serum against a peptide encompassing the 567-581 region (sequence: PHKEQYKEFQDLNQE) of Fam65b (Antibody Research, Inc.). Other blotting antibodies were anti-β actin (Sigma) or anti-eIF-4E (Transduction Laboratories) followed by goat-anti-mouse-HRP (BioRad) incubation and ECL revelation. eIF-4E was used as a loading. Gel band intensities were quantified by ImageJ.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank E. Gussoni for providing reagents. C. Randriamampita for discussions and critical reading of the manuscript. This work was supported by Inserm, CNRS and Ligue Nationale contre le Cancer.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Drop in Fam65b expression upon T cell activation. (A) Fam65b protein levels were analysed by Western blot on primary T lymphocytes activated for different times by anti-CD3/CD28 beads. One representative experiment out of three is shown. (B) $CD4^+$ T lymphocytes from 5C.C7 TCR transgenic mice were activated *in vivo* for different times, purified from the lymph nodes, and the Fam65b levels analyzed by Western blot. Time 0 corresponds to non activated naive cells from an unimmunized mouse. One experiment out of two performed is shown. (C) Primary T lymphocytes were co-transfected with luciferase reporter plasmid containing the two isoforms of fam65b promoter, an internal *Renilla* construct driven by the CMV promoter and in some conditions pEGFP FOXO1 TM construct. 24 h post transfection, cells were stimulated with antiCD3/CD28 beads (1 beads for 5 cells) and 8 hours later lysed and *Firefly* and *Renilla* luciferase activities were measured. Data are shown as means of two independent experiments conducted in triplicate.

Fig. 2. Fam65b inhibits T cells proliferation. (A) Cell proliferation was assessed in primary T lymphocytes by Cell Trace dilution. CT (black) or Fam65b KD (grey) T cells were loaded with Cell Trace and stimulated with 1 anti-CD3/CD28 coated bead for 10, 20 or 30 cells. Cell Trace dilution was analysed by flow cytometry 4 days after activation. One example out of four independent experiments is shown. (B) Primary T lymphocytes were transfected with GFP (black) or Fam65b iso2-GFP (grey), loaded with cell trace violet and stimulated with anti-CD3/CD28 beads (1 bead for 5 cells). Cell Trace dilution was analysed by flow cytometry after activation for 4 days. One example out of three independent experiments is shown. (C) Jurkat cell line was transfected with GFP (●), Fam65b iso1-GFP (□), iso2-GFP (△) or RhoA N19 (◐) and each day the numeration of GFP^+ cells were performed, (D) and three days post transfection cell cycle was analyzed by flow

cytometry, (E) and four days post transfection an annexinV labelling were performed was analyzed by flow cytometry. The results are the mean of tree experiments.

Fig.3. Fam65b expression controls the amplitude of secondary response. (A) Chimeric mice were injected with $0.5x10^6$ $CD8^+$ TCR anti-HY Tg T lymphocytes, infected with an empty retrovirus or a retrovirus coding shRNA against fam65b. Sixty days post injection, the $CD8^+$ TCR anti-HY Tg GFP^+ cells number was analyzed. One example out of three independent experiments (three mice per group) is shown. (B) The $CD8^+$ TCR anti-HY Tg GFP^+ cells obtained, as mentioned in figure 1A, were sorted by cytometry and injected in the new chimeric mice. Five days post injection, $CD8^+$ TCR anti-HY Tg GFP^+ were counted and (C) clearing of antigen HY was analyzed by RT-PCR. The results are the mean of two experiments with a total of five mice.

Fig. 4. Fam65b is less express on memory than naïve T lymphocytes. (A) Kinetic analysis of Fam65b protein levels was performed for $CD8^+$ HY T cells purified from the spleen of immunized animals. Fam65b iso2 levels from three independent experiments were averaged (*Right*). Day 0: naive; day 7: effector; day 60: memory. The level of Fam65b expression at transcriptional level (B) and protein level (C) was analyzed in human primary T lymphocyte purified for the expression of CD45RA and RO molecules.

Fig. S1. (A) The level of Fam65b expression of human primary T lymphocyte after transfection with siRNA control or directed against fam65b was evaluated by Western blot. (B) HEK293T cell line non treated (lane 1) or infected with retroviruses control (lane 2) or induced expression of isoform 2 of Fam65b (lane3), with (lane4) or without surinfection with retroviruses coding shRNA directed against Fam65b were analyzed by Western blot for Fam65b expression level.

REFERENCES

1. Masopust D & Picker LJ (2012) Hidden memories: frontline memory T cells and early pathogen interception. *J Immunol* 188, 5811-5817.
2. Obar JJ & Lefrancois L (2010) Memory CD8+ T cell differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 1183, 251-266.
3. Fabre S, Lang V, Harriague J, Jobart A, Unterman TG, Trautmann A, & Bismuth G (2005) Stable activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the T cell immunological synapse stimulates Akt signaling to FoxO1 nuclear exclusion and cell growth control. *J Immunol* 174, 4161-4171.
4. Fabre S, Carrette F, Chen J, Lang V, Semichon M, Denoyelle C, Lazar V, Cagnard N, Dubart-Kupperschmitt A, Mangeney M*, et al.* (2008) FOXO1 regulates L-Selectin and a network of human T cell homing molecules downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* 181, 2980-2989.
5. Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV, Dalal SN, DeCaprio JA, Greenberg ME, & Yaffe MB (2002) 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol* 156, 817-828.
6. Carrette F, Fabre S, & Bismuth G (2009) FOXO1, T-cell trafficking and immune responses. *Adv Exp Med Biol* 665, 3-16.
7. Kerdiles YM, Beisner DR, Tinoco R, Dejean AS, Castrillon DH, DePinho RA, & Hedrick SM (2009) Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat Immunol* 10, 176-184.
8. Gubbels Bupp MR, Edwards B, Guo C, Wei D, Chen G, Wong B, Masteller E, & Peng SL (2009) T cells require Foxo1 to populate the peripheral lymphoid organs. *Eur J Immunol* 39, 2991-2999.
9. Ouyang W, Beckett O, Flavell RA, & Li MO (2009) An essential role of the Forkhead-box transcription factor Foxo1 in control of T cell homeostasis and tolerance. *Immunity* 30, 358-371.
10. Rao RR, Li Q, Gubbels Bupp MR, & Shrikant PA (2012) Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8(+) T cell differentiation. *Immunity* 36, 374-387.
11. Kim EH, Sullivan JA, Plisch EH, Tejera MM, Jatzek A, Choi KY, & Suresh M (2012) Signal integration by Akt regulates CD8 T cell effector and memory differentiation. *J Immunol* 188, 4305-4314.

12. Sullivan JA, Kim EH, Plisch EH, Peng SL, & Suresh M (2012) FOXO3 regulates CD8 T cell memory by T cell-intrinsic mechanisms. *PLoS Pathog* 8, e1002533.
13. Sullivan JA, Kim EH, Plisch EH, & Suresh M (2012) FOXO3 Regulates the CD8 T Cell Response to a Chronic Viral Infection. *J Virol* 86, 9025-9034.
14. Yoon S, Molloy MJ, Wu MP, Cowan DB, & Gussoni E (2007) C6ORF32 is upregulated during muscle cell differentiation and induces the formation of cellular filopodia. *Dev Biol* 301, 70-81.
15. Rougerie P, Largeteau Q, Meunier S, Carrette F, Lejeune T, Bismuth G, Tanchot C, Delon J, & Mangeney M FoxO induces a new RhoA inhibitor that regulates T lymphocyte activation andmigration. .
16. Hedrick SM, Michelini RH, Doedens AL, Goldrath AW, & Stone EL (2012) FOXO transcription factors throughout T cell biology. *Nat Rev Immunol* 12, 649-661.
17. Tanchot C, Lemonnier FA, Perarnau B, Freitas AA, & Rocha B (1997) Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276, 2057-2062.
18. Tanchot C, Guillaume S, Delon J, Bourgeois C, Franzke A, Sarukhan A, Trautmann A, & Rocha B (1998) Modifications of CD8+ T cell function during in vivo memory or tolerance induction. *Immunity* 8, 581-590.
19. van der Horst A & Burgering BM (2007) Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 440-450.
20. Lin L, Hron JD, & Peng SL (2004) Regulation of NF-kappaB, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a. *Immunity* 21, 203-213.
21. Gaffen SL & Liu KD (2004) Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine* 28, 109-123.
22. Stahl M, Dijkers PF, Kops GJ, Lens SM, Coffer PJ, Burgering BM, & Medema RH (2002) The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol* 168, 5024-5031.
23. Niiya F, Tatsumoto T, Lee KS, & Miki T (2006) Phosphorylation of the cytokinesis regulator ECT2 at G2/M phase stimulates association of the mitotic kinase Plk1 and accumulation of GTP-bound RhoA. *Oncogene* 25, 827-837.
24. Su KC, Takaki T, & Petronczki M (2011) Targeting of the RhoGEF Ect2 to the equatorial membrane controls cleavage furrow formation during cytokinesis. *Dev Cell* 21, 1104-1115.
25. Malissen B, Ku G, Hermans M, Vivier E, & Malissen M (1995) Genetic dissection of the transducing subunits of the T-cell antigen receptor. *Ann N Y Acad Sci* 766, 173-181.

26. Kisielow P, Teh HS, Bluthmann H, & von Boehmer H (1988) Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 335, 730-733.

27. Tanchot C, Le Campion A, Leaument S, Dautigny N, & Lucas B (2001) Naive CD4(+) lymphocytes convert to anergic or memory-like cells in T cell-deprived recipients. *Eur J Immunol* 31, 2256-2265.

Figure 1

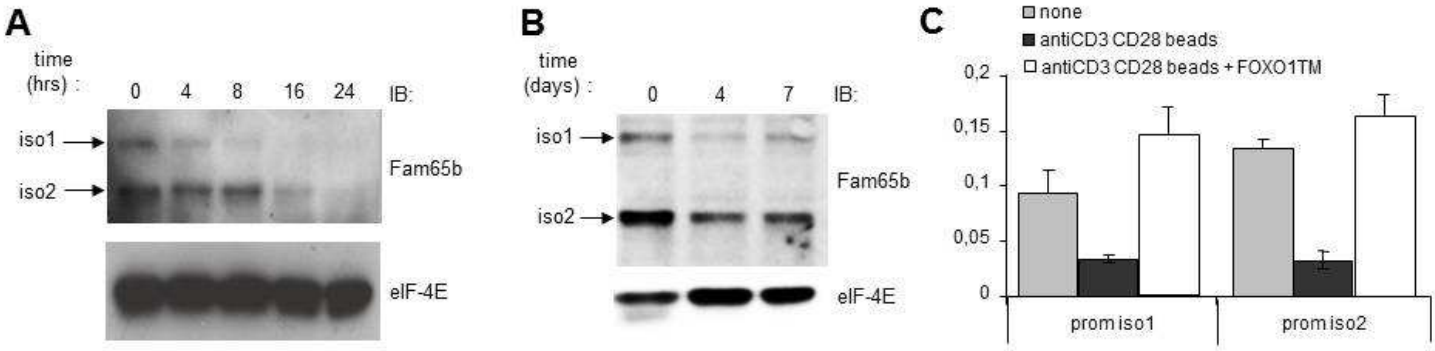

A
time
(hrs) :
0
4
8
16
24
IB:
iso1
iso2
Fam65b
eIF-4E
B
time
(days) :
0
4
7
IB:
iso1
iso2
Fam65b
eIF-4E
C
none
antiCD3 CD28 beads
antiCD3 CD28 beads + FOXO1TM
0,2
0,15
0,1
0,05
0
prom iso1
prom iso2

Figure 2

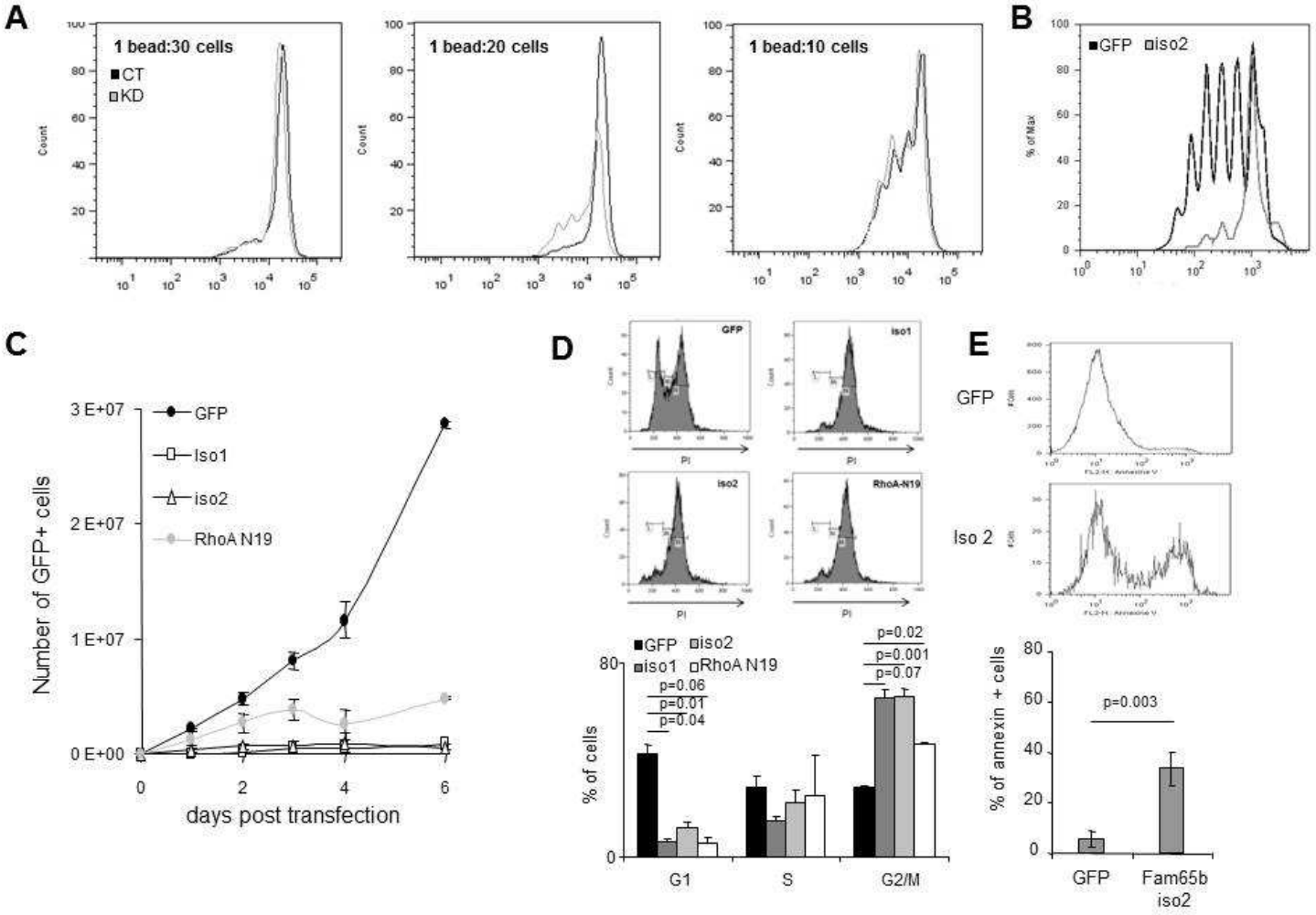

A
1 bead:30 cells
CT
KD
1 bead:20 cells
1 bead:10 cells
B
GFP
iso2
C
Number of GFP+ cells
GFP
Iso1
iso2
RhoA N19
days post transfection
D
GFP
Iso1
iso2
RhoA-N19
PI
GFP
iso2
iso1
RhoA N19
p=0.06
p=0.01
p=0.04
p=0.02
p=0.001
p=0.07
% of cells
G1
S
G2/M
E
GFP
Iso 2
% of annexin + cells
p=0.003
GFP
Fam65b
iso2

Figure 3

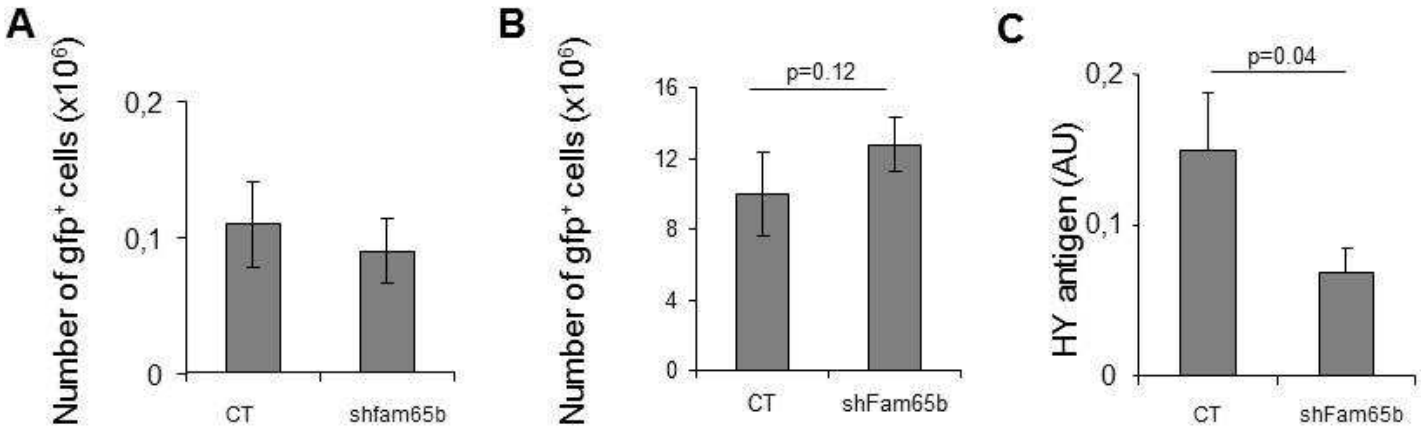
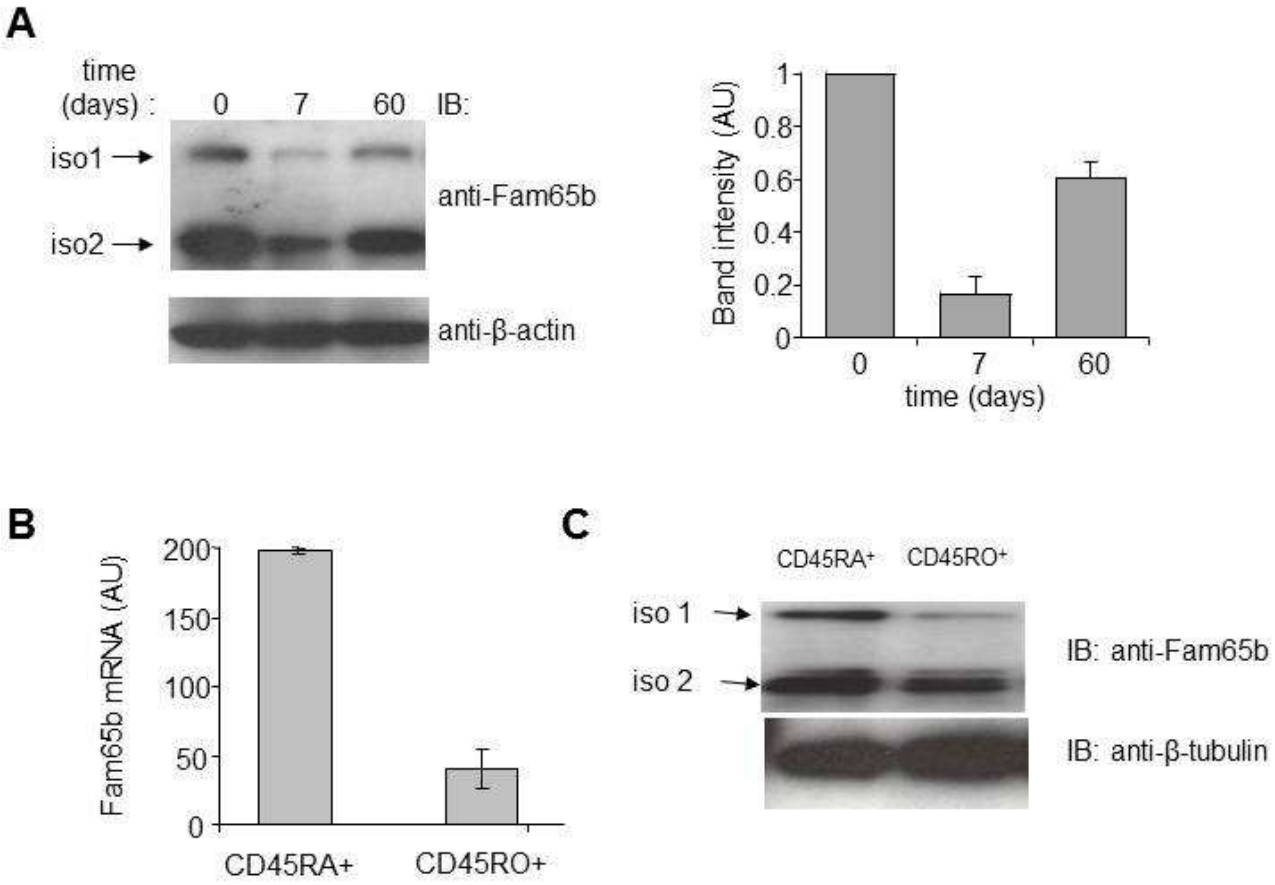
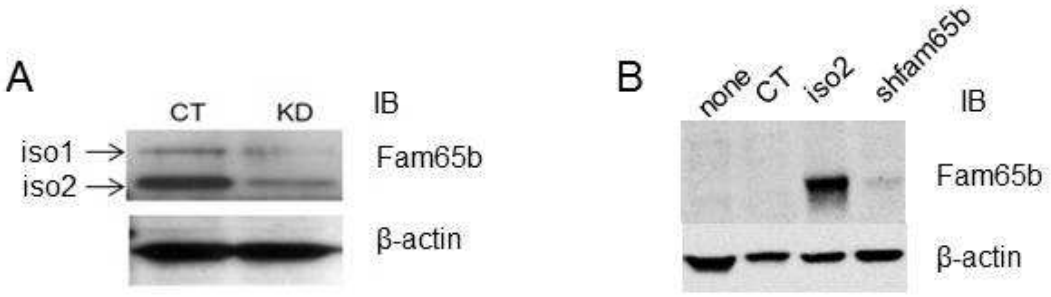

A
Number of gfp+ cells (x10^6)
0,2
0,1
0
CT
shfam65b
B
Number of gfp+ cells (x10^6)
p=0.12
16
12
8
4
0
CT
shFam65b
C
HY antigen (AU)
p=0.04
0,2
0,1
0
CT
shFam65b

Figure 4


A
time
(days) :
0
7
60
IB:
iso1
iso2
anti-Fam65b
anti-β-actin
Band intensity (AU)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
7
60
time (days)
B
Fam65b mRNA (AU)
200
150
100
50
0
CD45RA+
CD45RO+
C
CD45RA+
CD45RO+
iso 1
iso 2
IB: anti-Fam65b
IB: anti-β-tubulin

Suppl figure 1



REFERENCES

1. Masopust D & Picker LJ (2012) Hidden memories: frontline memory T cells and early pathogen interception. *J Immunol* 188, 5811-5817.
2. Obar JJ & Lefrancois L (2010) Memory CD8+ T cell differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 1183, 251-266.
3. Fabre S, Lang V, Harriague J, Jobart A, Unterman TG, Trautmann A, & Bismuth G (2005) Stable activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the T cell immunological synapse stimulates Akt signaling to FoxO1 nuclear exclusion and cell growth control. *J Immunol* 174, 4161-4171.
4. Fabre S, Carrette F, Chen J, Lang V, Semichon M, Denoyelle C, Lazar V, Cagnard N, Dubart-Kupperschmitt A, Mangeney M*, et al.* (2008) FOXO1 regulates L-Selectin and a network of human T cell homing molecules downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* 181, 2980-2989.
5. Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV, Dalal SN, DeCaprio JA, Greenberg ME, & Yaffe MB (2002) 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol* 156, 817-828.
6. Carrette F, Fabre S, & Bismuth G (2009) FOXO1, T-cell trafficking and immune responses. *Adv Exp Med Biol* 665, 3-16.
7. Kerdiles YM, Beisner DR, Tinoco R, Dejean AS, Castrillon DH, DePinho RA, & Hedrick SM (2009) Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat Immunol* 10, 176-184.
8. Gubbels Bupp MR, Edwards B, Guo C, Wei D, Chen G, Wong B, Masteller E, & Peng SL (2009) T cells require Foxo1 to populate the peripheral lymphoid organs. *Eur J Immunol* 39, 2991-2999.
9. Ouyang W, Beckett O, Flavell RA, & Li MO (2009) An essential role of the Forkhead-box transcription factor Foxo1 in control of T cell homeostasis and tolerance. *Immunity* 30, 358-371.
10. Rao RR, Li Q, Gubbels Bupp MR, & Shrikant PA (2012) Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8(+) T cell differentiation. *Immunity* 36, 374-387.
11. Kim EH, Sullivan JA, Plisch EH, Tejera MM, Jatzek A, Choi KY, & Suresh M (2012) Signal integration by Akt regulates CD8 T cell effector and memory differentiation. *J Immunol* 188, 4305-4314.

12. Sullivan JA, Kim EH, Plisch EH, Peng SL, & Suresh M (2012) FOXO3 regulates CD8 T cell memory by T cell-intrinsic mechanisms. *PLoS Pathog* 8, e1002533.
13. Sullivan JA, Kim EH, Plisch EH, & Suresh M (2012) FOXO3 Regulates the CD8 T Cell Response to a Chronic Viral Infection. *J Virol* 86, 9025-9034.
14. Yoon S, Molloy MJ, Wu MP, Cowan DB, & Gussoni E (2007) C6ORF32 is upregulated during muscle cell differentiation and induces the formation of cellular filopodia. *Dev Biol* 301, 70-81.
15. Rougerie P, Largeteau Q, Meunier S, Carrette F, Lejeune T, Bismuth G, Tanchot C, Delon J, & Mangeney M FoxO induces a new RhoA inhibitor that regulates T lymphocyte activation andmigration. .
16. Hedrick SM, Michelini RH, Doedens AL, Goldrath AW, & Stone EL (2012) FOXO transcription factors throughout T cell biology. *Nat Rev Immunol* 12, 649-661.
17. Tanchot C, Lemonnier FA, Perarnau B, Freitas AA, & Rocha B (1997) Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276, 2057-2062.
18. Tanchot C, Guillaume S, Delon J, Bourgeois C, Franzke A, Sarukhan A, Trautmann A, & Rocha B (1998) Modifications of CD8+ T cell function during in vivo memory or tolerance induction. *Immunity* 8, 581-590.
19. van der Horst A & Burgering BM (2007) Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 440-450.
20. Lin L, Hron JD, & Peng SL (2004) Regulation of NF-kappaB, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a. *Immunity* 21, 203-213.
21. Gaffen SL & Liu KD (2004) Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine* 28, 109-123.
22. Stahl M, Dijkers PF, Kops GJ, Lens SM, Coffer PJ, Burgering BM, & Medema RH (2002) The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol* 168, 5024-5031.
23. Niiya F, Tatsumoto T, Lee KS, & Miki T (2006) Phosphorylation of the cytokinesis regulator ECT2 at G2/M phase stimulates association of the mitotic kinase Plk1 and accumulation of GTP-bound RhoA. *Oncogene* 25, 827-837.
24. Su KC, Takaki T, & Petronczki M (2011) Targeting of the RhoGEF Ect2 to the equatorial membrane controls cleavage furrow formation during cytokinesis. *Dev Cell* 21, 1104-1115.
25. Malissen B, Ku G, Hermans M, Vivier E, & Malissen M (1995) Genetic dissection of the transducing subunits of the T-cell antigen receptor. *Ann N Y Acad Sci* 766, 173-181.

26. Kisielow P, Teh HS, Bluthmann H, & von Boehmer H (1988) Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 335, 730-733.

27. Tanchot C, Le Campion A, Leaument S, Dautigny N, & Lucas B (2001) Naive CD4(+) lymphocytes convert to anergic or memory-like cells in T cell-deprived recipients. *Eur J Immunol* 31, 2256-2265.

DISCUSSION

VII. Fam65b : un effecteur de FoxO1 régulant la quiescence et la migration des LT

VII.1. Régulation de l'expression de Fam65b

Notre travail a permis de mettre en évidence une organisation complexe du locus Fam65b. Deux transcrits alternatifs, sous le contrôle de deux promoteurs indépendants, peuvent être synthétisés à partir de ce gène. Ces ARNm sont de longueur différente et varient dans leur partie 5'. Cette structure particulière peut impliquer plusieurs niveaux de régulation *via* une stabilité ou un recrutement ribosomal propre à chaque ARN.

Fam65b est une cible transcriptionnelle de FOXO1. En effet, FOXO1 peut se lier sur des séquences consensus et transactiver subséquemment les deux promoteurs de Fam65b. Nous montrons, en plus, que ces deux promoteurs sont co-régulés par FOXO1 dans les LT. En effet, au cours de l'activation, l'expression des deux isoformes de Fam65b diminue, ce qui corrèle avec l'exclusion nucléaire de FOXO1 et donc l'arrêt de son activité transcriptionnelle.

D'autres gènes présentent ce type de régulation différentielle *via* l'existence de deux promoteurs. Un cas très similaire à Fam65b concerne le gène codant la diacylglycérol kinase α chez la souris (DGKα). Une étude récente montre que deux promoteurs co-existent au locus DGKα à partir desquels sont synthétisés des ARNm de longueur différente. Ces deux promoteurs sont co-régulés par Foxo1 et Foxo3 dans les LT, impliquant une diminution de leurs expressions au cours de l'activation. Aucune régulation d'expression différentielle ou de caractéristiques spécifiques des transcrits obtenus n'a été identifié par ailleurs (Martínez-Moreno et al., 2012). Le gène Lck est aussi caractérisé par la présence de deux promoteurs. L'un des deux est uniquement actif dans les thymocytes, alors que les deux sont actifs dans des LT matures. Il peut donc exister des mécanismes de régulation différentielle de deux promoteurs d'un même gène selon le stade de différenciation cellulaire (Wildin et al., 1991). Certains auteurs ont d'ailleurs rapporté une augmentation spécifique de l'un des transcrits dans certains lymphomes (Rouer et al., 1993). Il est tout à fait envisageable que la co-régulation des promoteurs Fam65b, notamment par FOXO1, ne soit pas effective dans tous les types cellulaires ou qu'elle varie au cours du développement. On peut, par exemple, se demander si ces mécanismes de régulation sont retrouvés dans un contexte musculaire ou placentaire, dans lesquels l'expression de Fam65b a été décrite. Ceci permettrait d'identifier

des rôles spécifiques de chacune des deux isoformes (Dakour et al., 1997; Yoon et al., 2007; Hirayama and Kim, 2008).

D'autres facteurs de transcription pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression de Fam65b dans les LT. Tout d'abord, les autres membres de la famille FoxO, et plus particulièrement FoxO3, sont susceptibles de se fixer aux mêmes sites de liaison que FoxO1. Du fait d'une possibilité de redondance fonctionnelle entre FoxO1 et FoxO3, il serait intéressant de voir si FoxO3 peut également réguler l'expression de Fam65b. Parallèlement, une analyse *in silico* révèle, par exemple, la présence de sites de liaison pour klf2, lui-même cible de FoxO1. Klf2 pourrait donc également contrôler la transcription du gène *Fam65b*. Les mécanismes de régulation de l'expression de Fam65b pourraient, ainsi, être ajustés selon le contexte cellulaire.

La transcription des deux ARNm de Fam65b aboutit à la synthèse de deux protéines de taille différente qui ont en commun leur partie N-terminale. En aval d'une stimulation du TCR, on observe une diminution transcriptionnelle et protéique de l'expression de Fam65b. La diminution de la quantité protéique de Fam65b après activation est très rapide et drastique. Elle pourrait s'expliquer par une courte durée de vie des protéines ou un mécanisme actif de dégradation. Plusieurs protéines sont régulées de cette façon après la stimulation du TCR permettant une adaptation très rapide (régulation protéique) et prolongée (régulation transcriptionnelle) de la cellule. C'est notamment le cas de klf2 et $p27^{KIP1}$, deux cibles des facteurs FoxOs, mais aussi des FoxOs eux-mêmes comme nous l'avons vu dans l'introduction. La dégradation de ces protéines est active, d'où sa rapidité, et implique le système ubiquitine-protéasome (Hara et al., 2001; Zhang et al., 2004). On peut se demander si l'inhibition de l'expression de Fam65b implique le même type de régulation active.

VII.2. Mécanismes d'action de Fam65b

VII.2.1. Fam65b est-il une GEF, une GAP, une GDI ?

Notre travail démontre que Fam65b est un nouveau partenaire de RhoA, interagissant directement avec cette dernière qu'elle soit active ou inactive. De plus, Fam65b régule l'activité de RhoA en contrôlant la balance GDP/GTP, par inhibition du chargement en GTP induit par une GEF.

RhoA possède un certain nombre de partenaires que l'on peut classer en deux grandes classes : les effecteurs et les régulateurs de son activité. Fam65b n'est, a priori, pas un effecteur puisque ceux-ci lient uniquement la forme active, couplée au GTP, de RhoA et ne régulent pas directement le chargement en GTP. Les partenaires qui régulent l'activité de RhoA sont des facteurs d'échange (GEF) permettant le remplacement du GDP par le GTP, des protéines GAP catalysant l'autohydrolyse du GTP, et enfin des protéines GDI qui, en inhibant une relocalisation membranaire des Rho GTPases, favorise le couplage au GDP à défaut du GTP. Ces trois familles de protéines possèdent des domaines consensus qui sont spécifiques à chacune d'elles. Le fait que Fam56b ne présente aucun domaine consensus n'est pas en faveur de son appartenance à l'une de ces trois familles de protéine. Ceci est renforcé par les résultats expérimentaux que nous avons obtenus. Nous avons observé le rôle inhibiteur du chargement en GTP de Fam65b dans un modèle acellulaire, ce qui est en défaveur d'un rôle de Fam65b comme GDI. Nous pouvons exclure un rôle de Fam65b comme protéines GEF puisque ces dernières, contrairement à lui, favorisent le chargement en GTP. L'hypothèse la plus évidente serait que Fam65b appartienne la famille de GAP et donc inhibe le chargement en GTP de RhoA. Trois arguments sont en défaveur de cette hypothèse : Fam65b est dépourvu des domaines consensus, les GAP ne se fixent généralement que sur la forme active de RhoA, contrairement à Fam65b, et enfin nous n'avons pas observé d'augmentation de l'autohydrolyse du GTP de RhoA, en présence de Fam65b seul, dans le test acellulaire.

L'ensemble de ces observations est en faveur d'une régulation atypique de RhoA par Fam65b. D'autres régulateurs atypiques ont été décrits. F11L, par exemple, est une protéine du virus de la vaccine qui est capable de se fixer sur RhoA de manière indépendante de sa charge en GTP. Il partage quelques acides aminés en commun avec l'effecteur ROCK et entre en compétition avec ce dernier pour la liaison à RhoA. Ainsi, F11L, en bloquant la liaison de ROCK à RhoA, inhiberait une boucle de rétrocontrôle positive entre ROCK et la charge en GTP de RhoA. En effet, en présence de F11L, la quantité de RhoA-GTP est diminuée (Valderrama et al., 2006). Un autre inhibiteur atypique de RhoA est la protéine MEMO. Cette protéine exerce un rôle d'échafaudage, en recrutant RhoA à la membrane, au sein d'un complexe avec l'effecteur mDia. Le recrutement membranaire de RhoA favorise probablement son contact avec des GEF, d'où l'augmentation de la charge en GTP (Zaoui et al., 2008).

Une autre hypothèse de mécanisme d'action de Fam65b serait qu'il soit un compétiteur de GEF. Il pourrait inhiber le fonctionnement des GEF en se fixant sur RhoA. Le point en

défaveur de ce modèle est que Fam65b se lie aux deux formes de RhoA. L'argument, en faveur de cette hypothèse, est que Fam65b inhibe le chargement en GTP, uniquement en présence de GEF. Quelques cas de régulateurs de l'activité GEF sont décrits dans la littérature. RasGRF2, GEF de la GTPase Ras, peut se fixer à la Rho GTPase Cdc42 dans des cellules de la lignée T Jurkat. Cette interaction empêche la fixation des GEF de Cdc42 (Calvo et al., 2011). Le gène DGKα, quant à lui, induit par les FoxOs dans les LT, est un inhibiteur de RasGRP1 qui est une GEF de la GTPase Ras (Sanjuán et al., 2003). Le dernier exemple implique l'ubiquitine ligase Cbl-b, qui régule l'activité de Vav, GEF de Rac1 (Chiang et al., 2000). Il est intéressant de noter à ce sujet que, dans l'étude globale du transcriptome induit par FOXO1 dans les LT, menée au laboratoire, Cbl-b apparaît comme une cible transcriptionnelle potentielle (Fabre et al., 2008b). Fam65b serait donc un pont moléculaire entre le facteur de transcription FoxO1 et la voie des Rho GTPases.

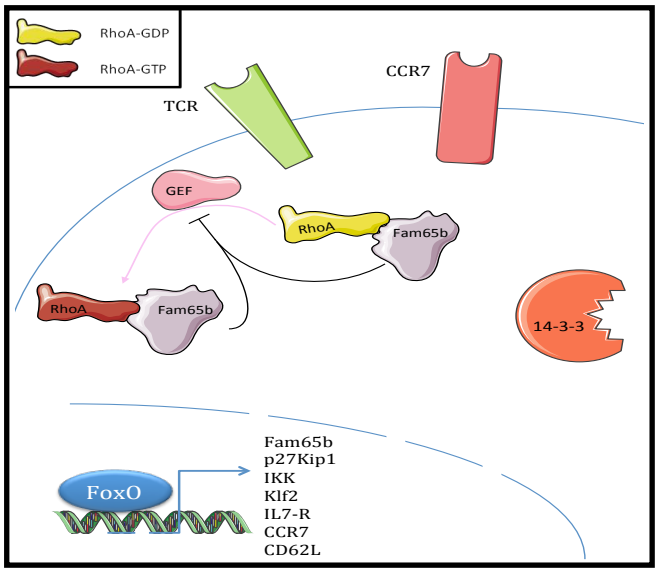
VII.2.2.Mécanisme moléculaire de la régulation de l'inhibition de RhoA par Fam65b

Nos résultats démontrent, qu'au cours d'une stimulation chimiokine, Fam65b se dissocie très rapidement (2 min) de RhoA. Seul Fam65b étant endogène dans nos expériences de pull-down, la rapidité de dissociation est très probablement due à une régulation post-traductionnelle de Fam65b. Une analyse *in silico* permet d'identifier trois sites de phosphorylation sur Fam65b qui ont été validés par des approches protéomiques à haut débit (Mayya et al., 2009). Ce type de régulation par des modifications post-traductionnelles contrôle l'activité de nombreuses protéines, comme les FoxOs dont nous avons déjà discuté dans l'introduction. D'autres exemples existent comme, par exemple, la localisation cytoplasmique de $p27^{KIP1}$ après phosphorylation par Akt sur la sérine 10 (Rodier, 2001). Les phosphorylations peuvent également être à l'origine d'un ciblage par le système ubiquitine-protéasome. L'étude du rôle de la phosphorylation de Fam65b est actuellement en cours au laboratoire.

De façon intéressante, nous avons observé que l'un des sites de phosphorylation de Fam65b, la sérine 21, est un site canonique de fixation de la protéine chaperonne 14-3-3. Les résultats de crible double hybride identifiant des partenaires de Fam65b met à jour une interaction de celui-ci avec la protéine chaperonne 14-3-3. Ce résultat vient d'être confirmé au laboratoire par des expériences de co-immunoprécipitation. Les protéines 14-3-3 sont impliquées dans une variété de processus biologiques par la régulation de l'activité et/ou de la localisation de diverses protéines, mais aussi en modulant la formation de complexes

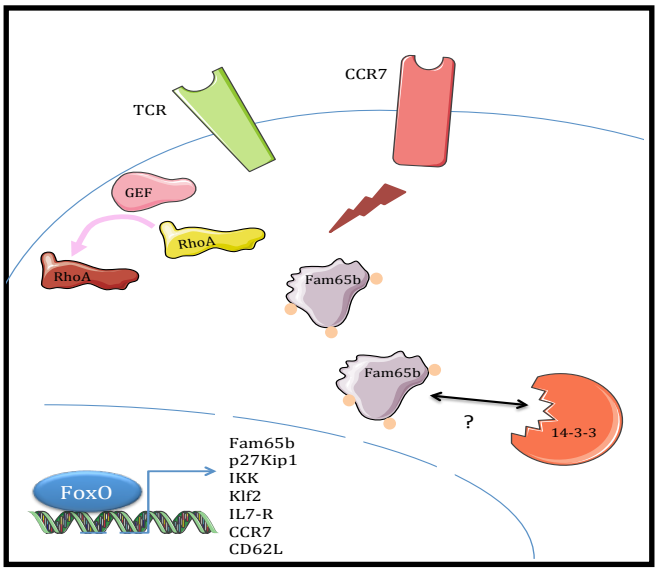
protéiques (Obsil and Obsilova, 2011b). Les protéines cibles de 14-3-3 contiennent des motifs comportant des résidus sérine ou thréonine phosphorylés. C'est notamment le cas des facteurs FoxOs qui, suite à leur phosphorylation par Akt, forment un complexe avec 14-3-3, entraînant leur localisation et séquestration cytoplasmique (cf. Chapitre 3).
Une étude réalisée dans la lignée cellulaire NIH 3T3 montre que l'activation de la voie PI3K/Akt aboutit à la phosphorylation du substrat Kank sur des résidus sérines. Cette phosphorylation permet la fixation de Kank à 14-3-3. Le complexe, ainsi formé, inhibe alors l'activation de RhoA (Kakinuma et al., 2008). Ainsi, il est tentant d'imaginer l'existence d'un tel système de régulation à trois acteurs permettant l'inhibition de RhoA par Fam65b. Nous pouvons proposer le modèle suivant : en aval d'une stimulation par la chimiokine CCL19 ou par le TCR, l'activation de la voie PI3K/Akt pourrait entraîner la phosphorylation de Fam65b sur ces résidus sérines. Suite à cela, la forme phosphorylée de Fam65b pourrait interagir avec 14-3-3 qui le séquestrerait, inhibant la liaison de Fam65b à RhoA. Ce mécanisme d'action est actuellement à l'étude au laboratoire.

La nature des signaux perçus par la cellule implique des mécanismes de régulation de Fam65b différents. En effet, nous montrons que la stimulation du TCR provoque l'arrêt de la transcription du gène *fam65b*, ainsi qu'une dégradation de la protéine. En conséquence, le complexe Fam65b/RhoA ne peut plus se former. En revanche, nous n'observons pas cette régulation en aval d'une stimulation chimiokine. Le signal TCR agit donc radicalement sur l'activité de Fam65b, puisque c'est l'expression de Fam65b qui est affectée. Cette « franche » levée d'inhibition pourrait permettre une activation à plus long terme de RhoA. En effet, la reformation du complexe nécessite du temps, puisqu'il faut que Fam65b soit ré-exprimé. Un tel mécanisme pourrait donc être favorable au processus d'activation du LT en réponse à l'antigène, *via* une activation soutenue et prolongée de RhoA en absence de Fam65b. En aval d'une stimulation du CCR7, la dissociation du complexe Fam65b/RhoA, sans modulation de l'expression de Fam65b, pourrait permettre une grande réactivité du système. En effet, étant effective en quelques minutes, la dissociation favorise probablement une activation rapide de RhoA, et donc une adaptation dynamique très rapide de la cellule. Parallèlement, la reformation du complexe étant facilitée, cela permet une régulation fine de l'activité de RhoA par Fam65b. Notons qu'une éventuelle dissociation du complexe Fam65b/RhoA très précocement après le début de la stimulation du TCR est actuellement à l'étude au laboratoire.



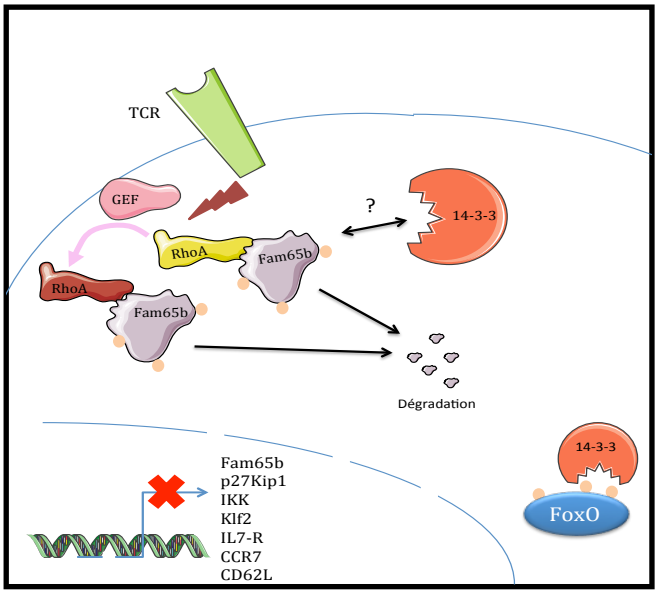
<u>En absence de stimulation :</u>

Fam65b est exprimé dans les LT quiescents via une régulation de sa transcription par FoxO1 qui est nucléaire dans ce contexte. Fam65b interagit sous forme de complexe avec RhoA actif (couplé au GTP) et inactif (couplé au GDP). L'ensemble est maintenu dans le cytoplasme. Fam65b inhibe l'activité de RhoA en limitant son chargement en GTP induit par une GEF. Actuellement, nous ne savons pas si cette inhibition implique la forme de Fam65b couplé à RhoA-GDP et/ou GTP. Fam65b inhibe la signalisation en aval du TCR et du CCR7, maintenant ainsi la quiescence des LT en absence de stimuli adéquats.



<u>En aval d'une stimulation du CCR7 :</u>

Fam65b, activement exprimé par FoxO1, se dissocie de RhoA. Nous ne savons pas, actuellement, si cette dissociation implique la forme de Fam65b couplé à RhoA-GDP et/ou GTP. La dissociation est favorable à l'augmentation du chargement en GTP de RhoA et donc de son activité. Une interaction éventuelle de 14-3-3 avec Fam65b pourrait apparaître suite à la phosphorylation de ce dernier sur des résidus sérines. Ceci pourrait participer à maintenir Fam65b à distance de RhoA, empêchant, transitoirement, la reformation de ce complexe.



<u>En aval d'une stimulation du TCR :</u>

L'activation de la voie PI3K/Akt aboutit à la phosphorylation et à l'exclusion nucléaire de Foxo1, lié à 14-3-3. De fait, la transcription du gène *fam65b* est arrêtée. La phosphorylation de Fam65b en aval du TCR pourrait favoriser son interaction avec 14-3-3. De plus, l'activation du LT induit la dégradation des protéines Fam65b. Actuellement, nous ne savons pas si une dissociation du complexe RhoA/Fam65b est effective en aval d'une stimulation du TCR. L'ensemble favorise le chargement en GTP de RhoA par les GEF induites en aval du TCR et donc une activation soutenue et prolongée de la voie RhoA.

Figure 18: Mécanisme d'action de Fam65b.

VII.3. Régulation fonctionnelle par Fam65b

VII.3.1. Fam65b régule le seuil d'activation des LT

En absence de toute stimulation, nous montrons que le chargement de RhoA en GTP dans des LT primaires, dépourvus en Fam65b, est supérieur à celui observé dans des LT exprimant Fam65b. De plus, la limitation du chargement en GTP de RhoA par Fam65b se fait uniquement en présence de GEF comme le montre notre test acellulaire. Cela implique l'existence de cycles de chargement/déchargement en GTP de RhoA dans un LT quiescent en absence de stimulus et donc à une activité basale de GEF. Dans ce contexte, Fam65b est un régulateur tonique de cette alternance à bas bruit, ayant lieu en absence de stimulation.

Nous montrons également que l'inhibition de l'expression de Fam65b permet l'entrée en cycle des LT humains dans des conditions de stimulation sous optimales, *via* le TCR et le CD28. Il semble donc que la moindre expression de Fam65b induit une moindre inhibition basale de la voie RhoA, rendant les LT plus facilement activable. Ainsi, Fam65b impose un seuil à franchir pour que les LT s'activent en réponse à l'antigène. Nous postulons donc que Fam65b est un régulateur du seuil d'activation des LT et que la régulation de son expression permet d'ajuster l'intensité des signaux nécessaire à engager un LT dans un processus d'activation et de prolifération.

Cette régulation du seuil d'activation par Fam65b est cohérente avec le phénotype des LT, observé dans un modèle murin invalidé pour le gène Foxo1 (Bupp et al., 2009; Kerdiles et al., 2009; Ouyang et al., 2009b). Les LT naïfs restants présentent un phénotype mémoire/activé et expriment le marqueur d'activation précoce CD69 et, très fortement, le marqueur de cellules activés ou à phénotype mémoire CD44. Ainsi, au vu de son rôle de régulateur du seuil d'activation des LT, Fam65b pourrait participer à maintenir un état non activé des LT.

Cette inhibition de la signalisation en aval du TCR par Fam65b paraît d'autant plus importante que les LT naïfs sont dépendants pour leur survie d'interactions de leur TCR avec des complexes CMH/peptide du soi (cf. chapitre II). Dans ces conditions, il est tout à fait envisageable que Fam65b inhibe la signalisation en aval du TCR suite à l'engagement par les complexes CMH/peptide du soi. Il permettrait alors de prévenir d'une éventuelle activation en aval de ce signal, tout en « autorisant » le signal de survie. Ainsi, le phénotype activé des LT

invalidés pour Foxo1 pourrait s'expliquer, au moins en partie, par l'absence d'expression de Fam65b.

Les LT mémoires ne requièrent pas d'interactions avec des complexes CMH/peptide du soi, ni avec l'antigène pour leur survie. Une signalisation tonique en aval du TCR n'est donc pas induite par ce biais dans les LT mémoires. De façon intéressante, nous avons observé que l'expression de Fam65b est plus faible dans les LT mémoires que dans les LT naïfs, ce qui est cohérent avec son rôle d'inhibiteur de la signalisation basale en aval du TCR lorsque celui-ci est engagé par des peptides du soi.

VII.3.2. Fam65b, un effecteur de la quiescence

Nous montrons que le maintien de l'expression de Fam65b, dans des LT quiescents, bloque la prolifération induite en aval d'un signal TCR/CD28. Ceci implique que la diminution d'expression de Fam65b est un prérequis à la prolifération de LT quiescents, ce qui corrèle avec une activation de la voie RhoA, promotrice des réponses cellulaires induites en aval du TCR (Mullin et al., 2007). L'ensemble est, en plus, cohérent avec le fait qu'aucune lignée prolifératives, que nous avons testé, n'exprime Fam65b. Ainsi, nous postulons que Fam65b est un régulateur de la quiescence des LT.

L'inhibition de Fam65b dans des LT quiescents n'induit pas leur prolifération spontanée en absence de tout stimulus. Ceci est également le cas dans les modèles murins d'invalidation des gènes codant Foxo1 ou Foxo3 (Bupp et al., 2009; Kerdiles et al., 2009; Ouyang et al., 2009b). L'ensemble suggère l'existence d'une somme de leviers moléculaires à actionner pour sortir de la quiescence et donc que cet état, activement maintenu, est verrouillé à plusieurs niveaux.

Les mécanismes d'action sous-jacents au maintien de l'expression d'un facteur de quiescence dans des cellules non prolifératives diffèrent de ceux induits lors de la ré-expression d'un tel facteur dans des cellules en prolifération. Nous observons que l'expression de Fam65b dans la lignée leucémique Jurkat entraîne l'arrêt de leur prolifération associé à un blocage en phase G2/M du cycle cellulaire, voire leur apoptose. Physiologiquement, nous avons pu observer que l'expression de Fam65b augmente entre jour 7 et jour 11 dans le modèle murin transgénique pour le TCR HY (données non montrées). Ceci corrèle avec le début de la phase de contraction de la réponse immune. Ainsi, il est envisageable que Fam65b

puisse être impliqué dans l'arrêt de la prolifération et la mort des LT sortants de la phase d'expansion clonale.

Les mécanismes moléculaires qui permettraient d'expliquer le rôle de Fam65b dans la régulation du cycle cellulaire ne sont pas connus. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées. Nous montrons que l'expression d'un dominant négatif de RhoA dans la lignée leucémique Jurkat induit un arrêt de la prolifération en phase G2/M. Il est donc envisageable que Fam65b induise un arrêt prolifératif *via* l'inhibition de l'activité de RhoA. Cependant, n'étant qu'une corrélation, d'autres mécanismes peuvent être proposés. Fam65b pourrait interférer avec certaines protéines régulatrices du cycle cellulaire. De telles interactions n'ont pu être identiées dans notre crible double hybride. Ceci n'exclut tout de même pas définitivement cette hypothèse, notamment de part des biais inhérents à la technique, mais aussi parce que ce crible a été réalisé sur une banque de thymocytes et non de LT périphériques. En revanche, il est possible que l'arrêt de la prolifération induit par Fam65b nécessite sa liaison à la protéine chaperonne 14-3-3, qui a été largement impliquée dans la régulation du cycle cellulaire (Gardino and Yaffe, 2011).

VII.3.3. Expression modérée de Fam65b dans les LT mémoires : conséquences fonctionnelles

Nos résultats montrent que l'expression de Fam65b dans les LT mémoires est plus faible que dans les LT naïfs, qu'ils soient humains ou murins. L'une des différences fondamentales entre la quiescence des LT naïfs et celle des LT mémoires est la capacité de ces dernières à s'auto-renouveler lentement. C'est ce que l'on appelle la prolifération homéostatique (Cf. Chapitre II). Nous avons vu que l'expression de Fam65b inhibe la prolifération des LT. Il est envisageable que l'expression modérée de Fam65b dans les LT mémoires soit favorable au processus de prolifération homéostatique induite par l'IL15. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet d'une inhibition de l'expression de Fam65b sur la réponse des LT à l'IL15.

L'autre hypothèse qu'il est tentant de formuler est que l'expression modérée de Fam65b dans les LT mémoires participe à la plus grande réactivité de ces cellules en réponse à l'antigène. Cette réactivité peut être vue en terme de capacité prolifératives, mais aussi effectrice. Nous montrons que l'inhibition de l'expression de Fam65b, dans des LT naïfs transgéniques pour le TCR HY, aboutit à une réponse secondaire améliorée qualitativement parlant. En effet, *in vivo*, l'élimination de l'antigène est plus efficace en absence de Fam65b.

Il est envisageable qu'une faible expression de Fam65b favorise l'entrée en cycle plus précoce des LT mémoires en réponse secondaire. En effet, nous observons *in vitro*, pour une même dose de stimulation, une proportion de LT en cycle légèrement plus importante en absence de Fam65b. Dans notre expérience *in vivo*, nous ne voyons pas de différence d'accumulation de LT spécifiques de l'antigène à jour 5 après le transfert. Il serait intéressant d'effectuer une cinétique en cours de réponse afin de visualiser un éventuel effet quantitatif de Fam65b.

La cytotoxicité améliorée des LT mémoires, exempt de Fam65b, ne semble pas venir d'une différence en terme de production d'IFNγ puisque celle-ci n'est pas affectée lorsque l'on restimule *in vitro* des LT mémoires en fin de réponse primaire (données non montrées). Il est tout à fait envisageable que d'autres types de cytotoxicité soient affectés par Fam65b : production de granzyme, de perforine. Il est également possible que cette différence reflète une variation d'ordre cinétique du relargage des molécules cytotoxiques. A ce sujet, il est intéressant de soulever le fait que les RhoGTPases sont clairement impliquées dans les processus de cytotoxicité des LT. Par exemple, le remaniement du cytosquelette est un paramètre crucial de la polarisation des granules et de leur sécrétion lors d'un contact avec une cellule infectée (Khurana and Leibson, 2003). Il est envisageable que l'inhibition de l'expression de Fam65b, entraînant une activation plus importante de la voie RhoA, favorise une dégranulation plus rapide et plus efficace. Il est alors tentant de se demander si un tel mécanisme existe dans les LT mémoires exprimant faiblement Fam65b. A ce sujet, il est important d'ajouter que la capacité des LT mémoires à éliminer plus rapidement une cellule infectée n'est pas encore formellement établie. Bien que des études montrent que les LT mémoires éliminent leurs cibles plus vite (Cho et al., 1999; Barber et al., 2003), d'autres n'observent aucune différence en terme de capacité de lyse (Bachmann et al., 1999). L'étude de l'axe Foxo/Fam65b/RhoA pourrait apporter des informations plus précises sur ces questions.

Il est possible que l'implication fonctionnelle de l'inhibition de l'expression de Fam65b en réponse secondaire soit en fait très similaire en réponse primaire. Cependant, le modèle que nous avons utilisé ne nous permet pas de vérifier cette hypothèse. En effet, la modulation de l'expression de Fam65b par des lentivirus dans des LT nécessite la pré-activation de ces derniers. Ceci implique que les LT n'expriment plus Fam65b dès le début de la réponse qu'ils

soient infectés par un vecteur contrôle ou un vecteur inhibant l'expression de Fam65b. Ainsi, nous ne pouvons percevoir le rôle de Fam65b dans une réponse immune qu'à partir de sa ré-expression. La réalisation, en cours au laboratoire, d'une souris knock-out pour le gène Fam65b permettra de palier à cette difficulté.

L'ensemble de ces résultats nous permet de postuler que l'expression modérée de Fam65b mesurée dans les LT mémoires participe à abaisser leur seuil d'activation et sous-tend leur plus grande réactivité et efficacité.

Ces données montrent également que la modulation d'expression de Fam65b entre les LT naïfs et les LT mémoires est un argument supplémentaire pour appuyer l'idée que le statut quiescent diffère entre ces deux populations. Une étude, particulièrement intriguante à ce sujet, montre que l'activation de la voie PI3K en aval du CD27 est nécessaire pour empêcher la réversion d'un phénotype mémoire vers un phénotype naïf (Allam et al., 2009). Ceci corrèle avec notre observation d'une plus faible expression de Fam65b dans les LT mémoires comparé aux LT naïfs, puisque l'activation de la voie PI3K induit l'arrêt de l'activité transcriptionnelle de Foxo1 par exclusion nucléaire. Ainsi, Fam65b est un marqueur du stade de différenciation des LT.

VII.3.4. Fam65b : un effecteur des FoxOs dans la différenciation et la fonctionnalité des LT mémoires ?

Nous venons de voir que la régulation de l'expression de Fam65b ajuste le seuil d'activation des LT. Sa moindre expression dans les LT mémoires corrèle avec leur plus grande efficacité à éliminer l'antigène. En revanche, notre travail montre également que l'inhibition de l'expression de Fam65b *in vivo* n'affecte pas la différenciation en LT mémoires. En effet, nous n'observons pas de différence en terme de nombre de LT spécifiques de l'antigène comptabilisé soixante jours après le début de l'immunisation.

Un premier point doit être souligné ici : comme nous venons de le discuter la pré-activation des LT dans notre modèle implique que, dès le début de la réponse, les LT infectés avec un vecteur contrôle n'expriment pas de Fam65b au même titre que ceux infectés avec un vecteur inhibant l'expression de Fam65b. De ce fait, nous ne pouvons exclure un éventuel rôle de Fam65b, dans la réponse primaire et la différenciation en LT mémoires, issu d'un effet au cours des premières heures de l'activation.

Nos résultats peuvent être mis en perspective avec de récents travaux étudiant le rôle des facteurs FoxOs dans la mémoire des LT.

FoxO1 est impliqué dans la différenciation des LT mémoires de par sa capacité à activer la transcription d'Eomes, facteur de transcription favorisant la génération de cellules précurseurs des LT mémoires (Rao et al., 2012). De plus, l'induction par Foxo1 de l'expression de l'IL7R semble nécessaire à l'établissement du pool de cellules mémoires et à leur fonctionnalité en réponse secondaire (Kim et al., 2012; Rao et al., 2012). Enfin, physiologiquement, les LT mémoires expriment moins de FOXO1 que les LT naïfs (Allam et al., 2009). D'après nos résultats, Fam65b n'intervient pas dans la différenciation des LT mémoires. Il n'est donc pas un effecteur de FoxO1 dans la régulation de la mémoire des LT *via* Eomes, ni *via* l'IL7R. En revanche, Fam65b est moins exprimé dans les LT mémoires comparé aux LT naïfs. Ainsi, la faible expression de FoxO1 et donc de Fam65b est une caractéristique fonctionnelle de LT mémoires, en participant à leur plus grande réactivité.

Foxo3 limite l'ampleur de la phase d'expansion clonale, affectant à terme le nombre accumulé de LT spécifiques d'antigène sans pour autant affecter leur fonctionnalité (Dejean et al., 2009; Sullivan et al., 2012a, 2012b). Cette apparente discordance avec nos résultats nécessite, dans un premier temps, la vérification d'une éventuelle régulation de la transcription de Fam65b par Foxo3. Par ailleurs, dans notre modèle, nous ne pouvons pas visualiser le rôle de Fam65b dans la phase d'expansion clonale lors d'une réponse primaire, ce qui limite la comparaison de ces résultats entre eux. Cependant, nous n'observons pas de différence du nombre de LT accumulés à jour 5 après transfert en réponse secondaire. Cette contradiction pourrait provenir d'une différence du point cinétique étudié. Enfin, l'utilisation de contextes expérimentaux différents peut aussi moduler l'interprétation des résultats. En effet, alors que nous avons testé l'efficacité des LT mémoires sur leur capacité à éliminer l'antigène, le rôle de Foxo3 a été mesuré sur la capacité des cellules à produire des cytokines telles que l'IFNγ, sur laquelle Fam65b non plus ne semble pas jouer.

VII.3.5.Fam65b régule la capacité migratoire des LT

Le travail présenté ici montre que Fam65b inhibe des propriétés fonctionnelles des LT en aval d'une stimulation chimiokine : l'adhésion, la polarisation et la migration.

Fam65b module les étapes très précoces de l'adhésion, puisque cette protéine affecte le nombre de cellules capables de s'arrêter sur un substrat ne serait-ce qu'une seconde. Nos

observations montrent que cet effet n'est pas dû à une modification de l'état d'affinité des intégrines, ce qui peut être étonnant du fait d'une implication décrite de RhoA. Il est possible que Fam65b soit impliqué dans l'agrégation des intégrines qui modulent également les propriétés adhésives des cellules (Giagulli et al., 2004; Pasvolsky et al., 2008).

Parallèlement, l'absence de Fam65b augmente la proportion de cellules possédant un lamellipode et, de façon plus marquée, celles étant totalement polarisées. Cependant, notre expérience montrant une absence d'effet de Fam65b sur la polymérisation d'actine implique que Fam65b ne contrôle pas le niveau cellulaire global de F-Actine. Fam65b pourrait alors intervenir dans la répartition et l'orientation de l'actine polymérisée.

Enfin, nous montrons que Fam65b inhibe la migration des LT à travers des membranes de Transwell. De plus, l'effet fonctionnel de Fam65b sur la migration est dépendant de la présence de son domaine de liaison à RhoA. Ceci est cohérent avec un rôle connu de l'axe RhoA/ROCK dans la contraction acto-myosique à l'origine de la formation de l'uropode, impliqué dans la capacité migratoire de LT primaires murins à travers des membranes de Transwell à partir d'une certaine taille de pores (Soriano et al., 2011). RhoA est également nécessaire à la migration transendothéliale de la lignée de LT CEM. Il semble que ce soit la formation de protrusions à l'avant, cette fois, qui favorise ce processus (Heasman et al., 2010). Ces données sont donc en faveur d'une inhibition de la migration induite par Fam65b, *via* une diminution de l'activité de RhoA, et régulable en aval d'un signal CCR7.

Physiologiquement, un cas d'expression modérée de Fam65b est détecté dans les LT mémoires comme le montre nos données. Peu d'études comparent les différences de capacités migratoires des LT naïfs versus LT mémoires. Cependant, une étude montre que la migration transendothéliale des LT mémoires est plus efficace que celle de LT naïfs, notamment de part le fait qu'elles sont plus promptes à produire des filipodes (Shulman et al., 2009). Ceci est cohérent avec l'idée qu'une diminution de l'expression de Fam65b est favorable à une augmentation d'activité de RhoA, dont l'impact, ici, est une plus grande efficacité à transmigrer. De façon intéressante, des données préliminaires suggèrent que le contenu en RhoA-GTP dans des LT primaires humains ($CD45RO^+$) serait plus important que celui dans des LT naïfs ($CD45RA^+$). Ainsi, il est envisageable que les LT mémoires pénètrent plus efficacement dans les ganglions que les LT naïfs. Ceci pourrait être un moyen d'augmenter la probabilité de rencontre entre le LT mémoire et la DC et d'orchestrer une réponse immune

plus efficace. Il serait intéressant d'approfondir ces quelques points qui restent pour l'instant largement spéculatif. Dans un premier temps, il s'agirait d'étudier *in vivo* le rôle de Fam65b dans la migration des LT. L'acquisition du modèle murin knock-out pour le gène Fam65b sera très utile dans cette optique.

VII.3.6.Fam65b : un effecteur de FoxO1 qui inhibe la migration ?

Un paradoxe intriguant est soulevé à la lecture de l'ensemble de nos résultats. Il est aujourd'hui admis que FoxO1 induit en parallèle un programme transcriptionnel pro-quiescence et pro-migration dans les LT. Or, Fam65b, qui est une cible de FOXO1, maintien la quiescence, mais inhibe la migration.

Une première hypothèse pour expliquer cette apparente contradiction est que la régulation du seuil d'activation de RhoA par Fam65b en aval du CCR7 pourrait assurer une sélectivité d'entrée des LT dans les ganglions. En effet, la stimulation du CCR7 est nécessaire à l'adhésion, la polarisation et la migration qui est notamment permise par une activation de la voie RhoA. L'inhibition de l'activité de Fam65b implique le déclenchement d'une signalisation *via* le CCR7, favorisant alors le déplacement de LT quiescents.

Une seconde hypothèse est basé sur le fait que la migration des LT est un processus complexe qui résulte d'interactions dynamiques intracellulaires (remaniement du cytosquelette, polarisation) et de leur adaptation rapide à l'évolution des contraintes environnementales. Contrairement au mode de migration lente mésenchymateuse, qui nécessite un fort ancrage dans le substrat ainsi qu'une polarité stable, les LT adoptent un mode de déplacement amiboïde caractérisée par son dynamisme, sa rapidité et un remodelage constant de la forme de la cellule. Selon l'environnement, l'implication des phénomènes d'adhésion ou de contraction des cellules est variable. Par exemple, contrairement aux évènements observés lors du homing ganglionnaire, la migration intranodale semble être peu dépendante de phénomènes de contraction et d'adhésion des cellules (Friedl and Bröker, 2000; Renkawitz and Sixt, 2010). D'ailleurs, nous n'observons pas de modulation de la capacité migratoire de LT par Fam65b dans un contexte de tranches de ganglions murins *ex vivo* (données non montrées). Ainsi, l'existence d'un inhibiteur de l'adhésion est finalement réconciliable avec un mode de déplacement amiboïde qui, par son faible recours à l'adhésion, permet une mobilité rapide des LT dans les ganglions. En revanche, lors du homing, l'inhibition transitoire de Fam65b est favorable à l'adhésion des LT

sur les cellules endothéliales précédant leur entrée dans les ganglions. En conséquence, Fam65b pourrait être un régulateur qualitatif de la migration.

En conclusion, mon travail de thèse a permis d'identifier Fam65b comme nouvel effecteur de FoxO1 qui régule conjointement la migration et la quiescence des LT. Fam65b régule le seuil d'activation des LT en aval d'une stimulation chimiokinique, mais aussi en aval du TCR, notamment en modulant la réactivité de la voie RhoA. La modulation de son expression dans les LT mémoires participe à leur efficacité améliorée et sous-tend des différences fondamentales entre la quiescence des LT naïfs et celle des LT mémoires.

BIBLIOGRAPHIE

Ahmed, R., Bevan, M.J., Reiner, S.L., and Fearon, D.T. (2009). The precursors of memory: models and controversies. Nature Reviews Immunology *9*, 662–668.

Aksoylar, H.I., Lampe, K., Barnes, M.J., Plas, D.R., and Hoebe, K. (2012). Loss of Immunological Tolerance in Gimap5-Deficient Mice Is Associated with Loss of Foxo in CD4+ T Cells. J Immunol *188*, 146–154.

Alanio, C., Lemaitre, F., Law, H.K.W., Hasan, M., and Albert, M.L. (2010). Enumeration of human antigen–specific naive CD8+ T cells reveals conserved precursor frequencies. Blood *115*, 3718–3725.

Allam, A., Conze, D.B., Torchia, M.L.G., Munitic, I., Yagita, H., Sowell, R.T., Marzo, A.L., and Ashwell, J.D. (2009). The CD8+ memory T-cell state of readiness is actively maintained and reversible. Blood *114*, 2121–2130.

Almeida, M., Han, L., Martin-Millan, M., O'Brien, C.A., and Manolagas, S.C. (2007). Oxidative Stress Antagonizes Wnt Signaling in Osteoblast Precursors by Diverting β-Catenin from T Cell Factor- to Forkhead Box O-mediated Transcription. J. Biol. Chem. *282*, 27298–27305.

Andrian, U.H. von, and Mempel, T.R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. Nature Reviews Immunology *3*, 867–878.

Anikeeva, N., and Sykulev, Y. (2011). Mechanisms controlling granule-mediated cytolytic activity of cytotoxic T lymphocytes. Immunol. Res. *51*, 183–194.

Aoki, M., Jiang, H., and Vogt, P.K. (2004). Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins. PNAS *101*, 13613–13617.

Araki, K., Turner, A.P., Shaffer, V.O., Gangappa, S., Keller, S.A., Bachmann, M.F., Larsen, C.P., and Ahmed, R. (2009). mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. Nature *460*, 108–112.

Arbonés, M.L., Ord, D.C., Ley, K., Ratech, H., Maynard-Curry, C., Otten, G., Capon, D.J., and Teddert, T.F. (1994). Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. Immunity *1*, 247–260.

Asada, S., Daitoku, H., Matsuzaki, H., Saito, T., Sudo, T., Mukai, H., Iwashita, S., Kako, K., Kishi, T., Kasuya, Y., et al. (2007). Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1. Cellular Signalling *19*, 519–527.

Asperti-Boursin, F., Real, E., Bismuth, G., Trautmann, A., and Donnadieu, E. (2007). CCR7 ligands control basal T cell motility within lymph node slices in a phosphoinositide 3–kinase–independent manner. J Exp Med *204*, 1167–1179.

Asselin-Labat, M.-L., David, M., Biola-Vidamment, A., Lecoeuche, D., Zennaro, M.-C., Bertoglio, J., and Pallardy, M. (2004). GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal–induced apoptosis. Blood *104*, 215–223.

Bachmann, M.F., Barner, M., Viola, A., and Kopf, M. (1999). Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. European Journal of Immunology *29*, 291–299.

Badovinac, V.P., Porter, B.B., and Harty, J.T. (2002). Programmed contraction of CD8+ T cells after infection. Nature Immunology *3*, 619–626.

Badovinac, V.P., Porter, B.B., and Harty, J.T. (2004). CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. Nature Immunology *5*, 809–817.

Badovinac, V.P., Tvinnereim, A.R., and Harty, J.T. (2000). Regulation of Antigen-Specific CD8+ T Cell Homeostasis by Perforin and Interferon-γ. Science *290*, 1354–1357.

Baekkevold, E.S., Yamanaka, T., Palframan, R.T., Carlsen, H.S., Reinholt, F.P., Andrian, U.H. von, Brandtzaeg, P., and Haraldsen, G. (2001). The Ccr7 Ligand ELC (Ccl19) Is Transcytosed in High Endothelial Venules and Mediates T Cell Recruitment. J Exp Med *193*, 1105–1112.

Bai, A., Hu, H., Yeung, M., and Chen, J. (2007). Krüppel-Like Factor 2 Controls T Cell Trafficking by Activating L-Selectin (CD62L) and Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Transcription. J Immunol *178*, 7632–7639.

Barber, D.L., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2003). Cutting Edge: Rapid In Vivo Killing by Memory CD8 T Cells. J Immunol *171*, 27–31.

Becker, T.C., Wherry, E.J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A., and Ahmed, R. (2002). Interleukin 15 Is Required for Proliferative Renewal of Virus-specific Memory CD8 T Cells. J Exp Med *195*, 1541–1548.

Berlin-Rufenach, C., Otto, F., Mathies, M., Westermann, J., Owen, M.J., Hamann, A., and Hogg, N. (1999). Lymphocyte Migration in Lymphocyte Function-associated Antigen (LFA)-1–deficient Mice. J Exp Med *189*, 1467–1478.

Berry, F.B., Skarie, J.M., Mirzayans, F., Fortin, Y., Hudson, T.J., Raymond, V., Link, B.A., and Walter, M.A. (2008). FOXC1 is required for cell viability and resistance to oxidative stress in the eye through the transcriptional regulation of FOXO1A. Hum. Mol. Genet. *17*, 490–505.

Biggs, W.H., Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W.K., and Arden, K.C. (1999). Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. PNAS *96*, 7421–7426.

Birkenkamp, K.U., and Coffer, P.J. (2003). FOXO Transcription Factors as Regulators of Immune Homeostasis: Molecules to Die for? J Immunol *171*, 1623–1629.

Blattman, J.N., Antia, R., Sourdive, D.J.D., Wang, X., Kaech, S.M., Murali-Krishna, K., Altman, J.D., and Ahmed, R. (2002). Estimating the Precursor Frequency of Naive Antigen-specific CD8 T Cells. J Exp Med *195*, 657–664.

Blattman, J.N., Grayson, J.M., Wherry, E.J., Kaech, S.M., Smith, K.A., and Ahmed, R. (2003). Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo. Nature Medicine *9*, 540–547.

Von Boehmer (1993). The life span of naive alpha/beta T cells in secondary lymphoid organs. The Journal of Experimental Medicine *177*, 891.

Braun, A., Worbs, T., Moschovakis, G.L., Halle, S., Hoffmann, K., Bölter, J., Münk, A., and Förster, R. (2011). Afferent lymph-derived T cells and DCs use different chemokine receptor CCR7-dependent routes for entry into the lymph node and intranodal migration. Nature Immunology *12*, 879–887.

Brenkman, A.B., de Keizer, P.L.J., van den Broek, N.J.F., Jochemsen, A.G., and Burgering, B.M. (2008). Mdm2 Induces Mono-Ubiquitination of FOXO4. PLoS ONE *3*, e2819.

Brent, M.M., Anand, R., and Marmorstein, R. (2008). Structural Basis for DNA Recognition by FoxO1 and Its Regulation by Posttranslational Modification. Structure *16*, 1407–1416.

Bromley, S.K., Mempel, T.R., and Luster, A.D. (2008). Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. Nature Immunology *9*, 970–980.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. Cell *96*, 857–868.

Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J.V., Dalal, S.N., DeCaprio, J.A., Greenberg, M.E., and Yaffe, M.B. (2002). 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. J Cell Biol *156*, 817–828.

Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L.S., Hemmings, B.A., and Greenberg, M.E. (2001). Protein Kinase SGK Mediates Survival Signals by Phosphorylating the Forkhead Transcription Factor FKHRL1 (FOXO3a). Molecular and Cellular Biology *21*, 952–965.

Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., et al. (2004). Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase. Science *303*, 2011–2015.

Buckley, A.F., Kuo, C.T., and Leiden, J.M. (2001). Transcription factor LKLF is sufficient to program T cell quiescence via a c-Myc–dependent pathway. Nature Immunology *2*, 698–704.

Bupp, M.G., Edwards, B., Guo, C., Wei, D., Chen, G., Wong, B., Masteller, E., and Peng, S.L. (2009). T cells require Foxo1 to populate the peripheral lymphoid organs. Eur J Immunol *39*, 2991–2999.

Calvo, F., Sanz-Moreno, V., Agudo-Ibáñez, L., Wallberg, F., Sahai, E., Marshall, C.J., and Crespo, P. (2011). RasGRF suppresses Cdc42-mediated tumour cell movement, cytoskeletal dynamics and transformation. Nature Cell Biology *13*, 819–826.

Cardone, L., Bardelli, A., and Avvedimento, V.E. (2012). Activation of β-Catenin by Oncogenic PIK3CA and EGFR Promotes Resistance to Glucose Deprivation by Inducing a Strong Antioxidant Response. PLoS ONE *7*, e37526.

Carlsen, H.S., Haraldsen, G., Brandtzaeg, P., and Baekkevold, E.S. (2005). Disparate lymphoid chemokine expression in mice and men: no evidence of CCL21 synthesis by human high endothelial venules. Blood *106*, 444–446.

Carlson, C.M., Endrizzi, B.T., Wu, J., Ding, X., Weinreich, M.A., Walsh, E.R., Wani, M.A., Lingrel, J.B., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2006). Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. Nature *442*, 299–302.

Carrio, R., Rolle, C.E., and Malek, T.R. (2007). Non-redundant role for IL-7R signaling for the survival of CD8+ memory T cells. European Journal of Immunology *37*, 3078–3088.

Chandele, A., Joshi, N.S., Zhu, J., Paul, W.E., Leonard, W.J., and Kaech, S.M. (2008). Formation of IL-7Rαhigh and IL-7Rαlow CD8 T Cells during Infection Is Regulated by the Opposing Functions of GABPα and Gfi-1. J Immunol *180*, 5309–5319.

Chang, J.T., Palanivel, V.R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Longworth, S.A., Vinup, K.E., Mrass, P., Oliaro, J., et al. (2007). Asymmetric T Lymphocyte Division in the Initiation of Adaptive Immune Responses. Science *315*, 1687–1691.

Charvet, C., Canonigo, A.J., Bécart, S., Maurer, U., Miletic, A.V., Swat, W., Deckert, M., and Altman, A. (2006). Vav1 Promotes T Cell Cycle Progression by Linking TCR/CD28 Costimulation to FOXO1 and p27kip1 Expression. J Immunol *177*, 5024–5031.

Chiang, Y.J., Kole, H.K., Brown, K., Naramura, M., Fukuhara, S., Hu, R.-J., Jang, I.K., Gutkind, J.S., Shevach, E., and Gu, H. (2000). Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. Nature *403*, 216–220.

Cho, B.K., Wang, C., Sugawa, S., Eisen, H.N., and Chen, J. (1999). Functional differences between memory and naive CD8 T cells. PNAS *96*, 2976–2981.

Choi, J., Oh, S., Lee, D., Oh, H.J., Park, J.Y., Lee, S.B., and Lim, D.-S. (2009). Mst1-FoxO Signaling Protects Naïve T Lymphocytes from Cellular Oxidative Stress in Mice. PLoS ONE *4*, e8011.

Clark, K.L., Halay, E.D., Lai, E., and Burley, S.K. (1993). Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. , Published Online: 29 July 1993; | Doi:10.1038/364412a0 *364*, 412–420.

Cornish, G.H., Sinclair, L.V., and Cantrell, D.A. (2006). Differential regulation of T-cell growth by IL-2 and IL-15. Blood *108*, 600–608.

Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C.-A., Ventre, E., Manh, T.-P.V., Baranek, T., Storset, A.K., Marvel, J., et al. (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8α+ dendritic cells. J Exp Med *207*, 1283–1292.

Cui, W., Joshi, N.S., Jiang, A., and Kaech, S.M. (2009). Effects of Signal 3 during CD8 T cell priming: Bystander production of IL-12 enhances effector T cell expansion but promotes terminal differentiation. Vaccine *27*, 2177–2187.

Cui, W., and Kaech, S.M. (2010). Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. Immunological Reviews *236*, 151–166.

Daitoku, H., Hatta, M., Matsuzaki, H., Aratani, S., Ohshima, T., Miyagishi, M., Nakajima, T., and Fukamizu, A. (2004). Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. PNAS *101*, 10042–10047.

Dakour, J., Li, H., and Morrish, D.W. (1997). PL48: a novel gene associated with cytotrophoblast and lineage-specific HL-60 cell differentiation. Gene *185*, 153–157.

Dejean, A.S., Beisner, D.R., Ch'en, I.L., Kerdiles, Y.M., Babour, A., Arden, K.C., Castrillon, D.H., DePinho, R.A., and Hedrick, S.M. (2009a). Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. Nature Immunology *10*, 504–513.

Dejean, A.S., Beisner, D.R., Ch'en, I.L., Kerdiles, Y.M., Babour, A., Arden, K.C., Castrillon, D.H., DePinho, R.A., and Hedrick, S.M. (2009b). Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. Nature Immunology *10*, 504–513.

Dejean, A.S., Hedrick, S.M., and Kerdiles, Y.M. (2011). Highly Specialized Role of Forkhead Box O Transcription Factors in the Immune System. Antioxidants & Redox Signaling *14*, 663–674.

Delgoffe, G.M., and Powell, J.D. (2009). mTOR: taking cues from the immune microenvironment. Immunology *127*, 459–465.

van der Heide, L.P., Jacobs, F.M.J., Burbach, J.P.H., Hoekman, M.F.M., and Smidt, M.P. (2005). FoxO6 transcriptional activity is regulated by Thr26 and Ser184, independent of nucleo-cytoplasmic shuttling. Biochemical Journal *391*, 623.

van der Windt, G.J.W., Everts, B., Chang, C.-H., Curtis, J.D., Freitas, T.C., Amiel, E., Pearce, E.J., and Pearce, E.L. (2012). Mitochondrial Respiratory Capacity Is a Critical Regulator of CD8+ T Cell Memory Development. Immunity *36*, 68–78.

Dijkers, P.F., Birkenkamp, K.U., Lam, E.W.-F., Thomas, N.S.B., Lammers, J.-W.J., Koenderman, L., and Coffer, P.J. (2002). FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal protein kinase B–enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. J Cell Biol *156*, 531–542.

DiSpirito, J.R., and Shen, H. (2010). Quick to remember, slow to forget: rapid recall responses of memory CD8+ T cells. Cell Research *20*, 13–23.

Dobson, M., Ramakrishnan, G., Ma, S., Kaplun, L., Balan, V., Fridman, R., and Tzivion, G. (2011). Bimodal regulation of FoxO3 by AKT and 14-3-3. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research *1813*, 1453–1464.

Dorner, B.G., Dorner, M.B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Güttler, S., Hutloff, A., Mages, H.W., Ranke, K., Schaefer, M., 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.

Essaghir, A., Dif, N., Marbehant, C.Y., Coffer, P.J., and Demoulin, J.-B. (2009). The Transcription of FOXO Genes Is Stimulated by FOXO3 and Repressed by Growth Factors. J. Biol. Chem. *284*, 10334–10342.

Essers, M.A., Weijzen, S., Vries-Smits, A.M. de, Saarloos, I., Ruiter, N.D. de, Bos, J.L., and Burgering, B.M.T. (2004). FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. The EMBO Journal *23*, 4802–4812.

Fabre, S., Carrette, F., Chen, J., Lang, V., Semichon, M., Denoyelle, C., Lazar, V., Cagnard, N., Dubart-Kupperschmitt, A., Mangeney, M., et al. (2008a). FOXO1 Regulates L-Selectin and a Network of Human T Cell Homing Molecules Downstream of Phosphatidylinositol 3-Kinase. J Immunol *181*, 2980–2989.

Fabre, S., Carrette, F., Chen, J., Lang, V., Semichon, M., Denoyelle, C., Lazar, V., Cagnard, N., Dubart-Kupperschmitt, A., Mangeney, M., et al. (2008b). FOXO1 Regulates L-Selectin and a Network of Human T Cell Homing Molecules Downstream of Phosphatidylinositol 3-Kinase. The Journal of Immunology *181*, 2980 –2989.

Fabre, S., Lang, V., Harriague, J., Jobart, A., Unterman, T.G., Trautmann, A., and Bismuth, G. (2005). Stable Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase in the T Cell Immunological Synapse Stimulates Akt Signaling to FoxO1 Nuclear Exclusion and Cell Growth Control. J Immunol *174*, 4161–4171.

Feng, X., Ippolito, G.C., Tian, L., Wiehagen, K., Oh, S., Sambandam, A., Willen, J., Bunte, R.M., Maika, S.D., Harriss, J.V., et al. (2010). Foxp1 is an essential transcriptional regulator for the generation of quiescent naive T cells during thymocyte development. Blood *115*, 510–518.

Feng, X., Wang, H., Takata, H., Day, T.J., Willen, J., and Hu, H. (2011). Transcription factor Foxp1 exerts essential cell-intrinsic regulation of the quiescence of naive T cells. Nature Immunology *12*, 544–550.

Fitzpatrick, D.R., Shirley, K.M., and Kelso, A. (1999). Cutting Edge: Stable Epigenetic Inheritance of Regional IFN-γ Promoter Demethylation in CD44highCD8+ T Lymphocytes. J Immunol *162*, 5053–5057.

Fox, C.J., Hammerman, P.S., and Thompson, C.B. (2005). Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. Nature Reviews Immunology *5*, 844–852.

Friedl, P., and Bröker, E.-B. (2000). T Cell Migration in Three-dimensional Extracellular Matrix: Guidance by Polarity and Sensations. Developmental Immunology *7*, 249–266.

Fruman, D.A., and Bismuth, G. (2009). Fine tuning the immune response with PI3K. Immunological Reviews *228*, 253–272.

Fu, W., Ma, Q., Chen, L., Li, P., Zhang, M., Ramamoorthy, S., Nawaz, Z., Shimojima, T., Wang, H., Yang, Y., et al. (2009). MDM2 Acts Downstream of p53 as an E3 Ligase to Promote FOXO Ubiquitination and Degradation. J. Biol. Chem. *284*, 13987–14000.

Fukuoka, M., Daitoku, H., Hatta, M., Matsuzaki, H., Umemura, S., and Fukamizu, A. (2003). Negative regulation of forkhead transcription factor AFX (Foxo4) by CBP-induced acetylation. International Journal of Molecular Medicine *12*, 503.

Furuyama, T., Nakazawa, T., Nakano, I., and Mori, N. (2000). Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. Biochemical Journal *349*, 629.

Garçon, F., Patton, D.T., Emery, J.L., Hirsch, E., Rottapel, R., Sasaki, T., and Okkenhaug, K. (2008). CD28 provides T-cell costimulation and enhances PI3K activity at the immune synapse independently of its capacity to interact with the p85/p110 heterodimer. Blood *111*, 1464–1471.

Gardino, A.K., and Yaffe, M.B. (2011). 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. Semin. Cell Dev. Biol. *22*, 688–695.

Gerlach, C., Heijst, J.W.J. van, Swart, E., Sie, D., Armstrong, N., Kerkhoven, R.M., Zehn, D., Bevan, M.J., Schepers, K., and Schumacher, T.N.M. (2010). One naive T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation. J Exp Med *207*, 1235–1246.

Giagulli, C., Scarpini, E., Ottoboni, L., Narumiya, S., Butcher, E.C., Constantin, G., and Laudanna, C. (2004). RhoA and ζ PKC Control Distinct Modalities of LFA-1 Activation by Chemokines: Critical Role of LFA-1 Affinity Triggering in Lymphocyte In Vivo Homing. Immunity *20*, 25–35.

Goldrath, A.W., Sivakumar, P.V., Glaccum, M., Kennedy, M.K., Bevan, M.J., Benoist, C., Mathis, D., and Butz, E.A. (2002). Cytokine Requirements for Acute and Basal Homeostatic Proliferation of Naive and Memory CD8+ T Cells. J Exp Med *195*, 1515–1522.

Gomis, R.R., Alarcón, C., He, W., Wang, Q., Seoane, J., Lash, A., and Massagué, J. (2006). A FoxO–Smad synexpression group in human keratinocytes. PNAS *103*, 12747–12752.

Grayson, J.M., Murali-Krishna, K., Altman, J.D., and Ahmed, R. (2001). Gene Expression in Antigen-Specific CD8+ T Cells During Viral Infection. J Immunol *166*, 795–799.

Green, D.R. (2008). Fas Bim Boom! Immunity *28*, 141–143.

Greer, E.L., Oskoui, P.R., Banko, M.R., Maniar, J.M., Gygi, M.P., Gygi, S.P., and Brunet, A. (2007). The Energy Sensor AMP-activated Protein Kinase Directly Regulates the Mammalian FOXO3 Transcription Factor. J. Biol. Chem. *282*, 30107–30119.

Grevenynghe, J. van, Procopio, F.A., He, Z., Chomont, N., Riou, C., Zhang, Y., Gimmig, S., Boucher, G., Wilkinson, P., Shi, Y., et al. (2008). Transcription factor FOXO3a controls the persistence of memory CD4+ T cells during HIV infection. Nature Medicine *14*, 266–274.

Gubbels Bupp, M.R., Edwards, B., Guo, C., Wei, D., Chen, G., Wong, B., Masteller, E., and Peng, S.L. (2009). T cells require Foxo1 to populate the peripheral lymphoid organs. European Journal of Immunology *39*, 2991–2999.

Gunn, M.D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J.G., Rosen, S.D., and Williams, L.T. (1998). A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. PNAS *95*, 258–263.

Hammarlund, E., Lewis, M.W., Hansen, S.G., Strelow, L.I., Nelson, J.A., Sexton, G.J., Hanifin, J.M., and Slifka, M.K. (2003). Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. Nature Medicine *9*, 1131–1137.

Hanyaloglu, A.C., and Zastrow, M. von (2008). Regulation of GPCRs by Endocytic Membrane Trafficking and Its Potential Implications. Annual Review of Pharmacology and Toxicology *48*, 537–568.

Hara, T., Kamura, T., Nakayama, K., Oshikawa, K., Hatakeyama, S., and Nakayama, K.-I. (2001). Degradation of p27 Kip1 at the G0-G1 Transition Mediated by a Skp2-independent Ubiquitination Pathway. J. Biol. Chem. *276*, 48937–48943.

Harada, Y., Harada, Y., Elly, C., Ying, G., Paik, J.-H., DePinho, R.A., and Liu, Y.-C. (2010). Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells. J Exp Med *207*, 1381–1391.

Hatta, M., and Cirillo, L.A. (2007). Chromatin Opening and Stable Perturbation of Core Histone:DNA Contacts by FoxO1. J. Biol. Chem. *282*, 35583–35593.

Heasman, S.J., Carlin, L.M., Cox, S., Ng, T., and Ridley, A.J. (2010). Coordinated RhoA signaling at the leading edge and uropod is required for T cell transendothelial migration. J Cell Biol *190*, 553–563.

Henrickson, S.E., Mempel, T.R., Mazo, I.B., Liu, B., Artyomov, M.N., Zheng, H., Peixoto, A., Flynn, M., Senman, B., Junt, T., et al. (2008a). In Vivo Imaging of T Cell Priming. Sci. Signal. *1*, pt2.

Henrickson, S.E., Mempel, T.R., Mazo, I.B., Liu, B., Artyomov, M.N., Zheng, H., Peixoto, A., Flynn, M.P., Senman, B., Junt, T., et al. (2008b). T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation. Nature Immunology *9*, 282–291.

Hildeman, D.A., Zhu, Y., Mitchell, T.C., Bouillet, P., Strasser, A., Kappler, J., and Marrack, P. (2002). Activated T Cell Death In Vivo Mediated by Proapoptotic Bcl-2 Family Member Bim. Immunity *16*, 759–767.

Hirayama, E., and Kim, J. (2008). Identification and characterization of a novel neural cell adhesion molecule (NCAM)-associated protein from quail myoblasts: relationship to myotube formation and induction of neurite-like protrusions. Differentiation *76*, 253–266.

Hogg, N., Patzak, I., and Willenbrock, F. (2011). The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. Nature Reviews Immunology *11*, 416–426.

Horst, A. van der, Tertoolen, L.G.J., Vries-Smits, L.M.M. de, Frye, R.A., Medema, R.H., and Burgering, B.M.T. (2004). FOXO4 Is Acetylated upon Peroxide Stress and Deacetylated by the Longevity Protein hSir2SIRT1. J. Biol. Chem. *279*, 28873–28879.

Horst, A. van der, Vries-Smits, A.M.M. de, Brenkman, A.B., Triest, M.H. van, Broek, N. van den, Colland, F., Maurice, M.M., and Burgering, B.M.T. (2006). FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. Nature Cell Biology *8*, 1064–1073.

Hu, M.C.-T., Lee, D.-F., Xia, W., Golfman, L.S., Ou-Yang, F., Yang, J.-Y., Zou, Y., Bao, S., Hanada, N., Saso, H., et al. (2004). IκB Kinase Promotes Tumorigenesis through Inhibition of Forkhead FOXO3a. Cell *117*, 225–237.

Huang, H., Regan, K.M., Lou, Z., Chen, J., and Tindall, D.J. (2006). CDK2-Dependent Phosphorylation of FOXO1 as an Apoptotic Response to DNA Damage. Science *314*, 294–297.

Huang, H., Regan, K.M., Wang, F., Wang, D., Smith, D.I., Deursen, J.M.A. van, and Tindall, D.J. (2005). Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. PNAS *102*, 1649–1654.

Jacobs, F.M.J., Heide, L.P. van der, Wijchers, P.J.E.C., Burbach, J.P.H., Hoekman, M.F.M., and Smidt, M.P. (2003). FoxO6, a Novel Member of the FoxO Class of Transcription Factors with Distinct Shuttling Dynamics. J. Biol. Chem. *278*, 35959–35967.

Jacobs, S.R., Herman, C.E., MacIver, N.J., Wofford, J.A., Wieman, H.L., Hammen, J.J., and Rathmell, J.C. (2008). Glucose Uptake Is Limiting in T Cell Activation and Requires CD28-Mediated Akt-Dependent and Independent Pathways. J Immunol *180*, 4476–4486.

Jacobs, S.R., Michalek, R.D., and Rathmell, J.C. (2010). IL-7 Is Essential for Homeostatic Control of T Cell Metabolism In Vivo. J Immunol *184*, 3461–3469.

Jiang, Q., Li, W.Q., Aiello, F.B., Mazzucchelli, R., Asefa, B., Khaled, A.R., and Durum, S.K. (2005). Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. Cytokine & Growth Factor Reviews *16*, 513–533.

Jin, S., and Levine, A.J. (2001). The p53 functional circuit. J Cell Sci *114*, 4139–4140.

Jones, R.G., Parsons, M., Bonnard, M., Chan, V.S.F., Yeh, W.-C., Woodgett, J.R., and Ohashi, P.S. (2000). Protein Kinase B Regulates T Lymphocyte Survival, Nuclear Factor κb Activation, and Bcl-XL Levels in Vivo. J Exp Med *191*, 1721–1734.

Kaech, S.M., Tan, J.T., Wherry, E.J., Konieczny, B.T., Surh, C.D., and Ahmed, R. (2003). Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. Nature Immunology *4*, 1191–1198.

Kakinuma, N., Roy, B.C., Zhu, Y., Wang, Y., and Kiyama, R. (2008). Kank regulates RhoA-dependent formation of actin stress fibers and cell migration via 14-3-3 in PI3K–Akt signaling. J Cell Biol *181*, 537–549.

Kedzierska, K., Day, E.B., Pi, J., Heard, S.B., Doherty, P.C., Turner, S.J., and Perlman, S. (2006). Quantification of Repertoire Diversity of Influenza-Specific Epitopes with Predominant Public or Private TCR Usage. J Immunol *177*, 6705–6712.

Kerdiles, Y.M., Beisner, D.R., Tinoco, R., Dejean, A.S., Castrillon, D.H., DePinho, R.A., and Hedrick, S.M. (2009). Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. Nature Immunology *10*, 176–184.

Kerdiles, Y.M., Stone, E.L., Beisner, D.L., McGargill, M.A., Ch'en, I.L., Stockmann, C., Katayama, C.D., and Hedrick, S.M. (2010). Foxo Transcription Factors Control Regulatory T Cell Development and Function. Immunity *33*, 890–904.

Kersh, E.N., Fitzpatrick, D.R., Murali-Krishna, K., Shires, J., Speck, S.H., Boss, J.M., and Ahmed, R. (2006). Rapid Demethylation of the IFN-γ Gene Occurs in Memory but Not Naive CD8 T Cells. J Immunol *176*, 4083–4093.

Khurana, D., and Leibson, P.J. (2003). Regulation of lymphocyte-mediated killing by GTP-binding proteins. J Leukoc Biol *73*, 333–338.

Kim, E.H., Sullivan, J.A., Plisch, E.H., Tejera, M.M., Jatzek, A., Choi, K.Y., and Suresh, M. (2012). Signal Integration by Akt Regulates CD8 T Cell Effector and Memory Differentiation. J Immunol *188*, 4305–4314.

Kops, G.J.P.L., Dansen, T.B., Polderman, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W.A., Coffer, P.J., Huang, T.-T., Bos, J.L., Medema, R.H., and Burgering, B.M.T. (2002a). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. Nature *419*, 316–321.

Kops, G.J.P.L., Medema, R.H., Glassford, J., Essers, M.A.G., Dijkers, P.F., Coffer, P.J., Lam, E.W.-F., and Burgering, B.M.T. (2002b). Control of Cell Cycle Exit and Entry by Protein Kinase B-Regulated Forkhead Transcription Factors. Mol. Cell. Biol. *22*, 2025–2036.

Kops, G.J.P.L., Ruiter, N.D. de, Vries-Smits, A.M.M.D., Powell, D.R., Bos, J.L., and Burgering, B.M.T. (1999). Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. Nature *398*, 630–634.

Ku, C.C., Murakami, M., Sakamoto, A., Kappler, J., and Marrack, P. (2000). Control of Homeostasis of CD8+ Memory T Cells by Opposing Cytokines. Science *288*, 675–678.

Kwon, I.-K., Wang, R., Thangaraju, M., Shuang, H., Liu, K., Dashwood, R., Dulin, N., Ganapathy, V., and Browning, D.D. (2010). PKG inhibits TCF signaling in colon cancer cells by blocking β-catenin expression and activating FOXO4. Oncogene *29*, 3423–3434.

Latner, D.R., Kaech, S.M., and Ahmed, R. (2004). Enhanced Expression of Cell Cycle Regulatory Genes in Virus-Specific Memory CD8+ T Cells. J. Virol. *78*, 10953–10959.

Lau, L.L., Jamieson, B.D., Somasundaram, T., and Ahmed, R. (1994). Cytotoxic T-cell memory without antigen. , Published Online: 23 June 1994; | Doi:10.1038/369648a0 *369*, 648–652.

Lehtinen, M.K., Yuan, Z., Boag, P.R., Yang, Y., Villén, J., Becker, E.B.E., DiBacco, S., de la Iglesia, N., Gygi, S., Blackwell, T.K., et al. (2006). A Conserved MST-FOXO Signaling Pathway Mediates Oxidative-Stress Responses and Extends Life Span. Cell *125*, 987–1001.

Li, X.-N., Song, J., Zhang, L., LeMaire, S.A., Hou, X., Zhang, C., Coselli, J.S., Chen, L., Wang, X.L., Zhang, Y., et al. (2009). Activation of the AMPK-FOXO3 Pathway Reduces Fatty Acid–Induced Increase in Intracellular Reactive Oxygen Species by Upregulating Thioredoxin. Diabetes *58*, 2246–2257.

Lin, L., Hron, J.D., and Peng, S.L. (2004). Regulation of NF-κB, Th Activation, and Autoinflammation by the Forkhead Transcription Factor Foxo3a. Immunity *21*, 203–213.

Link, A., Vogt, T.K., Favre, S., Britschgi, M.R., Acha-Orbea, H., Hinz, B., Cyster, J.G., and Luther, S.A. (2007). Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. Nature Immunology *8*, 1255–1265.

Liu, P., Kao, T.P., and Huang, H. (2008). CDK1 promotes cell proliferation and survival via phosphorylation and inhibition of FOXO1 transcription factor. Oncogene *27*, 4733–4744.

Lützner, N., Kalbacher, H., Krones-Herzig, A., and Rösl, F. (2012). FOXO3 Is a Glucocorticoid Receptor Target and Regulates LKB1 and Its Own Expression Based on Cellular AMP Levels via a Positive Autoregulatory Loop. PLoS ONE *7*, e42166.

Macintyre, A.N., Finlay, D., Preston, G., Sinclair, L.V., Waugh, C.M., Tamas, P., Feijoo, C., Okkenhaug, K., and Cantrell, D.A. (2011). Protein Kinase B Controls Transcriptional Programs that Direct Cytotoxic T Cell Fate but Is Dispensable for T Cell Metabolism. Immunity *34*, 224–236.

MacIver, N.J., Blagih, J., Saucillo, D.C., Tonelli, L., Griss, T., Rathmell, J.C., and Jones, R.G. (2011). The Liver Kinase B1 Is a Central Regulator of T Cell Development, Activation, and Metabolism. J Immunol *187*, 4187–4198.

Malek, T.R., and Castro, I. (2010). Interleukin-2 Receptor Signaling: At the Interface between Tolerance and Immunity. Immunity *33*, 153–165.

Manjunath, N., Shankar, P., Wan, J., Weninger, W., Crowley, M.A., Hieshima, K., Springer, T.A., Fan, X., Shen, H., Lieberman, J., et al. (2001). Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. Journal of Clinical Investigation *108*, 871–878.

Marelli-Berg, F., Cannella, L., Dazzi, F., and Mirenda, V. (2008). The highway code of T cell trafficking. The Journal of Pathology *214*, 179–189.

Martin, B., Bécourt, C., Bienvenu, B., and Lucas, B. (2006). Self-recognition is crucial for maintaining the peripheral CD4+ T-cell pool in a nonlymphopenic environment. Blood *108*, 270–277.

Martínez-Moreno, M., García-Liévana, J., Soutar, D., Torres-Ayuso, P., Andrada, E., Zhong, X.-P., Koretzky, G.A., Mérida, I., and Ávila-Flores, A. (2012). FoxO-Dependent Regulation of Diacylglycerol Kinase α Gene Expression. Mol. Cell. Biol. *32*, 4168–4180.

Masopust, D., and Picker, L.J. (2012). Hidden Memories: Frontline Memory T Cells and Early Pathogen Interception. J Immunol *188*, 5811–5817.

Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L., and Lefrançois, L. (2001). Preferential Localization of Effector Memory Cells in Nonlymphoid Tissue. Science *291*, 2413–2417.

Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Aoyama, H., Yoshimochi, K., and Fukamizu, A. (2005). Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. PNAS *102*, 11278–11283.

Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K., and Fukamizu, A. (2003). Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. PNAS *100*, 11285–11290.

Mayya, V., Lundgren, D.H., Hwang, S.-I., Rezaul, K., Wu, L., Eng, J.K., Rodionov, V., and Han, D.K. (2009). Quantitative Phosphoproteomic Analysis of T Cell Receptor Signaling Reveals System-Wide Modulation of Protein-Protein Interactions. Sci. Signal. *2*, ra46.

Medema, R.H., Kops, G.J.P.L., Bos, J.L., and Burgering, B.M.T. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. Nature *404*, 782–787.

Mei, Y., Zhang, Y., Yamamoto, K., Xie, W., Mak, T.W., and You, H. (2009). FOXO3a-dependent regulation of Pink1 (Park6) mediates survival signaling in response to cytokine deprivation. PNAS *106*, 5153–5158.

Michalek, R.D., and Rathmell, J.C. (2010). The metabolic life and times of a T-cell. Immunological Reviews *236*, 190–202.

Motta, M.C., Divecha, N., Lemieux, M., Kamel, C., Chen, D., Gu, W., Bultsma, Y., McBurney, M., and Guarente, L. (2004). Mammalian SIRT1 Represses Forkhead Transcription Factors. Cell *116*, 551–563.

Mousavi, S.F., Soroosh, P., Takahashi, T., Yoshikai, Y., Shen, H., Lefrançois, L., Borst, J., Sugamura, K., and Ishii, N. (2008). OX40 Costimulatory Signals Potentiate the Memory Commitment of Effector CD8+ T Cells. J Immunol *181*, 5990–6001.

Mullin, M., Lightfoot, K., Clarke, R., Miller, M., Lahesmaa, R., and Cantrell, D. (2007). The RhoA transcriptional program in pre-T cells. FEBS Letters *581*, 4309–4317.

Murali-Krishna, K., Lau, L.L., Sambhara, S., Lemonnier, F., Altman, J., and Ahmed, R. (1999). Persistence of Memory CD8 T Cells in MHC Class I-Deficient Mice. Science *286*, 1377–1381.

Nakae, J., Park, B.-C., and Accili, D. (1999). Insulin Stimulates Phosphorylation of the Forkhead Transcription Factor FKHR on Serine 253 through a Wortmannin-sensitive Pathway. J. Biol. Chem. *274*, 15982–15985.

Nehme, N.T., Schmid, J.P., Debeurme, F., André-Schmutz, I., Lim, A., Nitschke, P., Rieux-Laucat, F., Lutz, P., Picard, C., Mahlaoui, N., et al. (2012). MST1 mutations in autosomal recessive

primary immunodeficiency characterized by defective naive T-cell survival. Blood *119*, 3458–3468.

Nemoto, S., Fergusson, M.M., and Finkel, T. (2004). Nutrient Availability Regulates SIRT1 Through a Forkhead-Dependent Pathway. Science *306*, 2105–2108.

Nirula, A. (2006). Phosphoinositide-dependent kinase 1 targets protein kinase A in a pathway that regulates interleukin 4. Journal of Experimental Medicine *203*, 1733–1744.

Northrop, J.K., Wells, A.D., and Shen, H. (2008). Cutting Edge: Chromatin Remodeling as a Molecular Basis for the Enhanced Functionality of Memory CD8 T Cells. J Immunol *181*, 865–868.

Nowak, K., Killmer, K., Gessner, C., and Lutz, W. (2007). E2F-1 regulates expression of FOXO1 and FOXO3a. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression *1769*, 244–252.

Obsil, T., and Obsilova, V. (2011a). Structural basis for DNA recognition by FOXO proteins. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research *1813*, 1946–1953.

Obsil, T., and Obsilova, V. (2011b). Structural basis of 14-3-3 protein functions. Seminars in Cell & Developmental Biology *22*, 663–672.

Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Pabianova, A., Sulc, M., Teisinger, J., Boura, E., and Obsil, T. (2005). 14-3-3 Protein Interacts with Nuclear Localization Sequence of Forkhead Transcription Factor FoxO4. Biochemistry *44*, 11608–11617.

Oh, H.-M., Yu, C.-R., Dambuza, I., Marrero, B., and Egwuagu, C.E. (2012). STAT3 Protein Interacts with Class O Forkhead Transcription Factors in the Cytoplasm and Regulates Nuclear/Cytoplasmic Localization of FoxO1 and FoxO3a Proteins in CD4+ T Cells. J. Biol. Chem. *287*, 30436–30443.

Oh, H.-M., Yu, C.-R., Golestaneh, N., Amadi-Obi, A., Lee, Y.S., Eseonu, A., Mahdi, R.M., and Egwuagu, C.E. (2011). STAT3 Protein Promotes T-cell Survival and Inhibits Interleukin-2 Production through Up-regulation of Class O Forkhead Transcription Factors. J. Biol. Chem. *286*, 30888–30897.

Osborne, L.C., Dhanji, S., Snow, J.W., Priatel, J.J., Ma, M.C., Miners, M.J., Teh, H.-S., Goldsmith, M.A., and Abraham, N. (2007). Impaired CD8 T cell memory and CD4 T cell primary responses in IL-7Rα mutant mice. J Exp Med *204*, 619–631.

Otero, C., Groettrup, M., and Legler, D.F. (2006). Opposite Fate of Endocytosed CCR7 and Its Ligands: Recycling versus Degradation. J Immunol *177*, 2314–2323.

Ouyang, W., Beckett, O., Flavell, R.A., and Li, M.O. (2009a). An Essential Role of the Forkhead-Box Transcription Factor Foxo1 in Control of T Cell Homeostasis and Tolerance. Immunity *30*, 358–371.

Ouyang, W., Beckett, O., Flavell, R.A., and Li, M.O. (2009b). An Essential Role of the Forkhead-Box Transcription Factor Foxo1 in Control of T Cell Homeostasis and Tolerance. Immunity *30*, 358–371.

Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., Paik, J., DePinho, R.A., and Li, M.O. (2010). Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells. Nature Immunology *11*, 618–627.

Overwijk, W.W., and Schluns, K.S. (2009). Functions of γC cytokines in immune homeostasis: Current and potential clinical applications. Clinical Immunology *132*, 153–165.

Paik, J.-H., Kollipara, R., Chu, G., Ji, H., Xiao, Y., Ding, Z., Miao, L., Tothova, Z., Horner, J.W., Carrasco, D.R., et al. (2007). FoxOs Are Lineage-Restricted Redundant Tumor Suppressors and Regulate Endothelial Cell Homeostasis. Cell *128*, 309–323.

Pallard, C., Stegmann, A.P.., van Kleffens, T., Smart, F., Venkitaraman, A., and Spits, H. (1999). Distinct Roles of the Phosphatidylinositol 3-Kinase and STAT5 Pathways in IL-7-Mediated Development of Human Thymocyte Precursors. Immunity *10*, 525–535.

Papadia, S., Soriano, F.X., Léveillé, F., Martel, M.-A., Dakin, K.A., Hansen, H.H., Kaindl, A., Sifringer, M., Fowler, J., Stefovska, V., et al. (2008). Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. Nature Neuroscience *11*, 476–487.

Pappu, R., Schwab, S.R., Cornelissen, I., Pereira, J.P., Regard, J.B., Xu, Y., Camerer, E., Zheng, Y.-W., Huang, Y., Cyster, J.G., et al. (2007). Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. Science *316*, 295–298.

Park, J. (1999). Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. The EMBO Journal *18*, 3024–3033.

Park, J.-H., Yu, Q., Erman, B., Appelbaum, J.S., Montoya-Durango, D., Grimes, H.L., and Singer, A. (2004). Suppression of IL7Rα Transcription by IL-7 and Other Prosurvival Cytokines: A Novel Mechanism for Maximizing IL-7-Dependent T Cell Survival. Immunity *21*, 289–302.

Pasvolsky, R., Grabovsky, V., Giagulli, C., Shulman, Z., Shamri, R., Feigelson, S.W., Laudanna, C., and Alon, R. (2008). RhoA Is Involved in LFA-1 Extension Triggered by CXCL12 but Not in a Novel Outside-In LFA-1 Activation Facilitated by CXCL9. J Immunol *180*, 2815–2823.

Pearce, E.L. (2010). Metabolism in T cell activation and differentiation. Current Opinion in Immunology *22*, 314–320.

Pearce, E.L., Walsh, M.C., Cejas, P.J., Harms, G.M., Shen, H., Wang, L.-S., Jones, R.G., and Choi, Y. (2009). Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. Nature *460*, 103–107.

Pellegrini, M. (2003). Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim. Proceedings of the National Academy of Sciences *100*, 14175–14180.

Perrot, V., and Rechler, M.M. (2005). The Coactivator p300 Directly Acetylates the Forkhead Transcription Factor Foxo1 and Stimulates Foxo1-Induced Transcription. Molecular Endocrinology *19*, 2283–2298.

Pham, N.-L.L., Badovinac, V.P., and Harty, J.T. (2009). 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 *183*, 2337–2348.

Pham, T.H.M., Okada, T., Matloubian, M., Lo, C.G., and Cyster, J.G. (2008). S1P1 Receptor Signaling Overrides Retention Mediated by Gαi-Coupled Receptors to Promote T Cell Egress. Immunity *28*, 122–133.

Pihlgren, M., Arpin, C., Walzer, T., Tomkowiak, M., Thomas, A., Marvel, J., and Dubois, P.M. (1999). Memory CD44int CD8 T cells show increased proliferative responses and IFN-γ production following antigenic challenge in vitro. Int. Immunol. *11*, 699–706.

Pipkin, M.E., Sacks, J.A., Cruz-Guilloty, F., Lichtenheld, M.G., Bevan, M.J., and Rao, A. (2010). Interleukin-2 and Inflammation Induce Distinct Transcriptional Programs that Promote the Differentiation of Effector Cytolytic T Cells. Immunity *32*, 79–90.

Plas, D.R., and Thompson, C.B. (2003). Akt Activation Promotes Degradation of Tuberin and FOXO3a via the Proteasome. J. Biol. Chem. *278*, 12361–12366.

Prlic, M., and Bevan, M.J. (2008). Exploring regulatory mechanisms of CD8+ T cell contraction. PNAS *105*, 16689–16694.

Pua, H.H., Dzhagalov, I., Chuck, M., Mizushima, N., and He, Y.-W. (2007). A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation. J Exp Med *204*, 25–31.

Pua, H.H., Guo, J., Komatsu, M., and He, Y.-W. (2009). Autophagy Is Essential for Mitochondrial Clearance in Mature T Lymphocytes. J Immunol *182*, 4046–4055.

Qiang, L., Banks, A.S., and Accili, D. (2010). Uncoupling of Acetylation from Phosphorylation Regulates FoxO1 Function Independent of Its Subcellular Localization. J. Biol. Chem. *285*, 27396–27401.

Ramaswamy, S., Nakamura, N., Sansal, I., Bergeron, L., and Sellers, W.R. (2002). A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. Cancer Cell *2*, 81–91.

Rao, R.R., Li, Q., Bupp, M.R.G., and Shrikant, P.A. (2012). Transcription Factor Foxo1 Represses T-bet-Mediated Effector Functions and Promotes Memory CD8+ T Cell Differentiation. Immunity *36*, 374–387.

Rao, R.R., Li, Q., Odunsi, K., and Shrikant, P.A. (2010). The mTOR Kinase Determines Effector versus Memory CD8+ T Cell Fate by Regulating the Expression of Transcription Factors T-bet and Eomesodermin. Immunity *32*, 67–78.

Rathmell, J.C., Farkash, E.A., Gao, W., and Thompson, C.B. (2001). IL-7 Enhances the Survival and Maintains the Size of Naive T Cells. J Immunol *167*, 6869–6876.

Rathmell, J.C., Heiden, M.G.V., Harris, M.H., Frauwirth, K.A., and Thompson, C.B. (2000). In the Absence of Extrinsic Signals, Nutrient Utilization by Lymphocytes Is Insufficient to Maintain Either Cell Size or Viability. Molecular Cell *6*, 683–692.

Reif, K., Okkenhaug, K., Sasaki, T., Penninger, J.M., Vanhaesebroeck, B., and Cyster, J.G. (2004). Cutting Edge: Differential Roles for Phosphoinositide 3-Kinases, p110γ and p110δ, in Lymphocyte Chemotaxis and Homing. J Immunol *173*, 2236–2240.

Rena, G. (2002). Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion. The EMBO Journal *21*, 2263–2271.

Rena, G., Prescott, A.R., Guo, S., Cohen, P., and Unterman, T.G. (2001). Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targetting. Biochemical Journal *354*, 605.

Renault, V.M., Thekkat, P.U., Hoang, K.L., White, J.L., Brady, C.A., Broz, D.K., Venturelli, O.S., Johnson, T.M., Oskoui, P.R., Xuan, Z., et al. (2011). The pro-longevity gene FoxO3 is a direct target of the p53 tumor suppressor. Oncogene *30*, 3207–3221.

Renkawitz, J., and Sixt, M. (2010). Mechanisms of force generation and force transmission during interstitial leukocyte migration. EMBO Reports *11*, 744–750.

Riou, C., Yassine-Diab, B., Grevenynghe, J.V., Somogyi, R., Greller, L.D., Gagnon, D., Gimmig, S., Wilkinson, P., Shi, Y., Cameron, M.J., et al. (2007). Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4+ central memory T cells. J Exp Med *204*, 79–91.

Rochman, Y., Spolski, R., and Leonard, W.J. (2009). New insights into the regulation of T cells by γc family cytokines. Nature Reviews Immunology *9*, 480–490.

Rodier, G. (2001). p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis. The EMBO Journal *20*, 6672–6682.

Rosen, H., and Goetzl, E.J. (2005). Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. Nature Reviews Immunology *5*, 560–570.

Rouer, E., Dreyfus, F., Melle, J., Ribrag, V., and Benarous, R. (1993). Selective increase of alternatively spliced Lck transcripts from the proximal promotor in hematopoietic malignancies. Leukemia *7*, 246–250.

Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature *401*, 708–712.

Sanjuán, M.A., Pradet-Balade, B., Jones, D.R., Martínez-A, C., Stone, J.C., Garcia-Sanz, J.A., and Mérida, I. (2003). T Cell Activation In Vivo Targets Diacylglycerol Kinase α to the Membrane: A Novel Mechanism for Ras Attenuation. J Immunol *170*, 2877–2883.

Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. Science *307*, 1098–1101.

Sarkar, S., Kalia, V., Haining, W.N., Konieczny, B.T., Subramaniam, S., and Ahmed, R. (2008). Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. J Exp Med *205*, 625–640.

Sarkar, S., Teichgräber, V., Kalia, V., Polley, A., Masopust, D., Harrington, L.E., Ahmed, R., and Wherry, E.J. (2007). Strength of Stimulus and Clonal Competition Impact the Rate of Memory CD8 T Cell Differentiation. J Immunol *179*, 6704–6714.

Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C., and Lefrançois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. Nature Immunology *1*, 426–432.

Schmidt, M., Fernandez de Mattos, S., van der Horst, A., Klompmaker, R., Kops, G.J.P.L., Lam, E.W.-F., Burgering, B.M.T., and Medema, R.H. (2002). Cell Cycle Inhibition by FoxO Forkhead Transcription Factors Involves Downregulation of Cyclin D. Molecular and Cellular Biology *22*, 7842–7852.

Schwab, S.R., Pereira, J.P., Matloubian, M., Xu, Y., Huang, Y., and Cyster, J.G. (2005). Lymphocyte Sequestration Through S1P Lyase Inhibition and Disruption of S1P Gradients. Science *309*, 1735–1739.

Scimone, M.L., Felbinger, T.W., Mazo, I.B., Stein, J.V., Andrian, U.H. von, and Weninger, W. (2004). CXCL12 Mediates CCR7-independent Homing of Central Memory Cells, But Not Naive T Cells, in Peripheral Lymph Nodes. J Exp Med *199*, 1113–1120.

Sebzda, E., Zou, Z., Lee, J.S., Wang, T., and Kahn, M.L. (2008). Transcription factor KLF2 regulates the migration of naive T cells by restricting chemokine receptor expression patterns. Nature Immunology *9*, 292–300.

Seoane, J., Le, H.-V., Shen, L., Anderson, S.A., and Massagué, J. (2004). Integration of Smad and Forkhead Pathways in the Control of Neuroepithelial and Glioblastoma Cell Proliferation. Cell *117*, 211–223.

Shen, B., Chao, L., and Chao, J. (2010). Pivotal role of JNK-dependent FOXO1 activation in downregulation of kallistatin expression by oxidative stress. Am J Physiol Heart Circ Physiol *298*, H1048–H1054.

Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev. *13*, 1501–1512.

Shiow, L.R., Rosen, D.B., Brdičková, N., Xu, Y., An, J., Lanier, L.L., Cyster, J.G., and Matloubian, M. (2006). CD69 acts downstream of interferon-α/β to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. Nature *440*, 540–544.

Shulman, Z., Shinder, V., Klein, E., Grabovsky, V., Yeger, O., Geron, E., Montresor, A., Bolomini-Vittori, M., Feigelson, S.W., Kirchhausen, T., et al. (2009). Lymphocyte Crawling and Transendothelial Migration Require Chemokine Triggering of High-Affinity LFA-1 Integrin. Immunity *30*, 384–396.

Silhan, J., Vacha, P., Strnadova, P., Vecer, J., Herman, P., Sulc, M., Teisinger, J., Obsilova, V., and Obsil, T. (2009). 14-3-3 Protein Masks the DNA Binding Interface of Forkhead Transcription Factor FOXO4. J. Biol. Chem. *284*, 19349–19360.

Sinclair, L.V., Finlay, D., Feijoo, C., Cornish, G.H., Gray, A., Ager, A., Okkenhaug, K., Hagenbeek, T.J., Spits, H., and Cantrell, D.A. (2008). Phosphatidylinositol-3-OH kinase and nutrient-sensing mTOR pathways control T lymphocyte trafficking. Nature Immunology *9*, 513–521.

Singh, A., Jatzek, A., Plisch, E.H., Srinivasan, R., Svaren, J., and Suresh, M. (2010a). Regulation of Memory CD8 T-Cell Differentiation by Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27Kip1. Mol. Cell. Biol. *30*, 5145–5159.

Singh, A., Ye, M., Bucur, O., Zhu, S., Santos, M.T., Rabinovitz, I., Wei, W., Gao, D., Hahn, W.C., and Khosravi-Far, R. (2010b). Protein Phosphatase 2A Reactivates FOXO3a through a Dynamic Interplay with 14-3-3 and AKT. Mol. Biol. Cell *21*, 1140–1152.

Soriano, S.F., Hons, M., Schumann, K., Kumar, V., Dennier, T.J., Lyck, R., Sixt, M., and Stein, J.V. (2011). In Vivo Analysis of Uropod Function during Physiological T Cell Trafficking. J Immunol *187*, 2356–2364.

Stahl, M., Dijkers, P.F., Kops, G.J.P.L., Lens, S.M.A., Coffer, P.J., Burgering, B.M.T., and Medema, R.H. (2002). The Forkhead Transcription Factor FoxO Regulates Transcription of p27Kip1 and Bim in Response to IL-2. J Immunol *168*, 5024–5031.

Stein, J.V., Rot, A., Luo, Y., Narasimhaswamy, M., Nakano, H., Gunn, M.D., Matsuzawa, A., Quackenbush, E.J., Dorf, M.E., and Andrian, U.H. von (2000). The Cc Chemokine Thymus-Derived Chemotactic Agent 4 (Tca-4, Secondary Lymphoid Tissue Chemokine, 6ckine, Exodus-2) Triggers Lymphocyte Function–Associated Antigen 1–Mediated Arrest of Rolling T Lymphocytes in Peripheral Lymph Node High Endothelial Venules. J Exp Med *191*, 61–76.

Stittrich, A.-B., Haftmann, C., Sgouroudis, E., Kühl, A.A., Hegazy, A.N., Panse, I., Riedel, R., Flossdorf, M., Dong, J., Fuhrmann, F., et al. (2010). The microRNA miR-182 is induced by IL-2 and promotes clonal expansion of activated helper T lymphocytes. Nature Immunology *11*, 1057–1062.

Stock, A.T., Jones, C.M., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2006). Cutting Edge: Central Memory T Cells Do Not Show Accelerated Proliferation or Tissue Infiltration in Response to Localized Herpes Simplex Virus-1 Infection. J Immunol *177*, 1411–1415.

Strasser, A., Jost, P.J., and Nagata, S. (2009). The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System. Immunity *30*, 180–192.

Sullivan, J.A., Kim, E.H., Plisch, E.H., Peng, S.L., and Suresh, M. (2012a). FOXO3 Regulates CD8 T Cell Memory by T Cell-Intrinsic Mechanisms. PLoS Pathog *8*, e1002533.

Sullivan, J.A., Kim, E.H., Plisch, E.H., and Suresh, M. (2012b). FOXO3 Regulates the CD8 T Cell Response to a Chronic Viral Infection. J. Virol. *86*, 9025–9034.

Swanson, B.J., Murakami, M., Mitchell, T.C., Kappler, J., and Marrack, P. (2002). RANTES Production by Memory Phenotype T Cells Is Controlled by a Posttranscriptional, TCR-Dependent Process. Immunity *17*, 605–615.

Takada, K., and Jameson, S.C. (2009). Self–class I MHC molecules support survival of naive CD8 T cells, but depress their functional sensitivity through regulation of CD8 expression levels. J Exp Med *206*, 2253–2269.

Takada, K., Wang, X., Hart, G.T., Odumade, O.A., Weinreich, M.A., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2011). Kruppel-Like Factor 2 Is Required for Trafficking but Not Quiescence in Postactivated T Cells. J Immunol *186*, 775–783.

Takemoto, N., Intlekofer, A.M., Northrup, J.T., Wherry, E.J., and Reiner, S.L. (2006). Cutting Edge: IL-12 Inversely Regulates T-bet and Eomesodermin Expression during Pathogen-Induced CD8+ T Cell Differentiation. J Immunol *177*, 7515–7519.

Tang, T.T.-L., Dowbenko, D., Jackson, A., Toney, L., Lewin, D.A., Dent, A.L., and Lasky, L.A. (2002). The Forkhead Transcription Factor AFX Activates Apoptosis by Induction of the BCL-6 Transcriptional Repressor. J. Biol. Chem. *277*, 14255–14265.

Ticchioni, M., Essafi, M., Jeandel, P.Y., Davi, F., Cassuto, J.P., Deckert, M., and Bernard, A. (2007). Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. Oncogene *26*, 7081–7091.

Tough, D.F., and Sprent, J. (1994). Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. J Exp Med *179*, 1127–1135.

Tran, H., Brunet, A., Grenier, J.M., Datta, S.R., Fornace, A.J., DiStefano, P.S., Chiang, L.W., and Greenberg, M.E. (2002). DNA Repair Pathway Stimulated by the Forkhead Transcription Factor FOXO3a Through the Gadd45 Protein. Science *296*, 530–534.

Tzachanis, D., Freeman, G.J., Hirano, N., Puijenbroek, A.A.F.L. van, Delfs, M.W., Berezovskaya, A., Nadler, L.M., and Boussiotis, V.A. (2001). Tob is a negative regulator of activation that is expressed in anergic and quiescent T cells. Nature Immunology *2*, 1174–1182.

Valderrama, F., Cordeiro, J.V., Schleich, S., Frischknecht, F., and Way, M. (2006). Vaccinia Virus-Induced Cell Motility Requires F11L-Mediated Inhibition of RhoA Signaling. Science *311*, 377–381.

Veiga-Fernandes, H., and Rocha, B. (2003). High expression of active CDK6 in the cytoplasm of CD8 memory cells favors rapid division. Nature Immunology *5*, 31–37.

Veiga-Fernandes, H., Walter, U., Bourgeois, C., McLean, A., and Rocha, B. (2000). Response of naïve and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. Nature Immunology *1*, 47–53.

Vivien, L., Benoist, C., and Mathis, D. (2001). T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. Int. Immunol. *13*, 763–768.

Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Green, J.M., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. Immunity *1*, 405–413.

Walzer, T., Marçais, A., Saltel, F., Bella, C., Jurdic, P., and Marvel, J. (2003). Cutting Edge: Immediate RANTES Secretion by Resting Memory CD8 T Cells Following Antigenic Stimulation. J Immunol *170*, 1615–1619.

Wang, D., Qin, H., Du, W., Shen, Y.-W., Lee, W.-H., Riggs, A.D., and Liu, C.-P. (2012a). Inhibition of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) reprograms and converts diabetogenic T cells to Foxp3+ regulatory T cells. PNAS *109*, 9493–9498.

Wang, L., Brugge, J.S., and Janes, K.A. (2011). Intersection of FOXO- and RUNX1-mediated gene expression programs in single breast epithelial cells during morphogenesis and tumor progression. PNAS *108*, E803–E812.

Wang, M., Zhang, X., Zhao, H., Wang, Q., and Pan, Y. (2009). FoxO gene family evolution in vertebrates. BMC Evolutionary Biology *9*, 222.

Wang, X., Chen, W.R., and Xing, D. (2012b). A pathway from JNK through decreased ERK and Akt activities for FOXO3a nuclear translocation in response to UV irradiation. Journal of Cellular Physiology *227*, 1168–1178.

Warnock, R.A., Askari, S., Butcher, E.C., and Andrian, U.H. von (1998). Molecular Mechanisms of Lymphocyte Homing to Peripheral Lymph Nodes. J Exp Med *187*, 205–216.

Waugh, C., Sinclair, L., Finlay, D., Bayascas, J.R., and Cantrell, D. (2009). Phosphoinositide (3,4,5)-Triphosphate Binding to Phosphoinositide-Dependent Kinase 1 Regulates a Protein Kinase B/Akt Signaling Threshold That Dictates T-Cell Migration, Not Proliferation. Molecular and Cellular Biology *29*, 5952–5962.

Weng, N., Araki, Y., and Subedi, K. (2012). The molecular basis of the memory T cell response: differential gene expression and its epigenetic regulation. Nature Reviews Immunology *12*, 306–315.

Whitmire, J.K., Eam, B., and Whitton, J.L. (2008). Tentative T Cells: Memory Cells Are Quick to Respond, but Slow to Divide. PLoS Pathog *4*, e1000041.

Wiehagen, K.R., Corbo, E., Schmidt, M., Shin, H., Wherry, E.J., and Maltzman, J.S. (2010). Loss of tonic T-cell receptor signals alters the generation but not the persistence of CD8+ memory T cells. Blood *116*, 5560–5570.

Wildin, R.S., Garvin, A.M., Pawar, S., Lewis, D.B., Abraham, K.M., Forbush, K.A., Ziegler, S.F., Allen, J.M., and Perlmutter, R.M. (1991). Developmental regulation of lck gene expression in T lymphocytes. J Exp Med *173*, 383–393.

Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2007). Effector and Memory CTL Differentiation. Annual Review of Immunology *25*, 171–192.

Wofford, J.A., Wieman, H.L., Jacobs, S.R., Zhao, Y., and Rathmell, J.C. (2008). IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. Blood *111*, 2101–2111.

Woods, Y.L., Rena, G., Morrice, N., Barthel, A., Becker, W., Guo, S., Unterman, T.G., and Cohen, P. (2001). The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site. Biochemical Journal *355*, 597.

Wu, J., and Lingrel, J.B. (2004). KLF2 inhibits Jurkat T leukemia cell growth via upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1. Oncogene *23*, 8088–8096.

Yajima, T., Nishimura, H., Ishimitsu, R., Watase, T., Busch, D.H., Pamer, E.G., Kuwano, H., and Yoshikai, Y. (2002). Overexpression of IL-15 In Vivo Increases Antigen-Driven Memory CD8+ T Cells Following a Microbe Exposure. J Immunol *168*, 1198–1203.

Yajima, T., Yoshihara, K., Nakazato, K., Kumabe, S., Koyasu, S., Sad, S., Shen, H., Kuwano, H., and Yoshikai, Y. (2006). IL-15 Regulates CD8+ T Cell Contraction during Primary Infection. J Immunol *176*, 507–515.

Yamagata, K., Daitoku, H., Takahashi, Y., Namiki, K., Hisatake, K., Kako, K., Mukai, H., Kasuya, Y., and Fukamizu, A. (2008). Arginine Methylation of FOXO Transcription Factors Inhibits Their Phosphorylation by Akt. Molecular Cell *32*, 221–231.

Yamamoto, M., Kondo, E., Takeuchi, M., Harashima, A., Otani, T., Tsuji-Takayama, K., Yamasaki, F., Kumon, H., Kibata, M., and Nakamura, S. (2011). miR-155, a Modulator of FOXO3a Protein Expression, Is Underexpressed and Cannot Be Upregulated by Stimulation of HOZOT, a Line of Multifunctional Treg. PLoS ONE *6*, e16841.

Yamamura, Y., Lee, W.L., Inoue, K., Ida, H., and Ito, Y. (2006). RUNX3 Cooperates with FoxO3a to Induce Apoptosis in Gastric Cancer Cells. J. Biol. Chem. *281*, 5267–5276.

Yan, L., Lavin, V.A., Moser, L.R., Cui, Q., Kanies, C., and Yang, E. (2008). PP2A Regulates the Pro-apoptotic Activity of FOXO1. J. Biol. Chem. *283*, 7411–7420.

Yang, J.-Y., Zong, C.S., Xia, W., Yamaguchi, H., Ding, Q., Xie, X., Lang, J.-Y., Lai, C.-C., Chang, C.-J., Huang, W.-C., et al. (2008). ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. Nature Cell Biology *10*, 138–148.

Yang, Y., Zhao, Y., Liao, W., Yang, J., Wu, L., Zheng, Z., Yu, Y., Zhou, W., Li, L., Feng, J., et al. (2009). Acetylation of FoxO1 Activates Bim Expression to Induce Apoptosis in Response to Histone Deacetylase Inhibitor Depsipeptide Treatment. Neoplasia (New York, N.Y.) *11*, 313.

Yoon, S., Molloy, M.J., Wu, M.P., Cowan, D.B., and Gussoni, E. (2007). C6ORF32 is upregulated during muscle cell differentiation and induces the formation of cellular filopodia. Developmental Biology *301*, 70–81.

You, H., Pellegrini, M., Tsuchihara, K., Yamamoto, K., Hacker, G., Erlacher, M., Villunger, A., and Mak, T.W. (2006). FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. J Exp Med *203*, 1657–1663.

Yuan, Z., Becker, E.B.E., Merlo, P., Yamada, T., DiBacco, S., Konishi, Y., Schaefer, E.M., and Bonni, A. (2008). Activation of FOXO1 by Cdk1 in Cycling Cells and Postmitotic Neurons. Science *319*, 1665–1668.

Yusuf, I., Zhu, X., Kharas, M.G., Chen, J., and Fruman, D.A. (2004). Optimal B-cell proliferation requires phosphoinositide 3-kinase–dependent inactivation of FOXO transcription factors. Blood *104*, 784–787.

Zaoui, K., Honoré, S., Isnardon, D., Braguer, D., and Badache, A. (2008). Memo–RhoA–mDia1 signaling controls microtubules, the actin network, and adhesion site formation in migrating cells. J Cell Biol *183*, 401–408.

Zhang, X., Srinivasan, S.V., and Lingrel, J.B. (2004). WWP1-dependent ubiquitination and degradation of the lung Krüppel-like factor, KLF2. Biochemical and Biophysical Research Communications *316*, 139–148.

Zhao, Y., Wang, Y., and Zhu, W.-G. (2011). Applications of Post-Translational Modifications of FoxO Family Proteins in Biological Functions. J Mol Cell Biol *3*, 276–282.

Zhao, Y., Yang, J., Liao, W., Liu, X., Zhang, H., Wang, S., Wang, D., Feng, J., Yu, L., and Zhu, W.-G. (2010). Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity. Nature Cell Biology *12*, 665–675.