



HAL
open science

Étude de la répartition asymétrique des molécules lytiques et métaboliques dans la division des lymphocytes T CD8+ humains

Romain Jugelé

► **To cite this version:**

Romain Jugelé. Étude de la répartition asymétrique des molécules lytiques et métaboliques dans la division des lymphocytes T CD8+ humains. Immunologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30285 . tel-02926303

HAL Id: tel-02926303

<https://theses.hal.science/tel-02926303v1>

Submitted on 31 Aug 2020

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

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

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Présentée et soutenue par

Romain Jugelé

Le 06 décembre 2018

Titre :

Étude de la répartition asymétrique des molécules lytiques et métaboliques dans la division des lymphocytes T CD8+ humains

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Immunologie

Unité de recherche :

INSERM U1037

Directeurs de Thèse :

Prof. Salvatore Valitutti

Sabina Mueller-Valitutti

Jury :

Prof. Laurent Camille

Président

Prof. Thome Miazza Margot

Rapporteur

Dr. Labarriere Nathalie

Rapporteur

Dr. Villalba Martin

Rapporteur

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, **Margot Thome-Miazza**, **Nathalie Labarriere**, **Camille Laurent** et **Martin Villalba** pour leur disponibilité, leurs relectures, leurs commentaires constructifs et l'évaluation de ce travail.

Il me reste ensuite tant de personnes à remercier, qui m'ont supporté et aidé tout au long de ces quatre années de travail dans les bons comme les mauvais moments.

Pour commencer, l'ensemble des membres de notre équipe 20 du CRCT.

Parmi les membres de cette équipe, je tiens tout d'abord à remercier **Salvatore** et **Sabina**, mes directeurs de thèse qui m'ont accompagné tout au long de ces quatre années de recherche. Merci à vous deux d'avoir toujours trouvé du temps pour discuter lorsque j'en éprouvais le besoin, que ce soit à propos du projet scientifique ou de mes (trop ?) nombreux questionnements personnels. Merci **Salvatore** d'avoir toujours pris en considération mes idées et aspirations que ce soit au sujet de l'orientation du projet ou de l'écriture de l'article. À propos de cet article, je tiens également à vous remercier pour votre enseignement et l'aide très précieuse que vous m'avez apportée au cours de sa rédaction. Pour finir, je tiens à vous dire que le temps que vous avez tenu à prendre pour la relecture de mon manuscrit a particulièrement compté pour moi. **Sabina**, je tiens particulièrement à te remercier pour l'ensemble de tes précieux conseils et l'aide technique que tu m'as apportée ces derniers mois pour me permettre de rester entièrement concentré sur l'écriture de ma thèse.

Pauline, merci pour absolument tout ! Tu n'imagines pas à quel point ta présence est une chance pour moi. Tout au long de ces quatre années, tu as été pour moi une référence scientifique et sociale. Je sais que tu aimes les choses concises alors je tacherai de ne pas faire une « Elias » (*marque déposée des discours trop long*) et me contenterai de te remercier pour ton incroyable sincérité, de m'avoir supporté dans les moments difficiles et à l'inverse de m'avoir mis des « taqués » quand j'abusais. Tu es et restera pour moi un modèle à suivre.

Merci également à toi, **Éric** pour l'ensemble de tes précieux conseils. Ils nous ont bien souvent permis de sortir d'impasse ou d'améliorer la rigueur scientifique du travail que nous construisions avec Salvatore, au point que le préfixe « super » Salvameeting fait désormais référence à ta présence au cours de la présentation. Je tiens également à te remercier pour le temps que tu m'as accordé et tout particulièrement lors de ta présence à ma première commission de thèse.

Marie pierre, nous n'avons pas encore eu l'occasion de passer à la partie BioMol du projet mais je sais que le cas échéant, même au sein d'une autre équipe, dans une autre ville, dans un autre pays, je pourrais compter sur tes conseils avisés.

Cyprien, actuellement le cadet de l'équipe, toujours présent pour partager ta bonne humeur. Tu es pour moi, à la fois un jeune homme d'une grande crédulité (*qui fait aussi ton charme*) et en même temps, le plus malin des moins de 30 ans de cette équipe, puisque tu es bien le seul à avoir pressenti le piège sournois que représente un engagement en thèse.

Charlotte, médecin et stagiaire (*c'est assez rare pour être noté*), tu nous fais tous profiter au quotidien de ta gentillesse et de ta bonne humeur (*différente de celle de Cyprien puisque tu ne partages heureusement pas son humour de piètre qualité*).

Il est temps de passer au noyau dur du laboratoire, la crème de la crème, les meilleurs parmi les meilleurs, l'élite de l'élite, je parle bien sûr des étudiants de notre équipe de champion :

Par qui commencer ? Laissons quelques points de suspens(e)ion **Yoan**, ton arrivée au laboratoire fût pour moi « Salva-trice ». Dès ta seconde venue au laboratoire, dans un style claquette-chaussette qui ne me laissa pas indifférent, j'ai senti qu'une belle amitié était sur le point de naître et diantre que cette thèse aurait pu être vide de sens en ton absence (*tu remarqueras, je l'espère, l'effort de style*). Je pense réellement (quoi que tu en penses) que tu laisseras une trace indélébile de ton

passage que ce soit par ta bonne humeur, tes histoires beaucoup trop longues, ou QUARTZY. Hormis ton manque de confiance en toi, ne change rien. Pour finir, je tiens à te remercier d'avoir pris ta première cuite pour fêter ce jour où je suis (peut-être) devenu docteur. (*Maintenant que c'est écrit tu ne peux plus reculer !*)

Delphine, j'avais tort, les chats, c'est adorable ... pas autant que les chiens ... mais il faut le reconnaître. À l'avenir je te propose qu'on s'affronte pour déterminer lequel de nos chats est le plus mignon (*il va sans dire que ton chat Malo n'a aucune chance face à l'indifférence charismatique de mon Pollen*).

Marine, meilleure des stagiaires (*et accessoirement la seule*), j'ai pris énormément de plaisir à travailler avec toi. Je te remercie infiniment pour l'aide que tu m'as apportée et le temps que tu as passé à traiter mes données (*même pendant tes vacances*). Après, on ne va pas se mentir, il te suffit d'appuyer sur un bouton puis ça tourne tout seul. Bien évidemment, je ne le pense pas mais il faut noter ta patience et ta détermination pour m'avoir supporté si longtemps. Je te souhaite plein de réussite pour la suite.

Edouard (Doudou pour les intimes), dernier arrivé dans la « Dream Team ». Tu as déjà tout d'un bon et grand scientifique, ce qui au passage me pose pas mal de soucis puisqu'en temps normal, on se débarrasse des remerciements à faire au plus novice en lui donnant plein de conseils basiques transmis de thésard en thésard. Note au passage que je ne te le dirais jamais directement, de peur de créer un monstre. Dans tous les cas, je te remercie pour l'ensemble de nos conversations et débats scientifiques au cours de nos « rare » pauses café (*on ne sait jamais, si **Éric** et **Salvatore** lisent jusqu'ici...*).

Liza, je tenais à finir avec toi. Je me suis souvent dit au cours de l'écriture de ma thèse que l'écriture de mes remerciements à ton égard serait d'une grande facilité. Visiblement, je me trompé et je manque de mots pour te dire toute l'estime que j'ai pour toi. Tu es une jeune femme qui brille aussi bien par tes qualités scientifiques que sociales et je suis persuadé que d'ici quelques années, le **docteur Fillali** sera un nom réputé dans la communauté scientifique. Je pourrais alors dire fièrement : « regardez tous ! C'est ma chouchoute ! J'lui ai tout appris ! »

Au-delà de « collègues » (*désolé **Yoan***), vous êtes tous devenu de précieux amis et j'espère que cette amitié durera au-delà des frontières.

Une mention spéciale à **Javier**, notre espagnol favori, pas étudiant, mais un peu comme tel dans nos cœurs, qui a été pour moi, au cours de toutes ces années, une véritable source d'inspiration. Au-delà de ton incroyable bonté, tu resteras le scientifique aux protocoles les plus imaginatifs.

Avoir une équipe et des amis soudés au sein de son environnement de travail est un élément indispensable à la réussite d'une thèse, cependant rien n'aurait pu être possible sans le soutien de ma famille.

Je tiens avant tous à remercier mes parents, **Isabelle** et **François**. Vous m'avez toujours soutenu au cours de ces longues années d'étude et m'avez très largement facilité la vie. Vous n'avez pas conscience à quel point ! J'estime avoir de la chance de vous avoir et j'ai conscience d'être un privilégié. Cette thèse, c'est avant tout à vous que je la dois et même si je ne vous le dis pas souvent, je pense que ce moment est opportun pour vous dire que je vous aime.

Je veux également remercier mes grands-parents, **Anne-Marie**, **Danielle** et **George** toujours présents et disponibles pour moi depuis mon plus jeune âge. Vous m'avez beaucoup inspiré au cours de toutes les périodes de ma vie. Je tiens également à remercier ici, **Martine** et **Tonton Daniel**, pour leur bienveillance, leur accueil et de m'avoir permis de passer tant de temps avec mes cousins **Gregory** et **Florian** lors de nos jeunes années.

Gregory, **Florian**, j'en profite pour vous remercier de tous ces moments qu'on a partagés. Ils font clairement partie des meilleurs moments de ma jeunesse (*je peux le dire maintenant que j'approche de la trentaine*). On a tous les trois bien changé depuis, mais j'ai toujours admiré ce mélange si particulier de « zenitude » et de liberté qui vous caractérisent. Je n'ai jamais réussi à l'égaliser (*ni même l'effleurer finalement*), mais je l'ai toujours trouvé très inspirante.

Merci également à **Jean-Christophe** et **Stéphane**, les héros de mon enfance et adolescence, qui m'ont appris, sûrement malgré eux, que le travail, c'est bien mais le plaisir c'est mieux. Merci également d'avoir organisé les cousinades. Ces moments festifs réunissant la plupart des membres de la famille me manquaient depuis longtemps et cela m'a fait beaucoup de bien de revoir tous ces visages après tant d'années. Parmi les « cousins », je veux particulièrement remercier **Stéphanie**, ma marraine, qui a toujours cru en moi. Merci d'avoir pris soin de moi quand j'étais jeune et d'avoir toujours été juste. Merci à toi, **Sandrine**, pour ta gentillesse, ta bienveillance, les pâtes à pizza et de m'avoir hébergé avec **Stéphane** à chacune de mes excursions à Bordeaux. D'ailleurs, merci à toi, **Stéphane**, d'avoir toujours répondu présent pour tester les pizzas que nous préparions avec **Gregory** avant même que nous ayons le temps de les manger ! Je pense également à **Fred** et **Jérôme**, pour leur incroyable gentillesse et accueil (les rares fois où je remonte) et leurs rhums arrangés qui tabassent toujours un peu plus d'année en année (*un remède de choix pour oublier les semaines de boulot difficile*).

Léa, ma filleule mais aussi ma cousine (*tes parents savent que j'y tiens*) et **Alexie**. Au-delà de mes cousins, je crois que je vous ai un peu considérés comme les frangins que je n'ai jamais eus. Je n'ai pas pu suivre votre évolution autant que je l'aurais voulu mais j'ai toute confiance en vous, en vos choix et dans les individus que vous deviendrez. Je vous aime fort et j'espère vous revoir très vite.

Un petit message pour **Patrice**, mon parrain, véritable modèle de gentillesse (*sûrement même trop gentil*), qui n'a jamais manqué de prendre des nouvelles lors de mes anniversaires. C'est vrai que je n'y porte que très peu d'importance à cette journée mais ça m'a toujours beaucoup touché que tu y penses alors que nous n'avons que très rarement l'occasion de nous voir.

Il y a la famille qu'on a et puis il y a celle qu'on choisit ou qui par chance, nous tombe dessus

Parmi celle qui nous tombe dessus sans trop prévenir, il y a toi, **Marie-Charlotte**, qui m'accompagne maintenant depuis deux longues (*très longues*) années. Le moins que l'on puisse dire, c'est qu'ensemble, on n'a pas vraiment le temps de s'ennuyer, tant tu arrives à me rendre barge. Je ne serais pas vraiment dire, de manière objective, qui de nous deux est le plus patient avec l'autre mais il est certain qu'au cours de cette thèse, ta présence fut extrêmement précieuse pour moi. Comme promis, je te remercie pour cette superbe figure I-16 magnifiquement Photoshopée mais contrairement à ce que tu penses, j'ai bien plus à dire. Je te remercie de m'avoir soutenu pendant ces longues périodes de travail (*bien que les deux jours de travail par semaine que tu me préconises ne soit pas en total accord avec la réalisation d'une thèse*), d'avoir été une compagne souvent tendre (*il faut savoir que Marie et Charlotte sont deux individualités différentes, d'où le « souvent »*) et de m'avoir systématiquement donné un coup de main dans les moments où j'en avais le plus besoin (*comme cette fois où tu as lacé mes chaussures quand j'avais une main hors-jeux*). Merci d'avoir été une compagne capable de faire des blagues bien plus mauvaises que les miennes (*petit taquet derrière la nuque*) et de m'avoir fait rire chaque jour (*ou presque*) de chaque semaine. Je profite de ces quelques lignes pour te dire que je suis fier du chemin que tu as parcouru depuis que l'on s'est rencontré. Tu as gagné en confiance, en détermination et je suis certain que tu iras au bout du projet que tu t'es construit.

Je tiens également à remercier, ta maman **Marie-Josée**, ta grand-mère **Josette**, ainsi que **Brigitte** et **Jacques** pour leur accueil chaleureux, leur incroyable gentillesse, leur générosité, leur grand cœur et leurs bons petits plats (*ça compte énormément pour le moral*). Mention spéciale au poulet rôti de Mamie Josette et aux gambas de l'oncle Jacques (*peut-être une marque à déposer pour une nouvelle recette ?*).

Dans la catégorie famille qu'on choisit, **Antoine** et **Elyes**, de loin les compagnons les plus solides qu'on puisse avoir. La catégorie d'amis que l'on peut voir une fois tous les cinq ans sans que rien ne change. Le genre de potes toujours présents, sur qui l'on peut compter en cas de pépin. Le genre d'amis avec qui on peut « try hard » *Super Smash Bros™* en pleine période de partiel, avec qui on peut finir ivre dans le coffre d'une voiture alors qu'un oral noté nous attend le lendemain matin et pourtant finir avec un 18/20. Bref, une équipe de champion comme on en voit rarement.

Dans la même catégorie, **Florian**, le grand frère (*peut-être une nouvelle émission de qualité ??*) spirituel, toujours présent dans les moments difficiles. Je ne te remercierai jamais assez d'avoir pris le

temps chaque mois de prendre des nouvelles de la thèse et surtout de m'avoir rincé si souvent sur une base régulière pour m'aider à faire redescendre la pression. Merci pour ton soutien, tes conseils, l'alcool, les anniversaires de qualité, le dépannage de ma voiture, ma batterie (de voiture) et bien plus encore.

Gregory (Lavi), on ne doit se voir qu'une à deux fois par an, et pourtant je tenais à vous remercier, toi, ton frère **Nicolas** ainsi que tes parents **Nathalie** et **Patrick**, pour votre accueil, votre gentillesse et tous ces moments qu'on a pu partager au long de ces quelques années. Ces moments, bien que trop rares, ont toujours été un vrai plaisir pour moi. **Greg**, si je ne devais garder qu'une seule phrase, un seul moment, ça serait probablement celui-ci : « *je vais enlever le plus gros* » et tu connais la suite.

La section qui suit est entièrement consacrée à la communauté des jeux vidéo (*d'où certains pseudonymes atypiques*). On peut le dire : les gens ne se trompent rarement autant que lorsqu'ils nous disent qu'on ne se crée pas des relations de qualité sur un ordinateur. Alors qu'on ne s'est encore jamais vu en vrai (*pour la majeure partie*), vous avez tous été importants dans la réussite de ce travail (*particulièrement pour le moral*).

Je tiens avant tout à signaler aux rapporteurs que les fautes d'orthographe restantes dans le manuscrit sont avant tout à cause **Karine (Blondie)**, **Valentin (CharlesDeGole)** et dans une moindre mesure, **Marie-Charlotte (MarieBanane)**. Plus sérieusement, je ne sais pas comment vous remercier d'avoir pris de votre temps pour corriger mon manuscrit, le tout en 12 heures montre en main pour la première révision (*on ne va pas se mentir, c'est large*), alors que nous ne nous sommes encore jamais rencontrés (*sauf MarieBanane bien évidemment*). Ça a énormément compté pour moi et accessoirement sauvé le ..., l'arrière-train.

Valentin (CharlesDeGole), j'aimerais profiter de ce moment pour passer ton CV d'expert linguistique (*On peut le dire, je crois*), mais puisque j'ai choisi de mettre en avant les pseudonymes, je pense que c'est mal engagé. Cependant, chers lecteurs, je vous prie de me croire (*label déposé*) qu'au-delà de ces odieux « ça s'écrit comme ça ! », cet homme brille par son sens de l'humour divers et varié. J'attends avec impatience de venir faire un feat lors de ton futur One-man-show.

Ké, ..., Kév, ..., Apo, merci d'être en couple avec **Karine (Blondie)** qui a donc pu relire ma thèse. Voilà, c'est tout, a+.

Merci pour ton incroyable gentillesse, les fous rires, les dépannages PC, les montages de qualité (*j'attends toujours ma page de couverture !*) et surtout, comment ne pas citer tous ces jeux offerts, auxquels nous ne nous connecterons jamais tant ils semblent d'une haute manufacture.

Gaëtan (Zobteck), également connu comme étant le **déserteur** qui abandonne les copains sur le champ de bataille. Effectivement, je profite peut-être de ce moment particulier pour t'annoncer qu'on aimerait bien te revoir un peu plus (*PUBG a clairement perdu toute sa saveur sans ton rire que je n'arrive toujours pas à associer à ta grosse barbe*). Si je devais te remercier pour une seule et unique chose, ça serait incontestablement pour ce petit ventilateur avec port USB qui fait clairement la différence chaque été (*il faut savoir que pour moi, une température supérieure à 25°C, c'est la canicule*).

Et je n'oublie pas les potes rencontrés au fils de toutes ces (trop) longues années d'étude éparpillés un peu partout, qui ont contribué à faire de ces années universitaires les (*certainement*) meilleures années de ma vie. **JK, Antoine, Julien, Thomas, Quentin**, à toute nos soirées de « travail » et de « préparation de poster » transformées en soirée bière, pizza, console. **Nathan** et **Yacine**, des années de master, toujours plus présents pour picoler que pour faire une heure entière en amphithéâtre.

Pour finir, cela semblera très certainement curieux (*mais on m'a dit « les remerciements, ça t'appartient »*, alors je fais bien ce que je veux), mais je tiens à remercier les auteurs des chaînes **Astronogeeek**, **Defakator** et **Hygiène mentale**, que j'ai découverts et qui m'ont accompagné au cours de l'écriture de ma thèse. Je tiens à saluer leur travail instructif qui contribue à l'éveil de l'esprit critique de chacun et qui devrait être une source d'inspiration pour tous ceux qui prendront le temps de consulter leur contenu.

Sommaire

Liste des abréviations	8
Liste des figures et tableaux	10
Introduction	
I) Activation des lymphocytes T	11
1) La reconnaissance de l'antigène	11
Le TCR, la présentation de l'antigène, l'interactions TCR-pCMH et la signalisation intracellulaire	
2) Engagement des molécules de costimulation	36
Interaction CD28-CD80/86, CTLA4-CD80/86 et CD40L-CD40	
3) Engagement des récepteurs aux cytokines	39
Structure et signalisations intracellulaires des récepteurs aux cytokines de type I et II	
II) Réponse primaire et hétérogénéité des lymphocytes T CD8⁺	44
1) Les lymphocytes T naïfs	44
Formation, durée de vie et migration au sein des OLS	
2) Les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs	50
Migration au sein des tissus, cytolysse, durée de vie et sous population	
3) Les lymphocytes T CD8⁺ mémoires	59
Les mémoires centraux et les mémoires effecteurs	
III) La différenciation effecteur/mémoire des lymphocytes T CD8⁺	61
1) Les acteurs moléculaires de la différenciation	61
Les facteurs de transcription	
2) Les voies de signalisation effecteur/mémoire	66
La force du signal TCR, les signaux cytokiniques et le métabolisme	
3) Modèles cellulaires de l'hétérogénéité	78
La différenciation linéaire, le potentiel régressif, la forces des signaux et la division asymétrique	
IV) Hétérogénéité des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs	89
1) Les sous-populations effectrices T CD8⁺	89
TC1, TC2, TC9, TC17 et Treg	
2) Hétérogénéité fonctionnelle des CTL, Tc1	91
V) Objectif du travail	94
Résultats/Publication	
Stochastic asymmetric repartition of lytic machinery in dividing human CD8⁺ T cells	97
<i>Imaging flow cytometry reveals uneven repartition of lytic machinery in dividing human CD8⁺ T cells</i>	99
<i>mTORC1 activity is unequally segregated in telophase</i>	100
<i>Asymmetric distribution of lytic machinery and of mTORC1 in clonal CTL</i>	101
<i>Uneven repartition of lytic machinery is not part of fate determining ACD</i>	102
<i>Asymmetrical repartition of CD107a⁺ vesicles resets at each division event and generates heterogeneous daughter cells</i>	102
Discussions	
I) Hétérogénéité fonctionnelle des cellules effectrices	130
II) Différenciation mémoire et effecteur	135
Perspectives	139
References bibliographiques	141

Liste des abréviations

ACD - asymmetric cell division	DN - double negative
ADN - acide désoxyribonucléique	DN - double negative
ADP - adenosine diphosphate	DP - double positive
AEP - asparagine endo-peptidase	DRips - produits défectueux des ribosomes
AKT (PKB) - protein kinase B	DRM - detergent resistance membrane
AP-1 - Activator protein 1	Eomes - Eomesodermin
ARN - acide ribonucléique	ERK - extracellular signal-regulated kinases
ATP - adenosine triphosphate	ETC - electron transport chain
BCL - B-cell lymphoma protein	ETPs - Early T-cell Precursor
BCL - B-cell lymphoma/leukemia	FAS/FAS-L - protéine transmembranaire appartenant à la famille du récepteur du TNF / FAS-Ligand
BLIMP1 - Beta-interferon gene positive regulatory domain I-binding factor	FOS - proto-oncogenic transcription factor of the bZIP family
Ca ²⁺ - ion calcium	Fox / FOXP - forkhead box / forkhead box Protein
CARMA1 - Caspase recruitment domain-containing protein 11 or CARD-containing MAGUK protein 1	FOXO - O class of the forkhead box class transcription factors
CCL - CC chemokine ligands	FRET - fluorescence resonance energy transfert
CCR - C-C chemokine receptor	FT - Facteur de transcription
CD - Cluster of differentiation	Fyn - Proto-oncogene tyrosine-protein kinase
CD94/NKG2a - family of C-type lectin receptors	G3P - glycéraldéhyde-3-phosphate
CDR - complimentarity determining regions	G6P - glucose-6-phosphate
CLIP - class II-associated invariant chain peptide	GILT - gamma interferon inducible lysosomal thiol reductase
CMH - complexe majeur d'histocompatibilité	HIF - Hypoxia Inducible Factors
CPA - cellule présentatrice d'antigènes	HLA - human leucocyte antigen
CREB - C-AMP Response Element-binding protein	ID2/ID3 - DNA-binding protein inhibitor ID-2 / DNA-binding protein inhibitor ID-3
CTL - cellule T cytotoxique	IFNs - interferons
CTLA4 - cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	Ig - Immunoglobulin
CXCL - The chemokine (C-X-C motif) ligand	IL - interleukin
CyTOF - cytometry by time-off flight	IP3 - Inositol trisphosphate
DAG - diacylglycérol	IRF - Interferon regulatory factor
DAPK1 - Death-associated protein kinase 1	ITAM - immunoreceptor tyrosine based activation motif
DC - cellule dendritique	JAK - Janus Kinase
Dlg - Discs large protein	

JNK - c-Jun N-terminal kinases

JUN - Transcription factor AP-1

Kd - constant de dissociation

KLRG1 - Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1

LAT - Linker for Activation of T-Cells

LB - lymphocyte B

LCK - lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

LFA-1 - Lymphocyte function-associated antigen 1

Lgl - Lethal giant larvae

LT - lymphocyte T

MALT -

MAPK/MKKs/MKKs - Mitogen-activated protein kinases / MAPK kinase / MKKs kinase

MTOC - microtubule organizing center

mTOR/mTORC - mammalian target of rapamycin / mammalian target of rapamycin complex

NAD⁺/NADH - nicotinamide adenine dinucleotide

NFAT - Nuclear factor of activated T-cells

NF-κB - nuclear factor-kappa B

Notch - family of Type-1 transmembrane proteins

OLS - organes lymphoïdes secondaires

ORAI - Calcium release-activated calcium channel protein 1

p38 - P38 mitogen-activated protein kinases

PAR - Partitioning protein

pCMH - CMH liant un peptide

PD/PD-L - Programmed death / Programmed death-ligand

PDK - pyruvate déshydrogénase kinase

PI3K - phosphoinositide 3-kinase

PIP2 - phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PKC - Protein kinase C

PLC - Phospholipase C

PNAd - Protein N-terminal asparagine amidohydrolase

PSGL1 - P-selectin glycoprotein ligand-1

Raf - Serine/threonine-protein kinase

RAG - Recombination activating genes

Ras - famille de protéine Ras – petite GTPases de la famille des protéines G monomériques

RE - reticulum endoplasmique

ROR - receptor tyrosine kinase-like orphan receptor

RSS - recombination signal sequence

S1PR1 - Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1

Scribble - Scaffold protein

SLP-76 - signal-transducing adaptor protein

SP - simple positive

SRC - Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src

STATs - Signal Transducers and Activators of Transcription

TAP - protéines de transport des antigènes

T-bet - T-box transcription factor

TCF - T-Cell-Factor

Tcm - central memory T-cell

TCR - T cell receptor

Teff - T effecteur

Tem - effector memory T-cell

TGF - transforming growth factor

Th1/Th2 - T helper 1 / T helper 2

TNF - tumor necrosis factor

TRAIL - tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand

Trm - resident memory T-cell

VLA - Very Late Antigen

ZAP-70 - Zeta Chain of T Cell Receptor Associated Protein Kinase 70

Liste des figures et tableaux

Figure I-1: Structure des récepteurs des cellules T	
Figure I-2: Réarrangement génétique pour le codage TCR	
Figure I-3: Interaction TCR-pCMH	
Figure I-4: Structure des molécules CMH/HLA	
Figure I-5: La présentation par les molécules du CMH-I	
Figure I-6: La présentation par les molécules du CMH-II	
Figure I-7: Modèle de la relecture cinétique	
Figure I-8: Modèle de l'engagement en série du TCR	
Figure I-9: Mise en place du signalosome	
Figure I-10: La voie de signalisation Calcique (Ca²⁺) dans les cellules immunitaires	
Figure I-11: La signalisation PKCθ	
Figure I-12: Etat d'activation, modulé par les co-recepteur CD28 et CTLA-4	
Figure I-13: Composition, redondance et partage des chaînes protéiques des récepteurs aux cytokines	
Figure I-14: Signalisation intracellulaire, JAK-STAT	
Figure I-15: Maturation thymique des lymphocytes T (CD4+ et CD8+)	
Figure I-16: Entrée des lymphocytes T naïfs dans le ganglion lymphatique	
Figure I-17: Les mécanismes de cytotoxicité des CTL	
Figure I-18: Balance transcriptionnelle effecteur vs mémoire	
Figure I-19: La phosphorylation-oxydative	
Figure I-20: La glycolyse aérobie	
Figure I-21: L'activité des voies métaboliques est dépendante de la signalisation TCR	
Figure I-22: Modèle de différenciation des lymphocytes T naïfs en T effecteurs et T mémoires	
Figure I-23: Représentation 3D en CyTOF du continuum de différenciation des lymphocytes T	
Figure D-1: Distribution de T-bet et c-Myc entre les deux futures cellules filles au cours de la télophase de cellules naïves	
Tableau 1: Hiérarchie des voies de mort cellulaire dépendantes des granzymes	
Tableau 2 : Proteines de polarités et phénotypes associés	

Introduction

I) Activation des lymphocytes T

L'activation des lymphocytes T est une étape primordiale de la mise en place de l'immunité adaptative, principalement dépendante de la reconnaissance de l'antigène par le TCR, de la signalisation des molécules de costimulation ainsi que par le microenvironnement riche en facteurs capables de moduler la réponse des lymphocytes T.

1) La reconnaissance de l'antigène

La reconnaissance de l'antigène est assurée par le TCR, un récepteur transmembranaire capable de reconnaître spécifiquement une molécule antigénique, puis d'initier une signalisation intracellulaire indispensable à l'activation, la prolifération et la différenciation du lymphocyte. Le TCR n'étant pas capable de capter et d'identifier un antigène libre, l'activation d'un lymphocyte T nécessite l'intervention d'une tierce cellule, appelée CPA (cellule présentatrice d'antigène), capable de présenter l'antigène sur ses molécules de CMH (complexe majeur d'histocompatibilité). Au-delà de présenter l'antigène, le CMH est également reconnu par les molécules de costimulation CD4⁺ ou CD8⁺ qui stabilisent l'interaction et participent à la transduction du signal avec le CD3^{1,2}.

1) 1) Le TCR

1) 1)1) Structure

Les lymphocytes T (alpha/beta) reconnaissent les antigènes peptiques présentés dans un contexte CMH-peptide (pCMH) via leur TCR. Il s'agit d'un récepteur de la superfamille des immunoglobulines (Ig), constitué de deux chaînes polypeptidiques glycosylées transmembranaires (alpha et beta) liées par un pont disulfure^{3,4} (**Figure I-1**). Chaque chaîne comprend une région extracellulaire variable (V) et constante (C), une région transmembranaire indispensable à l'ancrage du TCR à la membrane cellulaire et un domaine intracytoplasmique court.

- Régions variables (V)

Il est connu que chaque lymphocyte T d'un individu est capable de reconnaître et de répondre à la reconnaissance d'une structure antigénique différente, permettant ainsi

la mise en place d'une réponse adaptée et spécifique face à un large panel d'antigènes et de pathogènes. Cette propriété est assurée par l'association de la région variable de la chaîne alpha et de la chaîne beta qui ensemble constituent un paratope unique, capable de reconnaître une structure antigénique unique. La variabilité du TCR est concentrée dans trois zones dites hypervariables : CDR1, CDR2 et CDR3 (complementarity Determining Regions). Des études de cristallographie montrent que les régions CDR sont exposées sur la face externe du TCR pour favoriser les interactions avec le pCMH. Les régions CDR1 et 2 semblent se lier majoritairement à la molécule CMH, alors que les régions CDR3 présentant le plus de variabilité se lient préférentiellement au peptide antigénique^{5,6}.

- **Régions constantes (C)**

La région constante est similaire entre tous les TCR de tous les lymphocytes. Ce domaine permet le maintien de la structure du TCR. Elle contient des résidus cystéine permettant la formation de ponts disulfures stables entre chaque chaîne alpha et beta⁷.

Chaque chaîne composant le TCR comprend un domaine transmembranaire hydrophobe indispensable à l'ancrage du TCR au niveau de la membrane cellulaire ainsi qu'une portion intracytoplasmique. Cette région intracytoplasmique constituée de 4 à 12 acides aminés est trop courte pour permettre la transduction du signal TCR, cependant la région constante est composée d'acides aminés chargés positivement, capables d'engager une liaison stable avec les acides aminés chargés négativement du complexe CD3 et de l'homodimère ζ/ζ , transducteur du signal TCR^{4,8,9}.

- **CD3 et homodimère ζ/ζ**

Le CD3 et l'homodimère ζ/ζ sont des complexes protéiques qui ne font pas parti, à proprement parler, du TCR. Cependant, leurs expressions et interactions avec le TCR sont indispensables à la transduction du signal intracellulaire suite à la reconnaissance d'un pCMH.

Le CD3 est un complexe composé de l'association de trois chaînes polypeptidiques (une chaîne CD3 γ , une chaîne CD3 δ , une chaîne CD3 ϵ), non polymorphiques qui s'associent en hétérodimère CD3 γ /CD3 ϵ et CD3 δ /CD3 ϵ . Chacune de ces chaînes comprend un domaine de type Ig dans sa portion extracellulaire et un motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) sur son domaine intracellulaire (de 45 à 55 acides aminés).

L'homodimère ζ/ζ est composé de deux chaînes polypeptidiques identiques qui se distinguent des chaînes α/β du TCR et des chaînes du complexe CD3, par l'expression d'un domaine extracellulaire court de neuf acides aminés, compensé par l'expression d'un domaine intracellulaire long de 113 acides aminés possédant trois motifs ITAM.

Aussi, le récepteur activateur TCR/CD3/ ζ/ζ , exprimé par les lymphocytes T, est formé de huit chaînes polypeptidiques contenant en tout dix motifs ITAM, riches en tyrosines dont la phosphorylation par des tyrosines kinases permet la transduction du signal¹⁰. L'association de ces chaînes est dépendante d'interaction non-covalente dépendante de domaine transmembranaire. Alors que les chaînes α et β du TCR expriment des acides aminés aboutissant à la génération d'une charge positive, les régions transmembranaires des chaînes CD3 et ζ expriment une charge négative, favorisant leur interaction. En parallèle, une étude démontre l'interaction directe entre la chaîne β du TCR et la chaîne CD3 γ et suggère fortement des interactions similaires entre la chaîne α du TCR et CD3 δ . Les chaînes ζ quant à elles sont capables de s'associer indépendamment avec les chaînes α et β du TCR. Cependant, en l'absence du complexe CD3, il a pu être montré que l'interaction entre le TCR et l'homodimère ζ/ζ est instable¹¹.

Au cours de l'activation d'un lymphocyte T, l'engagement du TCR avec le CD3 et l'homodimère ζ/ζ est donc associé à la transduction du signal TCR via la phosphorylation des motifs ITAM. Cependant, des études démontrent également que les chaînes CD3 et l'homodimère ζ/ζ jouent également un rôle-clef dans la stabilisation du TCR exprimé à la surface cellulaire^{12,15}.

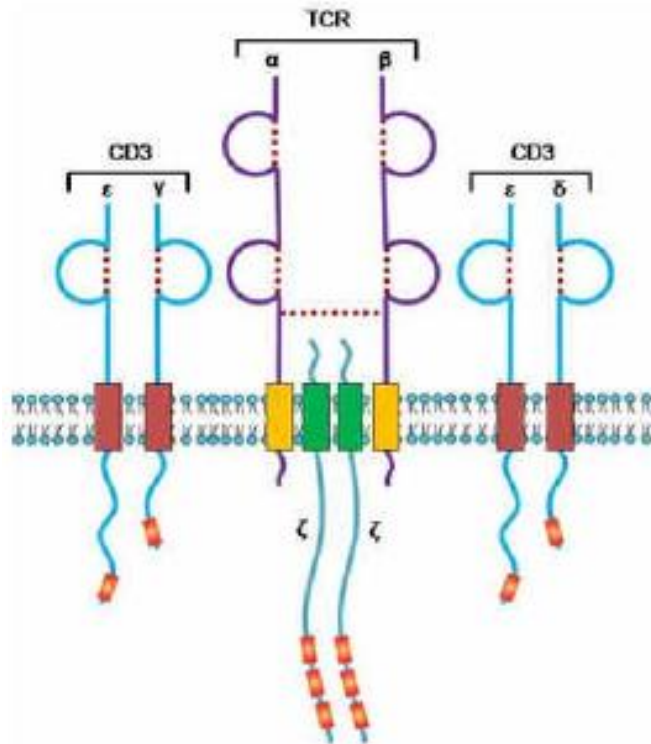


Figure I-1. Structure des récepteurs des cellules T. Le TCR se compose de deux chaînes, α et β , et forme un complexe avec les molécules de signalisation CD3 composées des complexes CD3 γ/ϵ , CD3 ϵ/δ et l'homodimère ζ/ζ . Ces chaînes polypeptidiques contiennent un à trois motifs ITAM de 14 à 16 acides aminés dans leur région cytoplasmique. Chaque chaîne ζ contenant trois motifs ITAM joue un rôle central dans la transduction du signal TCR. Repris et adapté de J. Gascoigne NR Nat Rev 2008¹⁶.

1) 1)2) Organisation des gènes du TCR

Hormis quelques exceptions^{17,19}, chaque lymphocyte T exprime un type unique de TCR à sa surface, spécifique d'un seul antigène. Aussi, l'efficacité de la réponse repose sur la capacité de l'organisme à générer une grande diversité de TCR différents capables de reconnaître l'ensemble des peptides antigéniques. Cette diversité du TCR est réalisée par un mécanisme de réarrangement génique aléatoire au niveau du locus codant pour la région variable des chaînes α et β du TCR.

L'expression du TCR est sous le contrôle de deux locus codant respectivement pour la chaîne α et β du TCR. La chaîne α est composée de nombreux fragments V (Variable), J (Joining) et C (Contant). En plus des segments V, J et C, le locus codant la chaîne β intègre deux domaines D (Diversity). La région variable définissant la spécificité du TCR est contrôlée via un réarrangement des domaines VJ de la chaîne α et VDJ de la chaîne β . Chaque domaine VJ ou VDJ est associé à un domaine C codant uniquement les polypeptides transmembranaires du TCR. On distingue un seul gène

codant pour la région constante de la chaîne α et deux gènes codant pour cette même région au sein de la chaîne β . L'ensemble de ces gènes étroitement homologues codent pour des produits similaires dont nous ne connaissons pour l'heure aucune différence fonctionnelle.

Chacun des segments qui composent les loci suivent une structure en cascade, ordonnée et répétée. Dans le sens de lecture du locus β , on observe en premier lieu la présence d'un segment V, d'un segment D puis d'un ensemble de segment J. Chaque segment V étant suivi de deux segments D, on observe la structure suivante : **V,D,J(x),C,D,J(x),C, V,...**

Le réarrangement génique est réalisé au niveau des séquences RSS (Recombination Signal Sequence), localisé entre chacun des segments V, D, J. Il s'agit de séquences palindromiques, composées de huit ou neuf paires de bases qui pourront servir d'ancrage à la machinerie RAG-1/RAG-1 recombinaison^{20,21}. Celle-ci permettra la coupure et le réarrangement du gène pour ne sélectionner qu'un seul segment V, D et J (chaîne β) ou V et J (chaîne α).

Le réarrangement génique de la chaîne β est réalisé en premier, lors de la sélection thymique des thymocytes DN (thymocyte CD4 et CD8 double négatif). Au cours de ce processus, on observe dans un premier temps la formation du segment DJ via la sélection et le regroupement d'un segment D et d'un segment J. Un second évènement de recombinaison entre le fragment DJ et le fragment V auquel il est associé permet la formation du domaine variable VDJ. À ce stade, la recombinaison génétique induit l'élimination de l'ensemble des segments localisés dans l'intervalle VDJ sélectionné, les introns sont éliminés et la translation en ARNm permet la synthèse primaire de la chaîne β du TCR. À la surface cellulaire, la chaîne β s'associe alors avec un substitut invariant de la chaîne α . Cette association forme un pre-TCR qui est alors testé par les cellules environnantes. Si le réarrangement de la chaîne β est fonctionnelle, le thymocyte prolifère formant ainsi un ensemble de cellule au pre-TCR identique. Chacune de ces cellules identiques réorganise alors son locus codant pour la chaîne α indépendamment les unes des autres. En suivant le même processus que pour la chaîne β , un segment se réarrange directement avec un segment J formant le fragment VJ. Suite à la transcription et la traduction de l'ARNm, la chaîne α est exprimée à la surface cellulaire et s'associe avec la chaîne β pour former le TCR final. **(Figure I-2)**

Théoriquement, ce processus de recombinaison génétique permet la formation de plus de 10^{15} variants du TCR. Cependant, la région variable du TCR étant formée via des recombinaisons aléatoires, certains lymphocytes T acquièrent la capacité de reconnaître et de réagir face aux peptides naturellement exprimés par l'organisme. Ces lymphocytes T, appelés « auto-réactifs », sont reconnus et neutralisés au niveau du thymus lors des sélections positives et négatives ou réprimés par la tolérance périphérique lors de leur introduction dans la voie sanguine. Il est estimé que le répertoire TCR des lymphocytes T humains retrouvés au niveau périphérique est d'environ 2.10^7 ²².

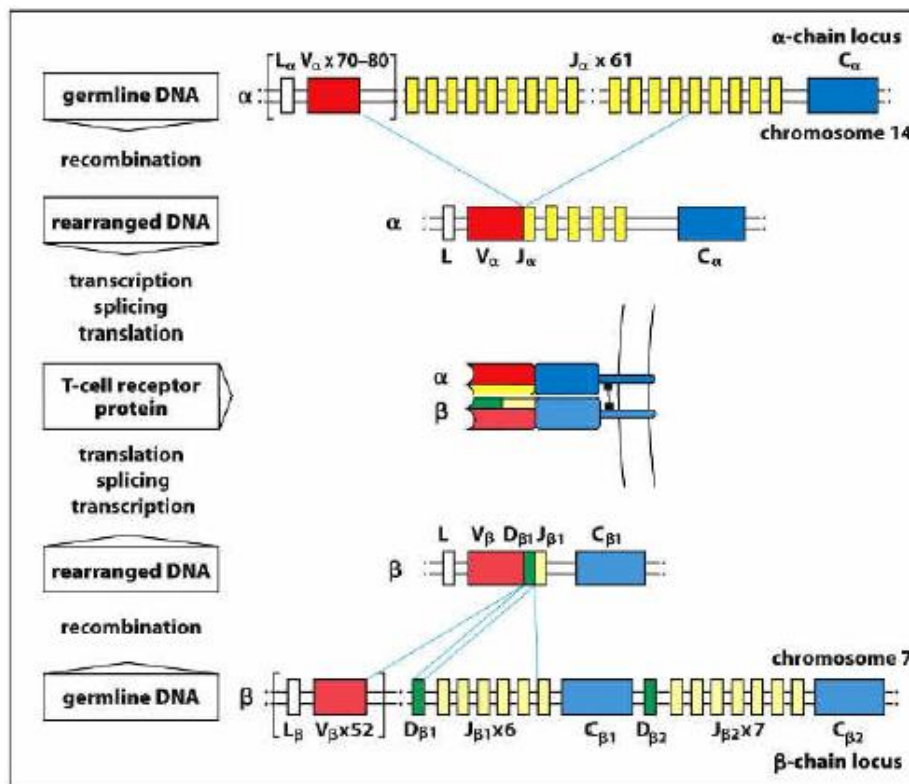


Figure I-2. Réarrangement génétique pour le codage TCR. La formation du TCR est initiée par le réarrangement des gènes de la chaîne β composé des fragments V, D, J et C pendant la sélection thymique. Le réarrangement génétique commence avec la sélection d'un segment D et d'un segment J qui s'associent en excluant l'ensemble des autres segments J. La formation du segment DJ sélectionné est directement associée avec le recrutement d'un segment V et d'un segment C. À ce point, tous les segments de gènes situés dans les intervalles du complexe V-D-J sélectionné sont éliminés. Suite à l'élimination des introns, la traduction de l'ARN messager génère la chaîne TCR β -chain. Cette protéine est alors associée à une chaîne invariable pour former le pré-TCR, exprimé sur la surface des thymocytes DN (Double Négatif : thymocytes : thymocytes n'exprimant ni les molécules CD4 ni les molécules CD8 sur leur surface). Si le réarrangement pré-TCR est fonctionnel et permet la prolifération cellulaire des DN, le gène de la chaîne α subit une étape de réarrangement aboutissant à la formation d'un TCR fonctionnel unique. Un segment V se réarrange avec un segment J, avant d'être transcrit et traduit en chaîne α effective. Repris de l'immunobiology Murphy et al. 2012²³

1) 2) Présentation de l'antigène aux lymphocytes T

Comme décrit précédemment, la reconnaissance d'un peptide antigénique par le TCR d'un lymphocyte T nécessite son interaction et sa présentation sur une molécule du CMH exprimée à la surface des cellules de l'organisme.

1) 2)1) Le CMH

On distingue le CMH de classe I exprimé par l'ensemble de cellules nucléées qui présente les peptides d'origine intracellulaire et le CMH de classe II, exprimé uniquement par les CPA telles que les cellules dendritiques, les macrophages ainsi que les lymphocytes B actifs qui présentent les peptides d'origine extracellulaire. De manière intéressante, on observe que les peptides présentés par le CMH de classe I sont reconnus et activent spécifiquement les lymphocytes T CD8⁺, alors que les peptides présentés par le CMH de classe II activent spécifiquement les lymphocytes T CD4⁺. Cette reconnaissance spécifique est directement liée aux molécules CD8 et CD4, capables respectivement de reconnaître un domaine du CMHI et CMHII²⁴. Cette interaction permet la stabilisation du complexe TCR-pCMH ainsi que la transduction du signal TCR au sein des lymphocytes T²⁵⁻²⁶ (**Figure I-3**).

1) 2)1)1) Structure

Chaque molécule de CMH a pour rôle la formation d'une niche permettant la fixation et la présentation de l'ensemble des antigènes peptidiques ainsi que la formation d'un domaine reconnu par le corécepteur CD4 ou CD8 exprimé à la surface des lymphocytes T. La formation de la niche par les molécules de CMH de classe I est assurée par une chaîne polypeptidique unique de type α . Elle se compose de trois domaines protéiques $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ qui s'associent avec une microglobuline $\beta 2$. Alors que la niche peptidique est assurée par l'interaction des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$, la reconnaissance du CMH par la molécule CD8⁺ est assurée par le domaine $\alpha 3$. Aussi, la microglobuline a pour rôle le maintien structurel du récepteur CMH.

Le CMH de classe II est quant à lui composé de deux chaînes protéiques α et β formant 4 domaines protéiques $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$. La niche de l'antigène est assurée par l'interaction des domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ alors que la reconnaissance du CMH par le CD4 est assurée par le domaine $\beta 2$ de la chaîne β ^{27,28} (**Figure I-4**).

1) 2)1)2) Le gène CMH

Le CMH, également appelé système HLA (Human Leucocyte Antigens), chez l'homme est un ensemble de plus de 200 gènes localisés sur le chromosome 6. Ils s'organisent en régions codant pour trois classes de molécules CMH/HLA. Ces molécules de classe I, II et III codent pour différentes protéines impliquées dans de nombreuses fonctions de l'immunité. On distingue les gènes de classe III qui codent des protéines spécialisées dans des fonctions telles que la sécrétion de cytokine ou la cascade du complément des gènes de classe I et II impliquées dans la présentation antigénique.

Les gènes de classe I (codant le CMHI) et de classe II (codant le CMHII) possèdent 3 caractéristiques communes appelées polygénéicité, codominance et polymorphisme²⁹.

La polygénéicité fait référence à la variabilité des chaînes peptidiques α et α/β respectivement exprimées par les molécules de CMH de classe I et II. Cette variabilité est le reflet de l'existence de trois gènes codant chacun indépendamment les uns des autres pour un variant de la chaîne α . On distingue donc chez l'homme le HLA-A, HLA-B, HLA-C parmi le CMHI et le HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR parmi le CMHII. Bien que chaque CMH soit capable de fixer et présenter un grand nombre de peptides, la polygénéicité permet d'élargir le panel d'interactions possibles permettant ainsi la reconnaissance de l'ensemble des peptides exprimés.

La codominance fait référence à la capacité de certaines cellules à pouvoir exprimer deux allèles de manière équivalente. Dans le cas des gènes du CMH, les cellules exprimant deux allèles codant pour une chaîne α différente seront capables d'exprimer deux types de CMHI et/ou II. Cette caractéristique permet à une cellule unique d'augmenter sa spécificité de présentation.

Pour finir, le polymorphisme fait référence à l'existence d'une grande diversité d'allèles, de chacun de ces gènes au sein d'une même population. Cette caractéristique n'apporte aucun avantage individuel. Cependant, elle permet une fois encore de multiplier les capacités de réponses aux différents profils de pathogène au sein d'une population. Ce mécanisme agit comme une signature spécifique à chaque individu complexifiant de ce fait les mécanismes de greffe²⁸.

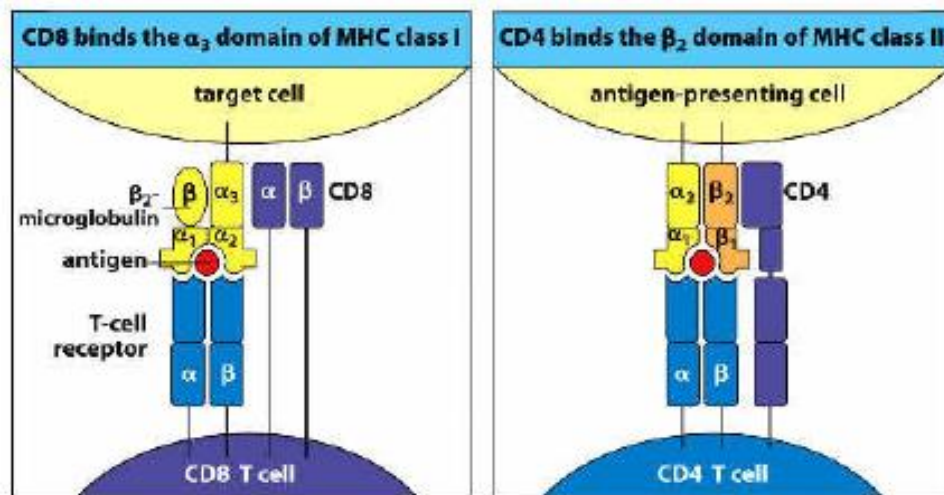


Figure I-3. Interaction TCR-pCMH. Le peptide complexe est présenté par le CMH dans la poche du CMH interagissant avec les domaines CDR (Complementarity Determining Region exposé) du TCR. Au cours de cette interaction, le complexe TCR-pCMH est stabilisé par le CD8 ou le CD4, capable respectivement de reconnaître la fraction α_3 du CMH de classe I et β_2 du CMH de classe II. Adapté de l'immunobiology Murphy 2012²³.

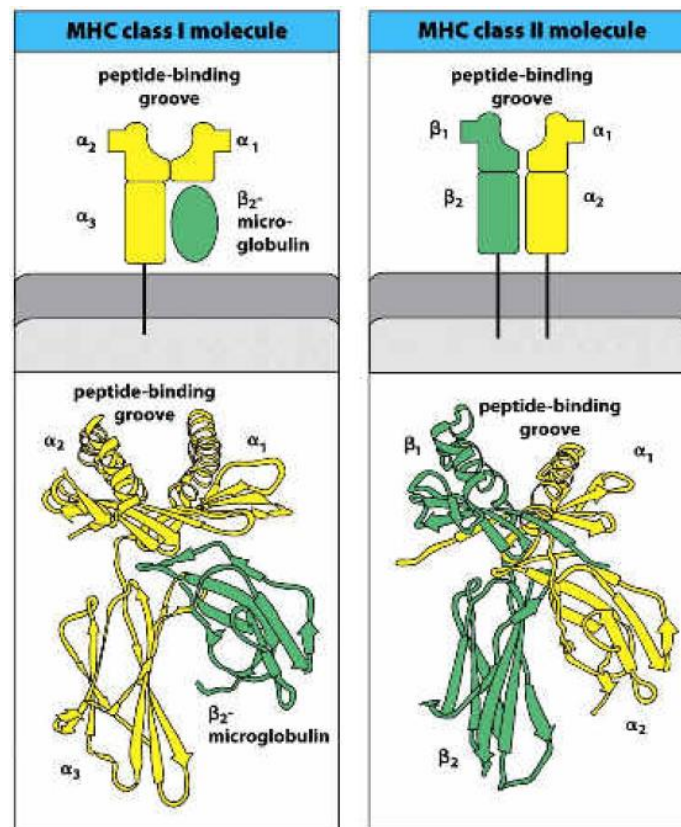


Figure I-4. Structure des molécules CMH/HLA. A) Le CMH de classe I est composé d'une chaîne de 45 kDa à trois domaines α (α_1 , α_2 et α_3 similaires à ceux des immunoglobulines) associés à la β_2 -microglobuline. Les domaines α_1 et α_2 forment une poche qui constitue le site où les antigènes peptidiques se lient à la molécule CMH. B) Les CMH de classe II sont des molécules hétérodimériques, composées de deux glycoprotéines transmembranaires : une chaîne α de 30-32 kDa associée de façon non-covalente avec une chaîne β de 27-29 kDa. Le site de liaison à l'antigène est formé par l'interaction des domaines α_1 et β_1 des chaînes α et β respectivement. Repris de l'immunobiology Murphy et al. 2012²³

1) 2)2) Apprêtement et présentation peptidique

L'apprêtement correspond à l'ensemble des étapes qui permettent à une cellule de présenter les peptides antigéniques sur les molécules de CMH en surface. Ce processus biologique comprend donc 3 étapes successives : la fragmentation de protéines antigéniques (protéolyse), l'association des fragments générés avec une molécule de CMH et l'expression du complexe pCMH à la surface des cellules présentatrices.

- Présentation des antigènes endogènes sur les molécules de classe I du CMH

Les molécules de classe I présentent des protéines endogènes, produites dans le cytoplasme de la cellule au cours du renouvellement des protéines cellulaires. La protéolyse des protéines en fin de vie (« retraitées ») ou des DRiPS (defective ribosomal products)^{30,31} en antigène peptidique est assurée par le protéasome, un complexe multiprotéique dont l'expression de certaines sous-unités est assurée par des gènes inductibles tels que certains gènes cibles de l'IFN γ , ainsi que par l'intervention d'aminoprotéase. Ce processus dépendant de l'ATP et de l'ubiquitination des protéines permet la formation de nombreux peptides au sein du cytosol capables de migrer vers le réticulum endoplasmique (RE) via le canal TAP³².

Les molécules de CMH sont synthétisées et stockées dans le RE. Suite à la formation des peptides et leur migration au sein du RE, les molécules de CMH de classe I dont le site de fixation à l'antigène est libre, captent les peptides, traversent l'appareil de Golgi, migrent jusqu'à la membrane cytoplasmique, puis sont exposées à la surface cellulaire (**Figure I-5**) et scannés par les lymphocytes T CD8⁺.

Dans le cas d'une infection bactérienne intracellulaire, virale ou de mutations tumorales, les protéines intracellulaires spécifiques de la pathologie, fixées et présentées par le CMH de classe I sont reconnues par les lymphocytes T CD8⁺ qui s'activent et réalisent le processus de cytolyse.

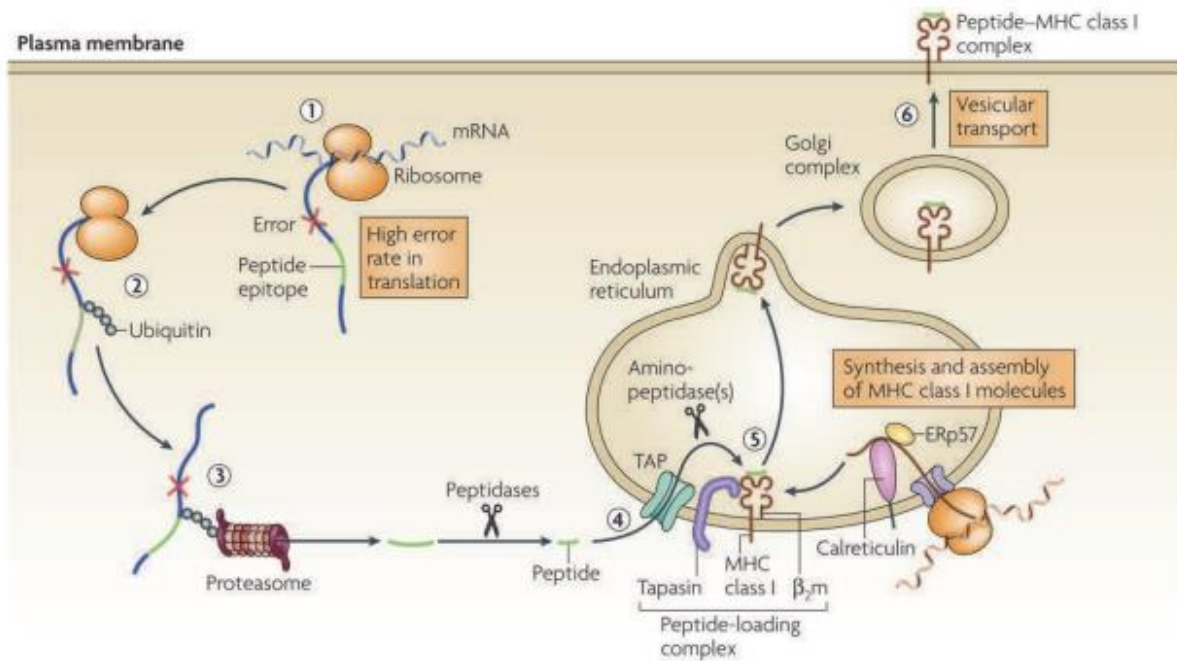


Figure I-5. La présentation par les molécules du CMH-I. Les protéines sont ubiquitinylées et reconnues par le protéasome qui, en association avec l'action des peptidases forment des peptides de tailles optimales à l'apprêtement sur le CMH de classe I. Les peptides ainsi formés pénètrent dans le RE via le canal TAP et sont associés avec le CMH de classe I via le « peptide-loading complex » qui comprend le CMH I et la Tapasin. Une fois le peptide associé, le complexe pCMH est transporté de l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane cytoplasmique où il est présenté au lymphocyte T CD8⁺. Repris de Vya JM et al. Nature Reviews Immunology 2008 ³³

- Présentation des antigènes exogènes sur les molécules de classe II du CMH

Les molécules de classe II présentant des protéines exogènes sont assemblées au sein du RE par l'association des chaînes α et β ainsi que de la protéine accessoire Ii³⁴, une chaîne invariante qui bloque l'accès au site de fixation peptidique^{35,36}, stabilise le complexe CMH II³⁷ et dicte sa migration vers les endosomes tardifs (MIIC/CIIV)^{36,38}. Une fois dans ces endosomes, les protéases telles qu'AEP (Asparagine Endopeptidase) et les cathepsines S et L clivent la chaîne invariante Ii et ne laissent que le domaine CLIP au niveau du site de fixation du peptide antigénique.

Pour être efficacement dégradées et permettre la génération de peptides antigéniques, les protéines internalisées par les cellules présentatrices doivent être dénaturées. La protéine endosomale GILT (gamma interferon inducible lysosomal thiol reductase), constitutivement exprimée par les APC et surexprimée en présence d'IFN γ , est capable, à pH acide, de dégrader les ponts disulfures de la plupart des protéines³⁹. La fusion des phagolysosome avec les endosomes tardifs, au pH acide et contenant de

nombreuses enzymes protéolytiques, permettent la formation des peptides antigéniques présentables par le CMH II^{40,41}.

À ce stade, la colocalisation entre HLA-DM et les molécules du CMH II dans les MIIC⁴² facilite l'échange entre le fragment CLIP et des peptides antigéniques issus de la dégradation des antigènes internalisés⁴³⁻⁴⁵. Il se forme ainsi les pCMH qui seront présentés en surface par exocytose. (**Figure I-6**)

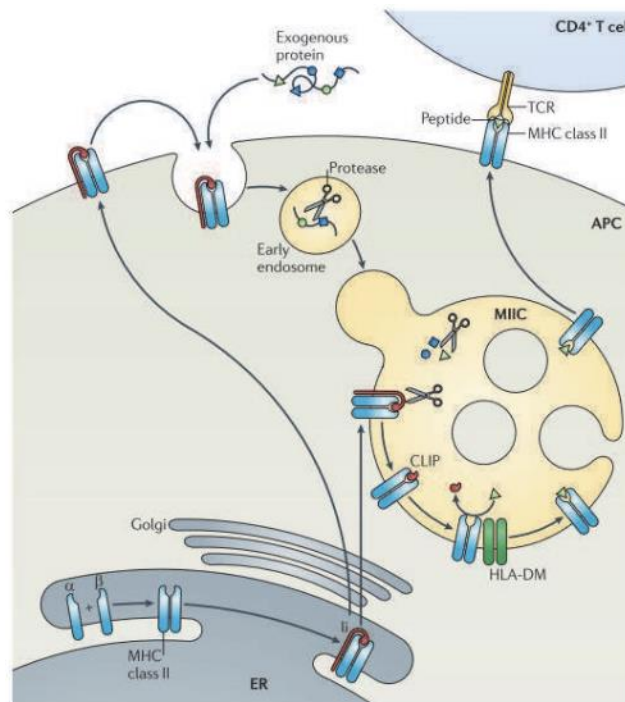


Figure I-6. La présentation par les molécules du CMH-II. Le CMH de classe II est constitué des chaînes α , β et de la chaîne invariante li qui s'assemblent dans le RE. Le complexe formé est transporté de l'appareil de Golgi jusqu'aux endosomes terminaux MIIC/CIIV au riche en protéase. En milieu acide, les protéases clivent la chaîne li, ne laissant que le domaine CLIP en contact avec le site de fixation de l'antigène. Via l'association avec HLA-DM et la présence de peptides antigéniques, dégradés par des protéases aux seins des endosomes précoces qui fusionnent avec les endosomes tardifs, le domaine CLIP est échangé avec un peptide antigénique. Pour finir, les pCMH de classe II migrent en surface et sont exposés au lymphocyte T CD4+. Repris de Neefjes et al., Nature Reviews Immunology 2011 ⁴⁶.

- La cross présentation, indispensable à la primo activation des lymphocytes T CD8⁺

L'ensemble des cellules nucléées de l'organisme exprime le CMH de classe I et sont donc capables d'activer les lymphocytes T CD8⁺. Cependant, les lymphocytes T naïfs, n'ayant jamais rencontrés leur antigène activateur, sont stockés au sein des organes lymphoïdes secondaires et ne sont donc pas capables de rentrer directement en

contact avec les cellules infectieuses localisées dans d'autres tissus. Pour leur première rencontre avec l'antigène, les lymphocytes comptent sur les CPA professionnelles, des cellules capables de capturer de façon exogène des antigènes, de les apprêter, puis de migrer au sein des organes lymphoïdes secondaires. Ces cellules capturant l'antigène de manière exogène expriment naturellement les peptides antigéniques sur leur CMH de classe II, aboutissant à l'activation des lymphocytes T CD4⁺. Cependant, l'activation des lymphocytes T CD8⁺ étant spécifique à la présentation sur le CMH de classe I, les CPA professionnelles réalisent la cross présentation, un mécanisme permettant la présentation d'antigènes exogènes sur les molécules de CMH de classe I. Classiquement, les antigènes exogènes présents au sein du phagosome sont redirigés vers le cytosol où ils sont dégradés par le protéasome, puis comme lors de la présentation des antigènes endogènes, ils intègrent le RE ou le phagosome par le transporteur TAP, avant d'être associés avec le CMH de classe I.

Aussi, la cross présentation ou présentation croisée, est essentielle à la présentation d'antigènes qui ne sont pas synthétisés directement par les DC et pour l'établissement d'une réponse CD8⁺ antivirale et antitumorale^{31,32}.

1) 3) Interaction TCR-pCMH

De manière générale, l'engagement du TCR dans un complexe TCR-pCMH correspond aux premiers signaux activateurs d'un lymphocyte T. Cependant, cette interaction ne se limite pas à un signal de tout ou rien mais est capable de moduler l'activation et l'activité d'un lymphocyte via des mécanismes d'interactions complexes.

1) 3)1) L'affinité de contact

Dans le cas du lymphocyte T, l'affinité de contact correspond à la constante d'équilibre qui régit l'interaction entre le TCR et le pCMH. Aussi, plus un TCR sera affin pour son peptide, plus la constante de dissociation (Kd) sera faible et plus le temps de contact sera prolongé entre le TCR et le CMH. De nombreuses études cellulaires démontrent que l'activation totale des cellules T nécessite un signal maintenu dans le temps supposant une signalisation soutenue entre le lymphocyte et sa cible⁴⁷⁻⁴⁹. Paradoxalement, d'autres études basées sur la mesure des affinités TCR-pCMH en solution révèlent des affinités ainsi que des temps de contact faibles entre le pCMH présenté et le TCR du lymphocyte^{50,51}. Plus récemment, l'utilisation des techniques de

microscopie à haute résolution et de FRET (fluorescence resonance energy transfer) permettant l'analyse approfondie d'un seul TCR fluorescent avec son ligand pCMH, **Huppa et al.** a démontré une augmentation de la cinétique d'interaction ainsi que de l'affinité entre un TCR et son pCMH lors de rencontre in situ comparée aux interactions en solution⁵².

La spécificité de la reconnaissance antigénique, un autre aspect important de la reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte T, établit clairement que des hauts niveaux de spécificité entre le TCR et le peptide présenté sont nécessaires à l'induction d'une activation totale des lymphocytes. Des expériences visant à déterminer le niveau d'activation des lymphocytes T pour des peptides de constitution similaire démontrent que la modification d'un seul acide aminé peut totalement inhiber l'activation d'un lymphocyte T⁵³.

1) 3)2) Probabilité d'interaction

L'interaction entre le TCR et son ligand est une contrainte majeure de l'activation des lymphocytes T. Premièrement, bien qu'une cellule T exprime un nombre significatif de TCR identiques, spécifique d'un antigène unique, une CPA ne présente à sa surface qu'un petit nombre de molécules de CMH présentant l'antigène spécifique d'un TCR. Malgré la reconnaissance et la dégradation d'un pathogène, la plupart des pMHC exprimés à la surface d'une APC sont des auto-antigènes, produits par l'apprêtement de protéines intra et extracellulaires. En 1990, **Demotz et al.** ont mesuré qu'une APC activatrice ne présente à sa surface que 0.03% de complexe pCMH spécifique d'un TCR parmi l'ensemble des pCMH exprimés⁵⁴. Par conséquent, la probabilité de présence de complexes pMHC spécifiques au niveau de la zone de contact entre deux cellules est rare. De plus, dans un second temps, un encombrement stérique réduit encore la probabilité d'interaction TCR-pMHC. En effet, le TCR ainsi que le CMH mesure de 7,5 nm à 9 nm chacun imposant une distance de ~ 15 nm pour permettre un engagement TCR productif. Ce scénario est difficile à envisager en raison de l'expression à la surface cellulaire d'un grand nombre de grosses protéines glycosylées qui pourraient empêcher une telle proximité⁵⁵. En dépit de ces facteurs contraignants, les lymphocytes T présentent une réponse de haute sensibilité à la stimulation antigénique. Des études récentes ont démontrées qu'un pMHC unique rencontrant son TCR est capable d'induire une augmentation transitoire de $[Ca^{2+}]_i$, traduisant une activation cellulaire, maintenue dans le temps dès la formation de

15 complexes TCR-pCMH^{56,57}. De même, les cellules déjà activées et différenciées en CTL sont capables de tuer les cellules cibles exprimant 1 à 10 complexes pMHC sur leur surface^{58,59}.

Depuis 1995, de nombreuses études ont tenté d'étudier ce paradoxe intrigant. Deux modèles sont proposés pour expliquer le mécanisme de régulation de la reconnaissance de l'antigène par les cellules T : le modèle de relecture cinétique proposé⁶⁰ et le modèle d'engagement de TCR en série¹⁷.

1) 3)2)1) Modèle de relecture cinétique

Le modèle de relecture cinétique décrit l'activation d'un lymphocyte T comme étant dépendant d'une interaction longue entre un TCR et le pCMH qui lui est associé. Selon ce modèle, il y a un laps de temps entre l'interaction TCR-pCMH initiale et la transduction du signal. Le modèle propose que la signalisation couplée au TCR soit composée d'une série d'étapes intermédiaires réversibles menant à une activation complète de la cascade de signalisation (**Figure I-7**). Bien que toutes les étapes et modifications fonctionnelles ne soient pas encore décrites, le modèle propose que, suite à la rencontre TCR-pCMH, le lymphocyte engage une séquence de modifications intracellulaires tels que des phosphorylations de tyrosine, le recrutement de protéines échafaudages ou la génération de second messenger qui s'opéreraient en cascade tant que la connexion TCR-pCMH est maintenue. Cependant, l'ensemble de ces modifications seraient réversibles permettant au lymphocyte T d'inhiber son activation dans le cas où il y aurait rupture de contact TCR-pCMH. Ce mécanisme permettrait d'agir tel un senseur induisant un signal abortif et anergique dans le cas où un antigène de trop faible affinité et non spécifique serait reconnu par un TCR. Ce modèle, basé sur des études de temps d'interaction et d'activation biologique du lymphocyte, suggère que la spécificité entre un TCR et son ligand antigénique détermine le temps d'interaction TCR-pCMH ainsi que le niveau de différenciation et d'activation du lymphocyte⁶¹⁻⁶³.

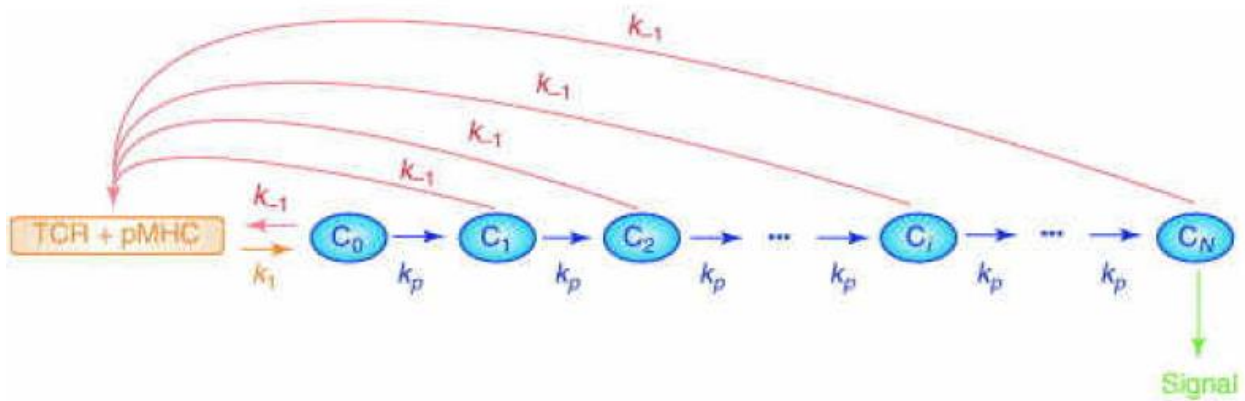


Figure I-7. Modèle de la relecture cinétique. Ce modèle suggère que la liaison d'un TCR à un pMHC pour former un complexe TCR-pMHC initie une séquence d'événements de signalisation intermédiaire (C_1 , C_2 ...) qui culminent vers la formation du produit de signalisation final (C_N). Toutefois, si le complexe TCR-pMHC se dissocie avant la formation de la signalisation C_N , celle-ci échoue. Les constantes de vitesse d'association (k_1) et de dissociation (k_{-1}) déterminent le niveau de signalisation intracellulaire aboutissant à la signalisation finale C_N . Repris de George et al., in immunology 2005 ⁴⁷.

1) 3)2)2) Modèle de l'engagement en série du TCR

Le modèle d'engagement en série est proposé pour expliquer la capacité d'un lymphocyte T à pouvoir répondre efficacement en présence de peu d'antigènes malgré des interactions TCR-pCMH de faible affinité. Ce modèle se base sur la capacité d'un lymphocyte à pouvoir faire interagir de nombreux TCR avec un seul et même pCMH via un mécanisme d'internalisation des molécules TCR activées permettant ainsi de maintenir une signalisation soutenue. Ils ont pu estimer qu'un seul pCMH présenté sur une CPA pouvait induire l'internalisation d'approximativement 180 molécules TCR. Cela signifie qu'une quantité infime d'antigènes présentée à la surface d'un CPA est capable d'activer un grand nombre de molécules TCR. Ce modèle propose que les TCR de faible affinité, en interagissant en série avec un petit nombre de pMHC spécifiques, peuvent conduire à une signalisation soutenue et amplifiée¹⁷.

Cette occupation dite « séquentielle » du pCMH par un grand nombre de TCR permet d'expliquer la haute sensibilité d'un lymphocyte T face à une quantité limitée de pCMH (**Figure I-8**)⁶⁴. Des publications récentes rapportant des taux pCMH faibles ainsi que des vitesses de liaisons TCR-pMHC transitoires et rapides supportent le modèle de l'engagement du TCR en série. De plus, des études expérimentales et computationnelles supposent qu'un mécanisme d'activation en série serait nécessaire pour une réactivité optimale des cellules T^{52,57,65}.

La lecture cinétique et l'engagement en série du TCR sont deux modèles permettant d'appréhender l'activation d'un lymphocyte T. Cependant, les mécanismes et tensions mis en œuvre pour expliquer la signalisation sont diamétralement opposés. D'une part, la lecture cinétique explique la spécificité des interactions au niveau moléculaire. D'autre part, l'engagement en série explique principalement la sensibilité de la cellule T à répondre à un niveau antigénique faible. Physiologiquement, rien ne permet d'affirmer que ces mécanismes soient mutuellement exclusifs et il semble cohérent de penser qu'en fonction de la situation, ces deux mécanismes puissent intervenir dans l'activation d'un lymphocyte T. En effet, il est cohérent de penser que la demi-vie des interactions TCR-pMHC soit assez longue pour permettre la relecture de la signalisation cinétique et assez courte pour permettre à un seul pCMH d'engager plusieurs TCR en série.

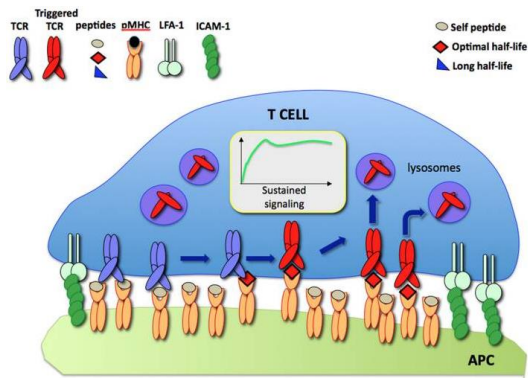


Figure 9A : à la SI, une petite quantité de CMH présente le peptide spécifique (♦). Les TCR sont successivement stimulés par le pCMH spécifique aboutissant à la formation d'un signal soutenu. Les TCR stimulés sont internalisés et dégradés par le lysosome laissant le pCMH libre, capable d'activer d'autres molécules TCR.

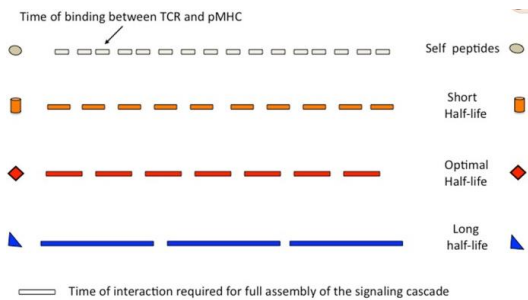


Figure 9B : le modèle d'engagement en série postule que les ligands présentés par le CMH présentant une demi-vie de liaison optimale avec le TCR se comportent comme des agonistes optimaux.

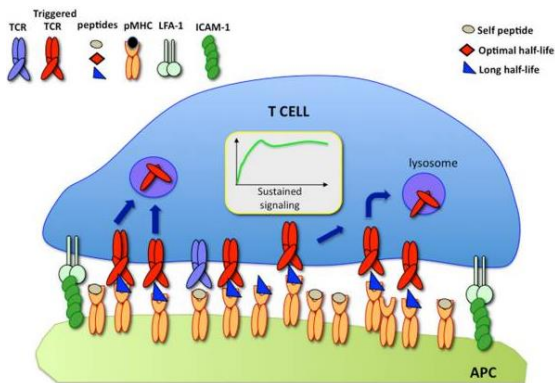


Figure 9C : lorsque la densité en pCMH spécifique est forte, les pCMH qui présentent une demi-vie de liaison forte sont capables d'agir comme peptides stimulateurs (suffisamment de pCMH capables de stimuler suffisamment de TCR).

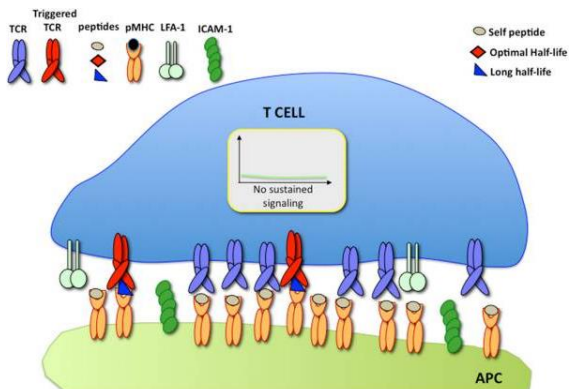


Figure 9D : lorsque la densité en pCMH spécifique est faible, les pCMH qui présentent une demi-vie de liaison forte sont incapables d'agir comme peptides stimulateurs (la faible densité en pCMH spécifique associée au long contact ne permet pas d'activer suffisamment de molécules TCR).

Figure I-8. Modèle de l'engagement en série du TCR. Repris de Valitutti 2012 Frontiers⁶⁴

1) 4) Signalisation intracellulaire

Dans le cas des lymphocytes T, l'activation est un terme général qui inclut les événements de signalisation conduisant à la survie cellulaire, la prolifération, le réarrangement du cytosquelette, l'augmentation du métabolisme et la variation du profil d'expression génique. Dans les cellules T naïves, l'activation nécessite l'accomplissement de trois signaux distincts et synergiques : la reconnaissance de complexes pCMH par le TCR, l'engagement de molécules co-stimulatrices et l'engagement des récepteurs aux cytokines. Ensemble, ces signaux induisent une signalisation intracellulaire capable d'impacter et de dicter les réponses biologiques du lymphocyte T.

1) 4)1) Étape précoce de l'engagement TCR

L'engagement du TCR est le premier événement nécessaire à l'activation d'un lymphocyte T naïf. Suite à la reconnaissance d'un pCMH, les événements précoces de la signalisation TCR peuvent être divisés en 4 étapes (**Figure I-9**).

1) Recrutement rapide des tyrosines kinases de la famille Src : LCK (acteur majeur) et Fyn. Chaque TCR engagé dans un complexe TCR-pCMH activateur est transloqué dans des micro-domaines membranaires, riches en cholestérol et en sphingolipides, connus sous le nom de DRM (membranes résistantes aux détergents)⁶⁶. Cette migration facilite la phosphorylation des motifs ITAM localisés au niveau des chaînes CD3 associées au TCR actif⁶⁷. L'engagement du TCR par le pCMH, des molécules de co-stimulation ainsi que le recrutement précoce de CD45, initient le recrutement et l'activation de la protéine LCK au niveau du domaine intracytoplasmique des corécepteurs CD4 et CD8⁶⁸⁻⁷⁰.

2) Phosphorylation des motifs ITAM du complexe CD3 et des chaînes ζ : Les motifs ITAM du complexe CD3 sont des motifs riches en résidu tyrosine directement phosphorylables par les tyrosines kinases LCK et Fyn recrutées suite à l'activation du TCR. Une étude réalisée sur le domaine ITAM de la chaîne CD3 ϵ montre que les résidus basiques présents au niveau de la chaîne CD3 ϵ sont capables d'interagir avec les phospholipides acides enrichis au sein du feuillet interne de la membrane phospholipidique. Les deux résidus tyrosine contenus au sein du motif ITAM sont alors insérés au niveau de la région transmembranaire hydrophobe et restent inaccessibles au Src kinase (LCK et FYN) capable de les phosphoryler. La stimulation du TCR serait

alors capable d'exposer les résidus tyrosine à la surface interne de la membrane plasmique. Ce mécanisme représente d'une part, un moyen ubiquitaire d'inhiber la phosphorylation aspécifique des ITAM et d'autre part, de permettre le rapprochement stérique entre les tyrosines et les kinases Src suite à la reconnaissance antigénique.

La phosphorylation des motifs ITAM induit le recrutement d'un ensemble d'enzymes (protéines kinases, GTPases, phosphatases) et de molécules adaptatrices dans les DRM pour former un complexe protéique appelé « signalosome »^{71,72}.

3) Recrutement et activation de la protéine ZAP-70 (protéine kinase associée à la chaîne ζ de 70 kDa). La protéine ZAP-70 est indispensable à l'établissement final du « signalosome ». Elle exprime deux domaines SH2 directement recrutés par les ITAM phosphorylés de la chaîne ζ . Suite à son encrage au niveau du « signalosome », la protéine ZAP-70 est activée par les protéines kinases Src⁷³.

4) Activation par phosphorylation de la protéine LAT (Linker pour l'activation des cellules T). Suite à sa phosphorylation par ZAP-70, LAT devient une plateforme pour la liaison de protéines de signalisation supplémentaires. De plus, d'autres substrats de l'activité ZAP-70 sont indispensables pour la transduction du signal telle que la protéine adaptatrice SLP-76 (protéine leucocytaire contenant le domaine SH2 de 76 kDa)⁷³.

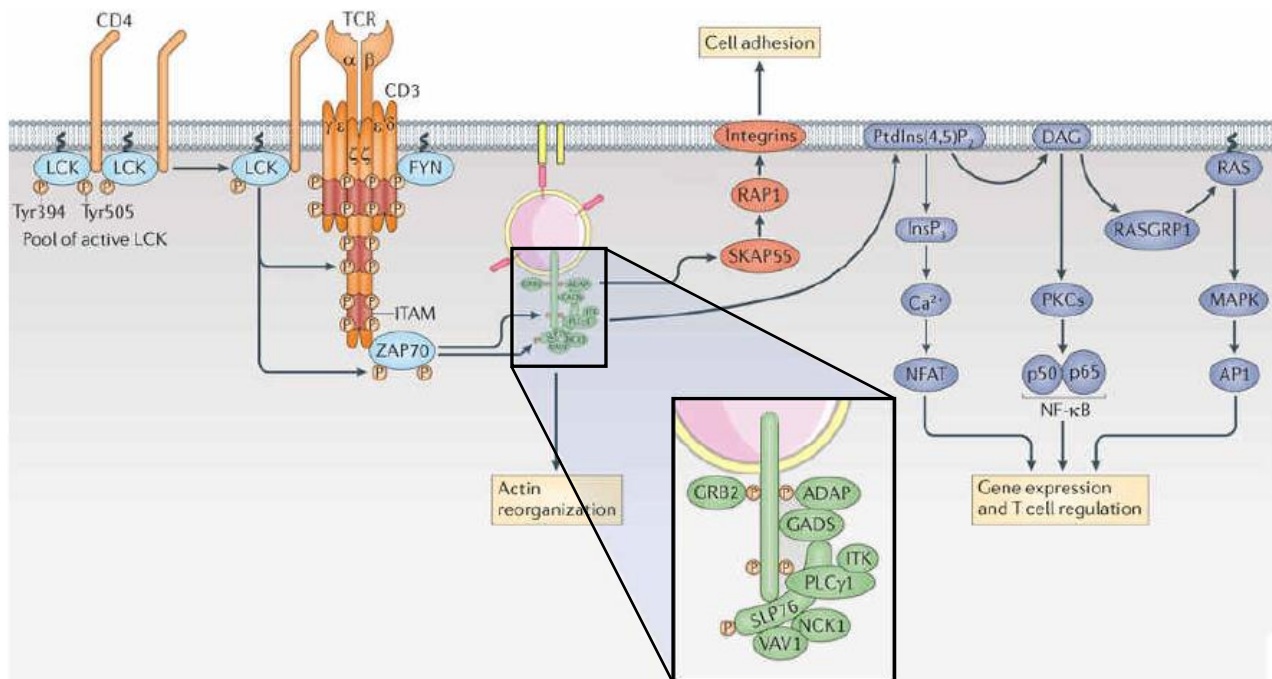


Figure I-9. Mise en place du signalosome. Adapté de Brownlie et al. 2013⁷³

1) 4)2) La transduction du signal

La mise en place du « signalosome » conduit à l'activation de nombreuses voies de signalisations intracellulaires dont l'activité convergente vers le noyau participe à la régulation de l'expression génique de gènes-clef intervenant dans les processus de prolifération et différenciation cellulaire. De manière intéressante, on observe que l'activation d'un lymphocyte T n'active pas une seule voie de signalisation mais sélectionne un ensemble de voies capables d'interagir et de converger vers une action commune.

1) 4)2)1) Voie calcique

L'interaction TCR-pMHC, induit une augmentation de la concentration de $[Ca^{2+}]_i$ dans les lymphocytes T, associée à l'activation de facteurs de transcription-clef nécessaire à l'activation d'un lymphocyte T^{74,75}. Il s'agit d'une réponse rapide, détectable dès les 6 premières secondes, directement dépendante de l'engagement du TCR et du nombre de complexe TCR-pCMH formés⁵⁶⁻⁵⁸. Comme illustré dans la **Figure I-10**, l'augmentation du calcium intracellulaire active différentes voies de signalisation permettant la translocation nucléaire de facteurs de transcription telles que NFAT, CREB ou NF- κ B, impliquées dans la prolifération cellulaire, la différenciation, la survie et l'acquisition de fonction telle que la sécrétion d'IL2⁷⁶.

Initialement, le calcium intracellulaire est maintenu au sein du réticulum endoplasmique où il n'est pas capable d'initier l'activation des facteurs de transcription. Suite à la formation du complexe TCR-pCMH, la mise en place du signalosome active de nombreuses enzymes dont la Phospholipase $C\gamma_1$ (PLC γ_1), capable de dégrader la protéine PIP2 en DAG et IP3. L'augmentation d'IP3 agit directement sur les canaux calciques RIP3 du réticulum endoplasmique qui s'ouvre et libère le calcium dans le cytoplasme de la cellule. En parallèle, on observe également l'ouverture de canaux membranaires tel que ORAI, induisant un flux calcique du milieu extracellulaire vers le cytoplasme⁷⁷. À ce stade, le calcium Ca^{2+} cytoplasmique est capable d'interagir et d'activer la calmoduline, un senseur de $[Ca^{2+}]_i$. La calmoduline ainsi activée lie les sous-unités CA et CB composant la Calcineurine⁷⁸. L'ensemble de ce complexe déphosphoryle le facteur de transcription NFAT qui migre du cytoplasme au noyau, où il active la transcription de gène codant pour des cytokines et facteurs de croissance indispensables à la prolifération et différenciation des lymphocytes T⁷⁶.

En plus de son rôle bien décrit dans la régulation de l'activation des cellules T et la production de cytokines, l'augmentation $[Ca^{2+}]_i$ semble avoir un impact sur le « signal d'arrêt » des cellules T. De par leurs fonctions, les lymphocytes T ont des propriétés de migrations importantes leur permettant de scanner l'ensemble de la surface d'une CPA à la recherche d'un peptide activateur. Lorsqu'un lymphocyte T rencontre un peptide spécifique, celui-ci se stoppe, favorisant la formation du complexe TCR-pCMH et la signalisation associée. Dans ce cas, le calcium intracellulaire active la calpaïne, une protéase qui libère la protéine de surface LFA-1 sous sa forme active^{79,80}. LFA-1 agit alors comme une protéine d'ancrage interagissant avec ICAM-1 présenté par les CPA au niveau de la zone de contact. Cette interaction a été démontrée comme étant indispensable au renforcement et la stabilisation de l'interaction entre un lymphocyte T et un CPA nécessaire à l'activation des lymphocytes T^{81,82}. Cet arrêt du lymphocyte T, toujours précédé d'une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$, est inhibé lorsqu'on induit une diminution artificielle du calcium disponible⁷⁴.

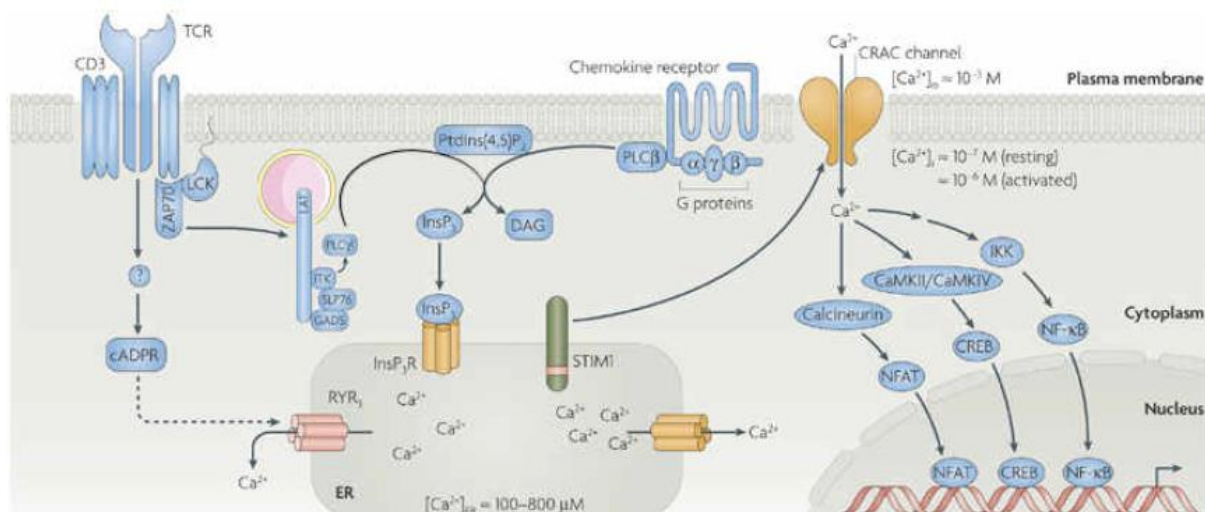


Figure I-10. La voie de signalisation calcique (Ca^{2+}) dans les cellules immunitaires. La reconnaissance de l'antigène par le TCR entraîne l'activation des protéines kinases, telles que LCK et ZAP70. Elles activent par phosphorylation des protéines adaptatrices, telles que SLP76 et LAT qui recrutent et activent la TEC kinase, ITK (interleukine-2-inductible T-cell kinase) et la phospholipase $C\gamma 1$ ($PLC\gamma 1$). De même, l'activation de la protéine G couplée aux récepteurs au chimiokine participe à l'activation de la $PLC\beta$. Ensemble, les PLC activent, catalysent l'hydrolyse du phospholipide phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ($PtdIns(4,5)P_2$) en inositol-1,4,5-trisphosphate ($InsP_3$) et diacylglycérol (DAG). $InsP_3$ (IP_3) se lie aux récepteurs $InsP_3$ ($InsP_3Rs$) localisés au niveau du réticulum endoplasmique (ER) qui retient le calcium intracellulaire. $InsP_3Rs$ est un récepteur capable de s'ouvrir en présence d' $InsP_3$ et de libérer le calcium intracellulaire, du ER vers le cytoplasme. En parallèle, la diminution du Ca^{2+} ER est « détectée » par la molécule d'interaction stromale 1 (STIM1), qui à son tour active l'entrée de Ca^{2+} intracytoplasmique via l'ouverture de canaux membranaires (CRAC Channel). L'afflux de Ca^{2+} par les canaux CRAC et la concentration intracellulaire élevée de Ca^{2+} activent les enzymes dépendantes du Ca^{2+} , telles que la Calcineurine et IKK. Ensemble, l'activation de ces voies participent aux modifications transcriptionnelles via la régulation de facteurs de transcriptions-

clefs NFAT, CREB, NF- κ B. NF- κ B (nuclear factor- κ B) and CREB (cyclic-AMP-responsive-element-binding protein). cADPR, cyclic ADP ribose; CaMK, calmodulin-dependent kinase; GADS, growth-factor-receptor-bound-protein-2-related adaptor protein; IKK, inhibitor of NF- κ B kinase; RYR3, ryanodine receptor 3. Repris de Feske S Nat Rev 2007⁷⁶.

1) 4)2)2) Voie PKC dépendante

Les PKC (protéine kinase C) sont des serines/thréonines kinases dont l'activité réversible est dépendante du DAG en présence de phospholipide. Cette famille de protéine kinase comprend dix isoformes qui possèdent un domaine catalytique identique mais dont les variabilités au niveau du domaine régulateur permettent l'établissement de trois sous-familles⁸³.

- PKC Classique (cPKC) : cette sous-famille comprend les isoformes PKC α , PKC β et PKC γ dont l'activité catalytique est dépendante de la présence de DAG ainsi que du calcium intracellulaire.
- PKC Nouvelle (nPKC) : regroupe les isoformes PKC δ , PKC ϵ , PKC η et PKC θ dont l'activation dépendante du DAG est indépendante du calcium intracellulaire.
- PKC Atypique (aPKC) : comprend les isoformes PKC ζ , PKC λ et PKC ι dont l'activité est indépendante du DAG et du calcium, justifiant leur appellation d'atypique.

Parmi l'ensemble de ces protéines serine/thréonine kinase, les isoformes PKC α , δ , ϵ , η , θ et ζ sont exprimées à des taux variables par les lymphocytes T humains. De manière intéressante, ces variabilités d'expression seraient directement associées à l'activation ainsi qu'aux fonctions effectrices mises en place par les lymphocytes T⁸⁴. Lors de la formation d'un complexe TCR-pCMH, la PKC θ est l'une des protéines les plus connues recrutées au niveau de la synapse immunologique (SI). En association avec le CD2, le CD4 ou CD8, le CD28 et les kinases Src (LCK, Fyn), la PKC θ participe à la mise en place du complexe SMAC de la SI ainsi qu'à l'activation des cellules T⁸⁵⁻⁸⁹.

A.Kupfer et al., dans leurs premières descriptions de synapse immunologique, ont montré que lors d'une interaction entre un lymphocyte T et une CPA, la PKC θ est recrutée très rapidement à la zone de contact entre les deux cellules, uniquement lorsque la CPA présente l'antigène spécifique reconnu par le TCR de la cellule T⁸⁹. La stimulation du TCR active la PLC γ 1 qui hydrolyse PIP2 en DAG et IP3. Le DAG recrute la PKC θ à la membrane plasmique qui est activée par phosphorylation sur son site

catalytique (Thr538) par la kinase GLK. La PKC θ activée (pPKC θ) induit la formation du complexe CARMA1/MALT/BCL10 et initie une cascade d'événements de phosphorylation. Le complexe CARMA1, ainsi formé, phosphoryle I κ B qui est alors reconnu et dégradé par le protéasome. La perte d'I κ B conduit à la libération de la forme active de NF- κ B, capable de migrer du cytoplasme au noyau, où il contribue à l'expression de gènes indispensables à la fonction et prolifération du lymphocyte T⁹⁰. Cette voie de signalisation est particulièrement décrite dans le processus de différenciation Th1/Th2 des lymphocytes T CD4⁺. En effet, bien que n'influençant pas le profil Th1, la perte de la PKC θ inhibe le développement et la différenciation des lymphocytes Th2⁹¹ (**Figure I-11**).

Récemment, des études ont identifié la PKC ζ atypique comme un guide moléculaire clé pour la polarisation des cellules T vers les DC^{92,93}.

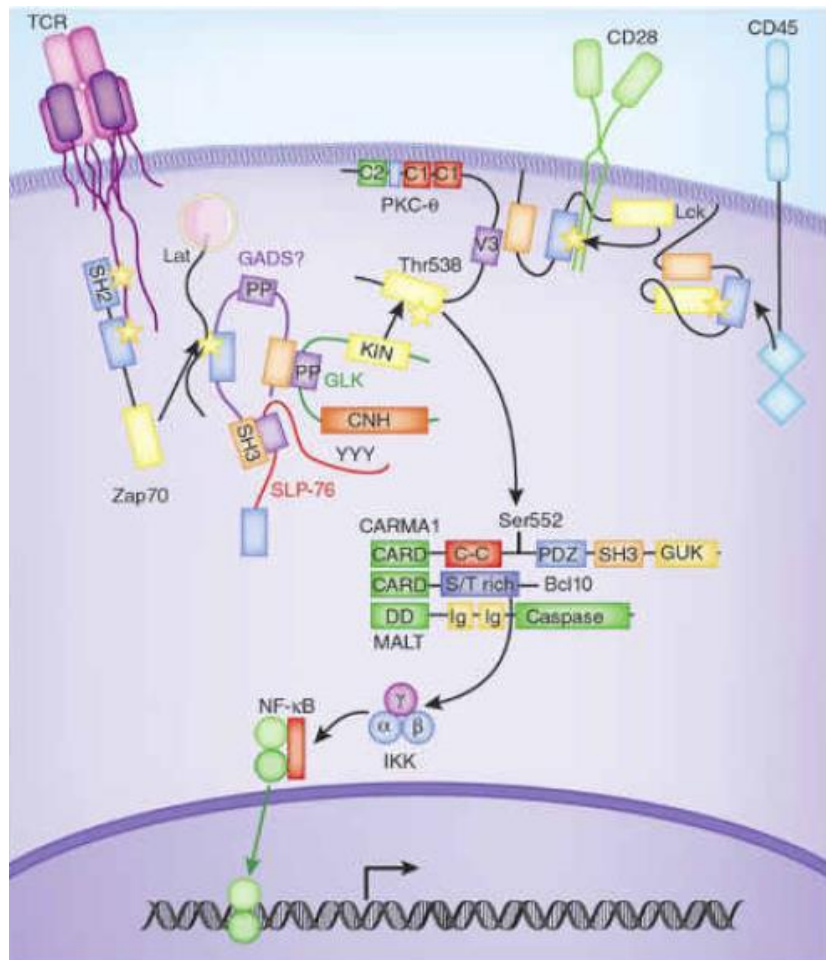


Figure I-11. La signalisation PKC θ . La stimulation TCR active la PLC γ 1 qui hydrolyse PIP2 en DAG et InsP3. Le DAG recrute la PKC θ à la membrane plasmique à proximité de la kinase GLK localisée dans le signalosome. La GLK phosphoryle (Thr538) et active le site catalytique de la PKC θ . À ce stade, la PKC θ initie la formation du complexe CARMA1/MALT/BCL10 qui aboutit à la phosphorylation d'I κ B et la libération de NF- κ B. I κ B phosphorylée est dégradée par le protéasome qui libère le NF- κ B, capable de migrer au noyau et d'induire l'expression de gènes-clés. C1, DAG-binding domains of PKC; C2, calcium- and phosphatidylserine-binding domain; PP, polyproline motif; CNH, citron homology domain; YYY, Tyr-Tyr-Tyr; CARD, caspase-recruitment domain; PDZ, postsynaptic density 65–discs large–zonula occludens 1 domain; GUK; guanlylate kinase domain; DD, death domain; Ig, immunoglobulin domain; IKK, inhibitor of NF- κ B kinase (γ , α , β are subtypes); KIN, kinase domain (tyrosine or serine-threonine). Repris de Dustin ML Nat Rev 2011 ⁹⁰

1) 4)2)3 Voie MAP Kinase dépendante

La voie de signalisation MAPK (mitogen activated protein kinase) est une voie particulièrement conservée au sein des organismes multicellulaires et retrouvée dans un large panel de type cellulaire humain. Chez les mammifères, on identifie les MAPK de la famille ERK (Extra-cellular signal-Regulated protein Kinases), p38 et JNK (c-Jun NH2-terminal Kinase) qui ciblent des facteurs de transcription distinct⁹⁴. Ensemble, les MAP-K sont impliquées dans un certain nombre d'évènements de la vie de la cellule, comme la mitose, mais aussi très liées à des phénomènes apoptotiques, la différenciation ou encore la survie cellulaire⁹⁵.

Chaque MAPK est activé en amont par une cascade de signalisation dépendante des MKKs (MAPK Kinase) et MKKKs (MAPK Kinase Kinase). Lors de l'activation cellulaire dépendante des signaux extracellulaires, les MKKs phosphorylent et activent les MKKs qui phosphorylent et activent les MAPK.

Les MAPK sont activées par une double phosphorylation sur des résidus tyrosines et thréonines spécifiques de leurs activations. Une fois activés, les MAPK activent différentes voies de signalisation via la phosphorylation et l'activation de facteurs de transcription.

- La voie MAPK/ERK, décrite dans les processus de prolifération et différenciation, répond à de nombreux stimuli tels que les facteurs de croissance, les cytokines ou encore lors d'infection virale. La reconnaissance de ces signaux active RasGDP en RasGTP, capables d'initier différents MKKKs tels que Raf1 ou B-Raf qui transduisent le signal par l'activation des MKKs, MKK1 et/ou MKK2. La transduction de ce signal aboutit à l'activation des MAPK, ERK1 et ERK2 dont les facteurs de transcription cible (telle que Elk1) sont principalement décrits dans la réponse proliférative et l'angiogenèse^{94,96,97}

- La voie MAPK/JNK est principalement décrite dans les processus de mort cellulaire telle que l'apoptose. Cette voie de signalisation cellulaire répond à de nombreux stimuli incluant des cytokines ainsi que les stress environnementaux telles que les radiations. La régulation de la voie JNK est complexe et dépend de nombreux MKKKs capables d'influencer la réponse cellulaire. De manière générale, on observe que l'activation de la MAPK JNKs (1, 2 ou 3) aboutit à l'augmentation de l'activité de c-Jun, un composant du facteur de transcription de AP1 qui contrôle la réponse à de nombreux stress cellulaires, cytokines et facteurs de croissance^{94,98}.
- La voie MAPK/p38 intègre de nombreux signaux telles que les cytokines inflammatoires, les hormones ou encore les stress environnementaux comme les chocs osmotiques ou thermiques (heat shock protein). De manière intéressante, les cellules immunitaires sont activées par la voie p38 en réponse à des signaux pro-inflammatoires et contribuent à la synthèse de cytokine pro-inflammatoire⁹⁴.

L'ensemble de ces voies ne sont pas indépendantes mais agissent en étroite collaboration. Par exemple, suite à l'activation cellulaire et à l'initiation de la voie de signalisation MAPK/ERK, ERK1/2 active par phosphorylation le facteur de transcription c-Fos. C-Fos forme alors un complexe avec JUN préalablement activé par phosphorylation via la signalisation MAPK/JNK. L'hétérodimère AP-1 ainsi formé par l'action simultanée des deux signaux MAPK permet d'initier l'entrée dans le cycle cellulaire et ainsi la prolifération⁹⁵ alors que dans d'autres contextes d'activation, AP-1 est décrit comme initiateur de l'apoptose⁹⁹

2) Engagement des molécules de costimulation

La signalisation TCR est indispensable à la mise en place du signalosome et correspond au premier signal nécessaire à l'activation d'un lymphocyte T. Cependant, à lui seul, ce signal aboutit à l'anergie du lymphocyte T qui devient alors incapable de s'activer et d'exercer sa fonction^{100,101}.

Au cours de la présentation antigénique, les CPA expriment des molécules de costimulation, capables de moduler l'activation d'un lymphocyte T. Bien que

l'engagement de molécules de costimulation soit une étape indispensable à l'activation d'un lymphocyte T face à un antigène spécifique, les molécules de costimulation sont capables au cours du temps d'initier des complexes activateurs ou inhibiteurs de l'activité d'un lymphocyte T. On distingue les molécules de costimulation qui vont directement influencer et participer la transduction du signal activateur (CD28, CD40L) ou inhibiteur (CTLA4), et les molécules d'adhésions telles que LFA-1 et CD2 favorisant le contact et les interactions entre le lymphocyte et la CPA. De telles interactions influencent et régulent la force de la liaison TCR-pMHC, mais affectent également l'amplitude et la qualité de la signalisation des cellules T.

2) 1) Interaction CD28-CD80/86 versus CTLA4-CD80/86

Les molécules CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) sont des protéines monomériques de la famille B7, exprimant chacune deux domaines de type Ig, capables de se lier aux molécules de stimulation, CD28 activateur et CTLA-4 inhibiteur^{102,103}.

Ces deux protéines de la famille B7 dont l'expression est restreinte aux CPA professionnels activés^{104,105} ont une cinétique d'expression et d'affinité particulière permettant à la fois d'initier, amplifier ou inhiber la réponse immunitaire adaptative. Tandis que CD86 est exprimé constitutivement sur les CPA et surexprimé lors son interaction avec CD28, l'expression de CD80 est induite suite à l'activation de la CPA pendant une durée de 4 à 5 jours (avec un pic maximal d'expression à 48 heures)¹⁰⁶.

Les molécules de costimulation CD28 et CTLA-4 exprimées à la surface des lymphocytes T sont capables d'interagir directement avec les molécules de costimulation CD80/86 exprimées à la surface des CPA actives. Cependant, malgré leur interaction commune, la formation du complexe CD28-CD80/86 initie un signal activateur, indispensable à la prolifération et à la mise en place des fonctions effectrices des lymphocytes alors que le complexe CTLA4-CD80/86 participe à la mise en place d'un signal inhibiteur de l'activité des lymphocytes T.

De manière intéressante, on observe que les molécules CD28 et CTLA4 n'ont pas la même cinétique d'expression au cours de l'activation des lymphocytes T. En effet, alors que la molécule CD28 est exprimée de manière constitutive à la surface des lymphocytes T, on observe que le CTLA-4 a une cinétique d'expression plus complexe dont l'exposition en surface est directement dépendante de l'état d'activation du lymphocyte.

Suite à la formation d'un complexe TCR-pCMH activateur, les molécules co-stimulatrices CD28 et CD86/CD80 exprimées par le lymphocyte et la CPA respectivement, interagissent et forment les activateurs CD28-CD86 et CD28-CD80. Ensemble, il génère un signal positif au sein des cellules T naïves nécessaires à leur activation, prolifération, différenciation ainsi qu'au contrôle de l'infection^{107,108}.

Initialement localisé au sein des vésicules intracellulaires, le CTLA4 est libéré à la surface cellulaire au cours de l'activation des lymphocytes T. Cette exposition en surface permet la formation de complexe CTLA4-CD86/80 inhibiteur de la réponse immunitaire. Il est intéressant d'observer que l'affinité du complexe CTLA4-CD80/86 est supérieure à l'affinité du complexe CD28-CD86/80, favorisant la formation du complexe inhibiteur au cours de temps suite à l'initiation du signal activateur^{109,110}.

Aussi, au cours de l'infection, le mécanisme CD28/CTLA4 dépendant des molécules de costimulation CD86 et CD80 exprimés en quantités limitantes à la surface des CPA permet à la fois l'activation des lymphocytes T nécessaires au contrôle du pathogène lors des phases précoces de l'infection ainsi que l'arrêt de la réponse immunitaire indispensable au contrôle de l'inflammation lors des phases tardives de l'infection¹¹¹

(Figure I-12).

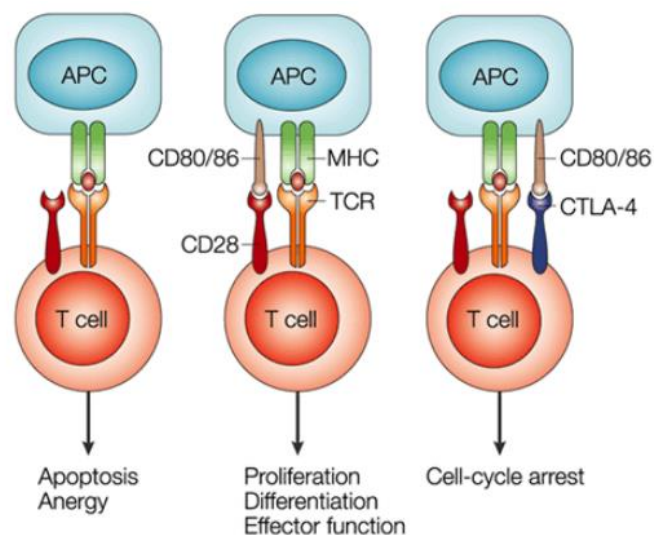


Figure I-12. État d'activation, modulé par les corécepteurs CD28 et CTLA-4. Lors de la reconnaissance du pCMH par le TCR d'une cellule T, l'absence de signalisation CD28 initie une signalisation intracellulaire abortive aboutissant à l'anergie et l'apoptose des cellules T. Ce mécanisme participe à la tolérance périphérique en inhibant les cellules T capables de reconnaître un antigène. La reconnaissance simultanée d'un pCMH par le récepteur TCR des cellules T et de CD80 (B7-1) ou CD86 (B7-2) par le récepteur co-stimulateur CD28 entraîne l'activation des cellules T, la production de cytokines, la prolifération et la différenciation. Après l'activation des lymphocytes T et la régulation à la hausse de l'antigène T-lymphocytaire cytotoxique 4 (CTLA-4 ; CD152), la co-ligand du TCR et du CTLA-4 entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et l'arrêt de l'activation des lymphocytes T. APC, cellule présentatrice d'antigène. Repris d'Alegre et al. Nat reviews immunology 2001 ¹¹¹

2) 2) Interaction CD40L-CD40

Le CD40 exprimé à la surface des CPA est un récepteur transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs du TNF. L'interaction du CD40 avec son ligand CD40L exprimé à la surface d'un lymphocyte est largement impliquée dans les dialogues entre un lymphocyte T et une CPA^{112,113}. L'engagement de CD40 améliore la survie des CPA via une régulation à la hausse de l'expression de Bcl-2 et aboutit à la maturation de ces cellules¹¹⁴. En outre, suite à l'engagement de CD40, les CPA augmentent l'expression des molécules du CMH de classe II, des molécules co-stimulatrices CD80 et CD86 et sont activées pour la production de cytokines tels que le TNF- α , IL-8 et MIP-1 α 69. L'engagement de CD40, associé à la réponse à l'IFN- γ , les CPA induisent également la production d'IL-6 et d'IL-12, deux cytokines pro-inflammatoires indispensables à la prolifération des lymphocytes T ainsi que la mise en place des cellules effectrices telles que les CTL^{115,116}.

3) Engagement des récepteurs aux cytokines

Les cytokines représentent un groupe diversifié de protéines qui agissent comme médiateurs entre les cellules. Parmi les cytokines, on distingue les interleukines, impliquées principalement dans les mécanismes d'activation, d'inhibition et de différenciation de la réponse immunitaire, et les chimiokines principalement impliquées dans les phénomènes migratoires.

Suite à la reconnaissance d'un pathogène, les cellules de l'immunité innée peuvent produire de nombreuses cytokines au site de l'infection telles que : l'IL12, l'IL1, l'IL6, le TNF α et l'IFN de type 1¹¹⁷. Ces cytokines pro-inflammatoires concentrées au site de l'infection participent à l'activation et la prolifération des cellules effectrices de l'immunité adaptative. Suite à la stimulation du TCR et des molécules de costimulation, les lymphocytes T migrent au niveau du tissu infecté riche en cytokine pro-inflammatoire. L'expression et l'activation du récepteur à l'IL12 participe à un signal intracellulaire nécessaire à l'expression du CD25, également connu comme étant la chaîne α de récepteur à l'IL2¹¹⁸. Cette expression du CD25 en surface rend le lymphocyte T sensible à la sécrétion d'IL2 (majoritairement produit par les lymphocytes T CD4⁺ actifs) et initie une cascade de signalisations aboutissant à l'expansion clonale aussi bien des LT¹¹⁹ que des LB¹²⁰. En parallèle, l'IL12 participe à la différenciation des T CD4⁺ en Th1 sécréteur de l'IFN γ , et du TNF α ¹²¹, deux autres

cytokines ayant un rôle majeur dans le contrôle de l'infection et stimulant l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ ^{122,123}.

A l'inverse, une fois l'infection contrôlée, la sécrétion dans le microenvironnement de cytokines anti-inflammatoires, telle que l'IL10, participe à l'arrêt de la réaction immunitaire¹²⁴.

Aussi, les cytokines présentes dans le microenvironnement ont un rôle majeur dans le contrôle de l'activité du lymphocyte T et constitue un troisième signal capable d'orienter la réponse immunitaire. Cependant, leur activité est directement dépendante des récepteurs qu'un lymphocyte exprime de manière constitutive ou induite.

3) 1) Structure des récepteurs aux cytokines de type I et II

En fonction de leur structure tri-dimensionnelle, les récepteurs aux cytokines sont classifiés en 6 familles : les récepteurs de type I, les récepteurs de type II, la superfamille des immunoglobulines, les tumour necrosis factor receptors, les chemokine receptors et les TGFb receptors. L'ensemble de ces récepteurs sont transmembranaires et expriment une région extracellulaire capable de reconnaître au moins une cytokine stimulatrice et un domaine intracellulaire capable d'initier la réponse cellulaire en réponse aux stimuli. Parmi ces familles de récepteur, on distingue les récepteurs aux cytokines de type I et II dont la transmission du signal est dépendante de la voie JAK-STAT, particulièrement étudiée dans les étapes de différenciation cellulaire¹²⁵.

Les récepteurs de type I et II sont constitués d'une, deux, voire trois chaînes polypeptidiques différentes codées par des gènes distincts. Cependant, un récepteur d'affinité optimale nécessite la co-expression d'au moins deux chaînes différentes : une chaîne α fixant spécifiquement le ligand et une chaîne β et/ou γ , ne fixant généralement pas le ligand à elle seule mais qui permet la stabilisation membranaire de récepteurs de forte affinité ainsi que la transduction du signal intracellulaire.

Plusieurs cytokines exercent des effets biologiques très proches. Cette redondance est le reflet d'un partage de chaînes entre différents récepteurs. En effet, bien que la chaîne α soit spécifique d'une cytokine particulière, les chaînes β ou γ , souvent en quantité limitante, qui transmettent le signal intracellulaire, peuvent se coupler à différentes chaînes α . Aussi, dans le cas des récepteurs dimériques, ce mécanisme de redondance permet à plusieurs cytokines différentes d'initier la même voie de

signalisation intracellulaire favorisant l'expression d'une fonction biologique cellulaire particulière quelle que soit le tissu ou le milieu considéré¹²⁶.

Cependant, dans certains cas, ce phénomène peut également être le reflet d'une compétition dans le choix d'une signalisation intracellulaire. Le récepteur de l'IL2, dont l'activation est indispensable à l'activation complète des cellules effectrices, est un complexe multimérique formé de trois chaînes : une chaîne α , spécifique de la reconnaissance de l'IL2, et deux chaînes, β et γ , toutes deux indispensables à la transduction du signal biologique de l'IL2. Cependant, bien que la chaîne γ soit commune aux récepteurs de l'IL2, 4, 7, 9, 15 et 21, ces cytokines activent des voies de signalisations différentes, suggérant que l'association entre la signalisation β et γ est indispensable à l'établissement de la fonction biologique associée. Dans ce cas, puisque la disponibilité en chaîne γ est limitante, les quantités et chances d'interaction entre la chaîne γ et les chaînes α/β d'un récepteur sont déterminantes au choix de la signalisation intracellulaire ainsi que de la fonction biologique associée^{127,128} (**Figure I-13**).

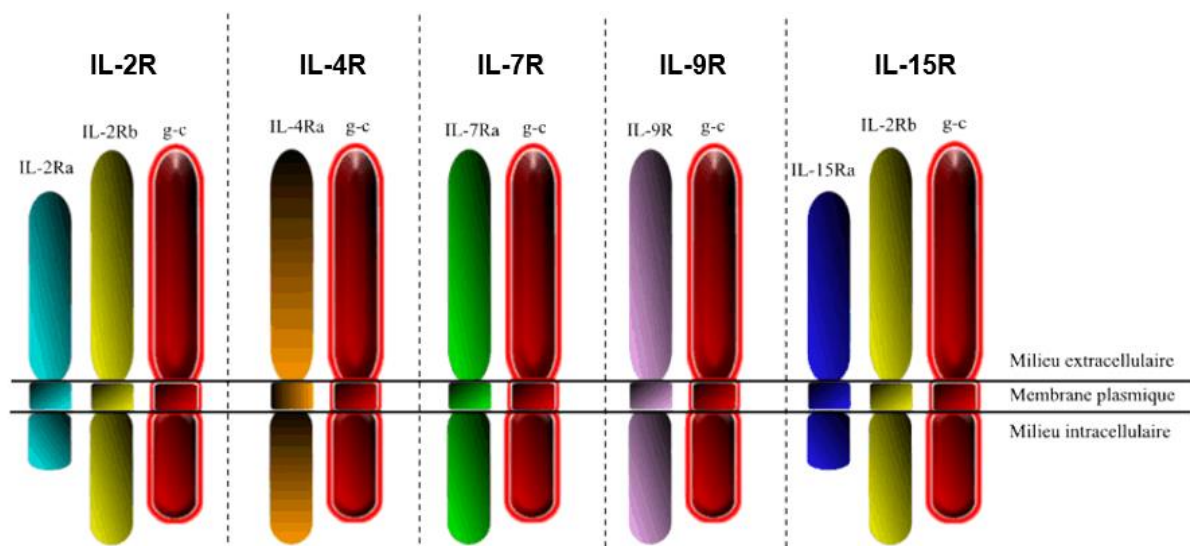


Figure I-13 : Composition, redondance et partage des chaînes protéiques des récepteurs aux cytokines. Les récepteurs aux cytokines majoritairement composés de deux ou trois chaînes polypeptidiques, une chaîne α (Cyan) capable de s'associer avec une chaîne capable d'initier la signalisation intracellulaire (γ et/ou β) (Rouge). Plusieurs cytokines sont capables d'assurer la mise en place de voies de signalisation communes, appelées mécanismes de redondance. Cette redondance est assurée par le partage d'une même chaîne γ et/ou β entre deux chaînes α différentes telle que la chaîne γ -c du récepteur à l'IL7 qui constitue également les récepteurs à l'IL4. Les récepteurs aux cytokines IL2 et IL15 qui partagent uniquement la chaîne γ -c des récepteurs IL7 et IL4 induisent des voies de signalisation différentes favorables à la prolifération cellulaire. Cette variabilité de la signalisation intracellulaire est liée à l'expression d'une troisième chaîne (β) au sein de ces deux récepteurs également capables de transduire le signal. Suite à la reconnaissance de leur cytokine spécifique, les récepteurs à l'IL2 et IL15 initient une voie de signalisation dépendant des chaînes γ et β qui aboutit à la mise en place d'une signalisation intracellulaire différente des récepteurs à l'IL4 et IL7 qui exprime uniquement la chaîne γ . Repris et modifié de <http://accres.ens-lyon.fr/biotic/biomol/enjeux/TGS/html/recepil.htm>

3) 2) Signalisation intracellulaire

Suite à la reconnaissance d'une cytokine, les récepteurs initient une cascade de signalisations intracellulaires aboutissant à l'expression ou la répression de gènes cibles. La transduction du signal de ces récepteurs est directement liée à la voie JAK-STAT qui lui est associée. La fixation de la cytokine au récepteur initie un changement conformationnel au niveau des chaînes qui induit la transactivation des kinases de la famille Jak (Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk selon les récepteurs) qui sont associées à chacune des chaînes du récepteur. Cette transactivation induit la phosphorylation en trans de chacune des kinases. Une fois phosphorylées et actives, les Jak kinases phosphorylent des résidus tyrosine du domaine intracellulaire de chacune des chaînes du récepteur. Cette phosphorylation permet le recrutement des molécules STATs via leur domaine SH2. Ce rapprochement stérique des molécules STATs ainsi recrutées et des Jak kinases permettent l'activation par phosphorylation des molécules STATs. Suite à leur phosphorylation, les molécules STATs peuvent se dimériser entre elles grâce à leur motif SH2, avant de migrer dans le noyau où elles exercent leur activité transcriptionnelle (**Figure I-14**). De manière intéressante, cette activité transcriptionnelle est accompagnée d'une boucle de rétrocontrôle négative via l'augmentation de l'expression des gènes SOCS, capables d'inhiber la voie JAK/STAT. Pour finir, il est important de constater que l'activation d'un récepteur et de sa signalisation JAK-STAT associée, active majoritairement une classe de STAT mais est également capable d'initier plusieurs types de molécules STATs différentes simultanément qui peuvent s'hétérodimériser, ajoutant ainsi de la complexité à cette signalisation mais favorisant aussi la flexibilité, l'adaptabilité et la plasticité de la réponse aux cytokines¹²⁹.

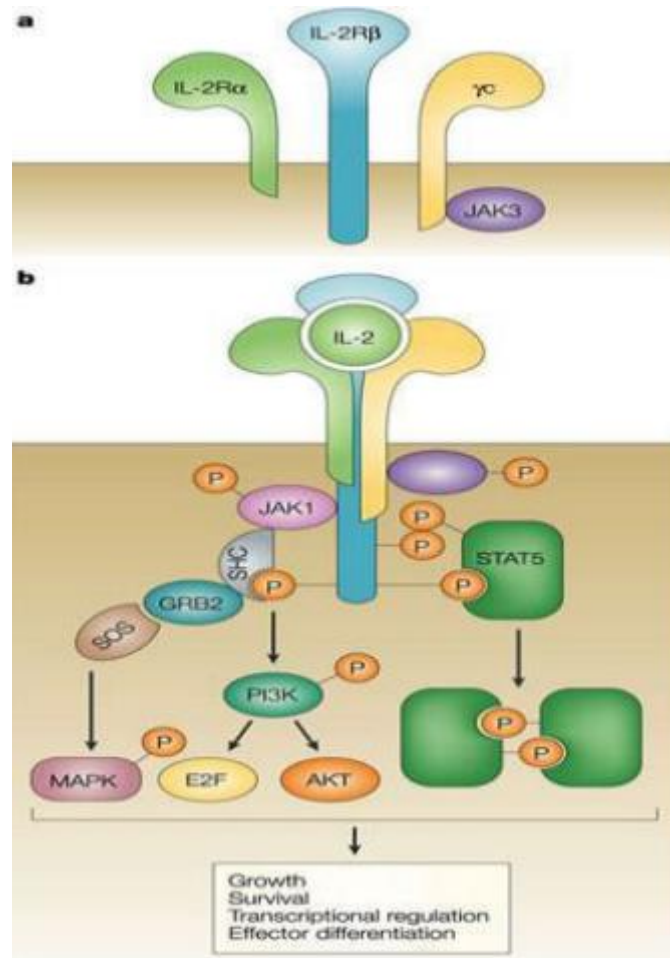


Figure I-14. Signalisation intracellulaire, JAK-STAT. (a) récepteur à l'IL2 en absence de la cytokine d'intérêt **(b)**. La fixation de la cytokine (IL-2) à son récepteur initie la transactivation puis la cross-phosphorylation des kinases JAK associées à chaque chaîne du récepteur. Suite à leur activation, les kinases JAK phosphorylent des résidus tyrosine dans les chaînes du récepteur qui peuvent alors recruter les protéines STAT via leur domaine SH2. Les molécules STAT associées au récepteur sont également phosphorylées, leur conférant la capacité de se dimériser. Les dimères de molécules STATs migrent alors dans le noyau où elles induisent la transcription de gènes cibles. Plusieurs dimères de STAT différents peuvent être générés et participent ainsi à l'expression de gènes distincts en fonction du microenvironnement en cytokines. En parallèle, les récepteurs aux cytokines sont capables d'activer des voies de signalisation annexes, telle que PI3K principalement activée par la signalisation TCR ou encore la signalisation MAPK comme décrit en **I)1)4)2)3**. De Razavi et Allen, 2015¹³⁰

II) Réponse primaire et hétérogénéité des lymphocytes T CD8⁺

Les lymphocytes T CD8⁺ sont les principaux acteurs de l'immunité adaptative à médiation cellulaire, capables de contrôler les infections intracellulaires ainsi que les mutations tumorales. La persistance d'une population de lymphocytes T CD8⁺ nécessaire au maintien de cette immunité adaptative est assurée par la génération d'un pool de lymphocytes T naïfs à longue durée de vie, stockés au sein des organes lymphoïdes secondaires. Suite à leur activation par une CPA professionnelle, capable de présenter l'antigène sur le CMH de classe I et de migrer jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes T naïfs entrent en phase de prolifération puis se différencient en cellules effectrices spécialisées, capables de contrôler l'infection ainsi qu'en cellules mémoires assurant une protection à long terme.

1) Les lymphocytes T naïfs

1) 1) Les lymphocytes T naïfs sont générés au sein du thymus

Les progéniteurs des lymphocytes T (ETPs) se développent au sein de la moëlle osseuse, puis migrent dans le thymus. Les ETPs sont alors appelés thymocytes. Le thymus est un organe constitué aussi bien de cellules d'origine hématopoïétique (macrophage et DC) et non hématopoïétique (cellules épithéliales et corticales thymiques) composant une succession de microenvironnements qui fournissent l'ensemble des signaux nécessaires à la maturation des thymocytes en lymphocytes T naïfs. Aussi, la maturation thymique est un mécanisme orchestré, accompagné de modifications morphologiques et fonctionnelles qui s'effectuent du cortex vers la médulla.

On discerne quatre grandes étapes lors de la maturation thymique (**Figure I-15**) :

- **Étape 1 : Entrée et prolifération dans la zone sous-capsulaire** : les ETPs quittent la moëlle osseuse et migrent à travers le flux sanguin jusqu'au thymus. Cette migration est assurée par l'expression de récepteurs aux chimiokines telles que CCR9/CCR7 ainsi que des molécules d'adressage (V-CAM1 et ICAM-1)^{117,131–133}. Une fois dans le thymus, les ETPs s'engagent définitivement dans la voie de différenciation lymphocytaire T. Ce processus est dépendant du récepteur Notch1, exprimé à la surface des ETPs, qui trouve son ligand activateur Jagged, exprimé à la surface des cellules stromales thymiques de la

jonction cortico-médullaire. À ce stade, il migre en périphérie de l'organe et exprime un phénotype de thymocyte dit « double-négatif » (DN) : CD4⁻ et CD8⁻. Au cours de cette première étape de maturation, les DN acquièrent le marqueur phénotypique CD2, modifient les profils d'expression CD44 et CD25 et prolifèrent en réponse à l'IL7 exprimé dans la zone sous-capsulaire du thymus. En parallèle, ils expriment également les gènes RAG1 et RAG2, nécessaires au réarrangement des gènes codant pour les chaînes α et β du TCR.

- **Étape 2 : Acquisition du TCR** : Sous la dépendance du micro-environnement thymique, les DN réalisent leurs premiers événements de recombinaison génétique du TCR sur les gènes composant la chaîne Tcr β . Ces recombinaisons aboutissent à l'expression à la surface cellulaire du pré-TCR, composé d'une chaîne β recombinée, d'une chaîne invariante et du CD3 qui ancre définitivement les DN vers le stade de différenciation des lymphocytes T $\alpha\beta$ ¹³⁴. À ce stade, les thymocytes appelés double-positif (DP) expriment les molécules CD4 et CD8. Cette association du pré-TCR, associé avec l'expression du CD4 et CD8, permet de tester fonctionnellement chaque DP au sein du cortex par les cellules épithéliales corticales. Les DP, capables de répondre aux cellules corticales, sont positivement sélectionnés et prolifèrent, permettant d'augmenter la population de thymocytes exprimant une chaîne β valide. Les DP ainsi sélectionnés initient le réarrangement des gènes composant la chaîne TCR α formant des DP aux TCR fonctionnels¹³⁵. Il est important de noter que chaque chaîne α est recombinée de manière aléatoire. Aussi, chaque DP exprimant une chaîne β identique suite à la prolifération cellulaire exprime un TCR $\alpha\beta$ différent.
- **Étape 3 : Éducation thymique** : Les DP exprimant un TCR $\alpha\beta$ ainsi que les molécules CD4 et CD8 sont capables pour la première fois d'engager leur TCR dans la formation d'un complexe TCR-pCMH accompagné de la reconnaissance du CMH par le CD4 ou le CD8. Les DP ainsi formés expriment tous un TCR formé de manière aléatoire, capable de reconnaître une infinité de peptide antigénique. Pour empêcher qu'un lymphocyte T soit capable de reconnaître et de s'activer au contact d'un antigène du soi (appelé lymphocyte T auto-réactif), les DP subissent une sélection positive, visant à sélectionner les TCR capables de reconnaître un antigène présenté sur une

molécule du CMH accompagné d'une sélection négative, visant à éliminer par apoptose les DP exprimant un TCR ayant une trop forte affinité pour un peptide antigénique du soi^{136,137}.

- **Étape 4 : Export vers la périphérie au niveau médullaire :** Les lymphocytes T ayant passé avec succès les étapes de sélection (2%) perdent le corécepteur non mis en jeu lors de ces étapes et deviennent des cellules dites simples positives (SP). Elles expriment alors le $TCR\alpha\beta/CD3$ ainsi qu'un marqueur CD4 ou CD8^{117,138}.

Les cellules simples positives naïves passent alors au niveau périphérique où elles migreront vers les organes lymphoïdes secondaires dans l'attente de leur activation future pour devenir des cellules T helper (CD4) ou cytotoxique (CD8).

Une fois le lignage établi au sein du thymus, celui-ci reste stable dans les cellules qui migrent en périphérie, conservant les marques épigénétiques dictant l'expression de nombreux gènes-clés^{139,140}. Malgré tout, suite à leur activation, l'ensemble de ces cellules passeront par de nouvelles étapes de différenciation, augmentant la diversité des populations T circulantes.

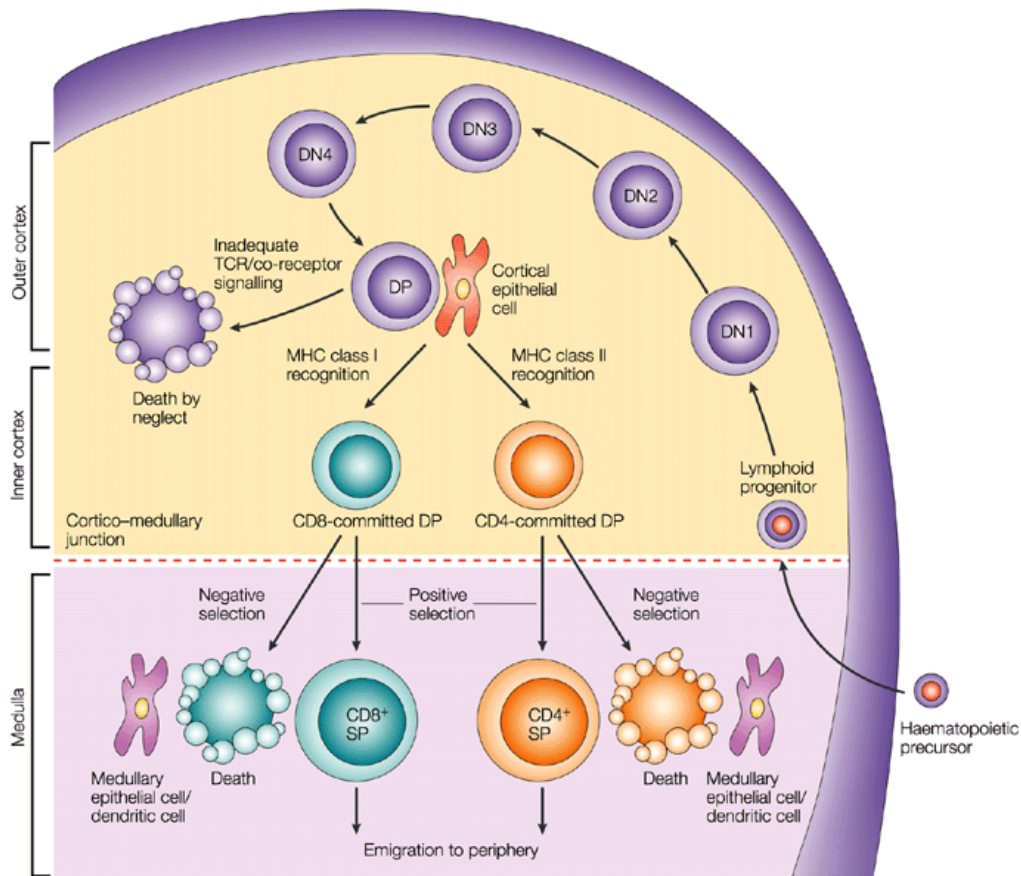


Figure I-15. Maturation thymique des lymphocytes T (CD4⁺ et CD8⁺). Au sein du thymus, les précurseurs hématopoïétiques différenciés en progéniteurs lymphoïdes ETPs mûrissent et aboutissent à la formation de ses populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ naïves. Au sein du cortex, le microenvironnement initie la maturation des ETPs doubles négatives (DN) qui n'expriment ni le TCR, ni les corécepteurs CD4 et CD8, vers le stade de cellules doubles positives (DP) qui expriment un pré-TCR et les deux molécules de costimulation CD4 et CD8. Le pré-TCR formé de la chaîne β du TCR recombinée ainsi que d'une chaîne α invariante permet la formation de complexe TCR-pCMH via leur interaction avec les cellules épithéliales corticales capables de présenter l'ensemble des antigènes potentiellement exprimé par le soi. Dans le cas d'une interaction avec une affinité modérée entre le TCR et le pCMH, le signal induit par le pré-TCR initie le réarrangement de la chaîne α qui s'associe avec le TCR à la place de la chaîne invariante. À ce stade, les DP migrent dans la médulla, où elles sont testées et sélectionnées pour leurs capacités à pouvoir reconnaître et réagir face au p-CMH. Seules les cellules fonctionnellement intéressantes, capables de maintenir une interaction modérée avec le CMH sans réagir au peptide du soi seront sélectionnées. Ces cellules deviennent alors des lymphocytes simples positifs (SP) qui expriment un TCR α/β associé à un seul corécepteur CD4⁺ ou CD8⁺. Reproduit d'après Germain et al., nature review immunology, 2002¹⁴¹

1) 2) Les cellules naïves sont des cellules à longue durée de vie

Les lymphocytes T CD8⁺ naïfs sont des cellules capables de rester au repos plusieurs années, en attente de leur stimulation spécifique¹⁴²⁻¹⁴⁴. Chez l'homme, la survie de ces cellules est dépendante de signaux immunologiques, environnementaux ainsi que de la prolifération homéostatique.

La signalisation TCR-CMH initie la signalisation PI(3)K-AKT. Dans le cas de la reconnaissance d'un peptide spécifique, la signalisation PI(3)K-AKT est fortement induite et aboutie à l'activation de nombreuses voies de signalisation et facteurs de transcriptions. L'ensemble de ces modifications aboutissent à la prolifération, l'activation et la maturation des lymphocytes T. Cependant, dès 1997, des études démontrent que la signalisation TCR-CMH, dépendante de la présentation d'un peptide du soi est nécessaire à la survie des lymphocytes T naïfs^{145,146}. Ces études réalisées chez la souris laissent penser qu'une faible signalisation PI(3)K, induite par un signal TCR faible pourrait contribuer à maintenir un niveau d'activité basal, favorable à leur activation et leur survie. De plus, bien que l'activation d'un lymphocyte T soit restreint à la reconnaissance d'un antigène agoniste unique par un TCR, on observe qu'un TCR est capable de lier et reconnaître plusieurs peptides dont certains agissent comme des agonistes partiels. Ces agonistes partiels induisent une réponse mesurable au sein des lymphocytes T naïfs qui se traduit par une prolifération minimale et la survie des cellules, sans étape de différenciation¹⁴⁷. En parallèle, les lymphocytes T naïfs expriment les récepteurs aux interleukines 7 (CD127) et 15 (IL7R, IL15R), deux cytokines décrites comme indispensables à la survie des cellules

lymphoïdes. Ensemble, ces signaux contribuent à inhiber la voie mitochondriale de l'apoptose et participent à la prolifération homéostatique des cellules^{148–150}.

La prolifération homéostatique, mise en évidence chez l'homme, est un mécanisme dépendant de différents signaux de survie et de prolifération qui permet à un lymphocyte T naïf de proliférer tout en conservant son profil inactif, augmentant ainsi le pool de lymphocytes T naïf spécifique d'un antigène unique^{151,152}.

1) 3) Les lymphocytes T naïfs migrent aux seins des organes lymphoïdes secondaires

Malgré le processus de prolifération homéostatique, la chance qu'un lymphocyte T naïf spécifique d'un pathogène rencontre son antigène spécifique reste faible. Pour pallier cette limite, les T naïfs migrent et se regroupent au sein des organes lymphoïdes secondaires (OLS) tels que les ganglions lymphatiques, la rate ou les plaques de Peyer, lieu privilégié de la rencontre entre les cellules de l'immunité innée, présentatrices des antigènes périphériques et les lymphocytes de l'immunité acquise. En parallèle, pour maximiser leur chance de rencontre avec l'antigène, elles sont capables de recirculer transitoirement, avant de réintégrer un OLS¹⁵³.

Suite à leur libération du thymus vers le sang périphérique, les lymphocytes T migrent et pénètrent au sein des OLS via l'expression de récepteurs aux chimiokines, d'intégrines et sélectines ainsi que via de nombreuses réorganisations du cytosquelette d'actine. Les lymphocytes T naïfs expriment fortement la L-selectin (CD62L), un « homing récepteur » capable de lier des protéines d'adhésion (PNAd) exprimé à la surface des cellules endothéliales. À l'approche de l'endothélium vasculaire épais des OLS, cette liaison CD62L-PNAd rapproche le lymphocyte T de la paroi vasculaire. Cette liaison a pour rôle d'induire le phénomène de « homing » (roulement du lymphocyte le long de la paroi) ralentissant sa progression dans le flux sanguin, ainsi que de favoriser les interactions entre le récepteur au chimiokine CCR7, exprimé par les lymphocytes T, de leur chimiokine CCL19 et CCL21 abondamment exprimé par les tissus des OLS. Cette interaction induit une signalisation intracellulaire aboutissant au passage de l'intégrine LFA-1 de sa forme inactive à sa forme active. La forme active de LFA-1 est alors capable de reconnaître et de lier ICAM-1 exprimé par les cellules endothéliales, qui stoppe définitivement la progression du lymphocyte (**Figure I-16**). L'arrêt du lymphocyte initie l'extravasation cellulaire, un mécanisme regroupant l'ensemble des étapes nécessaires au passage du lymphocyte du flux

sanguin vers l'OLS. Des études démontrent qu'une fois dans les OLS, les lymphocytes sont capables de recirculer au sein du flux sanguin avant de retourner au niveau d'un OLS favorisant une fois de plus les chances de rencontre avec un antigène spécifique^{153,154}.

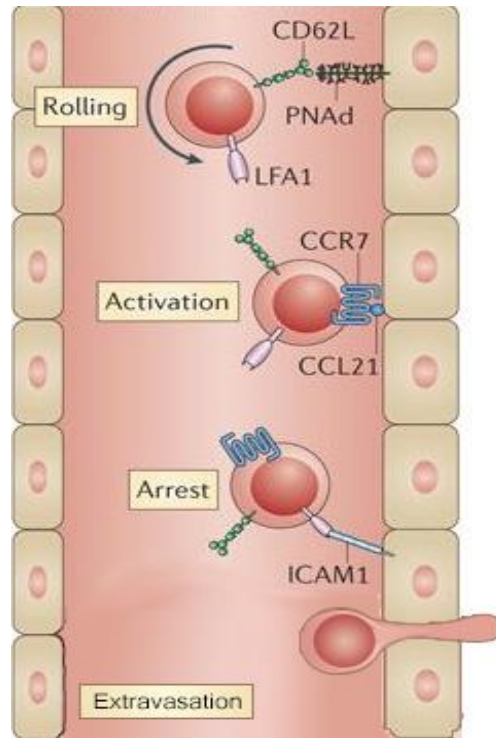


Figure I-16. Entrée des lymphocytes T naïfs dans le ganglion lymphatique. À l'approche des organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes T naïfs qui expriment le ligand CD62L sont captés par l'endothélium qui exprime le CD62. La formation de ces complexes, associés au flux sanguin, permettent le « roulement » cellulaire le long de la paroi endothéliale. Les ganglions lymphatiques (principaux organes lymphoïdes secondaires) expriment à leur surface endothéliale les chimiokines CCL21 et CCL20 directement reconnues par le récepteur au chimiokine CCR7. La formation du complexe CCR7/CCL20-21 initie le changement de conformation de LFA1 alors capable d'interagir avec ICAM1 exprimé à la surface des cellules endothéliales. Le complexe LFA1-ICAM1 induit l'arrêt total du lymphocyte contre la paroi endothéliale nécessaire à la mise en place de l'extravasation, un mécanisme complexe permettant aux lymphocytes de passer entre deux cellules endothéliales. Adapté de Masopust et Schenkel, 2013¹⁵³

2) Les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs

Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) sont les cellules effectrices T CD8⁺. L'engagement des cellules naïves dans la voie de différenciation des Teff est majoritairement induite par la présence de cytokines IL2 et IL12 dans le microenvironnement¹⁵⁵⁻¹⁵⁸. Cette différenciation est accompagnée de nombreuses modifications phénotypiques telles que : l'augmentation de l'expression des marqueurs CD44, CD69, KLRG1 et du récepteur à l'IL2, associé avec la diminution des marqueurs CD62L, CD127 et CD27 spécifiques à la localisation et à la survie des cellules naïves. Elles jouent un rôle central dans l'élimination des pathogènes intracellulaires et dans la réponse antitumorale. En effet, les pathogènes intracellulaires ainsi que les mutations tumorales induisent des modifications génétiques qui modifient le répertoire peptidique présenté par CMH de classe I des cellules transformées. Ces modifications du répertoire sont reconnues par le TCR et activent les CTL qui scannent l'ensemble des CMH de classe I au sein du tissu infectieux où elles migrent.

2) 1) Les CTL migrent au sein des tissus infectieux

Lors d'une infection, les lymphocytes T activés doivent quitter les OLS et migrer vers les tissus infectieux où ils réaliseront leur fonction. La sortie des lymphocytes T des OLS vers le flux sanguin est fortement corrélée avec le taux d'expression de S1PR1 (Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1), un récepteur membranaire sensible à la chimiokine sphingosine-1-phosphate S1P, fortement exprimée dans le flux sanguin et la lymphe. Suite à la reconnaissance antigénique au sein des OLS, la signalisation TCR associée avec de forts signaux pro-inflammatoires induisent une diminution transitoire de l'expression de S1PR1. Cette diminution d'expression est associée à une rétention des cellules T CD8⁺ activées au sein des OLS, décrite comme favorisant les contacts avec l'antigène présenté par les CPA et indispensable à l'activation optimale des lymphocytes T¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Au cours de leur activation, les LT CD8⁺ activées perdent l'expression des récepteurs CCR7 et CD62L favorisant leur délocalisation des OLS, et réexpriment S1PR1 favorisant leur introduction dans la voie sanguine. Une fois dans le flux sanguin, les cellules activées doivent migrer au sein des tissus infectieux pour réaliser leur fonction de cellules effectrices. Cette migration vers les tissus infectieux est dépendante d'une succession d'évènements dictée par l'expression de combinaison de molécules d'adhésion et de récepteurs aux

chimiokines¹⁶². Dans un milieu pro-inflammatoire ou lorsqu'elles sont infectées, les cellules épithéliales sécrètent de nombreuses chimiokines telles que CXCL9 et CXCL10 reconnues spécifiquement par le récepteur CXCR3, exprimé à la surface des lymphocytes T CD8⁺ stimulés. La sécrétion en CXCL9 et CXCL10 forment ainsi un gradient capable de diriger la migration des lymphocytes T stimulés du flux sanguin vers le tissu infectieux. En parallèle, en présence de cytokine pro-inflammatoire, les lymphocytes T expriment les molécules d'adhésions VLA-4 et PSGL1 qui participent à la migration du milieu périphérie vers les tissus infectés¹⁶³⁻¹⁶⁵.

En 2002, **weninger et al** proposent deux modèles qui expliqueraient comment un ensemble de lymphocyte effecteur peut acquérir l'ensemble des combinaisons de récepteurs nécessaires à leur migration spécifique vers et au sein des tissus infectieux.

- Le modèle sélectif est basé sur la capacité des cellules au cours de leur prolifération à acquérir des molécules d'adhésion et des récepteurs aux chimiokines aléatoirement. Celui-ci, au même titre que le réarrangement TCR, permettrait la formation de cellules ou populations cellulaires exprimant des combinaisons de récepteurs variables. Aussi, ce modèle aurait l'avantage de former des lymphocytes effecteurs capables de migrer au sein de l'ensemble des tissus d'un organisme suite à un seul évènement d'activation. Cependant, il est cohérent de penser qu'un tel modèle induit une perte conséquente de LT spécifiquement orienté vers un tissu spécifique.

- Le modèle instructif est basé sur l'éducation des lymphocytes T au cours de leur activation a exprimé les molécules d'adhésions et récepteurs aux chimiokines dont elles auront besoin pour répondre au type et au site de l'infection qui les a stimulées¹⁶⁶.

De nombreuses études suggèrent l'existence du modèle instructif. En effet, dans le cas d'un contexte d'inflammation pulmonaire, **Mikhak et al** ont pu démontrer que l'expression de CCR4 nécessaire à la migration des Teff vers le tissu pulmonaire nécessite que le peptide activateur soit présenté par un DC pulmonaire¹⁶⁷. En parallèle, **Sigmundsdottir et al** démontrent en 2007 que les DC résident au sein de la peau sont capables en présence d'UV de synthétiser de la vitamine D3. Une fois activée au niveau de la peau, ces cellules migreraient aux OLS où leur métabolite induirait l'expression de CCR10 par les lymphocytes T qu'elles activent. Ces cellules deviennent alors sensibles à la chimiokine CCL27 secrétée par les cellules de l'épiderme ¹⁶⁸. En accord avec ces résultats, **Hobb et al.** montrent dans un contexte

similaire que les lymphocytes T CD8⁺ retrouvés au sein de la peau expriment les récepteurs CCR10, CCR8 ainsi que les ligands E et P selectin¹⁶⁹. Ensemble, ces études suggèrent la mise en place d'un modèle instructif où les DC sont capables d'éduquer les lymphocytes T, d'une part en les activant et d'autre part en orientant leur migration vers le tissu infectieux qui a initialement induit leur activation.

Quel que soit le contexte infectieux, un lymphocyte T activé est capable de migrer dans l'ensemble des tissus infectieux^{164,165}. En parallèle, un lymphocyte T activé est capable de retraverser un OLS et de subir une modification de son panel d'expression¹⁷⁰. Ensemble, ces mécanismes maintiennent une flexibilité des lymphocytes T effecteurs, capables de réagir en cas d'infections généralisées dans l'ensemble des tissus infectieux.

2) 2) Les CTL réalisent la cytolyse

Lorsque qu'un CTL scanne la surface d'une cellule et rencontre un CMH de classe I présentant le peptide dont il est spécifique, celui-ci se stoppe, stabilise la synapse immunologique et induit le coup létal, se traduisant par la mort de la cellule cible transformée/infectée. Trois grandes voies ont pu être identifiées permettant à un CTL d'induire la mort d'une cellule cible spécifique : la voie de la perforine/granzyme, la voie FAS-L, et la voie dépendante des cytokines. Alors que la voie perforine/granzyme et FAS-L vont nécessiter un contact direct pour l'induction de l'activité cytolytique, la voie dépendante des cytokines va principalement impacter les cellules environnantes en favorisant leur reconnaissance par les CTL ou dans une moindre mesure induire l'apoptose. De manière intéressante, on observe que la granzyme B, la signalisation FAS et TNF α initient toute l'apoptose par la voie d'activation des caspases, démontrant une redondance d'activation des mécanismes de mort cellulaire¹⁴⁷ (**Figure I-17**).

2) 2)1) La voie perforine/granzymes

Ces deux protéines cytolytiques sont synthétisées par les CTL et pré-stockées au sein des granules lytiques CD107A⁺. Suite à la reconnaissance d'un peptide antigénique, le CTL activé se polarise et en réorientant sa machinerie lytique telles que les granules lytiques et l'appareil de Golgi, polarise le golgi vers la cellule cible^{171,172}. Lors de la reconnaissance peptidique, le MTOC (microtubule organizing centre) migre rapidement à la synapse immunologique et sert de plateforme à la migration des

granules lytiques^{173,174}. Cette polarisation aboutit à la sécrétion des granules lytiques au niveau de la synapse immunologique qui libère dans la fente synaptique, les protéines cytolytiques telles que la perforine/granzyme. Cependant, des études récentes montrent que les lymphocytes T CD8⁺ activés sont capables de tuer plusieurs cibles simultanément, suggérant des mécanismes indépendants de la polarisation du MTOC. Ce processus appelé « multiple killing » est dépendant d'une polarisation des granules lytiques qui précède la polarisation du MTOC au niveau d'une synapse lytique, permettant à un lymphocyte T CD8⁺ unique de tuer deux cibles simultanément malgré la présence d'un seul MTOC^{175,176}.

La perforine identifiée entre 1984 et 1986 est une protéine monomérique de 67kDa, capable à pH neutre et en présence de Ca²⁺ de former des pores au niveau de la membrane de la cellule cible. Elle est stockée au sein des lymphocytes T CD8⁺ dans des granules CD107a⁺ au pH acide qui la maintiennent sous une forme inactive, incapable de se lier au phospholipide^{177,178}. Suite à la sécrétion, la perforine est libérée dans le microenvironnement à pH neutre. Dans ces conditions et en présence de Ca²⁺, elle se lie au phospholipide de la cellule cible et s'oligomérisse. Cette oligomérisation forme au niveau de la membrane des pores de 16 à 22 nm qui rendent la cellule cible perméable¹⁷⁹⁻¹⁸³.

Bien que la perforine soit un acteur majeur, son action seule n'est pas suffisante pour induire l'apoptose de la cellule cible. La perméabilisation induite par l'oligomérisation de la perforine permet le passage à travers la membrane plasmique, des protéines lytiques de la famille des granzymes. Les granzymes induisent la mort des cellules cibles par des voies d'activation complémentaire, non-redondantes et hiérarchiques^{184,185} (**Tableau 1**). Parmi l'ensemble des protéines de cette famille, la granzyme B est celle qui ressort comme ayant les propriétés pro-apoptotiques les plus importantes. L'introduction de granzyme B suite à la perméabilisation cellulaire par la perforine induit l'apoptose en 5-8 min via l'activation de la voie des caspases, soit en clivant directement la caspase 3, soit via la voie mitochondriale. Chez l'homme, la granzyme B agit principalement sur la voie mitochondriale. Lors de son introduction dans le cytosol de la cellule cible, la granzyme B clive le facteur BID en tBID qui participe à la perturbation de l'activité mitochondriale. La libération de cytochrome c par la mitochondrie participe à la mise en place de l'apoptosome, complexe protéique

qui clive de nombreuses caspases dont la caspase 3 et la caspase 9 qui induisent la mort cellulaire^{186–189}.

Cell type (functional granzymes)	Cytotoxicity [†]	Morphology	Phosphatidylserine exposure [‡]	Propidium iodide uptake [‡]	Initiation phase [§] (minutes)
Wild-type NK cells (predominantly granzyme B)	+++++	Classical apoptosis	Early	Late (secondary necrosis)	<7
GzmA ^{-/-} NK cells (predominantly granzyme B)	+++++	Classical apoptosis	Early	Late (secondary necrosis)	<7
GzmB ^{-/-} NK cells (predominantly granzyme A)	++	Athetosis (worm-like morphology, elongated cells and no membrane blebbing)	Simultaneous (secondary necrosis)	Simultaneous (secondary necrosis)	~15
GzmA ^{-/-} GzmB ^{-/-} CTLs (other granzymes)	+/-	Similar to apoptosis but slower	Late	Late (secondary necrosis)	Typically >20

Tableau 1. Hiérarchie des voies de mort cellulaire dépendantes des granzymes. La quantité relative de mort cellulaire dans un test typique de 4 heures. Chaque « + » indique la mort d'environ 20% des cellules cibles.

« +/- » indique la mort de < 20% des cellules cibles. Exposition des phosphatidylsérines est une étape précoce de l'entrée en apoptose des cellules. L'iodure de propidium est une sonde de l'ADN uniquement capable de pénétrer au sein des cellules mortes. CTL, lymphocyte T cytotoxique ; Gzm, granzyme; NK, tueur naturel. Repris de Voskoboinik et al. 2015¹⁸⁵.

2) 2)2) La voie FAS/FAS-L

Dans un contexte inflammatoire, les cellules cibles expriment le récepteur membranaire FAS (CD95), capable de reconnaître la protéine, FAS-L (FAS ligand) exprimée à la surface des CTL activées. Lors d'une interaction soutenue et spécifique entre un CTL et sa cible, le ligand FAS-L se lie à son récepteur FAS qui induit une signalisation intracellulaire aboutissant à l'apoptose de la cellule cible par la voie classique d'activation des caspases¹⁹⁰.

2) 2)3) La voie des cytokines

Les cytokines ont un impact majeur dans le recrutement et l'activité du système immunitaire. Comme l'ensemble des cellules du système immunitaire, les CTL activent, synthétisent et sécrètent des cytokines favorisant leur capacité effectrice. Parmi les cytokines sécrétées par les CTL, on retrouve majoritairement les cytokines pro-inflammatoires, « tumor necrosis factor » TNF α et « interféron » IFN γ . À l'inverse des mécanismes cytolytiques perforine/granzyme et FAS/FAS-L, les cytokines

secrétées par les CTL ne nécessitent pas un contact direct entre le lymphocyte et sa cible pour exercer leur action. Aussi, suite à la reconnaissance antigénique, les cytokines secrétées pourront réaliser leur action et favoriser la réponse immunitaire au sein des tissus infectieux¹⁴⁷.

2) 2)3)1) Le $TNF\alpha$

Le $TNF\alpha$ est décrit pour la première fois en 1975 comme un facteur soluble libéré par les cellules de l'hôte, capable d'induire la nécrose de tumeur par sa seule présence dans le sérum¹⁹¹. Cette cytokine, fortement sécrétée par les lymphocytes T $CD8^+$ activés, est capable de se lier aux récepteurs membranaires, $TNFR1$ et $TNFR2$ respectivement impliqués dans les mécanismes de mort cellulaire par apoptose et de survie cellulaire. L'action du $TNF\alpha$ sur la mort ou l'apoptose est donc dépendante de l'état d'activation cellulaire ainsi que des facteurs associés¹⁹². Dans un contexte inflammatoire, la sécrétion de $TNF\alpha$ par les CTL favorise l'apoptose des cellules environnantes via l'activation des caspases.

2) 2)3)2) L' $IFN\gamma$

L'interféron (IFN) est décrit pour la première fois en 1957 par **A. Isaacs, J. Lindenmann et R.C. Valentine**¹⁹³, comme ayant une activité antivirale. Parmi les interférons, on distingue les interférons de classe I : $IFN\alpha$ et $IFN\beta$, des interférons de classe II : $IFN\gamma$. L' $IFN\gamma$, unique membre de la famille des interférons de classe II, est une cytokine pro-inflammatoire fortement synthétisée et sécrétée par les CTL actives. L' $IFN\gamma$ libéré dans le microenvironnement est capable de se lier aux récepteurs $IFNGR1$ ou $IFNGR2$ présentés à la surface cellulaire. Dans ce contexte, l' $IFN\gamma$ potentialise la réponse immunitaire en favorisant la reconnaissance des cellules infectieuses ainsi que leur élimination. Dans le cas de l'activité du CTL, l' $IFN\gamma$ sécrété induit une augmentation transcriptionnelle du CMH de classe I qui favorise la présentation et la reconnaissance de l'antigène spécifique en augmentant le nombre de complexes CMH-peptide à la surface des cellules cibles¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. En parallèle, l' $IFN\gamma$ via la voie $STAT1$, $IRF1$ induit la surexpression du récepteur FAS et l'élimination médiée par la signalisation FAS des cellules cibles environnantes de la CTL active^{197,198}. Ensemble, l'augmentation du CMHI et du récepteur FAS à la surface des cellules du tissu infecté favorise la reconnaissance et la neutralisation par apoptose des cellules infectées ou tumorales.

Pour finir, il est intéressant de noter que les IFN de type I et II (γ) ont pu être montrés comme régulant positivement l'expression du récepteur **TRAIL** (tumeur-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand) à la surface des lymphocytes T, et/ou des cellules de l'immunité innée, qui contribue fortement au contrôle des cellules tumorales via l'induction des caspases^{199–201}. Cependant, à l'inverse de l'IFN α (de type I), l'IFN γ n'est pas capable d'induire directement l'apoptose via la voie p53²⁰².

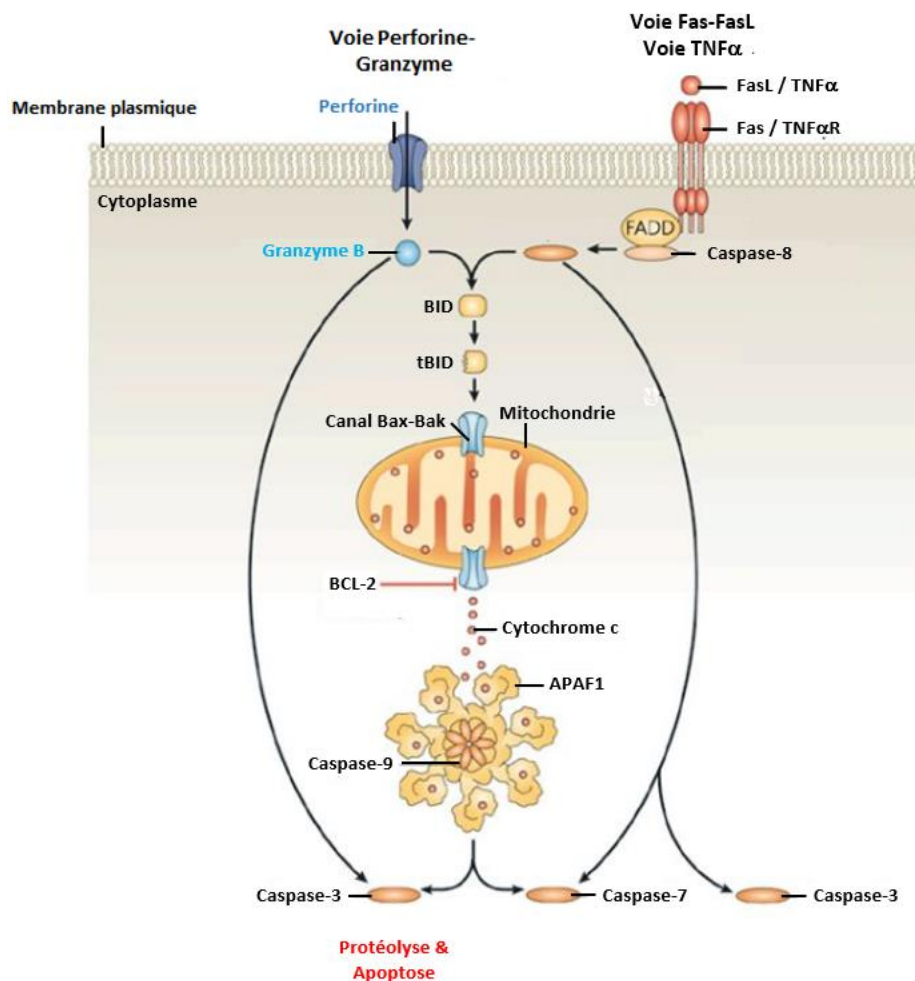


Figure I-17. Les mécanismes de cytotoxicité des CTL. La mort cellulaire par cytotoxicité repose sur une cascade d'activations aboutissant au clivage de la caspase 3. Une fois activée, la caspase 3 initie une seconde cascade d'activations aboutissant à la protéolyse et apoptose des cellules cibles. L'entrée de granzyme B (voie perforine/granzyme) dans le cytoplasme de la cellule cible ou le clivage de la caspase 8, suite à la reconnaissance du FAS-L ou du TNF α sur leur récepteur spécifique, initie l'ensemble des étapes aboutissant à la protéolyse et l'apoptose dépendante de la voie des caspases. La granzyme B et/ou la caspase 8 active clive et active la protéine BID en tBID. tBID est reconnue par les canaux Bax-Bak de la mitochondrie qui s'ouvre et laisse passer par osmose le cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme cellulaire. Le cytochrome c ainsi libéré s'associe et active l'apoptosome, un complexe protéique composé de sept protéines APAF1 et d'une protéine caspase 9, qui clive la caspase 3 en caspase 3 active. Une fois active, la caspase 3 initie une cascade d'activations qui aboutit à la mort cellulaire par apoptose. Repris et adapté de Taylor et al. 2008²⁰³.

2) 3) La courte durée de vie des CTL est directement contrôlée par son niveau d'activation

Comme vu précédemment, l'inflammation dite « aiguë » contribue au recrutement et à la maturation de cellules immunitaires, indispensables au contrôle de l'infection. Cependant, des perturbations dans les mécanismes de régulation de l'inflammation ou l'incapacité à endiguer l'infection initiale, tel que dans le VIH, contribuent à l'établissement d'une inflammation chronique associée à de nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose, le diabète de type II, l'asthme ou encore le cancer^{204–206}. Aussi, le contrôle de l'inflammation au cours de l'infection est un processus indispensable au bon fonctionnement de l'organisme.

Le contrôle de l'inflammation dépendante des CTL est assuré par la phase de contraction de la réponse immunitaire. Il s'agit d'une étape tardive de la réponse aboutissant à l'inactivation et l'apoptose des cellules effectrices. Celle-ci est dépendante de la mise en place de signalisations inhibitrices assurées par l'expression de récepteurs membranaires telles que CTLA4, PD1 ou encore FAS. La mise en place de ces voies et l'inhibition de la réponse immunitaire sont dépendantes de l'activation cellulaire des CTL. Dans ce sens, **Prato et al.** démontrent que l'inactivation des CTL est directement dépendante de la reconnaissance antigénique ainsi que du nombre de cellules cibles rencontrées²⁰⁷.

2) 3)1) Voie d'inhibition CTLA4-CD80/86

Comme décrit dans la section **II)2)1**, suite à l'activation d'un lymphocyte T, le récepteur inhibiteur CTLA-4 est exprimé à la surface et entre en compétition avec les récepteurs CD28 activateurs pour les récepteurs CD86 et/ou CD80 exprimés par les cellules présentatrices. CTLA-4 ayant une constante d'affinité pour CD80 et CD86 plus importante que CD28, sa surexpression en surface au cours du temps limite l'activation des lymphocytes T et initie l'anergie des cellules CTL.

2) 3)2) Voie d'inhibition PD1/PD-L1

La signalisation Programmed death 1 (PD1) et le ligand (PD-Ls) est un nouveau membre de la famille des B7/CD28 qui contribue fortement à l'immunorégulation et la tolérance périphérique des lymphocytes²⁰⁸. Comme CTLA-4, PD1 est un récepteur membranaire inhibiteur de l'activité des lymphocytes T, exprimé suite à leurs activations²⁰⁹. L'induction du signal inhibiteur de PD1 est dépendant de la

reconnaissance de ces ligands PD-L1 et/ou PD-L2. PD-L1 est exprimé par les cellules hématopoïétiques et parenchymateuses dont les hauts taux d'expression au niveau des organes tels que le cœur, les poumons ou le foie suggérant un contrôle accru de l'inflammation au sein de ces organes. PD-L2, quant à lui, est un ligand dont l'expression est restreinte aux macrophages et cellules dendritiques²⁰⁸. De plus, on observe que les macrophages et les DC qui expriment un faible niveau basal de PDL-1, surexpriment ce ligand dans un contexte inflammatoire, en particulier en présence de l'IFN γ . De plus, des expérimentations in vitro montrent qu'une stimulation du récepteur CD40, mimant l'interaction CD40 - CD40L entre une CPA et un lymphocyte T favorise également l'expression de PD-L1²¹⁰. En parallèle, des expériences in vitro démontrent que la stimulation du CD3 au niveau des lymphocytes T, mimant une reconnaissance TCR, favorise également l'expression de PD-L1 sur ces cellules²¹⁰. Ensemble, ces résultats suggèrent que l'expression de PD-L1 est un senseur du niveau d'activation des lymphocytes T aussi bien au niveau des CPA environnantes que des lymphocytes T et contribue ainsi au contrôle de l'inflammation via la signalisation inhibitrice PD1.

2) 3)3) Voie d'inhibition FAS/FAS-L

Comme détaillé précédemment en **III)2)2)2)**, suite à leurs activations, les lymphocytes T CD8⁺ expriment le FAS-L, capables d'initier l'apoptose aux seins des cellules cibles qui expriment le récepteur FAS. Cependant, au cours de leur activation TCR/CD3, les lymphocytes T surexpriment également le récepteur FAS, les rendant sensibles à l'apoptose suite à une interaction FAS/FAS-L entre deux lymphocytes actifs^{190,211}.

2) 4) Les sous-populations effectrices

Au cours de la réponse immunitaire à médiation cellulaire, les CTL également appelés Tc1 sont les cellules T CD8⁺ effectrices les plus représentées et actives capables de contrôler l'infection. Cependant, de nombreuses études démontrent aujourd'hui l'existence de sous-populations lymphocytaires T CD8⁺ effectrices, aux marqueurs phénotypiques, fonctions et propriétés de sécrétions différentes. Ces populations cellulaires dont la mise en place est dépendante des conditions de stimulation seront détaillées plus en profondeur dans le chapitre **V)1)**.

3) Les lymphocytes T CD8⁺ mémoires

Suite à l'activation, la prolifération, la différenciation des T naïfs et le contrôle de l'infection, on retrouve au sein de l'organisme hôte des lymphocytes mémoires ou T_m. Cette population cellulaire retrouvée dans une proportion bien inférieure à la population effectrice assure la réponse immunitaire secondaire, plus rapide et efficace que la réponse primaire suite à un second contact avec l'antigène déjà rencontré. Cette efficacité est assurée par l'augmentation du pool cellulaire capable de répondre à l'antigène ainsi que par le caractère pré-activé des lymphocytes T_m par rapport au naïf. En effet, on observe que le stock de cellules mémoires spécifiques pour un antigène, générés suite à la phase de contraction de la réponse immunitaire, est supérieur au stock initial de cellules naïves spécifiques pour le même antigène. En parallèle, les cellules mémoires expriment un profil phénotypique et transcriptionnel à mi-chemin entre les cellules naïves et effectrices. Initialement décrites comme étant des cellules à longue durée de vie exprimant les marqueurs de survie CD127(IL7R), IL15R et CD27 et localisées dans les ganglions lymphatiques via l'expression de marqueur de migration telle que CD62 et CCR7. Des études démontrent, dès 1999, l'existence de plusieurs sous-populations de lymphocytes T mémoires aux propriétés migratoires et fonctionnelles distinctes²¹²⁻²¹⁵. De manière générale, on observe que les lymphocytes T mémoires, à longue durée de vie, passent leur profil d'expression du marqueur CD45RA⁺ (naïves) à l'expression du marqueurs CD45RO⁺, acquièrent les marqueurs d'activation précoces telle que CD44⁺, sans acquérir les marqueurs d'activation des cellules effectrices terminales telle que KLRG1⁺.

3) 1) Les lymphocytes T mémoires centraux : T_{cm}

Les lymphocytes T_{cm} sont des cellules majoritairement retrouvées au sein des organes lymphoïdes secondaires. Il s'agit de cellules ayant recirculé, exprimant le marqueur d'activation CD44⁺ et CD45RO⁺, qui réintègrent les organes lymphoïdes secondaires via l'expression des marqueurs de migration CD62L et CCR7. **Sallusto et al.** démontrent, dès 1999, que les cellules à longue vie exprimant le récepteur au chimiokine CCR7⁺ en association avec CD62L est indispensable au roulement cellulaire (homing) aboutissant à l'arrêt et l'extravasation au sein des organes lymphoïdes secondaires²¹³ (cf. **III)1)3**). Une fois dans les organes lymphoïdes secondaires, les T_{cm} présentent un spectre d'activation plus large et efficace que les cellules naïves via l'expression de récepteur membranaire telle que CCR4, CCR7,

CXCR3 ou CD40L, qui favorisent les interactions avec les cellules dendritiques^{213,216,217}. Suite à leur re-stimulation, les Tcm sécrètent de l'IL2 indispensable à leur prolifération cellulaire et sont capables de générer des cellules Tem (effecteur memory) ainsi que des cellules effectrices.

3) 2) Les lymphocytes T mémoires effecteurs : Tem

Comme les Tcm, les Tem sont présents suite à la contraction de la réponse immunitaire et sont capables de répondre à un second contact avec leur antigène spécifique. Cependant, contrairement au Tcm, ces cellules n'expriment ni le marqueur membranaire CD62L, ni le récepteur au chimiokine CCR7²¹³, justifiant leur localisation périphérique²¹⁸. De plus, ces cellules expriment des taux importants de récepteurs aux chimiokines CCR1, CCR3, CCR5 en association avec l'expression des β 1 et β 2 intégrines spécifiques de la migration et du homing vers les tissus inflammés^{213,219–221}. Au cours de leur activation, ces cellules sécrètent un panel de cytokines différentes des Tcm, composées d'IL4, IL5 et d'IFN γ en association avec une diminution de la sécrétion d'IL2.

Alors que la re-stimulation des lymphocytes Tcm CCR7⁺ est capable de former un panel de cellules effectrices et Tem CCR7⁻, la re-stimulation des cellules Tem CCR7⁻ induit la formation de progénie conservant le phénotype CCR7⁻ ainsi que des propriétés de cellules effectrices²¹³ suggérant que les lymphocytes Tem sont dépendants des Tcm. Plus récemment, des études démontrent l'existence de lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ mémoires résidents des tissus (Trm)^{212,214,222} exprimant un large panel de récepteurs dépendant des organes où elles sont retrouvées²¹⁵.

III) La différenciation effecteur/mémoire des lymphocytes T CD8⁺

La différenciation est un processus primordial indispensable à la survie des organismes complexes multicellulaires. Ce mécanisme permet à une cellule de se spécialiser dans un type cellulaire qui se traduit par des modifications morphologiques, des expressions géniques et des fonctions biologiques. Ces mécanismes de différenciation arrivent tout au long de la vie d'un individu. On distingue les cellules pluripotentes telles que les cellules souches capables suite à leur division de suivre plusieurs voies de différenciation aboutissant à la formation de nombreux types cellulaires distincts (telles que des cellules cardiaques, myéloïdes et lymphoïdes), des cellules déjà engagées dans une voie de spécialisation dont la différenciation ne sera restreinte qu'à l'acquisition de nouvelles fonctions spécifiques de type cellulaire déjà près établi (tels que les lymphocytes T effecteur versus mémoire). De manière générale, on observe que plus une cellule se différencie, moins celle-ci sera capable de varier le type de cellule qu'elle peut produire, justifiant le terme de spécialisation cellulaire.

1) Les acteurs moléculaires de la différenciation

Suite à leur activation et à leur prolifération, les lymphocytes T CD8⁺ engagés dans la voie cytotoxique subissent des modifications phénotypiques, métaboliques et fonctionnelles. Ces modifications sont contrôlées par des signaux extracellulaires telle que la signalisation TCR, les contacts cellulaires ou encore les cytokines présentes dans le microenvironnement. Ensemble, ces signaux établissent le profil de différenciation et l'acquisition des fonctions du lymphocyte T effecteur ou mémoire via l'expression ou l'activation de facteur de transcription (FT) capable de lier l'ADN et d'induire ou d'inhiber l'expression de gènes spécifiques.

1) 1) Les facteurs de transcription

L'acquisition d'un profil cellulaire est finement régulée et fait intervenir de nombreux acteurs aux fonctions redondantes, complémentaires ou antagonistes. Cependant, de nombreuses études mettent en évidence des facteurs de transcription ayant un impact majeur dans les définitions du profil effecteur ou mémoire. De manière intéressante, on observe que de nombreux FT aux actions antagonistes sont régulés par des voies

de signalisation communes. Aussi, un FT pro-effecteur est couplé à un FT pro-mémoire et forment ensemble un couple « balance » contribuant au choix de différenciation²²³ (**Figure I-18**).

1) 1)1) Balance T-bet/Eomes

T-bet et Eomes sont deux facteurs de transcription de la famille T-Box dont les niveaux d'expressions sont cruciaux à l'établissement du profil effecteur ou mémoire. Au cours de l'activation précoce d'un lymphocyte T naïf, T-bet et EOMES sont exprimés et participeraient, grâce à leur fonction redondante, à la formation des CTL en participant à l'expression des molécules effectrices IFN γ , perforine et granzyme ainsi qu'à l'expression de récepteurs au chimiokine CXCR3 et CXCR4^{155,156,158,224,225}. Cependant, suite au contrôle de l'infection, on distingue au sein d'un même clone, les lymphocytes T effecteurs terminaux qui expriment T-bet et des lymphocytes T mémoires qui expriment EOMES. Malgré des fonctions redondantes, au cours de l'activation précoce, des études montrent qu'une déficience en T-bet inhibe la formation des cellules effectrices terminales (KLRG1⁺ ; CD62L⁻ ; IL7Ra⁻) alors qu'une déficience en EOMES inhibe l'expression de CD122, CD62L, CXCR3 et CXCR4, molécules participant à la mise en place d'une signalisation IL15, de la survie ainsi que de la migration vers les ganglions lymphatiques caractéristiques des cellules mémoires (KLRG1⁻ ; CD62L⁺ ; IL7Ra⁺)²²⁵.

T-bet et Eomes sont régulés par des voies de signalisation similaires, avec la signalisation IL12 et mTOR qui favorisent l'expression de T-bet tout en réprimant l'expression d'Eomes et la signalisation Foxo1 qui favorise l'expression d'Eomes tout en réprimant l'expression de T-bet²²⁶. Ces résultats suggèrent que T-bet et Eomes agissent et sont régulés en deux temps, avec une expression coordonnée lors de l'activation précoce, nécessaire à l'expression de molécules décrites aussi bien pour les fonctions effectrices que mémoire puis l'inhibition de l'une des deux voies lors de l'établissement du profil de différenciation terminale.

1) 1)2) Balance Blimp1/BCL6

Blimp1 et BCL6 sont deux facteurs de transcription à doigt de zinc conservés dans la même voie de signalisation, caractérisés comme antagonistes et capables de se réprimer l'un l'autre²²⁷, dont les niveaux d'expressions sont déterminants pour la définition du profil effecteur ou mémoire. Blimp-1 est fortement exprimé au sein des

lymphocytes T effecteurs et participe au potentiel effecteur des CTL via l'expression de l'IFN γ , le Granzyme B ou en favorisant la migration au site inflammatoire. De plus, Blimp-1 est également caractérisé comme répresseur transcriptionnel en inhibant certains programmes mémoires. Le niveau d'expression et l'activité antagoniste de BCL6 sont directement corrélés au niveau d'expression de Blimp-1 qui l'inhibe. Alors que l'expression de Blimp-1 est montrée comme indispensable à la mise en place des fonctions effectrices des CTL^{228,229}, l'expression de BCL6 est cruciale au renouvellement des cellules mémoires matures ainsi qu'à leur longue de vie^{155,230,231}. De manière intéressante, on observe que, suite à la clearance du pathogène, l'expression de Blimp-1 diminue au sein des cellules matures. Cette diminution de Blimp-1 inversement corrélée avec une augmentation de BCL6 est associée à la population mémoire mature¹⁵⁵. Pour finir, l'étude de **Nakayama et al.** de 2011 réalisée sur des lymphocytes T CD4⁺ suggère que T-bet et BCL-6 seraient capables d'interagir et de constituer une balance T-bet/BCL-6, où T-bet réprime l'expression de BCL-6 en fonction de la disponibilité en IL-2²³².

1) 1)3) Balance ID2/ID3

ID2 et ID3 sont deux facteurs de transcription de la famille des helix-loop-helix (HLH). Ils sont tous deux exprimés par les lymphocytes T effecteurs et contribuent à la survie cellulaire. Cependant, le taux d'expression ID2/ID3 est déterminant du profil de différenciation avec ID2 participant à la survie des cellules effectrices pendant la transition naïve-effecteur et ID3 participant à la survie des cellules pendant la transition naïve-mémoire via l'expression de facteurs telle que FOXM1 et NEK2 qui stabilisent le génome^{155,233-235}. De manière intéressante, le facteur de transcription pro-effecteur ID2 est décrit comme stabilisant des gènes de survie et anti-apoptotique telle que BCL6, alors que Blimp-1 répresseur transcriptionnel de BCL6 inhibe ID3 mais pas ID2²³³, suggérant des interactions fines et complexes entre les facteurs effecteurs et mémoires.

1) 1)4) IRF4

Les facteurs régulateurs de l'interféron (IRFs) sont des facteurs de transcription impliqués dans les mécanismes de survie, de croissance, de prolifération et de différenciation des cellules immunitaires. De par leur activité anti-apoptotique et initiatrice de la prolifération, les IRFs sont des cibles au fort potentiel oncogène et

transformant. IRF4 également connue comme « multiple myeloma oncoprotein 1 » (MUM1) est un membre de la famille des IRFs dont l'expression est spécifique à la population lymphocytaire²³⁶. Au sein des lymphocytes T CD8⁺, bien qu'IRF4 ne soit pas indispensable à l'activation précoce des lymphocytes T CD8⁺, son expression est indispensable au maintien de la prolifération, de la survie ainsi que la différenciation vers le profil effecteur²³⁷⁻²³⁹. Comme pour les autres membres de la famille des IRFs, l'expression d'IRF4 est associée à l'expansion ainsi qu'à la survie cellulaire. En inhibant l'expression et l'activité de la CDKn2a, un inhibiteur de cycline-dépendant kinase (CDK) ainsi que de la protéine apoptotique BIM, IRF4 contribue à l'expansion cellulaire en favorisant la prolifération tout en diminuant l'apoptose²³⁹. Bien que les lymphocytes soient capables d'initier leur prolifération en absence d'IRF4, **Raczkowski et al.** montrent en 2013 que l'expression d'IRF4 est indispensable à l'acquisition des fonctions cytotoxiques, caractéristique de la lignée effectrice²³⁸. En parallèle, il démontre que l'absence d'IRF4 diminue l'expression des facteurs de transcription Blimp-1, T-bet et ID2 tout en augmentant l'expression de BCL6, Eomes et ID3 suggérant qu'IRF4 est un facteur-clef de la différenciation cellulaire des lymphocytes T CD8⁺. La même année, une étude indépendante démontre également l'implication d'IRF4 dans l'expression d'un panel de gènes spécifiques de la différenciation effectrice telle que l'augmentation de Grzma (Granzyme A) et de FasL (Fas Ligand) impliquées dans la mise en place des propriétés cytotoxiques des lymphocytes T ; ou la diminution de l'Il7r (récepteur à l'IL7) impliquée dans la survie des mémoires²³⁷.

1) 1)5) Le cas mTOR/Foxo1

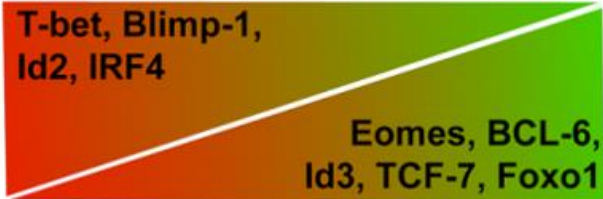
La signalisation mTOR, dépendante des complexes protéiques mTORC1 et mTORC2, est un puissant acteur métabolique senseur de la disponibilité en nutriment. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un facteur de transcription, de nombreuses études démontrent que la signalisation dépendante de mTOR est déterminante lors de la différenciation cellulaire²⁴⁰. De plus, mTOR est en étroite interaction avec le facteur de transcription Foxo1, capable à lui seul de contrôler le niveau d'expression générale des facteurs de transcription T-bet et Eomes, mais également de CD62L, CD127 et KLRG1 qui sont des marqueurs phénotypiques-clef, caractéristiques des populations effectrices ou mémoires^{226,241,242}. L'intégration de nombreux signaux par mTORC1 et mTORC2 tels que la disponibilité en nutriment, l'intégration du signal TCR et des

cytokines ainsi que son activité régulatrice de Foxo1 font de mTOR un point névralgique de la différenciation des lymphocytes T CD8⁺.

Foxo1 est un facteur de transcription de la famille des forkhead box (Fox) qui regroupe quatre protéines (Foxo1, Foxo3, Foxo4 et Foxo6) conservées au sein des mammifères. Elle régule de nombreuses fonctions physiologiques telles que la progression du cycle cellulaire, la survie cellulaire, la réponse au stress, ainsi que la différenciation cellulaire^{243,244}. L'expression de Foxo1 au sein des lymphocytes T induit directement l'expression de TCF7^{245,246}, un facteur de transcription qui régule directement l'expression d'Eomes^{247,248}. Aussi, à lui seul, le facteur Foxo1 est capable d'induire l'expression de Eomes tout en inhibant T-bet et de diriger le développement des lymphocytes T vers un profil mémoire²²⁶. De plus, l'expression de Foxo1 régule le trafic vers les organes lymphoïdes secondaires ainsi que l'auto-renouvellement des cellules via l'expression de Klf-2 et IL7Ra, CD62L et CD127 abondamment exprimées par les lymphocytes T naïfs et mémoires^{241,242,249,250} tout en diminuant l'expression de KLRG1 fortement retrouvé au sein des CTL²²⁶.

Au cours de son activation, un lymphocyte T intègre de nombreux signaux participant à l'augmentation de la signalisation mTOR qui contribue à l'inactivation de Foxo1. Cette inhibition, initiée par mTORC1 et mTORC2 mais maintenue au cours du temps par mTORC1, est une étape primordiale permettant le switch d'expression entre Eomes et T-bet, indispensable à la différenciation des effecteurs terminaux. Cependant, il est important de souligner que l'ensemble de la voie de mTOR et principalement celle de mTORC2 ne sont pas encore élucidées. En effet, bien qu'il soit clair que mTORC2 initie l'inactivation de Foxo1, son activité a pu être décrite dans des études récentes comme nécessaire à la mise en place²⁵¹ ou à l'inhibition du phénotype mémoire²⁵², suggérant un rôle transitoire de mTORC2 encore mal compris.

Effecteur T CD8⁺



Mémoire T CD8⁺

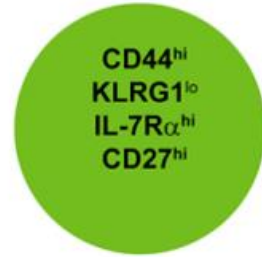


Figure I-18. Balance transcriptionnelle effecteur vs mémoire. La différenciation des lymphocytes T effecteurs ou mémoires, identifiés par l'expression de nombreux marqueurs phénotypiques (dans les cercles), est contrôlée par l'expression de facteur de transcription spécifique (dans les triangles), eux même dépendant des signaux environnementaux. Repris de Mittrucker et al 2014²²³

2) Les voies de signalisation effecteur/mémoire

La différenciation lymphocytaire est un mécanisme d'une grande plasticité, conférant à l'immunité adaptative sa capacité à pouvoir réagir à tout type d'infection. Cette plasticité et le choix de la réponse d'un lymphocyte T sont le reflet d'un ensemble de signaux directement liés au contexte infectieux présent dans le microenvironnement. Parmi ces signaux, on retrouve principalement la force de la signalisation TCR, reflet de l'affinité pour le peptide mais également de la charge en agent infectieux ainsi que le contexte cytokinique établi par la sécrétion de nombreuses cellules en fonction du type et statut de l'infection. Ensemble, ces signaux orientent la différenciation du lymphocyte T vers le sous-type cellulaire le plus adapté à répondre à l'infection.

2) 1) La force du signal TCR

La première information reçue par un lymphocyte T naïf au cours de son activation est directement liée à la reconnaissance de l'antigène et à la signalisation TCR. Plusieurs études ont démontré que la force de la signalisation TCR et des molécules de costimulation associées jouent un rôle primordial pour la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ en Teff cytotoxique ou mémoire en influençant l'activation de la voie mTOR, l'expression de récepteurs aux cytokines ainsi que l'expression des facteurs de transcription tel que T-bet/Eomes, Blimp-1/BCL6, IRF4 ou Foxo1.

Lors de la reconnaissance antigénique, la stimulation du TCR/CD3 ainsi que des molécules de costimulations activent la voie de signalisation PI(3)K-AKT. L'activité PI(3)K directement dépendante de l'activité TCR participe à l'activation par phosphorylation de PDK1 et mTORC2^{226,253}. PDK1 et mTORC2 phosphorylent

respectivement AKT en position Thr308 et S473²⁵³. La double phosphorylation en Thr308 et S473 active la protéine kinase AKT alors capable d'inhiber le facteur de transcription Foxo1. Cependant, l'activité et la phosphorylation d'AKT en position S473 assurées par l'activité mTORC2 sont transitoires et nécessitent l'activité de mTORC1 pour être maintenues au cours du temps²⁵⁴.

L'activité de mTORC1 est primordiale à l'établissement de la lignée effectrice et contribue au switch métabolique vers la glycolyse, fournissant l'énergie nécessaire à la prolifération cellulaire, à la synthèse protéique massive (voir plus bas) ainsi qu'à l'inhibition prolongée de Foxo1. Cependant, bien que l'activité de mTORC1 soit initiée par PI(3)K-PDK1 suite à la phosphorylation d'AKT en position Thr308, le maintien de son activation nécessite l'activation d'autres voies de signalisation provenant du microenvironnement telles que l'IL12²⁵⁵. Bien que la signalisation TCR soit capable d'initier et d'influencer la différenciation cellulaire, ces résultats démontrent à eux seuls que l'état d'activation ainsi que la différenciation des lymphocytes T sont finement régulés via l'interaction de plusieurs voies de signalisations indépendantes qui agissent en modulant l'activité de cibles communes.

En plus de son implication majeure sur la voie de différenciation mTOR/Foxo1²³⁷, **Man et al.** montre, via l'utilisation de deux peptides antigéniques distincts, que le niveau d'expression d'IRF4 est directement dépendant de l'affinité du TCR pour le peptide qui lui est présenté²³⁷. En parallèle, **Wang et Ning.**, en 2013, montrent que l'activité d'IRF4 est dépendante de la tyrosine kinase c-Src, connue comme l'un des acteurs principaux de la transduction du signal TCR, démontrant l'importance de la signalisation TCR sur l'activité d'IRF4²³⁶.

Aussi, l'ensemble de ces résultats démontrent que la signalisation TCR est un événement-clef de la différenciation des lymphocytes T en effecteurs ou mémoires :

- Dans le cas d'une signalisation TCR de forte affinité, la transduction du signal assurée par la s-Src, et la PI(3)K, contribuent à la mise en place de la signalisation IRF4, mTOR (mTORC1 et mTORC2), PDK1 et AKT qui ensemble contribuent à l'expression de T-bet, Blimp-1 ainsi qu'à l'inhibition de Foxo1, Eomes et Bcl6. L'ensemble de ces modifications transcriptionnelles participent à l'établissement du profil effecteur ainsi qu'à l'acquisition des propriétés fonctionnelles et migratoires caractéristiques de ces cellules.

- À l'inverse, une faible stimulation TCR limite l'expression d'IRF4 et n'est pas suffisante à inhiber l'activité de Foxo1, favorisant l'expression des facteurs de transcription mémoire Eomes et BCL6 tout en limitant l'expression de T-bet et Blimp-1, caractéristiques de la lignée mémoire.

2) 2) Signal cytokinique

Initialement identifiées comme étant des produits de la réponse immunitaire, les cytokines sont sécrétées par de nombreux types cellulaires capables de modifier le microenvironnement et de moduler l'activité et la différenciation des cellules immunitaires. Cependant, parmi les interleukines, on distingue les monokines produites par les phagocytes (macrophages, cellules dendritiques), des lymphokines sécrétées par les lymphocytes activés²⁵⁶.

Il existe un large panel d'interleukines capables de moduler directement l'activité ainsi que la différenciation des lymphocytes T suite à la reconnaissance antigénique. Parmi ces cytokines, on distingue les interleukines pro-inflammatoires, favorables au recrutement, à la prolifération et à l'activation des lymphocytes, des interleukines anti-inflammatoires, favorables à l'arrêt de la réponse immunitaire. De manière intéressante, de nombreuses études montrent que les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, dont le taux dans le microenvironnement est directement associé au contrôle de l'infection au cours du temps, contrôlent et participent à la différenciation effecteur ou mémoire des lymphocytes T activés^{155,226,257}.

Comme lors de la stimulation du TCR, la signalisation dépendante des cytokines est associée à des seconds messagers qui assurent la transduction du signal. Celle-ci est majoritairement associée à l'activation du complexe Jak-STAT, également dépendante d'un mécanisme de « balance » entre l'activation de STAT pro-effecteur et pro-mémoire.

2) 2)1) La signalisation effectrice

Comme précédemment décrit en **IV)2)1)**, la signalisation TCR joue un rôle majeur dans l'initiation de la réponse des lymphocytes. Suite à son activation, la voie PI(3)K initie la kinase PDK1, capable de phosphoryler AKT en position Thr308. Cette phosphorylation est directement couplée à l'activation de mTORC1, qui contribue à l'activité de mTORC2, capable de phosphoryler AKT en position Ser473. Cette double phosphorylation d'AKT contribue à la prolifération, ainsi qu'à l'inhibition du profil

mémoire en faveur du profil effecteur via l'inhibition de Foxo1. Cependant, la signalisation dépendante du TCR sur mTORC1 et AKT(Ser473) est transitoire et ne permet pas à elle seule d'expliquer la différenciation effectrice^{226,255}.

Au cours des phases précoces de l'infection, les cellules de l'immunité innée et adaptative ainsi que les cellules saines ou infectées au sein des tissus, sécrètent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires. Parmi ces cytokines pro-inflammatoires, l'IL12, l'IL2 ainsi que l'IFN γ sont identifiées comme ayant un rôle primordial lors de l'établissement du choix de différenciation.

La présence d'IL12 dans le microenvironnement initie au sein des lymphocytes T actifs, la signalisation STAT4 capable d'activer mTORC1. Cette activation de mTORC1, indépendante de la signalisation TCR-PI(3)K-PDK1-AKT(Thr308) permet le maintien de l'activité initiée par mTORC2 sur la phosphorylation d'AKT en S473²⁵⁵. De plus, STAT4 serait capable de maintenir l'activité de PI(3)K, capable de maintenir l'activité de PDK1 sur la phosphorylation en Thr308 d'AKT. Ensemble, mTORC1 et AKTdp (double phosphorylé) contribuent à l'expression de T-bet et l'inhibition de Foxo1, favorisant la différenciation et l'acquisition des fonctions effectrices.

En parallèle, de nombreuses études démontrent le rôle essentiel de la signalisation STAT en réponse aux IFNs²⁵⁷⁻²⁶⁰. En cas d'infection, les IFN de type I secrétés par les cellules infectées de l'immunité innée participent à la production d'IFN γ par les cellules T²⁶¹. L'induction de l'IFN γ par les IFNs de type I étant dépendante de l'activation de STAT4²⁶¹, il semble cohérent d'envisager que cette signalisation participe avec l'IL12 à l'activation de mTORC1. Par ailleurs, la signalisation de l'INF γ , dépendante de l'IFN γ R et de STAT1, participe à l'établissement des fonctions effectrices¹⁹⁸ et l'expansion clonale des cellules T^{262,263}. De manière intéressante, la perte de l'IFN γ R est associée avec une augmentation de pool mémoire en réponse à une stimulation TCR faible²⁶⁴.

Pour finir, la stimulation du récepteur à l'IL2 participe principalement à la prolifération et à la survie des cellules activées via la phosphorylation de STAT5^{265,266}. Cette activité redondante avec les récepteurs à l'IL7 et IL15 a pu être démontrée comme participant à la stabilisation de mTORC2, ainsi qu'à la survie des cellules aussi bien effectrices que mémoires²⁵⁷.

Il est important de noter que l'activation de STAT5 semble être nécessaire à l'établissement et à la survie des cellules effectrices et mémoires, alors que l'activité conjointe de STAT5 et STAT4 est corrélée avec l'expression d'ID2²³⁵, qui maintient la survie des cellules en expansion en faveur des cellules effectrices dans la balance ID2/ID3. De plus, alors que l'activation constitutive de STAT5 active AKT et BCL2, l'activation constitutive d'AKT aboutit à la diminution de l'expression des marqueurs mémoires IL7R, IL15R et BCL2 ainsi qu'à l'extinction de STAT5²⁶⁷, suggérant un rôle bivalent de STAT5.

L'ensemble de ces résultats démontrent que la différenciation effectrice est l'aboutissement d'un ensemble complexe de signalisations, incluant le signal TCR et la coopération de nombreuses cytokines dont les interactions complexes modulent et/ou potentialisent l'expression de facteurs communs, capables d'orienter la différenciation.

2) 2)2) La signalisation mémoire

Le maintien et la survie des cellules mémoires sont majoritairement associés à l'expression des récepteurs à l'IL7 et IL15. Ces deux voies de signalisations ont pu être associées à l'activation des STAT5 dont l'activité, comme dans le cas de l'IL2, est associée à une activation de mTORC2, à la phosphorylation d'AKT en S473 et à la survie cellulaire. Cependant, dans ce contexte cellulaire, la phosphorylation d'AKT en position S473, dépendante de STAT5 est associée à une augmentation de l'établissement du profil mémoire^{267,268}. Aussi, on observe que mTORC2, en fonction de la voie de signalisation qui lui est associé, est capable d'initier la survie et prolifération des cellules effectrices ou mémoires.

En parallèle, une étude particulièrement intéressante montre que l'IL7 seul induit l'activité mTORC1 et maintient un niveau basal de T-bet, associé avec la prolifération homéostatique et la survie des cellules naïves alors que l'association de la signalisation IL7/IL15 aboutit au switch d'expression T-bet/Eomes en faveur d'Eomes, caractéristique des cellules mémoires¹⁵⁰. Au cours de la même étude, l'extinction de mTOR associé à un signal IL7 unique permet l'induction du switch vers Eomes en absence de l'IL15, suggérant que l'activité de l'IL15 associée à l'activité de l'IL7 inhibe mTORC1¹⁵⁰. La signalisation de l'IL15 étant dépendante des STAT5 et 3²⁶⁹, cet effet inhibiteur de mTORC1 peut être associé à la suractivation de STAT5 ou à l'activité associée de STAT5 et de STAT3 (voir plus bas).

Ensemble, ces études suggèrent que la protéine kinase AKT est capable d'assurer à elle seule plusieurs fonctions indépendantes dont la mise en place est directement liée au site de phosphorylation activé. On semble donc pouvoir distinguer la phosphorylation en position S473 favorable à la survie et prolifération des cellules effectrices et mémoires, de la phosphorylation en position Thr308 déterminant le profil de différenciation via l'expression de mTORC1. Bien que l'expression et la stimulation des récepteurs à l'IL15 et IL7 soient associées à la survie, la prolifération et la migration des mémoires, aucune étude ne démontre réellement que ces récepteurs soient impliqués dans le choix de la différenciation de ces cellules.

Alors que la signalisation effectrice est corrélée à l'expression et à la présence de cytokines pro-inflammatoires, la signalisation mémoire semble être le reflet d'un équilibre entre cytokines pro et anti-inflammatoires. En effet, des études de vaccination et d'infection menées entre 2007 et 2010 montrent l'implication des interleukines IL6, IL10 et IL21 dans la définition du profil mémoire des lymphocytes T CD8+. L'interleukine 6 étant une cytokine pro-inflammatoire fortement exprimée au début de l'infection et l'interleukine 10 étant une cytokine anti-inflammatoire participant à l'arrêt de la réaction immunitaire suite à la clearance du pathogène, il est cohérent de penser que la différenciation mémoire est un mécanisme finement régulé tout au long de la réponse immunitaire²⁷⁰⁻²⁷³.

Ensemble, ces interleukines participent à l'activation de STAT3 qui semble être une signalisation-clef de la différenciation mémoire. En effet, l'ensemble des facteurs BCL-6, Eomes et SOCS3, mis en évidence au sein des populations mémoires KLRG1lo/IL7R α hi, semble être sous la dépendance de STAT3^{155,270}. Alors que l'expression de BCL-6 et Eomes impacte directement la différenciation et l'acquisition des fonctions mémoires, SOCS3 est quant à lui un inhibiteur des Jak dont l'activité est capable de bloquer la signalisation de l'IL12²⁷⁰. De plus, l'expression de STAT3 serait également nécessaire à la migration des lymphocytes T CD8 mémoires vers les organes lymphoïdes secondaires ainsi qu'à leur survie via l'expression des récepteurs transmembranaires CD62L et IL-7Ra. Aussi, l'expression de STAT3 dépendantes des cytokines IL6, IL10, IL21 aurait un impact majeur sur les balances, T-bet/Eomes, BLIMP1/BCL6 et ID2/ID3. Cependant, en accord avec des données obtenues au sein des populations lymphocytaires B²⁷⁴, l'activation de STAT3 semble également être nécessaire au maintien de l'expression de BLIMP1 considérée comme

indispensable à la mise en place de la lignée effectrice, suggérant l'implication d'autres voies de signalisations²⁷⁰.

En parallèle, la neutralisation du pathogène est associée avec la diminution de l'inflammation et la sécrétion d'IL12 au niveau des tissus infectés. Alors qu'une forte concentration en IL12 est associée à la signalisation mTORC1 et l'inhibition de Foxo1, une faible concentration en IL12 est associée à la transcription et l'activation de Foxo1. En plus de réguler la balance T-bet/Eomes en faveur de l'expression d'Eomes, l'expression de Foxo1 régule le trafic cellulaire vers les organes lymphoïdes secondaires via l'expression de CD62L et l'autorenouveaulement via l'expression de l'IL7R et Klf-2, deux caractéristiques fonctionnelles des cellules mémoires^{226,241,242,250}.

2) 3) Le métabolisme : cause et conséquence de la différenciation

Le métabolisme cellulaire est un mécanisme extrêmement régulé correspondant à la somme des activités de synthèse (anabolisme) et des activités de dégradation (catabolisme). Ensemble, l'anabolisme et le catabolisme assurent la production d'énergie nécessaire à la survie, la prolifération, et la synthèse protéique d'une cellule. Au sein des lymphocytes T, bien que le type de métabolisme soit directement associé au stade de différenciation et à la fonction d'un lymphocyte, de nombreuses études démontrent aujourd'hui que l'initiation d'une voie métabolique est également capable d'influer sur le choix de la différenciation d'un lymphocyte.

2) 3)1) La phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative est un processus permettant la phosphorylation de l'ADP en ATP grâce à l'énergie libérée par l'oxydation de donneurs d'électrons par la chaîne respiratoire des mitochondries. Il s'agit d'un processus au rendement énergétique important, capable de capter et régénérer les coenzymes (tels que NAD/NADH) formés lors des réactions de catabolisme tels que le cycle de Krebs ou la β -oxydation des acides gras. Au cours de ce processus, le NADH formé dans la matrice mitochondriale lors du catabolisme est réduit en $\text{NAD}^+ + \text{H}^+$ libérant un électron (e^-), capable de générer de l'énergie via une cascade d'oxydoréduction au niveau de la chaîne de transport des électrons. Ce transfert d'énergie est utilisé par les pompes à protons qui assurent le passage des H^+ libérés lors de la réduction de NADH de la matrice mitochondriale vers le cytosol cellulaire. Cependant, le gradient électrochimique ainsi formé par l'accumulation d' H^+ dans le cytosol favorise l'entrée

d'H⁺ dans la mitochondrie. Ce reflux est assuré par l'ATP synthase, capable de convertir l'ADP en ATP (**Figure I-19**).

Ce processus énergétique au fort rendement énergétique est employé par les cellules naïves et mémoire. Bien que ces cellules maintiennent un niveau énergétique bas, le processus de phosphorylation énergétique assure la synthèse d'ADN, la formation de lipides et de protéines indispensables à la prolifération homéostatique et à la survie cellulaire à partir de peu de métabolites telles que le glucose ou les acides gras^{275,276}. Même si ces deux types cellulaires assurent la majeure partie de leur besoin en énergie par la phosphorylation oxydative, plusieurs études montrent des différences métaboliques entre les lymphocytes mémoires et naïfs, en accord avec une étape d'activation et l'initiation de modifications transcriptionnelles et fonctionnelles.

2) 3)1) Le checkpoint mitochondrial

En comparaison au lymphocyte T naïf, les cellules mémoires expriment une activité respiratoire (SRC) supérieure, associé à une augmentation du nombre de mitochondries et l'augmentation des protéines associées à la chaîne de transport des électrons (ETC), suggérant une activité et un rendement en ATP plus important au sein des mémoires^{277,278}. De plus, **S. Dimeloe et al.** démontrent via l'utilisation de lymphocytes T CD4+ mémoires, une augmentation des capacités de glycolyse par rapport aux lymphocytes T naïfs. Aussi, les lymphocytes T mémoires semblent exprimer une activité métabolique intermédiaire entre les lymphocytes T naïfs quiescents et les lymphocytes T effecteurs favorables à une réponse rapide lors d'un second contact avec l'antigène. En parallèle, les mémoires contiennent des mitochondries allongées, démontrées comme étant les résultantes de la fusion des mitochondries, augmentant la surface mitochondriale, le rapprochement des protéines ETC et la formation par oxydation de NADH, indispensable à la formation d'ATP^{276,278}. Celle-ci a pu être associée à l'expression d'Opa1, une protéine dont l'inactivation chez la souris perturbe la formation des cellules T mémoires sans influencer la génération des CTLs²⁷⁹. L'ensemble de ces résultats démontre que le métabolisme assuré et dépendant des mitochondries est un évènement déterminant de la formation des cellules mémoires.

Bien que l'ensemble de ces résultats suggèrent que les lymphocytes T mémoires soient métaboliquement à mi-chemin entre les naïfs et les effecteurs, le travail de

Song et al. démontre l'existence d'étapes moléculaires spécifiques de la mise en place des cellules mémoires²⁷⁹.

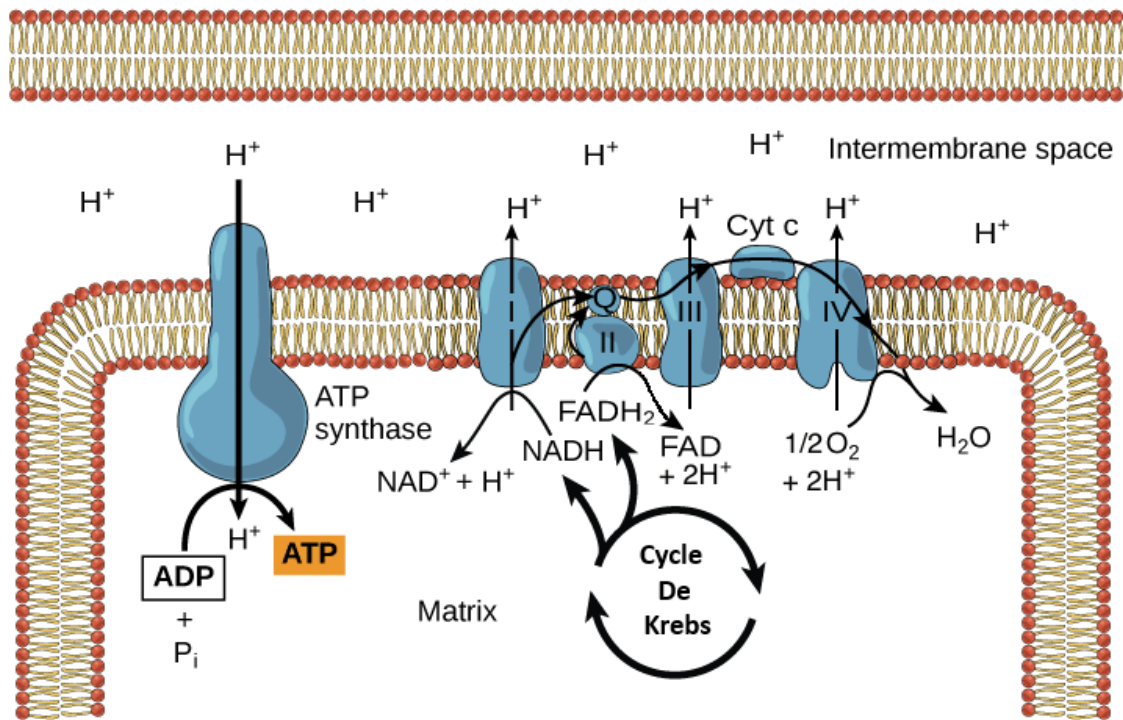


Figure I-19. La phosphorylation oxydative. Le NADH et FADH₂ générés lors du cycle de Krebs sont réduits en NAD⁺/H⁺ et FAD/2H⁺ respectivement par les complexes I et II de la chaîne de transport des électrons localisés à la membrane mitochondriale. Les électrons (e⁻) libérés génèrent de l'énergie via une cascade d'oxydoréductions le long de la chaîne de transport des électrons et permet d'assurer le passage des H⁺ vers le cytoplasme par les pompes à proton. Les protons libérés dans le cytoplasme forment un gradient qui favorise l'entrée d'H⁺ dans la mitochondrie via le canal de l'ATP synthase qui utilise les ions H⁺ libres pour assurer la formation d'ATP à partir d'ADP et d'un phosphate inorganique (Pi). Adapté de <http://botanystudies.com/oxidative-phosphorylation/>

2) 3)2) La glycolyse aérobie

La glycolyse est la voie principale du métabolisme du glucose et permet la génération d'énergie. Au cours de ce processus, une molécule de glucose est préalablement phosphorylée par la glucokinase en glucose-6-phosphate (G6P) puis subit une étape d'isomérisation en fructose-6-phosphate et est phosphorylée en fructose-1,6-bisphosphate par la phosphofructokinase. Cette étape consommant deux molécules d'ATP est indispensable à la génération de deux molécules de G3P (glycéraldéhyde-3-phosphate) phosphorylées en acide 1,3-bisphosphoglycerine par la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, capable de transférer un phosphate inorganique Pi via la réduction du NAD⁺ en NADH. Chaque molécule acide 1,3-bisphosphoglycerine contient alors deux phosphates qui seront récupérés et transférés à des molécules

d'ADP par la phosphoglycérate kinase et la pyruvate kinase. Aussi, la glycolyse est un processus au faible rendement énergétique permettant la formation finale de deux molécules d'ATP (4ATP finale – 2ATP initiale) et deux molécules de NADH capables d'alimenter la chaînes de transport des électrons²⁷⁶ (**figure I-20**). Cependant, bien que la glycolyse ait un rendement énergétique faible, le catabolisme du glucose aboutit à la formation finale de deux molécules de pyruvate, capables d'intégrer et alimenter le cycle de Krebs mitochondrial, dont les produits alimentent la chaîne de transfert des électrons (phosphorylation oxydative) ou de générer de l'énergie en anaérobiose via la voie de la fermentation.

Suite à leur activation, les lymphocytes T naïf doivent rapidement proliférer, produire et sécréter l'ensemble des molécules effectrices nécessaires au contrôle de l'infection. Cette réponse nécessite un fort apport en énergie assuré par une augmentation de la glycolyse. Suite à la stimulation du TCR et des molécules de costimulation, les lymphocytes réalisent une reprogrammation métabolique assurée par l'augmentation de l'expression des gènes spécifiques de la glycolyse tels que des transporteurs transmembranaires (glucose, glutamine et amino-acide) ainsi que des enzymes nécessaires à leur catabolisme²⁸⁰⁻²⁸². L'ensemble de cette reprogrammation assure l'augmentation de la biodisponibilité et du catabolisme des métabolites intracellulaires ainsi que la formation d'énergie sous forme d'ATP.

Des études démontrent que la manipulation du profil métabolique de la glycolyse au sein des lymphocytes T CD8+ est capable d'affecter la mise en place des populations effectrices et mémoires durant la réponse cellulaire^{283,284}. En effet, l'activation forcée de la glycolyse par la surexpression de l'enzyme glycolytique PGAM1 limite la formation des cellules mémoire de longue vie suivant l'infection. À l'inverse, le blocage de la glycolyse via l'utilisation du 2-deoxyglucose, un inhibiteur compétitif du glucose non métabolisable par la glycolyse, induit l'expression des gènes pro-mémoires ainsi que la formation de cellules à longue durée de vie capable de répondre à une réinfection²⁸³. Aussi, ces études suggèrent que la glycolyse n'est pas uniquement le reflet de la différenciation mais participe au choix de la différenciation cellulaire. De nombreuses études basées sur l'étude de la glycolyse et des facteurs associés démontrent que le choix de la voie métabolique est capable d'influencer l'expression de gènes et ainsi de participer à la différenciation cellulaire.

2) 3)2)1) mTOR/HIF-1 checkpoint

HIF-1 est un facteur de transcription directement régulé par l'activité de la signalisation mTOR et de la disponibilité en oxygène (O₂)²⁸⁵.

L'oxygène est un métabolite cellulaire central induisant des réponses cellulaires et physiologiques immédiates. Suite à des modifications de concentration en O₂, la régulation de l'homéostasie est directement associée à des réponses cellulaires influençant la fonction ainsi que la survie des cellules. La voie HIF-1 α est directement associée à la réponse liée à la concentration en oxygène. Parmi les « sensor » de l'O₂, on retrouve la chaîne respiratoire, la NADPH oxydase ainsi que la protéine prolyl-4-hydroxylase (PHD) capables de faire le lien entre la disponibilité en O₂ et la transduction du signal^{286,287}. En présence d'O₂ (normoxia), PHD inhibe le complexe HIF-1 α /HIF-1 β par hydroxylation de HIF-1 α qui subit une polyubiquitination avant d'être dégradé par le protéasome. À l'inverse, en condition d'hypoxie, lorsque l'O₂ vient à manquer, PHD n'est plus en mesure d'hydroxyler et dégrader le facteur HIF-1 α alors capable de former le complexe HIF-1 (association HIF-1 α /HIF-1 β)²⁸⁷.

Au cours de l'activation d'un lymphocyte T, la stimulation TCR/cytokines ainsi que la migration cellulaire au sein des tissus infectieux induisent respectivement l'augmentation de la signalisation mTOR et la diminution de la disponibilité en O₂. Ensemble, ces processus cellulaires participent à l'activation et l'expression des gènes associés à HIF-1 (**figure I-21**). Cette activité de HIF-1 en hypoxie lors de la stimulation TCR participe au maintien de la glycolyse via l'expression de gènes-clef tels que Glut1 qui assure le transfert du glucose au niveau intracellulaire, ainsi qu'aux fonctions effectrices des lymphocytes T CD8⁺ via l'expression du TGF β , TNF et l'IFN γ ²⁸⁸.

À noter que, l'inhibition de la glycolyse (2-deoxyglucose) ou de la signalisation mTOR, dont l'activité est un point-clef de la différenciation, inhibe l'expression de nombreux facteurs dépendants de l'activité d'HIF-1 ainsi que la production de nombreuses molécules effectrices^{285,289,290}. En parallèle, des études menées sur les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ montrent que BCL-6, fortement exprimé au sein des lymphocytes T mémoires, réprime les gènes de la glycolyse activée par HIF-1²⁹¹. Ensemble, ces études démontrent que le métabolisme et le contrôle des gènes associés est une étape primordiale de l'établissement des profils de différenciation.

Pour finir, des études démontrent qu'au sein des lymphocytes T CD4+, l'activation de HIF-1 augmente l'activité de ROR γ t et diminue l'activité de Foxp3, deux facteurs de transcription participant fortement à l'établissement des profils de différenciation Th17 et Treg respectivement²⁹²

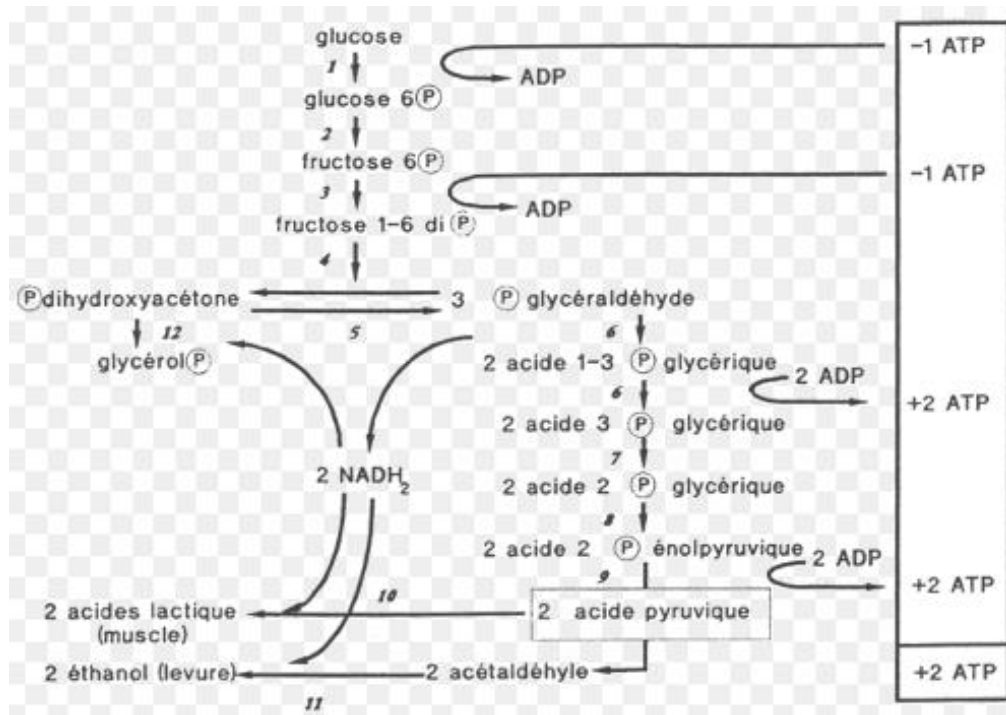


Figure I-20. La glycolyse aérobie. 1. hexokinase 2. Glucose-6-phosphate isomérase 3. Phosphofructokinase-1 4. Fructose-biphosphate aldolase 5. Triose-phosphate isomérase 6. Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et phosphoglycérate kinase 7. Phosphoglycérate mutase 8. enolase 9. Pyruvate kinase. **Bilan énergétique** : 2 mol ATP + 2 mol NADH. Schéma récupéré de <http://calamar.univ-ag.fr/uag/staps/cours/anat/new/physio.htm>

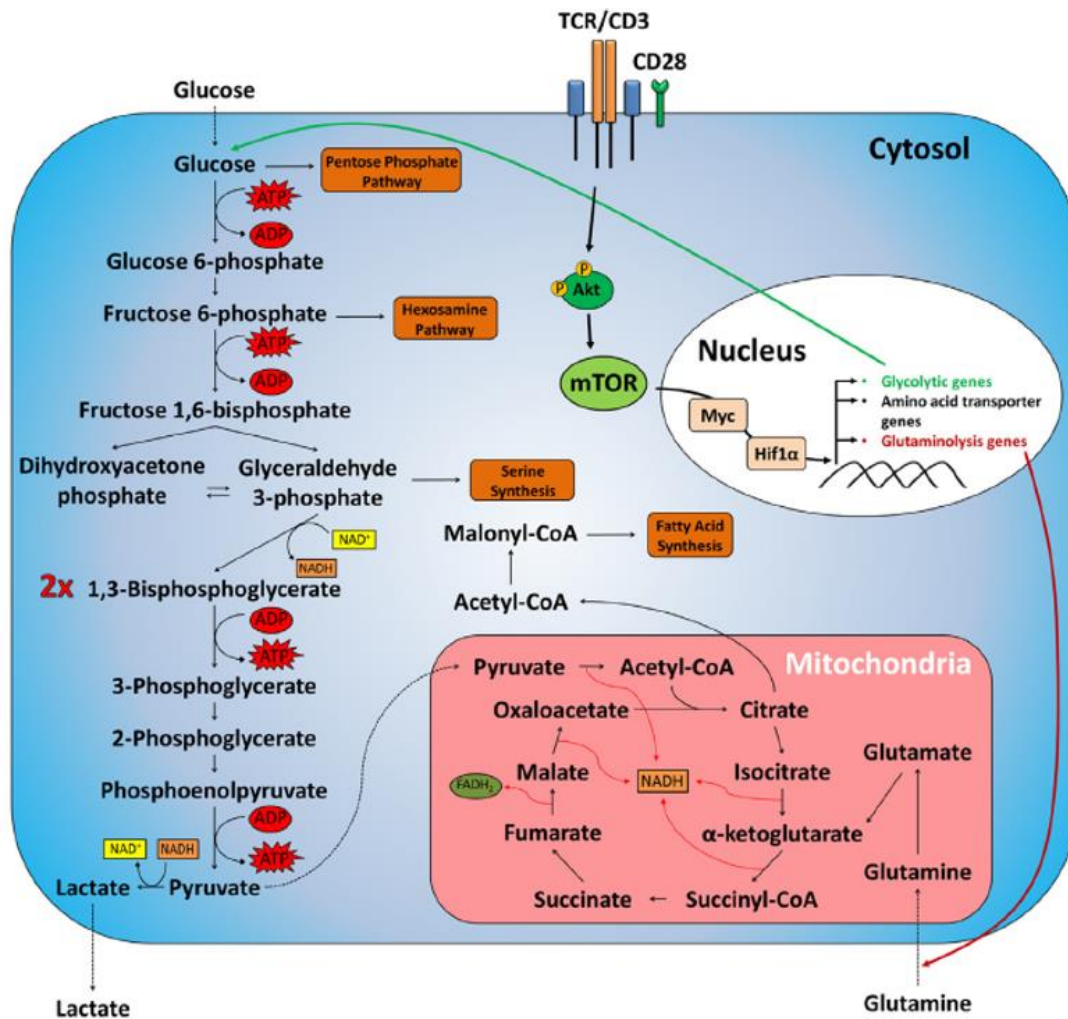


Figure I-21. L'activité des voies métaboliques est dépendante de la signalisation TCR. La stimulation du TCR induit l'activation de la voie mTOR et Hif1 α qui module l'expression de gènes clés de la glycolyse et glutaminolyse. L'augmentation du glucose intracellulaire via l'augmentation de l'expression du canal Glut1 augmente la production d'énergie dépendante de la glycolyse et augmente la concentration en pyruvate. Le pyruvate est converti en énergie, soit par sa dégradation en lactate qui régénère une mol de NAD⁺ utilisable lors de la glycolyse, soit en alimentant le cycle de Krebs suite à sa conversion en acétyl-CoA. Chaque pyruvate génère alors 4NADH et 1FADH₂ capables d'alimenter la chaîne de transport des électrons (cf. **figure I-22**). Repris de Almeida et al. 2016 ²⁷⁶

3) Modèles cellulaires de l'hétérogénéité

On observe qu'il existe de nombreuses voies et facteurs de différenciation capables de coopérer et d'orienter la différenciation cellulaire vers la voie effectrice ou mémoire en fonction des signaux reçus par le TCR, le microenvironnement et/ou la disponibilité en métabolite. En parallèle, de nombreuses études démontrent qu'une cellule naïve unique est pluripotente et capable, suite à son activation et prolifération, de former un pool de cellules effectrices et mémoires²⁹³⁻²⁹⁷, excluant la notion d'un modèle de séparation des précurseurs (**Figure I-22a**). Cependant, bien que cette notion soit acceptée par la communauté scientifique, la manière dont cette hétérogénéité

phénotypique et fonctionnelle se forme au cours de la réponse cellulaire à partir d'une seule cellule initiale reste controversée.

Actuellement, plusieurs modèles de différenciation, appuyés par des démonstrations expérimentales, sont retenus et discutés par la communauté pour justifier l'hétérogénéité cellulaire effecteur et mémoire. Cependant, à l'heure actuelle, aucun de ces modèles ne permet à lui seul d'expliquer l'ensemble de la diversité observée, suggérant que ces modèles ne sont pas mutuellement exclusifs mais participent ensemble à la formation de la diversité cellulaire.

3) 1) Modèle de la séparation des précurseurs

Le modèle de la séparation des précurseurs considère que les lymphocytes T naïf sont préprogrammés au sein du thymus pour se différencier suite à leur activation en lymphocyte T mémoire ou effecteur. Cependant, plusieurs études démontrent aujourd'hui que les cellules naïves sont multipotentes et capables de se différencier en effecteur et mémoire suite à leur stimulation^{296,297}. Ce modèle étant peu cohérent avec les observations scientifiques, celui-ci ne sera pas plus détaillé (**Figure I-22a**).

3) 2) Voie de différenciation linéaire

Le modèle de la différenciation linéaire considère que l'ensemble des progénies d'un lymphocyte T naïf activé ont la capacité de passer par l'ensemble des stades de différenciation cellulaire en suivant un ordre préétabli au cours du temps (**Figure I-22b**).

Dans leurs travaux, **S.L Swain (1994)** et **L. Bruno et al. (1995)** suggèrent que les lymphocytes T effecteurs à courte durée de vie, mis en place rapidement suite à la reconnaissance d'un pathogène, sont capables d'engager une étape de différenciation leur conférant des propriétés de cellules mémoires à longue durée de vie lors des étapes tardives de la réponse immunitaire^{298,299}. Plus récemment, le modèle mathématique mis en place par **Crauste et al.** appuie ce modèle de différenciation linéaire³⁰⁰. Cependant bien que ce modèle soit en accord avec les phases de la réponse immunitaire adaptative, où l'on observe dans un premier temps une augmentation des cellules effectrices capables de neutraliser l'infection, puis l'apparition du pool mémoire lors des phases tardives capables de maintenir une immunité à long terme, aucune démonstration biologique ne confirme directement qu'un lymphocyte T effecteur ait le potentiel de réaliser cette étape de différenciation

directe vers le statut mémoire, suggérant que l'apparition des mémoires n'est pas le reflet de leur différenciation tardive mais plutôt le reflet de la diminution des cellules effectrices en surnombre avant la phase de contraction de la réponse immunitaire. Bien que ce modèle de différenciation reste envisageable dans le cas de différenciation tardive, des études montrent aujourd'hui que des cellules mémoires spécifiques dérivées d'un lymphocyte T naïf unique peuvent être observées dès les phases précoces de l'infection^{295,301}.

En parallèle, de nombreuses études suggèrent l'existence d'un modèle de différenciation linéaire : lymphocyte T naïf vers mémoire puis effecteur. En effet, que ce soit en termes de fonction, phénotype ou profil de transcription génique, les cellules mémoires tendent à être à « mi-chemin » entre le statut naïf et effecteur.

Comme décrit précédemment, les lymphocytes T naïfs et mémoires sont des cellules à longue durée de vie, localisées au niveau des organes lymphoïdes secondaires et capables de proliférer et de se différencier en cellules effectrices suite à la rencontre d'un antigène spécifique alors que les cellules effectrices sont des cellules à courte durée de vie, localisées au niveau des tissus infectieux. La survie et la localisation des cellules naïves et mémoires, au sein des organes lymphoïdes secondaires, sont assurées par des marqueurs et récepteurs communs, tels que le CD127 (IL7R), le CD27 ou le CD62L dont l'expression est perdue par les cellules effectrices. En parallèle, les cellules mémoires expriment des marqueurs d'activation en commun avec les lymphocytes T effecteurs tels que CD44 (impliqué dans la recirculation des organes lymphocytes secondaire vers le flux sanguin) qui ne sont pas exprimés par les cellules naïves^{155,223}. Cependant, les mémoires n'expriment pas les marqueurs de différenciation terminale, telle que KLRG1, uniquement exprimé par les cellules effectrices à courte durée de vie. Ensemble, ces résultats, basés sur des analyses phénotypiques, suggèrent que les cellules mémoires sont des cellules intermédiaires entre le profil naïf et effecteur qui expriment des marqueurs d'activation (justifiant une réactivation plus rapide) tout en conservant les marqueurs de survie cellulaire et de localisation exprimés par les cellules naïves.

En parallèle, de nombreuses études tendent aujourd'hui à démontrer que les lymphocytes T mémoires sont des cellules à « mi-chemin » entre le statut naïf et effecteur, aussi bien en termes de fonction, de phénotype mais aussi de profil transcriptionnel. Fonctionnellement, on observe que les lymphocytes naïfs et

mémoires sont tous deux des cellules à longue durée de vie, retrouvés au niveau des organes lymphoïdes secondaires alors que les cellules effectrices à courte durée de vie seront retrouvées au niveau de la pulpe rouge de la rate, lieu de dégradation de nombreuses cellules du flux sanguin³⁰². Phénotypiquement, on observe que les lymphocytes T naïfs et mémoires partagent de nombreux marqueurs et récepteurs tels que CD127 et CD27 assurant leur survie ainsi que CD62L qui participe à la migration vers les organes lymphoïdes secondaires dont l'expression est perdue par les cellules effectrices^{223,303}. Cependant, les cellules mémoires expriment également des marqueurs d'activation non exprimés par les cellules naïves tels que CD44 impliqué dans la recirculation des organes lymphoïdes secondaires vers le flux sanguin et l'extravasation au sein des tissus infectieux³⁰⁴ également exprimés par les effectrices mais n'exprimeront pas les marqueurs d'activation terminaux tels que KLRG1²²³. Des études de transcription génique, réalisées par **Holmes et al. 2005** démontrent également un profil d'expression mémoire à mi-chemin entre le profil des cellules naïves et celui des effectrices. Au cours de cette étude, 156 gènes ont pu être regroupés en fonctions de leur taux d'expression dans les différentes populations (naïve, mémoire, effectrice). L'étude montre qu'une grande partie des gènes fortement exprimés au sein des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs et non exprimés au sein des lymphocytes T naïfs, sont légèrement exprimés par les lymphocytes T mémoires. Cette expression modérée de gènes tels que la perforine, le granzyme B et CD44 atteste du statut de pré-activation des cellules mémoires et justifie leur activation et réaction plus rapide lors d'une seconde rencontre avec leur antigène. À l'inverse, on observe que des gènes tels que le CD62L ou le CCR7, fortement exprimés par les cellules naïves et réprimés par les cellules effectrices sont modérément exprimés par les cellules mémoires attestant un maintien des fonctions naïves. Bien qu'il existe des gènes qui soient exprimés au même niveau entre les cellules effectrices et mémoires (HLA DR, LFA-3), aucun des 156 gènes considérés au cours de cette étude n'a pu être montré comme étant fortement exprimé par les cellules naïves et effectrices tout en étant réprimé par les mémoires, suggérant fortement cet état d'intermédiaire des cellules mémoires³⁰⁵.

Cette idée d'un schéma linéaire naïf, mémoire, effecteur peut facilement s'associer avec le modèle du potentiel régressif.

3) 3) Modèle du potentiel régressif

Dans le modèle du potentiel régressif, le stade de différenciation final d'un lymphocyte est directement associé avec le nombre de fois qu'un lymphocyte rencontre un signal stimulateur. Ce modèle est discuté pour la première fois en 1995, suite à l'étude de **Renno et al.** qui démontre que l'état d'activation d'un lymphocyte T est directement liée au nombre de fois que celui-ci a proliféré. Associé à ces observations, ils observent que les lymphocytes T ayant fortement proliféré sont plus sensibles à l'apoptose que les lymphocytes activés de même spécificité qui n'ont pas subi de nombreux cycles de division. Aussi, plus un lymphocyte rencontre de stimuli successif, plus il prolifère et plus il évolue vers un stade de différenciation effecteur terminal à courte durée de vie³⁰⁶. De manière intéressante, lors des étapes précoces d'une infection, le pathogène est en expansion et génère une réponse inflammatoire par l'organisme hôte. Ensemble, la forte pression en pathogène ainsi que les cytokines inflammatoires ont pu être démontrées comme étant d'importants stimuli générant la prolifération cellulaire ainsi que la différenciation en cellule effectrice^{155,156,307}. À l'inverse, la diminution de l'exposition à l'antigène et/ou de l'inflammation, via un traitement avec un anti-inflammatoire augmente la génération des cellules mémoires^{156,307,308}. Enfin, il a pu être démontré que suite à une stimulation de 4-5 jours, l'élimination de l'exposition à l'antigène diminue la fraction des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs terminaux, suggérant que la taille du pool effecteur terminal formé est directement dépendant de la disponibilité en antigène tout au long de la réponse immunitaire^{212,309}. Aussi, le modèle du potentiel régressif peut aisément être associé avec le modèle linéaire naïf, mémoire, effecteur où un lymphocyte T naïf est capable de passer par l'ensemble des stades de différenciations, en fonction du nombre de stimulations rencontrées (**Figure I – 22c**).

3) 4) Modèle de la force des signaux

Dans le modèle de la force des signaux, le stade de différenciation final d'un lymphocyte T naïf est associé à la force globale et cumulée des signaux en provenance de la stimulation TCR, des molécules de costimulation ainsi que des cytokines lors de l'activation primaire. Aussi, dans ce modèle, on observe qu'un lymphocyte T naïf activé par un signal fort favorisera la prolifération et la différenciation des cellules effectrices alors que des signaux faibles ou intermédiaires favoriseront la formation des cellules mémoires (**Figure I-22d**). Comme vu précédemment en **IV)2**,

de nombreuses études attestent que la force du signal TCR, l'affinité du TCR pour son ligand ainsi que les cytokines pro ou anti-inflammatoires sont capables d'orienter la différenciation aussi bien vers le statut effecteur que mémoire. Cependant, bien que ce modèle ne soit pas à exclure et qu'il soit cohérent de penser que la primo-activation soit un signal déterminant dans le choix de la différenciation finale d'un lymphocyte T, le modèle de la force des signaux ne semble pas pouvoir expliquer à lui seul l'ensemble de l'hétérogénéité observable chez l'homme et suggèrent l'activation d'au moins deux cellules naïves de même spécificité, au même moment, en présence de signaux stimulateurs différents pour justifier l'observation précoce des cellules effectrices et mémoires.

3) 5) Modèle de la division asymétrique : ACD

La mitose est un événement permettant d'assurer le renouvellement cellulaire. La plupart du temps, on observe des événements de division dit « symétrique » permettant la formation de deux cellules filles identiques à partir d'une cellule mère. Cependant, dans certain cas, des événements de division dit « asymétrique » (ACD) permettent la formation de deux cellules filles qui évolueront dans des voies de différenciations différentes à partir d'une seule cellule mère. Aussi, l'ACD est un mécanisme-clé et conservé au sein des espèces permettant de générer de l'hétérogénéité cellulaire³¹⁰. Dans les cas de l'embryogénèse, des études démontrent que l'hétérogénéité cellulaire est assurée par des événements d'ACD spontanés lors des premiers cycles de division de l'œuf. Chez l'adulte, bien que l'ACD spontané soit un mécanisme qui ne semble pas être maintenu, des études démontrent que les cellules souches, maintenues dans des niches, sont capables suite à la reconnaissance d'un signal polarisant, d'engager des événements d'ACD assurant le maintien d'une cellule souche et la formation d'une cellule évoluant dans un profil de différenciation³¹¹.

3) 5)1) Mécanisme et étape de l'ACD

Des études réalisées sur de nombreux modèles biologiques (drosophile, *C. elegans*, etc.) ont permis de mettre en évidence les différents événements contrôlant la mise en place de l'ACD et l'acquisition de profils de différenciation distinct suite à la mitose. Chez l'adulte, la mise en place de l'ACD est contrôlée par un signal polarisé assuré par des contacts cellule-cellule. Ce signal extracellulaire permet le recrutement de protéines du réseau de polarité à la membrane cellulaire. À ce stade, des protéines du

réseau de polarité différentes sont recrutées à la membrane du pôle proximal (proche du signal) et distal (à l'opposé du signal stimulateur) assurant la mise en place d'un axe de polarité indispensable au bon fonctionnement des cellules T (**Tableau 2**). Les complexes protéiques ainsi formés aux pôles distal et proximal assurent le recrutement de facteurs de transcriptions différents qui se concentrent soit au pôle distal soit au pôle proximal. Le maintien de cet axe de polarité tout au long de la mitose et la mise en place d'un axe de division perpendiculaire à l'axe de polarité assurent la formation de deux cellules qui héritent de facteurs de transcription différents. Ces facteurs de transcription migrent alors aux noyaux et assurent l'expression de gènes spécifiques et différents entre les deux cellules filles permettant leur évolution dans des voies de différenciations distinctes^{310,311}. (**Figure I-22e**)

Polarity protein	Known phenotypes	Lymphocyte phenotype
<p>PAR-1</p> <p>PAR-1</p> <p>Par1b/MARK2/EMK</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Mutation (<i>C. elegans</i>): controls spindle positioning (12) • Mutations (<i>Drosophila</i>): failed oocyte polarity. Phenotypes can be rescued by expressing ParN1 isoforms (121) 	<ul style="list-style-type: none"> • Dominant negative mutation (T cells): loss of Par1b polarization and TCR-induced MTOC polarization (111) • Loss (B and T cells): normal B and T cell development. CD4⁺ T cells exhibit higher TCR activation, B cell T-dependent and T-independent responses are altered, suggesting autoimmunity (112)
<p>PAR-3</p> <p>Bazooka</p> <p>Par3, ASIP, PARD3</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Mutation (<i>C. elegans</i>): posterior shift during P0 asymmetric cell division (15) • Mutation (<i>Drosophila</i>): loss of apical cue for Inscuteable localization in asymmetrically dividing neuroblasts (25) • Loss (<i>Drosophila</i>): disruption of embryo basolateral membrane polarity during mid-gastrulation (122), mislocalization of Numb, and planar symmetry of pl cell during sensory organ precursor ACD (123) failed oocyte ACD (124) • Removal/ectopic expression (mammalian neocortex): reduction of ACD and transformation of glial progenitor fate (57) 	<ul style="list-style-type: none"> • N/A. Par3 is excluded from the T cell uropod, and may localize transiently to the synapse during immunological synapse formation (76)
<p>PAR-6</p> <p>Par6</p> <p>Par6 α, β, and γ/PARD6 A, B, and C</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Mutation (<i>Drosophila</i>): failure of oocyte differentiation (45) 	<ul style="list-style-type: none"> • Overexpression of Par6 N-terminal aPKC interacting domain reduces T cell uropod formation (106)
<p>Pkc-3</p> <p>Atypical PKC</p> <p>PKCζ and ξ</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Mutation (<i>C. elegans</i>): posterior shift during P0 division (15) • Knockdown (<i>Drosophila</i>): reduced cell proliferation in both neuroblasts and epithelia (34, 125) • Loss (<i>Drosophila</i>): loss of AB cell polarity (126), failed oocyte ACD (124) 	<ul style="list-style-type: none"> • Overexpression/dominant negative mutation (T cells): randomizes F-actin distribution, impairs uropod formation, motility, defects in T cell scanning (106, 127) • Drug inhibition of aPKC/Par6 interaction (T cells): defective Numb localization during T cell ACD (94) • Loss: delay in secondary lymphoid organ formation (66), no naive T cell defects, Th2 differentiation but not Th1 differentiation is impaired, inhibition of ovalbumin induced allergic airway disease (108) • Combined PKCζ/ξ loss (HSC's, B and T cells): normal HSC self-renewal, engraftment, differentiation, interaction with the bone marrow microenvironment, polarization, self-renewal. Normal mature B cells and T cells numbers (56)
<p>Crb-1/Crb-like</p> <p>Crumbs</p> <p>Crumbs1-3</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Mutations (<i>Drosophila</i>): loss of epithelial cell morphology in the ectoderm (128) • Ectopic expression of Crumbs3 (mammalian epithelial): loss of tight junction formation and intracellular polarity (129) 	<ul style="list-style-type: none"> • N/A
<p>C01B7.4/tag-117</p> <p>Stardust</p> <p>Pals1/MPP5</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Loss (single and combined with Crumbs loss, <i>Drosophila</i>): disruption of the establishment and maintenance of epithelial morphology in the embryo (130), disrupted embryonic basolateral membrane polarity during mid-gastrulation (122) • Knockdown (mammals): loss of MDCK cell polarization in confluent cellular monolayers (129) 	<ul style="list-style-type: none"> • Knock down (T cells): suboptimal T cell activation and proliferation. Strongly localized to the Golgi apparatus, and is mislocalized upon Bref A (Golgi disrupting) treatment (55)
<p>Let-413</p> <p>Scribble</p> <p>Scribble</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Mutations (<i>Drosophila</i>): reduced neuroblast size, increased ganglion mother cell size, defects in targeting cell fate determinants, and altered spindle asymmetry (6) • Loss (<i>Drosophila</i>): defects in junction formation and epithelial organization. Hyperproliferation, formation of solid tumors in imaginal disk and follicular epithelia (121) 	<ul style="list-style-type: none"> • Knockdown (T cell line): prevention of TCR receptor polarization in response to antigen presentation, reduction in migration due morphological changes resulting in reduction of uropod formation (76) • Knockdown (thymocyte): defects in cell-cell clustering and maturation (77) • Loss: (T cells): altered pERK signaling in T cells but responses to influenza infection are intact. (B cells): delayed B cell proliferation, but T dependant and T independent activation are normal (63)
<p>Dlg-1</p> <p>Disks large</p> <p>Dlg 1-4</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Mutation (<i>Drosophila</i>): imaginal disk hyperproliferation, tumorigenesis, and transform into solid tumors (131), defects in neuroblast size and mitotic spindle asymmetry (6) 	<ul style="list-style-type: none"> • Overexpression (T cells): attenuates basal and Vav1-induced NFAT reporter activation (92) • Knockdown (T cells): enhances both CD3- and superantigen-mediated NFAT activation (89, 90, 92). Accumulation of actin at the T cell synapse, altered production of Th1 and Th2 cytokines (68) • Loss (thymocytes and T cells): normal T cell development (63, 68). Variable defects in mature CD4⁺ T cell differentiation (68, 92) Normal TCR-induced early phospho-signaling, actin-mediating events, proliferation, (66)
<p>Lgl-1</p> <p>Lethal Giant Larvae</p> <p>Lgl1, Lgl2</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Mutation (<i>Drosophila</i>): defects in neuroblast apical cell and spindle pole size resulting in symmetric or inverted neuroblast cell divisions. Loss of polarity in tissues that leads to overproliferation and tumor growth (5, 132) • Loss (mammals): neural progenitor cells fail differentiation, fail to exit cell cycle, then over proliferate and result in neural ectodermal tumors. Mislocalization of Numb in the neuroectoderm of the tumors (133) 	<ul style="list-style-type: none"> • Loss (HSC): increase in HSC numbers, cycling, increased HSC repopulation capacity and competitive advantage after transplantation (58)

Homologs: *C. elegans*, *Drosophila*, *Mammals*.

Tableau 2. Protéines de polarité et phénotypes associés. De Pham et al. 2014 ³¹²

3) 5)2) L'ACD au cours de la division lymphocytaire

En immunologie, l'ACD est proposée comme mécanisme d'hétérogénéité pour expliquer la génération des cellules effectrices et mémoires à partir de l'activation d'un lymphocyte T naïf unique³¹³.

Au cours de l'activation d'un lymphocyte T, la formation de la SI avec une CPA activatrice assure la formation d'un signal polarisé qui pourrait participer à la mise en place d'un axe de polarité intracellulaire. De nombreuses protéines telles que les protéines PAR (PAR3, PAR6)^{314,315}, les protéines kinase C atypiques (aPKC)³¹⁶ ainsi que le complexe Scribble (Scribble, Dlg1, Lgl1)^{317,318} connues comme étant des protéines du réseau de polarité, sont également exprimées par les lymphocytes et participent à leurs fonctions^{312,319,320} (**Tableau2**).

Dans le cas des lymphocytes T, **King et al.** démontrent qu'un axe de polarité peut être formé lors de la formation d'une SI avec une CPA présentant l'antigène stimulateur. Au cours de cette étude, ils montrent que la localisation polarisée des marqueurs membranaires CD8 et LFA-1 ainsi que des protéines du réseau de polarité, Numb, Scribble et PKC ζ est dépendante de la spécificité du signal activateur³²¹. Lors de la télophase (étape de la mitose précédant la formation des deux cellules filles), le recrutement des corécepteurs CD8, CD3, LFA-1 est associé au recrutement de Scribble et Crtam au pôle proximal et de la PKC atypique ζ au pôle distal^{313,322,323}, suggérant que le signal polarisé induit par le CD8, le CD3 et le LFA-1 est capable d'orienter la mise en place d'un axe de polarité intracellulaire. Pour appuyer ces résultats, **Metz et al.** démontrent que l'expression des aPKC (PKC ζ /PKC λ /l) observée par **Chang et al.** participe à la mise en place d'une asymétrie de répartition des récepteurs à l'IL2R et IFN γ ainsi que du facteur de transcription T-bet, connus comme contribuant fortement à l'établissement du phénotype effecteur³²⁴. En parallèle, **Chang et al.** observent également que les lymphocytes T naïfs activés sont capables de répartir et maintenir asymétriquement leur contenu en facteur de transcription T-bet, jusqu'au stade de la télophase. Cette répartition asymétrique du facteur de transcription T-bet serait en réalité dépendante de la répartition asymétrique du protéasome actif, colocalisé avec aPKC³²⁵. De manière intéressante, **Metz et al.** démontrent que la perte des aPKC induit une homogénéisation de T-bet entre les deux futures cellules filles, augmentant la proportion des précurseurs effecteurs au détriment des mémoires³²⁴. Ensemble, ces études suggèrent que les signaux en

provenance de la SI sont capables de contrôler la mise en place d'un axe de polarité Scribble/aPKC. Suite à la formation de cet axe, le protéasome actif co-localise avec aPKC et participe à la répression de T-bet. Au cours de division cellulaire, une cellule fille héritera de plus de CD8, CD3, LFA-1, IL2R, IFNR et de facteur de transcription T-bet participant à la différenciation effectrice alors que la seconde cellule filles héritera de peu de T-bet contribuant à l'établissement du profil mémoire. De plus, ces études tendent à démontrer que la division asymétrique est un évènement nécessaire à la mise en place de la lignée mémoire mais pas effectrice. Dans ce sens, **Hawkins et al.** montrent que les lymphocytes B sont capables de polariser le complexe Scribble mais que la perte de ce complexe au cours de la division cellulaire n'influence pas la formation et la fonction des plasmocytes (cellules effectrices de la lignée B)³²⁶.

Cependant, bien que ce mécanisme permette théoriquement d'expliquer la génération de cellules effectrices et mémoires à partir d'un lymphocyte T unique dès les stades précoces de l'infection, le modèle de l'ACD dans ce contexte cellulaire est controversé et peu accepté par la communauté. En effet, peu d'études abordent la question du signal initiateur de l'ACD. De plus, les études sont basées sur un nombre restreint d'évènements en télophase et de télophases directement en contact avec leur CPA activatrice ne permettant pas directement l'identification des pôles proximal et distal au cours de la mitose. Pour finir, aucune étude ne permet d'observer à la fois un évènement de division asymétrique et de suivre le profil de différenciation des deux cellules filles associées.

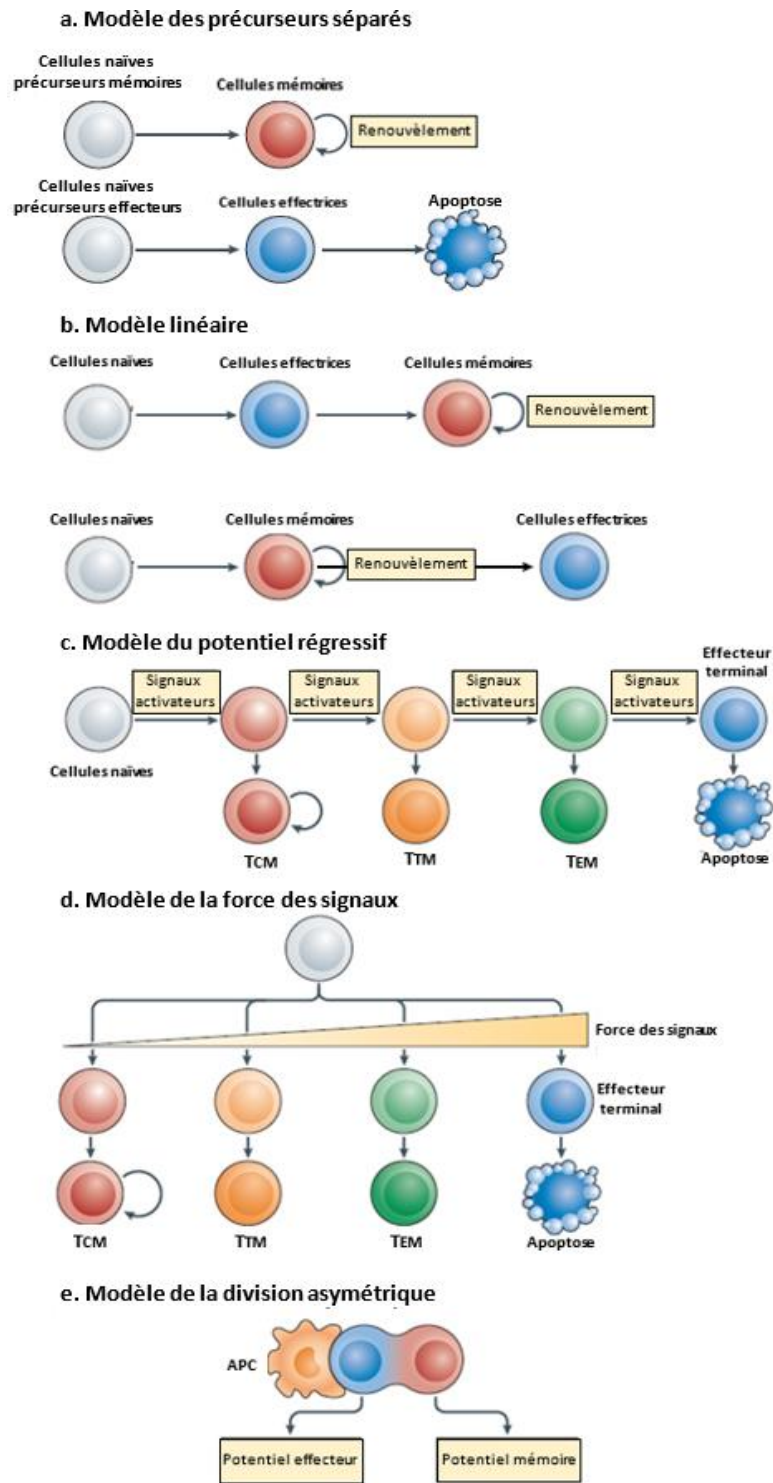


Figure I-22. Modèle de différenciation des lymphocytes T naïfs en T effecteurs et T mémoires. a. **Le modèle des précurseurs séparés**, considère que les lymphocytes T naïfs sont préprogrammés au sein du thymus à former le pool mémoire ou effecteur suite à leur prolifération. b. **Les modèles linéaires**, considèrent que l'ensemble des lymphocytes T naïfs activés sont capables de passer par l'ensemble des stades de différenciations. c. **Le modèle du potentiel régressif**, suggère que le niveau de différenciation d'un lymphocyte T naïf activé est dépendant du nombre de fois qu'il rencontre des signaux activateurs. d. **Le modèle de la force des signaux**, considère que le niveau de différenciation est dépendant de la force du signal reçu par le lymphocyte T lors de sa primo-activation. e. **Le modèle de la division asymétrique**, considère que les progéniteurs effecteurs et mémoires capables de former un pool cellulaire effecteur et un pool mémoire distinct sont formés au cours de la première division d'un lymphocyte T naïf. Ce modèle suppose un signal polarisant dépendant de l'APC capable de mettre en place un axe de polarité maintenue jusqu'à la cytokinèse. Adapté de Kaech et Cui. Nature Reviews Immunology. 2012 ¹⁵⁵.

IV) Hétérogénéité des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs

Comme nous avons pu le voir précédemment, la mise en place de l'hétérogénéité cellulaire est indispensable au bon fonctionnement du système immunitaire. En plus d'établir les lignées cellulaires effectrices et mémoires indispensables au maintien d'une immunité de longue durée suite au contrôle de l'infection, l'événement de différenciation assure la plasticité cellulaire des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs capables d'adapter leur réponse au type de pathogène. Cette plasticité cellulaire comprend d'une part, la mise en place de nombreuses sous-populations cellulaires, exprimant des marqueurs phénotypiques distincts et dont la fonction biologique diffère d'un sous type à l'autre, et d'autre part, l'hétérogénéité fonctionnelle au sein d'une population cellulaire, caractérisée par la capacité de cellules individuelles de même phénotype a réalisé une même fonction biologique avec plus ou moins d'efficacité.

1) Les sous-populations effectrices T CD8⁺

Majoritairement, suite à la prolifération d'un lymphocyte T naïf, les cellules effectrices mises en place sont les CTL également appelées Tc1, capables de réaliser des événements de cytolyse, efficace au contrôle de l'infection (cf. II)2)).

Cependant, en fonction des signaux extracellulaires, un lymphocyte T naïf activé peut engager d'autre voie de différenciation effectrice.

1) 1) Les lymphocytes T CD8⁺ alternatifs, Tc2

Suite à des expériences réalisées in vitro, il semble que l'engagement des lymphocytes T dans la voie des Tc2, exprimant le facteur de transcription GATA-3, soit dépendant de l'IL4³²⁷. À l'image des lymphocytes T CD4⁺ Th2, ces lymphocytes T CD8⁺ alternatifs produisent de l'IL5 et de l'IL13 connus respectivement comme activant les lymphocytes B et induisant la synthèse d'immunoglobuline de classe E associée à la réaction allergique. À l'inverse des Tc1 aux fonctions lytiques efficaces, les Tc2 expriment un faible niveau de Perforine/Granzyme B justifiant leur niveau cytotoxique faible, de faible protection immunitaire lors de l'infection à influenza comparée au Tc1. De plus, ils sont décrits comme facteurs aggravants durant l'inflammation allergique et des cas de maladie chronique telle que l'arthrite rhumatoïde^{328,329}.

1) 2) Les lymphocytes CD8 $\alpha\beta$ intraépithéliaux, Tc9

Suite à des expériences réalisées in vitro, il semble que l'engagement des lymphocytes T dans la voie des Tc9 puissent être induit par la présence de cellules dendritiques CX3CR1⁺ présentes au niveau de la lamina propria du petit intestin. L'engagement vers la voie Tc9 des lymphocytes T CD8⁺ est associé à l'expression de l'IL-9 et l'IL-10 au rôle anti-inflammatoire. En association avec un faible niveau d'expression de T-bet fortement exprimé dans les Tc1, les Tc9 présentent une faible expression de granzyme et une diminution de la production d'IFN γ corrélée à une diminution des propriétés cytotoxiques in vitro. Malgré leur faible activité cytotoxique, les Tc9 ont montré des propriétés antitumorales contre des cellules de mélanome B16 supérieur au Tc1, suggérant une forte activité antitumorale indépendante de la cytolyse³³⁰. D'autres études montrent que le profil Tc9 favoriserait les maladies inflammatoires médiées par les lymphocytes T CD4⁺ Th2³³¹ et diminuerait l'inflammation médiée par les lymphocytes T CD4 Th1 dans la lamina propria³³².

1) 3) Les lymphocytes T CD8⁺ Tc17

La différenciation des T CD8⁺ vers le stade Tc17 est dépendante des cytokines IL6, IL21, TGF- β ainsi que de l'IL23 qui stabilise leur phénotype. La différenciation vers les Tc17 est associée à l'expression des facteurs de transcription IRF4, ROR γ t et ROR α . Malgré une diminution de l'expression d'IFN γ , de granzyme B et de perforine, et de faibles propriétés cytotoxiques, de nombreuses études montrent un rôle protecteur des Tc17 au cours d'infections virales³³³⁻³³⁶. Cependant, de fortes évidences tendent à démontrer un rôle pathogénique des Tc17 dans le cas de maladies auto-immunes chez l'homme telles que le psoriasis, le diabète de type 1, ou la sclérose en plaque^{334,337,338}. Dans le cas tumoral, le rôle des Tc17 n'est pas clair et semble être dépendant du type et du microenvironnement tumoral.

1) 4) Les lymphocytes T CD8⁺ régulateurs, Treg

Cette population CD8⁺ peu représentée est restreinte aux peptides présentés par le HLA de classe E. Ce HLA conservé, exprimé par de nombreuses cellules telles que les lymphocytes T CD4⁺ ou NK, présente classiquement des peptides non antigéniques (dérivant de la séquence signal de la CMH de classe I) reconnu par le complexe inhibiteur CD94/NKG2A des Treg CD8⁺³³⁹. Cependant, la présentation sur le HLA-E de tous autres peptides suite à une infection virale où une dérive de la

machinerie intracellulaire pourra être reconnue par certains TCR induisant l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ régulateurs capables d'éliminer leur cible via la voie lytique, Perforine/Granzyme. Chez l'homme, il a pu être démontré qu'un dysfonctionnement des T CD8⁺ régulateurs pouvait être impliqué dans le développement de maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaque ou la maladie inflammatoire de l'intestin^{340,341}.

2) Hétérogénéité fonctionnelle des CTL, Tc1

De nombreuses études démontrent aujourd'hui que l'hétérogénéité cellulaire n'est pas seulement génératrice de nouvelles sous-populations cellulaires aux fonctions distinctes mais contribue à maintenir des variabilités fonctionnelles au sein de cellules ayant engagées la même voie de différenciation cellulaire.

Dès 1975, **Shiku et al.** démontrent l'existence d'une hétérogénéité cytotoxique au sein des populations effectrices CTL associées avec des modifications phénotypiques de leur marqueur membranaire Ly³⁴². Plus récemment, en 2002, **Takata et al.** identifient parmi les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs de différenciation terminale (CD27⁻, CD28⁻ sécréteurs des cytokines pro-inflammatoires, TNF α et IFN γ) l'existence de deux sous-populations CXCR1⁺ ou CXCR1⁻. Bien que les cellules effectrices terminales CXCR1⁺ et CXCR1⁻ présentent les mêmes activités cytotoxiques et des niveaux d'expression en molécules lytiques similaires, ces deux sous-populations présentent des différences pour leur capacité à produire de l'IL2 ainsi que pour leur propriété d'autorenouveau et de résistance à la mort cellulaire. Ils montrent au cours de leur travail que les sous-populations CXCR1⁻ sont associées à l'expression de l'IL7R ainsi qu'à la production et la sécrétion d'IL2, justifiant leur capacité d'autorenouveau, alors que les cellules CXCR1⁺ surexpriment la protéine kinase DAPK1 associée à l'entrée en apoptose (pro-apoptotic death-associated protein kinase 1)³⁴³. Bien que préliminaires, ces résultats démontrent l'existence de sous-populations au sein de familles cellulaires ayant sélectionné la même voie de différenciation terminale et exerçant une même fonction biologique et suggère que l'hétérogénéité apparaît à tous les niveaux de différenciations. Cependant, ces travaux ne permettent pas de déterminer si l'hétérogénéité fonctionnelle observée au sein des cellules CTL est le reflet de la sélection de plusieurs clones distincts (hétérogénéité inter-clonale) et/ou de la prolifération d'un seul clone cellulaire (hétérogénéité intra-clonale).

La récente mise en place d'approches dites « single-cells » permettant d'étudier les cellules individuellement, ont permis à **Lemaître et al.** de démontrer que la diversité cellulaire est un processus continu intervenant avant, pendant et après le premier cycle de division d'un clone. Au cours de leurs études, ils démontrent l'existence d'une hétérogénéité phénotypique (CD25, CD62L) et fonctionnelle (production et sécrétion d'IFN, Granzyme B) suite à la prolifération de progéniteur distinct mais également observable entre les cellules filles d'un même progéniteur³⁴⁴. Ce travail est en accord avec les études de **Newell et al.** qui démontrent, chez l'homme, via des expériences de cytométrie de masse CyTOF (cytometry by time-off flight) qu'il existe un continuum de phénotypes parmi les lymphocytes T CD8⁺ d'une même spécificité antigénique (**Figure I-23**) capables de sécréter un haut degré de combinaisons de cytokines différentes³⁴⁵. Ces données renforcent le travail de **Ma et al.**, qui démontrent via une approche « single cell in microfluidic platform » que chaque CTL unique est capable de sécréter des niveaux de cytokines et de molécules cytotoxiques variables³⁴⁶.

Plus récemment, en combinant des approches par cytométrie en flux et microscopie, **Vasconcelos et al.** mettent en évidence que la capacité des CTL à tuer des cellules cibles est extrêmement hétérogène et ce même au sein d'une même population clonale. En mettant une seule cellule CTL en contact avec un nombre défini de cellules cibles, ils démontrent que les CTL, génétiquement identiques, sont capables en 12 heures d'éliminer de 0 à 12 cellules cibles présentant le peptide spécifique de l'activation des CTL. En 12 heures, ils observent au sein d'une population clonale hautement différenciée, deux sous-populations fonctionnellement distinctes, définies comme les « high-rate killer » capables d'éliminer la majeure partie des cellules cibles et les « low-rate killer » aux capacités effectrices de « Killing » parfois nulles. De manière intéressante, en utilisant différentes concentrations de peptides antigéniques présentés par les cellules cibles, ils démontrent que cette hétérogénéité et plus particulièrement la mise en place de la sous-population « high-rate killer » est dépendante d'une forte stimulation du TCR³⁴⁷. Pour finir, **Vasconcelos et al.** montrent que l'expression in vivo d'un super-killer individuel n'aboutit pas à la génération d'une lignée stable de super-killer, suggérant un caractère non héritable des propriétés fonctionnelles d'un lymphocyte T effecteur. Ensemble, ces résultats suggèrent un processus qui permettrait au CTL de calibrer la réponse effectrice globale face à des populations de cellules cibles variées et hétérogènes.

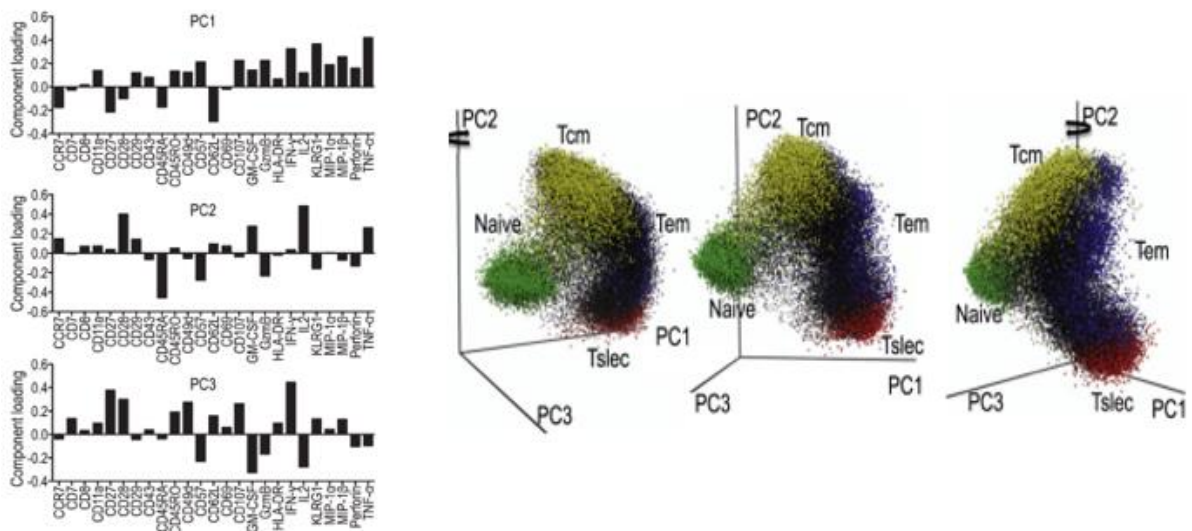


Figure I-23. Représentation 3D en CyTOF du continuum de différenciation des lymphocytes T. Les axes PC1, 2 et 3 représentent les différents profils d'expression pour 25 marqueurs phénotypiques et fonctionnels capables d'expliquer en cumulative plus de 50% de la variabilité des T CD8⁺. Repris de Newell et al. 2012³⁴⁵

V) Objectif du travail

L'hétérogénéité et la plasticité de la fonction lymphocytaire sont des éléments-clé d'une réponse immunitaire adaptative réussie. Ainsi, plusieurs études ont contribué à mettre en avant la notion que les cellules T individuelles murines et humaines présentent un degré élevé d'hétérogénéité dans leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles^{294,344,345,347-349}.

Plusieurs modèles non exclusifs ont été proposés pour expliquer l'acquisition de l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle, à la fois en termes de génération de sous-ensembles cellulaires et en termes de variabilité cellulaire individuelle au sein de populations définies²¹². Ils établissent que la différenciation des lymphocytes T peut être acquise progressivement après une première activation³⁵⁰, générée à la suite de signaux instructifs à chaque division cellulaire³⁵¹ ou déterminée au début des premiers cycles de division par des mécanismes de division cellulaire asymétrique (ACD)³¹³.

Au cours de ce travail, nous souhaitons mieux caractériser l'hétérogénéité fonctionnelle des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs, aussi bien en termes de génération que de fonction biologique. Les études publiées précédemment par l'équipe³⁴⁷ démontrent que l'ensemble de l'hétérogénéité observable au sein d'une population CTL peut être régénérée à partir de la prolifération d'une seule cellule. En se basant sur ces observations, nous suggérons que l'hétérogénéité fonctionnelle des CTL est directement dépendante de la prolifération cellulaire. De plus, en nous inspirant des concepts de l'ACD, nous établissons l'hypothèse que la distribution hétérogène de molécules intervenant dans la mise en place des fonctions effectrices des T CD8⁺ est observable au cours de la télophase et pourrait conférer des avantages fonctionnels différents entre les deux cellules filles naissantes.

Pour étudier sans ambiguïté la distribution des protéines au cours de la mitose, il est indispensable d'étudier un nombre conséquent d'évènements en télophase, qui sont des évènements rares, et d'établir le seuil entre une distribution stochastique et asymétrique des facteurs d'intérêt entre les deux futures cellules filles. Pour ce faire, nous avons mis en place un processus d'acquisition et d'analyse basé sur la cytométrie d'imagerie en flux, une technologie à mi-chemin entre la microscopie et la cytométrie. En nous basant sur les caractéristiques physiques des cellules en télophase, à savoir leur bi-nucléarité et la mise en place du midbody (structure tubulaire faisant le lien entre les deux futures cellules filles), nous avons mis en place un protocole d'analyse

permettant de discriminer et d'étudier un grand nombre d'évènements en télophase parmi une vaste population cellulaire en suspension. De plus, en nous basant sur de précédentes études^{352,353} ainsi que sur la distribution des protéines totales, nous avons pu établir un seuil discriminant les évènements de division asymétrique et symétrique au cours de la télophase.

Notre protocole d'étude, couplé à des analyses de microscopie confocale 3D à balayage laser et l'analyse de données mathématiques, permet d'étudier sans ambiguïté la répartition des molécules effectrices au cours de la division des lymphocytes T humains et de statuer sur le caractère symétrique ou asymétrique de cette répartition (en comparaison aux protéines totales).

Nos résultats montrent que les cellules T CD8⁺ du sang périphérique humain, fraîchement isolées, et les cellules T clonales CTL sont capables de générer de l'hétérogénéité en répartissant asymétriquement leurs granules lytiques (CD107a+) ainsi que leurs facteurs associés tels que la perforine, la granzyme B et le mTORC1, suite à leur activation in vitro. En nous basant sur le mécanisme de l'ACD, nous avons pu mettre en évidence que ce processus est indépendant de la répartition des facteurs de transcription classiquement associés à l'établissement des populations cellulaires effectrices ainsi que des facteurs protéiques classiquement décrits dans l'établissement de l'axe de polarité de l'ACD. De plus, nous montrons également que ce mécanisme, dépendant de la prolifération cellulaire, est réalisé indépendamment de la polarisation du signal activateur, suggérant un autre mécanisme que celui de la division asymétrique tel qu'il est classiquement décrit. De plus, nos résultats mettent en évidence un mécanisme non héritable et est réinitialisé à chaque cycle de division cellulaire.

Pour finir, nous cherchons à mettre en évidence l'importance fonctionnelle de cet héritage asymétrique au cours de la mitose. Bien qu'il soit impossible à l'heure actuelle de pouvoir suivre et associer directement un acte de division cellulaire à ses propriétés fonctionnelles, nos études indirectes démontrent l'importance de la signalisation mTOR pour l'élimination des cellules cibles sur des temps d'interaction prolongés, dans le cas où ces dernières sont en surnombre. De plus, nos travaux mettent en évidence qu'au sein d'une population CTL, les individus possédant un stock en vésicule acide, associé aux granules lytiques, présentent des propriétés fonctionnelles accrues aussi bien au temps court (4 heures) que prolongé (12 heures),

suggérant que l'héritage d'une quantité supérieure de granules lytiques au cours de la mitose pourrait conférer un avantage fonctionnel aux cellules filles.

Ensemble, les résultats de notre travail suggèrent un mécanisme « d'asymétrie stochastique » qui pourrait permettre de préserver la plasticité de la fonction effectrice au sein des populations cellulaires déjà différenciées.

Résultats

Stochastic asymmetric repartition of lytic machinery in dividing human CD8⁺ T cells

Romain Jugele¹, Sabina Müller¹, Marine Doineau², Valerie Duplan-Eche³, Eric Espinosa¹, Sebastien Gadat² and Salvatore Valitutti^{1,4*}

¹INSERM U1037, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Université de Toulouse III-Paul Sabatier, 31057 Toulouse, France. Team: Molecular dynamics of lymphocyte interaction, « Equipe labellisée Ligue Nationale contre le Cancer 2018 »

²Mathematics of decision making and statistics, Toulouse School of Economics, UMR 5604, Université Toulouse 1 Capitole, France

³INSERM, UMR1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, 31024 Toulouse, France

⁴Department of Pathology, Institut Universitaire du Cancer-Oncopole de Toulouse, 31059 Toulouse, France.

*Corresponding author: salvatore.valitutti@inserm.fr

Abstract

Asymmetric cell division plays a key role in cell progeny differentiation from undifferentiated precursors. Whether asymmetric molecular repartition in telophase also confers functional heterogeneity to differentiated cells is presently unknown. To address this question, we investigated the capacity of human CD8⁺ T cells, both freshly isolated polyclonal cells and clonal CTL, to unevenly segregate functional components during telophase using imaging flow cytometry and confocal laser scanning microscopy. We show that, in spite of homogeneous partitioning of fate determining factors, CD107a⁺ intracellular vesicles and lytic molecules unevenly segregate in telophase via a mechanism that stochastically occurs at each division round and does not require a polarity cue. We also show that vesicular mTOR asymmetrically segregates in telophase and that mTORC1 function is instrumental to fuel sustained killing of outnumbering target cells.

Our results highlight an unpredicted mechanism of stochastic uneven molecular segregation in telophase that randomly generates heterogeneity within established cell populations.

Introduction

Heterogeneity and plasticity of lymphocyte function are key components of successful adaptive immune responses. Accordingly several studies contributed to put forth the notion that individual mouse and human T cells exhibit a high degree of heterogeneity in both their phenotypic and functional characteristics (Beuneu, Lemaitre et al., 2010, Newell, Sigal et al., 2012) (Buchholz, Flossdorf et al., 2013, Halle, Keyser et al., 2016) (Lemaitre, Moreau et al., 2013) (Buchholz, Schumacher et al., 2016, Vasconcelos, Muller et al., 2015).

Several non-mutually exclusive models have been proposed to explain the acquisition of phenotypic and functional heterogeneity in mouse and human T lymphocytes both in terms of cellular subset generation and in terms of individual cell variability within defined populations (Buchholz et al., 2016). They postulate that differentiation of T lymphocytes might be either progressively acquired following an initial activation event (Sallusto, Geginat et al., 2004), generated following instructive signals at each cell division (Kaech, Wherry et al., 2002) or early determined during the first rounds of division via mechanisms of asymmetric cell division (ACD).

ACD is a key mechanism to generate cell heterogeneity in biology. It plays a crucial role in embryogenesis of organisms by allowing the formation of two distinct cells from a single mother cell (Dewey, Taylor et al., 2015, Knoblich, 2008). In immunology, ACD has been proposed as a process allowing mouse naive T lymphocytes to divide into different cellular pools (Chang, Ciocca et al., 2011, Chang, Palanivel et al., 2007) (Arsenio, Kakaradov et al., 2014) (Arsenio, Metz et al., 2015). Yet, alternative models of immune cell clonal expansion postulate that cellular differentiation might rather be achieved via the accumulation of progressive differences among daughter cells (Gerlach, Rohr et al., 2013) (Buchholz et al., 2013, Rohr, Gerlach et al., 2014).

The role of ACD in human T lymphocyte functional commitment is elusive. Moreover, it is not clear whether differentiated T cells, such as human peripheral blood CD8⁺ T lymphocytes, memory T cells and *in vitro* expanded clonal CTL, might exploit mechanisms of asymmetric repartition of molecular components in telophase to acquire functional heterogeneity.

In the present work, we investigated the possibility that a heterogeneous distribution in telophase of molecules relevant for human CD8⁺ T cell effector function might occur during their division. To address this question, we

employed imaging flow cytometry, 3-D confocal laser scanning microscopy and mathematical data analysis to unambiguously distinguish the repartition of T cell effector molecules from random distribution of total proteins in dividing human CD8⁺ T cells.

Our results show that both freshly isolated *in vitro* activated human peripheral blood CD8⁺ T cells and clonal CTL do not exhibit asymmetric inheritance of fate determining factors. Conversely they exhibit a heterogeneous repartition of lytic machinery components and of mTORC1 signaling pathway. Interestingly, this phenomenon resets at each round of division.

Our results unveil an unexpected mechanism of uneven repartition of functional components that is uncoupled from ACD-based cellular fate dichotomy. This mechanism of “stochastic asymmetry” might allow preserving effector function plasticity within established cellular populations.

Results

Imaging flow cytometry reveals uneven repartition of lytic machinery in dividing human CD8⁺ T cells

To define whether events of asymmetrical distribution of functionally relevant cellular components might occur in dividing human CD8⁺ T cells we initially investigated whether these cells might exhibit evidences of uneven repartition of their lytic machinery in telophase.

Lytic granule repartition during human CD8⁺ T cell division was evaluated using imaging flow cytometry, a technique allowing to combine the advantages of both flow cytometry and microscopy (Basiji & O’Gorman, 2015). This approach allowed us to collect and analyze a substantial number of cells and to visualize and assess the repartition of molecules of interest within individual cells that were unambiguously identified as being in telophase.

Cells in telophase were identified using a computer-assisted gating on the basis of nuclear and tubulin staining (see Material and Methods section). Nuclear staining with SYTOXorange[®] allowed us to identify binucleated cells with elongated form corresponding to cells in the late steps of division (anaphase and telophase). The cells in telophase were identified (and discriminated from possible cellular doublets) on the basis of tubulin staining that allowed us to highlight their mid-bodies (**Supplementary Figure 1**).

Cells were also stained with Cell Trace Violet[®] (CTV), a probe that labels total cell proteins. It has been reported that, upon cell division, total protein repartition varies in daughter cells (Filby, Perucha et al., 2011, Fuentealba, Eivers et al., 2008). Therefore, CTV staining served both as a marker of cell division (allowing us to identify cells in the different division rounds) and to normalize for total protein repartition in telophase. Asymmetric cells were defined as cells in telophase in which repartition of the marker of interest in the nascent daughter cells was beyond the limits observed for CTV repartition.

In a first approach, CD8⁺ T cells freshly isolated from healthy donor blood, were stimulated with immobilized anti-CD3/anti-CD28/ICAM1 for 72 hours, a stimulation condition thoroughly employed in studies investigating mouse T lymphocyte ACD (Chang et al., 2011). Anti-CD3/anti-CD28/ICAM1 stimulation resulted in activation of human CD8⁺ T cells as shown by CD137 up-regulation and cell proliferation (**Supplementary Figure 2**). Repartition of the lysosomal marker CD107a was investigated using imaging flow cytometry in the cells in

telophase. As shown in **Fig.1A**, we observed that, in agreement with previously reported data (Filby et al., 2011), CTV distribution ranged between 40 and 60% in dividing T cells. Interestingly, a fraction of CD8⁺ T cells exhibited an uneven distribution of CD107a⁺ vesicles overcoming the 40-60% CTV range. The number of uneven nascent daughter cells varied between 14 and 20% in the different experiments. To confirm results obtained using imaging flow cytometry with a classical microscopy approach we investigated by 3-D confocal laser scanning microscopy CD107a content in dividing CD8⁺ T cells following stimulation with immobilized anti-CD3/anti-CD28/ICAM1. Although this approach allowed us to collect a relatively small number of cells in telophase, it revealed that about 27% CD8⁺ T cells in telophase exhibited uneven repartition of CD107a, thus confirming results obtained using imaging flow cytometry (**Fig.1B and Movies 1 and 2**).

We next investigated the distribution in telophase of lytic components such as perforin and granzyme B (GrzB), molecules known to be pre-stored in lytic granules.

As shown in **Fig.1C**, similarly to CD107a, also perforin and GrzB were unevenly segregated in the two nascent daughter cells in telophase, indicating that daughter cells can inherit different lytic potential.

Finally, to define whether uneven repartition of lytic components could be observed in fully differentiated cells, such as memory cells, we investigated CD107a and perforin distribution in telophase in purified human memory CD8⁺ T cells. This analysis showed 16% of memory CD8⁺ T cells exhibited CD107a uneven repartition in telophase and 10% of these CD8⁺ T cells exhibited perforin uneven repartition (**Fig.1D**).

Taken together, the above results indicate that a lysosomal-associated membrane protein known to be a marker of lytic granules and effector molecules involved in CTL lytic function, are unevenly segregated during division of human CD8⁺ T cells.

mTORC1 activity is unequally segregated in telophase

The mechanistic target of rapamycin (mTOR) kinase, is a central regulator of cellular metabolism, known to localize its active form onto the surface of lysosomes, leading to the formation of the active signaling complex mTORC1 (Kaminski, Liedmann et al., 2016). mTORC1 activity is instrumental for effector T cell generation (Almeida, Lochner et al., 2016) and NK lytic function (Viel, Marçais et al., 2016). We therefore investigated whether uneven segregation of mTORC1 complex could occur in CD8⁺ T cells undergoing division. To address this question, we initially analyzed by image flow cytometry the distribution of mTOR in the two nascent daughter cells in telophase. This analysis showed that the total content of mTOR was homogeneously distributed in the two nascent daughter cells (**Fig.2A left panel**). Since the antibody used for staining recognizes both soluble mTOR (that is diffused throughout the cytosol) and its active form bound to lysosomes, we attempted to selectively define the distribution of vesicular mTOR. To this end, we applied a stringent thresholding to mTOR fluorescence in collected images, in order to highlight the strongest spots of mTOR staining (corresponding to granular staining) in the two nascent daughter cells. This analysis showed that granular staining of mTOR is highly heterogeneous in the two nascent daughter cells suggesting that vesicular mTOR might be unevenly segregated in telophase with about 80% of asymmetric cells (**Fig.2A right panel**). We reasoned that observed values could have been at least in part due to the application of an arbitrary thresholding to global mTOR staining images. To address this point and unambiguously define whether mTORC1 complex activity was unequally repartitioned within the two nascent

daughter cells we visualized the distribution in telophase of phospho-S6 ribosomal protein (pS6), a main substrate of mTORC1 (Pollizzi, Sun et al., 2016). As shown in **Fig.2B**, we observed an uneven segregation of pS6 in a fraction of cells in telophase, that was comparable to that observed for CD107a (16% of cells). Finally, treatment of anti-CD3/CD28/ICAM-1 stimulated cells with 100 ng/ml rapamycin, profoundly affected S6 phosphorylation, thus confirming the specificity of our pS6 staining (**Supplementary Fig.3**).

Taken together, the above results show that an uneven repartition in telophase of mTORC1 activity occurs in dividing human CD8⁺ T cells.

Asymmetric distribution of lytic machinery and of mTORC1 in clonal CTL

We next investigated whether lytic machinery asymmetric repartition could be observed also in homogeneous fully activated CD8⁺ T cell populations such antigen-specific CTL clones.

To address this question, we investigated CD107a repartition in CTL undergoing cell division. For this study, we activated CTL clones using immobilized anti-CD3/anti-CD28/ICAM-1 for 72 hours. We opted for this stimulation condition since, in preparatory experiments, we observed that conjugation of CTL with cognate target cells results (during the 72 hour culture) in the creation of cellular clumps and debris due to CTL killing activity, thus making it difficult to analyze cells by image flow cytometry and conventional microscopy. As shown in **Fig.3A**, we observed that in clonal CTL undergoing cell division 15% of the two nascent daughter cells in telophase exhibited uneven distribution of CD107a, thus confirming and extending observations obtained using CD8⁺ peripheral blood T cells.

In parallel experiments, imaging flow cytometry revealed heterogeneous repartition of vesicular mTOR in telophasic CTL, in line with results obtained in freshly isolated CD8⁺ T cells (**Fig.3B**).

Having observed that CTL can undergo uneven repartition of lytic components in telophase, we asked whether this process might potentially confer a functional advantage to daughter cells inheriting more abundant lytic compartment. To address this question, we labeled a CTL clone with LysoTracker Blue[®] a probe staining the acidic lytic compartment of these cells (Faroudi, Utzny et al., 2003). CTL expressing the highest and lowest of LysoTracker Blue staining were sorted and used for standard 4 hour killing assays. As show in **Supplementary Figure 4**, LysoTracker^{high} CTL exhibited a more efficient killing of target cells when compared to LysoTracker^{low} CTL, thus supporting the notion that higher lytic compartment expression correlates with better killing performance.

Finally, the observation of an uneven repartition of mTORC1 activity in dividing freshly isolated and clonal CD8⁺ T cells in parallel with lytic components raised the question of whether mTORC1 function might be involved in regulating cytotoxicity. To address this question, we asked whether mTOR pathway might be instrumental to support CTL-mediated cytotoxicity at low effector/target (E/T) ratio during prolonged time. We monitored CTL interaction with target cells by time-lapse confocal laser-scanning microscopy during 12 hours in the presence of 2.5 μM NucView[®] Caspase 3, a probe that allows to detect the activation of the executor caspase-3 in cells undergoing apoptosis, either in the presence or in the absence of 100 ng/ml rapamycin. This analysis showed that at 1:1 E/T ratio rapamycin had no major impact on the lethal hit delivery rate. Conversely, at a lower E/T ratio

(1:10), rapamycin strongly inhibited CTL-induced caspase-3 activation indicating that mTORC1 contributes to fuel sustained cytotoxicity of outnumbering target cells (**Fig.4**).

Taken together, the above results show asymmetric distribution of lytic granules and mTORC1 complex during mitosis in human CTL. They suggest that uneven repartition of lytic machinery and of a central integrator of environmental cues might contribute to confer functional heterogeneity to clonal CD8⁺ T cells.

Uneven repartition of lytic machinery is not part of fate determining ACD

The observation that both lytic components and associated mTOR signaling pathway were unevenly inherited in daughter cells prompted us to investigate whether this process was part of a mechanism of cell fate determining ACD previously described in mouse T lymphocytes (Arsenio et al., 2015, Pham, Sacirbegovic et al., 2014).

To address this question we initially investigated the possibility that uneven repartition of fate determining transcription factors T-bet and C-myc (Chang et al., 2011) (Verbist, Guy et al., 2016) might occur in telophase in freshly isolated peripheral blood CD8⁺ T cells stimulated with anti-CD3/anti-CD28/ICAM1 for 72 hours. As shown in **Fig.5A**, both T-bet and C-myc were not unevenly segregated in the two nascent daughter cells during telophase.

To further define whether a process of fate-determining ACD might take place in human CD8⁺ T cells we investigated whether the partitioning molecules PKC- ζ and PAR6 and the ACD effector Numb were unevenly segregated or not during cell division. As shown in **Fig.5B**, distribution of these molecular effectors of cell polarity was essentially not asymmetrical in the two nascent daughter cells during telophase.

Finally, we investigated whether uneven repartition of lytic components was dependent on a polarity cue as previously described for ACD (Arsenio et al., 2015, Pham et al., 2014). **Fig.6** shows that a polarity cue was not required to induce uneven distribution of lytic molecules, since comparable CD107a⁺ vesicles segregation was observed in peripheral blood CD8⁺ T cells stimulated by either immobilized (anti-CD3/anti-CD28/ICAM1) or soluble (PMA + ionomycin) stimuli. Similar results were obtained when purified CD8⁺ memory T cells were stimulated with either immobilized (anti-CD3/anti-CD28/ICAM1) or soluble (PMA + ionomycin) stimuli (data not show).

Taken together, the above results show that uneven partitioning of lytic compartment in telophase is not associated to asymmetric segregation of fate determining transcription factors and partitioning molecules. Moreover a polarity cue is not required. All in all, the above results imply that, in human CD8⁺ T cells, lytic machinery uneven repartition is not part of a classical mechanism of fate determining ACD.

Asymmetrical repartition of CD107a⁺ vesicles resets at each division event and generates heterogeneous daughter cells

In mouse T lymphocytes fate determining ACD, heterogeneous repartition of molecular components is typically described as an event occurring during the first division that follows productive TCR engagement (Arsenio et al., 2015, Chang et al., 2011). In order to define whether uneven repartition of lytic compartment in human CD8⁺ T cells might be limited to the first division or be observed during the following division steps, we considered the

cells in the different rounds of division (as detected by CTV dilution, **Supplementary Fig.2** (Quah & Parish, 2012)) and analyzed CD107a repartition during each telophase. This analysis showed that, in all division round considered, a comparable percentage of cells underwent heterogeneous repartition of CD107a (**Fig.7A and B**).

The above results showed that an uneven repartition of CD107a is not limited to the first division, providing further evidence in favor of a mechanism of heterogeneity generation in telophase that is in not part of a classical ACD.

A complementary observation indicated that the heterogeneity process is stationary but not hereditary: e.g. a daughter cell originating from a heterogeneous division has a constant stationary probability to produce a new uneven division. We arrived to this conclusion by generating CD107a fluorescence intensity (CD107a-FI) density curves of all telophasic cells having undergone 0, 1 or 2 mitosis. Cells in telophase showing unequal CD107a-FI repartition were then plotted on these curves (**Fig.7C**). The χ^2 statistical test showed that these cells were randomly and independently distributed on the CD107a-FI density curves, supporting the hypothesis that there is no inheritance in the decision to divide unevenly (see Supplementary Results section).

We next asked whether this process might create a drift in lytic compartment content in daughter cells. To address this question, we analyzed the total CD107a-FI in all G1 cells (either undivided or following each division round). As shown in **Fig.7D**, the total CD107a-FI appeared to be broadly similar at the different rounds of division in the whole populations, suggesting that uneven repartition of CD107a, in a relatively constant fraction of cells at each division round, does not lead to the emergence of well-defined cellular subsets expressing higher or lower levels of CD107a.

To determine whether the different curves followed the same distribution or not, we employed the Kolmogorov-Smirnov goodness of fit test. The test strongly rejected the hypothesis that the CD107a expression curves follow the same distribution during the first two division rounds (see Supplementary Results section), indicating that during these division events randomly heterogeneous populations were generated. Nevertheless, our test also showed that the Kolmogorov distance decreased when the number of divisions increased, indicating that CD107a-FI density distribution seems to be convergent with a higher number of divisions. To define where in the curves variability was located, we employed the χ^2 test. The test showed that variability was distributed all over the curves (i.e. for all the CD107a-FI). Together, Kolmogorov-Smirnov goodness of fit and χ^2 tests revealed a non-stationary variability in the content of CD107a⁺ vesicles in CD8⁺ T cells during early division events.

Taken together, the above results reveal a mechanism of asymmetric distribution of CD107a⁺ vesicles in telophase that is not limited to the first division and generates variability in the daughter cell populations.

Discussion

In the present study, we investigated whether asymmetric molecular segregation in telophase occurs in human CD8⁺ T lymphocytes. We report that, in both freshly isolated peripheral blood CD8⁺ T cells and clonal CTL, a fraction of telophasic cells undergoes asymmetric distribution of lytic compartment and of mTOR activity between the two daughter cells. Uneven lytic machinery repartition is not part of a mechanism of fate determining ACD. Yet, it engenders, at each new cell generation, heterogeneity of individual components within established cellular populations.

ACD is a key mechanism to generate cell diversity in biology. It plays a crucial role in the embryogenesis of organisms by allowing the formation of two distinct cells from a single mother cell. This mechanism resides in the ability of cells to distribute and maintain their intracellular components unevenly between the proximal and distal pole during mitosis. Following the formation of the division furrow and the cytokinesis, the two daughter cells inherit distinct intracellular effector molecules favoring their development into different functional cell populations (Dewey et al., 2015, Knoblich, 2008).

In mouse T lymphocytes, ACD has been described as a mechanism contributing to the generation of effector/memory daughter cells following division of an individual naive T cell (Arsenio et al., 2015, Chang et al., 2007). Establishment of asymmetry has been associated to the uneven inheritance by daughter cells of transcription factors such as c-Myc and T-bet known for their role in the induction of cell proliferation and T cell effector function (Chang et al., 2011) (Verbist et al., 2016). Following the original observation of uneven repartition of proteasomes in dividing mouse CD4⁺ T cells leading to asymmetric degradation of T-bet in daughter cells (Chang et al., 2011), additional cellular pathways including metabolic and signaling pathways have been found to be implicated in fate determining ACD in mouse naive T lymphocytes (Pollizzi et al., 2016, Verbist et al., 2016).

Our results extend data obtained in mouse models by revealing a previously non-described uneven repartition of molecular effectors in human CD8⁺ T cells, which is not accompanied by a detectable fate-determining ACD. In other words, we describe here a novel stochastic mechanism of asymmetric molecular distribution in telophase that perpetuates functional heterogeneity at the population level.

It should be noted that, although we could not detect a “classical”, fate determining, ACD neither in CD8⁺ T cells from adult healthy donor peripheral blood nor in CTL clones, this observation does not exclude the possibility that ACD might play a key role in the differentiation of human naive T cells into effector and memory subsets during initial antigen specific immune responses. It is therefore possible that the discrepancy between our results and previous studies on ACD in mouse T lymphocytes arises from the different nature of the cells involved in the study.

Discrepancy between human and mouse cell data might also derive from the employed experimental approaches. An important feature of our study is that we used imaging flow cytometry, a technique suitable to study cell division, since it combines the advantages of both flow cytometry and microscopy. While microscopy allows high-resolution visualization of molecular distribution during mitosis, the necessity of capturing rare cells in telophase makes the acquisition and analysis of a large number of events problematic. Flow cytometry can quantitatively assess the heterogeneity of marker expression by individual cells belonging to a given population, but it does not directly illustrate whether heterogeneity in the expression of a given marker results from an event of asymmetric

division. Combining the above approaches, imaging flow cytometry allows detecting and analyzing scarce cells within whole cell populations on the basis of their morphological and staining characteristics (Basiji & O'Gorman, 2015). We thus acquired a significant number of relatively rare events of T cell division by precisely identifying cells in telophase.

The advantages intrinsic to the chosen method, together with the use of CTV to normalize for total protein repartition in telophase, makes our approach a reliable and quantitative methodology to establish the asymmetry of some cellular effectors and to exclude asymmetry of others.

It should also be noted that, beside asymmetric division, other mechanisms can contribute to the generation of different T lymphocyte populations from naive lymphocytes and, more in general, can play a role in T lymphocyte heterogeneity. Alternative models postulate that lymphocyte differentiation might be achieved via the accumulation of progressive differences among daughter cells due to stochastic variation in the quantity of the inherited proteins (Pham et al., 2014, Rohr et al., 2014). An important piece of evidence in support of this notion comes from work performed by T.N. Schumacher and coll. Using a mouse model in which naive CD8⁺ T cells were provided with unique genetic tags, they showed that the progeny of a single naive T cell can adopt multiple fates (Gerlach et al., 2013) (Schumacher, Gerlach et al., 2010).

Our results provide support to stochastic division models of lymphocyte differentiation (Buchholz et al., 2016) and imply that such a mechanisms might contribute to human T cell phenotypic and functional heterogeneity (Newell et al., 2012) (Vasconcelos et al., 2015).

The molecular bases of the observed stochastic heterogeneity in lytic machinery repartition in telophase are presently elusive. It is tempting to speculate that stochastic heredity of lytic components might result from the highly dynamic behavior of human CD8⁺ T cells during antigen recognition. Differently from naive T cells that form stable immunological synapses and require prolonged time to be activated (Iezzi, Karjalainen et al., 1998) (Huang, Brameshuber et al., 2013), effector CD8⁺ T cells are rapidly activated at the immunological synapse, provide swift biological responses and interact with multiple target cells either sequentially or simultaneously (Wiedemann, Depoil et al., 2006) (Bertrand, Muller et al., 2013) (Vasconcelos et al., 2015). A polarity axis might therefore be difficult to establish in such highly dynamic cells that undergo transient polarization responses. It is tempting to speculate that, the observed asymmetric distribution of lytic components is actually independent from the establishment of a polarity axis and is rather an intrinsic phenomenon in dividing human CD8⁺ T cells. Our observation that a soluble stimulus such as PMA/ionomycin leads to asymmetric distribution of lytic components in telophase, strongly supports the hypothesis that there is no need for a polarity cue to induce asymmetric distribution in our cellular model.

Mathematical analysis of our imaging flow cytometry data provides a stepping-stone to illustrate the mechanisms of lytic machinery uneven distribution in dividing human CD8⁺ T cells. On one hand, the analysis shows that the process of asymmetric distribution is stationary in terms of the fraction of involved cells: e.g. occurs always on a similar percentage of cells, at each division round, in different experiments and following different stimuli. On the other hand, the heterogeneity process, although stationary is not hereditary: e.g. a daughter cell originating from a heterogeneous division has a constant stationary probability to produce a new uneven division. Finally, mathematical analysis also shows that, during initial division rounds, a random heterogeneity in lytic machinery

content is generated in the whole CD8⁺ T cell population, while CD107a-FI density curves tend to be convergent when the number of divisions increases.

What could be the functional role of a mechanism of asymmetric molecular segregation during mitosis in human T cells? We propose that a mechanism of asymmetric distribution in telophase that is stationary at each division, but not inherited by daughter cells, can be instrumental, on one hand to ensure reproducible antigen specific CD8⁺ T cell responses during clonal expansion and on the other hand to randomly generate short-lived CTL cohorts harboring functional heterogeneity. This process might confer robustness to CTL responses through population averaging (Buchholz et al., 2016) (Hodgkin, Dowling et al., 2014).

We have previously shown that human clonal CTL exhibit heterogeneity in their lytic function during sustained interaction with target cells: with some CTL killing a limited number of target cells and other CTL progressively emerging as super-killer cells (Vasconcelos et al., 2015). These observations suggested that a gradual “refining” of killing ability might allow the calibration of CTL responses, allowing adaptation of the whole CTL population to the resistance of the opposing target cell population or to the persistence of the antigenic stimulus. Interestingly, killing behavior is not inherited by daughter cells, since *in vitro* expanded individual super-killer cells do not generate a stable progeny of super-killers (Vasconcelos et al., 2015). Together, these previous observations indicate that a given killing behavior is not a prerogative of a subset of cells within the clonal CTL population, but is rather “the reflection of proliferation” where each individual cell is capable of generating heterogeneous daughter cells.

Our present study complements previous results. By showing the existence of stochastic lytic machinery distribution in telophase, we provide here a mechanistic explanation to the observed functional heterogeneity of individual human CTL.

Moreover the observation that in sorted CTL, higher lytic compartment expression correlates with better killing performance, further links asymmetric molecular distribution in telophase to CTL functional heterogeneity. Finally we also show that: i) not only lytic components, but also the lysosome-associated mTORC1 activity is unevenly distributed in telophase and ii) mTORC1 function is required for optimal sustained killing at low E/T ratios. These observations further support the notion that asymmetric repartition in telophase of cellular effectors can influence cytotoxicity.

It is tempting to speculate that, our results are compatible with a model of CTL function in which heterogeneous preformed stocks of lytic granules inherited following cell division confer diverse killing capabilities to individual CTL over short time periods of interaction with target cells. Upon prolonged CTL/target cell interaction, signaling via mTOR pathway a key regulator of effector T cell differentiation (Almeida et al., 2016, Finlay, Rosenzweig et al., 2012, Rao, Li et al., 2012, Rao, Li et al., 2010), might confer an “energetic and transcriptional advantage” (Almeida et al., 2016, Rao et al., 2012, Rao et al., 2010) to individual CTL allowing killing of outnumbering target cells over sustained times.

It is interesting to note that our results present important analogies with previously published data by F. Batista and coll. in which asymmetric segregation of internalized exogenous antigen was found to occur during B cell division (Thaunat, Granja et al., 2012). Together with this previous study, our results reveal an intriguing capacity

of both T cells and B cells to stochastically distribute in telophase their acidic compartments: MHC Class II compartments for B cells and lytic granules for CD8⁺ T cells.

Such a process might have been developed to ensure a high variability of both humoral and cellular adaptive immune responses during lymphocyte clonal expansion.

Materials and methods

Cell culture and stimulating conditions

Peripheral blood mononuclear cells were isolated from buffy coats of healthy donors obtained through the Etablissement Français du Sang (EFS). Blood samples were collected and processed following standard ethical procedures (Helsinki protocol), after obtaining written informed consent from each donor and approval by the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outremer II).

Total human CD8⁺ T cells were purified from healthy donor blood samples using the EasySep Negative human CD8⁺ T cell isolation kit (StemCell Technologies). CD8⁺ T cells were routinely ~90% pure. Memory human CD8⁺ T cells were purified from healthy donor blood samples using the EasySep Human Memory CD8⁺ T cell enrichment kit (StemCell Technologies), cells were routinely ~90% CD8⁺RO⁺RA⁻.

HLA-A2 restricted CD8⁺ T cell clones, specific for the NLVPMVATV peptide or the VLAELVKQI peptide of the CMV protein pp65 were cultured in complete RPMI/HS medium (RPMI 1640 medium supplemented with 5% human AB serum (Inst. Biotechnologies J.BOY, Reims), minimum essential amino acids, HEPES, sodium pyruvate (Invitrogen), 2-mercaptoethanol (5 µM, Gibco) and 150 IU/ml human rIL-2 and 50ng/ml rIL-15). Clones were re-stimulated every 2-3 weeks in 24-wells plate with 1×10^6 irradiated (35 Gy) allogeneic peripheral blood mononuclear cells (isolated on Ficoll Paque Gradient from buffy coats of healthy donors) and 1×10^5 irradiated EBV-transformed B cells (70 Gy). Complete RPMI/HS-Medium was supplemented with 1 µg/ml PHA. For imaging flow cytometry (ImageStream[®]X, Merk) and confocal laser-scanning microscopy human CD8⁺ T cells or CD8⁺ T cell clones were stimulated for 72h with immobilized anti-CD3 (1 µg/ml, TR66, (Valitutti, Dessing et al., 1995)), anti-CD28 (1 µg/ml, clone CD28.2, eBioscience) and immobilized recombinant ICAM1-Fc fusion protein (0.5µg/ml, R&D Systems) in complete RPMI/HS medium, cells were plated on anti-CD3/CD28/ICAM1 coated Nunc Lab-Tek Chamber Slide[™] system 8 wells at 500 000 cells / well. For image stream analysis, cells were plated on anti-CD3/CD28/ICAM1 coated 24 well plates at 1.5×10^6 cells / well.

Image Stream analysis

Staining and acquisition strategy. Cells were first stained with CellTrace[™] Violet Cell Proliferation Kit (CTV) in PBS (5 µM, 20 min, 37°C). After 72 hours of stimulation (cf: Cell culture and stimulating condition), cells were fixed in 1% PFA (10 min, 37°C) and permeabilized in permeabilization buffer (PBS 3% BSA, 0.1% saponin, Sigma) for 5 min. Cells were incubated for 45 min with the indicated antibodies: AlexaFluor[®] 647 anti-human CD107a antibody (diluted at 1/100, clone H4A3; BD pharmingen[™]), anti-human Perforin (10µg/ml, clone δG9; BD pharmingen[™]), AlexaFluor[®] 647 anti-human Granzyme B antibody (10µg/ml, clone GB11, BD Pharmingen[™]), anti-human mTOR (diluted at 1/500, clone 7C10; Cell Signaling Technology), anti-human P-S6 RibosomalProtein

(S240/244) (diluted at 1/500, clone D68F8; Cell Signaling Technology), anti-human Numb antibody (10 μ g/ml, clone 1A7; Abcam), anti-human PKC ζ (10 μ g/ml, clone C-20; Santa Cruz Biotechnology), anti-human PARD6B (10 μ g/ml, clone 1C4; Abnova), anti-human T-bet (Tbx21) (10 μ g/ml, clone 4B10; Abcam), anti-human C-myc (10 μ g/ml, clone 9E10; Thermo scientific), anti-human α -tubulin (diluted at 1/100, rabbit polyclonal; Abcam). The following secondary antibodies were used: AlexaFluor[®]488 or 647 goat anti-mouse IgG1 (10 μ g/ml; Invitrogen), AlexaFluor[®]488 or 647 anti-rabbit (H+L) (10 μ g/ml; Invitrogen). For image acquisition, cells were adjusted to 10.10⁶ - 20.10⁶ /mL in FACS buffer (PBS, 1% FCS, 5% Hepes, 0.1% Azide) containing SYTOX[™] Orange Dead Cell Stain (recommended dilution, Thermo Fisher Scientific) for nuclear staining. Cells were acquired using ImageStream^{®x} (IsX) technology.

Telophase discrimination strategy. IDEAS software (Merk) was used to analyze IsX data and identify cells in telophase. As in classical cytometry data analysis, cells in G2/M phase were first selected according to their DNA content (fluorescence of SYTOX orange). A mask based on nuclear staining was employed (SpotCount_Threshold (M03, nucleus, 60)) to visualize the nuclei of cells/events in the G2/M fraction at the single cell level. A second mask (Area_Range (Threshold(M02, tubulin, 75), 50-5000, 0-0.5)) based on the α -tubulin staining (to clearly identify the mid-body) was employed to distinguish telophases from anaphases or cell-doublets. Finally, the results from both masks were used to manually verify that selected cells were cells unambiguously in telophase.

Analysis of cell protein distribution during telophase using Fiji.

Staining intensities of α -tubulin, CTV and of the different markers of interest were analyzed on Fiji to determine the percentage of proteins inherited by the two nascent daughter cells in telophase.

Watershed function of Fiji software was used on the α -tubulin staining intensity to determine the specific areas corresponding to the two nascent daughter cells in telophase. The obtained areas were converted to masks that were next applied to measure CTV and the different markers of interest fluorescence. This procedure allowed us to determine the intensity of fluorescence in the two nascent daughter cells in telophase respectively. The percentage of staining in each nascent daughter cell was determined as: Fluorescence Intensity of daughter cell 1 / (Fluorescence Intensity of daughter cell 1 + Fluorescence Intensity of daughter cell 2) x 100.

For mTOR fluorescence analysis, the Shangbag threshold was applied to create a mask corresponding to the granular staining (image A). This mask was then used to create a new image excluding the fluorescence intensity contained in the Shangbag mask (image B). On the two images (A and B) we determined the fluorescence intensity of each nascent daughter cell. For each nascent daughter cell, the intensity of mTOR granular staining is obtained by subtracting fluorescence intensity of image A – fluorescence intensity of image B. The percentage of granular mTOR in the 2 nascent daughter cells is using the formula: mTOR granular intensity of nascent daughter cell 1 / (mTOR granular intensity of nascent daughter cell 1 + mTOR granular intensity of nascent daughter cell 2) x 100.

3-D laser scanning microscopy

After 72 hours of stimulation, cells were fixed in 1% PFA (10 min, 37°C). Permeabilization and stainings with antibodies were performed in PBS 3% BSA, 0.1% saponin (Sigma) for 5 min and 45 min respectively. The following antibodies were used: anti-human CD107a (10 μ g/ml, cloneH4A3, BD Pharmingen [™]) followed by AlexaFluor[®]488 goat anti-mouse IgG1 (10 μ g/ml; Invitrogen), anti-human α -tubulin (diluted at 1/100, rabbit

polyclonal; Abcam) followed by AlexaFluor®555 goat anti-rabbit (10µg/ml; Invitrogen). Nuclei were labeled with DAPI (1µg/ml, 5 min). The samples were mounted in 90% glycerol-PBS containing 2.5% DABCO (Sigma) and examined using a LSM 710 (Zeiss) confocal microscope with a ×63 plan-Apochromat objective (1.4 oil) with an electronic zoom of 4. Cells in telophase were identified on the basis of nuclear and tubulin marker staining. 3D images (using the z-stack function) were acquired for every cell identified as being in telophase. CD107a fluorescence intensity in the two nascent daughter cells was measured on 2-D image projections obtained applying the Sum function of Fiji Software to z-stack series. Since the background noise made the watershed function unusable, a region of interest (ROI) corresponding to the nascent daughter cells was manually drawn on the basis of brightfield and tubulin staining. We determined the percentage of CD107a staining in each nascent daughter cell as: $\text{CD107a intensity of daughter cell 1} / (\text{CD107a intensity of daughter cell 1} + \text{CD107a intensity of daughter cell 2}) \times 100$.

Cytotoxicity assay

CTL were incubated with 200nM LysoTracker Blue® for 30 minutes at 37°C/5% CO₂ in 5% FCS/RPMI/HEPES. After washing, cells expressing the highest and lowest 10% LysoTracker Blue staining were sorted using a FACSARIA-SORP (BD Biosciences). After overnight recovery in complete RPMI/HS-Medium, CTL were used for standard 4 hour killing assays. Target cells were left unpulsed or pulsed with 10µM antigenic peptide during 2 hours at 37°C/5% CO₂, washed three times and subsequently transferred to a 96 well U-bottom plate at 10×10^3 cells/100µl RPMI, 5% FCS/HEPES. CTL were previously stained with 0.1µM CMFDA for 15 minutes at 37°C/5% CO₂, washed and added to the target cells at 1 CTL versus 1 target cell ratio in 100µl RPMI, 5% FCS/HEPES. Cells were pelleted for 1 minute, 455 g, and incubated at 37°C/5% CO₂ for 4 hours. Before FACS analysis, 0.25µg 7-Aminoactinomycin D (7-AAD; BD Biosciences) was added to each sample in order to measure the percentage of death target cells.

Detection of caspase-3 activation by time-lapse confocal laser-scanning microscopy

Target cells were left unpulsed or pulsed with 10µM antigenic peptide, washed and seeded with clonal CD8⁺ T cells on poly-D-lysine-coated 8 well chambered slides (Ibidi, Munich, Germany) 5 min before imaging. CTL were pre-incubated or not for 1 hour at 37°C with rapamycin (100ng/ml, Sigma). Chambered slides were mounted on a heated stage within a temperature-controlled chamber maintained at 37 °C and 5% CO₂. Images were acquired every 5 min over 12 hours. Death of target cells was followed by fluorescence emission of NucView® 488 Caspase-3 assay probe directly added into the medium (2.5 µM, Biotium). Green fluoresce was acquired in the whole sequential images and quantified using Fiji software.

Statistical analysis

Paired Student's t-test, was performed to determine the statistical significance of differences between the groups (GraphPad Prism software version 5).

Chi-square of independence test was performed to determine the independence between the level of expression of a given marker and the capacity of a cell in telophase to asymmetrically distribute this marker (Python software version 3.5).

Kolmogorov-Smirnov goodness of fit test was performed to compare law between probability distribution of a marker of interest in cells in G1 (Python software version 3.5).

Chi-square of homogeneity test was performed (in addition Kolmogorov-Smirnov goodness of fit test) to determine where the probability distribution of a marker of interest varies (Python software version 3.5).

Acknowledgements

We thank Dr. Stephane Manenti for discussion and critical reading of the manuscript. Dr. Hellen Robey and Pauline Gonnord for discussion. We thank the “plateau technique de cytométrie et de microscopie” INSERM UMR 1043.

This work was supported by grants from the Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer (TOUCAN) (contract ANR11-LABEX), Region Occitanie (contracts RCLE R14007BB, No 12052802, and RBIO R15070BB, No 14054342), Fondation Toulouse Cancer Santé (contract 2014CS044) and from the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée 2018).

R.J. was supported by the Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer (TOUCAN) (contract ANR11-LABEX) and by the Ligue Nationale contre le Cancer.

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author Contributions

R.J. designed the research, performed the experiments, analyzed the results and wrote the paper; S.M. provided cellular tools, discussed results and wrote the paper; M.D. performed statistical analysis of the experimental data; S.G. performed statistical analysis of the experimental data and wrote the paper; V.D. provided technical tools and advices; E.E. discussed results and wrote the paper; S.V. designed the research and wrote the paper.

Competing Interests statement

The authors declare no competing financial interests.

References

- Almeida L, Lochner M, Berod L, Sparwasser T (2016) Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Semin Immunol* 28: 514-524
- Arsenio J, Kakaradov B, Metz PJ, Kim SH, Yeo GW, Chang JT (2014) Early specification of CD8+ T lymphocyte fates during adaptive immunity revealed by single-cell gene-expression analyses. *Nat Immunol* 15: 365-372
- Arsenio J, Metz PJ, Chang JT (2015) Asymmetric Cell Division in T Lymphocyte Fate Diversification. *Trends Immunol* 36: 670-683
- Basiji D, O'Gorman MR (2015) Imaging flow cytometry. *J Immunol Methods* 423: 1-2
- Bertrand F, Muller S, Roh KH, Laurent C, Dupre L, Valitutti S (2013) An initial and rapid step of lytic granule secretion precedes microtubule organizing center polarization at the cytotoxic T lymphocyte/target cell synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 6073-6078
- Beuneu H, Lemaitre F, Deguine J, Moreau HD, Bouvier I, Garcia Z, Albert ML, Bousso P (2010) Visualizing the functional diversification of CD8+ T cell responses in lymph nodes. *Immunity* 33: 412-23
- Buchholz VR, Flossdorf M, Hensel I, Kretschmer L, Weissbrich B, Graf P, Verschoor A, Schiemann M, Hofer T, Busch DH (2013) Disparate individual fates compose robust CD8+ T cell immunity. *Science* 340: 630-5
- Buchholz VR, Schumacher TN, Busch DH (2016) T Cell Fate at the Single-Cell Level. *Annu Rev Immunol* 34: 65-92
- Chang JT, Ciocca ML, Kinjyo I, Palanivel VR, McClurkin CE, Dejong CS, Mooney EC, Kim JS, Steinel NC, Oliaro J, Yin CC, Florea BI, Overkleeft HS, Berg LJ, Russell SM, Koretzky GA, Jordan MS, Reiner SL (2011) Asymmetric proteasome segregation as a mechanism for unequal partitioning of the transcription factor T-bet during T lymphocyte division. *Immunity* 34: 492-504
- Chang JT, Palanivel VR, Kinjyo I, Schambach F, Intlekofer AM, Banerjee A, Longworth SA, Vinup KE, Mrass P, Oliaro J, Killeen N, Orange JS, Russell SM, Weninger W, Reiner SL (2007) Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* 315: 1687-91
- Dewey EB, Taylor DT, Johnston CA (2015) Cell Fate Decision Making through Oriented Cell Division. *J Dev Biol* 3: 129-157
- Faroudi M, Utzny C, Salio M, Cerundolo V, Guiraud M, Muller S, Valitutti S (2003) Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14145-50
- Filby A, Perucha E, Summers H, Rees P, Chana P, Heck S, Lord GM, Davies D (2011) An imaging flow cytometric method for measuring cell division history and molecular symmetry during mitosis. *Cytometry A* 79: 496-506
- Finlay DK, Rosenzweig E, Sinclair LV, Feijoo-Carnero C, Hukelmann JL, Rolf J, Panteleyev AA, Okkenhaug K, Cantrell DA (2012) PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of CD8+ T cells. *J Exp Med* 209: 2441-53
- Fuentealba LC, Eivers E, Geissert D, Taelman V, De Robertis EM (2008) Asymmetric mitosis: Unequal segregation of proteins destined for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7732-7
- Gerlach C, Rohr JC, Perie L, van Rooij N, van Heijst JW, Velds A, Urbanus J, Naik SH, Jacobs H, Beltman JB, de Boer RJ, Schumacher TN (2013) Heterogeneous differentiation patterns of individual CD8+ T cells. *Science* 340: 635-9

Halle S, Keyser KA, Stahl FR, Busche A, Marquardt A, Zheng X, Galla M, Heissmeyer V, Heller K, Boelter J, Wagner K, Bischoff Y, Martens R, Braun A, Werth K, Uvarovskii A, Kempf H, Meyer-Hermann M, Arens R, Kremer M et al. (2016) In Vivo Killing Capacity of Cytotoxic T Cells Is Limited and Involves Dynamic Interactions and T Cell Cooperativity. *Immunity* 44: 233-45

Hodgkin PD, Dowling MR, Duffy KR (2014) Why the immune system takes its chances with randomness. *Nat Rev Immunol* 14: 711

Huang J, Brameshuber M, Zeng X, Xie J, Li QJ, Chien YH, Valitutti S, Davis MM (2013) A single peptide-major histocompatibility complex ligand triggers digital cytokine secretion in CD4(+) T cells. *Immunity* 39: 846-57

Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A (1998) The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8: 89-95

Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R (2002) Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2: 251-62

Kaminski MM, Liedmann S, Milasta S, Green DR (2016) Polarization and asymmetry in T cell metabolism. *Semin Immunol* 28: 525-534

Knoblich JA (2008) Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* 132: 583-97

Lemaitre F, Moreau HD, Vedele L, Bousso P (2013) Phenotypic CD8+ T cell diversification occurs before, during, and after the first T cell division. *J Immunol* 191: 1578-85

Newell EW, Sigal N, Bendall SC, Nolan GP, Davis MM (2012) Cytometry by time-of-flight shows combinatorial cytokine expression and virus-specific cell niches within a continuum of CD8+ T cell phenotypes. *Immunity* 36: 142-52

Pham K, Sacirbegovic F, Russell SM (2014) Polarized cells, polarized views: asymmetric cell division in hematopoietic cells. *Front Immunol* 5: 26

Pollizzi KN, Sun IH, Patel CH, Lo YC, Oh MH, Waickman AT, Tam AJ, Blosser RL, Wen J, Delgoffe GM, Powell JD (2016) Asymmetric inheritance of mTORC1 kinase activity during division dictates CD8(+) T cell differentiation. *Nat Immunol* 17: 704-11

Quah BJ, Parish CR (2012) New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo using CFSE-like fluorescent dyes. *J Immunol Methods* 379: 1-14

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: 374-87

Rao RR, Li Q, Odunsi K, Shrikant PA (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

Rohr JC, Gerlach C, Kok L, Schumacher TN (2014) Single cell behavior in T cell differentiation. *Trends Immunol* 35: 170-7

Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A (2004) Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22: 745-63

Schumacher TN, Gerlach C, van Heijst JW (2010) Mapping the life histories of T cells. *Nat Rev Immunol* 10: 621-31

Thaunat O, Granja AG, Barral P, Filby A, Montaner B, Collinson L, Martinez-Martin N, Harwood NE, Bruckbauer A, Batista FD (2012) Asymmetric segregation of polarized antigen on B cell division shapes presentation capacity. *Science* 335: 475-9

Valitutti S, Dessing M, Aktories K, Gallati H, Lanzavecchia A (1995) Sustained signaling leading to T-cell activation results from prolonged T-cell receptor occupancy - role of T-cell actin cytoskeleton. *Journal of Experimental Medicine* 181: 577-584

Vasconcelos Z, Muller S, Guipouy D, Yu W, Christophe C, Gadat S, Valitutti S, Dupre L (2015) Individual Human Cytotoxic T Lymphocytes Exhibit Intracлонаl Heterogeneity during Sustained Killing. *Cell Reports* 11: 1474-1485

Verbist KC, Guy CS, Milasta S, Liedmann S, Kaminski MM, Wang R, Green DR (2016) Metabolic maintenance of cell asymmetry following division in activated T lymphocytes. *Nature* 532: 389-93

Viel S, Marçais A, Guimaraes FS, Loftus R, Rabilloud J, Grau M, Degouve S, Djebali S, Sanlaville A, Charrier E, Bienvenu J, Marie JC, Caux C, Marvel J, Town L, Huntington ND, Bartholin L, Finlay D, Smyth MJ, Walzer T (2016) TGF-beta inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci Signal* 9: ra19

Wiedemann A, Depoil D, Faroudi M, Valitutti S (2006) Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10985-90

Figures

Fig.1

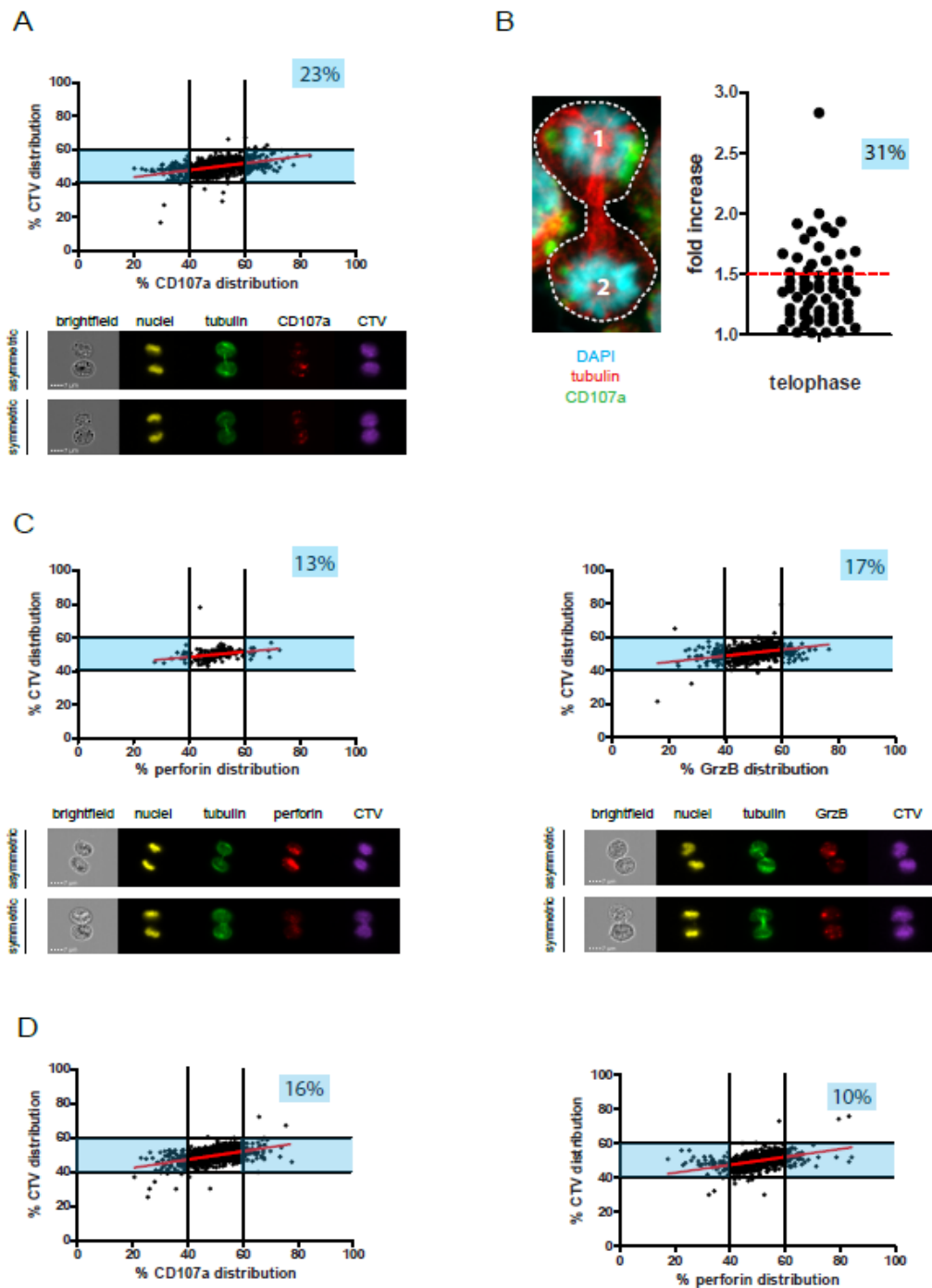


Fig.1: Lytic components are asymmetrically distributed in dividing CD8⁺ T cells. (A, B) Freshly isolated polyclonal CD8⁺ T cells were stimulated by immobilized anti-CD3/anti-CD28/ICAM1 during 72h and stained with antibodies directed against CD107a. Cells in telophase were identified using Imaging Flow Cytometry (A) or confocal laser-scanning microscopy (B). (A) Upper panel: Each dot represents one nascent daughter cell. Only one of the two nascent daughter cells in telophase is plotted. The percentage of staining for CD107a in the presented cell (*x axis*) is plotted against the percentage of staining for total cell proteins (CTV, *y axis*). Asymmetric cells

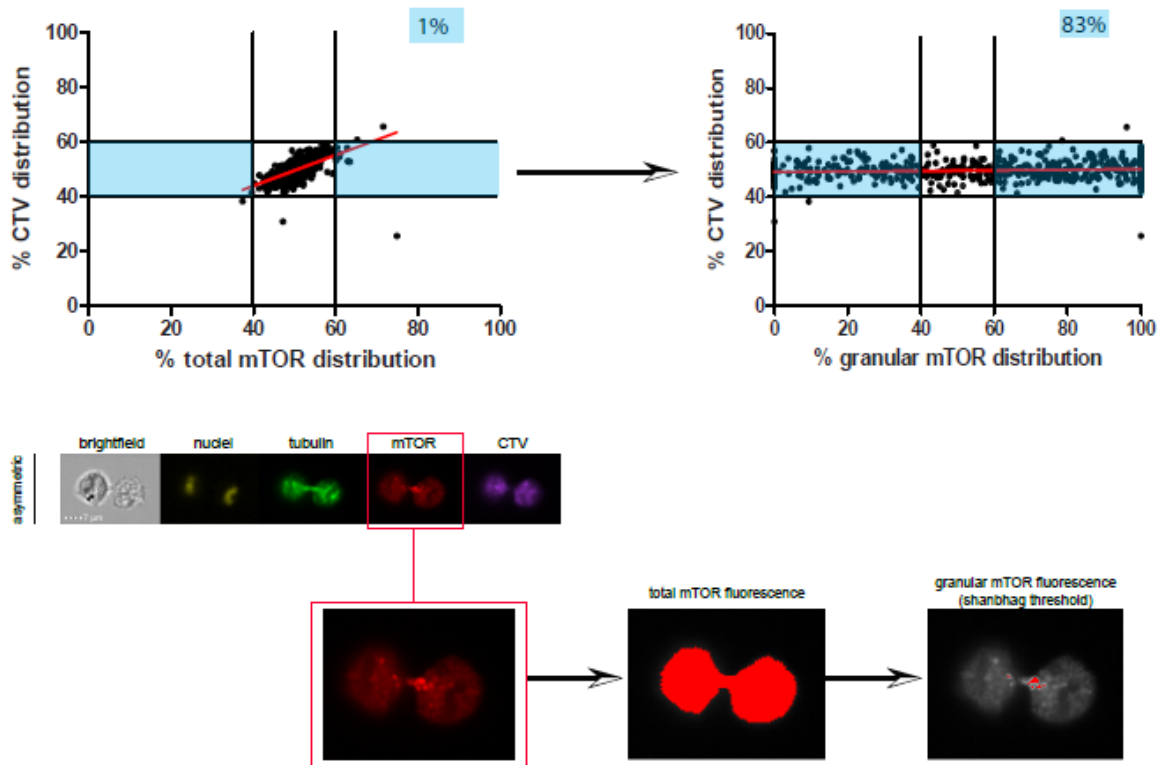
were defined as cells in telophase in which repartition of CD107a in the nascent daughter cells was beyond the 40-60% observed for CTV repartition (n=908 from 3 independent experiments). Lower panel: example of asymmetric and symmetric cells as detected by Imaging Flow Cytometry. **(B)** Left panel: A typical confocal laser-scanning microscopy image of a CD8⁺ T cell in telophase showing merged z-stacks for α -tubulin (red), CD107a (green) and DAPI (cyan). Dotted white lines show the selected area for measurement. Right panel: The fold increase of CD107a staining in the brighter nascent daughter cell as compared to the other nascent daughter cell is shown. The dotted red line indicates the limit between symmetric and asymmetric cells (1,5 fold increase, corresponding to a 60/40% variation) (n=61 from 2 independent experiments). Each dot represents one CD8⁺ T cell in telophase.

(C) Upper panel: The percentage of staining for perforin (left) or GrzB (right) in the presented nascent daughter cell is plotted as in panel A. Asymmetric cells were defined as indicated in panel A (perforin n=191 from 3 independent experiment; GrzB n=728 from 3 independent experiments). Lower panel: example of asymmetric and symmetric cells. **(D)** The panels show staining for CD107a and perforin in human CD8⁺ T memory T cells stimulated and analyzed as in (A) and (C). CD107a n=978 from 3 independent experiments; perforin n=1127 from 3 independent experiments.

Red lines indicate the global distribution of the data. Numbers highlighted in blue in the plots indicate the % of cells exhibiting asymmetric repartition of the marker of interest.

Fig.2

A



B

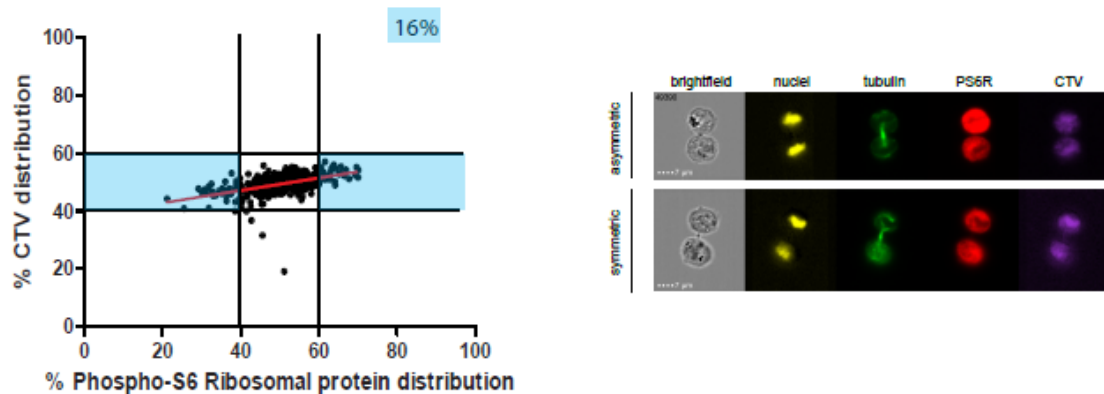


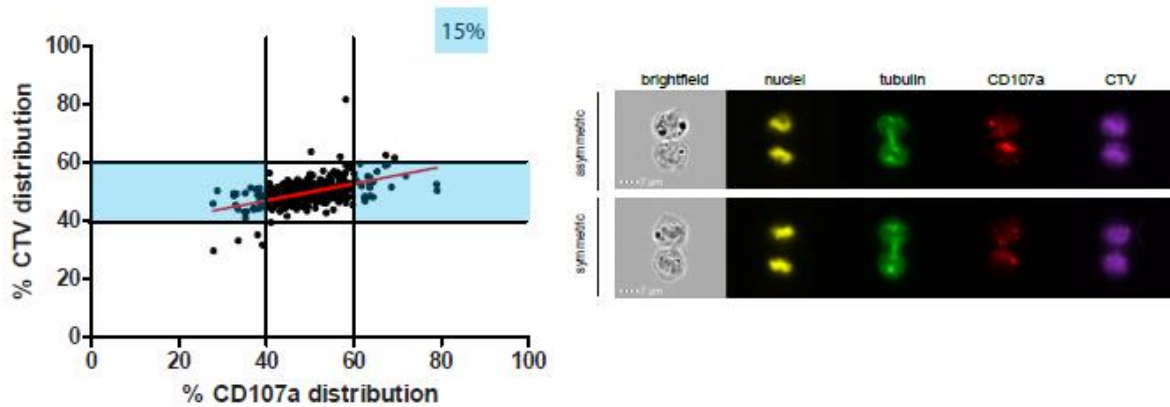
Fig.2: Asymmetric distribution of mTORC1 activity in telophase. (A, B) Freshly isolated polyclonal CD8⁺ T cells were stimulated by immobilized anti-CD3/anti-CD28/ICAM1 during 72h and stained with antibodies directed against mTOR (A) or Phospho ribosomal S6 protein (pS6R) (B). Cells in telophase were identified using Imaging Flow Cytometry. Each dot represents one nascent daughter cell. Only one of the nascent daughter cells in telophase that were identified by Imaging Flow Cytometry is plotted. The percentage of staining for mTOR (A) or pS6R (B) in the presented nascent daughter cell (*x axis*) is plotted against the percentage of staining for total cell proteins (CTV, *y axis*). Asymmetric cells were defined as in Fig.1.

(A) Left panel: analysis of total mTOR staining. Right panel: *shanbhag threshold* was applied to the same cells (n=704 from 3 independent experiment). Lower panels: an image gallery presenting staining for SytoxOrange/ α -tubulin/mTOR/CTV in a typical cell in telophase. mTOR staining before and after *shanbhag threshold* application is shown. (B) Left panel: Analysis of pS6R (n=449 from 3 independent experiments). Right panel: example of asymmetric and symmetric cells as detected by Imaging Flow Cytometry.

Red lines indicate the global distribution of the data. Numbers highlighted in blue in the plots indicate the % of cells exhibiting asymmetric repartition of the marker of interest.

Fig.3

A



B

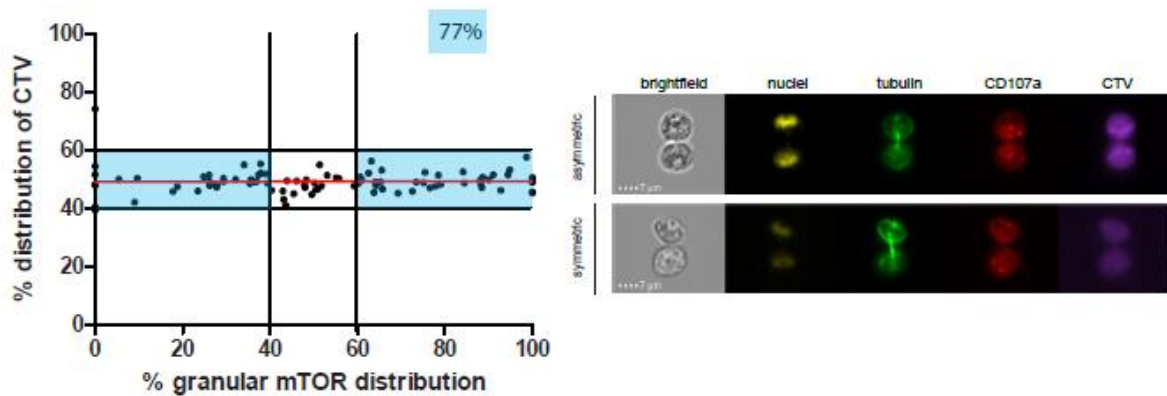
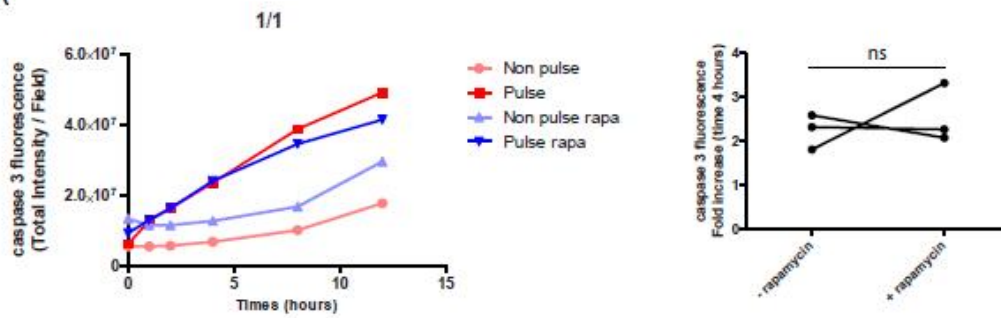
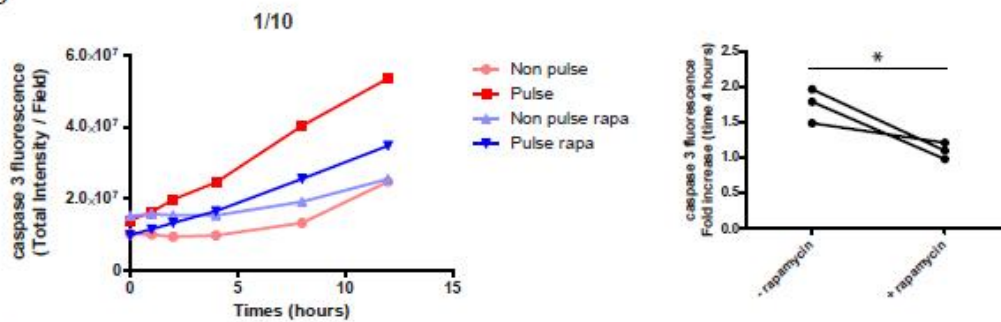


Fig.3: CD107a⁺ and mTOR⁺ vesicles uneven segregation in telophase in clonal CTL. CTL were stimulated by immobilized anti-CD3/anti-CD28/ICAM1 during 72h and stained with antibodies directed against CD107a and mTOR. Cells in telophase were identified using Imaging Flow Cytometry. **(A, B) Left panels:** Each dot represents one nascent daughter cell. Only one of the two nascent daughter cells in telophase that were identified by Imaging Flow Cytometry is plotted. The percentage of staining for the marker of interest in the presented nascent daughter cell (*x axis*) is plotted against the percentage of staining for total cell proteins (CTV, *y axis*). Asymmetric cells were defined as in Figure 1. **Right panels:** representative asymmetric and symmetric cells obtain by Imaging Flow Cytometry. **(A)** CD107a analysis (n=352 from 3 independent experiment). **(B)** Granular mTOR analysis (n=100 from 3 experiments). Red lines indicate the global distribution of the data. Numbers highlighted in blue in the plots indicate the % of cells exhibiting asymmetric repartition of the marker of interest.

Fig.4
A



B



C

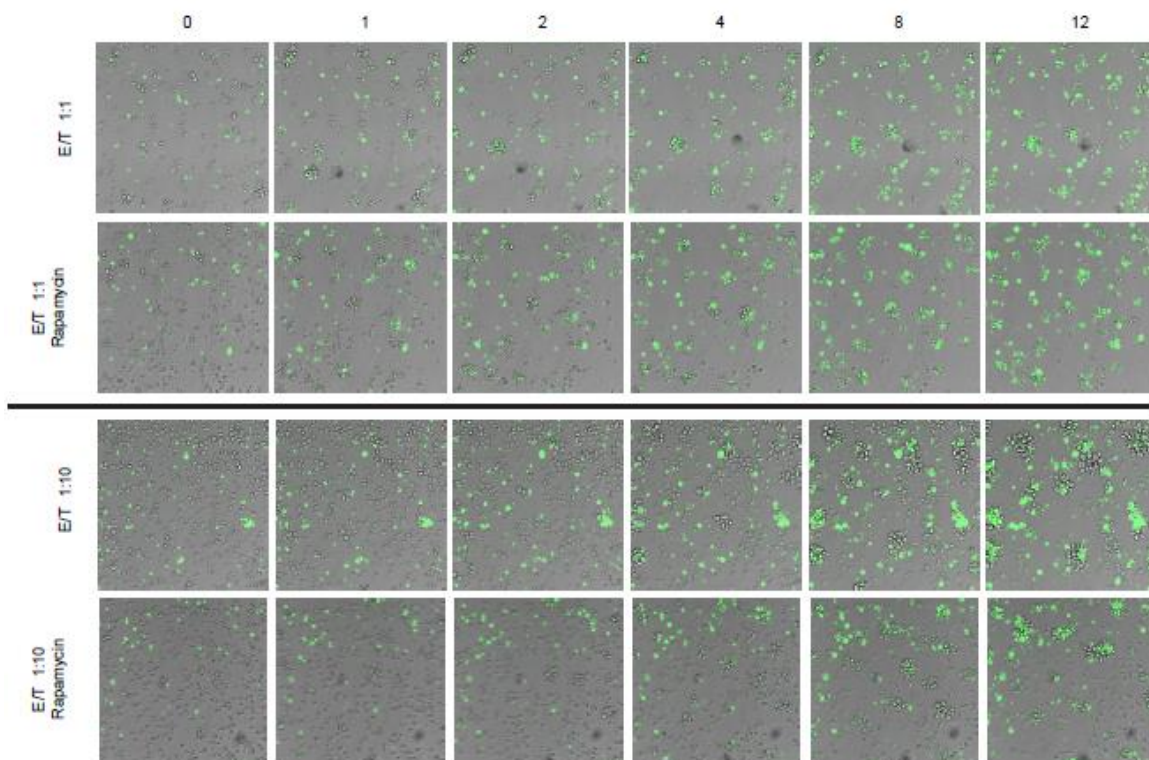


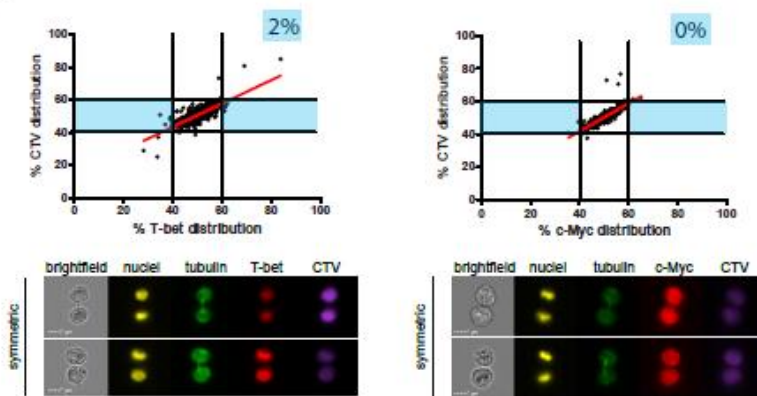
Fig. 4: mTORC1 activity contributes to CTL-mediated killing of outnumbering target cells. (A, B, C) Detection of caspase-3 activation by confocal laser-scanning microscopy. CTL were pretreated or not with 100nM rapamycin for 1 hours before conjugation with target cells. Cells were co-cultured for 12 hours either in presence or absence of rapamycin (100 ng/ml). Target cells were either unpulsed or pulsed with the specific peptide (10 μ M).

At time point: 0, 1, 2, 4, 8, 12 (hour) active caspase-3 was revealed by detecting NucView® caspase-3 fluorescence (green). **(A)** CTL and target cells were incubated at 1:1 E/T ratio (100 000 final cells in μ -slide ibidi 8 chambers). Left panel: caspase-3 fluorescence activation at each time points. Shown are pulsed or unpulsed target cells in presence or absence of rapamycin (1 representative experiment out of three is shown). Right panel: caspase-3 fluorescence fold increase (pulsed condition/ unpulsed condition) at 4 hours in presence or absence of rapamycin. **(B)** CTL and target cells were incubated at 1:10 E/T ratio (100 000 final cells in μ -slide ibidi 8 chambers). Left panel: caspase-3 fluorescence at each time points. Shown are pulsed or unpulsed target cells in presence or absence of rapamycin (1 representative experiment out of three is shown). Right panel: caspase-3 fluorescence fold increase (pulsed condition/control unpulsed condition) at 4 hours in presence or absence of rapamycin. **(C)** Typical time-lapse confocal laser-scanning microscopy snapshots showing caspase-3 activation at different time points.

Data are from 3 independent experiments. Paired Student's t-test using the GraphPad Prism software (version 5; GraphPad) was used to determine the statistical significance of differences between the groups. *P < 0.05.

Fig.5

A



B

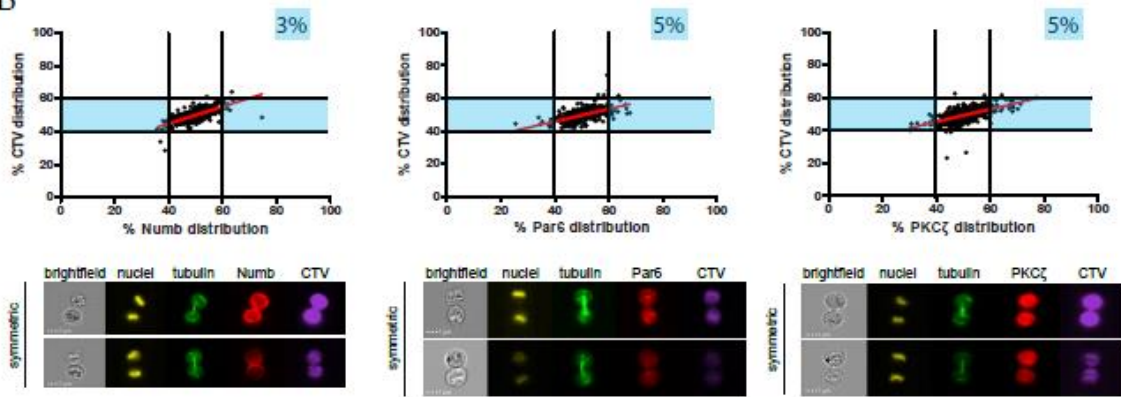


Fig.5: Uneven distribution in telophase is undetectable for fate determining transcription factors and limited for partitioning molecules. (A, B) Freshly isolated polyclonal CD8⁺ T cells were stimulated by immobilized anti-CD3/anti-CD28/ICAM1 during 72h and stained with antibodies directed against T-bet (left); c-Myc (right) (A) or Numb (left); Par6 (middle); PKCζ (right) (B). (A) left panel: T-bet analysis (n=926 from 3 independent experiments); right panel: c-Myc analysis (n=703 from 3 independent experiments). (B) left panel: Numb analysis (n=556 from 3 independent experiments); middle panel: PAR6 analysis (n=519 from 3 independent experiments); right panel: PKCζ analysis (n=900 from 3 independent experiments).

Red lines indicate the global distribution of the data. Numbers highlighted in blue in the plots indicate the % of cells exhibiting asymmetric repartition of the marker of interest.

Fig.6

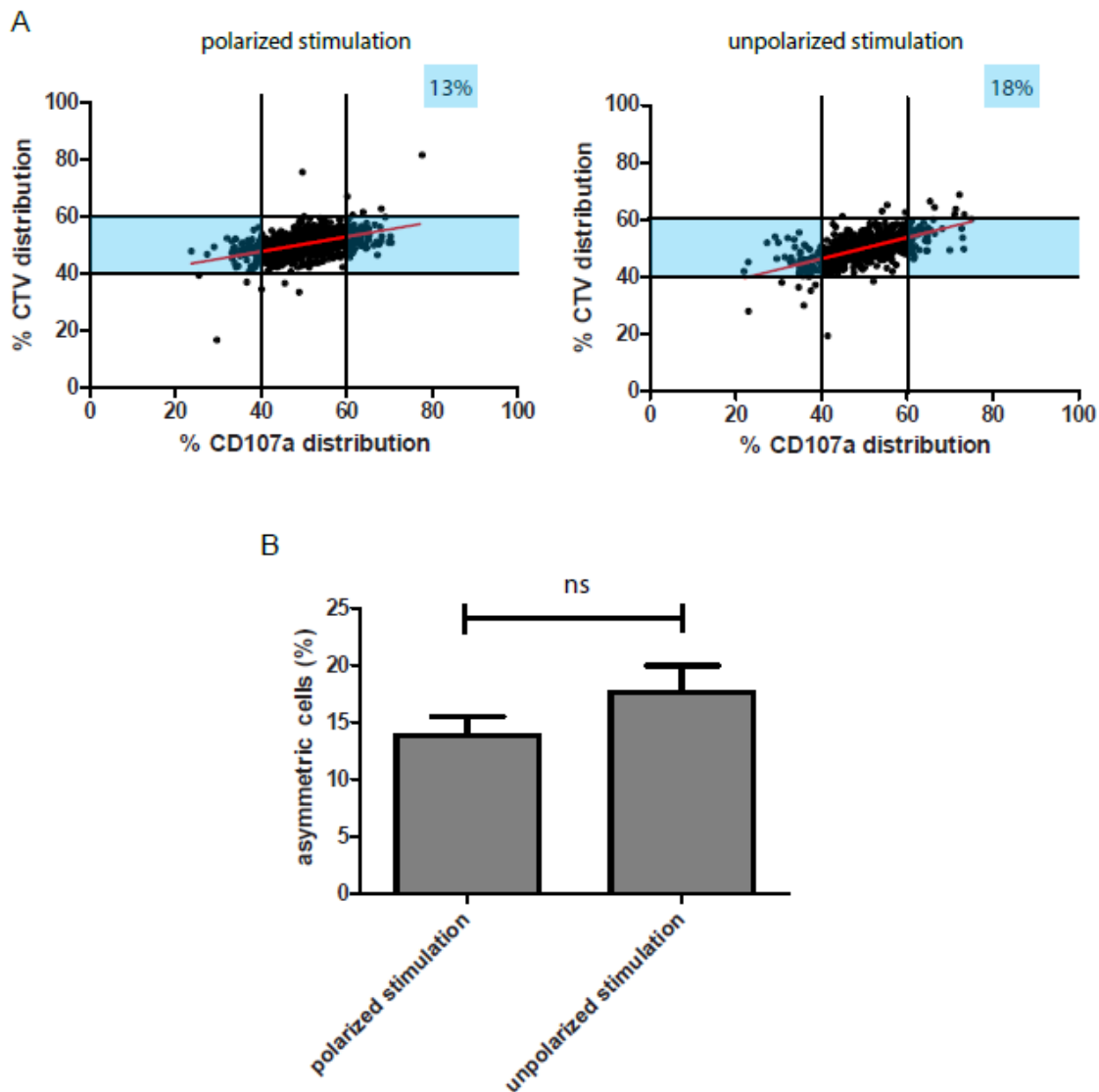


Fig.6: A polarity cue is not necessary for asymmetric repartition of lytic machinery. (A) Freshly isolated polyclonal CD8⁺ T cells were stimulated using immobilized anti-CD3/anti-CD28/ICAM1 (left) or with PMA/ionomycin (right) during 72 hours and stained with antibodies directed against CD107a. Each dot represents one nascent daughter cell. Only one of the two nascent daughter cells in telophase that were identified by Imaging Flow Cytometry is plotted. The percentage of staining for CD107a in the presented nascent daughter cell (*x axis*) is plotted against the percentage of staining for total cell proteins (CTV, *y axis*). Asymmetric cells were defined as in Figure 1. Left CD107a analysis when cells were stimulated with immobilized stimuli (n=1185 from 3 independent experiments). Right CD107a analysis when cells were stimulated with PMA/ionomycin (n=644 from 3 independent experiments). Red lines indicate the global distribution of the data. Numbers highlighted in blue in the plots indicate the % of cells exhibiting asymmetric repartition of the marker of interest.

(B) Histograms represent the mean and standard deviation of the percentage of asymmetric cells in the 3 independent experiments. No difference was revealed by paired t-test ($P>0.1$).

Fig.7

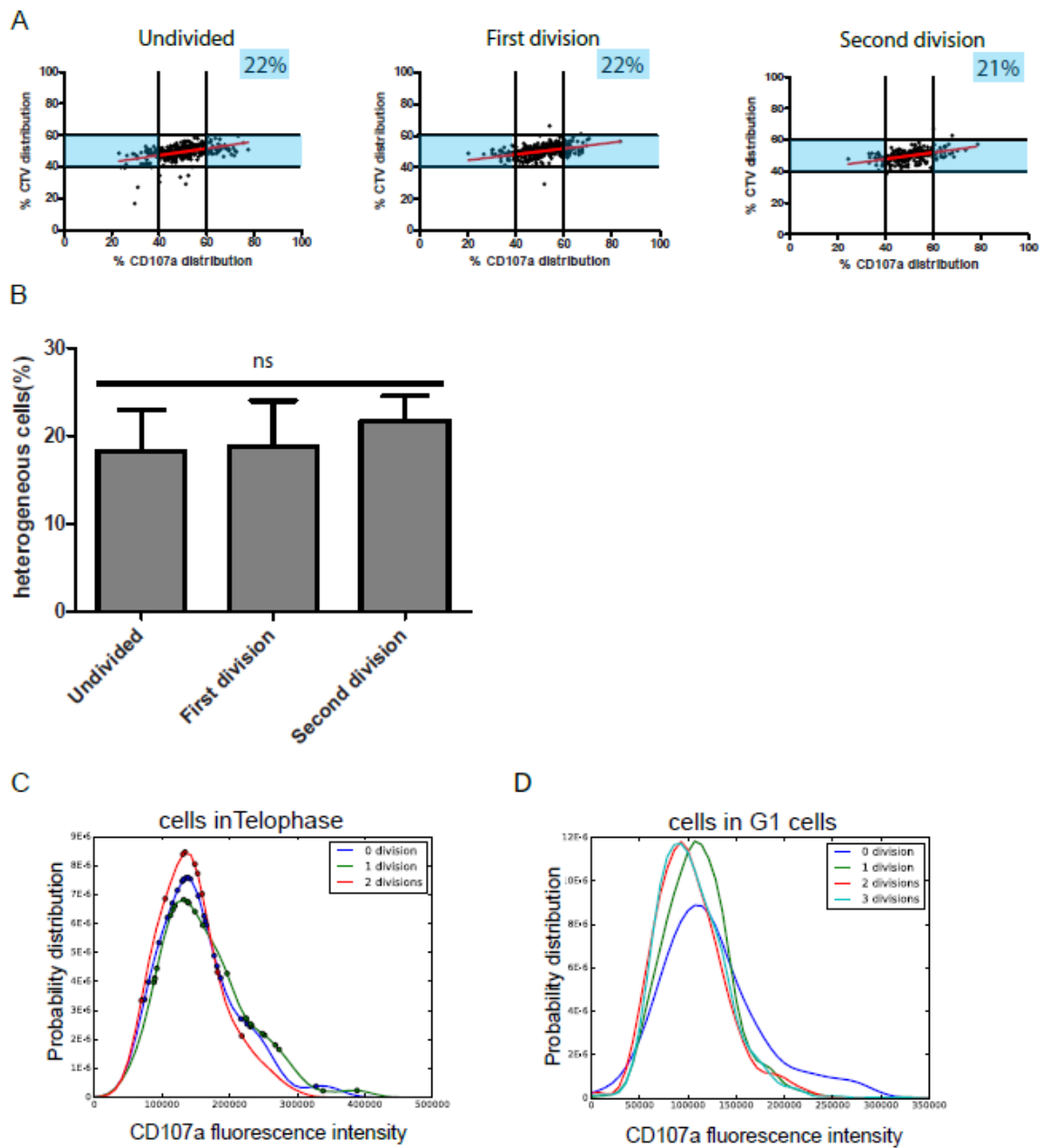


Fig. 7: Asymmetrical repartition of CD107a⁺ vesicles resets at each division event. (A, B) Freshly isolated polyclonal CD8⁺ T cells were stimulated using immobilized anti-CD3/anti-CD28/ICAM1 during 72h and stained with antibodies directed against CD107a. Cells in telophase were identified by Imaging Flow Cytometry. The number of divisions accomplished and the cell cycle phase were determined on the basis of CTV and SYTOX nuclear staining. (A) Each dot represents one nascent daughter cell. Only one of the two nascent daughter cells in telophase that were identified by Imaging Flow Cytometry is plotted. The percentage of staining for CD107a in the presented nascent daughter cell (*x axis*) is plotted against the percentage of staining for total cell proteins (CTV, *y axis*). Asymmetric cells were defined as in Figure 1. Numbers highlighted in blue in the plots indicate the % of cells exhibiting asymmetric repartition of the marker of interest.

(B) Histograms represent the mean and standard deviation of the percentage of asymmetric cells in 3 independent experiments ($P>0.5$). Red lines indicate the global distribution of the data.

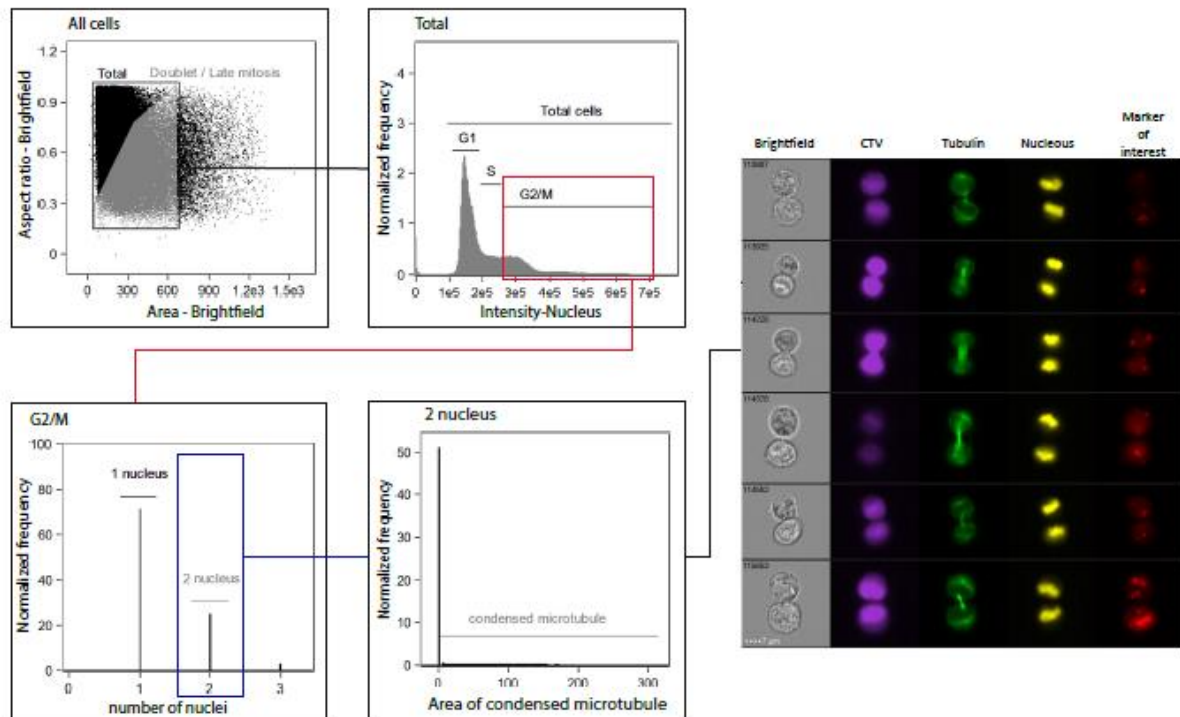
(C, D) Statistical analysis of cells in telophase and in G1. **(c)** Cells in telophase are plotted against their CD107a FI. The different curves represent cells having undergone 0, 1 or 2 mitoses. Each dot indicates one cell undergoing asymmetric CD107a repartition as compared to its CD107a FI. The χ^2 statistical test showed that cells undergoing uneven repartition of lytic machinery in telophase were randomly distributed all over the CD107a expression curves (See Supplementary Results).

(D) Plots show cells in G1 from three different experiments. Curves represent the distribution of CD107a fluorescence intensity for all cells in G1. Individual plots, marked with different colors, show cells in G1 at different rounds of division. The Kolmogorov-Smirnov goodness of fit test rejected the hypothesis that the CD107a expression curves follow the same distribution at the different division round (See Supplementary Results). The χ^2 test showed that variability was distributed all over the curves.

Supplementary figures

Fig S1

A



B

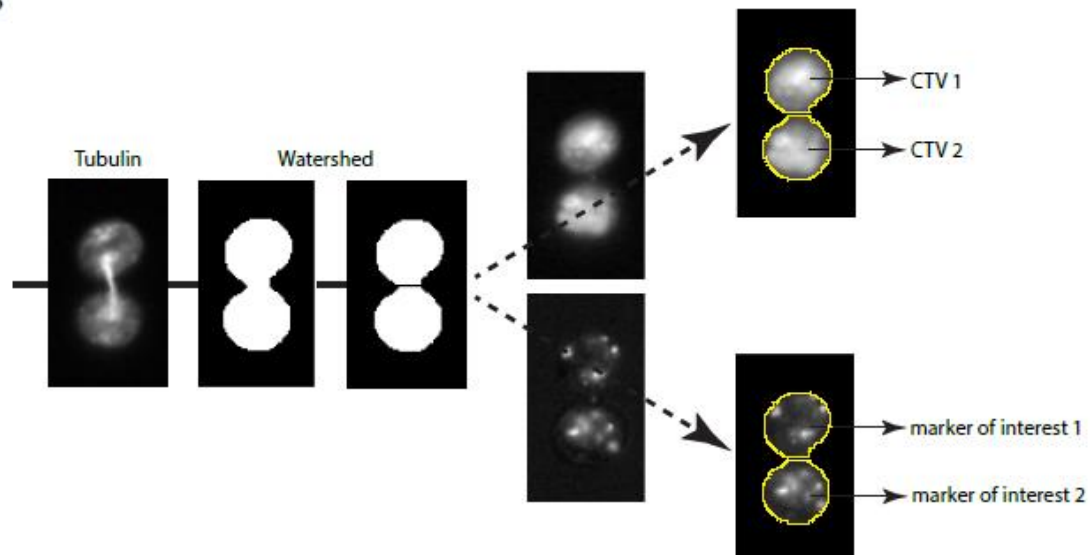


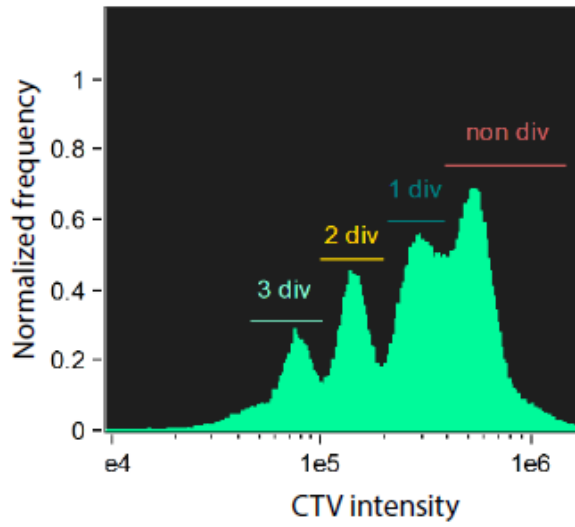
Fig S1: Gating strategy for Imaging Flow Cytometry (IsX) acquisition and single cell analysis of fluorescence intensity in telophase. (A) *Gating strategy* Based on the brightfield illumination, all events were plotted for their aspect ratio (length/width, equal 1 for perfectly round cells) and they area. Cells in telophase were

defined as those exhibiting a low aspect ratio and a big area. The region of interest (gray) included cell doublets and cells in anaphase and telophase. Based on the intensity of DNA staining (represented in linear axis) cells in G2/M were selected. We then applied a mask on the IsX image gallery (as described in material and methods section) to define the limits of the nuclei. This strategy was used to determine the number of nuclei present in each gated cell. To unambiguously identify cells in telophase we applied a mask on α -tubulin staining allowing to detect condensed microtubules in an elongated shape (as described in material and methods section). This procedure allowed us to detect the midbody (a structure characteristic of telophase formed by highly condensed α -tubulin that bridges the 2 nascent daughter cells). Cells included the described gates were finally visually inspected. All the cells recognized as in telophases on the basis of nuclear and tubulin staining were included in the analysis of the markers of interest.

(B) Analysis of individual cells in telophase All IsX generated TIFF files were analyzed using the Fiji software. For each telophase cell we used 3 TIFF image corresponding to: i) CTV staining; ii) α -tubulin staining iii) and marker of interest. To standardize analysis we used macro programming on Fiji (described in supplementary results section). To determine a rupture zone between the 2 nascent daughter cells we apply watershed function on tubulin mask. The watershed masks were used to determine the 2 nascent daughter cells in which the fluorescence intensities of CTV and of the markers of interest were measured (yellow lines).

Fig S2

A



B

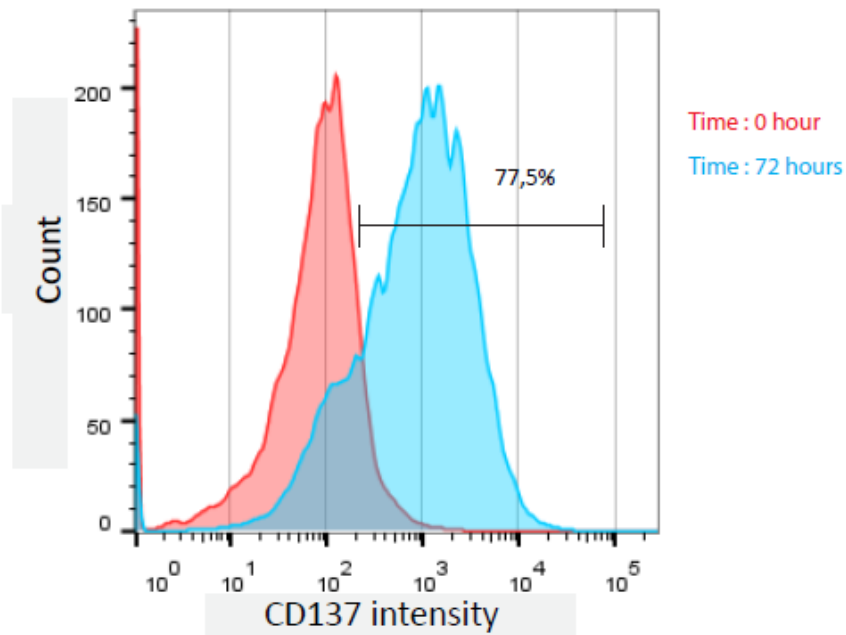


Fig S2: CD8⁺ T cells are efficiently stimulated by anti-CD3/anti-CD28/ICAM1 coating. Freshly isolated polyclonal CD8⁺ T cells previously stained with CTV were stimulated 72 hours using immobilized anti-CD3/anti-CD28/ICAM1. Upper panel Imaging Flow Cytometry shows that stimulated cell undergo several rounds of division as shown by CTV staining dilution. Lower panel Flow cytometry shows upregulation of CD137 staining in stimulated cells.

Fig S3

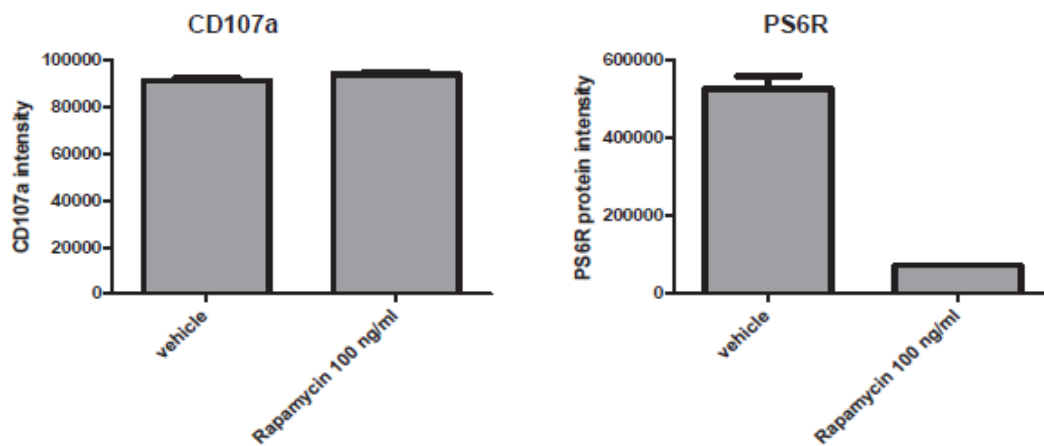


Fig S3: Treatment with rapamycin inhibits mTORC1 signaling without affecting lytic machinery expression. Freshly isolated polyclonal CD8⁺ T cells were stimulated using immobilized anti-CD3/anti-CD28/ICAM-1 during 72h and stained with antibodies directed against CD107a or pS6. Image Flow Cytometry analysis shows that treatment with 100 ng/ml rapamycin induces sharp diminution of pS6 staining without modifying CD107a staining (n=215 and 236 respectively).

Fig S4

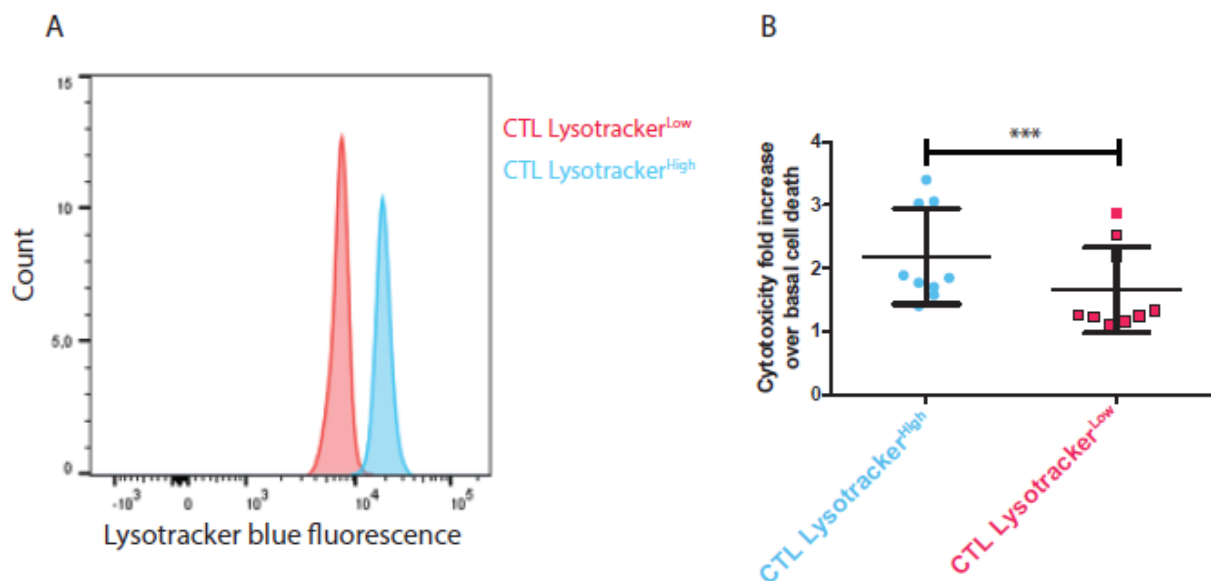


Fig S4: Higher levels of lytic granule expression by CTL correlate with stronger killing capability. (A) Clonal CTL were sorted on the basis of their LysoTracker Blue staining. (B) LysoTracker^{High} and LysoTracker^{Low} CTL-mediated cytotoxicity was evaluated by FACS analysis by measuring 7-AAD uptake in target cells either pulsed or not with antigenic peptide following 4 hour incubation with CTL at E/T ratio 1:1. Cytotoxicity is expressed as fold increase of pulsed target cells over unpulsed target cells.

Movie legends

Movie 1 and 2: 3-D representation of CD107a repartition in telaphasic CD8⁺ T cells The movies show 3-D reconstruction of cells in telophase. Cells were stimulated as described in Figure **1b** and stained for CD107a (green), α -tubulin (red) and DAPI (cyan).

Discussion

I) Hétérogénéité fonctionnelle des cellules effectrices

Au cours de cette étude, grâce à la mise en place d'un nouveau protocole d'acquisition et d'analyse des lymphocytes T CD8⁺ en télophase chez l'homme, nous avons pu mettre en évidence l'héritage asymétrique entre deux cellules filles, de la machinerie lytique CD107⁺, associé aux protéines lytiques perforine, granzyme B ainsi qu'à l'acteur métabolique mTORC1 de la voie de signalisation mTOR. Nos résultats montrent un mécanisme générateur d'hétérogénéité réalisé au cours de chaque cycle de prolifération, indépendant de la mise en place d'un axe de polarité et d'un signal polarisant. De plus, ces observations obtenues aussi bien suite à l'étude des télophases de cellules CD8⁺ du sang périphérique, effectrices clonales de différenciation terminale ou encore mémoires suggèrent un mécanisme d'hétérogénéité réalisé indépendamment du statut de différenciation des lymphocytes T CD8⁺. Pour finir nous démontrons d'une part l'implication de mTORC1 dans le maintien de l'activité lytique des CTL sur des temps prolongés (12heures) lorsque les cellules cibles sont en surnombre comparé aux CTL et d'autre part l'impact du stock initial en granule lytique sur les propriétés lytiques des CTL. Ensemble, ces résultats fonctionnels indirects, suggèrent que l'héritage asymétrique observé au cours de la division des lymphocytes T CD8⁺ entre les 2 cellules filles pourrait contribuer à former des cellules au potentiel lytique hétérogène sans induire d'étape de différenciation cellulaire.

De manière générale, l'hétérogénéité cellulaire générée entre deux cellules filles pendant la division cellulaire est associée au mécanisme de division asymétrique ACD. Il s'agit d'un mécanisme clé pour générer de la diversité cellulaire en biologie. Il joue un rôle crucial dans l'embryogenèse des organismes en permettant la formation de deux cellules distinctes à partir d'une seule cellule mère. Ce mécanisme réside dans la capacité des cellules à distribuer et à maintenir leurs composants intracellulaires de façon inégale entre les pôles proximal et distal pendant la mitose. Suite à la formation du sillon de division et de la cytokinèse, les deux cellules filles héritent de molécules effectrices intracellulaires distinctes favorisant leur développement en différentes populations de cellules fonctionnelles^{311,354}. Dans le cas des lymphocytes T, l'ACD a

pu être décrit chez la souris comme un mécanisme contribuant à la génération de cellules filles effectrices et mémoires à la suite de la division d'une cellule T naïve individuelle^{301,313}. Dans ce modèle, l'acquisition de profils cellulaires distincts entre les deux cellules filles est associé à la transmission inégale de facteurs de transcription tels que c-Myc et T-bet connus pour leurs rôles dans l'induction de la prolifération cellulaire et la fonction effectrice des cellules T^{325,355}. Suite à l'observation initiale d'une répartition inégale du protéasome actif au cours de la division de cellules T CD4⁺ murine conduisant à une dégradation asymétrique de T-bet dans les cellules filles³²⁵, d'autres voies de signalisation cellulaires, y compris les voies métaboliques, ont été décrites dans l'établissement des profils de différenciation suite à la mise en place d'un mécanisme d'ACD, par les lymphocytes T CD4⁺ naïfs murin^{355,356}. Ensemble ces résultats suggèrent qu'au cours de leur premier cycle de division les lymphocytes T naïfs réalisent un événement de division asymétrique au cours duquel chacune des cellules filles acquièrent des facteurs de transcription distincts influençant leurs différenciations vers le statut effecteur ou mémoire.

En nous basant sur les concepts et principes de l'ACD, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une répartition asymétrique entre deux cellules filles de facteurs associés à la machinerie lytique des lymphocytes T CD8⁺, au-delà des seuils de distribution aléatoire des protéines pendant la division cellulaire. Cependant, contrairement au mécanisme d'ACD, tel qu'il est classiquement décrit, cette répartition hétérogène des facteurs effecteurs au cours de la mitose n'est pas accompagnée d'une répartition asymétrique en facteurs de transcriptions effecteur, ni d'un déterminisme phénotypique. En parallèle, alors que l'ACD nécessite un signal polarisant, dictant la mise en place d'un axe de polarité intracellulaire nos résultats montrent l'existence d'un mécanisme, réalisé à chaque cycle de division indépendamment de la nature du signal activateur et de la mise en place d'un axe de polarité interne. Contrairement aux cellules T naïves qui forment des synapses immunologiques stables et nécessitent un temps d'activation prolongé^{65,357}, avant d'établir les populations cellulaires effectrices et mémoires, les cellules T CD8⁺ déjà différenciées en cellules effectrices sont rapidement activées au niveau de la synapse immunologique, fournissent des réponses biologiques rapides et interagissent avec plusieurs cellules cibles séquentiellement ou simultanément^{175,176,347}. Il pourrait donc être difficile d'établir un axe de polarité dans des cellules aussi dynamiques qui

subissent des stimulations polarisantes, transitoires et répétées. En se basant sur ces faits biologiques, nous suggérons que la distribution asymétrique des composants lytiques observées est en fait indépendante de l'établissement d'un axe de polarité et qu'il s'agit plutôt d'un phénomène intrinsèque de la division des cellules T CD8⁺ humaines. En accord avec cette hypothèse, notre observation qu'un stimulus soluble tel que la PMA/ionomycine conduit à une distribution asymétrique des composants lytiques dans la télophase similaire à celle obtenue pour une stimulation polarisante, soutient fortement l'idée d'un mécanisme général et intrinsèque de la division cellulaire, indépendant de la polarité et du type de stimulation.

Nos résultats associés à des analyses mathématiques, montrent d'une part, que ce processus de distribution asymétrique est stationnaire, c'est-à-dire qu'au cours de l'ensemble des cycles cellulaires le même pourcentage de cellules est capable de réaliser un événement de division asymétrique et d'autre part que ce processus d'hétérogénéité stationnaire n'est pas héréditaire signifiant qu'une cellule fille issue d'une division asymétrique a une probabilité stationnaire constante de produire une nouvelle division inégale. En d'autres termes, réaliser un événement de division hétérogène en division n , ne garantit pas de faire une division hétérogène en $n+1$.

Ensemble, nos résultats suggèrent que ce mécanisme, intrinsèque à la division cellulaire, permettrait de maintenir de l'hétérogénéité au sein des cellules fonctionnelles constituant une population clonale. Un tel processus de distribution asymétrique, stationnaire, au cours de la télophase, mais non hérité par les cellules filles pourrait permettre d'assurer des réponses reproductibles face à un antigène en établissant un large spectre de CTL fonctionnels capable d'étalonner leur réponse face à des populations de cellules cibles diverses et hétérogènes. En accord avec **Buchholz et al.**, 2016 et **Hodgkin et al.**, 2014 ce modèle pourrait conférer de la robustesse aux réponses des CTL via l'établissement d'une moyenne fonctionnelle au sein de la population ^{212,358}.

En parallèle, certains modèles postulent que la différenciation des lymphocytes pourrait être obtenue par l'accumulation de différences progressives entre les cellules filles en raison de la variation stochastique de la quantité de protéines héréditaires ^{312,359}. Une preuve importante à l'appui de cette notion vient du travail effectué par **T.N. Schumacher et al.** À l'aide d'un modèle murin dans lequel des cellules T CD8⁺ naïves

ont été dotées d'étiquettes génétiques uniques, ils ont montré que la progéniture d'une cellule T naïve peut adopter plusieurs profils de différenciation ^{293,360}.

Bien que nos observations ne soient pas associées avec l'établissement d'un nouveau profil de différenciation suite à la prolifération, nos résultats soutiennent l'existence d'un modèle de division stochastique capable d'influer sur la différenciation des lymphocytes ²¹² et laissent entendre qu'un tel mécanisme pourrait contribuer à l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des cellules T humaines ^{345,347}.

Au sein du laboratoire, nous avons déjà montré que les CTL clonales humaines présentent une hétérogénéité pour leur fonction lytique au cours d'une interaction soutenue avec les cellules cibles. Au cours de cette étude Z. Vasconcelos a mis en évidence au sein d'une population CTL clonale, dont les individus sont phénotypiquement identiques, l'émergence de cellules individuelles possédant une activité lytique limitée, appelées « low-rate killer » ainsi que de cellules capables de tuer l'ensemble des cellules cibles qui leurs sont présentées, appelées « high-rate killer » ou « super-killer ». En parallèle, en faisant proliférer individuellement des cellules décrites comme « high-rate killer », il démontre que le potentiel lytique mis en place par une CTL n'est pas un caractère héritable, mais que l'ensemble des individus d'une population cellulaire sont capables à eux seuls de reformer l'ensemble de l'hétérogénéité initiale au sein de leur progénie ³⁴⁷. Ensemble, ces observations indiquent que le comportement lytique n'est pas une prérogative de la formation d'un sous-ensemble de cellules au sein de la population clonale CTL, mais plutôt "le reflet de la prolifération" où chaque cellule individuelle est capable de générer des cellules filles hétérogènes.

En accord avec cette étude précédente, nos résultats suggèrent que l'hétérogénéité observée par **Vasconcelos et al.** ainsi que la formation des cellules « super-killer » pourraient être directement dépendantes de la « distribution asymétrique stochastique » de la machinerie lytique au cours de la télophase. De plus en triant des cellules CTL en fonction de leur contenu vésiculaire acide (granule lytique), nous observons une corrélation entre, disponibilité en granule lytique et capacité lytique. Bien que ces résultats puissent aux premiers abords sembler évidents, des études démontrent qu'une faible quantité de granules lytiques est suffisante pour induire un « killing » efficace, suggérant l'existence d'un mécanisme plus complexe ^{361,362}.

En accord avec cette hypothèse, nous avons pu mettre en évidence une distribution hétérogène de mTORC1 dont la forme active est directement liée au lysosome, ainsi que de la phosphorylation de S6P, l'un de ses principaux substrats. La signalisation mTOR étant aujourd'hui considérée comme l'un des piliers de la différenciation et de l'établissement des fonctions effectrices ²⁴⁰, ces observations associées avec la réalisation de test de lyse cellulaire (qui démontrent que l'expression de mTORC1 participe au maintien optimal des propriétés effectrices), suggèrent que l'héritage de mTORC1 au cours de la mitose pourrait conférer des avantages fonctionnels aux cellules CTL filles. De plus nos résultats démontrent que l'activité mTORC1, n'intervient dans les propriétés de « killing » qu'aux temps d'interaction prolongées et lorsque le stock de CTL disponibles est largement inférieur à la quantité de cellules cibles.

Ensemble ces résultats suggèrent un modèle en deux phases selon lequel : 1) les stocks hétérogènes de granules lytiques et de protéines lytiques hérités suite à la division cellulaire confèrent diverses capacités lytiques aux CTL individuelles sur de courtes périodes d'interaction. 2) lorsque, le nombre de CTL et le stock en perforine/granzyme initial est insuffisant pour contrôler l'ensemble des cellules cibles, les acteurs de la signalisation mTOR, différenciellement hérités au cours de la mitose pourraient conférer un "avantage énergétique et transcriptionnel" ^{226,255,276} aux CTL individuelles permettant de tuer des cellules cibles en plus grand nombre sur une période prolongée.

Il est intéressant de noter que nos résultats présentent d'importantes analogies avec des données publiées précédemment par **Batista et coll.** dans lesquelles une ségrégation asymétrique de l'antigène exogène internalisé s'est produite au cours de la division des cellules B ³⁶³. En accord avec cette étude, nos résultats révèlent une capacité intrigante des lymphocytes T et des lymphocytes B à distribuer stochastiquement leurs compartiments acides au cours de la télophase : Compartiments de classe II du CMH pour les cellules B et les granules lytiques pour les cellules T CD8+.

Un tel processus pourrait avoir été mis au point pour assurer une grande variabilité des réponses immunitaires humorales et cellulaires adaptatives au cours de l'expansion clonale des lymphocytes.

II) Différenciation mémoire et effecteur

Depuis 1994, de nombreux modèles cellulaires ont été proposés pour expliquer l'existence et la génération des cellules effectrices et mémoires. Parmi ces modèles on retrouve l'ACD, un modèle particulièrement intéressant exploité lors de l'embryogenèse et du renouvellement des cellules souches qui explique à lui seul l'observation de cellules effectrices et mémoires dès les temps précoces de l'infection suite à la stimulation d'un lymphocyte T naïf unique. Cependant ce modèle considère la mise en place d'une binarité suite à la stimulation d'un lymphocyte et laisse à mon sens peu de place à l'ensemble de l'hétérogénéité et au continuum de phénotype observable suite à la stimulation d'un lymphocyte ³⁴⁵. De plus, au cours de nos travaux, des résultats préliminaires acquis sur des cellules naïves ne montrent aucune asymétrie de répartition pour les facteurs de transcription T-bet et c-myc largement décrits dans la mise en place des cellules effectrices et proposés comme asymétriquement répartis au cours de la mitose chez la souris ^{325,355} (**Figure D-1**).

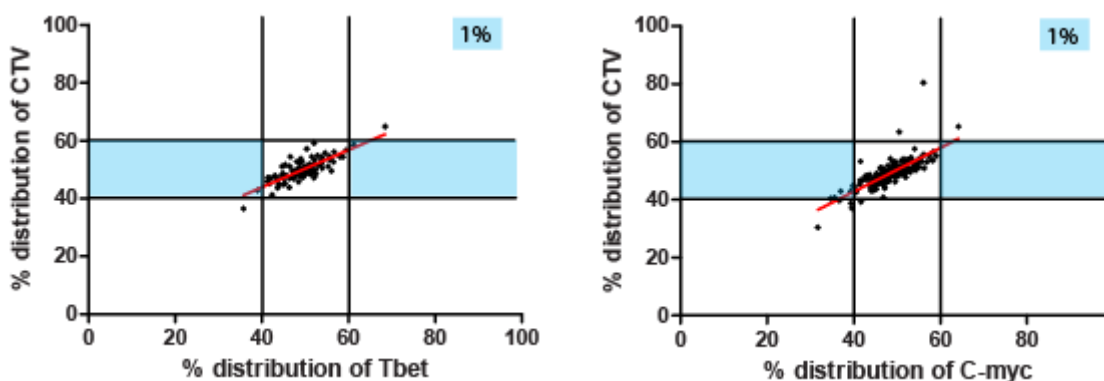


Figure D-1. Distribution de T-bet et c-Myc entre les deux futures cellules filles au cours de la télophase de cellules naïves.

Des cellules T naïves fraîchement isolées stimulées sur un coating anti-CD3/anti-CD28/ICAM1 immobilisées pendant 72h et colorées avec des anticorps dirigés contre T-bet ou c-Myc. Les cellules en télophase sont identifiées par cytométrie en flux d'imagerie. Chaque point représente une cellule fille naissante. Une seule des deux cellules filles naissantes de la télophase est tracée. Le pourcentage de coloration pour T-bet ou c-Myc (axe des x) est représenté par rapport au pourcentage de coloration pour les protéines cellulaires totales (CTV, axe des y). Les cellules asymétriques sont définies comme des cellules en télophase dans lesquelles la répartition des marqueurs T-bet ou c-Myc dans les cellules filles naissantes est supérieure aux 40-60% observés pour la répartition CTV (dans les rectangle bleu).

Le modèle de l'ACD fait directement opposition au modèle de différenciation linéaire, qui considère qu'il n'existe pas un pré-établissement de la différenciation cellulaire mais que l'ensemble des cellules stimulées sont capables de passer par l'ensemble

des stades de différenciations. Initialement, en accord avec la densité des populations observables au cours de la réponse immunitaire (forte augmentation des cellules effectrices au temps précoces, puis observation des mémoires au temps tardifs), le modèle de différenciation linéaire suggérait une transition des cellules naïves vers le statut effecteur puis mémoire. Cependant, ce modèle se confronte à de nombreux problèmes aussi bien théoriques que pratiques. À ce jour, alors que de nombreuses études démontrent que les cellules mémoires sont capables de se différencier en cellules effectrices, aucune étude ne démontre qu'un lymphocyte T effecteur ne soit capable de se différencier en mémoire. De plus, on observe que le nombre de cellules mémoires observables suite à l'infection est largement inférieur aux nombres de cellules effectrices mises en place au cours des phases précoces, suggérant que l'ensemble des effectrices ne sont pas capables de passer vers le statut mémoire. En parallèle, aucune étude n'explique les mécanismes de sélection par lesquels une cellule acquiert un statut de longue durée de vie ou entre en apoptose. Pour finir de nombreuses études démontrent aujourd'hui que les cellules mémoires sont des cellules à mi-chemin entre les profils de différenciation naïves et effecteurs. En considérant que le système immunitaire suit le premier principe de thermodynamique, selon lequel, lors de tout état de transformation il y a conservation de l'énergie, l'ensemble de ces démonstrations suggèrent principalement l'existence d'un modèle de différenciation linéaire où une cellule naïve est capable de se différencier en mémoire puis en effecteur.

En prenant en considération le modèle du potentiel régressif, qui démontre que le profil de différenciation est directement dépendant du nombre de cycles de prolifération et du nombre de contacts avec un stimulus activateur il semble cohérent de penser que l'ensemble des lymphocytes T soient capables de passer par l'ensemble des stades de différenciations, et que la somme des signaux stimulateurs dicte le devenir final de la cellule. Aussi dans ce modèle, lors de l'infection précoce, l'activation d'un lymphocyte T naïf initie les étapes de prolifération, de différenciation en cellules mémoires capables de re-circuler dans le flux sanguin et de migrer au niveau du site inflammatoire. La forte concentration en pathogène et cytokine-proinflammatoire entraîne alors une prolifération rapide ainsi qu'une différenciation massive des lymphocytes en cellules effectrices (CTL). Cependant parmi l'ensemble de ces cellules, retrouvées au niveau du site inflammatoire, il semble cohérent de penser que

chaque cellule individuelle sera en contact avec un niveau de stimulation variable directement lié à la probabilité de contact avec l'antigène ou les cytokines pro-inflammatoires. Un tel mécanisme permettrait au système immunitaire d'assurer un haut niveau d'hétérogénéité fonctionnelle, avec le maintien de cellules mémoires, qui auront rencontré peu de fois l'antigène avant de quitter les tissus infectieux et la génération de cellules effectrices, plus ou moins avancées dans le niveau de différenciation terminal. Cette hypothèse est en accord avec le travail de **Newell et al.** ³⁴⁵ qui démontre via des expériences de cytométrie de masse CyTOF (cytometry by time-of-flight) qu'il existe chez l'humain un continuum de différenciation plutôt que des groupes naïfs, mémoires et effecteurs bien définis. Aussi il n'existerait pas un type de cellule mémoire et effecteur exprimant tous les mêmes niveaux de récepteurs, mais un ensemble de cellules plus ou moins mémoires et plus ou moins effectrices dont le statut pourrait être le reflet d'un potentiel régressif. De manière intéressante, il est important de noter que ce modèle n'est pas en désaccord avec le modèle de la force des signaux qui considère que la force du signal apporté lors de la primo-activation d'un lymphocyte T naïf est directement capable d'influencer la différenciation cellulaire ¹⁵⁵. Ici un signal fort favoriserait dès les premières étapes une forte prolifération, aboutissant rapidement à la formation de cellules effectrices avant de rencontrer de nouveau l'antigène alors qu'un stimulus modéré favoriserait l'apparition des mémoires à la suite d'une prolifération modérée dont la nouvelle rencontre avec l'antigène favoriserait la formation des effectrices.

Lors des phases tardives de l'infection, la charge en pathogène et molécules pro-inflammatoires diminue au profit des cytokines anti-inflammatoires. Ce contexte cellulaire, contribue au maintien et sélection des cellules mémoires. Comme décrit précédemment aucune étude robuste ne suggère l'existence d'une étape de différenciation des effecteurs vers les mémoires. Cependant chez l'homme les lymphocytes T naïfs réalisent la prolifération homéostatique ^{148,150}, suggérant que des lymphocytes T naïfs d'une même spécificité peuvent être sélectionnés tardivement au cours de la réponse cellulaire. Aussi, cette activation de lymphocytes T naïfs au cours des phases tardives favoriserait la sélection de lymphocytes T mémoires, subissant peu de cycle de prolifération et capables de migrer au sein des organes lymphoïdes secondaires. Cette hypothèse est en accord avec les travaux de **D'Souza et Hedrick**, qui démontrent qu'au cours d'une infection virale les lymphocytes T naïfs ne sont pas

tous recrutés en même temps mais successivement pendant une période de 3-4 jours. En parallèle ils observent que la magnitude de prolifération ainsi que les profils de différenciations (phénotypiques) sont directement liés au temps d'activation d'un lymphocyte T naïf. Cependant, ils observent que les lymphocytes T activés lors des phases les plus tardives de l'infection présentent un profil phénotypique unique non prolifératif qui n'augmente pas le pool cellulaire de longue durée de vie, mémoire ³⁶⁴. Ces résultats sont en accord avec le modèle de la force du signal et suggèrent qu'un niveau d'activation minimal est nécessaire à la mise en place des cellules aussi bien effectrices que mémoires suite à la primo-stimulation d'un lymphocyte T naïf.

Aussi ce modèle qui associe, différenciation linéaire, potentiel régressif, force du signal et prolifération homéostatique permet d'expliquer la présence des cellules mémoires pendant la phase précoce de l'infection suite à la stimulation d'un seul naïf, la densité cellulaire des pools effecteur et tardif lors de l'ensemble de la réponse immunitaire ainsi que l'ensemble de l'hétérogénéité cellulaire et du continuum de différenciation.

Pour résumer, en accord avec le modèle proposé, lors de la primo-activation, les lymphocytes T naïfs initient leurs proliférations et acquièrent un phénotype mémoire capable de re-circuler et de migrer au sein des organes infectés. En fonction de la force du signal activateur, le taux de prolifération favorise la différenciation vers des statuts de plus en plus effecteurs. Associé à ce mécanisme, le potentiel régressif permet au système de s'adapter en continu à la charge infectieuse formant l'ensemble du continuum de différenciation à partir de l'activation d'une cellule initialement unique.

Lors des phases précoces, la forte charge infectieuse et l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires, favorisent une transition rapide du profil mémoire vers effecteur justifiant les observations d'un faible nombre de cellules mémoires au profit d'un nombre important de cellules effectrices à la suite de l'activation d'un lymphocyte T naïf unique.

Lors des phases tardives, la diminution de la charge infectieuse, associée à des signaux anti-inflammatoires favorise la sélection de cellules mémoires. Bien qu'il soit possible que l'observation des mémoires soit le reflet de cellules ayant rencontré peu de signaux stimulateurs lors de la phase précoce de l'infection, il semble plus cohérent que le pool mémoire observé suite à la contraction de la réponse immunitaire soit majoritairement le reflet de la stimulation d'autre lymphocyte T naïf de même spécificité issus de la prolifération homéostatique.

Perspectives

Au cours de cette étude nous avons pu montrer que les CTL humaines en télophase présentent, lors de chaque division cellulaire, une répartition asymétrique des composants de la machinerie lytique et des voies métaboliques. L'ensemble de nos résultats suggèrent un processus indépendant de la répartition des facteurs de transcriptions et de la mise en place d'un axe de polarité tel qu'il est décrit dans le cas du mécanisme de la division asymétrique. Cependant, il est important de noter qu'au cours de notre étude seul un panel restreint de facteurs contribuant à l'établissement de la lignée effectrice et/ou participant à l'ACD ont pu être testés. En utilisant le protocole que nous proposons, d'autres facteurs relevant tels qu'Eomes, BLIMP1 ou encore les ID2 et 3 seraient des pistes d'investigations intéressantes pour renforcer et/ou mieux appréhender notre modèle.

De manière intéressante, nous avons pu observer que l'hétérogénéité générée au cours de la division cellulaire par les lymphocytes T CD8+ (périphériques et CTL) est indépendante de la polarisation du signal. Cependant, qu'il s'agisse du coating anti-CD3/anti-CD28/ICAM1 ou de la PMA/ionomycine (en présence d'IL2 et IL15), les techniques de stimulation employées in vitro sont de fortes intensités, restreintes et fortement éloignées de la diversité des stimulations observables in vivo. Des études complémentaires visant à moduler la force de la signalisation TCR (via des expériences de cytotoxicités/Killing dirigées contre des cellules cibles présentant un peptide de forte ou faible affinité) ou la probabilité de contact avec l'antigène (en limitant le nombre de cellules cibles présentant le peptide antigénique spécifique à leur surface) semblent être des voies d'études intéressantes visant à mieux caractériser l'hétérogénéité stochastique. De plus, la signalisation dépendante de cytokines tel que le TGF β ou l'IL10 décrites comme contribuant à l'échappement tumoral via la diminution de l'activité lytique et l'augmentation de la résistance des cellules tumorales face au CTL ³⁶⁵, pourraient être des pistes intéressantes à explorer.

Au cours de notre étude, comme discuté précédemment nous suggérons que l'hétérogénéité des vésicules lytiques, molécules lytiques et de la voie métabolique mTORC1 pourraient contribuer à la génération et fonction des cellules dites « super-killer » précédemment décrites par notre équipe ³⁴⁶. Il est important de noter, que nous n'avons actuellement pas les moyens techniques d'identifier et suivre un événement

de division asymétrique pour CD107a et/ou mTORC1 pour en récupérer les cellules filles (vivantes) et tester respectivement leur capacité lytique en condition « single cell » (cellules testées individuellement). Cependant, il serait malgré tout intéressant d'employer les protocoles de « killing single cell » décrit par **Vasconcelos et al.**. Dans ces expériences, en triant des CTL en fonction de leur contenu en granule lytique et en testant leur activité lytique individuelle face à un nombre limité et constant de cellules cibles (ratio E:T 1:10), nous serions en mesure de déterminer si les cellules exprimant le plus de granules lytiques sont enrichies en cellules exprimant un profil « super-killer ». En parallèle une approche similaire en présence de rapamycine pourrait donner des informations supplémentaires sur le rôle que joue mTORC1 dans la mise en place de cette fonction.

En parallèle l'identification des super-killers en « single cell » et l'étude du panel d'expression de gènes relevant pour l'activation et l'activité des CTL individuelles (étude des mRNA exprimés) comparés aux cellules non super-killers pourraient révéler des pistes de recherches à explorer visant à comprendre les mécanismes mis en œuvre, aussi bien pour leurs générations que pour la mise en place de leurs fonctions lytiques amplifiées

Nous avons pu voir précédemment que mTORC1 est un puissant acteur métabolique, dont l'activation aboutit à l'augmentation de la glycolyse, de la synthèse d'énergie. De manière générale, toute augmentation du métabolisme est associée à l'augmentation de la synthèse protéique ainsi que des produits de cette activité telle que les ROS (Reactive Oxygen Species) au rôle décrit dans l'activité des lymphocytes T ³⁶⁶. En utilisant la gamme de bioanalyser Agilent (seahorse) capable de mesurer l'activité métabolique en temps réel, la mise au point d'un protocole de « Killing single cell » associé avec cette technologie pourrait permettre d'identifier précisément des différences métaboliques en corrélation avec des propriétés de « Killing ».

Dans l'ensemble, je pense que les résultats obtenus au cours de mes travaux de thèse peuvent inspirer des pistes de recherche intéressantes sur les mécanismes cellulaires et moléculaires régulant l'hétérogénéité fonctionnelle des lymphocytes T humains.

References bibliographiques

1. Haskins, K., Kappler, J. & Marrack, P. The Major Histocompatibility Complex-Restricted Antigen Receptor on T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2**, 51–66 (1984).
2. Malissen, B. & Bongrand, P. Early T Cell Activation: Integrating Biochemical, Structural, and Biophysical Cues. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 539–561 (2015).
3. Garcia, K. C. An α T Cell Receptor Structure at 2.5 Å and Its Orientation in the TCR-MHC Complex. (1996).
4. Schumacher, T. N. M. T-cell-receptor gene therapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 512–519 (2002).
5. Jorgensen, J. . Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics. (1992).
6. Sant'Angelo, D. B. *et al.* The Specificity and Orientation of a TCR to its Peptide–MHC Class II Ligands. *Immunity* **4**, 367–376 (1996).
7. Li, Z., Wu, W., Kemp, O., Stephen, M. & Manolios, N. The interchain disulfide linkage of T-cell antigen receptor- α and - β chains is a prerequisite for T-cell activation. *Cell. Immunol.* **190**, 101–111 (1998).
8. Rudolph, M. G., Stanfield, R. L. & Wilson, I. A. HOW TCRS BIND MHCS, PEPTIDES, AND CORECEPTORS. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 419–466 (2006).
9. Alarcon, B. Assembly of the Human T Cell Receptor-CD3 Complex Takes Place in the Endoplasmic Reticulum and Involves Intermediary Complexes between the CD3-706.e Core and Single T Cell Receptor α or β Chains. (1987).
10. Love, P. E. & Hayes, S. M. ITAM-mediated Signaling by the T-Cell Antigen Receptor. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, (2010).
11. Ashwell, J. D. & Klausner, R. D. Genetic and Mutational Analysis of the T-Cell Antigen Receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 139–167 (1990).
12. Koning, F., Lee Maloy, W. & Coligan, J. E. The implications of subunit interactions for the structure of the T cell receptor-CD3 complex. *Eur. J. Immunol.* **20**, 299–305 (1990).
13. Kuhns, M. S., Davis, M. M. & Garcia, K. C. Deconstructing the Form and Function of the TCR/CD3 Complex. *Immunity* **24**, 133–139 (2006).
14. Manolios, N., Bonifacino, J. S. & Klausner, R. D. Pairwise, cooperative and inhibitory interactions describe the assembly and probable structure of the T-cell antigen receptor. **9**
15. Sommers, C. L., Samelson, L. E. & Love, P. E. LAT: a T lymphocyte adapter protein that couples the antigen receptor to downstream signaling pathways. *BioEssays* **26**, 61–67 (2004).
16. Gascoigne, N. R. J. Do T cells need endogenous peptides for activation? *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 895–900 (2008).
17. Salvatore, V. serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide MHC complexes.pdf. (1995).
18. Padovan, E. *et al.* Expression of two T cell receptor α chains: dual receptor T cells. *Science* **262**, 422–424 (1993).
19. Padovan, E. *et al.* Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor β chains: implications for the mechanism of allelic exclusion. *J. Exp. Med.* **181**, 1587–1591 (1995).
20. Mombaerts, P. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes.pdf. (1992).
21. Shinkai, Y. *et al.* Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes. *Science* **259**, 822–825 (1993).

22. Nikolich-Zugich, J., Slifka, M. K. & Messaoudi, I. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 123–132 (2004).
23. Murphy, K., Travers, P., Walport, M. & Janeway, C. *Janeway's immunobiology*. (Garland Science, 2012).
24. Bridgeman, J. S., Sewell, A. K., Miles, J. J., Price, D. A. & Cole, D. K. Structural and biophysical determinants of $\alpha\beta$ T-cell antigen recognition. *Immunology* **135**, 9–18 (2012).
25. Bouvier, M. Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective. *Mol. Immunol.* **39**, 697–706 (2003).
26. Pieters, J. MHC class II-restricted antigen processing and presentation. in *Advances in Immunology* **75**, 159–208 (Elsevier, 2000).
27. Goldberg, A. C. & Rizzo, L. V. MHC structure and function – antigen presentation. Part 1. *Einstein* **13**, 153–156 (2015).
28. Cassinotti, A. *et al.* HLA and Autoimmune Digestive Disease: A Clinically Oriented Review for Gastroenterologists. *Am. J. Gastroenterol.* **104**, 195–217 (2009).
29. Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. The major histocompatibility complex and its functions. *Immunobiol. Immune Syst. Health Dis. 5th Ed.* (2001).
30. Yewdell, J. W., Antón, L. C. & Bennink, J. R. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J. Immunol.* **5** (1996).
31. Baey, C. Etude de l'efficacité et des mécanismes de la présentation croisée d'antigènes cellulaires tumoraux intacts par les cellules dendritiques. 171
32. Heath, W. R. & Carbone, F. R. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 126–134 (2001).
33. Vyas, J. M., Veen, A. G. V. der & Ploegh, H. L. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 607–618 (2008).
34. Busch, R., Doebele, R. C., Patil, N. S., Pashine, A. & Mellins, E. D. Accessory molecules for MHC class II peptide loading. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 99–106 (2000).
35. Roche, P. A. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding.pdf. (1990).
36. Viville, S. & Mathis, D. Class II Molecules Limited by Invariant Chain. **263**, 4 (1994).
37. Bikoff, E. K. Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J. Exp. Med.* **177**, 1699–1712 (1993).
38. Viville, S. *et al.* Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* **72**, 635–648 (1993).
39. Arunachalam, B., Phan, U. T., Geuze, H. J. & Cresswell, P. Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: Characterization of a Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 745–750 (2000).
40. Peter, J. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments.pdf. (1991).
41. Conus, S. & Simon, H. Cathepsins and their involvement in immune responses. *Swiss Med. Wkly.* (2010). doi:10.4414/smw.2010.13042
42. Sanderson, F. *et al.* Accumulation of HLA-DM, a Regulator of Antigen Presentation, in MHC Class II Compartments. **266**, 5 (1994).

43. Anders, A.-K. *et al.* HLA-DM captures partially empty HLA-DR molecules for catalyzed removal of peptide. *Nat. Immunol.* **12**, 54–61 (2011).
44. Denzin, L. K. & Cresswell, P. HLA-DM Induces CLIP Dissociation from MHC Class II ap Dimers and Facilitates Peptide Loading. 11
45. Sloan, V. S. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR..pdf. (1995).
46. Neefjes, J., Jongsma, M. L. M., Paul, P. & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 823–836 (2011).
47. George, A. J. T., Stark, J. & Chan, C. Understanding specificity and sensitivity of T-cell recognition. *Trends Immunol.* **26**, 653–659 (2005).
48. Huppa, J. B., Gleimer, M., Sumen, C. & Davis, M. M. Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. *Nat. Immunol.* **4**, 749–755 (2003).
49. Mempel, T. R., Henrickson, S. E. & Von Andrian, U. H. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* **427**, 154–159 (2004).
50. Matsui, K. *et al.* Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science* **254**, 1788–1791 (1991).
51. Weber, S., Traunecker, A., Oliveri, F., Gerhard, W. & Karjalainen, K. Specific low-affinity recognition of major histocompatibility complex plus peptide by soluble T-cell receptor. *Nature* **356**, 793–796 (1992).
52. Huppa, J. B. *et al.* TCR-peptide-MHC interactions in situ show accelerated kinetics and increased affinity. *Nature* **463**, 963–967 (2010).
53. Kalergis, A. M. Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. - PubMed - NCBI. (2001). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/11224522>. (Accessed: 31st August 2018)
54. Demotz, S., Grey, H. M. & Sette, A. The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* **249**, 1028–1030 (1990).
55. Davis, S. J. & Merwe, P. A. van der. The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond. *Nat. Immunol.* **7**, 803–809 (2006).
56. Irvine, D. J., Purbhoo, M. A., Krogsaard, M. & Davis, M. M. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* **419**, 845–849 (2002).
57. Purbhoo, M. A., Irvine, D. J., Huppa, J. B. & Davis, M. M. T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat. Immunol.* **5**, 524–530 (2004).
58. Huse, M. *et al.* Spatial and temporal dynamics of T cell receptor signaling with a photoactivatable agonist. *Immunity* **27**, 76–88 (2007).
59. Jiang, N. *et al.* Two-stage cooperative T cell receptor-peptide major histocompatibility complex-CD8 trimolecular interactions amplify antigen discrimination. *Immunity* **34**, 13–23 (2011).
60. McKeithan, T. W. Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5042–5046 (1995).
61. Davis, M. M. *et al.* Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 523–544 (1998).
62. Germain, R. N. & Stefanová, I. The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 467–522 (1999).
63. Gascoigne, N. R., Zal, T. & Alam, S. M. T-cell receptor binding kinetics in T-cell development and activation. *Expert Rev. Mol. Med.* **2001**, 1–17 (2001).

64. Valitutti, S. The Serial Engagement Model 17 Years After: From TCR Triggering to Immunotherapy. *Front. Immunol.* **3**, (2012).
65. Huang, J. *et al.* A single peptide-major histocompatibility complex ligand triggers digital cytokine secretion in CD4(+) T cells. *Immunity* **39**, 846–857 (2013).
66. He, H.-T., Lellouch, A. & Marguet, D. Lipid rafts and the initiation of T cell receptor signaling. *Semin. Immunol.* **17**, 23–33 (2005).
67. Janes, P. W., Ley, S. C., Magee, A. I. & Kabouridis, P. S. The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin. Immunol.* **12**, 23–34 (2000).
68. Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M. & Bolen, J. B. Pillars article: the CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. 1994. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 2650–2657 (2010).
69. Artyomov, M. N., Lis, M., Devadas, S., Davis, M. M. & Chakraborty, A. K. CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16916–16921 (2010).
70. Felberg, J. *et al.* Subdomain X of the kinase domain of Lck binds CD45 and facilitates dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* **279**, 3455–3462 (2004).
71. Werlen, G. & Palmer, E. The T-cell receptor signalosome: a dynamic structure with expanding complexity. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 299–305 (2002).
72. Drevot, P. *et al.* TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. *EMBO J.* **21**, 1899–1908 (2002).
73. Brownlie, R. J. & Zamoyska, R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 257–269 (2013).
74. Donnadieu, E. *et al.* Imaging early steps of human T cell activation by antigen-presenting cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **148**, 2643–2653 (1992).
75. Valitutti, S., Dessing, M., Aktories, K., Gallati, H. & Lanzavecchia, A. Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J. Exp. Med.* **181**, 577–584 (1995).
76. Feske, S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 690–702 (2007).
77. Oh-hora, M. & Rao, A. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 250–258 (2008).
78. Klee, C. B., Ren, H. & Wang, X. Regulation of the Calmodulin-stimulated Protein Phosphatase, Calcineurin. *J. Biol. Chem.* **273**, 13367–13370 (1998).
79. Svensson, L. *et al.* Calpain 2 Controls Turnover of LFA-1 Adhesions on Migrating T Lymphocytes. *PLoS ONE* **5**, (2010).
80. Stewart, M. P., McDowall, A. & Hogg, N. LFA-1-mediated Adhesion Is Regulated by Cytoskeletal Restraint and by a Ca²⁺-dependent Protease, Calpain. *J. Cell Biol.* **140**, 699–707 (1998).
81. Randriamampita, C. & Trautmann, A. Ca²⁺ signals and T lymphocytes; 'New mechanisms and functions in Ca²⁺ signalling'. *Biol. Cell* **96**, 69–78 (2004).
82. Trautmann, A. & Valitutti, S. The diversity of immunological synapses. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 249–254 (2003).
83. Mellor, H. & Parker, P. J. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* **332**, 281–292 (1998).
84. Meller, N., Elitzur, Y. & Isakov, N. Protein kinase C-theta (PKCtheta) distribution analysis in hematopoietic cells: proliferating T cells exhibit high proportions of PKCtheta in the particulate fraction. *Cell. Immunol.* **193**, 185–193 (1999).

85. Liu, Y. *et al.* Regulation of protein kinase C θ function during T cell activation by Lck-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **275**, 3603–3609 (2000).
86. Schaefer, B. C., Kappler, J. W., Kupfer, A. & Marrack, P. Complex and dynamic redistribution of NF- κ B signaling intermediates in response to T cell receptor stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1004–1009 (2004).
87. Dustin, M. L. T-cell activation through immunological synapses and kinapses. *Immunol. Rev.* **221**, 77–89 (2008).
88. Pfeifhofer-Obermair, C., Thuille, N. & Baier, G. Involvement of distinct PKC gene products in T cell functions. *Front. Immunol.* **3**, (2012).
89. Monks, C. R., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A. & Kupfer, A. Selective modulation of protein kinase C- θ during T-cell activation. *Nature* **385**, 83–86 (1997).
90. Dustin, M. L. PKC- θ : hitting the bull's eye. *Nat. Immunol.* **12**, 1031–1032 (2011).
91. Marsland, B. Protein kinase C θ is critical for the development of in vivo T helper (Th)₂ cell but not Th₁ cell responses. - PubMed - NCBI. (2004). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/15263025>. (Accessed: 31st August 2018)
92. Tourret, M. *et al.* T cell polarity at the immunological synapse is required for CD154-dependent IL-12 secretion by dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 6809–6818 (2010).
93. Bertrand, F. *et al.* Activation of the ancestral polarity regulator protein kinase C zeta at the immunological synapse drives polarization of Th cell secretory machinery toward APCs. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 2887–2894 (2010).
94. Johnson, G. L. & Lapadat, R. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science* **298**, 1911–1912 (2002).
95. Cargnello, M. & Roux, P. P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **75**, 50–83 (2011).
96. Yang, S.-H., Sharrocks, A. D. & Whitmarsh, A. J. Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* **320**, 3–21 (2003).
97. Le Gallic, L., Sgouras, D., Beal, G. & Mavrothalassitis, G. Transcriptional repressor ERF is a Ras/mitogen-activated protein kinase target that regulates cellular proliferation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4121–4133 (1999).
98. Tournier, C. *et al.* Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* **288**, 870–874 (2000).
99. Shaulian, E. & Karin, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* **4**, E131-136 (2002).
100. Yamamoto, T., Hattori, M. & Yoshida, T. Induction of T-cell activation or anergy determined by the combination of intensity and duration of T-cell receptor stimulation, and sequential induction in an individual cell. *Immunology* **121**, 383–391 (2007).
101. Schwartz, R. H. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J. Exp. Med.* **184**, 1–8 (1996).
102. Freeman, G. J. *et al.* B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **143**, 2714–2722 (1989).
103. Azuma, M. *et al.* B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* **366**, 76–79 (1993).
104. Acuto, O. & Michel, F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 939–951 (2003).
105. Sansom, D. M. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology* **101**, 169–177 (2000).

106. Bhatia, S., Edidin, M., Almo, S. C. & Nathenson, S. G. B7-1 and B7-2: similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. *Immunol. Lett.* **104**, 70–75 (2006).
107. Thompson, C. B. *et al.* CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 1333–1337 (1989).
108. Linsley, P. S. *et al.* Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* **173**, 721–730 (1991).
109. Walunas, T. L. *et al.* CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* **1**, 405–413 (1994).
110. Tivol, E. A. *et al.* Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* **3**, 541–547 (1995).
111. Alegre, M. L., Frauwirth, K. A. & Thompson, C. B. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 220–228 (2001).
112. Ma, D. Y. & Clark, E. A. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin. Immunol.* **21**, 265–272 (2009).
113. Bevan, M. J. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 595–602 (2004).
114. Elgueta, R. *et al.* Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol. Rev.* **229**, 152–172 (2009).
115. Cella, M. *et al.* Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* **184**, 747–752 (1996).
116. Koch, F. *et al.* High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J. Exp. Med.* **184**, 741–746 (1996).
117. Immunologie - broché - E. Espinosa, P. Chillet - Achat Livre | fnac. Available at: <https://livre.fnac.com/a2866066/E-Espinosa-Immunologie>. (Accessed: 5th September 2018)
118. Nguyen, T., Wang, R. & Russell, J. H. IL-12 enhances IL-2 function by inducing CD25 expression through a p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1445–1452 (2000).
119. Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T. & Taniguchi, T. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 245–268 (1993).
120. Nakagawa, T., Hirano, T., Nakagawa, N., Yoshizaki, K. & Kishimoto, T. Effect of recombinant IL 2 and gamma-IFN on proliferation and differentiation of human B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **134**, 959–966 (1985).
121. Macatonia, S. E. *et al.* Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* **154**, 5071–5079 (1995).
122. Gately, M. K. *et al.* Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of IFN-gamma in vivo. *Int. Immunol.* **6**, 157–167 (1994).
123. Ranges, G. E., Figari, I. S., Espevik, T. & Palladino, M. A. Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **166**, 991–998 (1987).
124. Iyer, S. S. & Cheng, G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Crit. Rev. Immunol.* **32**, 23–63 (2012).
125. JAK-STAT signaling pathway. *Wikipedia* (2018).
126. Kelso, A. The enigma of cytokine redundancy. *Immunol. Cell Biol.* **72**, 97–101 (1994).

127. Dusanter-Fourt, I., Mayeux, P. & Gisselbrecht, S. Transduction du signal par les récepteurs de cytokines. *médecine/sciences* **10**, 825 (1994).
128. Gonnord, P. *et al.* A hierarchy of affinities between cytokine receptors and the common gamma chain leads to pathway cross-talk. *Sci. Signal.* **11**, (2018).
129. Rawlings, J. S., Rosler, K. M. & Harrison, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.* **117**, 1281–1283 (2004).
130. Razavi, G. S. E. & Allen, T. Emerging Role of Interleukins in Cancer Treatment. *Immunome Res.* **0**, 1–17 (2015).
131. Zhang, S. L. & Bhandoola, A. Trafficking to the thymus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **373**, 87–111 (2014).
132. Liu, C. *et al.* Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization. *Blood* **108**, 2531–2539 (2006).
133. Taniuchi, I. CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annu. Rev. Immunol.* **36**, 579–601 (2018).
134. von Boehmer, H. & Fehling, H. J. Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 433–452 (1997).
135. Krangel, M. S. Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 133–139 (2009).
136. Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M. & Hogquist, K. A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 377–391 (2014).
137. Nitta, T., Murata, S., Ueno, T., Tanaka, K. & Takahama, Y. Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation. *Adv. Immunol.* **99**, 59–94 (2008).
138. Singer, A. New perspectives on a developmental dilemma: the kinetic signaling model and the importance of signal duration for the CD4/CD8 lineage decision. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 207–215 (2002).
139. Issuree, P. D. A., Ng, C. P. & Littman, D. R. Heritable Gene Regulation in the CD4:CD8 T Cell Lineage Choice. *Front. Immunol.* **8**, 291 (2017).
140. Rodriguez, R. M., Lopez-Larrea, C. & Suarez-Alvarez, B. Epigenetic dynamics during CD4(+) T cells lineage commitment. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **67**, 75–85 (2015).
141. Germain, R. N. T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 309–322 (2002).
142. Vriskoop, N. *et al.* Sparse production but preferential incorporation of recently produced naive T cells in the human peripheral pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 6115–6120 (2008).
143. von Boehmer, H. & Hafen, K. The life span of naive alpha/beta T cells in secondary lymphoid organs. *J. Exp. Med.* **177**, 891–896 (1993).
144. Freitas, A. A. & Rocha, B. B. Lymphocyte lifespans: homeostasis, selection and competition. *Immunol. Today* **14**, 25–29 (1993).
145. Tanchot, C., Lemonnier, F. A., Pérarnau, B., Freitas, A. A. & Rocha, B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naïve or memory T cells. *Science* **276**, 2057–2062 (1997).
146. Labrecque, N. *et al.* How much TCR does a T cell need? *Immunity* **15**, 71–82 (2001).
147. Andersen, M. H., Schrama, D., Straten, P. & Becker, J. C. Cytotoxic T Cells. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 32–41 (2006).

148. Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C. & Lefrançois, L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat. Immunol.* **1**, 426–432 (2000).
149. Surh, C. D. & Sprent, J. Regulation of mature T cell homeostasis. *Semin. Immunol.* **17**, 183–191 (2005).
150. Li, Q. *et al.* A Central Role for mTOR Kinase in Homeostatic Proliferation Induced CD8+ T cell Memory and Tumor Immunity. *Immunity* **34**, 541–553 (2011).
151. den Braber, I. *et al.* Maintenance of peripheral naive T cells is sustained by thymus output in mice but not humans. *Immunity* **36**, 288–297 (2012).
152. Qi, Q., Zhang, D. W., Weyand, C. M. & Goronzy, J. J. Mechanisms shaping the naïve T cell repertoire in the elderly - thymic involution or peripheral homeostatic proliferation? *Exp. Gerontol.* **54**, 71–74 (2014).
153. Masopust, D. & Schenkel, J. M. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 309–320 (2013).
154. Nolz, J. C., Starbeck-Miller, G. R. & Harty, J. T. Naive, effector and memory CD8 T-cell trafficking: parallels and distinctions. *Immunotherapy* **3**, 1223–1233 (2011).
155. Kaech, S. M. & Cui, W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 749–761 (2012).
156. Joshi, N. S. *et al.* Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8+ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity* **27**, 281–295 (2007).
157. Kalia, V. *et al.* Prolonged Interleukin-2R α Expression on Virus-Specific CD8+ T Cells Favors Terminal-Effector Differentiation In Vivo. *Immunity* **32**, 91–103 (2010).
158. Pipkin, M. E. *et al.* Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* **32**, 79–90 (2010).
159. Shiow, L. R. *et al.* CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* **440**, 540–544 (2006).
160. Graeler, M. & Goetzl, E. J. Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **16**, 1874–1878 (2002).
161. Matloubian, M. *et al.* Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **427**, 355–360 (2004).
162. Butcher, E. C. & Picker, L. J. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* **272**, 60–66 (1996).
163. Groom, J. R. & Luster, A. D. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 207–215 (2011).
164. Shimizu, Y., Seventer, G. A. V., Horgan, K. J. & Shaw, S. Regulated expression and binding of three VLA (β 1) integrin receptors on T cells. *Nature* **345**, 250–253 (1990).
165. Hirata, T. *et al.* P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is a physiological ligand for E-selectin in mediating T helper 1 lymphocyte migration. *J. Exp. Med.* **192**, 1669–1676 (2000).
166. Weninger, W., Manjunath, N. & von Andrian, U. H. Migration and differentiation of CD8+ T cells. *Immunol. Rev.* **186**, 221–233 (2002).
167. Mikhak, Z., Strassner, J. P. & Luster, A. D. Lung dendritic cells imprint T cell lung homing and promote lung immunity through the chemokine receptor CCR4. *J. Exp. Med.* **210**, 1855–1869 (2013).
168. Sigmundsdottir, H. *et al.* DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to ‘program’ T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat. Immunol.* **8**, 285–293 (2007).
169. Hobbs, S. J., Osborn, J. F. & Nolz, J. C. Activation and trafficking of CD8+ T cells during viral skin infection: immunological lessons learned from vaccinia virus. *Curr. Opin. Virol.* **28**, 12–19 (2018).

170. Liu, L., Fuhlbrigge, R. C., Karibian, K., Tian, T. & Kupper, T. S. Dynamic Programming of CD8+ T Cell Trafficking after Live Viral Immunization. *Immunity* **25**, 511–520 (2006).
171. Bykovskaja, S. N., Rytenko, A. N., Rauschenbach, M. O. & Bykovsky, A. F. Ultrastructural alteration of cytolytic T lymphocytes following their interaction with target cells. I. Hypertrophy and change of orientation of the Golgi apparatus. *Cell. Immunol.* **40**, 164–174 (1978).
172. Yannelli, J. R., Sullivan, J. A., Mandell, G. L. & Engelhard, V. H. Reorientation and fusion of cytotoxic T lymphocyte granules after interaction with target cells as determined by high resolution cinemicrography. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **136**, 377–382 (1986).
173. Stinchcombe, J. C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S. & Griffiths, G. M. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* **443**, 462–465 (2006).
174. Ritter, A. T., Angus, K. L. & Griffiths, G. M. The role of the cytoskeleton at the immunological synapse. *Immunol. Rev.* **256**, 107–117 (2013).
175. Bertrand, F. *et al.* An initial and rapid step of lytic granule secretion precedes microtubule organizing center polarization at the cytotoxic T lymphocyte/target cell synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 6073–6078 (2013).
176. Wiedemann, A., Depoil, D., Faroudi, M. & Valitutti, S. Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 10985–10990 (2006).
177. Praper, T. *et al.* Human perforin permeabilizing activity, but not binding to lipid membranes, is affected by pH. *Mol. Immunol.* **47**, 2492–2504 (2010).
178. Krzewski, K., Gil-Krzewska, A., Nguyen, V., Peruzzi, G. & Coligan, J. E. LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood* **121**, 4672–4683 (2013).
179. Henkart, P. A. Cytolytic activity of purified cytoplasmic granules from cytotoxic rat large granular lymphocyte tumors. *J. Exp. Med.* **160**, 75–93 (1984).
180. Millard, P. J., Henkart, M. P., Reynolds, C. W. & Henkart, P. A. Purification and properties of cytoplasmic granules from cytotoxic rat LGL tumors. 9
181. Podack, E. R., Young, J. D. & Cohn, Z. A. Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 8629–8633 (1985).
182. Young, J., Cohn, Z. & Podack, E. The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin 1) from cytotoxic T cells: structural, immunological, and functional similarities. *Science* **233**, 184–190 (1986).
183. Law, R. H. P. *et al.* The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature* **468**, 447–451 (2010).
184. Sutton, V. R. & Trapani, J. A. Proteases in lymphocyte killer function: redundancy, polymorphism and questions remaining. *Biol. Chem.* **391**, 873–879 (2010).
185. Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. & Trapani, J. A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 388–400 (2015).
186. Heibein, J. A. *et al.* Granzyme B–Mediated Cytochrome C Release Is Regulated by the Bcl-2 Family Members Bid and Bax. *J. Exp. Med.* **192**, 1391–1402 (2000).
187. Sutton, V. R. *et al.* Initiation of Apoptosis by Granzyme B Requires Direct Cleavage of Bid, but Not Direct Granzyme B–Mediated Caspase Activation. *J. Exp. Med.* **192**, 1403–1414 (2000).
188. Sutton, V. R., Wowk, M. E., Cancilla, M. & Trapani, J. A. Caspase Activation by Granzyme B Is Indirect, and Caspase Autoprocessing Requires the Release of Proapoptotic Mitochondrial Factors. *Immunity* **18**, 319–329 (2003).

189. Li, P. *et al.* Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* **91**, 479–489 (1997).
190. Nagata, S. & Golstein, P. The Fas death factor. *Science* **267**, 1449–1456 (1995).
191. Carswell, E. A. *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 3666–3670 (1975).
192. Pimentel-Muñoz, F. X. & Seed, B. Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation. *Immunity* **11**, 783–793 (1999).
193. Isaacs, A., Lindenmann, J. & Valentine, R. C. Pillars Article: Virus Interference. II. Some Properties of Interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1957. 147: 268–273. *J. Immunol.* **195**, 1921–1926 (2015).
194. Früh, K. & Yang, Y. Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 76–81 (1999).
195. Leggatt, G. R., Dunn, L. A., De kluyver, R. L., Stewart, T. & Frazer, I. H. Interferon-gamma enhances cytotoxic T lymphocyte recognition of endogenous peptide in keratinocytes without lowering the requirement for surface peptide. *Immunol. Cell Biol.* **80**, 415–424 (2002).
196. Zhou, F. Molecular Mechanisms of IFN- γ to Up-Regulate MHC Class I Antigen Processing and Presentation. *Int. Rev. Immunol.* **28**, 239–260 (2009).
197. Tomita, Y., Bilim, V., Hara, N., Kasahara, T. & Takahashi, K. Role of IRF-1 and caspase-7 in IFN-gamma enhancement of Fas-mediated apoptosis in ACHN renal cell carcinoma cells. *Int. J. Cancer* **104**, 400–408 (2003).
198. Xu, X., Fu, X.-Y., Plate, J. & Chong, A. S.-F. IFN- γ Induces Cell Growth Inhibition by Fas-mediated Apoptosis: Requirement of STAT1 Protein for Up-Regulation of Fas and FasL Expression. *Cancer Res.* **58**, 2832–2837 (1998).
199. Kayagaki, N. *et al.* Type I Interferons (IFNs) Regulate Tumor Necrosis Factor–related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Expression on Human T Cells: A Novel Mechanism for the Antitumor Effects of Type I IFNs. *J. Exp. Med.* **189**, 1451–1460 (1999).
200. Takeda, K. *et al.* Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J. Exp. Med.* **195**, 161–169 (2002).
201. Ehrlich, S., Infante-Duarte, C., Seeger, B. & Zipp, F. Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes. *Cytokine* **24**, 244–253 (2003).
202. Porta, C. *et al.* Interferons α and γ induce p53-dependent and p53-independent apoptosis, respectively. *Oncogene* **24**, 605–615 (2005).
203. Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 231–241 (2008).
204. Scrivo, R., Vasile, M., Bartosiewicz, I. & Valesini, G. Inflammation as “common soil” of the multifactorial diseases. *Autoimmun. Rev.* **10**, 369–374 (2011).
205. Vassileva, V. & Piquette-Miller, M. Inflammation: The Dynamic Force of Health and Disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* **96**, 401–405 (2014).
206. Deeks, S. G., Tracy, R. & Douek, D. C. Systemic Effects of Inflammation on Health during Chronic HIV Infection. *Immunity* **39**, 633–645 (2013).
207. Prato, S., Zhan, Y., Mintern, J. D. & Villadangos, J. A. Rapid Deletion and Inactivation of CTLs upon Recognition of a Number of Target Cells over a Critical Threshold. *J. Immunol.* **191**, 3534–3544 (2013).
208. Keir, M. E. *et al.* Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J. Exp. Med.* **203**, 883–895 (2006).

209. Agata, Y. *et al.* Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.* **8**, 765–772 (1996).
210. Okazaki, T. & Honjo, T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int. Immunol.* **19**, 813–824 (2007).
211. Vignaux, F. & Golstein, P. Fas-based lymphocyte-mediated cytotoxicity against syngeneic activated lymphocytes: a regulatory pathway? *Eur. J. Immunol.* **24**, 923–927 (1994).
212. Buchholz, V. R., Schumacher, T. N. M. & Busch, D. H. T Cell Fate at the Single-Cell Level. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 65–92 (2016).
213. Sallusto, F., Lenig, D. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **401**, 5 (1999).
214. Gebhardt, T. *et al.* Different patterns of peripheral migration by memory CD4+ and CD8+ T cells. *Nature* **477**, 216–219 (2011).
215. Steinert, E. M. *et al.* Quantifying Memory CD8 T Cells Reveals Regionalization of Immunosurveillance. *Cell* **161**, 737–749 (2015).
216. Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R. & Lanzavecchia, A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.* **187**, 875–883 (1998).
217. Tang, H. L. & Cyster, J. G. Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science* **284**, 819–822 (1999).
218. Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A. L. & Lefrançois, L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* **291**, 2413–2417 (2001).
219. Baron, J. L., Madri, J. A., Ruddle, N. H., Hashim, G. & Janeway, C. A. Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J. Exp. Med.* **177**, 57–68 (1993).
220. Wu, L. *et al.* CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *J. Exp. Med.* **185**, 1681–1691 (1997).
221. Sallusto, F., Mackay, C. R. & Lanzavecchia, A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* **277**, 2005–2007 (1997).
222. Gebhardt, T. *et al.* Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat. Immunol.* **10**, 524–530 (2009).
223. Mittrücker, H.-W., Visekruna, A. & Huber, M. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **62**, 449–458 (2014).
224. Intlekofer, A. M. *et al.* Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* **204**, 2015–2021 (2007).
225. Banerjee, A. *et al.* Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8+ T cells to compete for the memory cell niche. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 4988–4992 (2010).
226. Rao, R. R., Li, Q., Bupp, M. R. G. & Shrikant, P. A. Transcription Factor Foxo1 Represses T-bet-Mediated Effector Functions and Promotes Memory CD8+ T Cell Differentiation. *Immunity* **36**, 374–387 (2012).
227. Choi, Y. S., Yang, J. A. & Crotty, S. Dynamic regulation of Bcl6 in follicular helper CD4 T (Tfh) cells. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 366–372 (2013).
228. Rutishauser, R. L. *et al.* Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity* **31**, 296–308 (2009).
229. Crotty, S., Johnston, R. J. & Schoenberger, S. P. Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat. Immunol.* **11**, 114–120 (2010).

230. Ichii, H. *et al.* Bcl6 is essential for the generation of long-term memory CD4+ T cells. *Int. Immunol.* **19**, 427–433 (2007).
231. Ichii, H. *et al.* Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* **3**, 558–563 (2002).
232. Nakayamada, S. *et al.* Early Th1 Cell Differentiation Is Marked by a Tfh Cell-like Transition. *Immunity* **35**, 919–931 (2011).
233. Ji, Y. *et al.* Repression of the DNA-binding inhibitor Id3 by Blimp-1 limits the formation of memory CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* **12**, 1230–1237 (2011).
234. Cannarile, M. A. *et al.* Transcriptional regulator Id2 mediates CD8+ T cell immunity. *Nat. Immunol.* **7**, 1317–1325 (2006).
235. Yang, C. Y. *et al.* The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8+ T cell subsets. *Nat. Immunol.* **12**, (2011).
236. Wang, L. & Ning, S. Interferon Regulatory Factor 4 Is Activated through c-Src-Mediated Tyrosine Phosphorylation in Virus-Transformed Cells. *J. Virol.* **87**, 9672–9679 (2013).
237. Man, K. *et al.* The transcription factor IRF4 is essential for TCR affinity-mediated metabolic programming and clonal expansion of T cells. *Nat. Immunol.* **14**, 1155–1165 (2013).
238. Raczkowski, F. *et al.* The transcription factor Interferon Regulatory Factor 4 is required for the generation of protective effector CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 15019–15024 (2013).
239. Yao, S. *et al.* Interferon Regulatory Factor 4 Sustains CD8+ T Cell Expansion and Effector Differentiation. *Immunity* **39**, 833–845 (2013).
240. Zeng, H. & Chi, H. mTOR and lymphocyte cell metabolism. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 347–355 (2013).
241. Kerdiles, Y. M. *et al.* Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat. Immunol.* **10**, 176–184 (2009).
242. Ouyang, W., Beckett, O., Flavell, R. A. & Li, M. O. An essential role of the Forkhead-box transcription factor Foxo1 in control of T cell homeostasis and tolerance. *Immunity* **30**, 358–371 (2009).
243. Burgering, B. M. T. A brief introduction to FOXology. *Oncogene* **27**, 2258–2262 (2008).
244. Salih, D. A. M. & Brunet, A. FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 126–136 (2008).
245. Michelini, R. H., Doedens, A. L., Goldrath, A. W. & Hedrick, S. M. Differentiation of CD8 memory T cells depends on Foxo1. *J. Exp. Med.* **210**, 1189–1200 (2013).
246. Kim, M. V., Ouyang, W., Liao, W., Zhang, M. Q. & Li, M. O. The Transcription Factor Foxo1 Controls Central-Memory CD8+ T Cell Responses to Infection. *Immunity* **39**, 286–297 (2013).
247. Jeannot, G. *et al.* Essential role of the Wnt pathway effector Tcf-1 for the establishment of functional CD8 T cell memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 9777–9782 (2010).
248. Zhou, X. *et al.* Differentiation and Persistence of Memory CD8+ T Cells Depend on T Cell Factor 1. *Immunity* **33**, 229–240 (2010).
249. Ouyang, W. & Li, M. O. Foxo: in command of T lymphocyte homeostasis and tolerance. *Trends Immunol.* **32**, 26–33 (2011).
250. Gubbels Bupp, M. R. *et al.* T cells require Foxo1 to populate the peripheral lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* **39**, 2991–2999 (2009).
251. Zhang, L. *et al.* Mammalian Target of Rapamycin Complex 2 Controls CD8 T Cell Memory Differentiation in a Foxo1-Dependent Manner. *Cell Rep.* **14**, 1206–1217 (2016).

252. Pollizzi, K. N. *et al.* mTORC1 and mTORC2 selectively regulate CD8⁺ T cell differentiation. *J. Clin. Invest.* **125**, 2090–2108 (2015).
253. Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**, 471–484 (2006).
254. Sarbassov, D. D. *et al.* Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell* **22**, 159–168 (2006).
255. Rao, R. R., Li, Q., Odunsi, K. & Shrikant, P. A. 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 (2010).
256. Mayer, G. & Hudrisier, D. Microbiologie et immunologie on-ligne - CYTOKINES ET IMMUNOREGULATION. (2013). Available at: <http://www.microbiologybook.org/French-immuno/immchapter13.htm>. (Accessed: 6th September 2018)
257. Saleiro, D. & Platanias, L. C. Intersection of mTOR and STAT signaling in immunity. *Trends Immunol.* **36**, 21–29 (2015).
258. Platanias, L. C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 375–386 (2005).
259. Ivashkiv, L. B. & Donlin, L. T. Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 36–49 (2014).
260. Fish, E. N. & Platanias, L. C. Interferon receptor signaling in malignancy: a network of cellular pathways defining biological outcomes. *Mol. Cancer Res. MCR* **12**, 1691–1703 (2014).
261. Nguyen, K. B. *et al.* Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science* **297**, 2063–2066 (2002).
262. Whitmire, J. K., Tan, J. T. & Whitton, J. L. Interferon- γ acts directly on CD8⁺ T cells to increase their abundance during virus infection. *J. Exp. Med.* **201**, 1053–1059 (2005).
263. Reed, J. M., Branigan, P. J. & Bamezai, A. Interferon gamma enhances clonal expansion and survival of CD4⁺ T cells. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **28**, 611–622 (2008).
264. Stoycheva, D. *et al.* IFN- γ regulates CD8⁺ memory T cell differentiation and survival in response to weak, but not strong, TCR signals. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **194**, 553–559 (2015).
265. Lin, J. X. *et al.* The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity* **2**, 331–339 (1995).
266. Lin, J.-X. & Leonard, W. J. The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene* **19**, 2566–2576 (2000).
267. Hand, T. W. *et al.* Differential effects of STAT5 and PI3K/AKT signaling on effector and memory CD8 T-cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16601–16606 (2010).
268. Kelly, J. *et al.* A role for Stat5 in CD8⁺ T cell homeostasis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **170**, 210–217 (2003).
269. Malamut, G. *et al.* IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis. *J. Clin. Invest.* **120**, 2131–2143 (2010).
270. Cui, W., Liu, Y., Weinstein, J. S., Craft, J. & Kaech, S. M. An Interleukin-21- Interleukin-10-STAT3 Pathway Is Critical for Functional Maturation of Memory CD8⁺ T Cells. *Immunity* **35**, 792–805 (2011).
271. Castellino, F. & Germain, R. N. Chemokine-guided CD4⁺ T cell help enhances generation of IL-6^{hi}IL-7^{hi} prememory CD8⁺ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 778–787 (2007).

272. Foulds, K. E., Rotte, M. J. & Seder, R. A. IL-10 is required for optimal CD8 T cell memory following *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 2565–2574 (2006).
273. Yi, J. S., Ingram, J. T. & Zajac, A. J. IL-21 deficiency influences CD8 T cell quality and recall responses following an acute viral infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 4835–4845 (2010).
274. Diehl, S. A. *et al.* STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 4805–4815 (2008).
275. Fox, C. J., Hammerman, P. S. & Thompson, C. B. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 844–852 (2005).
276. Almeida, L., Lochner, M., Berod, L. & Sparwasser, T. Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Semin. Immunol.* **28**, 514–524 (2016).
277. Dimeloe, S. *et al.* The Immune-Metabolic Basis of Effector Memory CD4+ T Cell Function under Hypoxic Conditions. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **196**, 106–114 (2016).
278. Buck, M. D. *et al.* Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. *Cell* **166**, 63–76 (2016).
279. Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C. & Chan, D. C. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J. Cell Biol.* **178**, 749–755 (2007).
280. Wang, R. *et al.* The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity* **35**, 871–882 (2011).
281. Sinclair, L. V. *et al.* Control of amino-acid transport by antigen receptors coordinates the metabolic reprogramming essential for T cell differentiation. *Nat. Immunol.* **14**, 500–508 (2013).
282. Macintyre, A. N. *et al.* The Glucose Transporter Glut1 is Selectively Essential for CD4 T Cell Activation and Effector Function. *Cell Metab.* **20**, 61–72 (2014).
283. Sukumar, M. *et al.* Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8+ T cell memory and antitumor function. *J. Clin. Invest.* **123**, 4479–4488 (2013).
284. Tao, J.-H., Barbi, J. & Pan, F. Hypoxia-inducible factors in T lymphocyte differentiation and function. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **309**, C580–C589 (2015).
285. Finlay, D. K. *et al.* PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* **209**, 2441–2453 (2012).
286. Kaelin, W. G. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 865–873 (2008).
287. Wang, R. & Green, D. R. Metabolic checkpoints in activated T cells. *Nat. Immunol.* **13**, 907–915 (2012).
288. Chang, J. T., Wherry, E. J. & Goldrath, A. W. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat. Immunol.* **15**, 1104–1115 (2014).
289. Cham, C. M., Driessens, G., O’Keefe, J. P. & Gajewski, T. F. Glucose deprivation inhibits multiple key gene expression events and effector functions in CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2438–2450 (2008).
290. Cham, C. M. & Gajewski, T. F. Glucose availability regulates IFN-gamma production and p70S6 kinase activation in CD8+ effector T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 4670–4677 (2005).
291. Oestreich, K. J. *et al.* Bcl-6 directly represses the gene program of the glycolysis pathway. *Nat. Immunol.* **15**, 957–964 (2014).
292. Shi, L. Z. *et al.* HIF1 α -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J. Exp. Med.* **208**, 1367–1376 (2011).

293. Gerlach, C. *et al.* Heterogeneous Differentiation Patterns of Individual CD8+ T Cells. *Science* **340**, 635–639 (2013).
294. Buchholz, V. R. *et al.* Disparate Individual Fates Compose Robust CD8+ T Cell Immunity. *Science* **340**, 630–635 (2013).
295. Ahmed, R., Bevan, M. J., Reiner, S. L. & Fearon, D. T. The precursors of memory: models and controversies. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 662–668 (2009).
296. Gerlach, C. *et al.* One naive T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation. *J. Exp. Med.* **207**, 1235–1246 (2010).
297. Stemberger, C. *et al.* A Single Naive CD8+ T Cell Precursor Can Develop into Diverse Effector and Memory Subsets. *Immunity* **27**, 985–997 (2007).
298. Swain, S. L. Generation and in vivo persistence of polarized Th1 and Th2 memory cells. *Immunity* **1**, 543–552 (1994).
299. Bruno, L., Kirberg, J. & von Boehmer, H. On the cellular basis of immunological T cell memory. *Immunity* **2**, 37–43 (1995).
300. Crauste, F. *et al.* Identification of Nascent Memory CD8 T Cells and Modeling of Their Ontogeny. *Cell Syst.* **4**, 306–317.e4 (2017).
301. Arsenio, J., Metz, P. J. & Chang, J. T. Asymmetric Cell Division in T Lymphocyte Fate Diversification. *Trends Immunol.* **36**, 670–683 (2015).
302. Jung, Y. W., Rutishauser, R. L., Joshi, N. S., Haberman, A. M. & Kaech, S. M. Differential Localization of Effector and Memory CD8 T Cell Subsets in Lymphoid Organs during Acute Viral Infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 5315–5325 (2010).
303. Hamann, D. *et al.* Phenotypic and Functional Separation of Memory and Effector Human CD8+ T Cells. *J. Exp. Med.* **186**, 1407–1418 (1997).
304. Haynes, B. F., Telen, M. J., Hale, L. P. & Denning, S. M. CD44 — A molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol. Today* **10**, 423–428 (1989).
305. Holmes, S., He, M., Xu, T. & Lee, P. P. Memory T cells have gene expression patterns intermediate between naïve and effector. 5
306. Renno, T. Proliferation is a prerequisite for bacterial superantigen-induced T cell apoptosis in vivo. *J. Exp. Med.* **181**, 2283–2287 (1995).
307. Badovinac, V. P., Porter, B. B. & Harty, J. T. CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat. Immunol.* **5**, 809–817 (2004).
308. Badovinac, V. P., Messingham, K. A. N., Jabbari, A., Haring, J. S. & Harty, J. T. Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat. Med.* **11**, 748–756 (2005).
309. Sarkar, S. *et al.* Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J. Exp. Med.* **205**, 625–640 (2008).
310. Inaba, M. & Yamashita, Y. M. Asymmetric stem cell division: precision for robustness. *Cell Stem Cell* **11**, 461–469 (2012).
311. Knoblich, J. A. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* **132**, 583–597 (2008).
312. Pham, K., Sacirbegovic, F. & Russell, S. M. Polarized Cells, Polarized Views: Asymmetric Cell Division in Hematopoietic Cells. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
313. Chang, J. T. *et al.* Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* **315**, 1687–1691 (2007).

314. Kemphues, K. J., Priess, J. R., Morton, D. G. & Cheng, N. Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* **52**, 311–320 (1988).
315. Etemad-Moghadam, B., Guo, S. & Kemphues, K. J. Asymmetrically distributed PAR-3 protein contributes to cell polarity and spindle alignment in early *C. elegans* embryos. *Cell* **83**, 743–752 (1995).
316. Tabuse, Y. *et al.* Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. **8**
317. Iden, S. & Collard, J. G. Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 846–859 (2008).
318. Assémat, E., Bazellières, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A. & Massey-Harroche, D. Polarity complex proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1778**, 614–630 (2008).
319. Humbert, P., Dow, L. & Russell, S. The Scribble and Par complexes in polarity and migration: friends or foes? *Trends Cell Biol.* **16**, 622–630 (2006).
320. Ludford-Menting, M. J. *et al.* A Network of PDZ-Containing Proteins Regulates T Cell Polarity and Morphology during Migration and Immunological Synapse Formation. *Immunity* **22**, 737–748 (2005).
321. King, C. G. *et al.* T Cell Affinity Regulates Asymmetric Division, Effector Cell Differentiation, and Tissue Pathology. *Immunity* **37**, 709–720 (2012).
322. Kennedy, J. *et al.* A molecular analysis of NKT cells: identification of a class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM). *J. Leukoc. Biol.* **67**, 725–734 (2000).
323. Yeh, J.-H., Sidhu, S. S. & Chan, A. C. Regulation of a Late Phase of T Cell Polarity and Effector Functions by Crtam. *Cell* **132**, 846–859 (2008).
324. Metz, P. J. *et al.* Regulation of asymmetric division and CD8+ T lymphocyte fate specification by protein kinase C ζ and protein kinase C λ /i. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **194**, 2249–2259 (2015).
325. Chang, J. T. *et al.* Asymmetric Proteasome Segregation as a Mechanism for Unequal Partitioning of the Transcription Factor T-bet during T Lymphocyte Division. *Immunity* **34**, 492–504 (2011).
326. Hawkins, E. D. *et al.* Regulation of asymmetric cell division and polarity by Scribble is not required for humoral immunity. *Nat. Commun.* **4**, (2013).
327. Croft, M., Carter, L., Swain, S. L. & Dutton, R. W. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J. Exp. Med.* **180**, 1715–1728 (1994).
328. Tang, Y. *et al.* Antigen-specific effector CD8 T cells regulate allergic responses via IFN- γ and dendritic cell function. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 1611-1620.e4 (2012).
329. Cho, B.-A. *et al.* Characterization of effector memory CD8+ T cells in the synovial fluid of rheumatoid arthritis. *J. Clin. Immunol.* **32**, 709–720 (2012).
330. Lu, Y. *et al.* Tumor-specific IL-9-producing CD8+ Tc9 cells are superior effector than type-I cytotoxic Tc1 cells for adoptive immunotherapy of cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 2265–2270 (2014).
331. Visekruna, A. *et al.* Tc9 cells, a new subset of CD8(+) T cells, support Th2-mediated airway inflammation. *Eur. J. Immunol.* **43**, 606–618 (2013).
332. Chang, S.-Y. *et al.* Circulatory antigen processing by mucosal dendritic cells controls CD8(+) T cell activation. *Immunity* **38**, 153–165 (2013).
333. Hamada, H. *et al.* Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 3469–3481 (2009).
334. Huber, M. *et al.* IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J. Clin. Invest.* **123**, 247–260 (2013).

335. Yeh, N. *et al.* Tc17 cells are capable of mediating immunity to vaccinia virus by acquisition of a cytotoxic phenotype. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 2089–2098 (2010).
336. Billerbeck, E. *et al.* Analysis of CD161 expression on human CD8+ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 3006–3011 (2010).
337. Kryczek, I. *et al.* Induction of IL-17+ T cell trafficking and development by IFN-gamma: mechanism and pathological relevance in psoriasis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 4733–4741 (2008).
338. Marwaha, A. K. *et al.* Cutting edge: Increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 3814–3818 (2010).
339. Lu, L. & Cantor, H. Generation and Regulation of CD8+ Regulatory T Cells. *Cell. Mol. Immunol.* **5**, 401–406 (2008).
340. Jiang, H. *et al.* HLA-E-restricted regulatory CD8(+) T cells are involved in development and control of human autoimmune type 1 diabetes. *J. Clin. Invest.* **120**, 3641–3650 (2010).
341. Smith, T. R. F. & Kumar, V. Revival of CD8+ Treg-mediated suppression. *Trends Immunol.* **29**, 337–342 (2008).
342. Shiku, H. Expression of T-cell differentiation antigens on effector cells in cell-mediated cytotoxicity in vitro. Evidence for functional heterogeneity related to the surface phenotype of T cells. *J. Exp. Med.* **141**, 227–241 (1975).
343. Takata, H., Naruto, T. & Takiguchi, M. Functional heterogeneity of human effector CD8 α T cells. **119**, 10 (2012).
344. Lemaitre, F., Moreau, H. D., Vedele, L. & Bousso, P. Phenotypic CD8+ T Cell Diversification Occurs before, during, and after the First T Cell Division. *J. Immunol.* **191**, 1578–1585 (2013).
345. Newell, E. W., Sigal, N., Bendall, S. C., Nolan, G. P. & Davis, M. M. Cytometry by Time-of-Flight Shows Combinatorial Cytokine Expression and Virus-Specific Cell Niches within a Continuum of CD8+ T Cell Phenotypes. *Immunity* **36**, 142–152 (2012).
346. Ma, C. *et al.* A clinical microchip for evaluation of single immune cells reveals high functional heterogeneity in phenotypically similar T cells. *Nat. Med.* **17**, 738–743 (2011).
347. Vasconcelos, Z. *et al.* Individual Human Cytotoxic T Lymphocytes Exhibit Intraclonal Heterogeneity during Sustained Killing. *Cell Rep.* **11**, 1474–1485 (2015).
348. Beuneu, H. *et al.* Visualizing the functional diversification of CD8+ T cell responses in lymph nodes. *Immunity* **33**, 412–423 (2010).
349. Halle, S. *et al.* In Vivo Killing Capacity of Cytotoxic T Cells Is Limited and Involves Dynamic Interactions and T Cell Cooperativity. *Immunity* **44**, 233–245 (2016).
350. Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 745–763 (2004).
351. Kaech, S. M., Wherry, E. J. & Ahmed, R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 251–262 (2002).
352. Filby, A. *et al.* An imaging flow cytometric method for measuring cell division history and molecular symmetry during mitosis. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **79**, 496–506 (2011).
353. Fuentealba, L. C., Eivers, E., Geissert, D., Taelman, V. & De Robertis, E. M. Asymmetric mitosis: Unequal segregation of proteins destined for degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7732–7737 (2008).
354. Dewey, E. B., Taylor, D. T. & Johnston, C. A. Cell Fate Decision Making through Oriented Cell Division. *J. Dev. Biol.* **3**, 129–157 (2015).

355. Verbist, K. C. *et al.* Metabolic maintenance of cell asymmetry following division in activated T lymphocytes. *Nature* **532**, 389–393 (2016).
356. Pollizzi, K. N. *et al.* Asymmetric inheritance of mTORC1 kinase activity during division dictates CD8+ T cell differentiation. *Nat. Immunol.* **17**, 704–711 (2016).
357. Iezzi, G., Karjalainen, K. & Lanzavecchia, A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* **8**, 89–95 (1998).
358. Hodgkin, P. D., Dowling, M. R. & Duffy, K. R. Why the immune system takes its chances with randomness. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 711 (2014).
359. Rohr, J. C., Gerlach, C., Kok, L. & Schumacher, T. N. Single cell behavior in T cell differentiation. *Trends Immunol.* **35**, 170–177 (2014).
360. Schumacher, T. N. M., Gerlach, C. & van Heijst, J. W. J. Mapping the life histories of T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 621–631 (2010).
361. Gwalani, L. A. & Orange, J. S. Single Degranulations in NK Cells Can Mediate Target Cell Killing. *J. Immunol.* **200**, 3231–3243 (2018).
362. Lyubchenko, T. A., Wurth, G. A. & Zweifach, A. Role of Calcium Influx in Cytotoxic T Lymphocyte Lytic Granule Exocytosis during Target Cell Killing. *Immunity* **15**, 847–859 (2001).
363. Thauvat, O. *et al.* Asymmetric segregation of polarized antigen on B cell division shapes presentation capacity. *Science* **335**, 475–479 (2012).
364. D'Souza, W. N. & Hedrick, S. M. Cutting Edge: Latecomer CD8 T Cells Are Imprinted with a Unique Differentiation Program. *J. Immunol.* **177**, 777–781 (2006).
365. Sharma, S. *et al.* T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **163**, 5020–5028 (1999).
366. Belikov, A. V., Schraven, B. & Simeoni, L. T cells and reactive oxygen species. *J. Biomed. Sci.* **22**, (2015).

Abstract

Investigation of asymmetric repartition of lytic and signaling molecules in dividing human CD8+ T cells

Cellular responses' heterogeneity is a key feature of immune responses. It ensures the presence of cells endowed with distinct functions whose close collaboration allows efficient antigen recognition, activation of effector cells, pathogen elimination and the establishment of long-term immunity. Previous work in the Team of **Dr. Valitutti**, based on a "single cell" approach, revealed an additional level of heterogeneity within clonal effector CD8+ T lymphocytes. This work showed that CD8+ T lymphocytes, all genetically identical and specific for the same antigen, exhibit highly heterogeneous capability in target cell killing. Vasconcelos and al. also demonstrated that functional properties of an individual CD8+ T cell are not inherited by daughter cells upon cell division, on the contrary, expansion of a single cell leads to the generation of a clonal population endowed of a high functional heterogeneity.

The aim of my PhD work was to better understand the phenomenon of functional heterogeneity of human CD8+ T cells and its possible functional link with cell division. To address this issue, we investigated whether asymmetric repartition of molecular components could occur during human CD8+ T cell division (both freshly isolated polyclonal cells and clonal CTL). To study protein distribution during cell division, we chose to focus on cells in telophase (the last stage of mitosis before daughter cell separation). Because telophase cells are extremely rare in the G2/M population, and exhibit low adhesion capacity, we developed an acquisition and analysis protocol using imaging flow cytometry (IsX, MERK), a technology combining the advantages of both flow cytometry (highly quantitative analysis of cell populations) and microscopy (detailed analysis of individual cells), to acquire highly quantitative results allowing the unambiguous determination of the protein levels inherited by each of the nascent-daughter cell in telophase. Our results show that CD107a+ intracellular vesicles (corresponding to T lymphocyte lysosomes and lytic granules) and lytic molecules (such as perforin and granzyme B) are unevenly segregated in telophase, thus generating at each divisions daughter cells equipped with different amounts of lytic potential. Imaging flow cytometry also shows the uneven repartition of mTOR and of its main substrate phospho-S6 ribosomal protein during division. These results together with our observation that mTORC1 function is instrumental to fuel sustained killing of outnumbering target cells, support our finding that CTL lytic potential is asymmetrically inherited during division.

Three lines of evidences indicate that the observed uneven segregation of effector molecules in dividing human CD8+ T cells is not part of a classical mechanism of fate determining asymmetric cell division (ACD), such those described in embryogenesis.

- 1) In spite of effector molecules asymmetric distribution in telophase, we observed homogeneous partitioning of fate determining factors (such as the transcription factors T-bet and C-myc and the partitioning molecules PKC ζ , PAR6 and Numb) during CD8+ T cell division.
- 2) The process of asymmetric repartitioning of effector molecule occurs at each division round and is not hereditary, e.g. a daughter cell originating from a heterogeneous division has a constant stationary probability to produce a new uneven division.
- 3) The observed asymmetric repartition of effector molecules does not require a polarity cue as described in classical ACD processes.

Taken together our results reveal a novel mechanism of stochastic uneven molecular segregation in telophase of lytic molecules and signaling components that randomly generates heterogeneity within human CD8+ T cell populations and might contribute to the flexibility and robustness of adaptive immune responses.

Keywords : cytotoxic T lymphocytes, heterogeneity, functional heterogeneity, asymmetric division

Résumé

Etude de la répartition asymétrique des molécules lytiques et métaboliques dans la division des lymphocytes T CD8+ humains

Les lymphocytes T CD8+ humain répartissent asymétriquement leur contenu lytique au cours de la division cellulaire via la mise en place d'un mécanisme stochastique

L'hétérogénéité des réponses cellulaires est une caractéristique clé des réponses immunitaires. Celle-ci assure la présence de cellules dotées de fonctions distinctes dont l'étroite collaboration permet une reconnaissance efficace des antigènes, l'activation des cellules effectrices, l'élimination des pathogènes et l'établissement d'une immunité à long terme.

Les travaux antérieurs de l'équipe du **Dr Valitutti**, basés sur une approche "unicellulaire", ont révélé un niveau supplémentaire d'hétérogénéité au sein des clones effecteurs, lymphocytes T CD8+. Ces travaux ont montré que les lymphocytes T CD8+, tous génétiquement identiques et spécifiques d'un même antigène, présentent des capacités à éliminer leurs cellules cibles fortement hétérogène. **Vasconcelos et al.** ont également démontré que les propriétés fonctionnelles d'une cellule T CD8+ individuelle ne sont pas héritées par les cellules filles lors de la division cellulaire, au contraire, l'expansion d'une seule cellule conduit à la génération d'une population clonale dotée d'une hétérogénéité fonctionnelle élevée. Le but de mon travail de doctorat est de mieux comprendre le phénomène de l'hétérogénéité fonctionnelle des cellules T CD8+ humaines et son lien fonctionnel possible avec la division cellulaire. Pour résoudre ce problème, nous cherchons à savoir si la répartition asymétrique des composants moléculaires peut se produire pendant la division des cellules T CD8+ humaines (cellules polyclonales fraîchement isolées et CTL clonales).

Pour étudier la distribution des protéines au cours de la division cellulaire, nous avons choisi de nous concentrer sur les cellules en télophase (dernière étape de la mitose avant la séparation des cellules filles). Parce que les cellules en télophase sont extrêmement rares dans la population G2/M et présentent de faibles capacités d'adhésion, nous avons développé un protocole d'acquisition et d'analyse utilisant la cytométrie en flux (IsX, MERK), une technologie combinant les avantages de la cytométrie en flux (hautement quantitative) et de la microscopie (analyse détaillée des cellules individuelles), pour obtenir des résultats hautement quantitatifs permettant la détermination sans ambiguïté des niveaux de protéines hérités par chacune des cellules filles composant une télophase. Nos résultats montrent que les vésicules intracellulaires CD107a+ (correspondant aux lysosomes et granules lytiques) et les molécules lytiques (perforine/granzyme B) sont inégalement séparées au cours de la télophase, générant ainsi à chaque division des cellules filles dotées d'un potentiel lytique distinct. La cytométrie d'imagerie en flux montre également la répartition inégale de mTOR et de son substrat principal, la phospho-S6 ribosomal protein pendant la division. Ces résultats, ainsi que notre observation selon laquelle la fonction mTORC1 est essentielle pour alimenter l'élimination durable des cellules cibles en surnombre, appuient notre constatation selon laquelle le potentiel lytique des CTL est hérité de façon asymétrique pendant la division.

Intéressamment, nos études mettent en évidence un mécanisme de division asymétrique, générateur d'hétérogénéité au sein de populations clonales, indépendant d'un signal polarisant, de la mise en place d'un axe de polarité et maintenant de l'hétérogénéité sans génération de sous populations phénotypiquement différentes. Pour finir nos résultats, appuyés par des études mathématiques démontrent un mécanisme stochastique, non héritable, observable à tous les cycles de division, où chaque événement est capable ou non de réaliser un événement de division asymétrique indépendamment de sa cellule mère.

Mots clefs : lymphocytes T cytotoxiques, hétérogénéité, hétérogénéité fonctionnelle, division asymétrique, synapse immunologique