Université catholique de Louvain
Institut de Duve

Le facteur de transcription IRF4 atténue les fonctions des lymphocytes T CD8 humains et favorise leur prolifération et l'expression de PD-1

Thibault Hirsch

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
docteur en Sciences biomédicales et pharmaceutiques

Domaine des Sciences de la Santé

Octobre 2022

Membres du jury :

Prof. Pierre van der Bruggen, membre interne et directeur de thèse
Institut de Duve, Université Catholique de Louvain

Prof. Thomas Michiels, membre interne et président
Institut de Duve, Université Catholique de Louvain

Prof. Pierre Coulie, membre interne et secrétaire
Institut de Duve, Université Catholique de Louvain

Prof. Benoît Van den Eynde, membre interne
Institut de Duve, Université Catholique de Louvain

Prof. Charles De Smet, membre interne
Institut de Duve, Université Catholique de Louvain

Prof. Michel Braun, membre externe
Institute for Medical Immunology, Université Libre de Bruxelles

Prof. Grégory Verdeil, membre externe
Ludwig Institute for Cancer Research, Université de Lausanne

Remerciements

Lors de l'écriture de cette thèse, c'est à maintes reprises que j'ai visualisé ce moment où je rédigerais les mots qui vont suivre. Ce jour est enfin arrivé. Si la tâche à accomplir pour y accéder fut longue et exigeante, que dire des années intenses de travail qui ont précédé la rédaction de cette thèse ? S'il n'est pas nécessaire de répondre à cette question, il est essentiel de mentionner les personnes sans lesquelles il aurait été autrement plus difficile d'aller au bout de cette épreuve.

Je tiens d'abord à exprimer ma reconnaissance au Professeur Pierre van der Bruggen pour m'avoir offert la possibilité de réaliser un doctorat au sein de son laboratoire. Je vous remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir toujours soutenu, dans les bons comme dans les moins bons moments. Nos discussions nombreuses et variées m'auront énormément appris, tant sur moi-même que scientifiquement. Je ressors grandi de cette étape de ma vie auprès de vous.

Mes plus sincères remerciements vont également aux Professeurs Thomas Michiels, Pierre Coulie, Benoît van den Eynde et Charles de Smet, qui m'ont accompagné tout au long de ce doctorat. Vos remarques et conseils avisés auront également nourri mon développement scientifique et personnel. Enfin, je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude aux Professeurs Michel Braun et Grégory Verdeil pour avoir accepté d'examiner ce travail, et pour la richesse des discussions scientifiques que nous avons pu avoir lors de ma soutenance.

Il est évident qu'une thèse ne peut se réaliser sans un environnement accueillant, bienveillant, et coopératif. Je n'aurais pu rêver d'une meilleure ambiance de travail que celle que vous, membres actuels et passés de la team PVDB, avez contribué à développer. Merci donc à AAA, ABD, AMB, CED, CVR, CWI, DAN, FAN, FVH, MAL, MGA, NID, QUD, SHX, REB, SVI. Une pensée particulière à CVR et DAN, mes compagnons de route. Commencer ma thèse en même temps que vous aura été la plus belle des coïncidences. Merci également à toi, ABD, de t'être adonné avec ardeur à la construction des librairies RNA-seq. Une pensée particulière également à toi, CED. Ton aide constante pour alléger le quotidien de mes 2 dernières années de thèse aura été salvatrice. Cette thèse est aussi quelque part, un peu la tienne. Enfin, CWI, merci d'avoir été, sans que tu le saches vraiment, ma maman d'adoption.

Au-delà de notre équipe de choc, il convient de ne pas oublier d'innombrables autres personnes qui, on l'oublie trop souvent, rendent nos conditions de travail si confortables. Je pense particulièrement à Nicolas Dauguet pour la gestion infaillible des plateformes de cytométrie en flux et de tri cellulaire. Je tiens aussi à saluer tous les membres des équipes

technique, informatique et administrative. Merci, entre autres, à Samira, Olivier, Nora, Philippe, Carine et Geneviève. Merci également à Jacques pour l'aide informatique.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans les financements du FNRS/FRIA, Welbio, et la Fondation contre le Cancer. De même, la collaboration avec les Cliniques universitaires Saint-Luc a été fondamentale à la réalisation de ce projet, de par les nombreux échantillons qu'ils nous ont fournis. Je leur adresse également mes remerciements.

La réalisation de cette thèse de doctorat n'aurait également pu se faire sans les encouragements constants d'une famille unie et aimante. Maman, Papa, merci pour tout. Que ce soit à cette étape de ce parcours universitaire ou plus tôt dans mes études, votre soutien indéfectible, et votre confiance démesurée en ma capacité à réussir, auront été une source inépuisable de réconfort dans les moments les plus difficiles. Merci pour l'accueil chaleureux à la maison pendant mon marathon d'écriture. Je n'aurais pu réaliser le même manuscrit sans votre support extraordinaire. Merci également à mon frère et ma sœur d'avoir contribué à rendre agréable ces moments uniques et atypiques. Évidemment, je ne peux oublier de remercier le reste de ma famille, qui m'a toujours soutenu et montré un vif intérêt envers ce que je faisais.

Bien que le laboratoire ait été comme une 2ème famille, rien ne remplace les amis de toujours. Merci à la team made in France : Clara, Guich, Kamile, Fred, Nico, Flo, Thom, Agathe, Bru, Val, Oliv. Mes années de thèse à Bruxelles nous auront quelques temps éloignés, mais d'une façon ou d'une autre, j'ai toujours pu bénéficier de votre soutien. Une pensée toute particulière à toi, Clara. De manière inconditionnelle, tu auras constamment cherché à apaiser le courant du fleuve sur lequel je m'étais embarqué.

Et puis, lorsqu'on est loin de ses amis, certains vous font la joie de revenir vivre auprès de vous. Et qui de mieux que vous deux, Bruno, Valentin. Votre venue à « Bx » aura fait basculer mon expérience bruxelloise. Merci pour les mille moments de bonheur, rire, partage, soutien et bienveillance envers le disque rayé tournant en boucle que j'ai parfois été. Votre amitié est de l'or. Big-up à toi aussi, Miguel, quien a compartido el dìa a dìa de un doctorado durante casi 3 años. Gracias por las tortillas, cheesecake, café, « meme », discusiones.

À l'image d'une thèse, une vie se ponctue de moments de joie, tristesse, et résilience. Comment pourrais-je ne pas te remercier de m'avoir soutenu jusqu'au bout de tes forces pendant la majorité de cette expérience de thèse ? Merci à toi, Mish'. Et s'il advenait que tu fasses aussi une thèse de doctorat, je suis persuadé que la réussite sera au bout de ton chemin. Une thèse est une expérience unique que peu ont l'honneur de connaître. Certes, elle est exigeante. Mais sur bien des aspects, la richesse de ses enseignements est inégalable. Courage.

TABLE DES MATIÈRES

ABREVIATIONS 1

RÉSUMÉ 5

INTRODUCTION 7

PRÉAMBULE 9

1 DE LA RECONNAISSANCE À L'ÉLIMINATION D'UN ANTIGÈNE PAR LES LYMPHOCYTES T CD8 10

1.1 DÉTECTER ET SIGNALER LA PRÉSENCE D'UN ANTIGÈNE : RÉCEPTEURS DU LYMPHOCYTE T 10

1.1.1 Initiation de la signalisation TCR 12

1.1.2 Propagation de la signalisation TCR : voie menant à l'activation de NFAT 16

1.1.3 Propagation de la signalisation TCR : la voie des MAPK active AP-1 19

1.1.4 Propagation de la signalisation TCR : voie menant à l'activation de NFκB 22

1.2 DIFFÉRENCIATION EN LYMPHOCYTES T CD8 EFFECTEURS ET MÉMOIRE 28

1.2.1 Les lymphocytes T CD8 effecteurs 29

1.2.2 Les lymphocytes T CD8 mémoire 31

1.2.3 Facteurs de transcription des lymphocytes T CD8 effecteurs et mémoire 33

2 LES LYMPHOCYTES T CD8 FACE À UN ANTIGÈNE PERSISTANT 38

2.1 MODÈLE D'ÉTUDE DE PATHOLOGIE CHRONIQUE CHEZ LA SOURIS : LE MODÈLE LCMV 38

2.1.1 Genèse et caractéristiques du modèle LCMV 38

2.1.2 Le phénomène d'épuisement dans le modèle LCMV 43

2.2 L'ÉPUISEMENT : UNE VOIE DE DIFFÉRENCIATION DES LYMPHOCYTE T CD8 ? 48

2.2.1 Acquisition d'un programme transcriptionnel et épigénétique distinct 48

2.2.2 Origine cellulaire des lymphocytes T CD8 épuisés 55

2.2.3 Les lymphocytes T épuisés précurseurs et terminaux 60
2.2.4 Facteurs de transcription clés à l'épuisement : le rôle de TOX 66
2.2.5 Facteurs de transcription clé à l'épuisement : Tcf-1 et autres facteurs 75
2.3 LES LYMPHOCYTES T ÉPUISÉS EXISTENT-ILS DANS LE CANCER ? 80
2.3.1 Chez la souris 80
2.3.2 Chez l'Homme 86
2.3.3 Similitude du mode d'action du traitement anti-PD-1 entre Homme et souris 92
2.4 LES CAUSES DE L'ÉPUISEMENT 98
2.4.1 Charge antigénique 98
2.4.2 Temps d'exposition à l'antigène 100
2.4.3 Rôle du microenvironnement inflammatoire 102
2.4.4 Récepteurs inhibiteurs : PD-1, LAG-3 et TIM-3 107
2.4.5 La signalisation TCR est clé à l'induction de l'épuisement via TOX 116
3 QUEL EST LE RÔLE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION IRF4 ? 118
3.1 SIGNALISATION INTRACELLULAIRE AU CONTRÔLE DE L'EXPRESSION D'IRF4 118
3.2 STRUCTURE ET MÉCANISMES DE BASE DE LA RÉGULATION TRANSCRIPTIONELLE PAR IRF4 120
3.2.1 Mode d'interaction d'IRF4 avec son élément cis sur l'ADN 120
3.2.2 Modulation des séquences liées par IRF4 en fonction de son partenaire 122
3.2.3 IRF4 nécessite des partenaires protéiques pour lier l'ADN avec force 125
3.2.4 IRF4 peut-il avoir une activité sous forme monomérique ? 126
3.3 RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION PAR IRF4-NFAT DANS LES LYMPHOCYTES T 128
3.4 RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION PAR IRF4-BATF-JUN DANS LES LYMPHOCYTES T 130
3.4.1 IRF4 lie des éléments AICE sur l'ADN en partenariat avec BATF-Jun 130
3.4.2 Identification d'éléments cis AICE de haute et faible affinité pour IRF4 132
3.4.3 Comment IRF4 et BATF régulent-ils la transcription ? 134
3.4.4 IRF4-BATF-Jun dans les lymphocytes T CD8 également ? 135
3.5 RÔLES (PARFOIS) AMBIGUS D'IRF4 DANS LES LYMPHOCYTES T CD8 136
3.5.1 Modèle murin et rôle d'IRF4 dans le développement des thymocytes 136
3.5.2 IRF4 soutient la prolifération et l'expansion des lymphocytes T CD8 136
3.5.3 IRF4 est nécessaire à la glycolyse 139
3.5.4 IRF4 est requis pour les fonctions effectrices des T CD8 140
3.5.5 Rôles positifs de l'abondance d'IRF4 dans les lymphocytes T CD8 142
3.5.6 Rôles négatifs de l'abondance d'IRF4 dans les lymphocytes T CD8 144
4 REMARQUES CONCLUSIVES 148

OBJECTIF DE CE TRAVAIL DE THÈSE **150**

RÉSULTATS **153**

1 IRF4 : UN RHÉOSTAT RÉGULANT L'ACTIVITÉ DES LYMPHOCYTES T CD8 ? **155**

1.1 IRF4 ATTÉNUE LA FONCTION DES LYMPHOCYTES T CD8 157

1.1.1 L'expression ectopique d'IRF4 diminue la production de cytokines 157

1.1.2 Le KO d'IRF4 améliore la production de cytokines de lymphocytes T récemment activés 162

1.1.3 IRF4 atténue la dégranulation des lymphocytes T 166

1.2 IRF4 FAVORISE LA PROLIFÉRATION DES LYMPHOCYTES T CD8 168

1.2.1 Le KO d'IRF4 atténue l'expansion des lymphocytes T CD8 169

1.2.2 La surexpression d'IRF4 n'affecte pas l'expansion des lymphocytes T 172

1.3 IRF4 INDUIT L'EXPRESSION DE PD-1 174

1.3.1 L'expression de PD-1 et LAG-3 est diminuée en absence d'IRF4. 174

1.3.2 IRF4 est requis pour l'expression de PD-1 par les lymphocytes T en cours de division 176

1.3.3 L'abondance d'IRF4 conditionne l'expression de PD-1 179

1.4 IMPACT D'IRF4 SUR LE TRANSCRIPTOME DES LYMPHOCYTES T CD8 182

1.4.1 IRF4 modules des gènes distincts suite à l'activation du TCR 184

1.4.2 IRF4 inhibe l'expression de gènes régulés par la voie NFκB 187

1.4.3 IRF4 favorise l'expression de gènes régulant le cycle cellulaire 189

2 LES TILS DE CARCINOME OVARIEN EXPRIMANT IRF4 ONT UN PHÉNOTYPE « ÉPUISÉ » **193**

2.1 IRF4 EST EXPRIMÉ DANS LES TILS PD-1^{HI} TOX^{HI} ACTIVÉS 194

2.1.1 Les tumeurs épithéliales ovariennes contiennent des TILs PD-1^{hi} TOX^{hi} 194

2.1.2 Les TILs exprimant IRF4 sont PD-1^{hi} TOX^{hi} et sont activés 196

2.2 LES TILS PD-1^{HI} TOX^{HI} SONT-ILS ÉPUISÉS ? 198

2.2.1 Les TILs PD-1^{hi} TOX^{hi} ont un défaut de production de cytokines 198

2.2.2 Les lymphocytes T CD8 réagissant au SARS-CoV-2 sont activés 200

2.2.3 Les cellules PD-1^{hi} TOX^{hi} sont rares au sein des lymphocytes T activés par le SARS-CoV-2 202

DISCUSSION **207**

PRÉAMBULE **209**

1 IRF4, UN RHÉOSTAT MOLÉCULAIRE ? **209**

1.1 IRF4 ATTÉNUE LA FONCTION DES LYMPHOCYTES T CD8 209

1.2 IRF4 FAVORISE LA PROLIFÉRATION DES LYMPHOCYTES T CD8 218

1.3 De la prolifération cellulaire à la régulation de PD-1 par IRF4 223
1.4 IRF4 agit comme un rhéostat moléculaire 228
2 IRF4 : du rhéostat à l'épuisement ? 231
2.1 IRF4 peut-il initier la différenciation en lymphocytes T épuisés ? 231
2.2 Rôle d'IRF4 dans les lymphocytes T épuisés et TILs de cancer ovarien 236
2.3 IRF4, une cible pour le traitement du cancer ? 239
3 Conclusion 241

MATÉRIEL ET MÉTHODES 243

1 Cultures cellulaires et milieux 244
2 Isolement des cellules mononuclées de la tumeur et du sang (cancer et COVID-19) 244
3 Isolement des lymphocytes T CD8 du sang de donneurs hémochromateux 246
4 Plasmides et production de particules lentivirales 246
5 Transduction lentivirale et induction à la doxycycline 248
6 CRISPR/Cas9 248
7 Tests de fonction, prolifération, et mesure de récepteurs 249
7.1 Test de production de cytokines 249
7.2 Test de dégranulation 250
7.3 Test de prolifération et mesure de l'expression de récepteurs 251
8 Cytométrie en flux 252
8.1 Marquages extracellulaires et intracellulaires pour analyse au Fortessa 252
8.2 Particularités pour le marquage intracellulaire avant extraction d'ARN 253
9 Analyse du transcriptome par RNA-seq 254
9.1 Extraction d'ARN à partir de cellules fixées et perméabilisées 254
9.2 Construction des librairies et séquençage 255
9.3 Analyse des données 256
10 Analyses statistiques 256

RÉFÉRENCES 257

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. La présentation d'antigène aux lymphocytes T CD8. 11
Figure 2. Les premières étapes de la signalisation du TCR. 14
Figure 3. Structure générale de NFAT. 17
Figure 4. Propagation de la signalisation TCR par la voie NFAT. 18
Figure 5. Propagation de la signalisation TCR par la voie des MAPK. 21
Figure 6. Facteurs de transcription, régulateurs et activateurs de la voie NFκB. 24
Figure 7. Propagation de la signalisation TCR par la voie NFκB. 26
Figure 8. Genèse et caractéristiques du modèle LCMV. 39
Figure 9. Perte progressive des fonctions effectrices des lymphocytes T CD8 lors d'une infection chronique. 45
Figure 10. Biais du modèle LCMV : les lymphocytes T CD8 sont-ils épuisés ou activés ? 50
Figure 11. Les lymphocytes T mémoire précurseurs génèrent des lymphocytes T mémoire ou épuisés en fonction du contexte infectieux. 57
Figure 12. Hétérogénéité de la réponse immune des lymphocytes T CD8 lors d'une infection virale. 59
Figure 13. Hétérogénéité, ontogénie et propriétés des lymphocytes T épuisés. 63
Figure 14. Identification des divergences transcriptionnelles au sein des lymphocytes T mémoire précurseurs exposés à une infection aigüe ou chronique. 67
Figure 15. Un modèle de développement des lymphocytes T épuisés. 79
Figure 16. Charge antigénique vs persistance antigénique : rôles dans l'épuisement. 99
Figure 17. Antigène persistant vs environnement inflammatoire : rôles dans l'épuisement. 104
Figure 18. Les lymphocytes T épuisés précurseurs répondent au traitement anti-PD-L1. 111
Figure 19. Interactions principales entre IRF4 et l'ADN. 121
Figure 20. La structure d'IRF4 le rend dépendant de son interaction avec d'autres facteurs de transcription afin d'interagir efficacement avec l'ADN. 124
Figure 21. BATF-Jun et NFAT comme partenaires protéiques de IRF4 dans les lymphocytes T CD8. 129
Figure 22. Les éléments cis AICE reconnus par IRF4 et BATF-Jun dans les lymphocytes T CD4 et CD8. 133
Figure 23. Récapitulatif des connaissances sur le rôle d'IRF4 dans les lymphocytes T CD8. 147
Figure 24. Aperçu global du plan expérimental suivi lors de cette thèse de doctorat. 151
Figure 25. Approche utilisée pour examiner le rôle d'IRF4 dans les lymphocytes T CD8. 155
Figure 26. Induction contrôlée de l'expression d'IRF4 au sein des lymphocytes T CD8. 158

Figure 27. Simuler l'activation récente d'un lymphocyte T par l'expression ectopique d'IRF4 inhibe la production de cytokines. 161
Figure 28. Réprimer l'expression d'IRF4 au sein de lymphocytes T activés améliore leur capacité de production de cytokines. 163
Figure 29. Impact de la manipulation de l'expression d'IRF4 par CRISPR/Cas9 ou par transduction lentivirale sur la fonction des lymphocytes T CD8. 164
Figure 30. IRF4 atténue la production de cytokines face à des cellules tumorales. 165
Figure 31. Le KO d'IRF4 améliore la dégranulation des lymphocytes T récemment activés. 167
Figure 32. Principe du test de prolifération utilisé pour mesurer l'impact du KO d'IRF4. 168
Figure 33. IRF4 favorise l'expansion des lymphocytes T stimulés avec billes anti-CD3/CD28. 169
Figure 34. Le défaut d'expansion des lymphocytes T KO pour IRF4 n'est pas lié à la voie CD28. 171
Figure 35. La surexpression d'IRF4 n'impacte pas l'expansion des lymphocytes T suite à leur réactivation. 173
Figure 36. L'absence d'IRF4 atténue l'expression de récepteurs inhibiteurs. 175
Figure 37. IRF4 est requis pour l'expression de PD-1 et LAG-3 à la surface des lymphocytes T activés qui prolifèrent. 177
Figure 38. L'expression moindre de PD-1 est corrélée à l'expression moindre de IRF4. 179
Figure 39. La surexpression d'IRF4 exacerbe l'expression de PD-1. 181
Figure 40. Isolement de lymphocytes T CD8 KO ou sur-exprimant IRF4 pour analyser leur transcriptome. 183
Figure 41. Impact d'IRF4 sur le transcriptome des lymphocytes T CD8 réactivés ou non. 184
Figure 42. Identification de gènes réciproquement affectés par KO ou surexpression d'IRF4. 186
Figure 43. IRF4 inhibe l'expression de gènes contrôlés par la voie NFκB. 188
Figure 44. IRF4 favorise l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire. 190
Figure 45. Les TILs de carcinome ovarien contiennent des lymphocytes T CD8 PD-1^{hi} TOX^{hi}. 195
Figure 46. IRF4 est exprimé au sein des TILs PD-1^{hi} activés. 197
Figure 47. Les TILs PD-1^{hi} TOX^{hi} ont un défaut de production d'IFNγ. 199
Figure 48. Le sang de patients COVID-19 contient des lymphocytes T CD8 activés. 201
Figure 49. Le sang de patients COVID-19 contient peu de lymphocytes T CD8 PD-1^{hi} TOX^{hi}. 203
Figure 50. Mécanisme proposé d'atténuation de la production de cytokines par IRF4. 215
Figure 51. IRF4 régule l'expression de gènes clés à la progression dans le cycle cellulaire. 221
Figure 52. Dynamique de la régulation de l'expression de PD-1 par IRF4. 227
Figure 53. TOX est également capable d'induire l'expression de PD-1 chez l'Homme. 235
Figure 54. Vecteur de transfert dans lequel la CDS de RFP ou IRF4 a été insérée dans le MCS . 247

ABREVIATIONS

AP1	Activator Protein 1
AICE	AP1-IRF Composite Element
ATAC-seq	Assay for Transposase-Accessible Chromatin using Sequencing
BATF	Basic leucine zipper ATF-like Transcription Factor
BFA	Brefeldin A
Blimp-1	B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein-1
Ca^{2+}	Calcium
CamK	Calcium calmodulin-dependent protein Kinase
CAR T cells	Chimeric Antigen Receptor T cells
Cas9	CRISPR associated protein 9
CCR7	C-C Motif Chemokine Receptor 7
CD…	Cluster of Differentiation…
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
CTV	Cell Trace Violet
CXCR5	C-X-C Motif Chemokine Receptor 5
DAG	Diacylglycerol
Elk1	ETS Transcription Factor ELK1
Eomes	Eomesodermin
FMO	Fluorescence Minus One
GDP/GTP	Guanosine diphosphate/Guanosine triphosphate
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
gRNA	guide RNA
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
IFNγ	Interferon gamma
IκB	NFκB inhibitor
IKK	IkappaB kinase
IL-2	Interleukin-2
IP_3	Inositol 1,4,5-triphosphate
IRF4	Interferon Regulatory Factor 4
ISRE	Interferon Stimulated Response Element
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

ITK	IL2 Inducible T Cell Kinase
JNK	Jun N-terminal Kinase
KLRG1	Killer cell Lectin-like Receptor G1
KO	Knock-out
LAG-3	Lymphocyte-Activation Gene 3
LAT	Linker for Activation of T cells
Lck	Lymphocyte specific protein tyrosine kinase p56(lck)
LCMV	Lymphocytic Choriomeningitis Virus
MAPK(K)	Mitogen-Activated Protein Kinase (Kinase)
MFI	Median Fluorescence Intensity
MPEC	Memory Precursor Effector Cells
NES	Nuclear Export Signal
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
NFκB	Nuclear Factor Kappa B
NLS	Nuclear Localization Signal
PD-1	Programmed Cell Death 1
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
PFU	Plaque-forming unit
PIP_2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP_3	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PKCθ	Protein Kinase C Theta
PLCγ1	PhosphoLipase C Gamma 1
RasGRP	RAS Guanyl Releasing Protein
RFP	Red Fluorescent Protein
(sc)RNA-seq	(single-cell) RNA sequencing
SLEC	Short-Lived Effector Cells
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
T-bet	T-Box Expressed in T cells
Tcf-1	T-cell Factor 1
Tcm	T central memory cells
TCR	T-Cell Receptor
Tem	T effector memory cells
TILs	Tumor Infiltrating Lymphocytes (Lymphocytes infiltrant la tumeur)
TIM-3	T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha
TOX	Thymocyte Selection Associated High Mobility Group Box
TRAF	TNF Receptor Associated Factor
t-SNE	t-distributed stochastic neighbor embedding
ZAP70	Zeta-chain-Associated Protein kinase 70kD

RÉSUMÉ

Les lymphocytes T CD8 sont des médiateurs importants de l'immunité anti-virale et anti-tumorale. Lors de leur exposition prolongée avec leur antigène, ces lymphocytes ont une capacité atténuée à proliférer, produire des cytokines, et lyser leur cellule cible. Ce fonctionnement amoindri est souvent appelé « épuisement », pendant lequel l'activation continue des lymphocytes T par leur antigène entraîne des changements transcriptionnels et épigénétiques diminuant leurs fonctions effectrices. Le rôle des facteurs de transcription impliqués dans l'épuisement demeure incertain car il est difficile de distinguer les changements qui relèvent de l'activation d'un lymphocyte T de ceux qui conduisent à leur épuisement. De plus, la majorité des études réalisées compare des lymphocytes T CD8 épuisés, donc chroniquement activés, à des lymphocytes T CD8 au repos.

Dans ce travail de thèse, nous montrons que suite à l'activation d'un lymphocyte T CD8, le facteur de transcription IRF4 favorise la prolifération cellulaire et l'expression de PD-1, et atténue les fonctions effectrices de ces lymphocytes activés. Nous montrons ensuite que les TILs CD8 de carcinome ovarien avec un défaut de production d'IFNγ co-expriment les marqueurs d'épuisement TOX et PD-1 et les marqueurs d'activation IRF4 et CD137. Ainsi, nos données indiquent que l'activation récente d'un lymphocyte T CD8 suffit à mimer des caractéristiques de lymphocytes T épuisés sous la dépendance de IRF4.

Nous en concluons qu'une partie du dysfonctionnement attribué au phénomène d'épuisement pourrait provenir de l'expression d'IRF4 suite à l'activation d'un lymphocyte T.

INTRODUCTION

Préambule

D'abord perçu comme un système de défense face à des agents infectieux, le système immunitaire assure de nombreux rôles additionnels ayant également pour objectif la maintenance ou la restauration de l'intégrité des tissus de l'organisme auquel il appartient. Cette prouesse est le fruit de l'action coordonnée d'un ensemble de molécules et cellules immunitaires, dont la mise en marche et au repos est conditionnée par la situation à laquelle le système immunitaire fait face : substance étrangère, cicatrisation, bactérie, virus, cancer..

Depuis quelques décennies, l'interaction entre système immunitaire et tumeur fait l'objet de nombreuses études qui ont permis d'identifier les cellules immunes impliquées dans la lutte de l'organisme face au cancer. Parmi elles, les lymphocytes T CD8 (Coulie et al., 2014). Leurs capacités à reconnaître les cellules cancéreuses, à les éliminer et à instaurer une mémoire immunitaire contre l'antigène tumoral rencontré a d'ailleurs suscité le développement de l'immunothérapie, stratégie visant à susciter l'action des lymphocytes T face aux tumeurs. Toutefois, de nombreux patients ne bénéficient pas des effets thérapeutiques de ces traitements (Waldman et al., 2020). Mieux comprendre les réponses immunes menées par les lymphocytes T CD8 semble donc pertinent pour potentialiser leur action face aux cellules cancéreuses.

Au sein de cette introduction, nous verrons d'abord comment les lymphocytes T CD8 réagissent face à des antigènes qu'ils parviennent à éliminer rapidement. Puis, nous verrons comment ils réagissent lorsque l'antigène auquel ils font face persiste. Cette situation de persistance antigénique est hautement étudiée en raison des pathologies chroniques qui sévissent chez l'Homme, telles que cancer ou infections virales chroniques.

1 De la reconnaissance à l'élimination d'un antigène par les lymphocytes T CD8

1.1 Détecter et signaler la présence d'un antigène : récepteurs du lymphocyte T

Un antigène est une molécule ou un complexe moléculaire capable de susciter une réaction immunitaire. Pour les lymphocytes T, ces antigènes sont des complexes moléculaires qui se composent d'un peptide d'une dizaine d'acides aminés, lequel est lié à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Bjorkman et al., 1987; Townsend et al., 1986). Ces complexes CMH-peptide sont reconnus par les lymphocytes T grâce à une protéine transmembranaire hétérodimérique formée d'une chaîne α et β : le « T cell receptor » (TCR) (Smith-Garvin et al., 2009).

Outre le TCR pour se lier à ce complexe, le corécepteur exprimé à la surface des lymphocytes T participe également à l'adhésion du lymphocyte T à son ligand. En effet, le corécepteur CD8 à la surface des lymphocytes T participe à la reconnaissance des complexes CMH I - peptide (Garcia et al., 1996; Norment et al., 1998). De par le fonctionnement inhérent au mécanisme d'apprêtement d'antigènes sur les molécules du CMH de classe I, les lymphocytes T CD8 sont spécialisés à la reconnaissance de peptides issus de protéines dégradées par le protéasome à l'intérieur de la cellule présentatrice de l'antigène (Box 1). C'est pourquoi les lymphocytes T CD8 peuvent reconnaître des peptides provenant de virus ou encore des antigènes tumoraux (Coulie et al., 2014).

Une fois l'antigène reconnu par le TCR, il est nécessaire d'indiquer sa présence au lymphocyte T CD8. Or, le TCR ne contient ni activité enzymatique, ni domaine de signalisation intracellulaire. Comment le TCR peut-il donc produire un signal et le transduire à la cellule ?

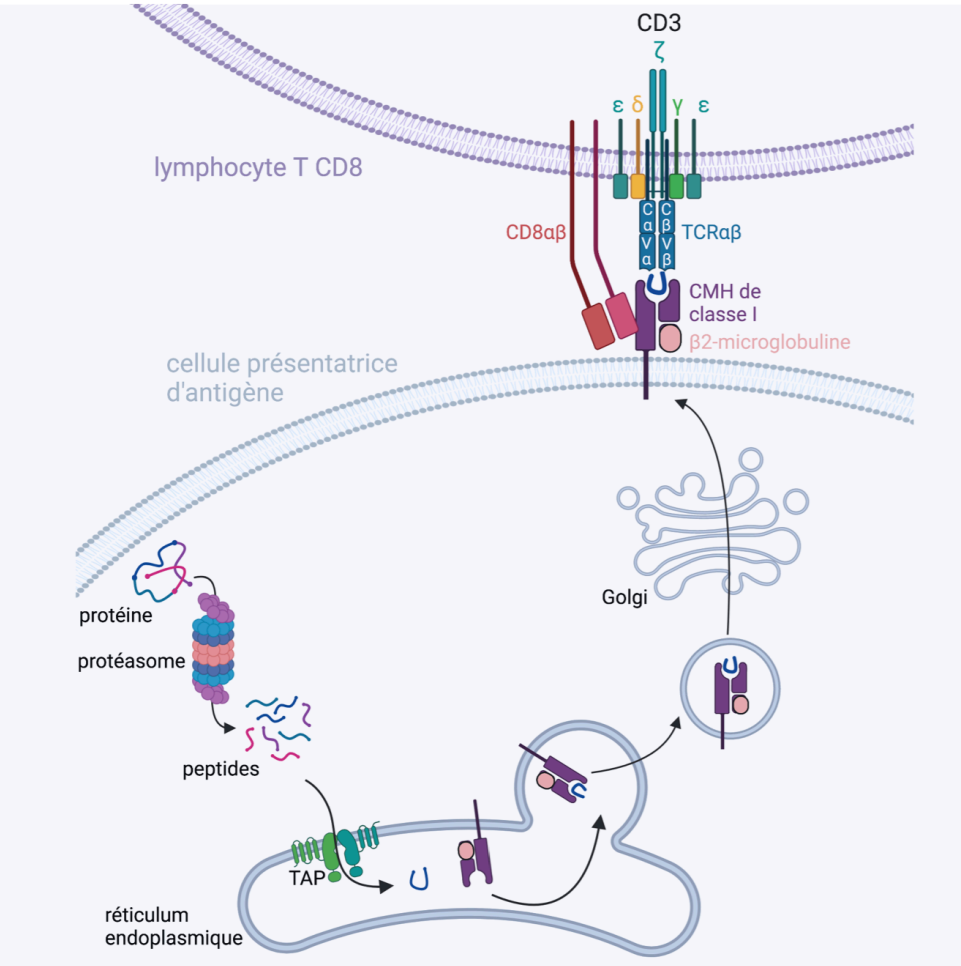


Figure 1. La présentation d'antigène aux lymphocytes T CD8.
La plupart des peptides antigéniques présentés aux lymphocytes T CD8 par les molécules du CMH de classe I sont produits par la dégradation de protéines intracellulaires par le protéasome. Le protéasome est un large complexe protéolytique principalement localisé dans le cytosol. Un transporteur dédié nommé « Transporter associated with antigen processing » (TAP) transporte les peptides résultant de l'activité du protéasome au sein du réticulum endoplasmique. Là, les peptides s'associent avec les molécules du CMH de classe I nouvellement synthétisées et migrent à la surface cellulaire en passant par le Golgi. Le complexe CMH-peptide transporté est reconnu par le TCR des lymphocytes T CD8, dont le corécepteur CD8 participe à la stabilisation de l'interaction.

Le TCR est associé de manière non covalente avec les protéines dimériques CD3ζ-CD3ζ, CD3δ-CD3ε et CD3γ-CD3ε. Le complexe TCR-CD3 qui en résulte respecte une stœchiométrie 1:1:1:1 (Dong et al., 2019) (Fig 1). Chacune des chaînes du complexe CD3 associée au TCR possède un à trois motifs d'activation des récepteurs immuns basés sur la tyrosine (ITAM) au sein de leur domaine cytoplasmique (Smith-Garvin et al., 2009). Suite à la reconnaissance d'un antigène par le TCR, ces motifs ITAM sont phosphorylés sur les résidus tyrosine

par une protéine associée au corécepteur CD8 des lymphocytes T: la tyrosine kinase Lck (Artyomov et al., 2010; Barber et al., 1989; Veillette et al., 1988). La phosphorylation des motifs ITAM de CD3 par Lck est un prérequis nécessaire à l'activation des lymphocytes T (Brownlie and Zamoyska, 2013; Smith-Garvin et al., 2009). Comme nous allons le voir, c'est de cette étape que découle la cascade de signalisation menant à l'activation des lymphocytes T. Ainsi, le TCR assure la reconnaissance de peptides antigéniques, tandis que le complexe CD3 apporte au TCR une plateforme protéique clé au déclenchement de la signalisation cellulaire. L'initiation de cette signalisation est notamment assurée par la kinase Lck associée au corécepteur CD8.

1.1.1 Initiation de la signalisation TCR

a) Régulation de l'activité de Lck, élément critique de la signalisation TCR

L'activité de la protéine kinase Lck est contrôlée par un équilibre entre la phosphorylation et la déphosphorylation de deux résidus tyrosine (Tyr) : la Tyr 505 localisée en son domaine C-terminal, et la Tyr 394 localisée au sein de son domaine catalytique (Brownlie and Zamoyska, 2013). Selon l'état de phosphorylation de ces résidus, Lck adopte une conformation différente dans laquelle son domaine catalytique est actif ou non. En l'occurrence, lorsque la Tyr 505 est phosphorylée, les domaines SH2 et SH3 de Lck interagissent avec la phosphotyrosine 505. Lck adopte alors une conformation fermée, dans laquelle son activité kinase ne peut être exercée (Yamaguchi and Hendrickson, 1996).

La phosphorylation de la Tyr 394 permettant d'activer Lck serait issue de son autophosphorylation ou d'une transphosphorylation (Brownlie & Zamoyska, 2013; Nika et al., 2010). La phosphorylation de la Tyr 505 permettant d'inhiber l'activité de Lck est notamment réalisée par la protéine kinase Csk (Bergman et al., 1992; Chow et al., 1993; Schmedt et al., 1998; Vang et al., 2004). À l'inverse, la déphosphorylation de la Tyr505 permettant de relâcher Lck de sa conformation fermée provient de l'activité phosphatase du domaine cytoplasmique de la

protéine transmembranaire CD45 (McNeill et al., 2007; Mustelin et al., 1989; Ostergaard et al., 1989). Toutefois, CD45 exerce également une activité phosphatase sur la Tyr394 activatrice de Lck (D'Oro and Ashwell, 1999; McNeill et al., 2007). Ces données indiquent que CD45 joue un rôle ambivalent en étant à la fois en mesure de favoriser et contrer l'activation de Lck. Par ailleurs, d'autres phosphatases telles que SHP1 et PTPN22 peuvent également déphosphoryler la Tyr394 activatrice de Lck (Brownlie and Zamoyska, 2013). Comment la balance penche-elle en faveur de l'activation de Lck lors de la liaison du TCR à son ligand ?

Dans des lymphocytes T CD4 humains au repos, Lck existe sous 4 formes différentes, dont 40% du pool de Lck est sous forme active (Fig 2a). De manière surprenante, l'activation des lymphocytes T n'augmente pas le taux de Lck sous forme active (Nika et al., 2010). Cette étude suggéra que ce n'est donc pas le niveau global de phosphorylation de Lck qui entraîne l'activation des lymphocytes T. À la place, l'activation proviendrait de la concentration des formes actives de Lck en une zone à partir de laquelle Lck initie la signalisation cellulaire en phosphorylant les motifs ITAM des chaînes CD3. En accord, il a été montré que suite à l'activation de la lignée humaine Jurkat, les formes actives de Lck sont agrégées en clusters avec la chaîne CD3ζ phosphorylée, tandis que la phosphatase CD45 est exclue de ces clusters (Rossy et al., 2013). Cette exclusion de CD45 permettrait de faire pencher localement la balance entre phosphorylation et déphosphorylation de Lck en faveur de sa forme active (Chang et al., 2016; James and Vale, 2012). D'autres modèles selon lesquels l'engagement du TCR par son ligand permettrait de faire basculer la signalisation en faveur de l'activation du lymphocyte T sont envisageables et sujets à débat (Mariuzza et al., 2020).

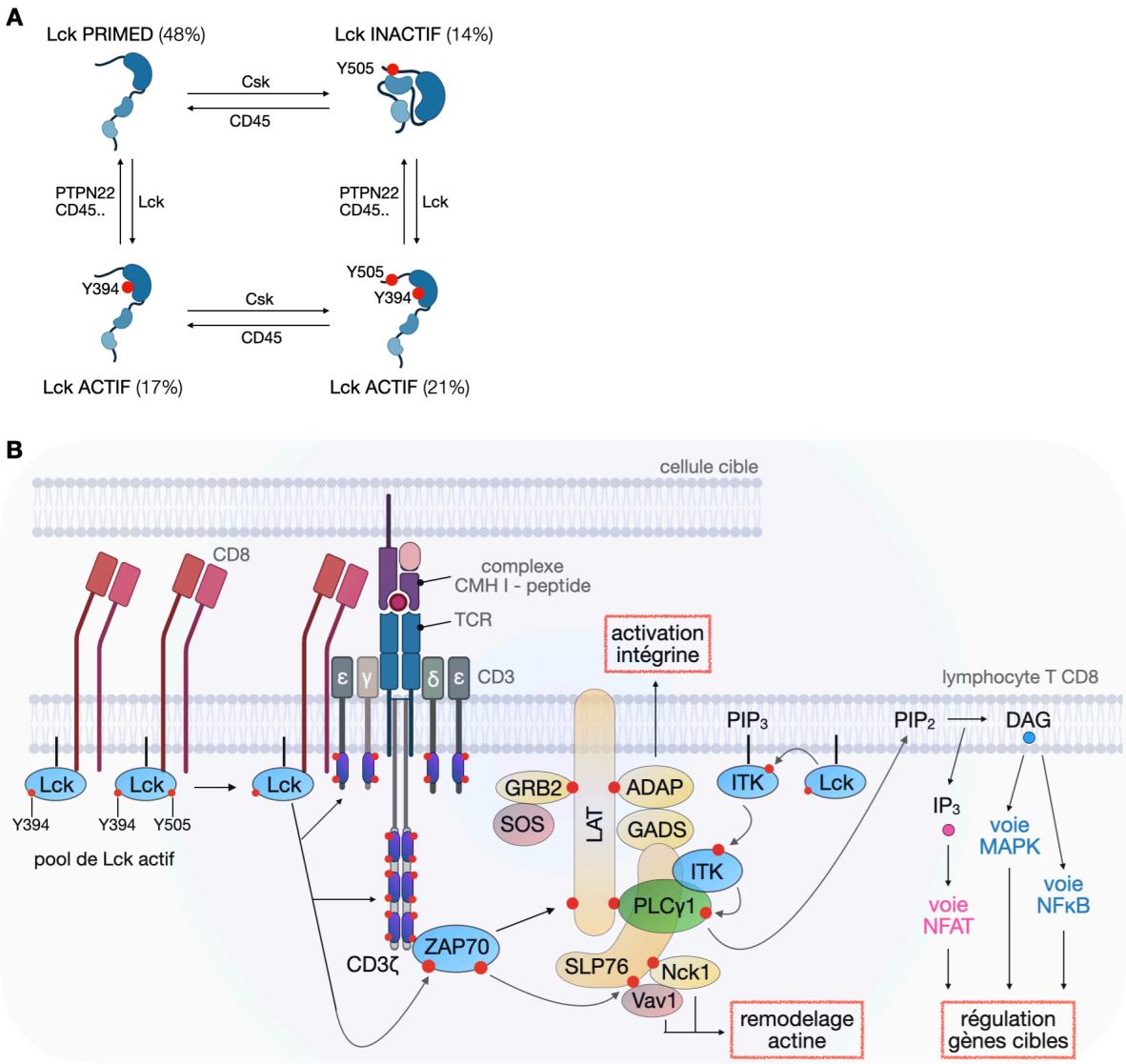


Figure 2. Les premières étapes de la signalisation du TCR.
(A) Dans les lymphocytes T CD4 humains au repos, Lck coexiste sous 4 conformations distinctes. Le passage d'une forme à l'autre est issue de l'activité kinase et phosphatase de diverses protéines, dont notamment Lck elle-même ainsi que la kinase Csk, et les phosphatases CD45 et PTPN22. (B) Lors de l'engagement du TCR par son ligand (complexe CMH de classe I présentant un peptide), la concentration locale de Lck sous forme active permet d'initier la phosphorylation des motifs ITAM de CD3. Les phosphotyrosines sur la chaîne CD3ζ permettent le recrutement de la protéine kinase ZAP70, laquelle est alors phosphorylée par Lck. La phosphorylation de ZAP70 l'active, et ZAP70 phosphoryle alors les protéines adaptatrices LAT et SLP76. Les phosphotryrosine de la protéine LAT et SLP76 servent alors de point d'amarrage pour le recrutement de diverses protéines. Le complexe en résultant est un hub protéique nommé LAT signalosome à partir duquel le signal TCR est amplifié et diversifié. Ceci aboutit à divers évènements cellulaires tels que la réorganisation du cytosquelette d'actine, l'activation d'intégrines importantes à l'adhésion cellulaire, et l'activation de voies de signalisation menant à la transcription de gènes cibles. Ce dernier évènement provient notamment de l'activation de la phospholipase Cγ1 (PLCγ1) par ITK. Son activation génère du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol triphosphate (IP_3), 2 messagers à la base de l'activation des voies NFAT, MAPK et NFκB. Les motifs ITAM sont en violet, les groupements phosphate en rouge, les kinases en bleu, les protéines adaptatrices en orange, et les GEFs en brun. Adapé de Brownlie & Zamoyska., 2013, et de Smith-Garvin et al., 2009.

b) Premières étapes de la signalisation du TCR

L'activation de Lck libère son domaine catalytique, via lequel Lck phosphoryle les motifs ITAM de CD3. En particulier, les phosphotyrosines sur CD3ζ servent alors de site d'amarrage à la protéine tyrosine kinase ZAP70, qui suite à son recrutement via son domaine SH2, est activé par phosphorylation par Lck (Chan et al., 1992; Iwashima et al., 1994). Suite à son activation par Lck, ZAP70 phosphoryle les protéines adaptatrices SLP76 et LAT sur divers résidus tyrosine (Wardenburg et al., 1996; Zhang et al., 1998). La phosphorylation de ces deux protéines est critique à la transduction de la signalisation cellulaire. En effet, les phosphotyrosines de LAT et SLP76 servent de site d'amarrage à de nombreuses protéines clés à la propagation et diversification du signal TCR. Parmi elles, PLCγ1, GRB2, GADS, ADAP, ITK, Nck1 et Vav1. Ensemble, ces protéines forment un « hub » nommé le LAT signalosome, duquel le signal est propagé et diversifié afin d'aboutir à plusieurs évènements distincts tels que la réorganisation du cytosquelette d'actine, l'activation d'intégrines permettant l'adhésion cellulaire, et l'activation de voies de signalisation menant à la régulation de nombreux gènes (Brownlie and Zamoyska, 2013; Smith-Garvin et al., 2009) (Fig 2b).

Une protéine clé pour la diversification et propagation du signal depuis le LAT signalosome est la phospholipase PLCγ1 (Fig 2b). Comment est-elle activée ?

L'activation du TCR conduit à l'activation de l'enzyme phosphoinositide-3-kinase (PI3K) par Lck. Une fois activée, la PI3K génère à la membrane du phosphatidylinositol triphosphate (PIP_3). Ce phospholipide est reconnu par le domaine PH de la protéine kinase ITK, ce qui permet son recrutement à la membrane (Andreotti et al., 2010). Le recrutement d'ITK à la membrane conduit à sa phosphorylation par Lck. ITK est alors activé et interagit avec SLP76, protéine adaptatrice constitutivement associée à la PLCγ1 (Andreotti et al., 2010; Smith-Garvin et al., 2009). ITK phosphoryle alors la PLCγ1, ce qui active la

PLCγ1, et la conduit à convertir le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG) (Liu et al., 1998; Perez-Villar and Kanner, 1999; Pettitt et al., 1997; Schaeffer et al., 1999). De ces seconds messagers, trois voies distinctes majeures vont alors être activées : la voie NFAT, NFκB, et des MAPK (Fig 2b).

1.1.2 Propagation de la signalisation TCR : voie menant à l'activation de NFAT

a) Structure de NFAT

La famille de facteurs de transcription « facteur nucléaire des lymphocytes T activés » (NFAT), est composée de 5 membres, dont 3 sont impliqués dans le développement et la fonction des lymphocytes T : NFAT-1 encodée par NFATc2, NFAT-2 encodée par NFATc1, et NFAT-4 encodée par NFATc3 (Macian, 2005).

Les protéines NFAT possèdent un domaine « Rel homology region » conservé qui comme son nom l'indique, est structurellement homologue à celui des facteurs de transcription Rel de la famille NFκB. Ce domaine est responsable de l'interaction de NFAT avec l'ADN, et renferme également les acides aminés permettant à NFAT d'interagir avec d'autres facteurs de transcription (Macian, 2005; Müller and Rao, 2010) (Fig 3).

Les protéines NFAT contiennent également un domaine régulateur, dont l'organisation des acides aminés génère des motifs phosphorylables. Ces motifs sont de deux types : des répétitions Ser-Pro-X-X (SP) et des motifs riches en sérine (SRR) (Fig 3). La présence de ces motifs fournit 14 sites de phosphorylation sur les résidus sérine conservés au sein de la famille NFAT chez la souris et l'Homme (Okamura et al., 2000). Ces résidus sérine sont phosphorylés par des protéines kinases telles que la caséine kinase 1 (CK1) et la glycogène-synthase kinase 3 (GSK3) (Beals et al., 1997; Okamura et al., 2004; Zhu et al., 1998). Quelle est la conséquence de leur phosphorylation ?

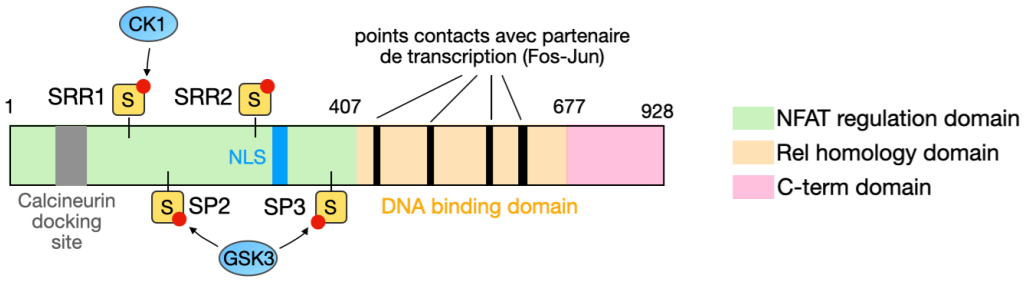


Figure 3. Structure générale de NFAT.
Les membres de la famille NFAT possèdent un domaine N-terminal conservé (NFAT regulation domain). Ce domaine régule l'activité de NFAT en modulant l'état de phosphorylation de NFAT. Les motifs phosphorylables détenus au sein de ce domaine sont des motifs SRR (serine rich region) et des motif SP (répétition de motif Ser-Pro-X-X). Les résidus sérine de ces motifs sont reconnus et phosphorylés par des enzymes telles que la caséine kinase 1 (CK1) et la glycogène-synthase kinase 3 (GSK3). La forme phosphorylée de NFAT est séquestrée dans le cytoplasme et est donc inactive. La forme active de NFAT provient de sa déphosphorylation, laquelle a lieu suite au recrutement de la phosphatase calcineurine via le domaine N-terminal de NFAT. Le signal de localisation nucléaire (NLS) permet la translocation de NFAT dans le noyau où il interagit avec l'ADN via son domaine d'homologie à Rel. Ce domaine contient des acides aminés permettant à NFAT d'interagir avec d'autres partenaires protéiques tels que Fos et Jun. Adapté de Müller & Rao., 2010.

b) Régulation de l'activité de NFAT par son état de phosphorylation

La régulation de l'activité de NFAT est basée sur son état de phosphorylation. Dans des lymphocytes T au repos, la phosphorylation de NFAT par des enzymes de maintenance telles que Ck1 permettent de séquestrer NFAT dans le cytoplasme (Okamura et al., 2000; Zhu et al., 1998). En effet, quand NFAT est phosphorylé, son signal de localisation nucléaire est masqué, tandis que son signal d'export nucléaire est exhibé (Macian, 2005; Okamura et al., 2000).

Dans des lymphocytes T activés, NFAT est déphosphorylé, ce qui cause l'exposition du signal de localisation nucléaire et masque le signal d'export nucléaire (Okamura et al., 2000). NFAT migre alors dans le noyau, où il régule la transcription de ses gènes cibles. Au sein du noyau, des enzymes telles que CK1 et GSK3 rephosphorylent NFAT, ce qui entraîne l'exposition du signal d'export et ainsi l'export de NFAT hors du noyau (Beals et al., 1997; Okamura et al., 2000, 2004) (Fig 3 et 4). Quelle est la voie de signalisation qui fait le lien entre l'activation du TCR et la déphosphorylation activatrice de NFAT ?

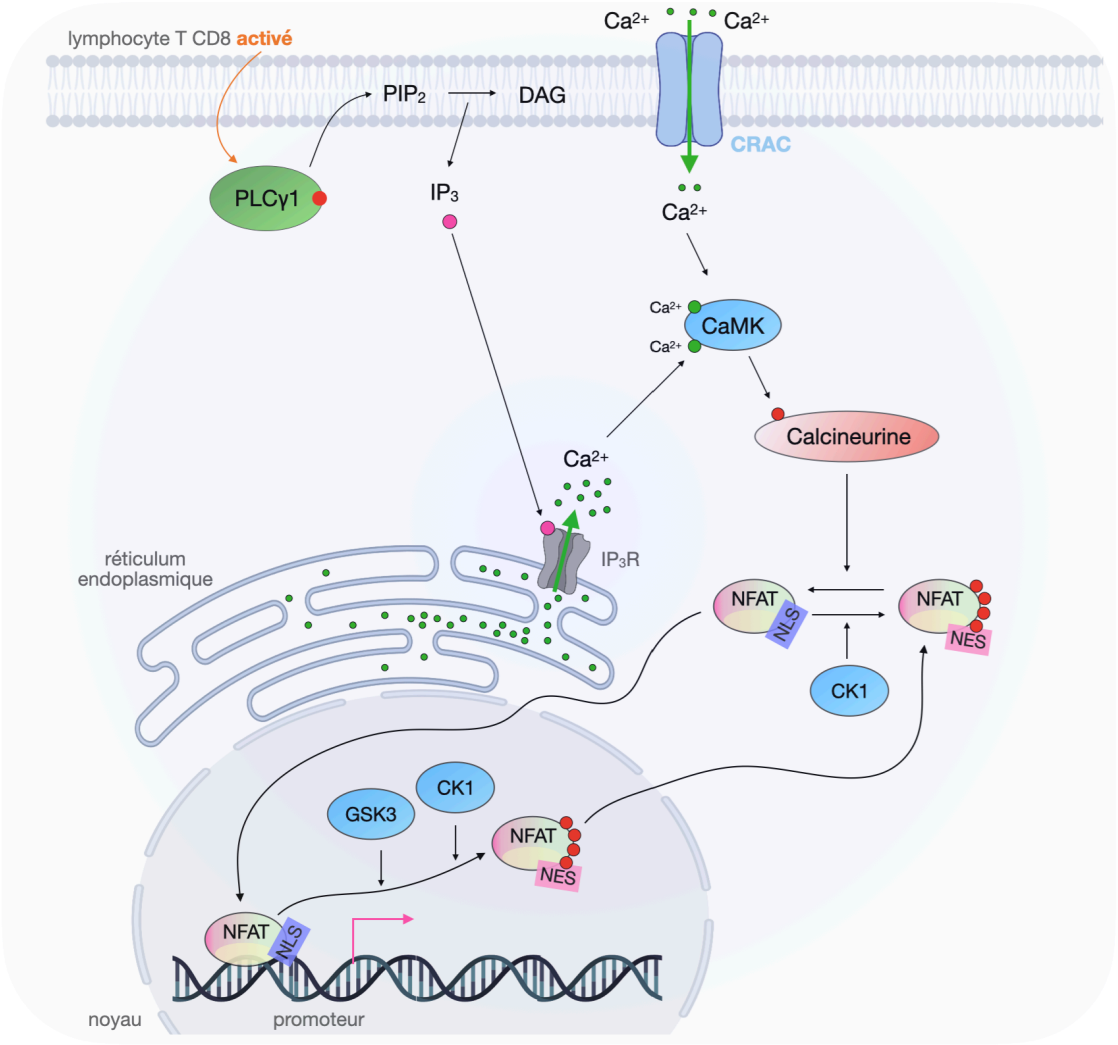


Figure 4. Propagation de la signalisation TCR par la voie NFAT.
La phospholipase Cγ1 (PLCγ1) génère de l'inositol triphosphate (IP_3). En se liant à son récepteur, l'IP_3 entraîne l'efflux de calcium (Ca^{2+}) du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme. L'appauvrissement du stock de Ca^{2+} au sein du réticulum endoplasmique conduit à l'ouverture du canal calcique transmembranaire CRAC (Calcium Release Activated Channel), ce qui contribue à l'augmentation de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+}. Le Ca^{2+} active la camoduline kinase (CaMK), laquelle phosphoryle la sérine/thréonine phosphatase calcineurine. La calcineurine déphosphoryle NFAT, ce qui permet l'exposition du signal de localisation nucléaire (NLS). NFAT migre dans le noyau, où il régule l'expression de divers gènes. Dans le noyau, NFAT est rephosphorylé sur ses résidus sérine par les enzymes caséine kinase 1 (CK1) et glycogène synthase kinase 3 (GSK3). Cette forme phosphorylée de NFAT est exportée hors du noyau, et son état de phosphorylation est maintenu dans le cytoplasme par CK1. Les groupements phosphate sont en rouge, les kinases en bleu. Adapté de Müller & Rao., 2010.

c) Activation de NFAT par sa déphosphorylation

Nous avons vu que l'activation du TCR conduit à l'activation de la PLCγ1, enzyme catalysant la conversion du PIP_2 en DAG et IP_3. Dans le cytoplasme, l'IP_3 interagit avec son récepteur sur le réticulum endoplasmique et induit l'efflux du calcium (Ca^{2+}) stocké dans le réticulum endoplasmique vers le cytoplasme. L'appauvrissement du stock de Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique mène également à l'ouverture de canaux calciques à la membrane plasmique permettant l'entrée supplémentaire de Ca^{2+} dans le cytoplasme (Macian, 2005; Smith-Garvin et al., 2009) (Fig 4).

L'augmentation de la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} déclenche l'activation de la protéine kinase calcium dépendante, la calmoduline CaMK, qui à son tour active la calcineurine par phosphorylation (Garcia-Cozar et al., 1998; Macian, 2005). En sa qualité de sérine/thréonine phosphatase, la calcineurine déphosphoryle 13 des 14 groupements phosphate de NFAT suite à son interaction avec le domaine N-terminal de NFAT. La déphosphorylation de NFAT par la calcineurine permet l'exposition de son signal de localisation nucléaire, et donc la translocation de NFAT dans le noyau (Aramburu et al., 1998; Garcia-Cozar et al., 1998; Luo et al., 1996; Okamura et al., 2000). Là, NFAT régule l'expression de ses gènes cibles (Feske et al., 2001; Martinez et al., 2015) (Fig 4).

1.1.3 Propagation de la signalisation TCR : la voie des MAPK active AP-1

a) Régulation de l'activité de Ras, protéine clé à l'activation de la voie MAPK

La protéine GTPase Ras est critique à l'initiation de la voie des MAPK. Par conséquent, la régulation de son activité est primordiale. Celle-ci repose sur le type de nucléotide guanylique avec lequel Ras interagit. La forme de Ras liée à une molécule de guanosine diphosphate (GDP) est inactive, tandis que la forme de Ras liée à du guanosine triphosphate (GTP) est active (Stone, 2011). L'échange du GDP par du GTP, menant à l'activation de Ras, est régulé par des facteurs d'échange de nucléotides guanyliques (GEFs) : RasGRP et SOS. Ces 2 GEFs sont

exprimés au sein des lymphocytes T et agissent en synergie pour activer Ras et la voie des MAPK qui en découle (Roose et al., 2007).

b) Activation de la voie des MAPK et de AP-1

Suite à l'activation du TCR et de la PLCγ1, cette dernière génère du diacylglycérol (DAG). Le DAG induit le recrutement à la membrane de la protéine kinase C theta (PKCθ) (Díaz-Flores et al., 2003; Monks et al., 1997), où elle est activée par phosphorylation. Là, elle active le GEF RasGRP, lui aussi recruté par le DAG (Carrasco and Merida, 2004; Ebinu et al., 1998; Roose et al., 2005). RasGRP échange alors la molécule de GDP liée à Ras par du GTP, ce qui active Ras (Dower et al., 2000; Downward et al., 1990; Ebinu et al., 2000). Un autre GEF, Son of sevenless (SOS), est recruté à proximité de Ras par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice GRB2 du LAT signalosome, et active également Ras (Buday et al., 1994; Egan et al., 1993; Finco et al., 1998) (Fig 5).

Une fois activée, Ras-GTP active la sérine-thréonine kinase Raf1, une MAPKKK. Raf-1 phosphoryle et active à son tour les MAPKK MEK1 et MEK2, qui phosphorylent et activent à leur tour les MAPK Erk1 et Erk2 (Smith-Garvin et al., 2009; Stone, 2011). Les MAPK Erk1 et Erk2 phosphorylent le facteur de transcription Elk1, qui induit alors l'expression du facteur de transcription c-Fos (Gille et al., 1995; Marais et al., 1993). Par ailleurs, la Ras-GTP active également la MAPKKK MEKK1, qui mène à son tour à l'activation de la c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Faris et al., 1996; Lin et al., 1995; Minden et al., 1994). Cette sérine/thréonine kinase réalise alors une phosphorylation activatrice sur le domaine N-terminal du facteur de transcription c-Jun (Hibi et al., 1993; Su et al., 1994) (Fig 5).

Les facteurs de transcription c-Fos et c-Jun forment ensemble l'hétérodimère AP-1 (Jain et al., 1992) et régulent l'expression de divers gènes, notamment en association avec NFAT (Macián et al., 2001).

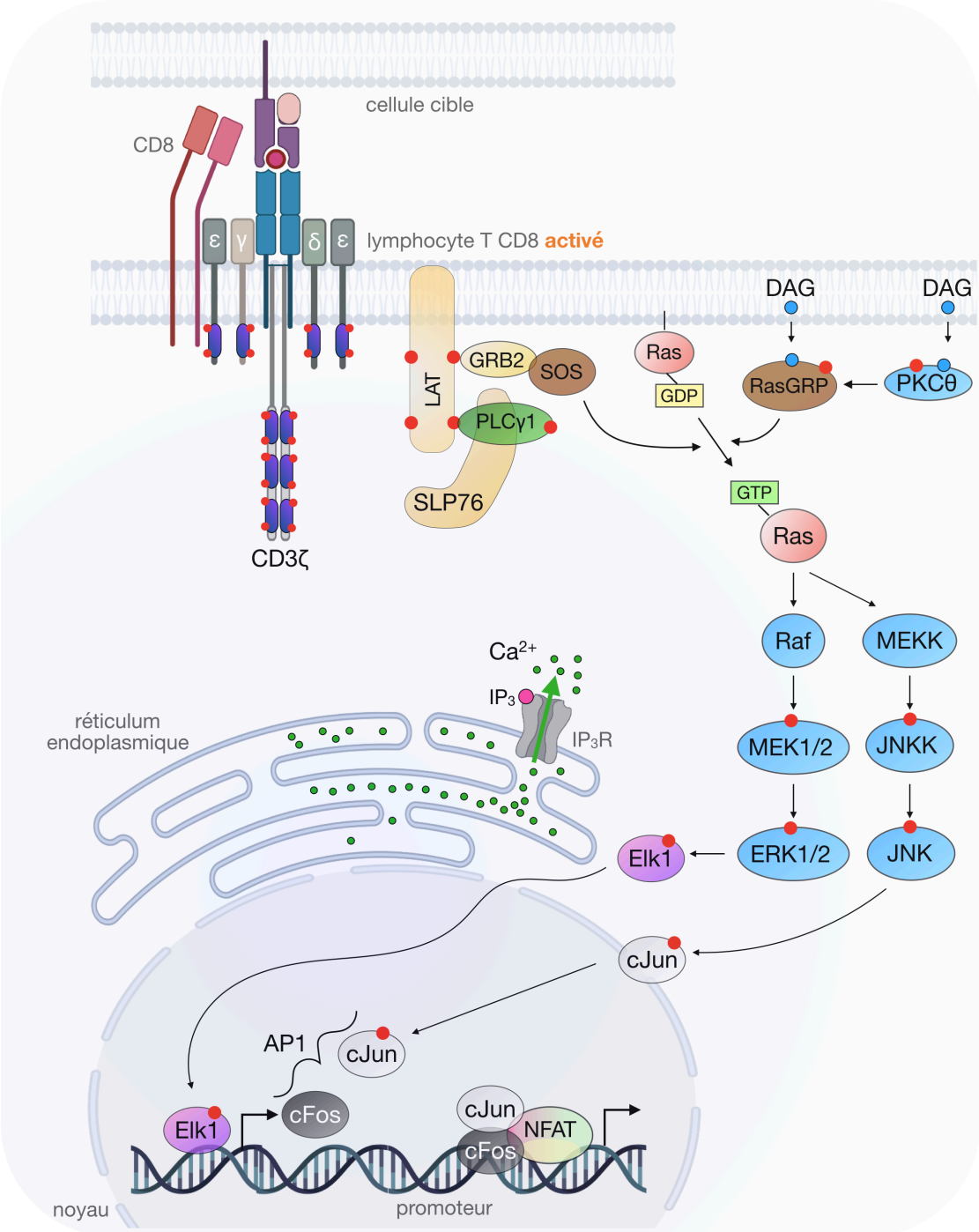


Figure 5. Propagation de la signalisation TCR par la voie des MAPK.
L'activation du TCR ayant mené à la production de DAG par la PLCγ1 conduit à l'activation du GEF RasGRP qui catalyse l'échange de GDP par du GTP sur Ras. Le GEF SOS recruté au LAT signalosome par l'intermédiaire de GRB2 active également Ras. Ras-GTP enclenche l'activation des MAPKKK Raf et MEKK, ce qui aboutit à la phosphorylation du facteur de transcription Elk1 et de la kinase JNK, respectivement. Elk1 migre dans le noyau et induit l'expression de c-Fos. JNK phosphoryle et active c-Jun. Les facteurs de transcription c-Fos et c-Jun forment le dimère AP-1. NFAT et AP-1 forment un complexe régulant l'expression de divers gènes. Les groupements phosphate sont en rouge, les GEFs en brun, les kinases en bleu. Adapté de Gaud et al., 2018.

1.1.4 Propagation de la signalisation TCR : voie menant à l'activation de NFκB

a) La famille NFκB de facteurs de transcription

La famille de facteurs de transcription NFκB est composée de 5 membres : NFκB1 (p50), NFκB2 (p52), RelA (p65), RelB, et c-Rel. Ces protéines sont caractérisées par leur domaine d'homologie à Rel (RHD), qui permet leur interaction avec l'ADN au niveau des élément *cis* κB (Fig 6a et b). Ces éléments d'une dizaine de paires de bases ont pour séquence GGGRNWYYCC avec R = purine, Y = pyrimidine, W = A ou T, et N = n'importe quel nucléotide. Cette séquence est localisée au promoteur et enhancer des gènes régulés par NFκB. De par la nature dégénérée de cette séquence et des modifications post-traductionnelles pouvant affecter l'activité de NFκB, l'étendu des gènes régulés par NFκB est large et contextuel (Hoffmann et al., 2006; Natoli et al., 2005).

Un niveau de complexité supérieur est ajouté par le fait que les membres de la famille NFκB agissent en dimère. Dans la plupart des cellules, NFκB2 forme préférentiellement un hétérodimère avec RelB, tandis que NFκB1 forme préférentiellement un hétérodimère avec RelA ou c-Rel (Fig 6b). De plus, RelA et c-Rel peuvent également former des homodimères (Hoffmann et al., 2006). Les facteurs NFκB1 et NFκB2 ne possédant pas de domaine transactivateur, ils dépendent d'autres facteurs pour induire la transcription. Leur dimérisation avec RelA, RelB ou c-Rel leur apporte cette capacité grâce au domaine transactivateur dont les facteurs Rel sont pourvus (Hayden and Ghosh, 2008).

Au sein de cellules au repos, ces dimères sont préférentiellement sous forme latente dans le cytoplasme jusqu'à ce que leur activation leur permette de migrer sous forme active dans le noyau (Vallabhapurapu and Karin, 2009). Deux voies d'activation distinctes mènent à l'activation des dimères NFκB : la voie canonique, qui active les dimères RelA-NFκB1 et c-Rel-NFκB1, et la voie alternative, qui active le dimère NFκB2-RelB (Hayden and Ghosh, 2008). Comment sont régulées ces voies ?

b) Inhibition de l'activité de NFκB par les protéines IκB

La régulation de l'activité de NFκB est réalisée par la famille IκB de protéines kinases inhibitrices de NFκB (Fig 6c). Cette famille de protéines se compose de plusieurs membres, dont le mieux connu est IκBα, qui inhibe l'activation de la voie NFκB canonique. Ces protéines permettent de favoriser la localisation des dimères latents de NFκB dans le cytoplasme (Vallabhapurapu and Karin, 2009).

La structure cristallographique de IκBα en interaction avec le dimère NFκB1-RelA a suggéré que la séquence de localisation nucléaire (NLS) de RelA est masquée par IκBα. En revanche, la NLS de NFκB1 demeure exposée (Hayden and Ghosh, 2008). Par conséquent, le complexe RelA-NFκB1-IκBα naviguerait entre le cytoplasme et le noyau, sans que sa localisation nucléaire ne persiste dû au signal d'export nucléaire (NES) de IκBα (Huang et al., 2000; Johnson et al., 1999) (Fig 6d). Lorsque la voie NFκB est activée, IκBα est dégradée (Henkel et al., 1993). Ceci aboutit à l'exposition du NLS de RelA et à l'arrêt de l'export hors du noyau par le NES de IκBα (Hayden and Ghosh, 2008). Ainsi, le complexe NFκB dépourvu de IκBα demeure préférentiellement dans le noyau où il exerce son activité transcriptionnelle (Fig 6d). L'un des gènes cibles rapidement induit par RelA-NFκB1 au sein des cellules Jurkat est NFKBIa, qui encode IκBα. La resynthèse de IκBα permet d'atténuer l'activité NFκB, et constitue ainsi une boucle de rétrocontrôle (Hoffmann et al., 2002; Sun et al., 1993).

c) Activation de l'activité de NFκB par les kinases du complexe IKK

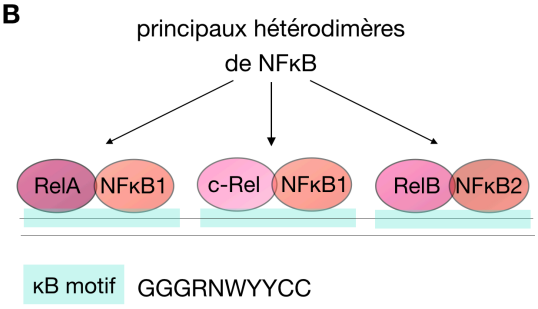
La dégradation de l'inhibiteur IκBα est causée par le complexe IKK. Ce complexe est formé des kinases activatrices IKKα et IKKβ, et de leurs sous-unités régulatrices IKKγ (Fig 6e et f). La kinase IKKβ est essentielle à l'activation de la voie NFκB canonique qui aboutit à l'activation des dimères RelA-NFκB1 et c-Rel-NFκB1 (Hu et al., 1999; Li et al., 1999). La kinase IKKα est impliquée dans l'activation de la voie alternative qui aboutit à l'activation des dimères RelB-NFκB2 (Senftleben et al., 2001). Par ailleurs, il a été montré dans les macrophages

que IKKα était également capable de phosphoryler RelA et c-Rel, ce qui conduit à leur dégradation et permet de contribuer à la résolution de l'inflammation (Lawrence et al., 2005).

A la famille de facteurs de transcription NFκB

gene	protein	domaine RHD	C-term
NFKB1	p50 (NFκB1)	DNA binding + dimerization	régulation
NFKB2	p52 (NFκB2)	idem	régulation
RELA	p65 (RelA)	idem	transactivateur
RELB	RelB	idem	transactivateur
REL	c-Rel	idem	transactivateur

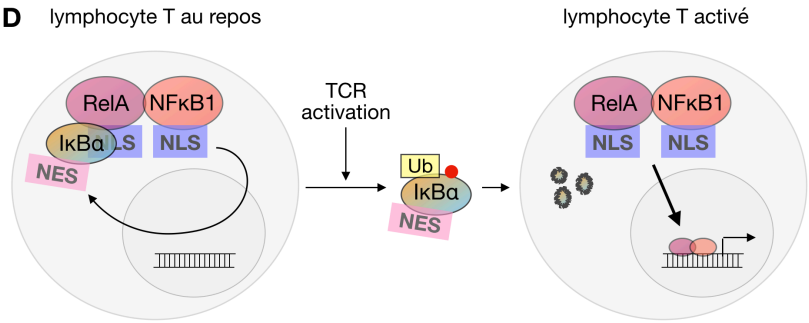
B



C la famille de kinases inhibitrices de NFκB

gene	protein
NFKBIA	IκBα
NFKBIB	IκBβ
NFKBIE	IκBε
NFKBIZ	IκBζ
Bcl3	Bcl-3

D



E la famille de kinases activatrices de NFκB

gene	protein	rôle
CHUK	IKKα	active voie NFκB alternative
IKBKB	IKKβ	active voie NFκB canonique
IKBKG	IKKγ	régule IKKα et IKKβ

F

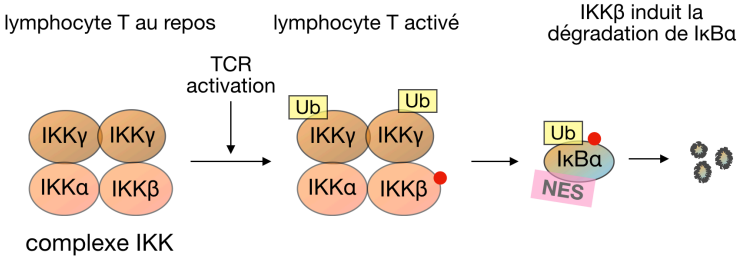


Figure 6. Facteurs de transcription, régulateurs et activateurs de la voie NFκB.
(A) Facteurs de transcription membre de la famille NFκB. Leur structure de base consiste en un domaine d'homologie à Rel (RHD) responsable de leur dimérisation et fixation à l'ADN, et un domaine C-terminal impliqué dans la séquestration de NFκB dans le cytoplasme (régulation) ou dans l'activation de la transcription (transactivateur). (B) Principaux hétérodimères de NFκB présents dans les cellules. (C) Kinases inhibitrices de la voie NFκB. (D) Mécanisme le plus connu de régulation de l'activité de RelA-NFκB1 par la kinase inhibitrice IκBα. (E) Kinases activatrices de la voie NFκB. (F) Les kinases activatrices de la voie NFκB interagissent avec leur sous-unité régulatrice IKKγ. Lorsqu'un lymphocyte T est activé, IKKγ est polyubiquitinylé, et IKKβ phosphorylé, ce qui induit son activation. IKKβ phosphoryle et induit la dégradation de la kinase inhibitrice IκBα.
Ub = Ubiquitine; NES = Nuclear Export Signal; NLS = Nuclear Localization Signal. Les groupements phosphate sont en rouge.
Adapté de Hayden et Ghosh, 2008.

d) La signalisation TCR mène à l'activation de la voie NFκB canonique

Dans les lymphocytes T, l'activation du TCR déclenche la voie NFκB canonique menant à l'activation de NFκB1-RelA (Vallabhapurapu and Karin, 2009). Son initiation dépend de l'activation de la PKCθ suite à son recrutement à la membrane (Chuang et al., 2011; Lee et al., 2005; Park et al., 2009).

Une fois activée, la PKCθ phosphoryle la protéine adaptatrice CARMA1 (Matsumoto et al., 2005). Constitutivement associée à la membrane plasmique, CARMA1 sert alors de point d'entrée à la propagation du signal de la voie NFκB. En effet, la phosphorylation de CARMA1 permet la formation du complexe CARMA1-Bcl10-MALT1 essentiel à la propagation du signal (Che et al., 2004; Gaide et al., 2002; Sun et al., 2004; Wang et al., 2004; Zhou et al., 2004).

MALT1 est impliqué dans le recrutement et l'activation de l'ubiquitine ligase TRAF6 (Sun et al., 2004). Bcl10 est quant à lui ubiquitiné, et cette modification permet le recrutement de la sous-unité régulatrice IKKγ du complexe IKK (Wu and Ashwell, 2008). Il s'en suit la polyubiquitination de la sous-unité régulatrice IKKγ du complexe IKK par TRAF6 (Sun et al., 2004; Zhou et al., 2004). D'autres ubiquitines ligases telles que TRAF2 pourraient aussi avoir ce rôle (Paul and Schaefer, 2013). La polyubiquitination de IKKγ s'accompagne de la phosphorylation de la sous-unité IKKβ du complexe IKK par la kinase TAK1 (Sun et al., 2004) . Ces 2 modifications post-traductionnelles sur le complexe IKK aboutissent à l'activation de IKKβ, qui phosphoryle alors IκBα, menant ainsi à la dégradation de IκBα (Brown et al., 1995; Chen et al., 1996; Scherer et al., 1995). La translocation nucléaire de NFκB1-RelA dans le noyau mène à la régulation de l'expression de gènes liés à la prolifération, la survie, et la fonction des lymphocytes T (Paul and Schaefer, 2013).

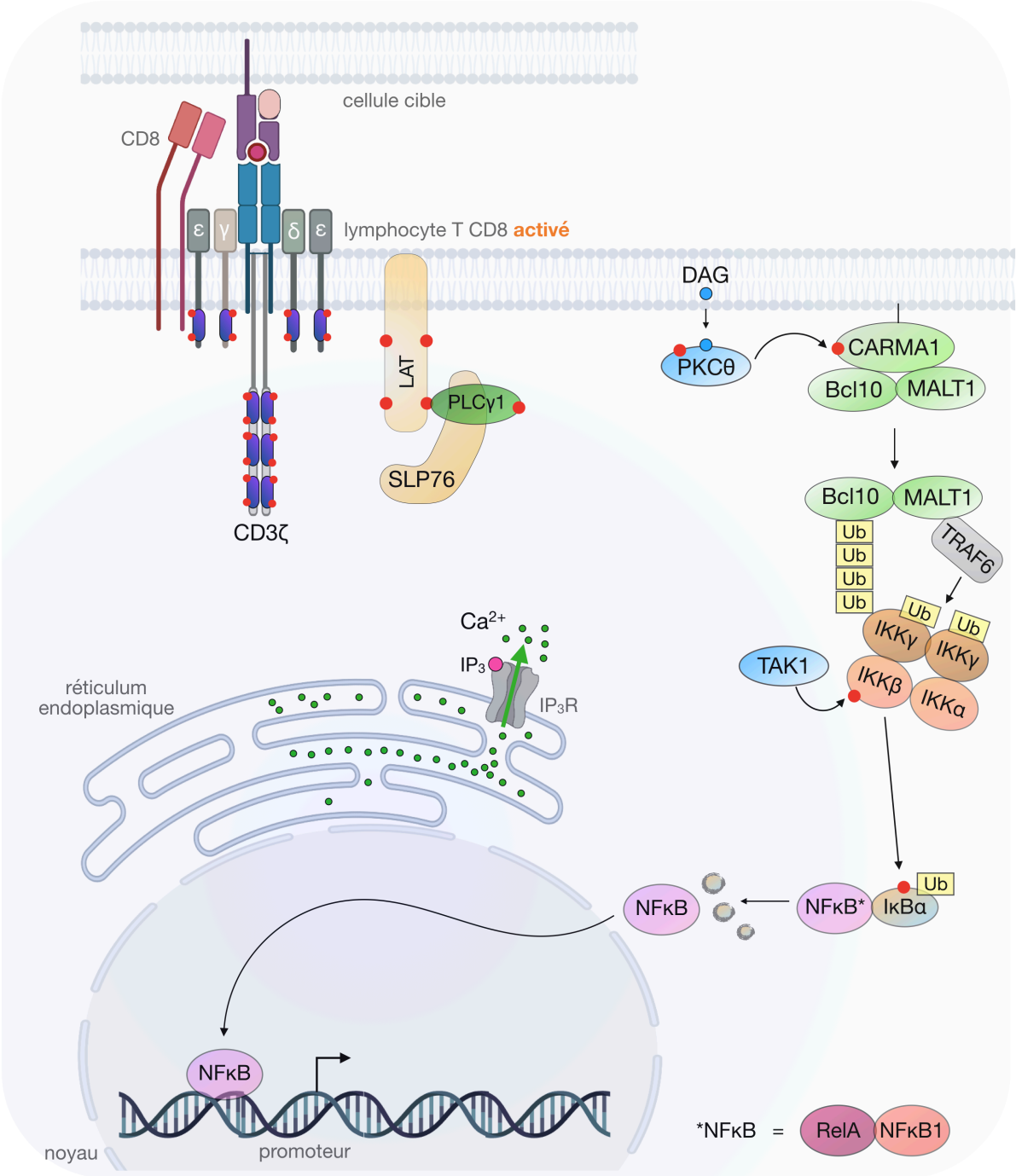


Figure 7. Propagation de la signalisation TCR par la voie NFκB.
L'activation du TCR ayant mené à la production de DAG par la PLCγ1 conduit à l'activation de la PKCθ, qui phosphoryle à son tour CARMA1. Cette modification post-traductionnelle induirait un changement de conformation nécessaire pour permettre à CARMA1 d'interagir avec Bcl10 et MALT1. Bcl10 est alors polyubiquitinylé, ce qui permet le recrutement du complexe IKK à proximité de l'ubiquitine ligase TRAF6, recrutée par MALT1. La kinase TAK1 phosphoryle la sous-unité IKKβ du complexe IKK, ce qui mène à son activation et à la phosphorylation de IκBα. Cette dernière est alors ubiquitinée à son tour, et dégradé par le protéasome, libérant ainsi NFκB (RelA-NFκB1) qui migre alors dans le noyau où il régule l'expression de ses gènes cibles. Les groupements phosphate sont en rouge, les kinases en bleu ou orange, les groupements ubiquitine en jaune. Adapté de Paul and Schaeffer, 2013.

Remarque

La présentation séquentielle et structurée de la signalisation du TCR réalisée dans cette partie ne prétend pas correspondre à toute la réalité des évènements qui ont lieu lorsque le TCR est activé. En effet, des interconnexions entre les voies de signalisation décrites existent, mais également des mécanismes de rétrocontrôle et d'ajustement de ces voies. Entrer dans de tels détails s'éloigne du sujet de cette thèse. Plus d'informations à cet égard sont disponibles (Brownlie and Zamoyska, 2013; Gaud et al., 2018).

Par ailleurs, la signalisation découlant de l'activation du TCR qui a été présentée n'intègre pas les signaux co-stimulateurs qui sont rencontrés par un lymphocyte T lors de son interaction avec des cellules présentatrices d'antigène. Ceux-ci sont essentiels lors de la première activation d'un lymphocyte T naïf par son antigène, aussi appelée phase de « priming ». Sans ces signaux costimulateurs, un lymphocyte T naïf deviendra anergique. Ce phénomène est notamment conduit par NFAT lorsque ce dernier agit en l'absence de son partenaire AP-1 (Macián et al., 2002). L'un des signaux costimulateurs les mieux connus provient de CD28, qui permet notamment de renforcer l'activité d'AP-1 et NFκB par la voie PI3K-AKT en aval de CD28 (Smith-Garvin et al., 2009). Ensemble, NFAT et AP-1 exercent alors un programme transcriptionnel distinct de l'anergie, qui en synergie avec la voie NFκB, mène à l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs.

1.2 Différenciation en lymphocytes T CD8 effecteurs et mémoire

Lors d'une infection, par exemple par un virus, les lymphocytes T naïfs spécifiques de l'antigène rencontré sont activés par des cellules présentatrices au sein des organes lymphoïdes secondaires. Les lymphocytes T naïfs migrent constamment entre ces organes et le sang jusqu'à être activés par leur antigène. Suite à l'activation et costimulation d'un lymphocyte T naïf, CCR7 est transitoirement régulé à la hausse, ce qui permet le maintien du lymphocyte T activé dans les organes lymphoïdes (Chen et al., 2018). Il s'en suit une phase d'expansion clonale pendant laquelle le lymphocyte T CD8 ayant reconnu son antigène prolifère et acquiert un nouveau programme transcriptionnel conduisant à l'acquisition de ses fonctions effectrices (Badovinac et al., 2002; Chen et al., 2018; Murali-Krishna et al., 1998). Les lymphocytes T effecteurs quittent les organes lymphoïdes et migrent au site d'infection, où leurs fonctions effectrices sont mobilisées pour contrôler l'antigène rencontré (Chen et al., 2018). Lorsque l'antigène est éliminé, près de 95% des lymphocytes T effecteurs sont éliminés au cours d'une phase de contraction pendant laquelle les lymphocytes T CD8 spécifiques de l'antigène rencontré meurent par apoptose (Badovinac et al., 2002; Murali-Krishna et al., 1998). Les cellules qui survivent se différencient en lymphocytes T mémoire, dont la persistance dans l'organisme confère une protection immédiate en cas de réexposition à l'antigène qui leur est spécifique (Chen et al., 2018).

Dans cette partie, nous verrons brièvement les différences majeures entre lymphocytes T effecteurs et mémoire, les facteurs de transcription clés qui gouvernent leur développement, et leur devenir.

1.2.1 Les lymphocytes T CD8 effecteurs

a) activité cytotoxique

L'une des caractéristiques principales d'un lymphocyte T CD8 est sa capacité à induire la mort de sa cellule cible. Deux mécanismes majeurs existent.

Le premier mécanisme cytotoxique met en jeu les protéines perforine et granzymes. Ces protéines ne sont pas exprimées par les lymphocytes T naïfs, à l'inverse des lymphocytes T effecteurs qui contiennent ces protéines au sein de granules lytiques (Peters et al., 1991). Suite à l'activation du TCR, la sécrétion de ces granules en direction de la cellule cible conduit à sa mort (Griffiths, 1997). Ceci est notamment due à l'action de la perforine. En s'insérant dans la bicouche lipidique de la membrane de la cellule cible, la perforine forme des pores à travers lesquels le contenu des granules lytiques peut pénétrer dans la cellule cible. Les granzymes déversées dans la cellule cible y initient alors la signalisation menant à l'apoptose (Chowdhury and Lieberman, 2008; Griffiths, 1997). Le second mécanisme cytotoxique dépend de FasL (CD95L), exprimé à la surface des lymphocytes T CD8 effecteurs (Rouvier et al., 1993). La liaison de FasL au récepteur Fas (CD95) sur la cellule cible entraîne l'apoptose de la cellule cible (Ashkenazi and Dixit, 1998).

Ces 2 mécanismes cytotoxiques contribuent de manière variable au contrôle d'infections virales. Par exemple, l'élimination du virus influenza des poumons de souris infectées peut avoir lieu à la fois par le système perforine/granzyme et par la voie Fas/FasL (Topham et al., 1997). En revanche, l'élimination du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) repose principalement sur le système perforine/granzyme (Kägi et al., 1994; Walsh et al., 1994).

b) production de cytokines

Une autre fonction effectrice importante au contrôle d'une infection virale est la production de cytokines. Contrairement aux granules lytiques dont la sécrétion est rapidement initiée après activation du TCR, la sécrétion de cytokines nécessite d'abord leur synthèse *de novo*, elle aussi enclenchée après activation du TCR des lymphocytes T effecteurs. De nombreuses cytokines exercent des rôles variées. Les cytokines effectrices phares produites par les lymphocytes T CD8 sont l'interféron-gamma (IFNγ) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNFα). (Harty et al., 2000).

Suite à la liaison de son récepteur, les signaux induits par l'IFNγ dans sa cellule cible ont des effets variés et nombreux : augmentation de l'apprêtement antigénique, arrêt du cycle cellulaire, polarisation Th1 de la réponse CD4…(Schoenborn and Wilson, 2007). Par conséquent, l'IFNγ représente une cytokine essentielle à la résolution d'infections virales variées ou face à la bactérie *L.Monocytogenes* (Bouley et al., 1995; Finke et al., 1995; Guidotti et al., 1996; Huang et al., 1993; Lu et al., 1998; Tishon et al., 1995).

Suite à la liaison de son récepteur, le TNFα active les facteurs de transcription AP-1 et NFκB, ce qui induit l'expression de gènes encodant des molécules inflammatoires, ou mène dans certains cas à l'apoptose (Ashkenazi and Dixit, 1998). Par conséquent, le TNFα participe également au contrôle d'infections virales ou par *L.Monocytogenes* (Guidotti et al., 1996; Nakane et al., 1988; Pfeffer et al., 1993).

c) devenir des lymphocytes T effecteurs

Lorsque l'antigène est éliminé, la majorité des cellules effectrices meurent par apoptose, avec près de 95% des cellules qui sont éliminées (Badovinac et al., 2002; Murali-Krishna et al., 1998). Les cellules effectrices qui meurent lors de cette phase de contraction sont qualifiées de SLEC pour « Short-Lived Effector Cells », et sont classiquement identifiées par cytométrie en flux comme étant

CD127$^-$ KLRG1$^+$ (Joshi et al., 2007). Suite à la résolution d'une infection aigüe avec le virus LCMV, les lymphocytes T CD8 antiviraux SLEC déclinent d'un facteur 40 entre les jours 8 et 30 post infection, et ce déclin continue par après (Joshi et al., 2007; Kaech et al., 2003).

1.2.2 Les lymphocytes T CD8 mémoire

a) origine des lymphocytes T mémoire

Une faible proportion (5-10%) des lymphocytes T CD8 effecteurs survit à la phase de contraction. Les cellules qui survivent n'expriment pas KLRG1, mais expriment CD127. Entre le jour 8 et 30 post infection, elles ne déclinent que d'un facteur 4, puis leur quantité demeure stable (Joshi et al., 2007). Ces lymphocytes T CD127$^+$ KLRG1$^-$ sont qualifiés de MPEC pour « Memory Precursor Effector Cells », et sont considérés comme étant précurseur des lymphocytes T mémoire.

Le transfert adoptif séparé des SLEC (CD127$^-$ KLRG1$^+$) et MPEC (CD127$^+$ KLRG1$^-$) dans des souris congéniques démontre que les MPEC transférés sont maintenus, tandis que la population SLEC transférée décline progressivement (Joshi et al., 2007; Kaech et al., 2003). De plus, seuls les MPEC sont capables de conférer une réponse immune secondaire menant à l'élimination de leur antigène suite à leur réexposition à ce dernier (Kaech et al., 2003). C'est pourquoi cette population de lymphocytes T effecteurs KLRG1$^-$ CD127$^+$ qui persiste suite à la phase de contraction est considérée comme étant à l'origine des lymphocytes T mémoire chez la souris, d'où son qualificatif de MPEC.

Toutefois, une étude plus récente a mis en évidence que la combinaison des marqueurs KLRG1 et CD127 n'est pas suffisamment spécifique à la distinction des SLEC et MPEC (Herndler-Brandstetter et al., 2018). À partir des jours 5-7 après infection avec la bactérie *L.Monocytogenes* ou avec le virus de la stomatite vésiculaire, 10-15% des lymphocytes T KLRG1$^+$ CD127$^-$ sont convertis en cellules KLRG1$^-$ CD127$^+$ et représentent ensuite 20-30% des lymphocytes T CD8 mémoire (Herndler-Brandstetter et al., 2018).

b) devenir des lymphocytes T mémoire

Deux catégories majeures de lymphocytes T CD8 mémoire sont identifiables chez l'Homme et la souris : les lymphocytes T CD8 mémoire centraux (Tcm), et les lymphocytes T CD8 mémoire effecteurs (Tem) (Chen et al., 2018).

Chez la souris, les Tcm sont identifiés par la coexpression des récepteurs CCR7 et CD62L, tandis que les Tem n'expriment ni CCR7, ni CD62L. Ces 2 populations ont des localisations différentes dans l'organisme : les Tcm sont préférentiellement trouvés dans la circulation sanguine et lymphatique, et circulent donc à travers l'organisme via les organes lymphoïdes secondaires. Les Tem sont préférentiellement trouvés dans le sang, la pulpe rouge (rate), les tissus périphériques (Gerlach et al., 2016; Masopust et al., 2001; Mueller et al., 2013).

Chez l'Homme, Tcm et Tem sont distingués sur la base de l'expression de CCR7 et CD45RA, avec les Tcm étant $CCR7^+$ $CD45RA^-$ (et $CD62L^+$), et les Tem $CCR7^-$ $CD45RA^-$ (et majoritairement $CD62L^-$) (Sallusto et al., 1999). Une population de cellules $CCR7^-$ $CD45RA^+$, les TemRA, existe aussi chez l'Homme (Sallusto et al., 1999). Ces cellules ont été décrites comme étant des effecteurs mémoire terminaux. Pourtant, lorsque ces cellules sont activées *in vitro*, elles prolifèrent, perdent l'expression de CD45RA, et maintiennent leurs fonctions effectrices (Carrasco et al., 2006; van Leeuwen et al., 2002). Ces données interrogent sur le qualificatif d'effecteurs terminaux et suggèrent que les TemRA pourraient également être des cellules au repos. Plus récemment, il a été montré qu'au sein des TemRA, les cellules $CD57^+$ ont une faible capacité de prolifération, ont des télomères plus courts, et sont moins capables de sécréter d'IFNγ que leurs homologues $CD57^-$. (Verma et al., 2017) De plus, la restimulation *in vitro* de TemRA $CD57^-$ mène à la perte d'expression de CD45RA, ce qui n'est pas observé avec les TemRA $CD57^+$ (Verma et al., 2017). Ainsi, la coexpression de CD45RA et CD57 serait plus fiable à l'identification de cellules effectrices mémoires terminales.

c) fonctions des lymphocytes T mémoire

Par rapport aux lymphocytes T naïfs activés, les lymphocytes T mémoire activés sont plus rapides pour entrer en cycle, se diviser, et exercer leurs fonctions effectrices (Bachmann et al., 1999; Sallusto et al., 1999; Veiga-Fernandes et al., 2000). Ainsi, lors de leur réexposition à leur antigène, les lymphocytes T mémoire confèrent une protection immédiate contre ce dernier.

En transférant séparément des Tcm et Tem dans des souris congéniques pour y être réactivés par leur antigène, il a été rapporté que les Tcm étaient plus efficaces à la génération d'une réponse immune secondaire protectrice (Bouneaud et al., 2005; Wherry et al., 2003a). Toutefois, cette conclusion est à nuancer dans la mesure où la présence de Tem est essentielle à la protection immédiate des tissus périphériques lors d'une réinfection (Bachmann et al., 2005; Mueller et al., 2013). Les Tem rapidement recrutés au site inflammatoire limitent la réplication et dissémination du pathogène, et leur action est soutenue après quelques jours par une seconde vague de cellules effectrices générées par l'activation des Tcm dans les organes lymphoïdes secondaires (Mueller et al., 2013).

1.2.3 Facteurs de transcription des lymphocytes T CD8 effecteurs et mémoire

L'expression des gènes encodant les protéines qui différencient les lymphocytes T CD8 naïfs, effecteurs et mémoire, est régulée par des facteurs de transcription. Certains de ces facteurs de transcription exercent des fonctions partiellement redondantes ou antagonistes, ce qui favorise la différenciation en cellules effectrices ou mémoire. C'est le cas des axes T-bet/Eomes et Blimp-1/Bcl-6. D'autres agissent en synergie, tels que BATF et IRF4, sans lesquels la différenciation en lymphocytes T effecteurs est entravée. D'autres, et en particulier Tcf-1, exercent un rôle critique à l'établissement d'un pool de lymphocytes T mémoire, puisque sans Tcf-1, les lymphocytes T mémoire précurseurs (MPEC) ne sont pas formés lors d'une infection aigüe (Jeannet et al., 2010; Zhou et al., 2010). Le rôle de Tcf-1 sera approfondi au chapitre 2.

a) BATF et IRF4

Suite à leur priming, les lymphocytes T naïfs expriment les facteurs de transcription BATF et IRF4 endéans 24h (Kurachi et al., 2014; Yao et al., 2013). Ces facteurs exercent un rôle critique : sans eux, la réponse effectrice n'est pas maintenue suite à la phase d'expansion clonale des lymphocytes T. Ce défaut est corrélé à la dysrégulation de nombreux gènes encodant des protéines effectrices (ex : IFNγ, granzyme B), des facteurs de transcription participant à la différenciation effectrice (ex : T-bet et Blimp-1), et des protéines de la glycolyse (Grusdat et al., 2014; Kurachi et al., 2014; Man et al., 2013; Yao et al., 2013).

Dans les lymphocytes T CD4, plusieurs études ont suggéré que IRF4 et BATF collaborent pour ouvrir la chromatine au niveau de gènes où d'autres facteurs de transcription sont ensuite recrutés pour en favoriser l'expression (Ciofani et al., 2012; Kwon et al., 2009). Pour cette raison, IRF4 et BATF sont parfois qualifiés de facteurs « pionniers » à la différenciation des lymphocytes T naïfs en cellules effectrices. Plus d'informations à cet égard sont disponibles dans le chapitre 3.

b) T-bet et Eomes

T-bet et Eomes appartiennent à la famille T-box de facteurs de transcription. Ces 2 facteurs de transcription ont leur abondance qui change au cours de la différenciation des lymphocytes T. L'expression de T-bet atteint son maxima lors de la conversion du stade naïf au stade effecteur, puis son expression est moindre. À l'inverse, l'expression de Eomes est moindre au stade effecteur, et atteint son maxima dans les lymphocytes T mémoire centraux (Tcm) (Joshi et al., 2007). Ces différences d'expression de T-bet et Eomes au cours de la différenciation des lymphocytes T peuvent être exacerbées par la présence d'IL-12, laquelle augmente l'expression de T-bet et réprime celle de Eomes dans les lymphocytes T effecteurs (Takemoto et al., 2006).

Malgré cette dynamique différente de leur expression, T-bet et Eomes exercent des fonctions partiellement redondantes et collaborent lors de la

différenciation des lymphocytes T CD8. En effet, T-bet et Eomes peuvent tout 2 complémenter leur absence. Par exemple, en l'absence de T-bet ou de Eomes, la production d'IFNγ, l'expression de granzyme B et perforine, et l'activité cytotoxique, n'est que faiblement impacté, tandis qu'un défaut majeur est observé au sein de lymphocytes T CD8 T-bet$^{-/-}$ Eomes$^{-/-}$ (Intlekofer et al., 2005, 2008; Pearce et al., 2003). En accord avec ces observations, des souris T-bet$^{-/-}$ et des souris Eomes$^{-/-}$ nettoient l'infection virale aigüe avec le LCMV, tandis que des souris T-bet$^{-/-}$ Eomes$^{-/-}$ ne contrôlent pas l'infection (Intlefoker et al., 2008).

Ce recouvrement partiel des fonctions de T-bet et Eomes au sein des lymphocytes T CD8 n'aboutit toutefois pas à au même devenir de ces cellules. T-bet favorise la différenciation en cellules effectrices terminales (KLRG1^{+}), et ce processus est amplifié par la présence d'IL-12, qui augmente l'expression de T-bet (Joshi et al., 2007; Takemoto et al., 2006). À l'inverse, Eomes favorise plutôt le développement de lymphocytes T CD8 mémoire centraux. Précisément, les lymphocytes T CD8 effecteurs avec un phénotype KLRG1^{-} CD127^{+} (MPEC) se forment normalement en l'absence de Eomes, mais les lymphocytes T CD8 mémoire qui en découlent contiennent moins de Tcm et ont un défaut de persistance (Banerjee et al., 2010; Paley et al., 2013).

c) Blimp-1 et Bcl-6

À l'instar de T-bet et Eomes, Bcl-6 et Blimp-1 ont des impacts opposés sur le devenir des lymphocytes T CD8. Le facteur de transcription Bcl-6 est impliqué dans la différenciation des lymphocytes T CD8 en cellules mémoire. Lorsqu'il est surexprimé, la quantité de lymphocytes T mémoire centraux augmente, tandis que l'inverse est observé au sein de lymphocytes T CD8 KO pour Bcl-6 (Ichii et al., 2004). L'expression de Bcl-6 est conduite par la voie STAT3 en aval de la signalisation induite par l'IL-10 et l'IL-21 (Cui et al., 2011).

Le facteur de transcription Blimp-1 a son expression qui atteint son maxima au sein des cellules effectrices KLRG1^{+} CD127^{-} (SLEC), puis son expression est

maintenue à niveau plus faible au sein des lymphocytes T mémoire effecteurs (Tem) (Kallies et al., 2009; Rutishauser et al., 2009). L'expression de Blimp-1 est également renforcée par la signalisation induite par l'IL-2 et l'IL-12 (Xin et al., 2016). Sans Blimp-1, les lymphocytes T CD8 ne parviennent pas à contrôler le virus de la grippe (Kallies et al., 2009). Cet effet est associé à un défaut de recrutement des lymphocytes T CD8 au site d'infection, ainsi qu'une différenciation altérée des lymphocytes T CD8 en SLEC. En effet, ces derniers ont un défaut d'expression de T-bet, granzyme B, perforine, et expriment à la place des facteurs de transcription communément trouvés dans les lymphocytes mémoire précurseurs (MPEC) tels que Bcl-6, Tcf-1 et Eomes (Kallies et al., 2009; Rutishauser et al., 2009). Par conséquent, après résolution d'une infection avec le virus de la grippe ou le LCMV, les lymphocytes T CD8 KO pour Blimp-1 ont un phénotype biaisé vers la différenciation en lymphocytes Tcm (Kallies et al., 2009; Rutishauser et al., 2009). Collectivement, ces données indiquent que Blimp-1 favorise la différenciation des lymphocytes T CD8 en effecteurs terminaux.

Plus récemment, cette régulation de la différenciation en cellules effectrices terminales a été montrée comme étant le fruit d'une collaboration entre Blimp-1 et T-bet. En analysant le transcriptome de lymphocytes T CD8 antiviraux KO pour Blimp-1, KO pour T-bet, ou KO pour T-bet et Blimp1, il a été montré que T-bet et Blimp-1 régulent des gènes distincts, mais aussi des gènes communs, qui sont au centre du programme transcriptionnel des SLEC (Xin et al., 2016). Ceci suggère que T-bet et Blimp-1 ont des rôles qui sont en partie non redondants lors de la différenciation des lymphocytes T en SLEC. En accord avec ce postulat, la surexpression de T-bet au sein de lymphocytes T KO pour Blimp-1 ne contre que partiellement le défaut de différenciation en SLEC (Xin et al., 2016).

Conclusion :

Les lymphocytes T CD8 naïfs activés par leur antigène se différencient en cellules effectrices grâce à l'action conjointe des facteurs de transcription IRF4 et BATF. Les facteurs de transcription Blimp-1 et T-bet participent à la mise en place du programme transcriptionnel des cellules effectrices terminales (SLEC). Suite à l'élimination de leur antigène, les SLEC meurent par apoptose, tandis que les lymphocytes T mémoire précurseurs (MPEC) formés grâce à Tcf-1, persistent et se différencient en lymphocytes T mémoire sous l'influence de facteurs de transcription tels que Eomes et Bcl-6. En cas de réexposition avec leur antigène, les lymphocytes T mémoire mobilisent rapidement leurs fonctions effectrices, conférant ainsi une protection immédiate face à l'agent infectieux rencontré.

La situation décrite ci-dessus, optimale pour l'organisme infecté et défavorable à l'agent infectieux, ne se produit malheureusement pas systématiquement. En effet, diverses pathologies chroniques sévissent chez l'Homme, et se caractérisent par la coexistence de l'agent causatif de la maladie et de lymphocytes T CD8 dirigés contre cet agent. Cette situation a été abondamment étudiée dans le modèle d'infection virale chronique avec le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV).

Dans le second chapitre de cette introduction, nous verrons comment a été développé et fonctionne le modèle LCMV. Cette rétrospective est essentielle afin de comprendre la force de ce modèle, mais également ses faiblesses de par les biais qu'il introduit dans les résultats qu'il apporte. Puis, nous verrons les connaissances que ce modèle a générées sur l'immunité cellulaire antivirale, avec notamment la découverte du phénomène « d'épuisement ». Nous verrons également la portée que ces nouvelles connaissances ont eue dans le domaine de l'immunité anti-tumorale chez la souris, mais aussi chez l'Homme. Enfin, nous verrons quelles causes sont les plus fréquemment rapportées pour expliquer le phénomène d'épuisement.

2 Les lymphocytes T CD8 face à un antigène persistant

2.1 Modèle d'étude de pathologie chronique chez la souris : le modèle LCMV

Lors de l'épidémie d'encéphalite de St Louis en 1933, Charles Armstrong inocula à un primate le matériel infectieux issu d'un patient décédé lors de l'épidémie dans le but d'en isoler l'agent infectieux causatif (Beeman, 2007). Il isola de ce primate un microorganisme inconnu en ce temps, le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), dont le nom provient des observations anatomopathologiques des tissus cérébraux du primate inoculé (Armstrong and Lillie, 1934). Bien que le LCMV n'était en fait pas responsable de l'épidémie, sa découverte fortuite permit le développement d'un modèle expérimental d'infection virale aigüe ou chronique chez la souris (Fig 8a).

2.1.1 Genèse et caractéristiques du modèle LCMV

Le virus de la chorioméningite lymphocytaire d'Armstrong a pour hôte naturel la souris (Traub, 1935). Suite à l'isolement du virus par Armstrong, d'autres souches virales furent isolées et caractérisées (Dutko and Oldstone, 1983). Expérimentalement, l'occurrence d'une chorioméningite lymphocytaire létale suite à l'injection de souris immunocompétentes dépend de la souche virale utilisée, de la souche murine receveuse, de la dose injectée, et de la voie d'administration. La plupart du temps, toutefois, l'injection par voie intracérébrale est fatale, tandis que l'injection par voie périphérique génère des infections non létales (Buchmeier et al., 1980; Traub, 1936a) (Fig 8b).

En 1936, Erich Traub rapporta que les souris naturellement infectées par le virus LCMV le portent tout au long de leur vie suite à leur infection *in utero* ou néonatale, et que le développement de chorioméningite lymphocytaire à la suite de cette infection est rare (Traub, 1936a, 1936b). Cet état de persistance virale a

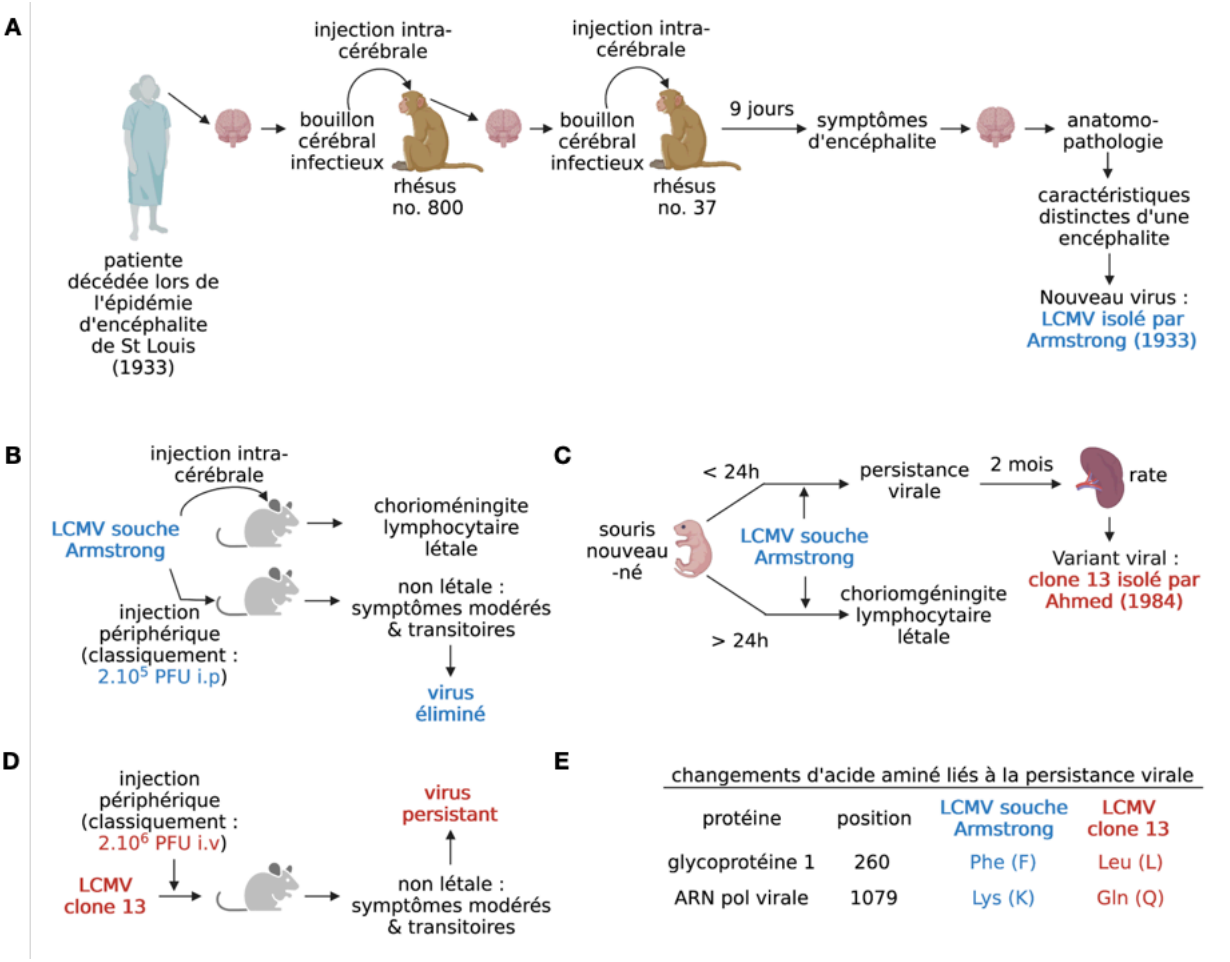


Figure 8. Genèse et caractéristiques du modèle LCMV.
(A) Condensé des étapes de la procédure suivie par Charles Armstrong pour tenter d'isoler l'agent causatif de l'épidémie d'encéphalite de St Louis en 1933. Ceci mena à la place à l'isolement du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV). Adapté de la biographie de Charles Armstrong (Beeman., 2007). (B) Le virus isolé par Charles Armstrong en 1933 cause des symptômes identiques à ceux observés chez le macaque après administration intracérébrale chez la souris adulte. En revanche, l'injection par voie périphérique produit des symptômes distincts qui s'effacent lorsque le virus est éliminé. Dans le modèle LCMV, la souche Armstrong est communément injectée par voie intrapéritonéale avec 2.10^5 PFU de virus. (C) L'injection néonatale de souris par voie intracérébrale cause une infection persistante tandis que le risque de chorioméningite lymphocytaire augmente si l'injection tarde. Rafi Ahmed isola en 1984 un variant viral de la rate de souris chroniquement infectées : le clone 13. (D) L'injection périphérique du clone 13 du LCMV produit chez des souris adultes une infection chronique similaire à celle observée par injection néonatale. Dans le modèle LCMV, le clone 13 est communément injecté par voie intraveineuse avec 2.10^6 PFU de virus. (E) Deux acides aminés changent entre la souche isolée par Armstrong en 1933 et le clone 13 isolé par Rafi Ahmed en 1984. La mutation F260L en particulier est essentielle à la persistance virale.

été reproduit expérimentalement en administrant les souris en intracérébrale endéans 24h après leur naissance. Si cette injection néonatale tarde, la probabilité des souris de succomber d'une chorioméningite lymphocytaire augmente puisque dès le 6ème jour après naissance, la mortalité est de 60% contre 15% si l'injection a lieu dans les 24h (Hotchin JE and Cinits M, 1958). Les souris survivantes deviennent porteuses chroniques du virus (Fig 8c). De manière importante, comme montré par Traub en 1936, elles sont protégées d'un challenge subséquent par injection intracérébrale du virus, suggérant qu'elles ont développé une immunité face au LCMV, bien que le virus ait persisté dans l'organisme de ces souris (Hotchin JE and Cinits M, 1958; Traub, 1936a).

Cette apparente contradiction entre immunité et persistance virale mena à de nombreuses études. L'une d'entre elles, parue en 1984, fut un tournant dans la genèse du modèle LCMV. Après avoir établi des souris chroniquement infectées par injection néonatale de la souche Armstrong du virus, Rafi Ahmed *et al* isolèrent deux mois plus tard de la rate de ces souris un variant viral, le clone 13 (Fig 8c). Lorsque ré-administré dans des souris adultes par voie intraveineuse, ce variant viral est détecté jusqu'à 90 jours dans le sérum des souris, tandis que la souche parentale Armstrong, injectée en même quantité et par la même voie, est indétectable dès le 8ème jour après infection (Ahmed et al., 1984) (Fig 8b et d). Cette persistance virale est corrélée à l'incapacité des splénocytes de ces souris à lyser *in vitro* des fibroblastes infectés avec le LCMV (Armstrong ou clone 13), tandis que les splénocytes de souris infectées avec la souche Armstrong le peuvent (Ahmed et al., 1984). Il fut ainsi établi que la persistance virale observée chez les souris infectées dès leur naissance était due à l'émergence *in vivo* de variants viraux, tels que le clone 13, capables de réprimer la réponse des lymphocytes T cytotoxiques. Surtout, il devint possible de reproduire un état de persistance virale en injectant des souris adultes avec le clone 13.

Le récepteur lié par le LCMV pour initier son entrée dans sa cellule cible est le α-dystroglycane (Cao et al., 1998). Ce récepteur est présent à la surface de diverses cellules telles que macrophages, cellules dendritiques, fibroblastes, cellules épithéliales (Durbeej et al., 1998; Mueller et al., 2007; Sevilla et al., 2000). En raison de la variété de cellules exprimant ce récepteur, le clone 13 se dissémine dans de nombreux organes tels que rate et foie, desquels il est progressivement éliminé en 40 jours, tandis que le virus est encore détecté à 80 jours dans d'autres organes tels que cerveau et reins. À l'inverse, l'injection de la souche parentale Armstrong mène à une réponse rapide et efficace puisque le virus est indétectable dès le jour 8 après infection (Wherry et al., 2003b).

La caractérisation moléculaire subséquente de la souche Armstrong et du clone 13 en dérivant a révélé qu'une mutation était essentielle à la persistance du clone 13. Cette mutation a lieu en position 260 de la glycoprotéine d'enveloppe GP1 qui dicte le tropisme du virus. Elle consiste en la substitution d'une phénylalanine (F) (souche Armstrong) en une leucine (L) (clone 13) (Salvato et al., 1988) (Fig 8e). La mutation F260L confère au clone 13 une affinité bien supérieure pour son récepteur α-dystroglycane, et affecte son tropisme. En effet, l'analyse de la rate de souris infectées en intraveineuse montre que si la souche Armstrong et le clone 13 se trouvent tous deux au niveau de la zone marginale au sein de macrophages un jour après infection, leur distribution change par après : au 3ème jour, le virus d'Armstrong se situe majoritairement au sein de macrophages dans la pulpe rouge tandis que le clone 13 se situe majoritairement au sein de cellules dendritiques dans la zone marginale et surtout dans la pulpe blanche (Borrow et al., 1995; Matloubian et al., 1993; Sevilla et al., 2000; Smelt et al., 2001). La réversion de la mutation F260L dans le clone 13 réduit son affinité pour l'α-dystroglycane à un niveau comparable à la souche Armstrong, rétablit sa distribution dans la pulpe rouge, et de manière importante, réduit son pouvoir persistant et sa capacité à réprimer une réponse immune cytotoxique (Smelt et al., 2001). Par ailleurs, l'isolement de 24 variants viraux capables de générer une

infection persistante et de réprimer la réponse immune cytotoxique a montré qu'ils contenaient tous cette substitution de la phénylalanine 260 en un acide aminé aliphatique tel que la leucine (L) ou l'isoleucine (I). Ces variants se distribuent également dans la zone marginale et la pulpe blanche de la rate et ont aussi une affinité supérieure pour l'α-dystroglycane (Sevilla et al., 2000).

Une seconde mutation distingue le clone 13 de la souche Armstrong. Elle a lieu en position 1079 dans l'ARN polymérase ARN-dépendante et consiste en la substitution d'une lysine (K) (souche Armstrong) en glutamine (Q) (clone 13). Cette mutation K1079Q accélère la réplication du clone 13 au sein des cellules qu'il infecte et contribuerait à la persistance du virus *in vivo* (Bergthaler et al., 2010; Matloubian et al., 1993). L'importance de cette mutation demeure toutefois controversée : tandis que l'isolement de variants viraux persistants est invariablement liée à la mutation F260L/I, nombreux de ces variants ne portent pas nécessairement la mutation K1079Q (Sevilla et al., 2000) (Fig 8e). Enfin, une troisième et dernière mutation n'ayant aucun rôle sur la persistance virale a été identifiée (Sullivan et al., 2011).

De manière importante, les 3 mutations distinguant le clone 13 de la souche parentale Armstrong n'affectent pas les épitopes reconnus par les lymphocytes T CD8. Les épitopes dominants, présentés sur la molécule H2-D^b, sont les peptides GP_{33-41} et $GP_{276-286}$ issus respectivement des glycoprotéines d'enveloppe GP1 et GP2, et le peptide $NP_{396-404}$ issu de la protéine de nucléocapside (Gairin et al., 1995). Il est à noter que les épitopes reconnus par les lymphocytes T CD4 sont également préservés des mutations distinguant le clone 13 de la souche Armstrong (Dow et al., 2008). Les épitopes viraux reconnus par les lymphocytes T CD8 et CD4 anti-LCMV étant identiques en cas d'infection aigüe ou chronique, il est possible d'étudier pourquoi ils parviennent dans un cas à éliminer le virus, et n'y parviennent pas dans l'autre.

Le propos de cette thèse portant sur les lymphocytes T CD8, c'est de cette population dont nous allons parler. Pour l'étudier, il est nécessaire d'évaluer la réponse CD8 face aux antigènes qu'ils reconnaissent. Deux approches principales ont été employées dans ce but. La première consiste à utiliser des lymphocytes T issus de souris exprimant un TCR transgénique (TCR P14) reconnaissant le peptide GP_{33-41} sur H2-D^b. Je me référerai à cette approche en parlant de lymphocytes T P14. La seconde approche consiste à l'emploi de multimères fluorescents de molécules CMH présentant un peptide antigénique donné. Je me référerai à cette approche en parlant de lymphocytes T anti-GP_{33-41}, anti-$GP_{276-286}$ ou anti-$NP_{396-404}$.

2.1.2 Le phénomène d'épuisement dans le modèle LCMV

Comme mentionné avant, Ahmed et al rapporta en 1984 que les splénocytes de souris chroniquement infectées avec le clone 13 ne produisent pas de réponse cytotoxique détectable *in vitro* (Ahmed et al., 1984). Par ailleurs, le transfert adoptif de lymphocytes T P14 résulte en leur délétion lorsque les souris receveuses sont infectées avec 10^7 PFU d'une souche LCMV donnant lieu à une infection chronique (souche Docile). Si seulement 10^2 PFU sont administrés, les lymphocytes T P14 subsistent et éliminent le virus tandis que la situation est intermédiaire à 10^4 PFU (Moskophidis et al., 1993). Ainsi il fut proposé que la persistance virale était due à la délétion de clones antiviraux en réponse à une charge antigénique abondante.

Quelques années plus tard, l'avènement de multimères de CMH permit d'étudier la réponse CD8 polyclonale en réponse à une infection virale. Par cette approche, il fut montré que les lymphocytes T anti-GP_{33-41} subsistent en fait dans la rate de souris infectées avec la souche Docile, mais que leur fonctionnement est altéré comme mesuré par une diminution de la production d'IFNγ et une faible activité cytotoxique. Ce constat est observé lorsqu'une haute dose de virus est administrée. Lorsque 1 000 à 10 000x moins de virus est injecté dans les souris,

celui-ci est éliminé et suite à la phase de contraction, une population de lymphocytes T mémoire fonctionnels persiste (Gallimore et al., 1998).

L'équipe de Rafi Ahmed affina la caractérisation de ce phénomène en employant la souche Armstrong et le clone 13, et montra qu'en plus de la perte de production d'IFNγ par les lymphocytes T anti-GP_{33-41}, les lymphocytes T anti-$NP_{396-404}$ sont indétectables dès la 4ème semaine d'une infection chronique tandis qu'ils se maintiennent jusqu'à 161 jours après une infection aigüe (Zajac et al., 1998). Ces résultats démontrèrent que plusieurs mécanismes pouvaient être mis en jeu pour expliquer la persistance d'un virus, et menèrent à l'emploi du mot « épuisé » pour qualifier ces lymphocytes T dont le fonctionnement est diminué lors d'infections chroniques et les distinguer des lymphocytes T effecteurs ou mémoire générés lors d'une infection aigüe.

La dissection du phénomène d'épuisement par Wherry et al montra que la perte de fonction des lymphocytes T anti-GP_{33-41}, -$GP_{276-286}$ et -$NP_{396-404}$ s'aggrave avec la durée de l'infection, et est proportionnelle à la charge virale dans l'organisme. Les premières fonctions effectrices amoindries dès le jour 8 sont la production d'IL-2 et l'activité cytotoxique. La production de TNFα et d'IFNγ est également altérée, mais celle de TNFα devient quasi-nulle au jour 15, tandis que celle d'IFNγ atteint son minima au jour 30 après infection (Wherry et al., 2003b) (Fig 9).

En dépit de leurs fonctions effectrices amoindries, les lymphocytes T CD8 épuisés demeurent cruciaux pour le contrôle de l'infection virale chronique à laquelle ils font face. Si leur maintenance *in vivo* est compromise, le titre viral mesuré dans plusieurs organes au jour 90 post infection augmente a minima d'un facteur 1000 (Paley et al., 2012). De plus, ces fonctions résiduelles sont suffisantes pour éliminer le virus lors d'une infection aigüe, car lorsque des lymphocytes T épuisés isolés de souris infectées 4 semaines avec le clone 13 sont

transférés dans des souris TCRα$^{-/-}$ infectées avec la souche Armstrong, ils éliminent le virus en 8 jours (Utzschneider et al., 2013).

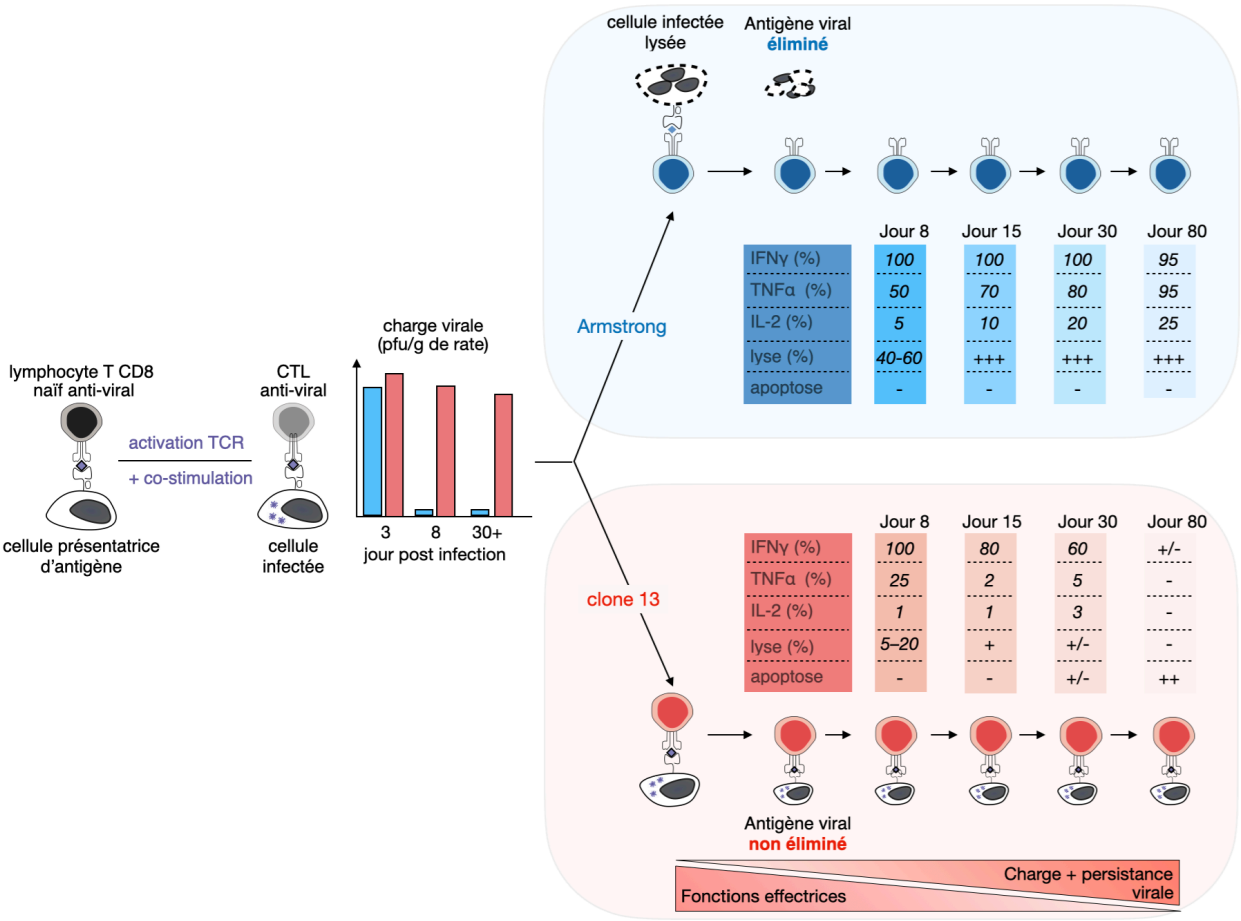


Figure 9. Perte progressive des fonctions effectrices des lymphocytes T CD8 lors d'une infection chronique.

Lors d'une infection virale avec le LCMV, les lymphocytes T CD8 naïfs antiviraux sont activés et costimulés par la cellule présentant l'antigène. Ils se différenciernt alors en lymphocytes T effecteurs et parviennent à éliminer le virus (infection aigüe avec la souche Armstrong) ou non (infection chronique avec le clone 13). Dans ces 2 contextes infectieux opposés, la fonctionnalité des lymphocytes T antiviraux est également antinomique. Tandis que les lymphocytes T antiviraux issus d'infection aigüe sont capables de produire diverses cytokines effectrices, les lymphocytes T antiviraux issus d'infection chronique perdent progressivement cette capacité. L'activité lytique des lymphocytes T exposés à une infection chronique est également diminuée. À des stades tardifs de l'infection chronique, les lymphocytes T dirigés contre certains épitopes viraux (ex : $NP_{396-404}$) sont éliminés par apoptose.

Adapté de Wherry et al., 2003, 2007.

La maintenance des lymphocytes T épuisés est hautement dépendante de la persistance de l'antigène auquel ils font face, lequel induit leur prolifération constante. Ceci a été démontré en utilisant le clone 13 muté (V35A) afin que le peptide GP_{33-41} ne soit plus capable de lier la molécule H2-D^b. Lorsque les lymphocytes T CD8 épuisés de souris chroniquement infectées sont transférés dans des souris congéniques infectées avec le clone 13 V35A, la quantité de lymphocytes T anti-GP_{33-41} décline progressivement. Les lymphocytes T anti-$GP_{276-286}$ sont eux maintenus car ils prolifèrent en réponse à l'antigène (Shin et al., 2007). Lorsque les lymphocytes T CD8 mémoire, issus de souris dont la souche virale Armstrong a été éliminée, sont transférés dans des souris non infectées, la quantité de lymphocytes T anti-GP_{33-41} demeure constante de par le fait que leur survie ne dépend pas d'activations du TCR mais de signaux fournis par l'IL-7 et l'IL-15 (Shin et al., 2007). Cette dépendance des lymphocytes T épuisés à des activations répétées du TCR pour leur survie est associée à une faible expression des récepteurs CD127 (IL-7Ra) et CD122 (IL-2/15Rb) à des stades avancés d'infection (Wherry et al., 2004).

Les lymphocytes T épuisés expriment à leur surface une panoplie de récepteurs inhibiteurs tels que PD-1 ou LAG-3 (Blackburn et al., 2009). La distribution d'un des ligands de PD-1, PD-L1, a révélé que dès le 3ème jour après infection, les cellules PD-$L1^+$ telles que les cellules réticulaires fibroblastiques sont infectées par le clone 13, mais très peu par la souche Armstrong (Mueller et al., 2007). Nous verrons plus tard si ces récepteurs, et en particulier l'axe PD-1/PD-L1, sont le simple reflet de l'activation des lymphocytes T ou s'ils jouent un rôle dans l'épuisement (voir 2.4.4).

La première caractérisation moléculaire du phénomène d'épuisement en comparant la signature transcriptionnelle de lymphocytes T épuisés avec celle de lymphocytes T effecteurs ou mémoire anti-GP_{33-41} montra de profonds changements dans le métabolisme cellulaire, la régulation du cycle cellulaire,

l'expression de récepteurs inhibiteurs et de facteurs de transcription (Wherry et al., 2007). Tandis que ces conclusions proviennent de comparaisons quantitatives d'expression de gènes, il est également possible d'utiliser une approche corrélative de l'expression de gènes. Cette dernière vise à regrouper en modules les gènes dont les changements d'expression sont hautement corrélés entre eux. Chaque module représenterait alors un réseau transcriptionnel, la logique sous-jacente étant que ces gènes seraient connectés les uns aux autres puisque leur expression est hautement corrélée. Par cette approche, Doering et al rapportèrent que les circuits transcriptionnels employés par les lymphocytes T anti-GP_{33-41} épuisés sont différents de ceux utilisés au sein des lymphocytes T anti-GP_{33-41} effecteurs ou mémoire (Doering et al., 2012). Par exemple, certains facteurs de transcription communément utilisés par les lymphocytes T effecteurs et mémoire tels que Eomes, T-bet et Tcf-1, sont également exprimés par les lymphocytes T épuisés, mais agiraient sur des gènes distincts. Cette étude suggéra également que d'autres facteurs de transcription préalablement non suspectés pourraient être impliqués dans l'épuisement, tels que TOX ou IRF4 (Doering et al., 2012). Cette étude est d'autant plus remarquable que le rôle clé de TOX dans l'épuisement a été rapporté 7 ans plus tard (voir 2.2.4).

Outre leur transcriptome divergeant, l'analyse par ATAC-seq des lymphocytes T épuisés au jour 20 après infection a montré une accessibilité différente à 5000 et 3000 régions de chromatine par rapport aux lymphocytes T mémoire et effecteur, respectivement. À titre de comparaison, les lymphocytes T mémoire ont 6000 et 3000 régions de chromatine différemment accessibles par rapport aux lymphocytes T naïfs et effecteurs, respectivement (Scott-Browne et al., 2016).

Collectivement, ces données suggèrent que les lymphocytes T épuisés sont distincts de leurs homologues effecteurs et mémoire à de nombreux égards. En accord avec leurs divergences phénotypiques, ces cellules sont également

distinctes d'un point de vue transcriptionnel et épigénétique. Ces constats suggèrent que les lymphocytes T épuisés représentent un type cellulaire distinct de leurs homologues effecteurs ou mémoire. Au cours des parties suivantes, nous verrons que le développement des lymphocytes T épuisés est un processus hiérarchique et progressif animé par des facteurs de transcription clés, et dont le phénotype auquel il aboutit est stablement acquis.

2.2 L'épuisement : une voie de différenciation des lymphocyte T CD8 ?

2.2.1 Acquisition d'un programme transcriptionnel et épigénétique distinct

Lorsque des lymphocytes T P14 sont exposés à une infection chronique pendant 8 jours puis transférés dans un contexte d'infection aigüe, ils parviennent à se différencier en lymphocytes T mémoire fonctionnels, comme mesuré par l'expression de CD127 et leur capacité à produire IFNγ et TNFα après restimulation. En revanche, si les lymphocytes sont exposés plus longtemps à l'infection chronique avant d'être transférés dans un contexte d'infection aigüe, ils ne se différencient pas en lymphocytes T mémoire fonctionnels (Angelosanto et al., 2012; Brooks et al., 2006).

Si l'exposition à une infection chronique doit être suffisamment longue pour mener à la production de lymphocytes T épuisés plutôt qu'à celle de lymphocytes T mémoire, cela suggère que les changements transcriptionnels et épigénétiques qui distinguent ces 2 populations se mettent graduellement en place, avec un point d'inflexion à partir duquel le changement devient ensuite irréversible (Box 1).

Box 1

Divergences transcriptionnelles et remodelage de la chromatine lors de la persistance d'un antigène

L'analyse longitudinale du transcriptome des lymphocytes T antiviraux au cours d'une infection aigüe ou chronique a montré qu'aux jours 6 et 8 après infection, environ 300 à 400 gènes sont différentiellement exprimés, contre environ 1500 et 1200 gènes aux jours 15 et 30, respectivement (Doering et al., 2012; Khan et al., 2019). Dès le jour 6, un cluster spécifique de gènes encodant des facteurs de transcription et des modulateurs de chromatine est exprimé au sein des lymphocytes T issus d'infection chronique, suggérant qu'ils subissent un remaniement transcritpionnel et épigénétique distinct de celui ayant lieu au sein des lymphocytes T exposés à une infection aigüe (Khan et al., 2019). De manière cohérente, au jour 8 après infection, environ 7000 régions de chromatine uniques sont plus accessibles au sein des lymphocytes T issus d'infection chronique par rapport à leurs homologues d'infection aigüe (Sen et al., 2016). Ainsi, aux alentours des jours 6 à 8 après infection chronique, la persistance du LCMV clone 13 conduit les lymphocytes T CD8 à des changements transcriptionnels uniques permettant l'expression de nouveaux facteurs de transcription et le remodelage de la chromatine. Parallèlement, des facteurs de transcription utilisés par les lymphocytes T effecteurs et mémoire sont réutilisés par les lymphocytes T épuisés mais participent à des circuits transcriptionnels distincts (Doering et al., 2012). De plus amples changements transcriptionnels sont ensuite mesurés aux jours 15 et 30 après infection, ainsi qu'un dysfonctionnement plus marqué (Khan et al., 2019; Wherry et al., 2007). Ces gènes exercent leurs fonctions dans des cellules dont la chromatine est toujours hautement remaniée, puisqu'au jour 28, 6000 régions de chromatine uniques distinguent les lymphocytes T épuisés des lymphocytes T mémoire (Sen et al., 2016).

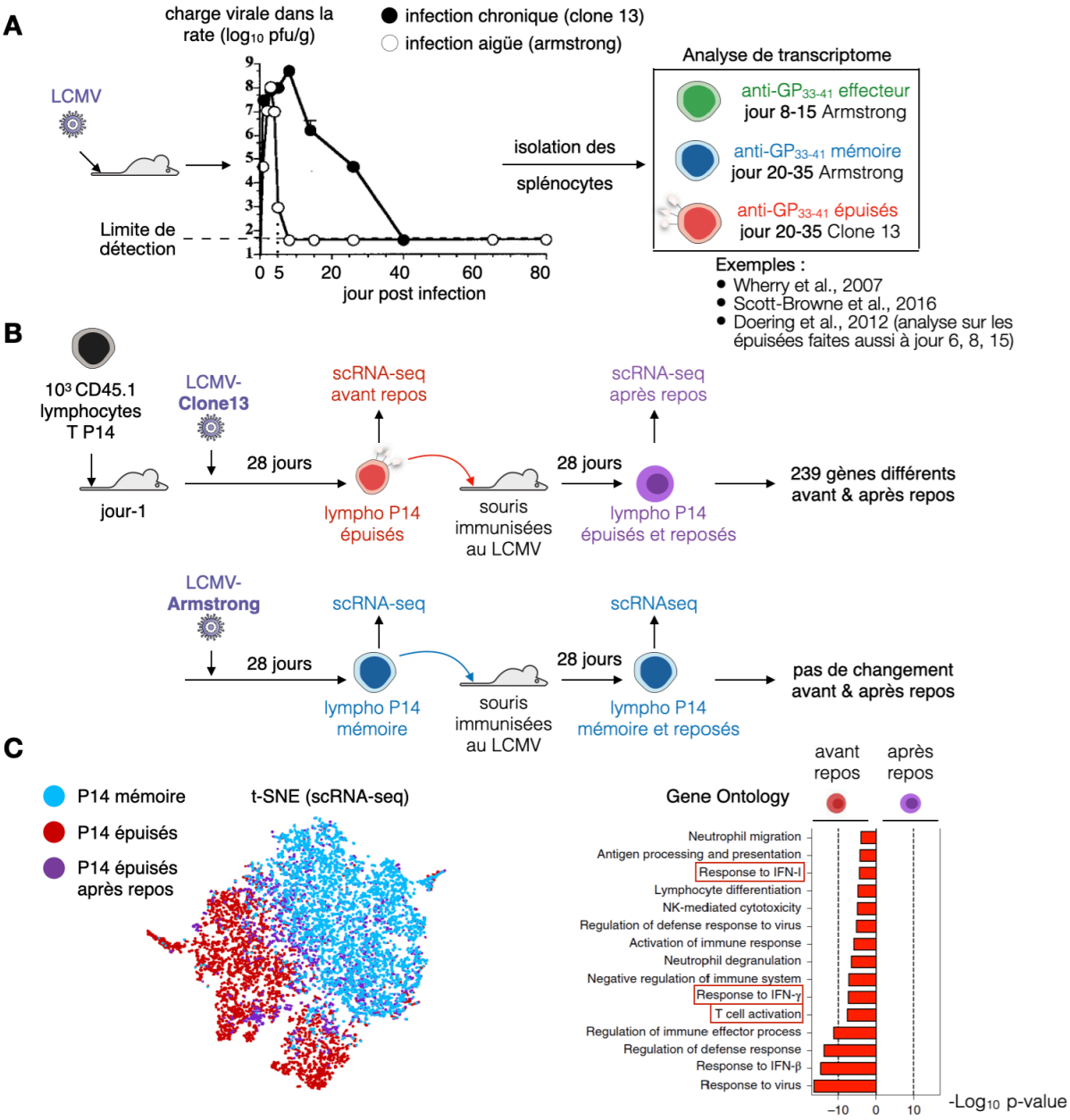


Figure 10. Biais du modèle LCMV : les lymphocytes T CD8 sont-ils épuisés ou activés ?
(A) La charge virale diffère dans la rate des souris infectées avec la souche Armstrong (infection aigüe) ou avec le clone 13 (infection chronique). Les lymphocytes T antiviraux sont fréquemment analysés et comparés à des timings d'infection différents. Le virus est indétectable dès le jour 8 lors d'une infection aigüe, et est abondamment présent jusqu'au jour 40 dans la rate lors d'une infection chronique. Adapté de Wherry et al., 2003. (B) Des lymphocytes T P14 épuisés ou mémoire ont été mis au repos ou non pendant 28 jours avant d'être analysés par scRNA-seq. L'absence du virus n'affecte pas le transcriptome des lymphocytes T mémoire. L'absence du virus pendant 4 semaines affecte le transcriptome des lymphocytes T épuisés. (C) Après 4 semaines sans antigène, les lymphocytes T P14 adoptent un phénotype intermédiaire entre des lymphocytes T mémoire et des lymphocytes T épuisés (t-SNE). Par exemple, après repos, les gènes liés à l'activation des lymphocytes T et à la signalisation par l'IFN de type I et II (Gene Ontology - voies encadrées en rouge) ne sont plus enrichies. Ceci illustre que des changements transcriptionnels entre des lymphocytes T issus d'infection aigüe et d'infection chronique sont simplement causés par l'exposition des cellules à des contextes infectieux différents. Adapté de Abdel-Hakeem et al., 2021.

Eu égard à la nature même d'une infection chronique, les changements transcriptionnels et épigénétiques observés dans les lymphocytes T épuisés sont indissociables de la persistance de l'antigène et de l'environnement inflammatoire qui l'accompagne. De fait, clamer que ces changements reflètent l'acquisition d'une nouvelle identité se révèle délicat, et il serait difficile de contredire un argumentaire proposant que ces différences sont simplement le reflet de la comparaison d'une même population de lymphocytes T mais exposée à des infections de magnitude complètement opposée (Fig 10a).

Le groupe de John Wherry a analysé par single-cell RNAseq (scRNA-seq) le transcriptome de lymphocytes T P14 épuisés au jour 28 après infection chronique, avant ou après avoir laissé ces cellules reposer 4 semaines dans des souris congéniques préalablement immunisées contre le LCMV. La même chose a été réalisée avec des lymphocytes T P14 mémoire au jour 28 après infection aigüe (Abdel-Hakeem et al., 2021). Alors que le transcriptome des lymphocytes T mémoire demeure identique avant ou après ces 4 semaines de repos, celui des lymphocytes T épuisés change partiellement, avec 239 gènes différentiellement exprimés (Fig 10b). Ces changements d'expression induisent l'acquisition d'une signature transcriptionnelle les rapprochant de lymphocytes T mémoire (Fig 10c). En effet, la distribution de ces populations sur l'espace t-SNE montre que 4 semaines après leur mise au repos, 68% des cellules épuisées sont distribuées au sein de clusters majoritairement composés des lymphocytes T mémoire. En revanche, avant d'être mis au repos, les lymphocytes T épuisés forment une population distincte de leurs homologues mémoire (Abdel-Hakeem et al., 2021). Ces données illustrent qu'une partie des changements observés entre les lymphocytes T mémoire et épuisés sont le simple reflet de leur exposition à des infections de magnitude opposée au moment de leur analyse.

Ainsi, en réalisant l'analyse des lymphocytes T épuisés après avoir pris soin de les placer dans un environnement comparable à celui de lymphocytes T

mémoire, leurs différences sont amoindries. Mais est-ce suffisant à abroger le dysfonctionnement associé au phénotype d'épuisement ?

Lorsque des lymphocytes T épuisés sont mis au repos pendant 4 semaines, ils récupèrent partiellement leur fonctionnalité puisque leur capacité à produire des cytokines et dégranuler est supérieure à celle des lymphocytes T épuisés non mis au repos. Cependant, les lymphocytes T mémoire sont plus nombreux à être en mesure d'exercer de multiples fonctions effectrices (IFNγ, TNFα, IL-2, dégranulation) par rapport aux lymphocytes T épuisés mis au repos. De plus, la persistance des lymphocytes T mémoire en l'absence d'antigène est supérieure à celle des lymphocytes T épuisés (Abdel-Hakeem et al., 2021). Enfin, lorsque réexposés à une infection aigüe, les lymphocytes T épuisés ne parviennent pas à réacquérir des propriétés similaires aux lymphocytes T mémoire. En effet, lorsque des lymphocytes T congéniques mémoire et leurs homologues épuisés mis au repos 4 semaines sont transférés dans des souris congéniques afin d'être rechallengés avec la souche LCMV Armstrong, l'expansion des lymphocytes T mémoire 8 jours plus tard est 5x supérieure. Leur capacité de lyse est également 3x supérieure et leur capacité à coproduire IFNγ et TNFα est 2x supérieure (Abdel-Hakeem et al., 2021).

Ces résultats sont en harmonie avec une étude antérieure montrant que l'atténuation des fonctions effectrices des lymphocytes T épuisés est une caractéristique stablement acquise et propagée à leur progéniture. En effet, si des lymphocytes T épuisés issus de souris chroniquement infectées sont exposés à une infection aigüe, ils prolifèrent face à l'infection et éliminent le virus. Toutefois, leurs fonctions effectrices sont moindres par rapport à des lymphocytes T mémoire (Utzschneider et al., 2013). Il est également notable que malgré 4 semaines sans exposition à leur antigène, les lymphocytes T épuisés maintiennent l'expression de PD-1, en accord avec des observations antérieures (Abdel-Hakeem et al., 2021; Angelosanto et al., 2012; Utzschneider et al., 2013). Même

constat pour le facteur de transcription TOX, dont le rôle clé dans le phénomène d'épuisement sera expliqué plus tard (voir 2.2.4) (Abdel-Hakeem et al., 2021).

Ainsi, même en étant séparés de leur contexte infectieux initial, les lymphocytes T épuisés conservent un transcriptome suffisant à réduire leur fonctionnalité en dépit de l'acquisition partielle d'une signature transcriptionnelle de lymphocytes T mémoire normaux. Ceci suggère que le dysfonctionnement associé aux lymphocytes T épuisés est stablement acquis. En accord avec ce postulat, le remaniement de la chromatine qui a lieu lors du développement des lymphocytes T épuisés est distinct de celui des lymphocytes T mémoire, et demeure stable après 4 semaines sans antigène. En effet, les régions de chromatine plus accessibles au sein des lymphocytes T épuisés par rapport aux lymphocytes T mémoire sont conservés à 80% après 4 semaine de repos. De plus, 3000 régions de chromatine accessibles au sein des lymphocytes T mémoire ne le sont pas au sein des lymphocytes T épuisés, et leur mise au repos permet de récupérer l'accès à seulement 136 d'entre elles. Enfin, 94% des gènes différentiellement exprimés après qu'un lymphocyte T épuisé ait été mis au repos ne sont pas associés à des altérations d'accès à la chromatine, ce qui suggère que ces gènes peuvent être aisément réutilisés après réexposition des lymphocytes T à leur antigène (Abdel-Hakeem et al., 2021).

En conclusion, après retrait du contexte infectieux, les lymphocytes T épuisés peuvent acquérir des changements tant fonctionnels que transcriptionnels qui les rapprochent un peu plus de lymphocytes T mémoire. Mais leur paysage épigénétique demeure similaire à celui de lymphocytes T épuisés, et ce faisant, conditionne le comportement de ces cellules, à savoir, maintenir un phénotype fonctionnel atténué. Ceci est évocateur de l'acquisition d'un état de différenciation, et c'est pourquoi l'épuisement n'est aujourd'hui plus perçu comme un simple mot décrivant le dysfonctionnement de lymphocytes T lors d'infections chroniques. Au même titre qu'un lymphocyte T naïf se différencie en

lymphocyte T effecteur et génère une population de lymphocytes T mémoire après élimination de l'antigène l'ayant activé, un lymphocyte T CD8 faisant face à un antigène persistant ou abondant se différencie en lymphocyte T épuisé (Box 2). Cette identité est stable puisque le dysfonctionnement qui lui est associé demeure même après retrait de l'antigène. Quelle est l'origine de ces lymphocytes T épuisés et comment se développent-ils ?

Box 2 L'épuisement : un phénomène d'adaptation des lymphocytes T CD8 ?

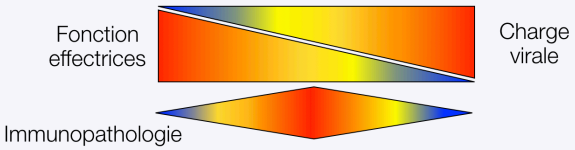
Pourquoi un lymphocyte T CD8 emprunterait une voie de différenciation le menant à devenir un lymphocyte T épuisé ? D'un point de vue physiologique, l'adoption d'un nouveau programme transcriptionnel atténuant le fonctionnement des lymphocytes T face à un antigène persistant ou abondant est perçu comme un phénomène conservé d'adaptation afin de contenir cet antigène tout en limitant les dégâts immunopathologiques qui seraient causés par l'activation répétée des lymphocytes T CD8 (Blank et al., 2019). Cette notion s'illustre par le schéma expérimental ci-dessous:

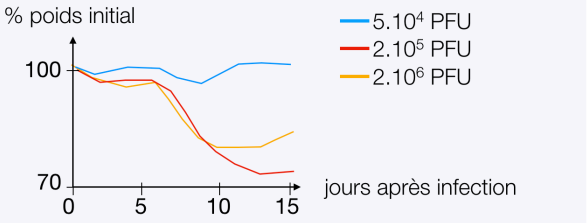
L'injection intraveineuse de 2 à 5.10^4 (faible dose), 2.10^5 (dose intermédiaire) ou 2.10^6 (haute dose) PFU du clone 13 induit une perte de fonction des lymphocytes T GP_{33-41} et $NP_{396-404}$ proportionnelle à la dose de virus rencontrée.

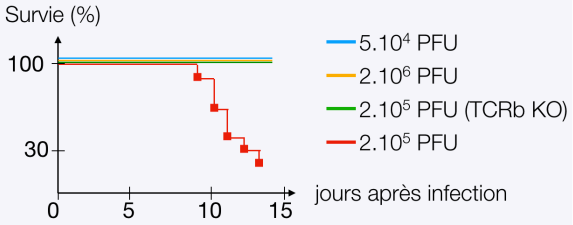
À faible dose, les lymphocytes T antiviraux parviennent à éliminer le virus. La quantité d'antigène rencontrée étant faible, la réponse immune est faiblement délétère pour l'organisme. 100% des souris survivent à l'injection.

À haute dose, les lymphocytes T antiviraux ne parviennent pas à éliminer le virus. Malgré la persistance de l'antigène, la réponse immune est faiblement délétère pour l'organisme car les lymphocytes T sont épuisés. 100% des souris survivent à l'injection.

À dose intermédiaire, les lymphocytes T antiviraux causent des dégâts tissulaires dans les poumons et le foie de par la dose d'antigène rencontrée et le maintien partiel des fonctions effectrices des lymphocytes T antiviraux. 25%-75% des souris injectées succombent à l'infection à moins que les lymphocytes T CD8 soient absent lors de la réponse immune.







Adapté de Cornberg et al., 2013 et Waggoner et al., 2012.

Comme nous l'avons vu, le clone 13 a initialement été isolé de variants viraux générés *in vivo* à partir de souris porteuses du LCMV depuis leur naissance. Ainsi, un équilibre entre pathogénicité virale et réponse immune adaptée à la charge antigénique mène à une situation bénéficiant tant à l'hôte qu'au virus. De manière spéculative, l'émergence *in vivo* de variants viraux capables de persister due à l'atténuation de la réponse CD8 par le phénomène d'épuisement pourrait être le fruit d'une coévolution hôte-virus.

2.2.2 Origine cellulaire des lymphocytes T CD8 épuisés

Comme nous l'avons vu en première partie de l'introduction, lorsque des lymphocytes T CD8 sont exposés à une infection aigüe, les lymphocytes T KLRG1^{hi} CD127^{-} sont les lymphocytes T CD8 effecteurs dont la phase de contraction a lieu suite à la résolution de l'infection. En même temps, une sous-population de précurseurs mémoire KLRG1^{lo} CD127^{+} persiste et génère des lymphocytes T CD8 mémoire dont la fonctionnalité est classiquement caractérisée par l'expression de CD127, la capacité à rapidement produire IFNγ et TNFα, et à lyser leurs cellules cibles (Fig 11a). Lors d'une infection chronique, une population distincte de cellules est trouvée : les lymphocytes T CD8 épuisés. Mais quelle est leur origine ?

Afin de répondre à cette question, Angelosanto et al ont trié au jour 8 après infection chronique les lymphocytes T anti GP_{33-41} $KLRG1^{lo}$ et $KLRG1^{hi}$ et les ont transférés séparément dans des souris congéniques chroniquement infectées depuis 8 jours. Lorsque 60 jours après transfert, la persistance des lymphocytes T est analysée, seules les souris ayant reçu la population $KLRG1^{lo}$ contiennent des lymphocytes T anti GP_{33-41}. Ces cellules ont perdu la capacité à produire les cytokines IFNγ, TNFα et IL-2 (Angelosanto et al., 2012) (Fig 11c). En revanche, si les lymphocytes T au jour 5-8 après initiation d'une infection chronique sont transférés dans un contexte d'infection aigüe, leur capacité à générer des lymphocytes T mémoire est préservée, comme mesurée par la production de cytokines similaire à celle de lymphocytes T mémoire d'un contexte d'infection aigüe (Angelosanto et al., 2012; Brooks et al., 2006) (Fig 11b). De manière importante, les lymphocytes T épuisés issus de la population $KLRG1^{lo}$ maintiennent l'expression de PD-1 et de TOX, et demeurent moins capables de produire des cytokines (IFNγ, TNFα et IL-2), même après avoir été mis au repos dans des souris immunisées contre le LCMV (Abdel-Hakeem et al., 2021; Angelosanto et al., 2012) (Fig 11d).

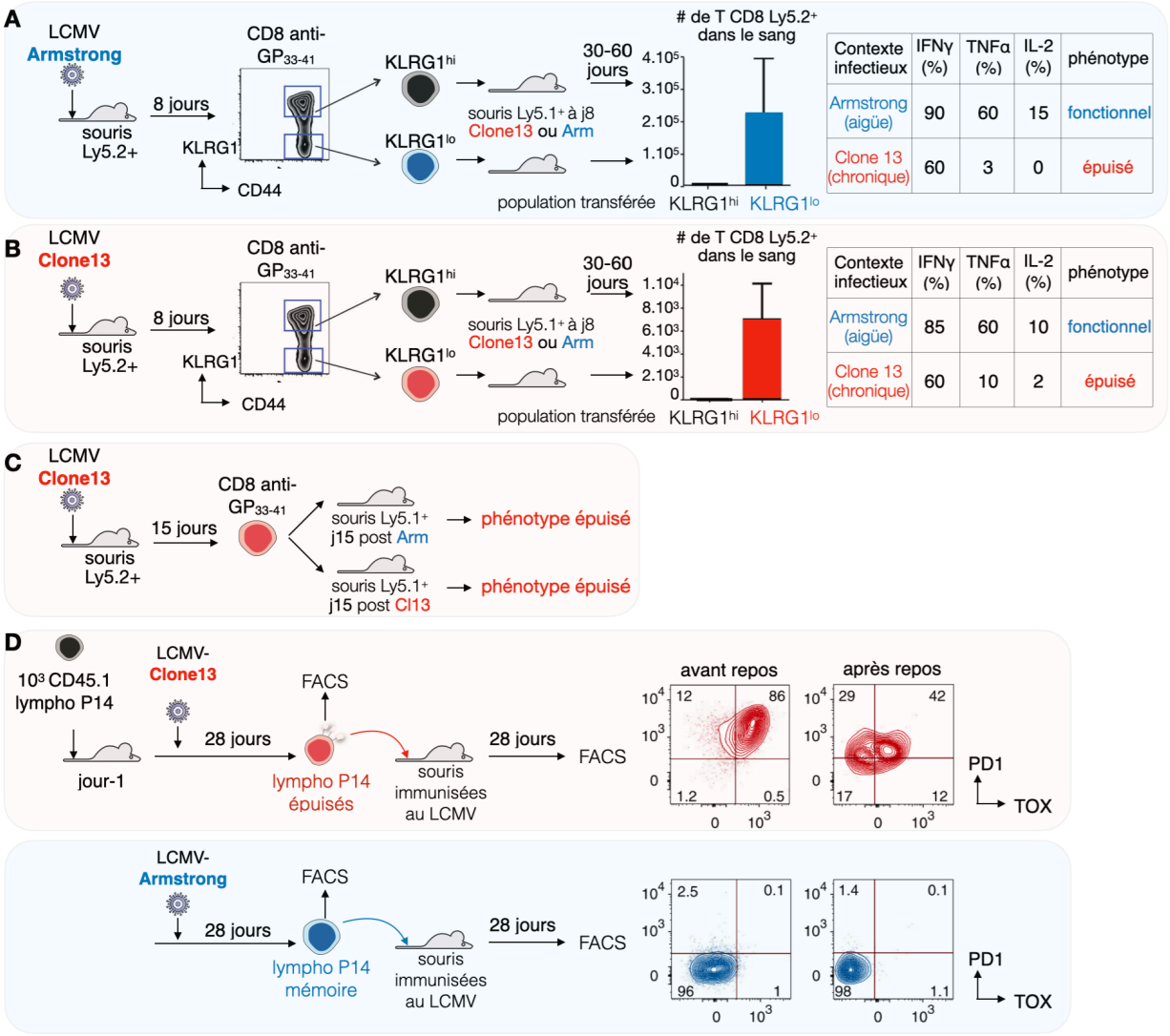


Figure 11. Les lymphocytes T mémoire précurseurs génèrent des lymphocytes T mémoire ou épuisés en fonction du contexte infectieux.

(A) Suite à une infection aigüe, les lymphocytes T CD8 anti-GP$_{33-41}$ issus de souris donneuses Ly5.2 sont séparément transférés sur la base de KLRG1 dans des souris receveuses Ly5.1. Les souris receveuses ont été préalablement infectées avec la souche LCMV Armstrong ou le clone 13. Qu'ils soient exposés à une infection aigüe ou chronique, seuls les lymphocytes T KLRG1^{lo} permettent la maintenance des lymphocytes T antiviraux. Ils adoptent un phénotype mémoire fonctionnel ou épuisé en fonction du contexte infectieux auquel ils font face. (B) Idem que A, mais les lymphocytes T CD8 anti-GP$_{33-41}$ proviennent de souris chroniquement infectées. Il est à noter que même s'ils ont été exposés pendant 8 jours à une infection chronique, leur transfert dans des souris exposées à une infection aigüe n'aboutit pas à leur épuisement. Ce point indique que l'épuisement n'est pas dû à un défaut de priming des lymphocytes T lors d'une infection chronique. (C) Si les lymphocytes T sont exposés plus longtemps à une infection chronique, alors ils deviennent épuisés même après transfert dans un contexte d'infection aigüe. (D) Même s'ils sont mis au repos pendant 28 jours, les lymphocytes T exposés à une infection chronique pendant 4 semaines maintiennent l'expression de PD-1 et de Tox.

Adapté de Abdel-Hakeem et al., 2021; Angelosanto et al., 2012; Brooks et al., 2006.

Récemment, les évènements de la réponse antivirale à une infection chronique ou aigüe au LCMV ont été disséqués par scRNA-seq de lymphocytes T P14 au jour 8 après transfert dans des souris congéniques exposées à la souche Armstrong ou au clone 13 (Fig 12a). L'analyse t-SNE des données de transcriptome a révélé que les lymphocytes T P14 exposés à une infection chronique forment une population de lymphocytes T KLRG1^{hi} CD39^{hi} TIM-3^{+}, qui ont un transcriptome et une fonctionnalité similaire aux lymphocytes T effecteurs générés lors d'une infection aigüe (Chen et al., 2019; Utzschneider et al., 2020). Toutefois, ces cellules ne persistent pas et sont largement perdues entre le jour 8 et 12 post infection (Fig 12b, c et d). À la place est trouvée une population de lymphocytes T KLRG1^{lo} PD-1^{+} qui dès le jour 5-8 après infection chronique, présente une capacité de production d'IFNγ et TNFα inférieure à la population effectrice : les lymphocytes T épuisés (Chen et al., 2019; Utzschneider et al., 2020). Ces lymphocytes T épuisés se composent d'une population KLRG1^{lo} CD39^{lo} Tcf-1^{+} et d'une population KLRG1^{lo} CD39^{hi} Tcf-1^{-}. Lorsque ces deux populations sont séparément transférées dans des souris congéniques chroniquement infectées, la population CD39^{lo} Tcf-1^{+} redonne des lymphocytes T CD39^{hi} Tcf-1^{-}. L'inverse n'a pas lieu (Fig 12e). Ceci indique que la différenciation des lymphocytes T épuisés se fait de manière hiérarchique (Fig 12f). En effet, deux populations majeures de lymphocytes T épuisés ont été identifiées : les lymphocytes T épuisés précurseurs et les lymphocytes T épuisés terminaux.

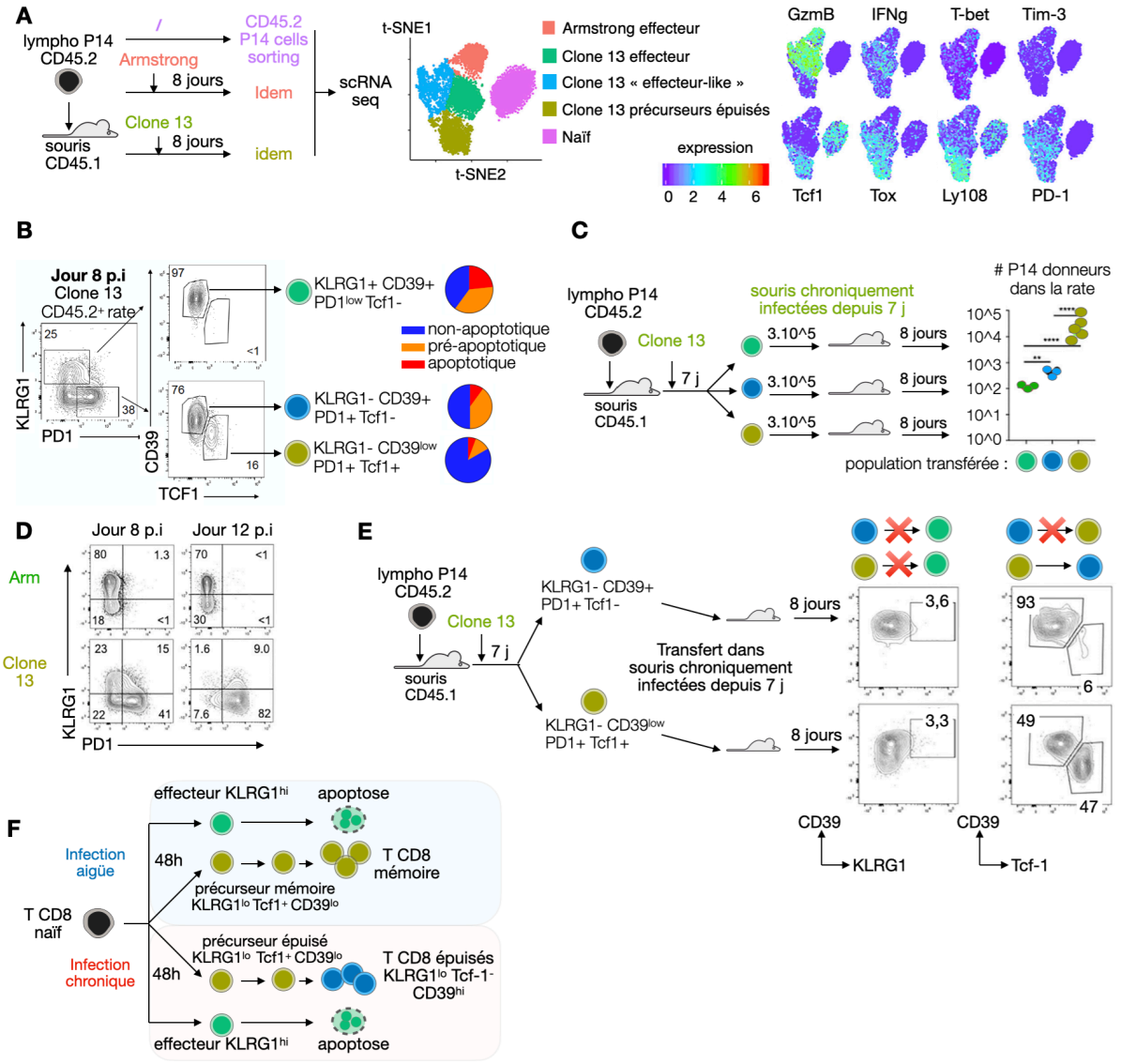


Figure 12. Hétérogénéité de la réponse immune des lymphocytes T CD8 lors d'une infection virale.

(A) Au jour 8 d'une infection aigüe, les lymphocytes T répondant à une infection aigüe sont majoritairement des lymphocytes T effecteurs. Au jour 8 d'une infection chronique coexistent plusieurs populations : une population de lymphocytes T effecteurs similaire à celle produite lors d'une infection aigüe (vert), une population de lymphocytes T épuisés précurseurs (moutarde), et une population de lymphocytes T « effecteur-like » (bleu) correspondant à la progéniture des lymphocytes T épuisés précurseurs. (B) Au jour 8 d'une infection chronique, les lymphocytes T effecteurs sont hautement apoptotiques. Les cellules épuisées précurseurs sont très faiblement apoptotiques. (C) et (D) Les lymphocytes T épuisés précurseurs persistent lors d'une infection chronique tandis que le nombre de lymphocytes T CD8 effecteurs décline. (E) Les lymphocytes T épuisés KLRG1^{lo} Tcf-1^{+} CD39^{lo} sont les précurseurs des lymphocytes T KLRG1^{lo} Tcf-1^{-} CD39^{hi} tandis qu'ils ne peuvent pas se différencier en lymphocytes T KLRG1^{hi} effecteurs. (F) Développement de la réponse immune hétérogène au LCMV lors d'une infection aigüe ou chronique.

Figures de Chen et al., 2019. Adapté de Chen et al., 2019; Utzschneider et al., 2020.

2.2.3 Les lymphocytes T épuisés précurseurs et terminaux

Les lymphocytes T épuisés se distinguent en deux populations majeures de cellules : les lymphocytes T épuisés précurseurs, décrits comme étant PD-1^{int} TIM-3^{-} $CXCR5^{+}$ $Ly108^{+}$, et les lymphocytes T épuisés terminaux, décrits comme étant PD-1^{high} TIM-3^{+} $CXCR5^{-}$ $Ly108^{-}$ (Blackburn et al., 2008; He et al., 2016; Im et al., 2016; Jin et al., 2010; Utzschneider et al., 2016a). Cette population précurseur $CXCR5^{+}$ est absente de souris répondant à une infection aigüe ou infectées avec 10 000x moins de LCMV clone 13 (He et al., 2016; Im et al., 2016).

Lorsque les populations de lymphocytes T épuisés précurseurs et terminaux sont isolées l'une de l'autre et séparément transférées dans des souris au même stade d'infection virale, seule la population précurseur prolifère, et surtout, elle redonne des cellules épuisées terminales tout en maintenant un réservoir de cellules épuisées précurseurs (Blackburn et al., 2008; Beltra et al., 2020; He et al., 2016; Im et al., 2016; Jin et al., 2010; Utzschneider, Charmoy, et al., 2016). De plus, lorsque ces populations épuisées précurseurs et terminales sont isolées de souris congéniques à jour 30 après infection puis transférées dans des souris non infectées, seule la population précurseur épuisée persiste, sans redonner de cellules épuisées terminales (Abdel-Hakeem et al., 2021). Ces données suggèrent que les lymphocytes T épuisés précurseurs forment un réservoir de cellules dotées de capacité d'auto-renouvellement et qui génèrent des lymphocytes T épuisés terminaux suite à leur activation.

L'analyse du transcriptome de la population précurseur épuisée $CXCR5^{+}$ a révélé que ces cellules ont des caractéristiques de lymphocytes T mémoire précurseurs $CD127^{+}$ $KLRG1^{lo}$ typiquement trouvés au jour 7 d'une infection aigüe. En l'occurrence, les précurseurs épuisés expriment CD127 ainsi que des facteurs de transcription essentiels à l'établissement d'un réservoir de lymphocytes T mémoire lors d'une infection aigüe, dont Tcf-1, Eomes, Bcl-6 et Id3 (Chen et al., 2019; Im et al., 2016; Utzschneider et al., 2016a). À l'inverse, la

population épuisée CXCR5$^-$ TIM-3$^+$ présente une signature transcriptionnelle évocatrice des lymphocytes T effecteurs terminaux trouvés lors d'une infection aigüe, et dont la persistance est limitée. En l'occurrence, cette population n'exprime pas les facteurs de transcription Tcf-1 et Id3, mais expriment des facteurs de transcription typiquement utilisés par des lymphocytes T effecteurs tels que Blimp1 et Id2 (Im et al., 2016; Utzschneider et al., 2016a). Enfin, un facteur de transcription communément exprimé par ces 2 populations est TOX (Chen et al., 2019; Khan et al., 2019; Utzchneider et al., 2020; Yao et al., 2019).

La population épuisée terminale exprime plus de granzyme B, perforine et FasL que la population épuisée précurseur dont elle provient. Son activité lytique *in vitro* est supérieure à celle des lymphocytes T épuisés précurseurs (Beltra et al., 2020; Im et al., 2016). Une autre étude a toutefois obtenu un résultat contraire, en montrant par un test de lyse en 5h *in vivo* que la population CXCR5$^+$ était plus apte que la population CXCR5$^-$ à lyser des cellules chargées avec un peptide viral et une sonde cellulaire (He et al., 2016). En revanche, plusieurs études montrent que la capacité de production de cytokines des lymphocytes T épuisés précurseurs est supérieure à celle des lymphocytes T épuisés terminaux (Beltra et al., 2020; He et al., 2016; Hudson et al., 2019; Im et al., 2016; Utzschneider et al., 2016a).

Lorsque les lymphocytes T épuisés précurseurs et terminaux sont isolés de souris au jour 8 d'une infection chronique pour être séparément transférés dans des souris et ré-exposés à une infection chronique, la virémie mesurée 3-5 jours plus tard est largement inférieure si ce sont les lymphocytes T épuisés précurseurs qui ont été transférés (Blackburn et al., 2008; He et al., 2016). Ceci découle probablement de leurs capacités supérieures de prolifération, survie, et de repeuplement continu du réservoir de lymphocytes T épuisés terminaux dont l'activité cytotoxique résiduelle permet de contenir le virus. Ainsi, les lymphocytes T épuisés précurseurs forment un réservoir de cellules avec des propriétés « memory-like » permettant leur auto-renouvellement. Suite à leur

activation, ces précurseurs redonnent des lymphocytes T épuisés terminaux dont les fonctions effectrices résiduelles permettent de contenir l'infection virale.

Le groupe de John Wherry a récemment rapporté que l'hétérogénéité des lymphocytes T épuisés est plus vaste qu'une simple population précurseur et terminale (Beltra et al., 2020) (Fig 13). Dès le jour 8 après infection avec le clone 13 du LCMV, les lymphocytes T antiviraux peuvent être séparés en 4 populations sur base de l'expression des protéines transmembranaires CD69 et Ly108 (Fig 13a et b). Les lymphocytes T précurseurs expriment Ly108, et se composent de 2 populations. L'une est $CD69^-$, quiescente et résidente dans les tissus lymphoïdes. L'autre est $CD69^+$, en cours de division cellulaire, et migre entre les tissus lymphoïdes et le reste de l'organisme par la circulation sanguine. Ces deux populations sont inter-convertibles, expriment Tcf-1, et leur différence est le reflet de leur localisation et de leur état d'activation (Beltra et al., 2020). Ces populations de lymphocytes T épuisés précurseurs peuvent à la fois s'auto-renouveler, et donner naissance à deux populations plus matures de lymphocytes T: les lymphocytes T épuisés intermédiaires, et les lymphocytes T épuisés terminaux (Fig 13c) (Beltra et al., 2020).

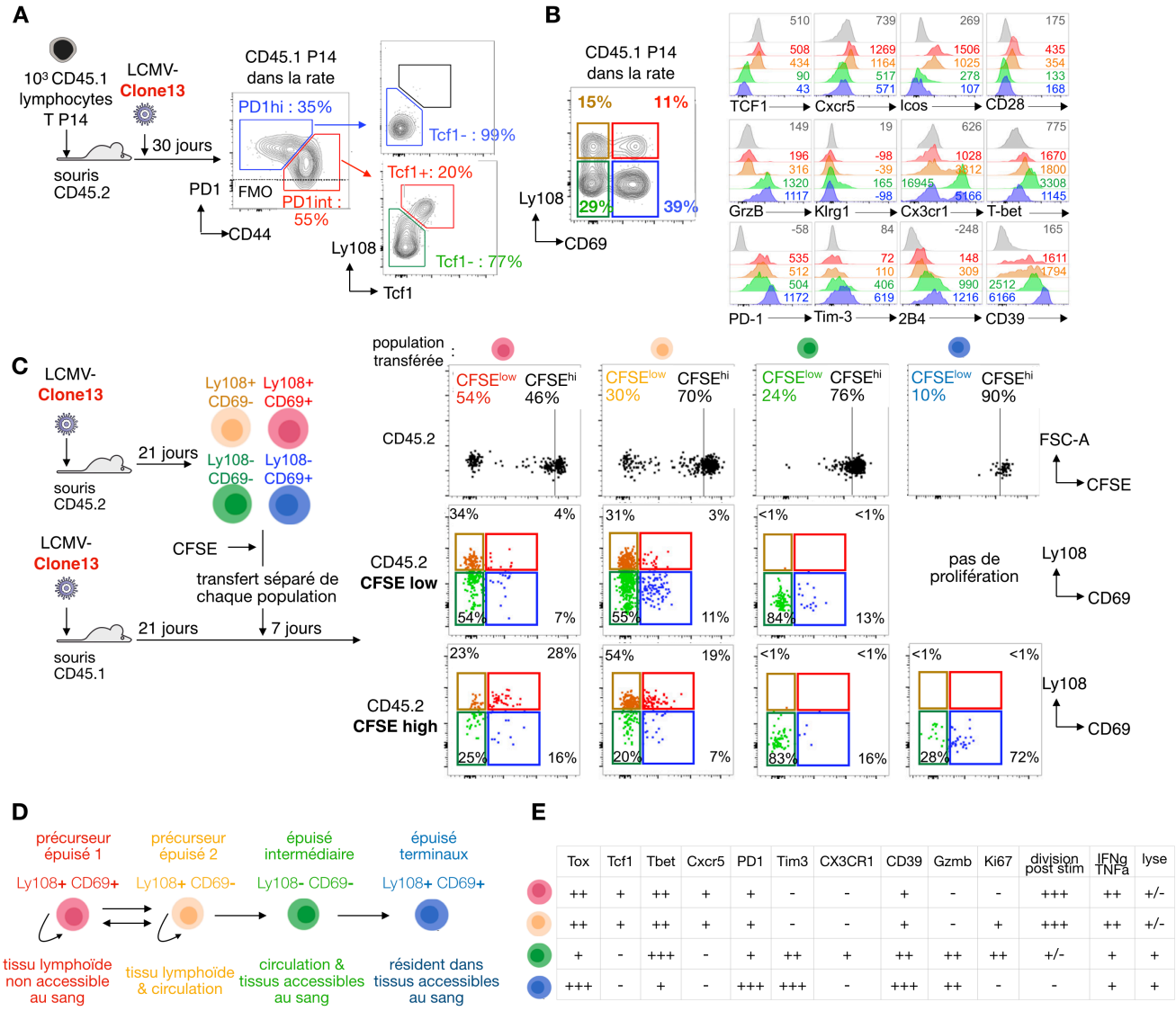


Figure 13. Hétérogénéité, ontogénie et propriétés des lymphocytes T épuisés.
(A) PD-1 fut le premier marqueur distinguant les lymphocytes T épuisés précurseurs (PD-1^{int}) et terminaux (PD-1^{hi}). Puis, le facteur de transcription Tcf-1 et le récepteur Ly108 ont été identifiés comme marqueurs des lymphocytes T épuisés précurseurs PD-1^{int}. Seule une portion des lymphocytes T PD-1^{int} exprime Tcf-1. Les lymphocytes T PD-1^{hi} n'expriment pas Tcf-1. (B) L'hétérogénéité des lymphocytes T épuisés a été capturée grâce à l'utilisation combinée de Ly108 (co-exprimé avec Tcf-1) et CD69. L'expression de divers marqueurs tels que Tcf-1, CXCR5, T-bet, PD-1, TIM-3 et GzmB au sein de chacune des populations a été mesurée par cytométrie de flux. Les lymphocytes T épuisés ***précurseurs*** *PD-1^{int} Ly108^{+} sont en* ***rouge*** *et* ***orange*** *tandis que les lymphocytes T épuisés* ***terminaux*** *PD-1^{hi} sont en* ***bleu****. Une population* ***épuisée intermédiaire*** *PD-1^{int} n'exprimant pas Tcf-1 mais exprimant abondamment T-bet est en* ***verte****. (C) Après 21 jours d'infection chronique, les 4 populations de lymphocytes T congéniques ont été triées sur la base de Ly108 et CD69 et chargées avec une sonde cellulaire (CFSE). Elles ont séparément été transférées dans des souris congéniques infectées. Après 7 jours, les 2 populations précurseurs Ly108^{+} (ligne CD45.2) ont proliféré et redonné des lymphocytes T Ly108^{-} (ligne CFSE low), tout en s'auto-renouvelant (ligne CFSE high). Les lymphocytes T Ly108^{-} (Tcf-1^{-}) prolifèrent peu et ne redonnent pas de lymphocytes T Ly108^{+}. (D) Ontogénie proposée des lymphocytes T épuisés, ainsi que leur localisation dans la souris lors d'une infection chronique. (E) Quelques marqueurs et propriétés de chacune des populations de lymphocytes T épuisés. Adapté de Beltra et al., 2020.*

L'existence de lymphocytes T épuisés intermédiaires avait déjà été suggéré par le groupe de Rafi Ahmed (Hudson et al., 2019). Leur travail a montré l'existence d'une population de lymphocytes T antiviraux Tcf-1$^-$ TIM-3$^+$ PD-1$^+$ qui expriment de manière spécifique CX3CR1 ainsi que d'autres molécules migratoires (Fig 13b). Au contraire, les lymphocytes T épuisés terminaux localisés dans les tissus infectés, n'expriment pas CX3CR1, et expriment plus abondamment les récepteurs PD-1, TIM-3 et LAG-3 (Beltra et al., 2020; Hudson et al., 2019). Lorsque les lymphocytes T épuisés intermédiaires sont isolés de souris chroniquement infectées, chargés avec une sonde cellulaire, puis adoptivement transférés dans des souris chroniquement infectées, ils peuvent partiellement proliférer et ce faisant, se différencient en lymphocytes T épuisés terminaux. Lorsque la même chose est réalisée avec des lymphocytes T épuisés terminaux, ceux-ci ne sont pas capables de se diviser (Beltra et al., 2020; Hudson et al., 2019).

Les lymphocytes T épuisés intermédiaires et terminaux ont un transcriptome s'apparentant à celui de lymphocyte T CD8 effecteurs. Mais diverses molécules effectrices sont plus exprimées au sein des lymphocytes T épuisés intermédiaires. Ceci est en accord avec l'expression abondante de T-bet et l'expression moindre de TOX dans les lymphocytes T épuisés intermédiaires (Beltra et al., 2020; Hudson et al., 2019). Les lymphocytes T épuisés terminaux expriment faiblement T-bet et abondamment TOX (Beltra et al., 2020; Hudson et al., 2019). Hudson et al ont rapporté que la capacité de production d'IFNγ des lymphocytes T épuisés intermédiaires était supérieure à celle des lymphocytes T épuisés terminaux, tandis que Beltra et al ont montré l'inverse (Beltra et al., 2020; Hudson et al., 2019). Leur activité lytique est comparable (Beltra et al., 2020).

En conclusion, nous avons vu dans cette partie que les lymphocytes T épuisés proviennent de la même population de cellules précurseurs mémoire Tcf-1^+ qui lors d'une infection aigüe, génère des lymphocytes T mémoire fonctionnels. Mais lors d'une infection chronique, ces lymphocytes T précurseurs deviennent épuisés et se différencient progressivement en lymphocytes T épuisés terminaux. Comment expliquer ce biais vers cette voie de différenciation ?

2.2.4 Facteurs de transcription clés à l'épuisement : le rôle de TOX

a) Approche pour identifier un facteur de transcription clé à l'épuisement

Des lymphocytes T P14 ont été transférés dans des souris et analysés par scRNA-seq aux jours 4.5 et 7 après infection aigüe ou chronique. La variabilité et complexité des données d'expression pour chaque gène par cellule a été visualisée par t-SNE. Au jour 4.5, les lymphocytes T P14 issus d'infections aigües et chroniques se confondent sur l'espace bidimensionnel crée par le t-SNE. Mais au jour 7, les lymphocytes T issus d'infections aigües et chroniques forment des populations à part, suggérant que des changements transcriptionnels ont eu lieu (Yao et al., 2019) (Fig 14a).

Lorsqu'un algorithme de clustering non supervisé est utilisé pour identifier des sous-populations homogènes sur la base de leur transcriptome, 4 clusters principaux sont identifiés au sein des lymphocytes T à jour 7. Deux clusters sont les lymphocytes T mémoire précurseurs et les lymphocytes T effecteurs issus d'infection aigüe. Les deux autres clusters sont les lymphocytes T épuisés précurseurs et les lymphocytes T épuisés terminaux issus d'infection chronique (Fig 14a et b). De manière intéressante, le cluster de lymphocytes T mémoire précurseurs contient également des cellules du jour 4.5 après infection aigüe et chronique, tandis qu'aucune cellule du jour 7 après infection chronique n'appartient à ce cluster (Yao et al., 2019) (Fig 14a). Ces données indiquent donc que dès le jour 4.5, des cellules précurseurs mémoire se forment dans les 2 types d'infection, mais leur transcriptome diverge par après.

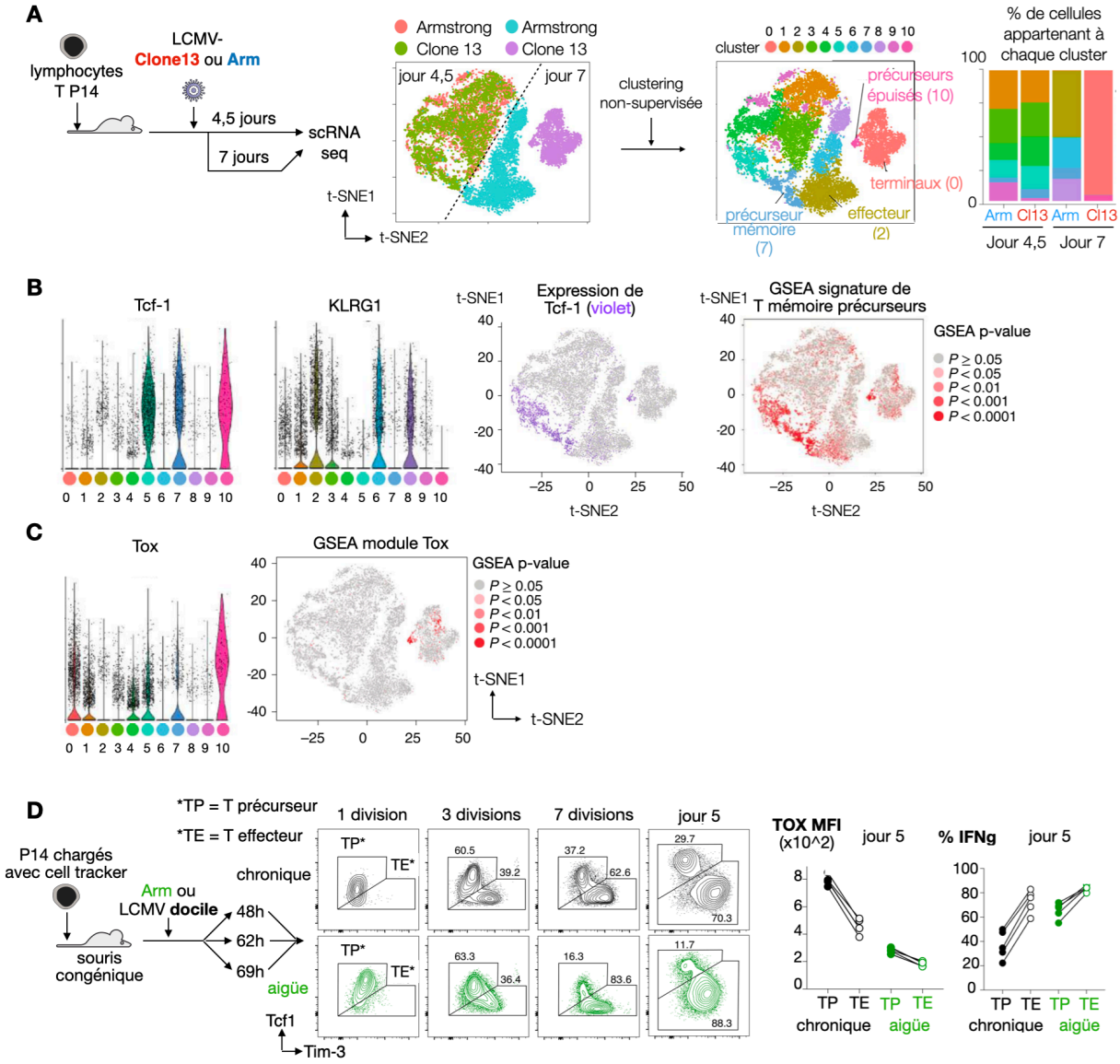


Figure 14. Identification des divergences transcriptionnelles au sein des lymphocytes T mémoire précurseurs exposés à une infection aigüe ou chronique.

(A) L'analyse par scRNA-seq de la réponse immune antivirale aux jours 4.5 et 7 après infection aigüe ou chronique montre que d'importants changements transcriptionnels ont lieu entre les jours 4.5 et 7. (B) Les lymphocytes T mémoire précurseurs issus d'infection aigüe (cluster 7) et d'infection chronique (cluster 10) expriment Tcf-1, n'expriment pas KLRG1, et possèdent une signature transcriptionnelle de lymphocytes T mémoire précurseurs (définie par Gene Set Enrichment Analysis). (C) Le facteur de transcription Tox est abondamment exprimé dans les lymphocytes T au jour 7 après infection chronique, et en particulier au sein des lymphocytes T précurseurs (cluster 10). L'ensemble des gènes connectés à Tox (module Tox) est enrichi au sein des lymphocytes T précurseurs issus d'infections chroniques. (D) Les lymphocytes T P14 répondant à une infection aigüe ou chronique se séparent en 2 populations dès la 3ème division cellulaire : les précurseurs (TP) et effecteurs (TE). Au jour 5 post infection, Tox est abondamment exprimé au sein des précurseurs. Les lymphocytes T effecteurs issus d'infection aigüe ou chronique ont la même capacité de production d'IFNγ, comme mesuré après restimulation in vitro.

Adapté de Yao et al., 2019 et de Utzschneider et al., 2020

En effet, bien que les précurseurs mémoire et les précurseurs épuisés à jour 7 partagent un nombre important de gènes communs dont Tcf-1, un module unique de 200 gènes est spécifiquement exprimé par les précurseurs épuisés (Yao et al., 2019) (Fig 14c). Au sein de ce module, la moitié sont des gènes auxquels le facteur de transcription TOX se lie au sein de lymphocytes T CD8 chroniquement activés par leur antigène (Page et al., 2018; Yao et al., 2019). Ces données, suggérant que TOX est surexprimé par les précurseurs épuisés, ont été confirmées par cytométrie en flux et montrent que déjà au jour 5, TOX est plus abondant au sein des précurseurs exposés à une infection chronique. Cette différence devient plus marquée au jour 7 (Yao et al., 2019). Similairement, lorsque des lymphocytes T P14 congéniques sont chargés avec une sonde cellulaire et transférés dans des souris exposées à une infection virale chronique ou aigüe, dès la 3ème génération de cellules se démarquent 2 populations : des lymphocytes T précurseurs Tcf-1^{+} TIM-3^{-}, et des lymphocytes T effecteurs Tcf-1^{-} TIM-3^{+}. Ces 2 populations émergent indépendamment du type d'infection. Toutefois, à la 7ème génération de cellules, qui correspond au jour 5 après infection, le facteur de transcription TOX est surexprimé par les cellules précurseurs Tcf-1^{+} exposées à une infection chronique (Utzschneider et al., 2020) (Fig 14d).

Ainsi, ces données ont permis de considérer le facteur de transcription TOX comme un candidat responsable de la divergence des lymphocytes T précurseurs mémoire lors d'une infection aigüe ou chronique.

b) Cinétique et mécanisme sous-jacent de l'expression de TOX

Dans un contexte d'infection aigüe avec la souche Armstrong ou lorsqu'une quantité moindre d'antigène GP_{33-41} est présente au cours d'une infection chronique, TOX est transitoirement exprimé. Son maxima est atteint au jour 6 après initiation de l'infection, avec 20% des lymphocytes T P14 qui expriment TOX.

Lors d'une infection chronique, 30% des lymphocytes T antiviraux expriment TOX au jour 4, et 80% au jour 6. TOX atteint son maxima au jour 15 avec 95% des lymphocytes acquérant l'expression de TOX (Alfei et al., 2019; Khan et al., 2019). Après 200 jours d'exposition à une infection chronique, 70% des lymphocytes T expriment encore TOX (Khan et al., 2019). Ainsi, TOX reste continuellement exprimé au cours d'une infection chronique et son expression est répandue au sein des lymphocytes T épuisés précurseurs et terminaux.

Cette expression soutenue de TOX est initialement dépendante de la signalisation émanant du TCR, et en particulier de la voie NFAT. Alors que 85% des lymphocytes T expriment TOX au jour 8 après infection chronique, seuls 20% expriment TOX si un inhibiteur de la calcineurine est administré entre les jours 3 à 7 de l'infection (Khan et al., 2019; Yao et al., 2019). En revanche, passé le jour 25 après infection chronique, l'administration de cet inhibiteur n'altère plus l'expression de TOX (Khan et al., 2019). Ces données suggèrent que la signalisation TCR menant à l'activation de NFAT est requise pour permettre l'induction de TOX mais que plus tard au cours de l'infection, le maintien de son expression est indépendant de NFAT. D'ailleurs, lorsque des lymphocytes T épuisés au jour 28 après infection chronique sont mis au repos 4 semaines dans des souris congéniques préalablement immunisées contre le LCMV, TOX demeure exprimé malgré l'absence d'antigène, tandis que des lymphocytes T mémoire issus d'infection aigüe n'expriment pas TOX (Abdel-Hakeem et al., 2021). Il est toutefois notable que l'expression mesurée après repos est 2x inférieure à celle mesurée avant repos. Cela peut être imputé à l'expression moindre de TOX par les précurseurs épuisés par rapport aux épuisés terminaux, ces derniers devenant minoritaires après 4 semaines de repos en raison de leur faible persistance en l'absence d'antigène (Abdel-Hakeem et al., 2021; Miller et al., 2019).

c) Quel est le rôle de TOX ?

L'analyse du transcriptome de lymphocytes T sur-exprimant TOX *in vitro* pendant 6 jours ou exposés à une infection aigüe pendant 30 jours a révélé que TOX induit l'acquisition d'une signature transcriptionnelle de lymphocytes T épuisés, tandis que les gènes de lymphocytes T mémoire sont moins exprimés (Khan et al., 2019). De plus, la surexpression de TOX au sein d'une lignée de fibroblastes pendant 48h suffit à induire partiellement l'acquisition de la signature transcriptionnelle de lymphocytes T épuisés. Ces fibroblastes sur-expriment par exemple les gènes encodant NFAT2, TIM-3, Nr4a2 et TOX2 (Khan et al., 2019). Ainsi, des lymphocytes T exposés à une infection aigüe n'adoptent pas un transcriptome de lymphocytes T mémoire lorsqu'ils sur-expriment TOX. À la place, TOX y installe le programme transcriptionnel de lymphocytes T exposés à une infection chronique. Ceci se retraduit-il par une atténuation des fonctions effectrices ?

Lorsque des souris sont infectées avec un mix de clone 13 et de son variant muté pour GP_{33-41} (variant V35A), l'abondance d'antigène GP_{33-41} en résultant est moindre, et ceci résulte en la différenciation des lymphocytes T P14 en cellules effectrices et mémoire fonctionnelles. Mais si ces lymphocytes T sont préalablement transduits pour sur-exprimer TOX avant d'être exposés à ce contexte infectieux pendant 21 jours, leur capacité de production d'IFNγ et TNFα est diminuée, l'expression de PD-1 augmentée, et celle de KLRG1 diminuée (Alfei et al., 2019). Des résultats identiques ont été obtenus *in vitro* ou à partir de lymphocytes T P14 exposés à une infection aigüe pendant 8 jours (Khan et al., 2019). Enfin, dans un contexte d'infection chronique, des lymphocytes T P14 sur-exprimant TOX et exposés pendant 7 jours au LCMV clone 13 ont un défaut de production d'IFNγ et TNFα exacerbé. Leur activité lytique demeure pareillement diminuée (Yao et al., 2019). Ainsi, ces résultats confirment que TOX biaise la

différenciation des lymphocytes T vers l'épuisement, en dépit de leur exposition à un contexte infectieux générant normalement des lymphocytes T mémoire.

À l'inverse de sa surexpression, l'impact de l'absence de TOX lors d'une infection chronique a également été analysé en utilisant des lymphocytes T P14 congéniques $Tox^{fl/fl}$ ou $Tox^{fl/fl}$ Cd4 Cre. L'analyse du transcriptome de ces cellules exposées à une infection chronique pendant 7 jours révèle que en l'absence de TOX, les lymphocytes T P14 ont un phénotype se rapprochant de celui de lymphocytes T effecteurs $KLRG1^{+}$ générés lors d'une infection aigüe (Khan et al., 2019; Yao et al., 2019). Des résultats similaires ont été obtenus avec des lymphocytes T P14 dans lesquels l'exon encodant le domaine de liaison de TOX à l'ADN est invalidé (ToxΔ) (Alfei et al., 2019). Les lymphocytes T P14 Tox KO ou ToxΔ produisent plus d'IFNγ et TNFα, expriment plus de granzyme B et FasL, leur expression des récepteurs inhibiteurs PD-1 et LAG-3 est atténuée, et la quantité de clone 13 détectée dans la rate au jour 7 est inférieure (Alfei et al., 2019; Khan et al., 2019; Yao et al., 2019). De manière importante, des lymphocytes T P14 Tox KO ou ToxΔ répondant à une infection aigüe se différencient sans problème en lymphocytes T effecteurs et mémoire fonctionnels, et leur transcriptome est faiblement impacté (Alfei et al., 2019; Khan et al., 2019).

Collectivement, l'ensemble de ces données montre que TOX est essentiel à l'installation du programme transcriptionnel de l'épuisement et empêche la survenue d'un programme transcriptionnel typique de lymphocyte T effecteurs ou mémoire. Son action requiert son domaine de liaison à l'ADN, et est spécifique à un contexte infectieux chronique. Comme préalablement évoqué, ce programme transcriptionnel est perçu comme une adaptation probable à une situation de persistance virale ou charge antigénique abondante afin d'éviter des dégâts immunopathologiques. À cet égard, les lymphocytes T P14 ToxΔ répondant à une infection chronique induisent au jour 11 des dégâts tissulaires supérieurs dans les

poumons et le foie, ce qui se retraduit par une perte de poids plus marquée des souris infectées (Alfei et al., 2019).

d) Cibler TOX pour contrer l'épuisement : une approche pertinente ?

Vu le rôle joué par TOX lors d'une infection chronique, le cibler pour prévenir la survenue de l'épuisement semble être une approche pertinente. Lorsque des lymphocytes T P14 congéniques $Tox^{fl/fl}$ ou $Tox^{fl/fl}$ Cd4 Cre sont co-transférés dans des souris et exposés 7 jours à une infection chronique, les 2 populations génèrent une réponse immune. Cependant, le KO de TOX empêche le développement des lymphocytes T épuisés précurseurs Tcf-1^+ et la génération subséquente des lymphocytes T épuisés terminaux TIM-3^+ (Khan et al., 2019; Yao et al., 2019). En conséquence, endéans 2 à 4 semaines d'infection, la proportion de lymphocytes T KO pour TOX est considérablement réduite, jusqu'à ce que ces cellules soient quasiment indétectables. Des résultats similaires ont été obtenus avec les lymphocytes T P14 ToxΔ. À 3 semaines d'infection, la quantité de lymphocytes T épuisés précurseurs est 80x inférieure et celle de leur progéniture épuisée terminale 60x inférieure (Alfei et al., 2019). TOX étant essentiel au développement et à la maintenance des lymphocytes T épuisés, le meilleur contrôle sur la virémie au jour 7 d'une infection chronique n'est que transitoire et une semaine plus tard, la virémie est similaire à celle mesurée dans les souris ayant reçu un transfert de lymphocytes T P14 normaux (Alfei et al., 2019). Cependant, dans un modèle murin de mélanome B16-GP33, le KO partiel de TOX en utilisant des lymphocytes T P14 $Tox^{fl/+}$ Cd4 Cre mène à un meilleur contrôle tumoral que si des lymphocytes T P14 normaux sont injectés (Khan et al., 2019).

Ainsi, TOX exerce un rôle ambivalent en étant d'une part essentiel au développement et à la persistance de lymphocytes T exposés à une infection chronique, et en restreignant d'autre part la fonction de ces cellules par le programme transcriptionnel qu'il instaure. Cette dualité rend TOX une cible

délicate et réduire partiellement son activité semble être pertinent. Il est toutefois notable que les approches décrites ci-dessus ont pour effet d'invalider TOX avant même que les lymphocytes T aient rencontré leur antigène. Or, dans un but curatif d'une pathologique chronique installée, les lymphocytes T épuisés seraient déjà formés sous l'influence de TOX. Que se passerait-il si TOX était ciblé à cet instant ?

e) Paysage épigénétique instauré par TOX

Bien qu'aucun élément de réponse ne peut être apporté quant à l'effet que produirait l'inhibition de TOX une fois des lymphocytes T épuisés formés, il est intéressant de noter que TOX est également responsable de l'installation d'un environnement épigénétique spécifique : celui de lymphocytes T épuisés. Or, comme mentionné en 2.2.1, le maintien d'un paysage épigénétique propre à celui de lymphocytes T épuisés ancre les lymphocytes T répondant à une infection chronique dans un état d'hypofonctionnement (Abdel-Hakeem et al., 2021). La question serait donc de savoir si cet environnement épigénétique perdurerait même en absence de l'activité de TOX.

L'impact que TOX exerce sur le remodelage de la chromatine a été évalué en comparant par ATAC-seq les régions de chromatine accessibles au sein de lymphocytes T P14 normaux ou KO pour TOX. Au jour 8 après infection chronique, 4000 régions sont différentiellement accessibles. Près de 40% des régions moins accessibles dans les lymphocytes T $Tox^{-/-}$ sont des régions exclusives aux lymphocytes T épuisés, et 20% des loci plus accessibles dans les lymphocytes T $Tox^{-/-}$ sont exclusifs aux lymphocytes T effecteurs répondant à une infection aigüe (Khan et al., 2019; Pauken et al., 2016). Sur son ensemble, le profil d'ATAC-seq de lymphocytes T effecteurs est enrichi au sein des lymphocytes T KO pour TOX, et le profil d'ATAC-seq de lymphocytes T épuisés est déplété lorsque TOX est absent. De plus, la surexpression de TOX *in vitro* pendant 6 jours au sein de lymphocytes T CD8 isolés de la rate suffit également à induire

l'ouverture de la chromatine de 344 régions dont la majorité sont typiquement trouvées au sein de lymphocytes T épuisés (Khan et al., 2019). En conclusion, TOX induit des évènements épigénétiques permettant l'accès ou la fermeture de régions de chromatine associées à la différenciation en lymphocytes T épuisés ou effecteurs, respectivement.

Cette force de remodelage de la chromatine exercée par TOX est probablement reliée à sa capacité à interagir avec des protéines architectes de la chromatine. En effet, l'immunoprécipitation de TOX suivie de l'analyse de ses partenaires par spectrométrie de masse a révélé que TOX interagit avec des protéines impliquées dans la fermeture de la chromatine, telles que DNMT1, LEO1, PAF1, SAP130 et SIN3A (Khan et al., 2019). À l'inverse, TOX interagit avec des protéines du complexe HBO1, lequel induit l'ouverture de la chromatine par l'acétylation des histones H3 et H4. Il a notamment été confirmé par western-blot du complexe immunoprécipité que TOX interagit avec l'acétyltransférase KAT7 du complexe HBO1 (Khan et al., 2019). L'ensemble de ces données a été obtenu au sein de la lignée EL4 de lymphome de type T. Toutefois, elles semblent applicables *in vivo*. En effet, les gènes identifiés par scRNA-seq comme étant co-exprimés avec TOX sont associés à l'histone H3 acétylé sur la lysine 27 ($H3K27^{Ac}$). De plus, l'ensemble des gènes auxquels TOX a été rapporté se lier (Page et al., 2018) sont également plus porteurs de cette modification épigénétique (Yao et al., 2019).

f) Conclusion sur TOX

Lors d'une réponse immune face à un antigène viral, un réservoir de lymphocytes T mémoire précurseurs $KLRG1^{lo}$ et un réservoir de lymphocytes T effecteurs $KLRG1^{hi}$ se forme. Suite à la phase de contraction des lymphocytes T effecteurs, une population de lymphocytes T mémoire persiste. À leur réactivation, les lymphocytes T mémoire sont rapidement en mesurer de proliférer et d'utiliser diverses fonctions effectrices.

Lors d'une infection chronique, les lymphocytes T mémoire précurseurs KLRG1^{lo} activés par leur antigène acquièrent l'expression de TOX suite à l'action du facteur de transcription NFAT. L'expression de TOX conduit à l'ouverture et à la fermeture de régions de chromatine permettant l'acquisition d'un paysage épigénétique spécifique aux lymphocytes T épuisés. Ce remaniement de la chromatine est rendu possible par des protéines que TOX recrute aux loci qu'il lie, telles que l'histone acétyltransférase KAT7.

De plus, TOX altère le transcriptome des lymphocytes T précurseurs KLRG1^{lo}. Il empêche l'acquisition d'un transcriptome de lymphocytes T effecteurs et mémoire, et installe un transcriptome de lymphocytes T épuisés qui permet de favoriser la persistance de lymphocytes T avec des fonctions effectrices amoindries.

Ces évènements de remodelage de la chromatine et du transcriptome ont lieu au sein des lymphocytes T « mémoire précurseurs » KLRG1^{lo}. Ces cellules ont un phénotype « pseudo-mémoire », car les changements induits par TOX conditionnent ces cellules à se différencier en lymphocytes T épuisés terminaux et non en lymphocytes T mémoire fonctionnels suite à leur activation par leur antigène.

2.2.5 Facteurs de transcription clé à l'épuisement : Tcf-1 et autres facteurs

a) Tcf-1

Bien que TOX soit essentiel au développement et maintien des lymphocytes T épuisés, d'autres facteurs de transcription exercent un rôle important. Le facteur de transcription Tcf-1, dont l'expression au sein des lymphocytes T épuisés est restreinte au réservoir de cellules précurseurs, n'est pas qu'un simple marqueur de cette population. Lorsque des lymphocytes T KO pour Tcf-1 sont transférés dans des souris congéniques infectées avec le clone 13, leur expansion aboutit 8-10 jours plus tard à un nombre similaire de lymphocytes T que leurs homologues normaux. Cependant, à partir du jour 13-15, la quantité de lymphocytes T KO

pour Tcf-1 décline progressivement, contrairement aux lymphocytes exprimant Tcf-1 (Chen et al., 2019; Im et al., 2016; Utzschneider et al., 2016a). De plus, lorsque les lymphocytes T KO pour Tcf-1 issus d'infection chronique sont transférés dans des souris congéniques pour être rechallengés par une infection aigüe, leur expansion est diminuée (Utzschneider et al., 2016a). Comment expliquer ces observations ?

Wu et al ont analysé l'impact du KO et de la surexpression de Tcf-1 au sein de lymphocytes T P14 exposés pendant 7 jours à une infection chronique. Leur transcriptome a été comparé à celui des lymphocytes T épuisés précurseurs TIM-3^- et terminaux TIM-3^+. Lorsque Tcf-1 est absent, les lymphocytes T P14 ont un transcriptome enrichi en gènes de lymphocytes T épuisés terminaux TIM-3^+. À l'inverse, lorsque Tcf-1 est sur-exprimé, 1es lymphocytes T P14 ont un transcriptome enrichi en gènes de lymphocytes T épuisés précurseurs TIM-3^- (Wu et al., 2016). Ces données suggèrent que lors d'une infection chronique, Tcf-1 favorise la mise en place d'un transcriptome de lymphocytes T épuisés précurseurs et réprime la mise en place d'un transcriptome effecteur terminal. Ces observations ont été confirmées par cytométrie de flux. Au jour 8 d'une infection chronique, la fréquence de lymphocytes T P14 KO pour Tcf-1 exprimant les marqueurs de cellules effectrices terminales TIM-3, CD39 et KLRG1 est augmentée, tandis que forcer l'expression de Tcf-1 par transduction rétrovirale diminue la proportion de cellules TIM-3^+ $CD39^+$ $KLRG1^+$ (Chen et al., 2019; T. Wu et al., 2016).

Collectivement, ces données suggèrent que Tcf-1 réprime la différenciation effectrice des lymphocytes T répondant à une infection chronique, au profit de la mise en place d'un phénotype « précurseur mémoire ». Ce rôle de Tcf-1 lors d'une infection chronique est similaire à celui qu'il joue lors d'une infection aigüe, pendant laquelle Tcf-1 est essentiel à la formation des lymphocytes T précurseurs mémoire (Danilo et al., 2018; Jeannet et al., 2010; Zhou et al., 2010). Mais comme

nous l'avons vu, lors d'une infection chronique, ces lymphocytes T précurseurs mémoire subissent d'importants remaniements transcriptionnels et épigénétiques sous l'influence de TOX, faisant d'eux des lymphocytes T précurseurs épuisés.

Divers circuits transcriptionnels dépendant ou non de Tcf-1 participent à la formation de lymphocytes T mémoire précurseurs lors d'une infection aigüe. Ces circuits ont également été rapporté comme essentiel à la formation des lymphocytes T épuisés précurseurs, comme nous allons le voir brièvement ci-dessous.

b) Rôles de Eomes et T-bet

Eomes et T-bet sont deux facteurs de transcription exerçant des rôles redondants pour l'acquisition et le maintien des fonctions effectrices des lymphocytes T CD8 (Pearce et al., 2003; Sullivan et al., 2003). Toutefois, lors d'une infection aigüe, ils exercent des rôles distincts lors de la différenciation des lymphocytes T CD8. Eomes est impliqué dans la génération de lymphocytes T mémoire (Banerjee et al., 2010; Intlekofer et al., 2005; Rao et al., 2010). À l'inverse, T-bet favorise la différenciation effectrice terminale des lymphocytes T CD8 (Banerjee et al., 2010; Intlekofer et al., 2005; Rao et al., 2010), et ce rôle est notamment assuré en conjonction avec le facteur de transcription Blimp1 (Xin et al., 2016).

Lors d'une infection chronique, Tcf-1 favorise l'expression du facteur de transcription Eomes (Chen et al., 2019; Im et al., 2016). Son expression est maintenue tout au long de la maturation des lymphocytes T épuisés du stade précurseur au stade terminal (Beltra et al., 2020). Lorsque Eomes est invalidé au jour 9 d'une infection chronique par un système Lox-Cre^{ERT2} inductible, les lymphocytes T P14 ayant perdu l'expression de Eomes sont indétectables (Chen et al., 2019). Ainsi, Eomes est essentiel au maintien des lymphocytes T épuisés.

Tcf-1 et T-bet ont quant à eux des rôles antagonistes lors du développement des lymphocytes T épuisés. La conversion du stade épuisé précurseur Tcf-1$^+$ CXCR5$^+$ au stade épuisé intermédiaire Tcf-1$^-$ CX3CR1$^+$ s'accompagne d'une

augmentation de l'expression de T-bet (Beltra et al., 2020; Hudson et al., 2019). De manière concordante avec le rôle de T-bet lors d'une infection aigüe, les lymphocytes T épuisés intermédiaires ont un transcriptome enrichi en gènes de lymphocytes T effecteurs (Beltra et al., 2020; Hudson et al., 2019). Au jour 8-15 d'une infection chronique, les lymphocytes T P14 KO pour T-bet se différencient préférentiellement en lymphocytes T épuisés précurseurs. À l'inverse, des lymphocytes T P14 sur-exprimant T-bet se différencient plutôt en lymphocytes T épuisés intermédiaires (Beltra et al., 2020).

La surexpression de T-bet réduit également la proportion de lymphocytes T épuisés terminaux, suggérant qu'en plus de permettre la différenciation du stade précurseur au stade intermédiaire, T-bet stabilise le stade épuisé intermédiaire (Beltra et al., 2020). En accord, lors de la conversion du stade épuisé intermédiaire au stade épuisé terminal, l'expression de T-bet décline, tandis que celle de TOX atteint son maxima (Beltra et al., 2020). De plus, lorsque des lymphocytes T P14 $Tox^{+/-}$ sont transférés, les lymphocytes T se différencient plutôt en cellules épuisées intermédiaires qu'en cellules épuisées terminales (Beltra et al., 2020). Ainsi, T-bet favorise la conversion du stade épuisé précurseur au stade épuisé intermédiaire, et stabilise ce stade de différenciation, à moins que l'expression soutenue de TOX ne conduise à leur différenciation terminale.

c) Autres facteurs de transcription

Le développement des lymphocytes T épuisés est également influencé par d'autres axes transcriptionnels que ceux décrits jusqu'à présent. En particulier, plusieurs couples de facteurs de transcription exercent des actions antagonistes favorisant la différenciation des lymphocytes T en cellules effectrices ou cellules épuisées. Par exemple, BATF et Bach2, Bcl-6 et Blimp-1, Id2 et Id3. Plus d'informations à l'égard du rôle de ces facteurs de transcription sont disponibles ailleurs (Kallies et al., 2020).

d) Un modèle du développement des lymphocytes T épuisés

Nous avons vu jusqu'à présent l'ontogénie des lymphocytes T épuisés et certains facteurs de transcription impliqués dans ce processus. Le modèle de développement suivant pourrait résumer l'état de l'art sur ce sujet (Figure 15).

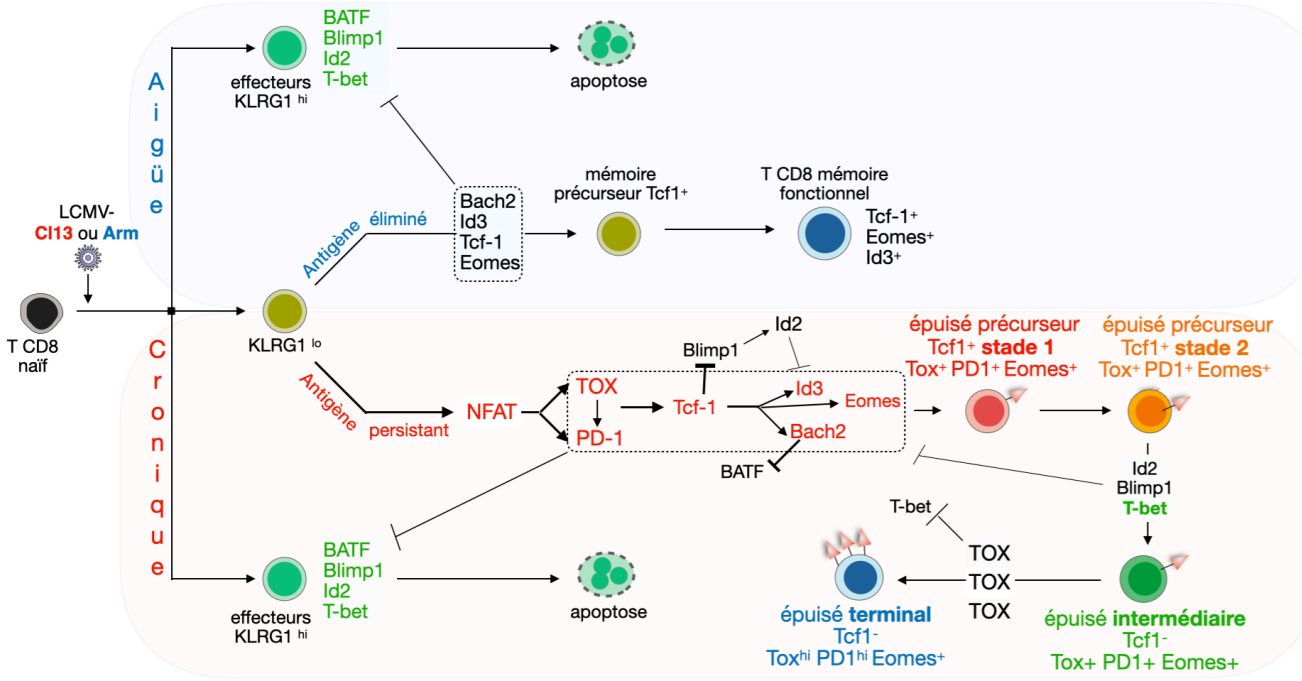


Figure 15. Un modèle de développement des lymphocytes T épuisés.
Tcf-1, Id3, Eomes et Bach2 sont essentiels à la formation de lymphocytes T mémoire précurseurs. L'activation répétée de NFAT conduit à l'expression soutenue de TOX et PD-1. Le facteur de transcription TOX conduit alors les lymphocytes T mémoire précurseurs à devenir des lymphocytes T épuisés précurseurs. Le facteur de transcription Tcf-1 régule les axes transcriptionnels Bcl-6/Blimp-1 et E2A-Id3/Id3. Le facteur de transcription Bach2 participe également à la différenciation en lymphocytes T épuisés précurseurs, en restreignant notamment l'action du facteur de transcription BATF. Enfin, Eomes participe au maintien des lymphocytes T épuisés. Lors de leur différenciation en lymphocytes T épuisés intermédiaires, les facteurs de transcription T-bet, Blimp-1 et Id2 répriment le circuit transcriptionnel de Tcf-1 et Id3. La conversion du stade épuisé intermédiaire au stade épuisé terminal s'accompagne de l'augmentation de l'expression de TOX et de la diminution de l'expression de T-bet.

L'activation de NFAT au sein des lymphocytes T KLRG1^{lo} lors d'une infection chronique conduit à l'expression de TOX et PD-1. L'antigène persistant, l'expression de TOX demeure soutenue. TOX peut lui-même réguler l'expression de PD-1. La chromatine et le transcriptome des lymphocytes T KLRG1^{lo} sont

remaniés sous l'influence de TOX, ce qui les conduit à devenir des précurseurs de lymphocytes T épuisés.

L'expression de Tcf-1 pourrait être régulée par l'action conjointe de TOX et PD-1. Le gène encodant Tcf-1 fait partie des gènes auxquels TOX se lie, et sans TOX, l'accès au locus de Tcf-1 est moindre (Alfei et al., 2019; Khan et al., 2019; Page et al., 2018). Lorsque TOX est absent de lymphocytes T P14 au jour 8 d'une infection chronique, Tcf-1 n'est pas exprimé, et la persistance des lymphocytes T épuisés est drastiquement réduite (Alfei et al., 2019; Khan et al., 2019; Yao et al., 2019). De même, lorsque des lymphocytes T P14 congéniques PD-$1^{-/-}$ sont cotransférés avec des lymphocytes T P14 normaux dans des souris et exposées à une infection chronique pendant 8 jours, la proportion de lymphocytes T PD-$1^{-/-}$ exprimant Tcf-1 est 3x inférieure. À la place, ces cellules expriment les marqueurs de lymphocytes T effecteurs terminaux KLRG1, CD39 et TIM-3 (Chen et al., 2019).

Les études décrivant le phénomène d'épuisement et le développement des lymphocytes T épuisés proviennent du modèle LCMV d'infection chronique avec le clone 13. Mais est-ce un phénomène propre à ce système expérimental, ou trouve-t-on également des lymphocytes T épuisés dans d'autres pathologies chroniques ? Cette question s'est légitimement posée sous couvert d'un parallèle évident entre infection chronique et cancer : dans ces deux situations, l'antigène persiste.

2.3 Les lymphocytes T épuisés existent-ils dans le cancer ?

2.3.1 Chez la souris

a) Les TILs forment aussi des lymphocytes épuisés précurseurs et terminaux

Dans le modèle murin de mélanome B16.F10, 10 à 20 jours après implantation de la tumeur, les TILs $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ se divisent en une population minoritaire $Tcf\text{-}1^+$ $Ly108^+$ $TIM\text{-}3^-$ et une population majoritaire $Tcf\text{-}1^-$ $Ly108^-$ $TIM\text{-}3^+$. Le

transcriptome de ces populations est, respectivement, proche de celui de leurs homologues épuisés précurseurs et terminaux trouvés dans le modèle LCMV d'infection chronique (Miller et al., 2019).

Outre leur transcriptome, leur similitude fonctionnelle avec leurs homologues trouvés dans le modèle LCMV a également été testée. Pour ce faire, un modèle de tumeur B16 exprimant l'ovalbumine (B16-OVA) a été employé. La réponse anti-OVA est initiée 3-5 jours après implantation de la tumeur par l'administration de cellules B16-OVA sécrétant du GM-CSF. Au jour 20, les populations de TILs CD8 anti-OVA Ly108^{+} TIM-3^{-} et Ly108^{-} TIM-3^{+} sont isolées puis séparément transférées dans des souris congéniques porteuses de tumeur B16 exprimant OVA ou non. Au jour 16 après transfert, les TILs Ly108^{-} TIM-3^{+} sont détectés et ont conservé leur phénotype. Lorsque ce sont les TILs Ly108^{+} TIM-3^{-} qui sont transférés, ils sont également détectés 16 jours plus tard, et ont redonné des cellules Ly108^{-} TIM-3^{+}. En revanche, la progéniture Ly108^{-} TIM-3^{+} n'est pas détectée lorsque les TILs Ly108^{+} TIM-3^{-} sont transférés dans des tumeurs ne présentant pas l'antigène OVA. Ces résultats indiquent que de façon similaire au modèle LCMV, la population de TILs Ly108^{+} TIM-3^{-} a un rôle « précurseur épuisé ». Suite à l'activation de leur TCR, ces cellules se différencient en lymphocytes T « épuisés terminaux » Ly108^{-} TIM-3^{+} (Miller et al., 2019).

Cette population épuisée précurseur exprime peu de granzyme B et est faiblement cytolytique, tandis que la population épuisée terminale à laquelle elle donne naissance exprime granzyme B et exerce une activité lytique supérieure *in vitro*. Lorsque ces populations sont séparément transférées dans des souris porteuses de tumeur B16-OVA, un meilleur contrôle tumoral est exercé par les lymphocytes T épuisés précurseurs. Ceci découle de leurs capacités de prolifération, survie, et de repeuplement continu du réservoir de lymphocytes T épuisés terminaux, lesquels contiennent la croissance tumorale grâce à leur activité cytotoxique résiduelle (Miller et al., 2019).

Des données similaires ont été obtenues dans un modèle murin de mélanome modifié pour présenter l'antigène GP_{33-41} du LCMV. Les lymphocytes T congéniques P14 ont été adoptivement transférés un jour avant implantation de la tumeur, et au jour 14, l'administration du peptide GP_{33-41} avec un adjuvant induit une réponse anti-tumorale. Dans ce modèle, les TILs P14 se distinguent aussi en une population précurseur Tcf-1^+ granzyme B^- et une population Tcf-1^- granzyme B^+. Lorsque des souris transgéniques P14 exprimant le récepteur à la toxine diphtérique sous contrôle de Tcf-1 reçoivent cette toxine, les TILs P14 Tcf-1^+ sont éliminés. Par conséquent, la population de TILs Tcf-1^- granzyme B^+ décline également, et la croissance tumorale n'est plus contrôlée (Siddiqui et al., 2019).

b) Les TILs expriment également le facteur de transcription TOX

En plus d'exister sous forme de deux populations analogues à celles trouvées lors d'infection chronique, les TILs analysés dans divers modèles tumoraux expriment également le facteur de transcription TOX. Le niveau mesuré est comparable à celui trouvé au sein des lymphocytes T antiviraux exposés à une infection chronique et l'abondance de PD-1 est étroitement corrélée à l'abondance de TOX (Khan et al., 2019; Scott et al., 2019).

Lorsque des lymphocytes T P14 sont adoptivement transférés dans des souris implantées en sous-cutanée avec la lignée de mélanome B16.F10 modifiée pour présenter l'antigène GP_{33-41}, 80% des TILs P14 coexpriment TOX et PD-1, et leur capacité à produire de l'IFNγ est largement amoindrie par rapport aux TILs P14 n'exprimant pas TOX (Khan et al., 2019). L'expression de TOX, corrélée à celle de PD-1, est aussi mesurée dans 80% des TILs dans le carcinome du colon CT26 (Khan et al., 2019). Dans le modèle B16.F10, le transfert adoptif de lymphocytes T exprimant un TCR transgénique dirigé contre l'antigène tumoral TRP2 ou contre gp100 aboutit 15 jours plus tard à l'expression de TOX et PD-1 (Scott et al., 2019). Comme dans le modèle LCMV, l'expression de TOX découle de l'activité de NFAT. En effet, l'administration d'un inhibiteur de calcineurine du

jour 2 à 9 après exposition à la tumeur atténue l'expression de TOX et PD-1 par les TILs anti-tumoraux (Scott et al., 2019).

c) La persistance antigénique mène à l'expression de TOX et à l'épuisement

Le rôle de TOX au sein des TILs a été examiné en détail dans un modèle de carcinome hépatocellulaire spontané induit par l'oncogène SV40 Tag, lequel génère également un peptide antigénique, Tag $_{206-215}$ (Scott et al., 2019). Les souris cancéreuses sont injectées en intrapéritonéal avec la bactérie recombinante *L.Monocytogenes* exprimant les peptides antigéniques $Tag_{206-215}$ et $OVA_{257-264}$. L'administration de la bactérie en intraveineuse donne lieu à une infection aigüe et se localise dans le foie 2h après injection (Brocksted et al., 2004). Lorsque des lymphocytes CD8 congéniques TCR_{Tag} sont transférés avec des lymphocytes CD8 TCR_{OVA}, ces deux populations infiltrent de manière équivalente la tumeur endéans 3-4 semaines et sont activés par leurs antigènes respectifs, comme indiqué par l'expression de CD44 et Ki67. Pourtant, seuls les lymphocytes T anti-tumoraux expriment le facteur de transcription TOX, les récepteurs inhibiteurs PD-1, LAG-3 et TIM-3, et perdent leur capacité à produire IFNγ, TNFα, et à dégranuler (Scott et al., 2019). L'analyse RNA-seq et ATAC-seq de ces deux populations isolées de la tumeur révèlent 2347 gènes différentiellement exprimés et 19 000 zones de chromatine différentiellement accessibles et confirme que les lymphocytes anti-tumeur TCR_{Tag} ont une signature transcriptionnelle proche de celle des lymphocytes T épuisés du modèle LCMV (Scott et al., 2019). Ainsi, entre deux populations de lymphocytes T exposés à un antigène au sein d'un même environnement, seule la population exposée à un antigène persistant acquiert l'expression de TOX et un phénotype épuisé. Est-ce dû à TOX ?

d) Le facteur de transcription TOX conduit à l'épuisement des TILs

Le rôle de TOX a été étudié dans le modèle de tumeur décrit ci-dessus. Lorsque sont co-transférés des lymphocytes CD8 congéniques TCR_{Tag} ou TCR_{Tag} $Tox^{fl/fl}$ Lck-Cre, les 2 populations expriment 7-10 jours plus tard les marqueurs

d'activation CD44, CD69, CD25 et Ki67 à des niveaux similaires. Mais l'analyse par RNA-seq et ATAC-seq de ces 2 populations révèle près de 700 gènes différentiellement exprimés et 12 000 régions de chromatine différentiellement accessibles. De nombreux gènes et leurs loci correspondant qui sont affectés par l'absence de TOX sont spécifiques à la signature transcriptionnelle de lymphocytes T épuisés du modèle LCMV. L'analyse par cytométrie de flux des TILs TCR_{Tag} TOX KO au $10^{ème}$ jour après exposition à la tumeur montre qu'ils expriment les récepteurs PD-1, LAG-3 et 2B4 à un niveau similaire à celui de lymphocytes T naïfs (Scott et al., 2019).

À l'inverse, la surexpression de TOX *in vitro* pendant 6 jours induit l'expression différentielle de 850 gènes, dont nombre d'entre eux sont exprimés par les lymphocytes T épuisés dans le modèle LCMV. Parmi ces gènes, les lymphocytes T surexprimant TOX expriment plus abondamment les récepteurs PD-1, LAG-3 et 2B4 (Scott et al., 2019). De façon similaire au modèle LCMV, TOX participe à la régulation de nombreux gènes trouvés au sein de lymphocytes T épuisés tels que des récepteurs inhibiteurs, et a un impact fort sur le remodelage de la chromatine.

Dans le modèle LCMV, le KO de TOX améliore la fonctionnalité des lymphocytes T épuisés. Ceci n'est en revanche pas observé dans le modèle tumoral, puisque les TILs TCR_{Tag} KO pour TOX ne récupèrent pas leurs capacités de production de cytokines, de dégranulation et de lyse (Scott et al., 2019).

Pourtant, d'autres études ont montré que diminuer l'expression de TOX était bénéficiaire dans les TILs. En effet, le KO partiel de TOX est plus bénéfique que son KO complet pour le contrôle tumoral dans un modèle de carcinome hépatocellulaire sous-cutané (Wang et al., 2019). Ces résultats sont en accord avec une autre étude dans laquelle l'expression de TOX est partiellement réprimée par transduction de shRNA dans des « CAR T cells » anti-hCD19 dirigés contre la tumeur B16.F10 exprimant la protéine CD19 humaine (Seo et al., 2019). Dans ce

modèle, les CAR T cells anti-hCD19 exposés pendant 8-12 jours à la tumeur co-expriment TOX, TOX-2, PD-1 et LAG-3 sous l'influence de NFAT. Des CAR T cells KO pour TOX-2 contrôlent mieux la tumeur que leurs homologues normaux. Similairement, des CAR T cells dont l'activité de TOX est réduite par des shRNA contrôlent mieux la tumeur. L'inhibition combinée de TOX et TOX-2 contribuent à un effet synergique aboutissant à un contrôle tumoral encore supérieur (Seo et al., 2019). Cet effet est associé à une diminution de l'expression des récepteurs PD-1, TIM-3 et LAG-3 dans les CAR T cells infiltrés au site tumoral. Aussi, leur activité lytique et la production des cytokines IFNγ et TNFα est supérieure aux CAR T cells KO pour TOX-2 (Seo et al., 2019). Ainsi, comme il a été observé dans le modèle LCMV, le KO partiel de TOX est bénéficiaire à l'activité des TILs face à la tumeur.

e) TOX est nécessaire à la persistance des TILs au site tumoral

Deux semaines après leur transfert, les lymphocytes T TCR_{Tag} KO pour TOX sont en quantité moindre que leurs homologues normaux, indiquant que TOX est important pour le développement et la persistance des lymphocytes T épuisés. Cet effet n'est pas observé lors d'une exposition à une infection aigüe avec *L.Monocytogenes* exprimant l'antigène Tag, indiquant que l'absence de TOX n'affecte pas la différenciation en lymphocytes T effecteurs et mémoire (Scott et al., 2019). Ainsi, comme dans le modèle LCMV, TOX est essentiel au maintien des TILs épuisés.

Dans le modèle LCMV, TOX est nécessaire à l'expression de Tcf-1, et Tcf-1 est nécessaire à l'homéostasie des lymphocytes T épuisés (Alfei et al., 2019; Khan et al., 2019; Utzschneider, Chamoy, et al., 2016; Yao et al., 2019). En opposition avec ces données, les lymphocytes TCR_{Tag} KO pour TOX sur-expriment Tcf-1 au jour 8-9 après transfert dans des souris cancéreuses (Scott et al., 2019). Malgré cette surexpression de Tcf-1, les lymphocytes T TCR_{Tag} KO pour TOX ont une persistance limitée dans la tumeur. Cette faible persistance des TILs TCR_{Tag} KO

pour TOX est associée à une mortalité accrue de ces cellules au site tumoral. Au jour 7-10 après infiltration dans la tumeur, les lymphocytes TCR_{Tag} KO pour TOX expriment plus abondamment les formes actives des caspases-3 et -7, sont plus fortement marqués avec l'annexine V, et ont un transcriptome enrichi en gènes apoptotiques (Scott et al., 2019). Un enrichissement en gènes apoptotiques a également été observé dans le modèle LCMV en l'absence de TOX (Alfei et al., 2019). Ces données suggèrent que TOX permet aussi la maintenance des lymphocytes T épuisés en les protégeant de la mort cellulaire.

f) Conclusion sur l'épuisement dans le cancer chez la souris

Les TILs murins acquièrent des caractéristiques similaires aux lymphocytes T épuisés lors de leur exposition chronique à la tumeur contre laquelle ils sont dirigés. Ces caractéristiques se manifestent notamment par l'existence de deux populations de lymphocytes T épuisés : précurseurs et terminales. Leur transcriptome et paysage épigénétique partage des similitudes avec ce qui a été observé dans le modèle LCMV. Ceci est cohérent puisque les TILs épuisés expriment également le facteur de transcription TOX dont le rôle a été présenté au sein de cette partie. Certaines discordances ont néanmoins été soulevées et suggèrent que de plus amples études sont nécessaires pour clarifier le rôle de TOX dans les TILs et identifier d'autres acteurs moléculaires contribuant à l'épuisement des lymphocytes T CD8 anti-tumoraux.

Qu'en est-il chez l'Homme ?

2.3.2 Chez l'Homme

a) « Les TILs sont épuisés car ils expriment des récepteurs inhibiteurs »

Les lymphocytes T CD8 infiltrés dans des tumeurs telles que mélanome, carcinome ovarien et carcinome pulmonaire expriment une panoplie de récepteurs typiques de lymphocytes T épuisés, tels que PD-1, LAG-3, TIM-3 ou CTLA-4 (Ahmadzadeh et al., 2009; Matsuzaki et al., 2010; Thommen et al., 2015; Zhang et al., 2010). Leur expression a été confirmée à la surface de TILs spécifiques

pour des antigènes tumoraux tels que Melan-A ou NY-ESO-1 (Ahmadzadeh et al., 2009; Matsuzaki et al., 2010). L'expression à la surface des TILs des récepteurs LAG-3, TIM-3 et CTLA-4 est rarement unique mais plutôt accompagnée de celle de PD-1, tandis que PD-1 peut être exprimé sans être accompagné d'autres récepteurs inhibiteurs (Ahmadzadeh et al., 2009; Matsuzaki et al., 2010; Thommen et al., 2015, 2018). Mais l'expression de multiple récepteurs inhibiteurs est corrélée à l'expression de marqueurs d'activation tels que Ki67, HLA-DR, CD38 ou encore CD137 (Ahmadzadeh et al., 2009; Thommen et al., 2018). Ce constat est également observé à la surface des lymphocytes T anti-NY-ESO-1 présents dans le sang de patients atteints de mélanome (Fourcade et al., 2010).

Ainsi, l'expression de récepteurs inhibiteurs à la surface des TILs est étroitement liée à leur état d'activation. Au même titre que dans le modèle LCMV, l'expression de récepteurs inhibiteurs à la surface des lymphocytes T antiviraux ne suffit pas à qualifier ces cellules d'épuisées, les TILs ne peuvent être qualifiés d'épuisés pour cette même raison.

b) « Les TILs sont épuisés car ils ont une signature transcriptionnelle de lymphocytes T épuisés du modèle LCMV »

L'émergence de techniques d'analyse du transcriptome par (sc)RNA-seq des TILs pour comparer leur signature transcriptionnelle à celle des lymphocytes T murins épuisés a été une approche fréquemment employée au cours des dernières années. Mais existe-il un seuil de similitude pertinent pour confirmer que le phénomène d'épuisement s'applique aussi aux TILs humains ? De plus, des similitudes entre transcriptome de lymphocytes T épuisés et TILs humains pourraient être le fruit de la comparaison de cellules à des stades d'activation similaires. À ce titre, l'analyse par (sc)RNA-seq des lymphocytes T CD8 issus de divers types de cancer a révélé que les TILs exprimant des marqueurs « d'épuisement » sont également engagés dans le cycle cellulaire, expriment des marqueurs d'activation tels que

CD137, et ont un répertoire TCR surreprésenté par des clonotypes, ce qui témoignerait de leur activation et amplification dans la tumeur (Li et al., 2019; Thommen et al., 2018; Tirosh et al., 2016; Zhang et al., 2018; Zheng et al., 2017). Ces observations illustrent la difficulté d'obtenir une signature transcriptionnelle distinguant des lymphocytes T activés de lymphocytes T épuisés, et soulève la question de savoir si les TILs sont épuisés ou activés. Ce biais est inhérent à l'origine du phénomène d'épuisement puisque sa cause principale est la signalisation issue de l'activation du TCR (voir 2.4.5).

c) « Les TILs sont épuisés car ils sont dysfonctionnels »

Tester la fonctionnalité des TILs semble être un prérequis pour conclure de leur épuisement ou non, puisque les lymphocytes T épuisés ont une fonctionnalité atténuée. Dans ce but, la capacité de production de cytokines effectrices telles que l'IFNγ et le TNFα est un test communément effectué. En utilisant cette mesure, de nombreuses études ont rapporté que les TILs isolés de divers types de cancer exprimant PD-1 sont dysfonctionnels par comparaison avec leurs homologues PD-1$^-$ issus du même tissu ou de tissus sains (Ahmadzadeh et al., 2009; Matsuzaki et al., 2010; Thommen et al., 2015, 2018; Zhang et al., 2010). Une similitude intéressante avec le modèle LCMV est que la co-expression de PD-1 avec plusieurs récepteurs inhibiteurs (LAG-3, TIM-3, CTLA-4) est corrélée à un degré de dysfonctionnement plus marqué (Ahmadzadeh et al., 2009; Matsuzaki et al., 2010; Thommen et al., 2018). Mais, l'expression de plusieurs récepteurs inhibiteurs à la surface des TILs est corrélée à l'expression de marqueurs d'activation, et des lymphocytes T récemment activés sont moins à même de produire des cytokines au moment de leur réactivation (Abdel-Hakeem et al., 2021; Demotte et al., 2008). Ceci pourrait éventuellement expliquer cette observation. De plus, de nombreux mécanismes immunosuppresseurs auxquels les TILs ont été exposés pourraient également expliquer leur dysfonction : facteurs solubles immunosuppressifs, hypoxie, déplétion d'acides aminés et

glucose, cellules à activité immunosuppressive (Thommen and Schumacher, 2018; Zarour, 2016). Stipuler que des TILs sont dysfonctionnels car « épuisés » est donc audacieux.

d) « Les TILs sont épuisés car ils expriment TOX »

Chez la souris, le facteur de transcription TOX induit par la voie NFAT est le pionnier du développement des lymphocytes T épuisés dans le modèle LCMV et le cancer. TOX représente peut-être un marqueur plus fiable pour prétendre avec un niveau de confiance supplémentaire que des TILs sont épuisés dès lors qu'ils expriment TOX.

Toutefois, comme nous l'avons vu dans le modèle LCMV, TOX est transitoirement exprimé au cours d'une infection aigüe, avec un maxima de 20% de lymphocytes T antiviraux exprimant TOX (Khan et al., 2019). De plus, les lymphocytes T CD8 non naïfs dans le sang de donneurs sains expriment TOX. Ils n'expriment cependant pas TIM-3 ou LAG-3, et l'expression de PD-1 est limitée (Sekine et al., 2020). Parmi ces cellules, environ 60% des lymphocytes T CD8 dirigés contre les virus persistants EBV ou CMV expriment TOX, contre 10% des lymphocytes T CD8 anti-influenza (Sekine et al., 2020). Les lymphocytes T anti-EBV ou CMV peuvent-ils être qualifiés d'épuisés uniquement car ils expriment TOX ? Lorsque leurs fonctions sont testées et comparées à celle des lymphocytes T anti-influenza, les capacités de production d'IFNγ, TNFα, IL-2 et de dégranulation de ces 3 populations antivirales est similaire, suggérant que TOX n'est pas ici un marqueur de dysfonction. Lorsque la même analyse est réalisée sur des patients chroniquement infectés avec le VIH, 80% des lymphocytes T antiviraux expriment TOX, et leur fonctionnalité est diminuée (Sekine et al., 2020). Cette étude met en évidence que se fier à la simple détection de l'expression de TOX ne peut être suffisant comme marqueur d'épuisement. Seule son expression abondante et soutenue conduit à l'installation du programme de l'épuisement. Dès lors, peut-être que la combinaison des facteurs suivants rendrait

plus fiable l'affirmation selon laquelle des lymphocytes T seraient épuisés : les niveaux d'expression de TOX et PD-1 doivent être corrélés et supérieurs à ceux de lymphocytes T « normaux » activés, et la fonctionnalité de ces cellules doit également être testée et comparée.

e) Que conclure sur l'épuisement des TILs dans le cancer chez l'Homme ?

Dans le cancer chez l'Homme, l'expression de TOX est hautement corrélée à l'expression de PD-1, et d'autres récepteurs inhibiteurs tels que TIM-3 et LAG-3 sont également exprimés à la surface des TILs TOX^{hi} de carcinome ovarien, cancer des poumons, cancer du sein, et mélanome, avec pour point de comparaison les lymphocytes T CD8 sanguins de ces patients (Khan et al., 2019; Scott et al., 2019). Comme mentionné précédemment, les TILs $PD\text{-}1^{+}$ sont moins fonctionnels que leurs homologues $PD\text{-}1^{-}$. Dans ce cas présent, TOX est donc un marqueur de dysfonction, et son expression corrélée à celle de PD-1 légitime que ces lymphocytes T ne sont pas seulement activés, mais aussi des cellules « épuisées ». Il aurait toutefois été intéressant d'avoir un comparatif du niveau d'expression de TOX avec des lymphocytes T « normaux » activés.

Il semble donc cohérent de conclure que l'épuisement est un phénomène qui pourrait s'appliquer également aux TILs humains. Il est notable que les analyses réalisées par scRNA-seq sur les TILs issus de carcinome pulmonaire, hépatocellulaire, colorectal, mélanome et cancer du sein ont toutes sans exception rapporté l'expression de TOX au sein des clusters de TILs présentant les caractéristiques de lymphocytes T épuisés (Guo et al., 2018; Li et al., 2019; Savas et al., 2018; Tirosh et al., 2016; Zhang et al., 2018; Zheng et al., 2017). Cette observation est d'autant plus remarquable que la signature transcriptionnelle de ces TILs varie d'une pathologie à l'autre, à l'exception d'un cluster d'une vingtaine de gènes dont TOX fait partie et qui est commun à diverses pathologies (Guo et al., 2018; Zhang et al., 2018; Zheng et al., 2017).

Il est évident que de nombreuses découvertes décrites dans le modèle LCMV chez la souris ne peuvent être copiées et collées pour expliquer ce qu'il se passe dans le cancer chez l'Homme. Un exemple illustrant ce propos est l'identification du récepteur inhibiteur BTLA exprimé à la surface des lymphocytes T anti-NY-ESO-1 dans le sang de patients atteints de mélanome, ce qui n'est pas le cas au sein des lymphocytes T antiviraux exposés à une infection chronique (Blackburn et al., 2009; Fourcade et al., 2012). Un autre exemple est celui de la protéine layiline encodée par le gène LAYN, fréquemment détectée par scRNA-seq au sein des TILs épuisés issus de diverses pathologies humaines (Guo et al., 2018; Zhang et al., 2018; Zheng et al., 2017). Sa surexpression *in vitro* altère la sécrétion d'IFNγ (Zheng et al., 2017). Mais une autre étude a rapporté que sans la layiline, l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8 est atténuée, probablement car la layiline facilite l'adhésion des lymphocytes T à leur cible (Mahuron et al., 2020).

En conclusion, de nombreuses divergences entre les lymphocytes T épuisés du modèle LCMV et les TILs humains sont à anticiper eu égard au microenvironnement tumoral qui est complexe et probablement différent de celui d'une infection virale chronique. L'identification de ces divergences n'est pas nécessairement un gage que la protéine identifiée est responsable du dysfonctionnement des TILs humains, comme illustré avec la layiline.

Bien qu'il soit évident que des différences nombreuses puissent exister entre le cancer chez l'Homme et le modèle LCMV, l'aller-retour incessant entre modèle LCMV, modèle de tumeur murin et cancer chez l'Homme constitue une approche pertinente. En témoigne la révolution thérapeutique qu'a engendré l'utilisation en clinique d'anticorps dirigés contre l'axe PD-1-PD-L1 (Waldman et al., 2020).

2.3.3 Similitude du mode d'action du traitement anti-PD-1 entre Homme et souris

a) La réponse au traitement anti-PD-1 dépend des lymphocytes T Tcf-1$^+$

Dans des modèles de cancer chez la souris, l'effet du traitement anti-PD-1 sur le contrôle tumoral dépend de la population épuisée précurseur Tcf-1$^+$. Lorsque les populations épuisées précurseurs et terminales sont séparément transférées dans des souris congéniques cancéreuses et traitées avec un anti-PD-1 pendant 2 semaines, seul le transfert de la population précurseur aboutit à son expansion et différenciation en réponse au traitement (Miller et al., 2019). En accord, dans un modèle de transfert adoptif de lymphocytes T P14 exprimant le récepteur à la toxine diphtérique sous contrôle du gène encodant Tcf-1 (*Tcf7*-DTR), la délétion de la population Tcf-1$^+$ des TILs diminue la réponse au traitement combinant anti-PD-1 et anti-CTLA-4 (Siddiqui et al., 2019).

Ce mode d'action de l'anti-PD-1 est en accord avec le modèle LCMV. En effet, les souris chroniquement infectées contrôlent mieux la virémie après administration d'un traitement bloquant l'axe PD-(L)1. Cet effet repose là aussi sur la population épuisée précurseur Tcf-1$^+$ qui prolifère et se différencie en cellules dotées de fonctions effectrices supérieures en réponse au traitement (Barber et al., 2006; Beltra et al., 2020; Im et al., 2016; Utzschneider, Charmoy, et al., 2016) (et voir 2.4.4 pour plus de détails).

Chez l'Homme, la présence au sein des TILs de mélanome d'une population PD-1$^+$ Tcf-1$^+$ est un marqueur prédictif d'une réponse clinique favorable à l'anti-PD-1 combiné ou non à un anti-CTLA-4 (Miller et al., 2019; Sade-Feldman et al., 2018). Ainsi, les lymphocytes T épuisés précurseurs Tcf-1$^+$ semblent également représenter une population essentielle à la réponse anti-PD-1 chez l'Homme. Il reste à établir si le traitement agit en améliorant directement la fonctionnalité de ces cellules, ou s'il agit en provoquant leur conversion vers un stade cellulaire distinct nécessaire à la réponse antitumorale.

b) Le traitement anti-PD-1 affecte les TILs préexistants au site tumoral

En analysant les TILs par scRNA-seq et scTCR-seq avant et après traitement, il est possible de suivre les changements transcriptionnels induits par ce traitement pour un même clonotype. Au sein de patients atteints de cancer du poumon qui répondent à un traitement combinant anti-PD-1 et chimiothérapie, le traitement provoque un changement de la composition et de la qualité des lymphocytes T CD8 composant les TILs (Liu et al., 2022).

Chez les patients ayant répondu au traitement, 40% des clonotypes détectés après traitement étaient déjà localisés au site tumoral avant le traitement. Suite au traitement, la quantité de ces clonotypes représente 60% du répertoire clonal de lymphocytes T CD8 identifiés après traitement (Liu et al., 2022). Ces clonotypes possédaient avant traitement une signature transcriptionnelle de lymphocytes T « épuisés terminaux ». Après traitement, ils acquièrent une signature de lymphocytes T « effecteur-like » $Gzmk^{+}$, dont le transcriptome est comparable à celui des lymphocytes T épuisés intermédiaires (Beltra et al., 2020; Hudson et al., 2019; Liu et al., 2022). Les patients n'ayant pas répondu au traitement maintiennent une population de TILs dépourvus de lymphocytes T intermédiaires (Liu et al., 2022).

Ces données sont en harmonie avec plusieurs observations issues du modèle LCMV. Il a récemment été montré que le traitement anti-PD-1 rebalance l'hétérogénéité des lymphocytes T épuisés en faveur des lymphocytes T épuisés précurseurs et leur progéniture intermédiaire, deux populations importantes au contrôle de l'infection virale (Beltra et al., 2020; Hudson et al., 2019). Ces lymphocytes T ayant un phénotype « effecteur-like », ceci explique l'enrichissement de gènes de lymphocytes T effecteurs après traitement, comme initialement observé par RNA-seq sur l'ensemble hétérogène de lymphocytes T P14 traités avec un anti-PD-1 lors d'une infection chronique (Pauken et al., 2016). Ceci explique également pourquoi le traitement pendant 2 semaines de souris avec

un anti-PD-L1 induit la génération de cellules dont les fonctions effectrices sont supérieures (Barber et al., 2006).

Quant à l'effet du traitement sur des lymphocytes T préexistant au site tumoral, ce constat est à mettre en corrélation avec l'observation suivante. Chez la souris, le traitement anti-PD-1 et anti-CTLA-4 induit l'expansion des lymphocytes T antitumoraux et le contrôle de la tumeur, même lorsque les souris sont traitées avec un inhibiteur empêchant les lymphocytes T de quitter les organes lymphoïdes (Siddiqui et al., 2019). En revanche, la déplétion des lymphocytes T Tcf-1^+ de la tumeur diminue la réponse à l'immunothérapie, suggérant que les lymphocytes T Tcf-1^+ résidant au sein même de la tumeur constituent un réservoir de cellules répondant à l'immunothérapie.

Ainsi, chez l'Homme, les TILs des patients répondant au traitement anti-PD-1 réengagent des fonctions effectrices (mesurées sur base de leur transcriptome), et cet effet est exercé sur des lymphocytes T CD8 préexistant au site tumoral avant traitement. Il n'est pas clairement démontré si suite au traitement, les clonotypes réengageant leurs fonctions effectrices proviennent du cluster de lymphocyte T épuisés précurseurs ou s'ils proviennent du cluster de lymphocytes T épuisés terminaux (Liu et al., 2022). Les auteurs proposent toutefois par une analyse bioinformatique que la seule trajectoire de différenciation plausible est dans le sens d'une différenciation du stade précurseur vers le stade intermédiaire (Liu et al., 2022). Ce mode d'action serait en accord avec ce qui a été montré chez la souris.

c) Le traitement anti-PD-1 induit la génération de novo de clonotypes

Les biopsies de patients atteints de cancer du poumon répondant au traitement combinant anti-PD-1 et chimiothérapie sont enrichies en clonotypes déjà localisés au site tumoral avant le traitement. Mais environ 60% des clonotypes détectés après traitement sont des clonotypes qui n'étaient pas détectés au site tumoral avant le traitement (Liu et al., 2022). Afin d'identifier leur origine, une analyse de

répertoire TCR a été réalisée sur le sang de ces patients avant et après traitement. Parmi les nouveaux clonotypes détectés au site tumoral après traitement, 87% d'entre eux sont également détectés dans le sang, mais uniquement après traitement (Liu et al., 2022). Ces données indiquent que le traitement anti-PD-1 induit également la génération de nouveaux clones antitumoraux qui repeuplent la tumeur depuis la périphérie.

Ce constat est en accord avec une étude antérieure sur des patients atteints de carcinome épidermoïde traités avec un anti PD-1. Chez ces patients, le traitement induit l'expansion de TILs CD8 exprimant des marqueurs d'épuisement et d'activation. Parmi les clonotypes amplifiés après le traitement, 84% d'entre eux n'étaient pas présents au site tumoral avant le traitement (Yost et al., 2019). En analysant le répertoire TCR dans le sang de ces patients avant et après traitement, les auteurs rapportent que 35% de ces nouveaux clonotypes détectés au site tumoral sont présents dans le sang après traitement (Yost et al., 2019). Ainsi, cette étude met aussi en évidence un repeuplement du réservoir de TILs CD8 par des nouveaux clonotypes provenant de la périphérie.

Ces observations, proposant que le traitement anti-PD-1 conduit à la génération de nouveaux clonotypes dont la source est extra-tumorale, peuvent être mises en corrélation avec les études suivantes. Il a récemment été montré que les ganglions lymphatiques drainant la tumeur contiennent des lymphocytes T antitumoraux avec un phénotype épuisé précurseur, qui repeuplent la tumeur suite au traitement anti-PD-L1 (Dammeijer et al., 2020). Dans le modèle LCMV, la réponse au traitement anti-PD-L1 s'accompagne de l'expansion des lymphocytes T épuisés précurseurs et intermédiaires, dont la localisation est principalement restreinte aux organes lymphoïdes et au sang, tandis que les organes non lymphoïdes infectés sont principalement infiltrés par des lymphocytes T épuisés terminaux (Beltra et al., 2020; Im et al., 2016).

d) Réconciliation du mode d'action variable du traitement anti-PD-1

Comment réconcilier l'observation selon laquelle le traitement anti-PD-1 entraîne l'amplification de clonotypes préexistants (Liu et al., 2022) ou non (Yost et al., 2019) ? Une possibilité est la présence ou non de structures lymphoïdes tertiaires au sein de la tumeur. Ces dernières pourraient constituer une niche permettant le maintien des lymphocytes T épuisés précurseurs, à l'image de leur localisation dans la rate de souris chroniquement infectées (Im et al., 2016). En accord, il a été montré au sein de patients cancéreux l'existence de niches immunes composées de cellules présentatrices et de lymphocytes T CD8 Tcf-1^{+}. Ces derniers ont un répertoire TCR partagé avec les lymphocytes T CD8 épuisés terminaux, suggérant qu'ils proviennent des lymphocytes T Tcf-1^{+}. La rareté de ces structures lymphoïdes au site tumoral est corrélée à la rareté des lymphocytes T Tcf-1^{+} et à une infiltration moindre de lymphocytes T CD8 (Jansen et al., 2019). Ces niches immunes pourraient donc être requises pour l'amplification de TILs préexistants au site tumoral suite au traitement anti-PD-1.

Alternativement, il est possible que les clonotypes préexistant prolifèrent immédiatement après traitement, tandis que plusieurs semaines après le traitement, de nouveaux clonotypes s'infiltrent au site tumoral. Cette seconde vague de clonotypes reconnaîtrait des antigènes secondaires provenant de la mort des cellules cancéreuses induite suite au traitement. En accord, les patients atteints d'un cancer du sein et traités avec un anti-PD-1 contiennent 9 jours après traitement des clonotypes amplifiés qui étaient déjà présents avant traitement (Bassez et al., 2021). L'étude dans le cancer du poumon rapportant l'amplification de clonotypes préexistant a analysé les TILs 3 semaines après le dernier traitement (Liu et al., 2022). L'étude dans le carcinome épidermoïde rapportant l'émergence de nouveaux clonotypes a été réalisée en moyenne 9 semaines après le dernier traitement (Yost et al., 2019).

Comment réconcilier l'observation selon laquelle le traitement anti-PD-1 entraîne l'acquisition d'un transcriptome « effecteur » (Bassez et al., 2021; Liu et

al., 2022) ou non (Yost et al., 2019) ? Dans le modèle LCMV, il a été rapporté que le traitement anti-PD-L1 provoque l'expression de gènes de lymphocytes T effecteurs. Mais cet effet sur le transcriptome des lymphocytes T épuisés n'est que transitoire. Le jour suivant l'arrêt du traitement, cet effet est encore mesuré. Mais 18 semaines plus tard, le transcriptome des lymphocytes T issus de souris traitées ou non est similaire (Pauken et al., 2016). L'étude de Yost et al rapporte que les nouveaux clonotypes après traitement ont une signature transcriptionnelle « épuisée » semblable à celle observée avant traitement. À l'inverse, Liu et al et Bassez et al ont rapporté un changement dans le transcriptome des clonotypes amplifiés par le traitement anti-PD-1, avec notamment l'acquisition de gènes de lymphocytes T effecteurs. Ces différences pourraient là aussi provenir du temps écoulé entre le dernier traitement et l'analyse de la réponse au traitement (Bassez et al., 2021; Liu et al., 2022; Yost et al., 2019).

De plus amples investigations sont nécessaires pour clarifier le mode d'action du traitement anti-PD-1, bien que d'importants progrès aient été réalisés. Continuer de comprendre les causes du dysfonctionnement des lymphocytes T CD8 exposés à un antigène persistant ou abondant est donc essentiel pour améliorer le traitement des patients cancéreux. Dans la partie suivante, nous verrons les causes de l'épuisement.

2.4 Les causes de l'épuisement

Sujet effleuré dans les parties précédentes de cette introduction, la dose d'antigène rencontré ainsi que la durée d'exposition à celui-ci contribuent tous deux à rendre les lymphocytes T antiviraux épuisés. Mais, cet effet est-il dû à l'antigène lui-même en engageant de façon répétée le TCR des lymphocytes, ou est-ce le fruit d'interactions entre récepteurs et ligands exprimés sur la cellule infectée, ou bien est-ce le résultat d'une exposition chronique à un environnement inflammatoire ?

2.4.1 Charge antigénique

L'équipe de Dietmar Zehn employa une méthode consistant à infecter des souris avec un ratio 1:3 de clone 13 et de son mutant V35A dont le peptide GP_{33-41} ne peut lier H2-D^b. Au jour 8 post infection, ce ratio passe à 1:10, et à 1:20 au jour 28, en raison de l'avantage sélectif du mutant V35A. Ainsi, au cours de l'infection, seule la quantité d'antigène GP_{33-41} est diminuée, tandis que la réponse aux autres épitopes, la charge virale et le niveau d'inflammation demeurent similaires (Fig 16a). Dans la situation où l'abondance en antigène GP_{33-41} est amoindrie, les lymphocytes T P14 (TCR transgénique anti GP_{33-41}) présentent un phénotype équivalent aux lymphocytes T P14 mémoire générés lors d'une infection aigüe, suggérant que la quantité d'antigène rencontrée joue à elle seule un rôle dans l'acquisition de caractéristiques de l'épuisement (Utzschneider et al., 2016b). Toujours en utilisant la même approche, il a été montré que la survenue des caractéristiques de l'épuisement, à savoir perte de production d'IFNγ, différenciation biaisée vers la population précurseur épuisée Tcf-1^+ et acquisition de l'expression de TOX, étaient proportionnelles à la dose d'antigène à laquelle les lymphocytes T P14 sont exposés (Alfei et al., 2019; Utzschneider et al., 2020) (Fig 16b).

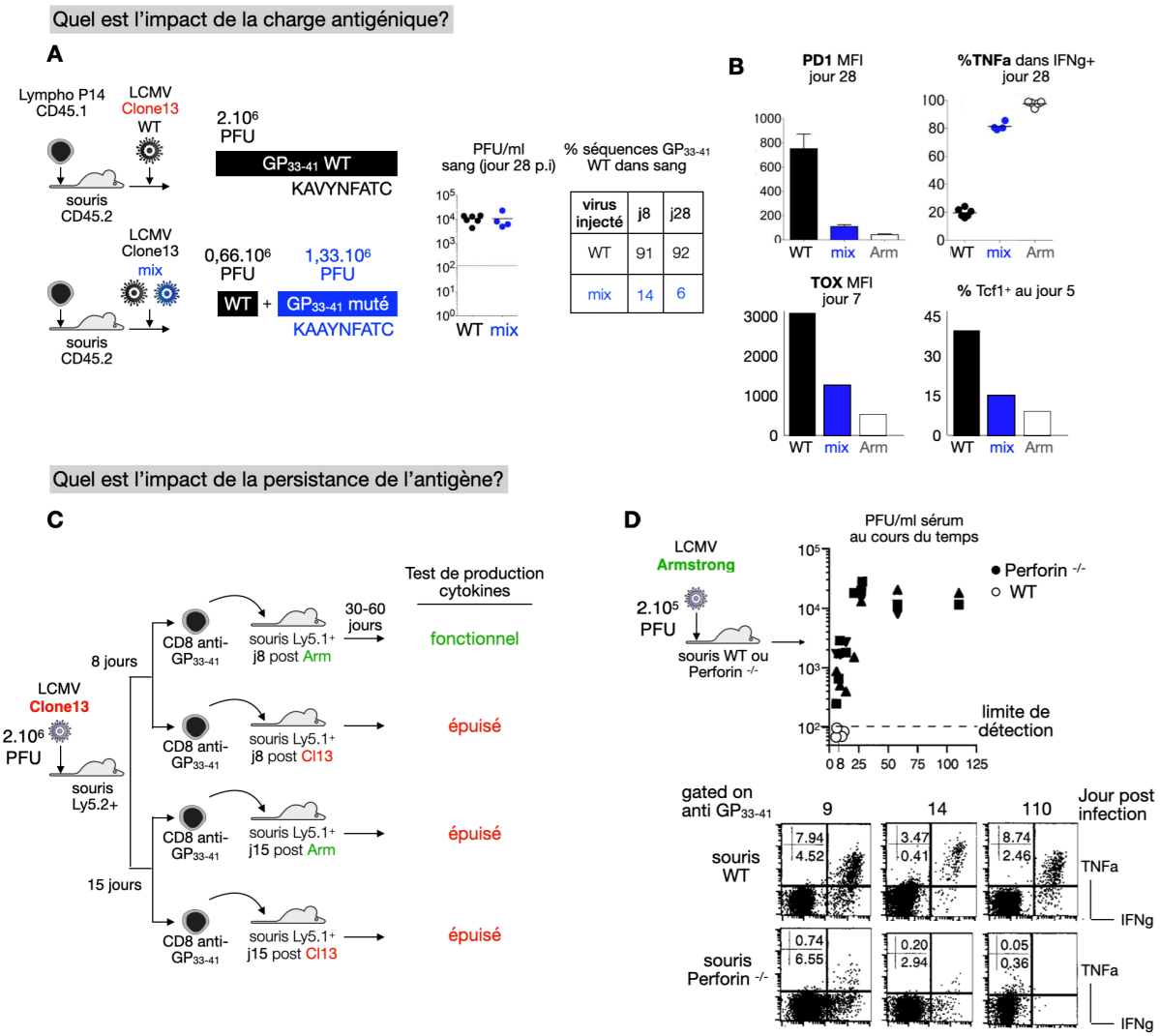


Figure 16. Charge antigénique vs persistance antigénique : rôles dans l'épuisement.
(A) Approche employée afin de ne faire varier que la dose de l'antigène GP_{33-41} lors d'une infection chronique. La mutation du peptide GP_{33-41} empêche sa présentation sur les molécules du CMH de classe I. En utilisant un mix de LCMV clone 13 et de son variant muté pour le peptide GP_{33-41}, la charge virale mesurée au jour 28 après infection est la même qu'avec le LCMV clone 13. Mais la quantité d'antigène GP_{33-41} est faible et décline au cours du temps, en raison de l'avantage sélectif du variant viral muté. (B) Le phénotype des lymphocytes T P14 exposés à une infection chronique est similaire à celui de lymphocytes T exposés à une infection aigüe si la charge antigénique est faible. (C) Lorsque des lymphocytes T sont exposés seulement 8 jours à une infection chronique, leur transfert dans un contexte d'infection aigüe empêche la survenue du phénotype « épuisé » même s'ils ont initialement été exposés à une charge antigénique typique d'une infection chronique. S'ils sont exposés 15 jours à une infection chronique, ils deviennent dysfonctionnels et le restent même s'ils sont laissés au repos 30-60 jours dans des souris ayant déjà éliminé l'antigène. (D) Des souris infectées avec 2.10^5 PFU de la souche Armstrong du LCMV ne parviennent pas à se débarrasser du virus lorsque le gène encodant la perforine est défectif. L'infection persistante en résultant induit la perte de fonction progressive des lymphocytes T anti-GP_{33-41} même s'ils ont initialement été exposés à une charge antigénique typique d'une infection aigüe.
(A) et (B) adapté de Utzschneider et al., 2016, 2020 et Alfei et al., 2019. (C) adapté de Angelosanto et al., 2012; Brooks et al., 2006. (D) adapté de Fuller et Zajac, 2003.

De manière intéressante, si les lymphocytes T P14 sont activés dans des conditions où la quantité d'antigène GP_{33-41} est 10x inférieure au jour 8 post infection, le dysfonctionnement observé au jour 28 est partiel même si la charge antigénique est ensuite aussi abondante qu'en condition contrôle. Ce dysfonctionnement partiel se manifeste par une activité lytique diminuée, mais la production de TNFα est restaurée (Utzschneider et al., 2016b). Ceci suggère que l'exposition initiale à une faible quantité d'antigène ne mène pas à l'acquisition de toutes les caractéristiques de l'épuisement même si l'antigène persiste. La charge antigénique est donc un facteur important conduisant à la différenciation en lymphocytes T épuisés. Ce postulat est en accord avec l'observation selon laquelle dès le jour 5 après infection chronique, les lymphocytes T précurseurs Tcf-1^+ expriment abondamment TOX à moins d'être exposés à une charge virale moindre (Utzschneider et al., 2020).

Toutefois, si des lymphocytes T fonctionnels sont isolés au jour 8 ou 15 après résolution d'une infection aigüe, et qu'il sont transférés dans des souris chroniquement infectées avec le clone 13, ils deviennent dysfonctionnels, en dépit de leur exposition initiale avec une charge antigénique faible (Angelosanto et al., 2012; Brooks et al., 2006). Ces résultats indiquent que même s'ils ont été activés dans un contexte d'infection aigüe, les précurseurs mémoire peuvent encore donner naissance à des lymphocytes T épuisés dans un contexte d'infection chronique. Ils suggèrent également qu'un autre facteur contribue à l'épuisement : la durée d'exposition à l'antigène.

2.4.2 Temps d'exposition à l'antigène

La notion de temporalité est également un élément critique à l'établissement de l'épuisement. Ce concept a notamment été mis en évidence de la façon suivante : lorsque les lymphocytes T sont exposés à une infection chronique pendant 8 jours puis transférés dans un contexte d'infection aigüe, ils parviennent à se différencier en lymphocytes T mémoire fonctionnels, comme mesuré par l'expression de

CD127 et leur capacité à produire IFNγ, TNFα et IL-2 après restimulation. En revanche, si les lymphocytes T sont exposés plus longtemps à l'infection chronique avant d'être transférés dans un contexte d'infection aigüe, ils ne se différencient pas en lymphocytes T mémoire fonctionnels puisqu'ils ont perdu l'expression de CD127 et sont incapables de produire des cytokines après restimulation. Même une fois séparés de leur antigène, le dysfonctionnement est maintenu (Angelosanto et al., 2012; Brooks et al., 2006) (Fig 16c).

De plus, lorsque des souris WT ou perforine KO sont infectées avec la même quantité de virus LCMV Armstrong, le virus est éliminé par les souris WT tandis qu'il persiste dans les souris perforine KO. Cette persistance virale conduit l'ensemble des lymphocytes T antiviraux dirigés contre les épitope GP_{33-41}, $GP_{276-286}$ ou $NP_{396-404}$ à perdre progressivement la capacité à produire IFNγ et TNFα bien qu'ils aient initialement été exposés à une charge virale identique aux lymphocytes T issus de souris normales (Fuller and Zajac, 2003) (Fig 16d).

La notion de temporalité a également été mis en évidence dans un modèle de cancer du foie inductible dans lequel le transfert adoptif de lymphocytes T naïfs congéniques reconnaissant un antigène tumoral mène à leur activation et différenciation en lymphocytes T effecteurs. Lorsqu'isolés de la tumeur au jour 8 et transférés dans des souris non cancéreuses infectées le jour suivant avec *L.Monocytogenes* exprimant l'antigène tumoral, les lymphocytes T adoptent un phénotype de lymphocytes T mémoire et produisent de l'IFNγ et du TNFα. Si les lymphocytes T sont laissés 30 jours dans la tumeur avant d'être challengés avec *L.Monocytogenes*, ils présentent un phénotype de lymphocytes T épuisés, même s'ils sont laissés au repos 3-4 semaines avant d'être réexposés à *L.Monocytogenes* (Schietinger et al., 2016).

Ainsi, il est difficile de définir l'importance relative de la charge antigénique et de la durée d'exposition à l'antigène dans le phénomène d'épuisement, mais ces deux facteurs sont clairement à la base de l'épuisement. Il est à noter qu'en cas de charge virale abondante, certains changements transcriptionnels et modifications épigénétiques trouvés au jour 21 d'une infection chronique sont déjà présents dès le 5ème jour de l'infection (Utzschneider et al., 2020). Le fait que l'exposition continue à un antigène soit aussi nécessaire au développement de cellules épuisées suggère que la différenciation en lymphocytes T épuisés peut survenir rapidement, notamment en cas de charge antigénique élevée, et que ce phénotype est stabilisé avec le temps d'exposition à l'antigène.

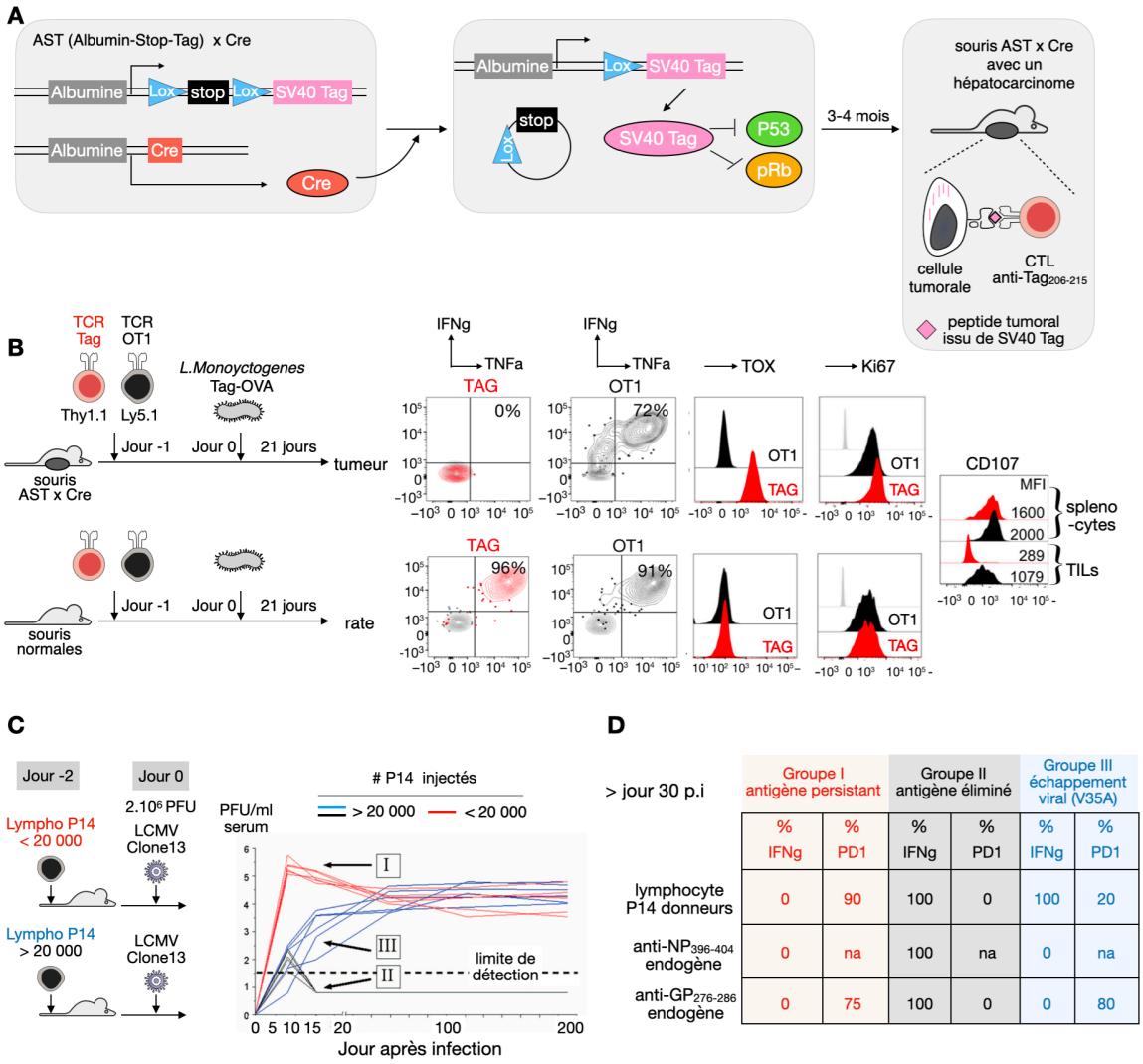
Toutefois, dans la plupart des études présentées jusqu'à présent, il est impossible de déterminer avec certitude si c'est l'antigène lui-même ou/et le microenvironnement inflammatoire qui lui est associé qui conduit au développement de lymphocytes T épuisés. Penchons-nous sur cette question.

2.4.3 Rôle du microenvironnement inflammatoire

Le rôle du microenvironnement inflammatoire dans l'épuisement est complexe et implique divers facteurs solubles qui seraient sécrétés lors d'infections chroniques tels que IFN de type I, TGFβ, ou IL-10. Le but de cette partie n'est pas de décrire le rôle de chacun de ces facteurs dans l'épuisement. Plus d'informations à leur égard peuvent être trouvées ici (McLane et al., 2019).

Le but est de décrire l'importance que l'environnement inflammatoire pourrait avoir sur le développement de lymphocytes T épuisés. Comme nous l'avons vu jusqu'à présent, l'épuisement est un mécanisme d'atténuation des fonctions effectrices qui se met en place par l'acquisition d'un programme transcriptionnel adapté à une situation de persistance antigénique ou de charge antigénique élevée. Ce programme transcriptionnel implique le facteur de transcription TOX, sans lequel la différenciation en lymphocytes T épuisés est compromise. Le microenvironnement inflammatoire peut-il y participer ?

Afin de tester cette hypothèse, Scott et al ont utilisé des souris Thy1.2 transgéniques Albumine-flox-stop-flox-Tag (AST) x Albumine-Cre (Alb-Cre), dans lesquelles le promoteur de l'albumine dirige l'expression de la protéine Tag du virus simien 40 (SV40 Tag). La traduction en protéine de SV40 Tag n'a lieu qu'après excision des sites flox par la protéine Cre, dont l'expression est également contrôlée par le promoteur de l'albumine. Ce promoteur est utilisé par les hépatocytes, lesquels forment une tumeur suite à l'action de SV40 Tag qui inhibe la fonction des protéines suppressives de tumeur pRb et p53 et mène à la formation d'un carcinome hépatocellulaire en 3-4 mois (Schietinger et al., 2016). L'oncogène SV40 Tag génère également un peptide antigénique ($Tag_{206-215}$) présenté sur $H2\text{-}D^b$ (Fig 17a). Ces souris cancéreuses sont également injectées en intrapéritonéale avec une bactérie recombinante *L.Monocytogenes* exprimant les peptides antigéniques $Tag_{206-215}$ et $OVA_{257-264}$ (Fig 17b), qui donne lieu à une infection aigüe et dont la présence dans le foie a lieu dès 2h après administration intraveineuse (Brocksted et al., 2004).



> jour 30 p.i	Groupe I antigène persistant		Groupe II antigène éliminé		Groupe III échappement viral (V35A)	
	% IFNg	% PD1	% IFNg	% PD1	% IFNg	% PD1
lymphocyte P14 donneurs	0	90	100	0	100	20
anti-NP$_{396-404}$ endogène	0	na	100	na	0	na
anti-GP$_{276-286}$ endogène	0	75	100	0	0	80

Figure 17. Antigène persistant vs environnement inflammatoire : rôles dans l'épuisement.
(A) Les hépatocytes des souris ASTxCre exprimant l'oncogène SV40 Tag sous contrôle du promoteur de l'albumine ne peuvent traduire la protéine SV40 Tag qu'après excision des sites LoxP qui flanquent le codon stop en amont de SV40 Tag. Cette excision est induite par l'enzyme Cre dont l'expression est aussi dirigée par le promoteur de l'albumine. SV40 Tag induit la transformation tumorale des hépatocytes en inhibant les protéines suppressives de tumeur p53 et rétinoblastome (pRb). Un carcinome hépatocellulaire est développé en 3-4 mois. Les hépatocytes transformés présentent un peptide tumoral dérivé de SV40 Tag, qui peut être reconnu par des lymphocytes T CD8 exprimant le TCR anti-Tag. (B) Les souris ASTxCre porteuses de tumeur sont coinjectés avec un mix de lymphocytes TCR Tag et de lymphocytes TCR OT1 et avec la bactérie L.Monocytogenes exprimant les antigènes Tag et OT-1. Des souris non cancéreuses ont aussi été injectées de la même façon. Seuls les lymphocytes T TCR Tag perdent leur fonction et expriment Tox lorsque l'antigène qu'ils reconnaissent persiste. (C) Le transfert adoptif de moins de 20 000 lymphocytes T P14 résulte en la persistance du clone 13 (groupe I). Le transfert adoptif de plus de 20 000 lymphocytes T P14 résulte en l'élimination du virus (groupe II) ou à sa persistance (groupe III). Le virus persiste dans les souris du groupe III due à une mutation (V35A) abolissant la présentation du peptide GP$_{33-41}$ sur H2-D^b. (D) L'apparition du variant viral V35A réprime la survenue du phénomène d'épuisement dans les lymphocytes T P14 tandis que les lymphocytes T endogènes reconnaissant des épitopes persistants deviennent épuisés. (A) et (B) Adapté de Scott et al., 2019. (C) et (D) Adapté de Blattman et al., 2009.

Lorsque des lymphocytes Thy1.1 TCR_{Tag} sont transférés avec des lymphocytes T Ly5.1 TCR_{OVA}, ces deux populations ont infiltré de manière équivalente la tumeur 3-4 semaines plus tard et expriment les marqueurs d'activation CD44 et Ki67, mais seuls les lymphocytes T anti-tumoraux expriment le facteur de transcription TOX, les récepteurs inhibiteurs PD-1, LAG-3 et TIM-3, et sont dysfonctionnels comme mesuré par la perte de production d'IFNγ, de TNFα, et de dégranulation. En revanche, ces deux populations antigène-spécifique distinctes ont le même phénotype fonctionnel si elles proviennent de souris non cancéreuses infectées avec *L.monocytogenes* exprimant OVA et Tag (Scott et al., 2019) (Fig 17b). L'analyse RNA-seq et ATAC-seq de ces deux populations isolées de la tumeur révèlent 2347 gènes différentiellement exprimés et 19 000 zones de chromatine différentiellement accessibles et confirme que les lymphocytes TCR_{Tag} ont un phénotype de cellules épuisées (Scott et al., 2019). Ainsi, au sein d'un même environnement, les lymphocytes T exposés à un antigène persistant se développent en lymphocytes T épuisés, tandis que des lymphocytes T répondant à une infection aigüe se développent en lymphocytes T mémoire fonctionnels. Bien que cela n'exclue pas que le microenvironnement puisse participer au développement de lymphocytes T épuisés lors de leur activation chronique, ces résultats indiquent néanmoins qu'il n'est pas suffisant à lui seul pour mener au développement de lymphocytes T épuisés.

Une autre indication du rôle secondaire du microenvironnement inflammatoire dans l'épuisement provient d'une observation fortuite réalisée dans le modèle LCMV. Dans le but d'étudier l'issue d'une infection virale chronique en fonction de la quantité de lymphocytes T P14 transférés dans les souris, Blattman et al observèrent qu'à partir de 1.10^5 lymphocytes T transférés, certaines souris éliminent le virus tandis que d'autres deviennent chroniquement infectées (Fig 17c). Ceci est en fait dû à l'émergence d'un variant viral dont nous avons parlé antérieurement, le variant V35A, dont la mutation empêche le peptide GP_{33}-

$_{41}$ de lier H2-D^{b}. En conséquence de la persistance de ce variant, les lymphocytes T endogènes dirigés contre les autres épitopes viraux deviennent épuisés, tandis que les lymphocytes P14 demeurent fonctionnels, en dépit de leur exposition initiale avec l'antigène GP_{33-41} et au maintien d'un microenvironnement inflammatoire associé à la persistance virale (Blattman et al., 2009) (Fig 17d).

Bien que les résultats des 2 études ci-dessus mettent en exergue le rôle prépondérant de l'antigène par rapport à celui du microenvironnement inflammatoire qui lui est associé, ce dernier n'est pas inerte pour autant. Lorsque des lymphocytes T humains isolés du sang de donneurs sains sont activés en présence de VEGF pendant 4 jours, leurs capacités à proliférer et produire de l'IFNγ et du TNFα est diminuée (Kim et al., 2019a). Cet effet est corrélé à l'expression supérieure de TOX ainsi que de NFAT-2, facteur de transcription induisant l'expression de TOX. Traiter ces lymphocytes T avec un siRNA contre TOX restaure le fonctionnement des lymphocytes T. De plus, dans un modèle de tumeur colorectale MC38-OVA, la délétion conditionnelle du récepteur VEGFR2 atténue l'expression de TOX et restaure partiellement le fonctionnement des lymphocytes T anti-tumoraux $OVA_{257-265}$ (Kim et al., 2019a). En accord avec ces effets, la signature transcriptionnelle des lymphocytes T épuisés dans le modèle LCMV est enrichie au sein des cellules exposées au VEGF (Kim et al., 2019).

En conclusion, le microenvironnement inflammatoire peut contribuer à exacerber le dysfonctionnement associé au phénomène d'épuisement, sans être le facteur déterminant du développement de lymphocytes T épuisés. Se pourrait-il que ce rôle soit endossé par d'autres facteurs, tels que des récepteurs exprimés à la surface des lymphocytes T et leurs ligands exprimés sur les cellules infectées ?

Les lymphocytes T épuisés expriment de nombreux récepteurs inhibiteurs. Leur expression n'est toutefois pas restreinte à des cellules épuisées, puisque toute cellule activée par son TCR exprimera nombre de ces récepteurs, ce qui amène fréquemment au raccourci selon lequel un lymphocyte T est épuisé dès lors qu'il

exprime ces récepteurs. Toutefois, en raison du rôle régulateur qu'exercent les récepteurs inhibiteurs sur les lymphocytes T suite à leur activation, leur rôle dans l'épuisement lors d'infections chroniques fut logiquement étudié.

2.4.4 Récepteurs inhibiteurs : PD-1, LAG-3 et TIM-3

a) Dynamique d'expression lors d'infection virale

Lors d'une infection aigüe avec la souche Armstrong, plusieurs récepteurs inhibiteurs tels que PD-1, LAG-3 et TIM-3 sont transitoirement exprimés à la surface des lymphocytes T antiviraux, avec un pic d'expression au jour 5-6 après infection et un retour au niveau basal au jour 9, après que l'antigène ait été éliminé (Scott et al., 2019). En revanche, lorsque l'antigène persiste, l'expression de PD-1, LAG-3 et TIM-3 demeure soutenue (Barber et al., 2006; Blackburn et al., 2009; Jin et al., 2010; Scott et al., 2019).

L'antigène persistant, le TCR est répétitivement activé, ce qui conduit à l'activation continue de la signalisation menant à l'expression de PD-1, LAG-3 et TIM-3. À cet égard, les facteurs de transcription de la voie NFAT, NFAT-1 et NFAT-2, ont été détectés par ChIP aux loci des gènes encodant PD-1, TIM-3 et LAG-3 (Martinez et al., 2015). L'expression de ces récepteurs à la surface des lymphocytes T P14 est diminuée en l'absence de NFAT-1 et NFAT-2 lors d'infections aigües et chroniques avec le LCMV (Martinez et al., 2015).

L'expression soutenue de récepteurs inhibiteurs peut également être indépendante de l'activation du TCR et de NFAT. Lorsque des lymphocytes T épuisés sont isolés de souris chroniquement infectées depuis 3 semaines et mis au repos pendant 3 à 4 semaines au sein de souris congéniques non infectées, l'expression de PD-1 est maintenue en dépit de l'absence d'antigène, tandis que des lymphocytes T mémoire issus d'infections virales aigües n'expriment pas PD-1 (Abdel-Hakeem et al., 2021; Pauken et al., 2016; Utzschneider et al., 2013). Ceci suggère que des mécanismes indépendant de NFAT se mettent en place pour maintenir l'expression de PD-1 en absence d'antigène. L'un d'entre eux

dépendrait de TOX, puisque des lymphocytes T KO pour TOX répondant à une infection virale ou à une tumeur ont au jour 8 des niveaux de PD-1 et LAG-3 diminués (Khan et al., 2019; Scott et al., 2019). À l'inverse, la transduction rétrovirale de TOX favorise l'expression de PD-1 et LAG-3 lors d'une infection aigüe (Khan et al., 2019). Ceci suggère que TOX participerait également à la régulation de l'expression de PD-1 et LAG-3 et pourrait maintenir leur expression même en l'absence d'antigène.

D'un point de vue épigénétique, des mécanismes se mettent également en place pour faciliter le maintien de l'expression de PD-1. Environ 1000 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription de PD-1 se trouve une région CR-C contenant un élément *cis*-régulateur nécessaire à NFAT-2 pour induire l'expression de PD-1 (Oestreich et al., 2008). Lors d'une infection virale chronique, les ilots CpG sont déméthylés au niveau de cette région CR-C, et cet état de déméthylation est maintenu puisque 90 jours après élimination du clone 13, PD-1 est exprimé et la région CR-C déméthylée (Youngblood et al., 2011). À l'inverse, cette déméthylation n'est que transitoire lors d'une infection aigüe, puisque CR-C est déméthylé au sein des lymphocytes T effecteurs et re-méthylé au sein des lymphocytes T mémoire (Youngblood et al., 2011). Cette modification est associée à la perte des marques d'histone répressives H3K9^{me3} et H3K27^{me3} et au gain de la marque activatrice H3K27^{ac} (Lu et al., 2014; Youngblood et al., 2011).

Une autre région de chromatine localisée environ 23kb en amont du site d'initiation de la transcription de PD-1 est spécifiquement accessible dans les lymphocytes T épuisés, et est nécessaire à l'expression élevée de PD-1 dans la lignée de lymphome EL4 (Pauken et al., 2016; Sen et al., 2016).

L'ensemble de ces résultats soutient la notion selon laquelle l'expression de récepteurs inhibiteurs par les lymphocytes T épuisés, en particulier PD-1, pourrait

être maintenue de manière indépendante de NFAT en absence d'antigène. Quel est son rôle ?

b) Rôle de PD-1

Dans la rate, l'expression d'un des ligands de PD-1, PD-L1, est augmenté à la surface des cellules infectées par le clone 13 (Barber et al., 2006). PD-1 étant exprimé à la surface des lymphocytes T antiviraux et PD-L1 à la surface des cellules infectées, il fut logique d'évaluer l'impact de l'interaction entre PD-1 et PD-L1 en utilisant des souris KO pour PD-L1. Lorsque ces souris déficientes pour PD-L1 sont infectées avec le clone 13, elles meurent en l'espace de 7 jours, tandis que l'absence de PD-L1 est sans impact lors d'une infection aigüe (Barber et al., 2006). Ceci suggère que l'axe PD-1 - PD-L1 permet d'atténuer une réponse immune autrement exacerbée et délétère pour l'hôte en cas de charge virale abondante ou persistante. Par extension, cela rend pertinent de penser que PD-1 pourrait participer au phénomène d'épuisement. Qu'en est-il lorsque cette voie est bloquée de manière pharmacologique?

Lorsqu'un anticorps anti-PD-L1 est administré tous les 3 jours, du jour 21 à 37 après infection chronique, le virus est indétectable dans la rate et le foie et la virémie est globalement diminuée dans le reste de l'organisme au jour 37 (Barber et al., 2006). Cet effet est corrélé à une augmentation du nombre absolu de lymphocytes T antiviraux dirigés contre les épitopes $NP_{396-404}$, GP_{33-41} et $GP_{276-286}$, une augmentation de la capacité de production d'IFNγ et TNFα, et de leur activité cytotoxique (Barber et al., 2006). Lorsque des lymphocytes T épuisés $Ly5.2^+$ sont chargés au CFSE et transférés dans des souris $Ly5.1^+$ infectées depuis 45 jours, le traitement anti PD-L1 induit une dilution quasi totale du CFSE, indiquant que l'augmentation du nombre absolu de lymphocytes T antiviraux après traitement est au moins en partie due à une prolifération accrue des lymphocytes T épuisés transférés (D.L. Barber et al., 2006) (Fig 18a).

Ce « boost » de prolifération observé après traitement avec un anti-PD-L1 provient en fait de la sous-population de lymphocytes épuisés précurseurs Tcf-1^+. Lorsque cette population est transférée dans des souris chroniquement infectées, le traitement anti-PD-L1 induit une augmentation de cette population d'un facteur 3, et surtout, le nombre de lymphocytes T épuisés terminaux TIM-3^+ Tcf-1^- est multiplié par 30. Si ce sont les lymphocytes T épuisés terminaux TIM-3^+ Tcf-1^- qui sont transférés, l'expansion lymphocytaire est quasi-nulle (Im et al., 2016; Utzschneider et al., 2016a) (Fig 18b, c et d). En accord avec leurs propriétés essentielles à l'homéostasie des lymphocytes T épuisés lors d'infections chroniques, les lymphocytes T épuisés précurseurs sont là aussi indispensables à l'effet du traitement anti-PD-L1 pour permettre la génération de lymphocytes T épuisés dotés de fonctions effectrices résiduelles. Précisément, le traitement anti-PD-L1 rebalance l'hétérogénéité des lymphocytes T en faveur des précurseurs épuisés Tcf-1^+ CXCR5^+ Tim-3^- de stade 2 et des épuisés intermédiaires Tcf-1^- CXCR5^- Tim-3^+ (Beltra et al., 2020) (Fig 18e).

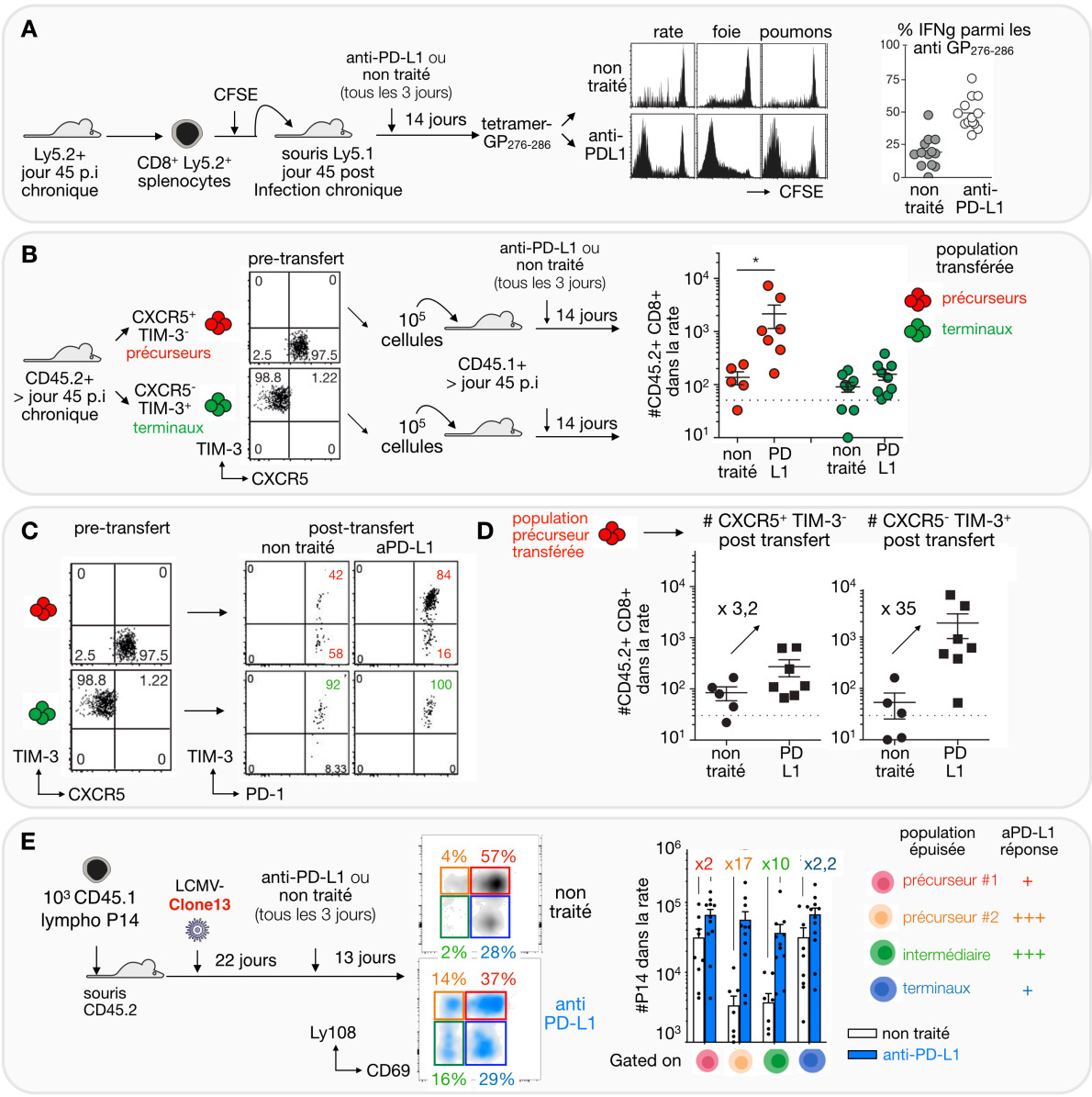


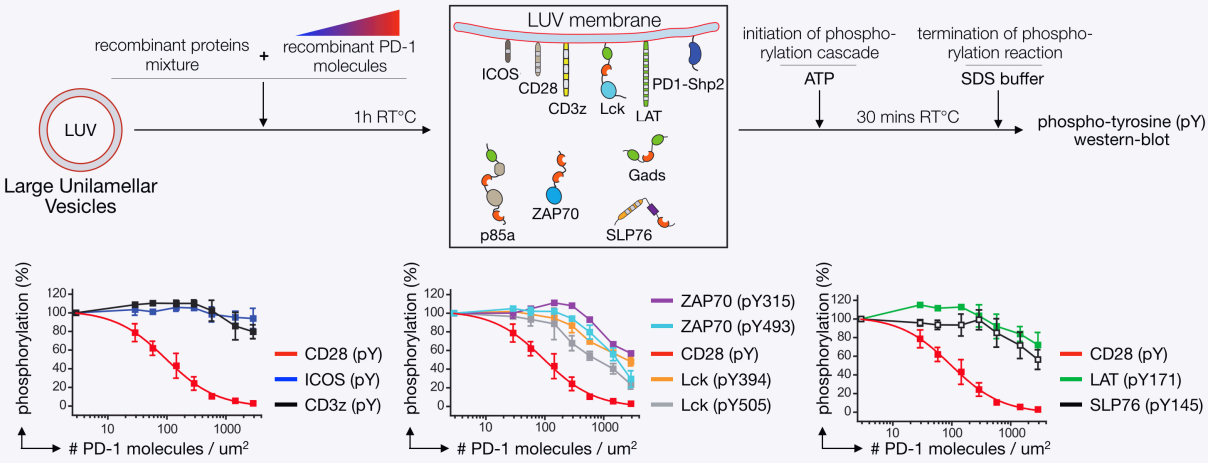
Figure 18. Les lymphocytes T épuisés précurseurs répondent au traitement anti-PD-L1.
(A) Les lymphocytes T épuisés adoptivement transférés dans des souris chroniquement infectées prolifèrent suite à un traitement anti-PD-L1. Ces cellules produisent aussi plus d'IFNγ suite à leur restimulation ex vivo. (B) La prolifération des lymphocytes T épuisés suite à un traitement anti-PD-L1 provient de la population précurseur épuisée CXCR5$^+$ TIM-3$^-$. (C) La prolifération des lymphocytes T épuisés précurseurs suite à un traitement anti-PD-L1 conduit à leur différenciation en lymphocytes T épuisés terminaux (PD-1$^+$ TIM-3$^+$), tout en maintenant un réservoir de cellules précurseurs (PD-1$^+$ TIM-3$^-$). (D) Quantification du nombre de lymphocytes T épuisés précurseurs (CXCR5$^+$ TIM-3$^-$) et terminaux (CXCR5$^-$ TIM-3$^+$) après transfert des lymphocytes T épuisés précurseurs donneurs (rouge). (E) Lors d'un traitement anti-PD-L1, la quantité de lymphocytes T épuisés précurseurs de stade 2 et de lymphocytes T épuisés intermédiaires augmente d'un facteur 10-20 tandis que celle des lymphocytes T épuisés précurseurs de stade 1 et terminaux ne change que peu. (A) Adapté de Barber et al., 2006. (B) et (C) Adapté de Im et al., 2016. (D) Adapté de Beltra et al., 2020

Quelques études récentes ont clarifié le mode d'action de PD-1 dans les lymphocytes T épuisés. Au jour 8 d'une infection chronique, la re-stimulation *ex vivo* de lymphocytes T P14 KO pour PD-1 conduit à une phosphorylation plus abondante de Akt 473, ERK 202/204, mTOR 2448 et S6 235/236 (Oddorizi et al., 2015). De plus, les lymphocytes T KO pour PD-1 sont 5 fois plus nombreux que leurs homologues normaux au jour 8 après infection (Oddorizi et al., 2015). Ces résultats suggèrent que la phosphorylation activatrice de protéines en aval du TCR et/ou de CD28 est réduite en présence de PD-1 (Hui et al., 2017; Yokosuka et al., 2012) (Box 3).

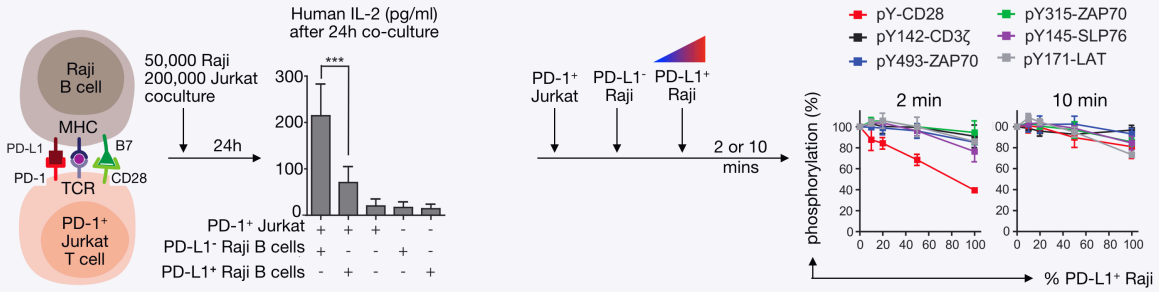
Outre son mécanisme d'action, le rôle de PD-1 dans le développement de l'épuisement commence seulement à se préciser. L'absence de PD-1 favorise l'expansion des lymphocytes T P14 entre les jours 8 et 14 après infection. Mais leur maintien à des stades plus tardifs de l'infection est compromis et est associé à une perte d'entrée dans le cycle cellulaire et une survie moindre (Odorizzi et al., 2015). Par ailleurs, l'absence de PD-1 ne contre pas la perte de production des cytokines IFNγ et TNFα, mais favorise l'acquisition de l'expression de granzyme B (Odorizzi et al., 2015). Plus récemment, Chen et al ont montré que sans PD-1, la proportion de lymphocytes T P14 Tcf-1^{+} au jour 8 d'une infection chronique est diminuée. À la place, ces lymphocytes T P14 KO pour PD-1 acquièrent un phénotype semblable à celui de lymphocytes T effecteurs terminaux : ils persistent faiblement *in vivo* et expriment les marqueurs de différenciation terminale TIM-3, KLRG1 et CD39 (Chen et al., 2019). Ces 2 études suggèrent que lors d'une infection chronique, PD-1 contribue à la formation du réservoir de lymphocytes T épuisés précurseurs KLRG1^{lo} Tcf-1^{+}, lesquels génèrent ensuite les lymphocytes T épuisés terminaux. Sans PD-1, la quantité de lymphocytes T épuisés décline suite à la diminution du réservoir de leurs précurseurs, au profit de lymphocytes T « effector-like ». Ces derniers ont cependant une survie limitée.

Box 3 PD-1 inhibe préférentiellement la signalisation CD28 plutôt que la signalisation TCR Hui et al., 2017

- En utilisant un système in vitro de liposomes reconstitués de divers composants de signalisation, Hui et al ont montré que la voie de signalisation inhibée par PD-1 est principalement CD28 plutôt que celle du TCR.

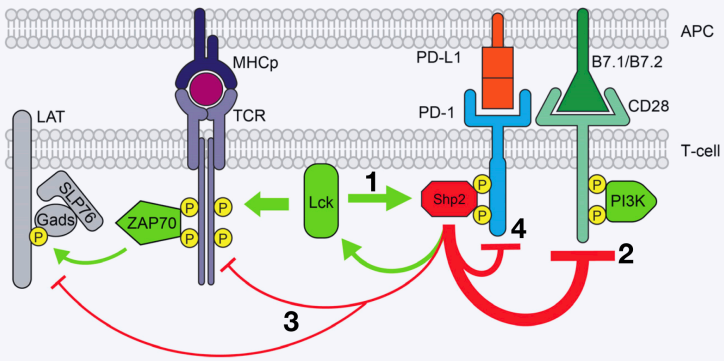


- La déphosphorylation de CD28 survient après recrutement de Shp2 sur les phosphotyrosines 224 et 248 de PD-1.
- L'activité kinase de Lck est nécessaire à la phosphorylation des tyrosines 224 et 248 de PD-1.
- Ces données ont été corroborées par les observations selon lesquelles PD-1 est préférentiellement colocalisée avec CD28 plutôt qu'avec le TCR lors de l'activation d'un lymphocyte T.



- Des cellules Jurkat sur-exprimant PD-1 sont co-cultivés avec des cellules Raji sur-exprimant PD-L1 (PD-L1⁺) ou non (PD-L1⁻). En présence de PD-L1, la sécrétion d'IL-2 est atténuée.
- Les cellules Jurkat cocultivées en présence d'une quantité croissante de cellules Raji PD-L1⁺ ont une phosphorylation moindre de CD28 tandis que les molécules en aval du TCR sont faiblement affectés par la ligation de PD-1.

T cell signaling after PD-1 induction



1 Lorsque PD-1 est engagé par PD-L1, la phosphorylation des tyrosines de PD-1 par Lck aboutit au recrutement de la protéine tyrosine phosphatase Shp2 au domaine cytoplasmique de PD-1.

2 Là, l'activité phosphatase de Shp2 catalyse la déphosphorylation du domaine cytoplasmique de CD28, ce qui réduit le recrutement de PI3K et par conséquent, l'activation de la voie CD28.

3 En revanche, le TCR et les protéines de signalisation en aval sont moins sensibles à l'activité phosphatase de Shp2-PD-1.

4 Le complexe Shp2-PD-1 n'est que formée transitoirement due à l'activité phosphatase de Shp2 sur le domaine cytoplasmique de PD-1

Toutes les figures proviennent de Hui et al., 2017.

c) Rôle d'autres récepteurs inhibiteurs : LAG-3 et TIM-3

La multiplicité des récepteurs inhibiteurs exprimés à la surface des lymphocytes T est corrélée avec une incapacité plus marquée à produire de l'IFNγ et du TNFα (Blackburn et al., 2009). D'autres récepteurs inhibiteurs autres que PD-1 pourraient-ils participer à l'atténuation du fonctionnement des lymphocytes T lors d'infections chroniques ?

Au jour 30 après injection du LCMV clone 13, PD-1 est exprimé par tous les lymphocytes T anti GP_{33-41}, tandis que LAG-3 est co-exprimé avec PD-1 à la surface de 85% de ces cellules (Blackburn et al., 2009). Lorsqu'au jour 28 après infection, un anti-LAG-3 est administré tous les 3 jours pendant 2 semaines, aucun effet n'est mesuré, tandis que l'anti PD-L1 produit des effets similaires à ceux précédemment décrits (Barber et al., 2006; Blackburn et al., 2009). En revanche, la combinaison d'un anti-LAG-3 et d'un anti-PD-L1 a un effet synergique sur l'expansion des lymphocytes T anti-GP_{33-41}, $GP_{276-286}$ et $NP_{396-404}$ (Blackburn et al., 2009). Seule la fonctionnalité des lymphocytes T anti-$GP_{276-286}$ a été mesurée. Leur capacité de production de TNFα est inchangée peu importe le traitement, tandis que celle à produire de l'IFNγ et à dégranuler est améliorée en monothérapie seulement par l'anti-PD-L1, et l'ajout d'un anti-LAG-3 a un effet synergique. Enfin, la virémie dans divers organes est plus faible lorsque la combinaison de traitements est administrée par rapport à l'une ou l'autre monothérapie (Blackburn et al., 2009).

De manière similaire à LAG-3, TIM-3 est également coexprimé avec PD-1 à la surface de 70% des lymphocytes T anti-GP_{33-41}. Lorsqu'au jour 80 après infection, un anti-TIM-3 est administré tous les 3 jours pendant 2 semaines, ceci a un effet très modeste sur l'expansion des lymphocytes T anti-GP_{33-41}. En revanche, sa combinaison à un anti-PD-L1 améliore l'expansion des lymphocytes T anti GP_{33-41} par rapport à l'effet produit par l'anti-PD-L1 seul (Jin et al., 2010). Suite à ces 2 semaines de traitement, les lymphocytes T anti-GP_{33-41}, -$GP_{276-286}$ et

-$NP_{396-404}$ ont une capacité de dégranulation et de production d'IFNγ améliorée par la monothérapie anti-PD-L1. La combinaison avec l'anti-TIM-3 a un effet synergique. En accord, la virémie dans divers organes est plus faible lorsque la combinaison de traitements est administrée par rapport à l'une ou l'autre monothérapie (Jin et al., 2010).

d) Conclusion sur PD-1, LAG-3 et TIM-3

L'ensemble de ces résultats montre que PD-1 joue un rôle prédominant dans l'épuisement par rapport aux autres récepteurs inhibiteurs exprimés à la surface des lymphocytes T épuisés. Il serait intéressant de déterminer la distribution des ligands de TIM-3 et LAG-3 par rapport à PD-L1 lors d'infections virales chroniques.

Des effets synergiques entre récepteurs inhibiteurs semblent exister, en témoignent les effets complémentaires d'un blocage double de PD-L1 et TIM-3/LAG-3. D'autres récepteurs inhibiteurs tels que 2B4 ou CD160 sont également exprimés à la surface des lymphocytes T épuisés, et pourraient contribuer à l'atténuation des fonctions effectrices (Blackburn et al., 2009). Toutefois, la restauration partielle du fonctionnement des lymphocytes T épuisés après inhibition de ces récepteurs témoigne d'un mécanisme plus profond au centre de l'épuisement. Ces résultats font d'autant plus sens lorsqu'il fut récemment compris que la signalisation émanant de l'activation du TCR est en fait au centre de l'installation du programme de l'épuisement. C'est ce que nous allons voir dans la partie suivante.

2.4.5 La signalisation TCR est clé à l'induction de l'épuisement via TOX

Nous avons vu préalablement que TOX était un facteur de transcription essentiel au développement des lymphocytes T épuisés. Nous avons également vu que la voie NFAT fait le lien entre l'activation du TCR et l'induction de TOX (Alfei et al., 2019; Khan et al., 2019; Scott et al., 2019; Yao et al., 2019). De fait, mentionner la signalisation émanant du TCR comme l'une des causes de l'épuisement est indispensable à la cohérence de ce chapitre. Nous n'irons toutefois pas dans les détails puisque beaucoup a déjà été dit au sujet de TOX. Nous discuterons seulement des expériences ayant montré que la voie NFAT induit l'expression de TOX.

La stimulation du TCR conduit à l'activation de la calcineurine, dont l'activité phosphatase permet de relâcher la séquestration dans le cytoplasme des protéines NFAT. Lorsqu'un inhibiteur de la calcineurine est administré entre les jours 3 et 7 après infection chronique, l'expression de TOX au sein des lymphocytes T P14 est presque abolie (Khan et al., 2019; Yao et al., 2019). Des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle de tumeur dans lequel les lymphocytes TCR_{Tag} expriment au jour 10 après infiltration dans la tumeur 3x moins de TOX (Scott et al., 2019). Ces résultats montrent que la voie NFAT induit TOX.

Dans les lymphocytes T, deux protéines de la famille NFAT sont activées par la calcineurine : NFAT-1, encodé par Nfatc2, et NFAT-2, encodé par Nfatc1. Le rôle de la protéine NFAT-2 a été démontré en la sur-exprimant dans les lymphocytes T P14 sous une forme constitutivement active. Cette forme a été obtenue en remplaçant les résidus sérine de son domaine régulateur par des résidus alanine. Ainsi, NFAT-2 ne peut plus être phosphorylé, ce qui empêche sa séquestration dans le cytoplasme, et conduit à sa localisation constante dans le noyau (Monticelli and Rao, 2002). Par cette approche, Khan et al ont montré que NFAT-2 induit l'expression de TOX. À l'inverse, le KO de NFAT-2 atténue l'expression de TOX. En accord, NFAT-2 se lie au locus de TOX, comme montré

par ChIP-seq (Khan et al., 2019). La protéine NFAT-1, encodée par le gène Nfatc2, est également capable de lier le locus de TOX (Khan et al., 2019; Scott et al., 2019). Son rôle n'a pas été investigué car NFAT-1 n'est pas surexprimé dans les lymphocytes T épuisés tandis que NFAT-2 l'est (Khan et al., 2019).

Ainsi, suite à l'activation du TCR, la voie NFAT, et en particulier la protéine NFAT-2, permet d'induire le facteur de transcription TOX. Ce dernier permet alors le développement des lymphocytes T épuisés. Mais d'autres facteurs de transcription sont également activés par la signalisation TCR et pourraient participer à ce processus. Dans le dernier chapitre de cette introduction, nous verrons le rôle ambigu de l'un d'entre eux : le facteur de transcription IRF4.

3 Quel est le rôle du facteur de transcription IRF4 ?

Le but de cette dernière partie est de faire l'état de l'art sur le rôle varié et parfois ambigu du facteur de transcription d'IRF4 dans les lymphocytes T CD8. Étudier un facteur de transcription nécessite avant tout de comprendre sa cinétique, sa structure, les séquences qu'il reconnaît au niveau des gènes qu'il régule, et ses éventuels partenaires protéiques. Chacun de ces éléments constitue un moyen de réguler l'activité d'un facteur de transcription, ici, IRF4. Beaucoup d'informations à ce sujet ont été obtenues à partir des lymphocytes B et des lymphocytes T CD4. C'est pourquoi la majorité de cette partie mentionnera volontairement nombre de ces études réalisées dans ces cellules. Elle constitue une source de connaissances importantes sur le fonctionnement d'IRF4. Moins d'informations sont disponibles à son sujet dans les lymphocytes T CD8, et ces connaissances sont contradictoires. Elles seront traitées en toute dernière partie.

3.1 Signalisation intracellulaire au contrôle de l'expression d'IRF4

IRF4 appartient à la famille de facteurs de transcription Interferon Regulatory Factor (IRF). L'activation du TCR des lymphocytes T est la voie majeure menant à l'expression d'IRF4 (Huber and Lohoff, 2014). En effet, lorsque des lymphocytes T OT-I sont activés avec des anticorps anti-CD3/CD28 en présence d'un inhibiteur de la tyrosine kinase ITK, l'expression d'IRF4 est inhibée de manière proportionnelle à la dose d'inhibiteur à laquelle ils sont exposés (Nayar et al., 2012; Yao et al., 2013). Or, ITK a notamment pour rôle d'activer la phospholipase PLCγ1 qui convertit le PIP_2 en IP_3 et DAG, deux messagers à la base de la propagation de la signalisation TCR vers les voies NFAT et NF-κB.

Une étude antérieure a montré dans des lymphocytes T murins que le membre de la famille NF-κB, c-Rel, est en mesure de lier les éléments *cis* κB1 et κB2 dans le promoteur du gène d'IRF4 et d'induire la transcription du gène rapporteur en aval. Des splénocytes c-Rel$^{-/-}$ ne parviennent pas à transcrire le gène encodant

IRF4 suite à leur incubation avec de la PMA ou des anticorps anti-CD3/CD28 (Grumont and Gerondakis, 2000). NFAT régule également l'expression d'IRF4, puisque si son activation est inhibée par la cyclosporine A, la quantité d'ARNm pour IRF4 détectée est réduite (Matsuyama et al., 1995). De plus, NFAT-1 et NFAT-2 sont tout 2 détectés par ChIP au promoteur de IRF4, et des lymphocytes T CD8 KO pour NFAT-1 et NFAT-2 ont au jour 2 après activation un défaut d'expression d'IRF4 (Man et al., 2017).

L'induction d'IRF4 étant contrôlée par des facteurs de transcription directement activés par la signalisation du TCR, il est de fait cohérent que l'expression d'IRF4 soit détectée au niveau ARNm dès 2h après activation (Grumont and Gerondakis, 2000; Matsuyama et al., 1995). L'ARNm décline ensuite progressivement mais est encore détectable 4 jours après activation (Yao et al., 2013). La protéine est détectable dans les lymphocytes T CD8 dès 8h après activation et demeure détectable, en abondance moindre, au jour 4 (Man et al., 2013). *In vivo*, IRF4 est encore détectable au jour 30 après infection aigue avec la souche Armstrong, mais son expression est 4 fois moindre qu'au jour 5 de l'infection (Man et al., 2017).

Le niveau d'induction d'IRF4 est proportionnel à la force d'activation du TCR. Ceci a été démontré en utilisant des lymphocytes T CD8 OT-I incubés avec le peptide OVA, lequel existe sous 3 séquences peptidiques d'affinité différente. Moins le peptide utilisé a d'affinité pour le TCR, moins IRF4 est synthétisé, et plus son expression retourne rapidement à un niveau basal (Yao et al., 2013). Ce constat a également été fait *in vivo* en utilisant des souris transgéniques exprimant le TCR OT-I et en les infectant avec la bactérie *L.Monocytogenes* modifiée pour exprimer les différentes versions du peptide OVA (Man et al., 2013). La quantité d'IRF4 induite est également proportionnelle à la quantité d'antigène rencontrée, puisque les lymphocytes T CD8 OT-1 exposés au peptide OVA de haute affinité expriment d'autant plus d'IRF4 que la quantité de peptide augmente (Yao et al.,

2013). Ainsi la force d'activation du TCR module la quantité d'IRF4 détectée dans des lymphocytes T CD8 récemment activés.

Une fois synthétisé, IRF4 va, en sa qualité de facteur de transcription, réguler l'expression de divers gènes contenant des séquences nucléotidiques spécifiques. Dans les parties suivantes, nous allons voir comment IRF4 accomplit son rôle de facteur de transcription.

3.2 Structure et mécanismes de base de la régulation transcriptionelle par IRF4

3.2.1 Mode d'interaction d'IRF4 avec son élément cis sur l'ADN

Chez l'Homme comme chez la souris, IRF4 possède un domaine N-terminal conservé au sein de la famille IRF. Ce domaine d'environ 120 acides aminés constitue le domaine de liaison à l'ADN. La séquence nucléotidique canonique reconnue est GAAA, mais d'autres nucléotides autour de cette séquence participent également à la stabilisation de l'interaction. La première structure cristallographique d'un des membres de la famille IRF, IRF1, en interaction avec l'ADN, a révélé la nature de cette interaction et les acides aminés impliqués (Escalante et al., 1998). Le mode d'interaction est extrêmement proche de celui d'IRF4 (Escalante et al., 2002) (Fig 19).

La séquence *cis* optimale reconnue par le domaine de liaison à l'ADN des protéines IRF serait AAnnGAAA(C). Cette séquence nucléotidique est contenue au sein d'éléments *cis* nommés ISRE pour Interferon Stimulated Response Element, communément organisés sous forme de tandems tels que A/GnGAAAnnGAAACT (Huber and Lohoff, 2014).

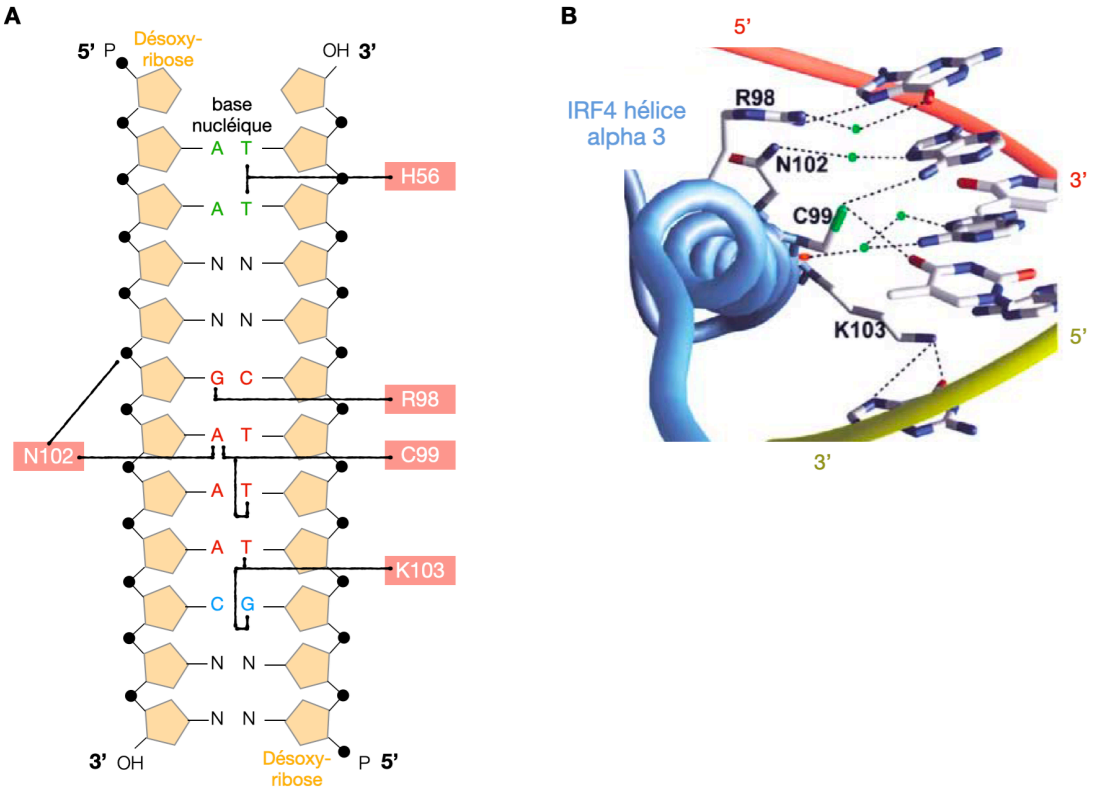


Figure 19. Interactions principales entre IRF4 et l'ADN.
(A) Schéma des interactions principales entre les nucléotides reconnus par IRF4, et les acides aminés responsables de cette reconnaissance. Deux acides aminés absolument conservés au sein de la famille IRF, l'arginine 98 (R98) et la cystéine 99 (C99), sont responsables de la spécificité envers les 3 premiers nucléotides du motif GAAA (en rouge). Un 3ème acide aminé, l'asparagine 102 (N102), contribue à la stabilisation de cette interaction. Le 4ème acide aminé en position 103, une sérine dans IRF1 et une lysine dans IRF4 (K103), interagit avec l'adénine n°4 du motif GAAA (en rouge). De plus, en raison de la longueur supérieure de la chaîne latérale de la lysine et de son groupement NH_3^+, celle-ci peut également réaliser une liaison hydrogène avec la base nucléique complémentaire au nucléotide adjacent au motif GAAA, à savoir une guanine (en bleu). L'ensemble de ces interactions a lieu dans le sillon majeur de l'ADN. Dans le sillon mineur de l'ADN, un autre acide aminé totalement conservé au sein de la famille IRF, l'histidine 56 (H56), réalise également des interactions deux nucléotides en amont de la séquence consensus (en vert). (B) Les acides aminés principalement responsables de la liaison d'IRF4 à l'ADN sont contenus dans l'hélice α3 d'IRF4. Adapté de Escalante et al., 2002.

3.2.2 Modulation des séquences liées par IRF4 en fonction de son partenaire

IRF4 possède également un domaine d'association lui permettant d'interagir avec d'autres facteurs de transcription (Fig 20a). Par conséquent, en fonction de son partenaire protéique, la séquence *cis* liée par IRF4 doit être intégrée à proximité de celle du motif nucléotidique reconnu par le facteur de transcription auquel IRF4 est associé. Au sein des lymphocytes T CD4, IRF4 interagit avec l'hétérodimère BATF-Jun, ce qui l'amène à lier des éléments composites AP-1-IRF (AICE) (Ciofani et al., 2012; Glasmacher et al., 2012; Li et al., 2012; Tussiwand et al., 2012). Cette observation s'applique également aux lymphocytes T CD8 (Kurachi et al., 2014; Man et al., 2013). Dans les lymphocytes T CD4, IRF4 est également capable d'interagir avec NFAT-1 et de lier des éléments composites NFAT-IRF (Rengarajan et al., 2002). Cette observation pourrait aussi s'appliquer aux lymphocytes T CD8 (Man et al., 2017). Les conséquences biologiques de ces interactions seront décrites plus tard.

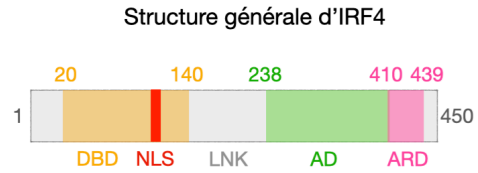
Au sein des lymphocytes B, IRF4 interagit avec le facteur de transcription de la famille Ets, PU.1, et lie des éléments *cis* composites Ets-IRF (Eisenbeis et al., 1995). En conjonction avec PU.1, IRF4 permet la différenciation de lymphocytes B activés par des antigènes T-dépendant en lymphocytes B germinatifs. Sans IRF4, cette différenciation est altérée, et restaurer l'expression d'IRF4 de façon transitoire permet de restaurer la différenciation en lymphocytes B germinatifs (Ochiai et al., 2013). En revanche, si la surexpression d'IRF4 demeure soutenue, la différenciation des lymphocytes B IRF4$^{-/-}$ est favorisée vers la production de plasmocytes sécréteurs d'anticorps (Ochiai et al., 2013). Comment l'expliquer ?

Lors de l'activation de lymphocytes B par leur BCR et de leur costimulation par CD40, ceux-ci expriment IRF4 dès le jour 1. L'analyse par ChIP-seq de lymphocytes B au jour 1 après activation a révélé que ces hétérodimères PU.1-IRF sont exclusivement liés à des motifs Ets-IRF au niveau de gènes contrôlant la différenciation en lymphocytes B germinatifs, tels que Bcl-6. En revanche, au

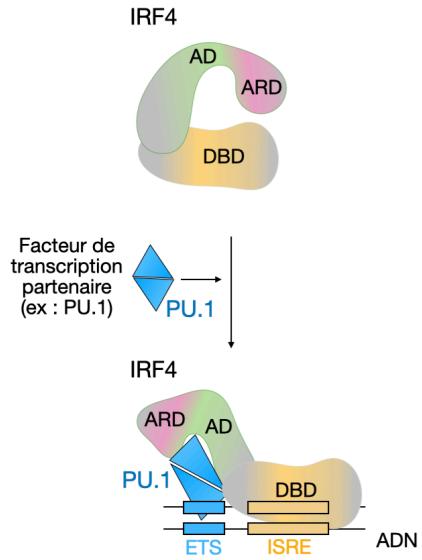
jour 3 après activation, la quantité d'IRF4 est nettement supérieure. À ce moment, l'analyse ChIP-seq de ces cellules révèle que IRF4 est lié aux éléments *cis* ISRE tandems (GAAA-nn-GAAA) au niveau de gènes régulant la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps, tels que Blimp-1 (Ochiai et al., 2013). L'analyse *in vitro* du type de liaison réalisé avec ces éléments révèle que IRF4 interagit avec ces éléments *cis* ISRE sous la forme d'homodimère. L'affinité de ces homodimères pour l'élément *cis* ISRE est moindre que celle de l'hétérodimère PU.1-IRF4 pour l'élément *cis* composite Ets-IRF, ce qui suggère l'importance d'un excès d'IRF4 pour permettre la mise en place d'un tel programme transcriptionnel (Ochiai et al., 2013). Ainsi, cette étude a élégamment mis en évidence que IRF4 peut, en fonction de sa concentration cellulaire et donc de son partenaire, interagir avec des éléments *cis* différents, ce qui aboutit à des programme transcriptionnels divergents.

En conclusion, IRF4 peut lier l'ADN en partenariat avec NFAT et BATF-Jun dans les lymphocytes T, et avec PU.1 ou lui-même dans les lymphocytes B (Fig 20c).

A



B



C

Activité d'IRF4 sur l'ADN en fonction du partenaire protéique avec lequel IRF4 interagit

Partenaire	NFAT-1	BATF	PU.1	IRF4	aucun
Element *cis* reconnu	NFAT-ISRE	AICE	Ets-ISRE	ISRE-ISRE	ISRE
Affinité	++	++	++	+	+/-
Type cellulaire	LT CD4 & CD8	LT CD4 & CD8	LB	LB	LB

Figure 20. La structure d'IRF4 le rend dépendant de son interaction avec d'autres facteurs de transcription afin d'interagir efficacement avec l'ADN.

(A) IRF4 possède un domaine de liaison à l'ADN (DBD), une séquence de localisation nucléaire (NLS), une région charnière ou « linker » (LNK), un domaine d'association avec d'autres protéines (AD), et un microdomaine autorégulateur (ARD). (B) Modèle proposé par Brass et al en 1999 décrivant un mécanisme par lequel IRF4 est recruté, ou non, sur l'ADN. Sous forme monomérique, le microdomaine autorégulateur d'IRF4 empêche le domaine de liaison à l'ADN d'interagir efficacement avec l'ADN. Suite à l'interaction d'IRF4 avec un partenaire protéique, ce microdomaine autorégulateur est déplacé. Le domaine de liaison à l'ADN interagit alors efficacement avec l'élément cis ISRE, permettant le recrutement d'IRF4 sur l'ADN. (C) Partenaires protéiques d'IRF4 dans les lymphocytes T CD4, CD8 et les lymphocytes B. Les éléments cis reconnus sont dépendants du partenaire d'interaction d'IRF4. Lorsqu'abondant, IRF4 peut former un homodimère, dont l'affinité pour l'ADN est inférieure à celle de l'hétérodimère IRF4-PU.1. Sans partenaire protéique, IRF4 est rapporté comme étant faiblement en mesure de se lier à l'ADN.

LT = lymphocyte T ; LB = lymphocyte B ; AICE = AP-1-IRF Composite Element ; ISRE = Interferon Stimulated Response Element.

(A) et (B) Adapté de Brass et al., 1996.

3.2.3 IRF4 nécessite des partenaires protéiques pour lier l'ADN avec force

La capacité d'IRF4 à se lier à l'ADN en conjonction avec divers facteurs de transcription n'est pas anodine. En fait, sous forme monomérique, IRF4 possède une faible capacité de liaison à l'ADN. Les raisons sous-jacentes ont fortement été étudiées dans les lymphocytes B avec son partenaire protéique PU.1.

En l'absence de PU.1, IRF4 ne peut induire la transcription de ses gènes cibles et son interaction avec les éléments composites Ets-IRF est faible (Brass et al., 1996; Eisenbeis et al., 1995; Perkel and Atchison, 1998). En cause, la présence au sein d'IRF4 d'un micro-domaine autorégulateur d'une vingtaine d'acides aminés à l'extrémité C-terminale de son domaine d'association (Fig 20a). Lorsque ce domaine est muté, IRF4 devient capable de lier l'ADN sous forme monomérique, mais perd la capacité à former un complexe protéique avec PU.1 (Brass et al., 1996, 1999). Ceci suggère que ce micro-domaine autorégulateur comporte à la fois des acides aminés essentiels à la régulation de la liaison d'IRF4 à l'ADN, mais aussi à son interaction avec d'autres facteurs de transcription. C'est pourquoi il a été proposé que sous forme monomérique, IRF4 est peu capable de lier sa séquence *cis* en raison de ce domaine autorégulateur. Suite à l'interaction entre IRF4 et son partenaire protéique, ce domaine autorégulateur est déplacé, permettant à IRF4 de se lier efficacement à l'ADN (Bovolenta et al., 1994; Brass et al., 1996, 1999; Remesh et al., 2015) (Fig 20b).

Ce mécanisme de recrutement d'IRF4 sur l'ADN sous la dépendance d'un partenaire protéique a également été observé pour NFAT-1 : la mutation du micro-domaine autorégulateur d'IRF4 affecte son interaction avec NFAT-1 et la transcription du gène qu'il lie en synergie avec NFAT-1 (Rengarajan et al., 2002).

3.2.4 IRF4 peut-il avoir une activité sous forme monomérique ?

Dans les lymphocytes B, le recrutement d'IRF4 aux motifs Ets-IRF renforce la transcription du gène associé, indiquant qu'IRF4 possède un domaine transactivateur. En l'absence de PU.1, IRF4 ne peut induire la transcription de son gène cible et son interaction avec l'ADN est faible (Brass et al., 1996; Eisenbeis et al., 1995; Perkel and Atchison, 1998). Cette affinité moindre d'IRF4 pour l'ADN demeurerait toutefois suffisante à inhiber le recrutement et l'activité transcriptionnelle d'autres membres de la famille IRF au niveaux des éléments *cis* ISRE (Bovolenta et al., 1994; Brass et al., 1996; Yamagata et al., 1996). Cette compétition avec d'autres facteurs pour un même élément *cis* constituerait un mécanisme répresseur de la transcription par IRF4 lorsqu'il est sans partenaire.

Alternativement, il a été proposé qu'IRF4 monomérique peut se lier à l'ADN avec une force suffisante pour permettre le recrutement de protéines répressives de la transcription, ce qui suggérerait qu'IRF4 possède aussi un domaine transrépresseur (Yamagata et al., 1996). À cet effet, il a été montré que IRF4 seul peut réprimer l'expression du gène de la luciférase sous contrôle d'un promoteur auquel il se lie via le motif ISRE. Cet effet répresseur est accentué si IRF4 interagit avec IRF8 (Rosenbauer et al., 1999). De même, dans les lymphocytes B, IRF4 se lie au promoteur de Bcl-6 et réprime son expression, mais le mécanisme sous-jacent n'a pas été identifié (Saito et al., 2007).

En conclusion, IRF4 a un rôle ambivalent complexe puisqu'il est en mesure de rentrer en compétition avec d'autres facteurs de transcription pour un même élément *cis*, sans être capable pour autant d'induire la transcription du gène auquel il est lié. Lors de son interaction avec un partenaire protéique, IRF4 se lie stablement à l'ADN. Là, il permettrait d'augmenter la transcription du gène qu'il régule grâce à son domaine transactivateur. Les gènes que IRF4 régulent dépendent de sa concentration et de ses partenaires protéiques. Ce constat suggère que IRF4 a évolué de sorte à pouvoir interagir avec divers facteurs de

transcription, facilitant de fait son recrutement à des éléments régulateurs géniques variés. Dans les parties suivantes, nous allons examiner plus en détail le mécanisme de fonctionnement d'IRF4 avec ses partenaires protéiques pour réguler la transcription dans les lymphocytes T.

3.3 Régulation de la transcription par IRF4-NFAT dans les lymphocytes T

Un facteur de transcription majeur avec lequel IRF4 interagit et régule la transcription dans les lymphocytes T est NFAT-1 (Lee et al., 2009; Man et al., 2017; Rengarajan et al., 2002). Le recrutement d'IRF4 aux gènes liés par NFAT-1 augmente leur transcription. Ceci a été démontré au sein de lymphocytes T CD4 murins primaires et au sein de lymphocytes T CD4 humains de la lignée Jurkat avec les gènes encodant IL-2, l'IL-4, l'IL10 (Lee et al., 2009; Rengarajan et al., 2002). Cet effet est issu d'une activité transactivatrice, puisque la transfection transitoire du plasmide encodant la luciférase sous contrôle du promoteur du gène humain de l'IL-4 mène à son activation en présence d'IRF4 et de NFAT-1 (Rengarajan et al., 2002). Des résultats similaires ont été obtenus avec le gène encodant l'IL-10, et du ChIP sur des lymphocytes T CD4 polarisés en Th2 *in vitro* confirme bien que IRF4 et NFAT-1 sont liés au promoteur du gène encodant l'IL-10 (Lee et al., 2009). Conformément à la faible capacité de liaison d'IRF4 à l'ADN sans partenaire protéique, IRF4 est incapable d'activer l'expression de son gène cible en l'absence de NFAT-1 (Lee et al., 2009; Rengarajan et al., 2002).

Peu d'informations existent quant à la relevance de ce complexe dans les lymphocytes T CD8. Seule une étude fait état d'une colocalisation de IRF4 et BATF à proximité des éléments *cis* liés par NFAT-1 (Man et al., 2017). Précisément, 45% des gènes auxquels IRF4 se lie dans les lymphocytes T CD8 effecteurs sont également liés par BATF et NFAT-1. De plus, IRF4 est également détecté sur des gènes avec NFAT-1 sur lesquels BATF n'est pas présent dans 25% des cas (Man et al., 2017) (Fig 21a). La présence concomitante de IRF4, NFAT-1 et BATF aux gènes où ils sont liés se retraduit par une proximité physique des éléments *cis* qu'ils reconnaissent (Fig 21b). Par exemple, la moitié des séquences *cis* auxquels NFAT est lié via le motif GGAAA sont localisées à moins de 25bp des séquences *cis* auxquels IRF4 est lié via le motif GAAA (Man et al., 2017) (Fig 21c).

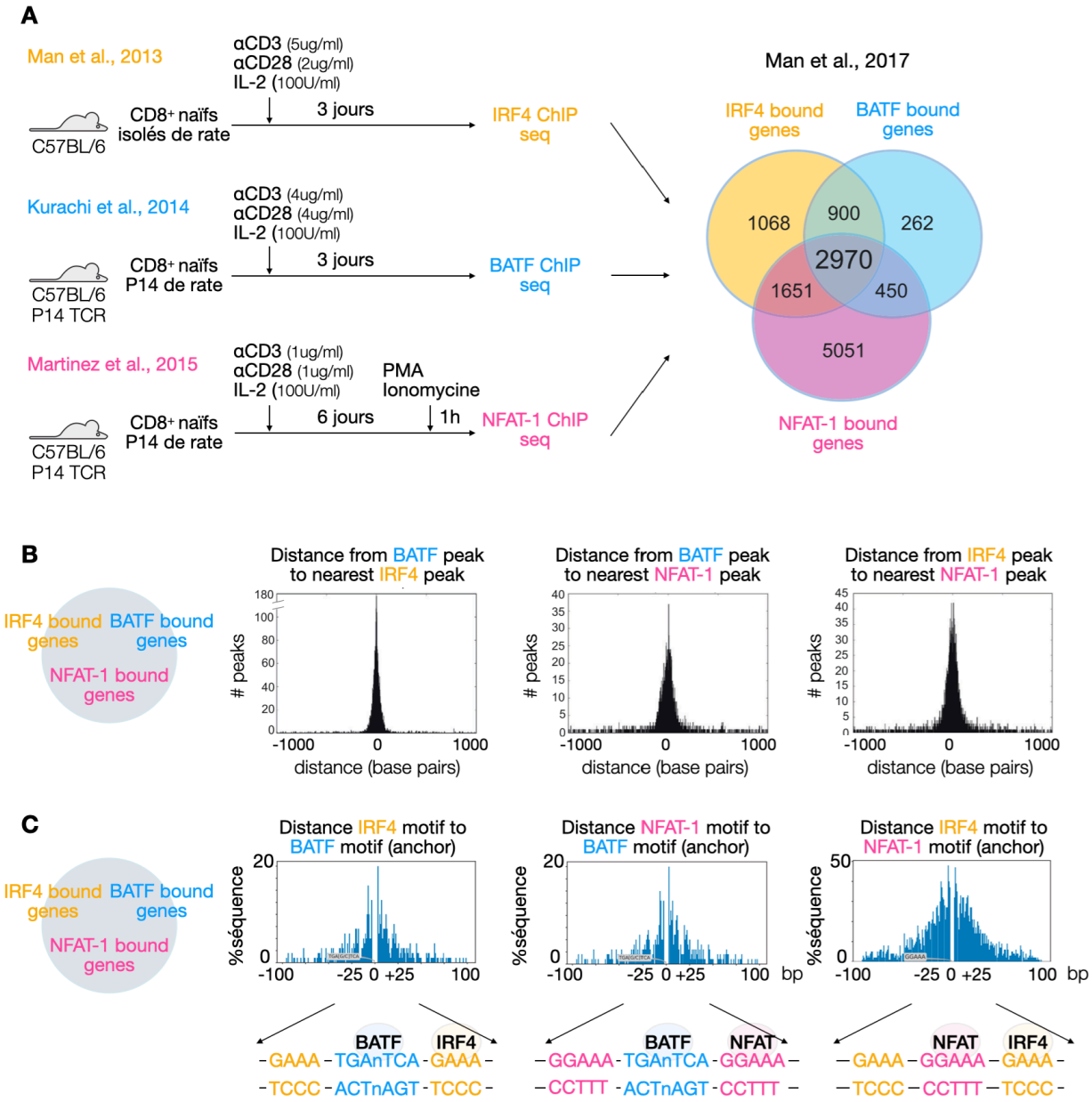


Figure 21. BATF-Jun et NFAT comme partenaires protéiques de IRF4 dans les lymphocytes T CD8.

(A) Trois groupes distincts de recherche ont activés in vitro des lymphocytes T CD8 naïfs avec des anticorps dirigés contre CD3 et CD28 puis ont analysé par ChIP-seq l'ensemble des gènes liés par IRF4, BATF et NFAT-1. À droite figure un Venn Diagram illustrant l'ensemble des gènes qui sont liés par un, deux ou trois facteurs de transcription. (B) Les régions de chromatine coimmunoprécipitées avec IRF4, BATF ou NFAT-1 sont nommées « pics ». La distance entre les pics spécifiques à chaque facteur de transcription a été déterminée, et indique que IRF4, BATF et NFAT-1 se lient dans des régions de chromatine voisines. (C) Les motifs nucléotidiques reconnus par IRF4, NFAT et BATF sont nommés éléments cis. Parmi les séquences liées par NFAT-1, IRF4 et BATF, près de 50% des séquences avec un élément cis NFAT-1 sont localisées à < de 25bp d'un élément cis IRF4 (panel tout à droite). Parmi les séquences liées par NFAT-1, IRF4 et BATF, près de 40% des séquences avec un élément cis BATF sont localisées à < de 25bp d'un élément cis IRF4 (panel tout à gauche) ou NFAT-1 (panel central).
Adapté de Man et al., 2017.

3.4 Régulation de la transcription par IRF4-BATF-Jun dans les lymphocytes T

3.4.1 IRF4 lie des éléments AICE sur l'ADN en partenariat avec BATF-Jun

En 2012, plusieurs études employant du ChIP-seq ont révélé que dans les lymphocytes T CD4 murins, IRF4 se lie à des éléments composites AP-1-IRF (AICE) (Ciofani et al., 2012; Glasmacher et al., 2012; Li et al., 2012; Tussiwand et al., 2012). Les éléments *cis* AP-1 étant liés par l'hétérodimère Jun-BATF, ceci suggère que IRF4 coopère avec l'hétérodimère Jun-BATF pour réguler la transcription aux éléments composites AICE. Deux types d'AICE ont été décrits : l'un contient les élément *cis* AP-1 et ISRE adjacents l'un à l'autre, (motif AICE2 GAAATGAnTCA), l'autre contient un espace de 4 nucléotides entre les 2 éléments *cis* (motif AICE1 TTTCnnnnTGAnTCA).

Lorsque du ChIP-seq contre IRF4 est réalisé sur des lymphocytes T CD4 $BATF^{-/-}$, la quantité de séquences comptées est drastiquement réduite, indiquant la dépendance de IRF4 envers BATF afin d'interagir avec les motifs AICE. De même, l'occupation des motifs AICE par BATF au sein de lymphocytes T CD4 $IRF4^{-/-}$ est également réduite (Ciofani et al., 2012; Li et al., 2012). En fait, au sein de lymphocytes T CD4 Th17, les données de ChIP-seq obtenues en immunoprécipitant BATF, IRF4, ou divers membres de la famille Jun, ont révélé que ces protéines sont colocalisées sur l'ADN. Par exemple, 54% des sites liés par IRF4 sont liés par BATF, 65% des sites liés par BATF sont liés par IRF4, et la vaste majorité des sites liés par c-Jun et JunB sont colocalisés avec BATF et/ou IRF4 (Li et al., 2012). Glasmacher et al ont mesuré que 50% des sites liés par BATF étaient colocalisés avec IRF4, tandis que 80% des sites liés par IRF4 colocalisent avec BATF (Glasmacher et al., 2012). Ces données suggèrent que BATF-Jun et IRF4 sont recrutés ensemble au niveau des AICE.

L'incubation d'extraits nucléaires de lymphocytes T CD4 avec une sonde nucléotidique de séquence déterminée par ChIP-seq a révélé que IRF4, BATF et Jun forment bien un complexe sur les éléments AICE. Cette liaison est

coopérative puisque des extraits nucléaires de cellules 293T transfectées pour exprimer l'une ou l'autre protéine seule n'aboutit pas à une liaison à la sonde nucléique, tandis que les extraits nucléaires des 293T exprimant les 3 partenaires protéiques aboutit à la liaison de ce complexe sur la sonde (Glasmacher et al., 2012; Li et al., 2012). La mutation de 2 nucléotides du motif ISRE (GAAA) inhibe également le recrutement d'IRF4 sur les éléments AICE, indiquant que la liaison est coopérative tant au niveau protéique que nucléotidique (Glasmacher et al., 2012; Li et al., 2012). Toutefois, IRF4 peut tolérer des éléments AICE dégénérés dans lesquels le motif ISRE a un de ses 4 nucléotides remplacés par une thymidine, et ce constat a été validé par ChIP-seq (Glasmacher et al., 2012).

L'absence d'IRF4 affecte variablement la liaison de l'hétérodimère BATF-Jun sur les éléments AICE de la sonde nucléique, tandis que sans BATF-Jun, la liaison d'IRF4 à l'élément AICE est drastiquement affectée (Ciofani et al., 2012; Glasmacher et al., 2012; Li et al., 2012). Ceci est cohérent puisque IRF4 possède une faible affinité pour l'ADN sous forme monomérique et son recrutement stable à l'ADN dépend de sa liaison avec un partenaire protéique.

La coopération de l'hétérodimère BATF-Jun avec IRF4 aux motifs AICE se retraduit par l'activation de la transcription des gènes auxquels ils sont liés dans les lymphocytes T CD4 Th17 tels que *Ctla4*, *Il10*, *Il17* (Ciofani et al., 2012; Glasmacher et al., 2012; Li et al., 2012). Lorsque des lymphocytes T CD4 BATF$^{-/-}$ sont cultivés dans des conditions polarisant leur différenciation en Th17, la production de la cytokine phare de ce phénotype, l'IL-17, est diminuée. La réintroduction par transduction rétrovirale de BATF restaure la production d'IL-17, à moins que le résidu His 55 de BATF ne soit muté. Or, cet acide aminé est impliqué dans le recrutement d'IRF4 sur les motifs AICE (Glasmacher et al., 2012; Tussiwand et al., 2012). Ceci démontre l'importance réciproque de IRF4 et BATF pour la transcription de gènes avec des fonctions clés.

3.4.2 Identification d'éléments cis AICE de haute et faible affinité pour IRF4

Un niveau de complexité supérieur dans la régulation des gènes par BATF et IRF4 est à noter. En plus de reconnaître les éléments *cis* AICE1 et AICE2, l'élément AICE2 (GAAATGAnTCA) possède une affinité pour Jun-BATF-IRF4 qui varie en fonction de la séquence nucléotidique flanquant le site AICE2 (Fig 22a et b). En particulier, si le 4ème nucléotide en amont du site est une thymidine (Tnnn-AICE2), ceci produit un site AICE2 avec une affinité supérieure pour IRF4 (Iwata et al., 2017). Ce détail n'est pas anodin.

La quantité d'IRF4 et BATF induite après activation d'un lymphocyte T dépend de la force d'activation du TCR. Lorsque des lymphocytes T CD4 Th2 sont activés avec une faible dose d'anti-CD3, les gènes contenant ce motif AICE2 optimal sont préférentiellement liés par IRF4 et BATF et transcrits : c'est le cas de GATA3 ou IL-10. En revanche, toute une panoplie de gènes tels que Ctla4 et Hif1a n'est liée et transcrit qu'à des doses d'anti-CD3 2 à 4x supérieure. En accord, le motif AICE2 de ces gènes ne contient généralement pas de thymidine 4 nucléotides en amont (Iwata et al., 2017). Par l'existence de ces 2 variantes de motif AICE2, il est ainsi possible de réguler spécifiquement des gènes en fonction de la quantité de IRF4 induite, et donc de la force d'activation du TCR (Fig 22b).

Chez l'Homme, au locus de CTLA4, un polymorphisme nucléotidique (G → T) 4 nucléotides en amont du motif AICE2 est associé à une protection du développement d'arthrite rhumatoïde et de la granulomatose avec polyangéite (Iwata et al., 2017). Ce polymorphisme correspond à la séquence d'un motif AICE2 de haute affinité (Fig 22c). Pour en tester la relevance, une construction rétrovirale contenant la GFP sous contrôle du promoteur humain du gène CTLA4 et de l'élément AICE2 avec ou sans le polymorphisme a été utilisé. Les lymphocytes T CD4 transduits sont activés à des doses croissantes d'anti-CD3.

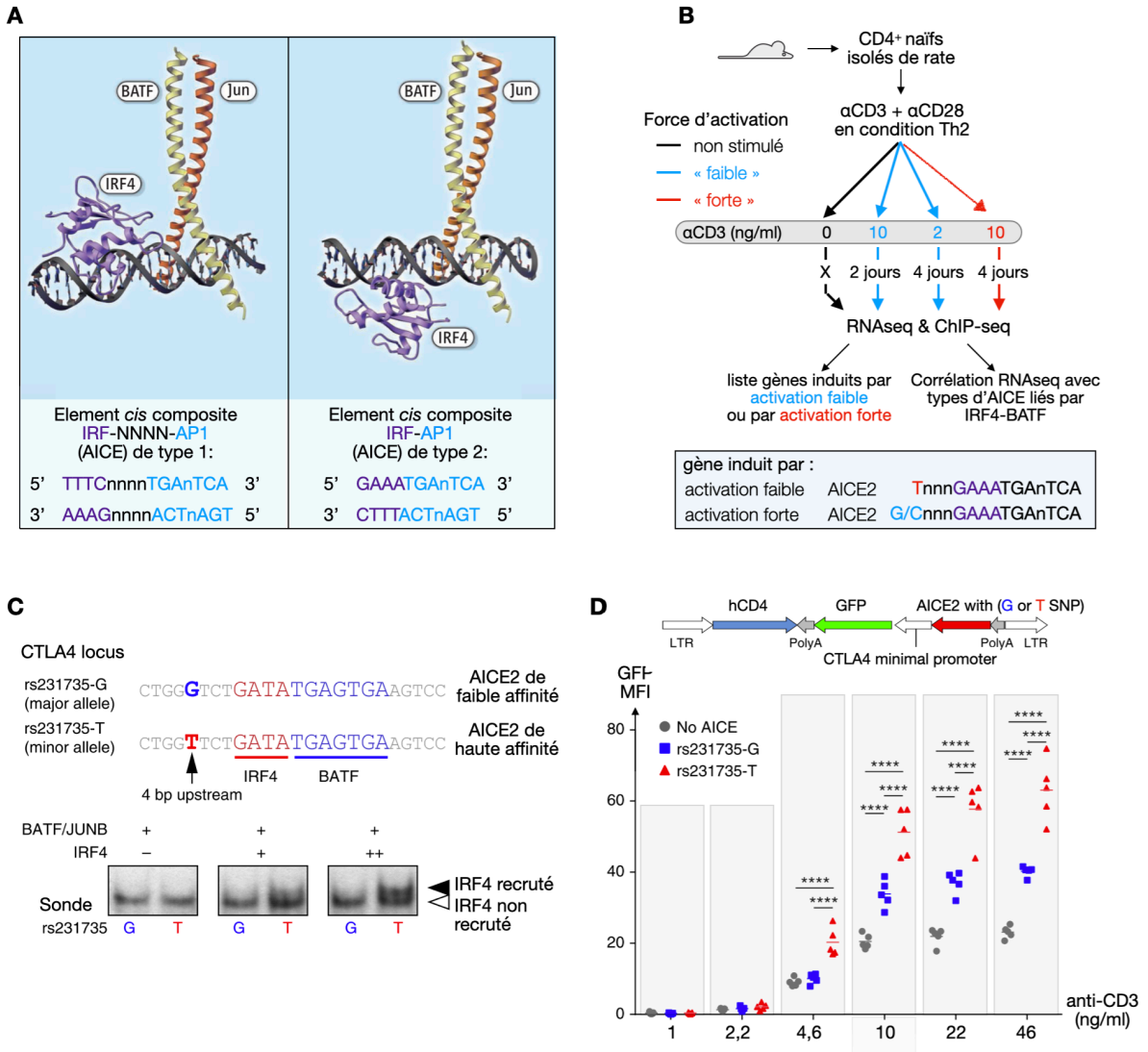


Figure 22. Les éléments cis AICE reconnus par IRF4 et BATF-Jun dans les lymphocytes T CD4 et CD8.

(A) IRF4 interagit avec l'hétérodimère BATF-Jun pour lier des éléments composites AP1-IRF (AICE). Les AICE se composent de l'élément cis ISRE de IRF4 et de l'élément AP-1 lié par l'hétérodimère BATF-Jun. Deux types d'AICE sont détectés par ChIP-seq dans les lymphocytes T CD4 et CD8 : les AICE de type 1 et les AICE de type 2. Figure de Martinez et Rao., 2012. (B) Les motifs AICE des gènes induits suite à une activation faible ou forte du TCR ont été définis. Puisqu'IRF4 et BATF sont présents en quantité moindre lors d'une activation faible du TCR, il a été proposé que les gènes qu'ils régulent détiennent un AICE de haute affinité, tandis que les gènes nécessitant une quantité supérieure d'IRF4 et BATF pour être exprimés détiendraient un AICE de faible affinité. Les AICE associés aux gènes induits par une activation faible et forte a été défini par ChIP-seq. (C) Les sondes nucléotidiques employées sont basées sur la séquence d'un polymorphisme au locus de CTLA4 chez l'Homme, dans lequel l'élément AICE comporte ou non une thymidine 4 nucléotides en amont. Le gel retard montre des extraits nucléaires de 293T transfectés pour exprimer BATF/JunB et incubés avec la sonde nucléique et des quantités croissantes d'IRF4. La sonde nucléique est liée par IRF4 en présence d'une thymidine en amont du AICE. (D) Des lymphocytes T CD4 Th2 ont été transduits avec une construction rétrovirale rapporteuse. La GFP est sous contrôle du promoteur de CTLA4. En amont se trouve un enhancer contenant ou non l'élément AICE 2 de haute (T) et faible (G) affinité pour IRF4. L'intensité d'expression de la GFP est plus forte en réponse à l'activation du TCR lorsque l'élément AICE2 contient une thymidine en amont. Iwata et al., 2017.

A partir de 4ng/ml, la GFP est exprimée, mais son niveau d'induction est supérieur si l'élément AICE2 est associée au polymorphisme G → T qui rend les motifs AICE2 plus affins pour les complexes IRF4-BATF-Jun (Iwata et al., 2017) (Fig 22c et d). Ainsi, ce motif AICE2 de haute affinité, rapporté comme un polymorphisme protecteur chez l'Homme, permet d'induire l'expression de CTLA-4 de manière plus efficace après activation du TCR, ce qui est loin d'être négligeable étant donné le rôle protecteur de CTLA-4 face au développement de maladies auto-immunes (Leonardo et al., 2016).

3.4.3 Comment IRF4 et BATF régulent-ils la transcription ?

Deux mécanismes majeurs peuvent être mentionnés pour expliquer la régulation positive de la transcription par le complexe IRF4-BATF-Jun.

Le premier est issu de l'activité transactivatrice de ce complexe. En effet, lorsque des lymphocytes T CD4 sont transfectés avec un plasmide contenant un gène rapporteur sous contrôle d'un promoteur avec un élément AICE, ce gène est exprimé à moins que l'élément AICE ne comporte une mutation dans le motif AP-1 ou dans le motif ISRE (Glasmacher et al., 2012; Li et al., 2012).

Le deuxième mécanisme serait issu d'une activité de remodelage de la chromatine. Cette proposition provient du constat suivant : lors de la différenciation des lymphocytes T CD4 en Th17, des facteurs de transcription clés sont recrutés à des éléments *cis* localisés dans le voisinage des éléments AICE liés par IRF4-BATF-Jun. Si IRF4 ou BATF est absent, les éléments *cis* liés par les facteurs de transcription régulant la différenciation en Th17 sont moins accessibles, suggérant qu'IRF4 et BATF refaçonnent la chromatine localement (Ciofani et al., 2012). Un constat similaire a été réalisé au sein de lymphocytes T CD4 $IRF4^{-/-}$ exposés à de l'IL-21, dans lesquels le recrutement de STAT3 à ses éléments *cis* dans le voisinage d'IRF4 est altéré (Kwon et al., 2009).

3.4.4 IRF4-BATF-Jun dans les lymphocytes T CD8 également ?

Dans les lymphocytes T CD8 effecteurs, IRF4 collabore également avec l'hétérodimère Jun-BATF au niveaux des éléments composites AP1-IRF (Kurachi et al., 2014; Man et al., 2013). Entre 2000 et 2500 gènes sont liés par IRF4 au jour 3 de l'activation de lymphocytes T CD8 naïfs avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Kurachi et al., 2014; Man et al., 2013). En comparant le transcriptome de lymphocytes T CD8 $IRF4^{+/+}$ et $IRF4^{-/-}$, il a pu être montré que 75% des gènes auxquels IRF4 est lié sont sous-exprimés en l'absence d'IRF4 (Man et al., 2013). Ceci suggère que lors de la différenciation des lymphocytes T CD8 en cellules effectrices, IRF4 exerce plutôt un rôle activateur que répresseur de l'expression des gènes qu'il régule. En combinant par ChIP-seq l'analyse des régions liées par IRF4 et BATF à celle de diverses modifications épigénétiques associées aux histones, il a été montré que IRF4 et BATF sont majoritairement localisés au niveau de sites enhancer plutôt qu'au niveau de promoteurs (Kurachi et al., 2014).

En combinant les données de ChIP-seq des 2 études décrites ci-dessus, Man et al ont rapporté en 2017 que 45% des gènes auxquels IRF4 se lie dans les lymphocytes T CD8 effecteurs sont également liés par BATF et NFAT-1 (Man et al., 2017). De plus, IRF4 est également détecté sur des gènes avec BATF sur lesquels NFAT-1 n'est pas présent dans 14% des cas (Man et al., 2017). Enfin, IRF4 est immunoprécipité indépendamment de BATF et NFAT-1 sur 16% des gènes qu'il lie, tandis que BATF est immunoprécipité indépendamment de IRF4 et NFAT-1 sur 6% des gènes qu'il lie (Man et al., 2017).

Ces données démontrent l'importance réciproque de BATF et IRF4 pour leur liaison à l'ADN. Elles montrent aussi que IRF4 est un facteur de transcription dont la structure et le fonctionnement lui offre une polyvalence importante quant à la variété de gènes qu'il peut réguler. Ceci laisse présager que les évènements

biologiques qu'il produit en conséquence de son activité sur l'ADN sont nombreux et variés. C'est ce que nous allons voir dans la dernière partie qui suit.

3.5 Rôles (parfois) ambigus d'IRF4 dans les lymphocytes T CD8

3.5.1 Modèle murin et rôle d'IRF4 dans le développement des thymocytes

Le rôle d'IRF4 a largement été étudié en utilisant des souris Irf4$^{-/-}$ ou Irf4$^{fl/fl}$ Gzmb Cre. Le second système a pour avantage de restreindre le KO de IRF4 aux lymphocytes T acquérant l'expression de granzyme B suite à leur activation et différenciation causée par leur antigène (Man et al., 2013; Yao et al., 2013). Alternativement, des modèles de souris dans lesquels la Cre recombinase est sous contrôle du promoteur de CD8α ou de Lck ont également été employés, ce qui entraine le KO de IRF4 au cours du développement des lymphocytes T dans le thymus (Man et al., 2013; S. Yao et al., 2013). Ce modèle semble acceptable pour étudier le rôle d'IRF4 au sein des lymphocytes T CD8 matures, car l'absence d'IRF4 dès le stade double positif du développement des thymocytes est sans conséquence (Man et al., 2013; Nayar et al., 2012).

3.5.2 IRF4 soutient la prolifération et l'expansion des lymphocytes T CD8

Lorsque les lymphocytes T CD8 naïfs sont isolés de la rate de souris puis activés *in vitro* avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28, l'absence d'IRF4 n'affecte pas les premiers évènements conséquents à leur activation. En effet, sur les 4 jours d'analyse, divers marqueurs d'activation sont normalement exprimés (Man et al., 2013). Des résultats similaires ont été obtenus en activant les lymphocytes T CD8 avec un anti-CD3 soluble et des cellules dendritiques (S. Yao et al., 2013). En revanche, la prolifération mesurée par dilution d'une sonde cellulaire sur les 3-4 jours suivant leur activation est variablement affectée. Tandis que des lymphocytes T CD8 Irf4$^{-/-}$ activés avec anticorps anti-CD3 et CD28 prolifèrent normalement (Man et al., 2013), les lymphocytes T CD8 Irf4$^{fl/fl}$ CD8a Cre activés

avec un anti-CD3 soluble et des cellules dendritiques montrent un retard de prolifération (S. Yao et al., 2013).

Il n'en demeure pas moins que même si IRF4 n'impacte pas directement la prolifération des lymphocytes T CD8, leur expansion et accumulation est dépendante de IRF4. En effet, le nombre de lymphocytes T CD8 comptabilisés dès le jour 3 de l'activation est 3-4x inférieur en l'absence d'IRF4 (Man et al., 2013; S. Yao et al., 2013). *In vivo*, en réponse à une infection aigüe avec le virus de la grippe, des lymphocytes T CD8 reconnaissant les peptides viraux NP366 et PA224 sont produits et se localisent au sein de divers organes tels que les poumons et la rate. Toutefois, aux jours 9-10 de l'infection de souris $Irf4^{fl/fl}$ CD8a Cre, leur quantité est réduite (S. Yao et al., 2013). De même, lorsque des lymphocytes CD8 OT-I congéniques Ly5.1 $Irf4^{+/+}$ et Ly5.2 $Irf4^{-/-}$ sont cotransférés dans des souris exposées un jour avant à une infection avec le virus de la grippe exprimant le peptide OVA, le nombre de lymphocytes T CD8 $Irf4^{-/-}$ comptabilisés dans la rate et les poumons au jour 5 est 15 à 100x inférieur, et leur quantité continue de décliner au jour 10 (Man et al., 2013). Au même titre qu'IRF4 est requis pour l'expansion des lymphocytes T *in vitro*, IRF4 est nécessaire au soutien de l'expansion des lymphocytes T CD8 *in vivo*. Pourquoi ?

In vitro, l'expansion altérée des lymphocytes T CD8 $Irf4^{-/-}$ est corrélée à une mortalité supérieure en culture. Ceci a été mesurée par les marqueurs d'apoptose annexine V et caspase-3 active, ainsi que par l'intercalant 7-AAD qui marque l'ADN des cellules dont la membrane lui est perméable en raison d'une faible viabilité cellulaire (Man et al., 2013; S. Yao et al., 2013). De façon concordante, l'absence d'IRF4 au sein de lymphocytes T CD8 au jour 2 de leur activation *in vitro* est corrélée à une augmentation de l'expression de la molécule pro-apoptotique Bim. IRF4 étant détecté par ChIP au locus de Bim, ceci suggère qu'IRF4 réprime son expression (S. Yao et al., 2013). Ainsi, *in vitro*, l'absence d'IRF4 défavorise l'expansion des lymphocytes T CD8, vraisemblablement en

raison de la capacité d'IRF4 à promouvoir la survie cellulaire. Qu'en est-il *in vivo* ?

Au jour 7 de l'infection grippale, les lymphocytes T CD8 $Irf4^{fl/fl}$ CD8a Cre anti-PA224 expriment plus abondamment la molécule Bim et expriment la forme active de la caspase-3, en accord avec les données *in vitro* (S. Yao et al., 2013). Afin d'évaluer l'importance de ce phénomène sur le défaut d'expansion des lymphocytes T CD8 *in vivo*, des souris Ly5.2 $Irf4^{-/-}$ $Bim^{-/-}$ ou des souris Ly5.2 $Irf4^{-/-}$ Vav-Bcl-2 ont été utilisées. Dans le premier cas, la molécule pro-apoptotique Bim est déficiente, tandis que dans le second cas, la molécule anti-apoptotique Bcl-2 est surexprimée dans toutes les cellules hématopoïétiques. Des souris Ly5.1 receveuses ont été irradiées et reconstituées avec de la moelle osseuse Ly5.1 $Irf4^{+/+}$ et Ly5.2 $Irf4^{-/-}$ $Bim^{-/-}$ ou Ly5.2 $Irf4^{-/-}$ Vav-Bcl-2. Au jour 10 de l'infection de ces souris chimériques, les lymphocytes T CD8 $Irf4^{-/-}$ dirigés contre les antigènes grippaux NP366 et PA224 sont en proportion moindre que leurs homologues $Irf4^{+/+}$, et l'abolition de l'expression de Bim ou la surexpression de Bcl-2 ne contre pas le défaut observé (Man et al., 2013). Ainsi, des raisons autres que la dérégulation de la voie intrinsèque de l'apoptose en l'absence d'IRF4 participent à la faible expansion des lymphocytes T CD8 antiviraux *in vivo*. Quelles pourraient-elles être?

La prolifération des lymphocytes T est la conséquence directe de leur division lors de la mitose. L'entrée en phase mitotique nécessite le passage préalable des phases G1, S et G2 du cycle cellulaire. Ceci dépend de l'action concertée de cyclines et des kinases Cdk auxquelles elles s'associent. Ces kinases sont régulées par des inhibiteurs Cdkn. Lorsque IRF4 est absent, les inhibiteurs Cdkn1a, Cdkn2a et Cdkn1c sont détectés par PCR quantitative avec une abondance supérieure au jour 2 après activation *in vitro* (S. Yao et al., 2013). Ceci suggère qu'IRF4 favoriserait la prolifération cellulaire en réprimant l'expression

d'inhibiteurs de la progression du cycle cellulaire. En accord, IRF4 est détecté par ChIP au niveau du promoteur de Cdkn2a (S. Yao et al., 2013).

In vivo, des lymphocytes T CD8 OT-I Irf4$^{-/-}$ ont un retard de prolifération par rapport à leurs homologues OT-I Irf4$^{+/+}$ comme mesuré par dilution d'une sonde cellulaire 5 jours après infection avec le virus grippal exprimant OVA (Man et al., 2013). L'incorporation de BrdU par les lymphocytes T CD8 anti-PA224 au jour 7 post infection au virus de la grippe est également moindre en l'absence d'IRF4, indiquant un blocage dans le cycle cellulaire avant la phase de réplication d'ADN. En accord, les lymphocytes T CD8 Irf4$^{fl/fl}$ CD8a Cre isolés au jour 7 post infection expriment abondamment les inhibiteurs du cycle cellulaire Cdkn2a et Cdkn1c (S. Yao et al., 2013).

En conclusion, IRF4 favorise la prolifération et l'expansion des lymphocytes T CD8 en favorisant leur progression dans le cycle cellulaire ainsi que leur survie. Il est remarquable que dans ce contexte, IRF4 agit en exerçant un rôle répresseur sur l'expression de la molécule pro-apoptotique Bim et les inhibiteurs du cycle cellulaire tels que Cdkn2a, deux gènes sur lesquels IRF4 a été détecté par ChIP (S. Yao et al., 2013). Ce constat est d'autant plus remarquable que lorsque des lymphocytes T CD8 Batf$^{-/-}$ sont activés *in vitro*, aucun défaut de prolifération n'est mesuré, et l'expression de Cdkn2a, Cdkn1a et Cdkn1c est inchangée (S. Yao et al., 2013). La molécule pro-apoptotique Bim est quant à elle légèrement surexprimée, en accord avec une proportion supérieure de lymphocytes T CD8 Batf$^{-/-}$ exprimant la caspase-3 active. Mais l'effet est moindre que celui mesuré lorsque IRF4 est absent (S. Yao et al., 2013). Ceci suggère que le rôle répresseur d'IRF4 sur ces gènes est majoritairement indépendant de BATF.

3.5.3 IRF4 est nécessaire à la glycolyse

Nous avons vu que IRF4 soutient la prolifération et la survie des lymphocytes T CD8 suite à leur activation. Or, lorsque des lymphocytes T naïfs sont activés, leurs besoins énergétiques augmentent afin de pouvoir répondre aux nombreux

changements qu'engendrent leur prolifération et différenciation. Pour ce faire, ils augmentent leur apport énergétique en augmentant la phosphorylation oxydative et en passant à la glycolyse aérobie (Buck et al., 2015).

L'analyse du transcriptome des lymphocytes T OT-I Irf4$^{-/-}$ et Irf4$^{+/+}$ révèle que de nombreuses enzymes de la voie de la glycolyse sont sous-exprimées en l'absence d'IRF4 (Man et al., 2013). Cette observation découle probablement du fait que les facteurs de transcription régulant l'expression de ces enzymes, Foxo1, Foxo3 et Hif1a, sont également sous-exprimés en l'absence d'IRF4. De plus, IRF4 est détecté par ChIP-seq aux loci de Foxo1 et Hif1a, suggérant qu'IRF4 régule positivement leur expression (Man et al., 2013). Ensemble, ces données suggèrent que IRF4 soutient également la prolifération cellulaire en enclenchant la transcription de gènes au cœur de la glycolyse.

Le rôle d'IRF4 dans la glycolyse a été confirmé *in vitro.* La quantité de lactate excrétée dans le milieu des lymphocytes T CD8 Irf4$^{-/-}$ au jour 2 de leur activation est moindre, ce qui suggère une capacité réduite à métaboliser le glucose (Man et al., 2013). De plus, les lymphocytes T CD8 Irf4$^{-/-}$ parviennent moins efficacement à passer de la phosphorylation oxydative à la glycolyse (Man et al., 2013).

3.5.4 IRF4 est requis pour les fonctions effectrices des T CD8

Les souris Irf4$^{fl/fl}$ CD8a Cre ont une virémie 10x supérieure au jour 10 de leur infection grippale. De plus, lorsque les lymphocytes T CD4 sont déplétés, la proportion de souris Irf4$^{fl/fl}$ CD8a Cre succombant de l'infection est 4x supérieure aux souris contrôle (S. Yao et al., 2013). Peut-on incomber cet effet au seul rôle d'IRF4 dans la prolifération des lymphocytes T CD8 ?

En fait, 5 jours après une infection avec le virus de la grippe exprimant le peptide OVA, les lymphocytes T OT-I Ly5.2^{+} Irf4$^{-/-}$ produisent moins d'IFNγ et de TNFα que leurs homologues Ly5.1^{+} Irf4$^{+/+}$ suite à leur restimulation *ex vivo* à la PMA et ionomycine (Man et al., 2013). De même, l'expression de granzyme B est perdue en l'absence d'IRF4 (Man et al., 2013; S. Yao et al., 2013). Pourtant,

au jour 3 après infection, ces défauts sont mineurs (Man et al., 2013). Un constat similaire a été fait *in vitro* (S. Yao et al., 2013). Ceci suggère que IRF4 n'a pas empêché l'acquisition de fonctions effectrices par les lymphocytes T CD8 activés par leur antigène, mais qu'il contribuerait au maintien de leurs fonctions.

Deux facteurs de transcription essentiels à la différenciation des lymphocytes T CD8 naïfs en lymphocytes T effecteurs sont T-bet et Blimp-1 (Xin et al., 2016). En l'absence d'IRF4, les lymphocytes T CD8 $Irf4^{fl/fl}$ CD8a Cre isolés au jour 7 post infection expriment moins abondamment T-bet et Blimp-1 (S. Yao et al., 2013). Des résultats similaires ont été obtenus *in vitro* aux jours 2-3 après activation, timing auquel IRF4 est immunoprécipité au locus de Blimp-1 (S. Yao et al., 2013). Ces résultats suggèrent qu'IRF4 est nécessaire à l'expression de T-bet et Blimp-1, lesquels permettent à leur tour l'acquisition et le maintien de fonctions effectrices. D'ailleurs, en l'absence d'IRF4, les marques épigénétiques activatrices portées par l'histone H3 aux loci des gènes de l'IFNγ et de granzyme B sont altérées (S. Yao et al., 2013).

Collectivement, ces données suggèrent que lors d'une infection aigüe, IRF4 soutient la différenciation des lymphocytes T CD8 en cellules effectrices, notamment en soutenant l'expression des facteurs de transcription clés à l'acquisition de fonction effectrices, à savoir T-bet et Blimp-1. Une fois différenciées, ces cellules reposent également sur IRF4 pour leur expansion. Ces importants changements qui ont lieu sont énergétiquement assouvis par la mise en route de la glycolyse, là aussi régulée par IRF4.

Bien que ces données montrent un rôle clair pour l'acquisition des fonctions effectrices par les lymphocytes T CD8, rien n'exclue qu'IRF4 pourrait exercer un rôle distinct plus tardivement au cours de la vie de ces cellules, comme au sein de lymphocytes T mémoire. Une étude récente a testé cette hypothèse en utilisant un modèle murin de KO inductible complet ou partiel (Harberts et al., 2021). Des souris $Rag1^{-/-}$ ont été reconstituées avec des lymphocytes T issus de souris

congéniques $Irf4^{fl/+}$ ou $Irf4^{fl/-}$. La délétion de l'exon d'IRF4 a lieu en administrant du tamoxifène 5 semaines après l'infection avec *L.Monocytogenes*-OVA. Lorsque la capacité de production de cytokines des lymphocytes T CD8 est testée en les restimulant *ex vivo* avec le peptide OVA, les auteurs analysent la production de cytokines au sein de la population totale de lymphocytes T CD8. De fait, la proportion de cellules produisant des cytokines est biaisée par le nombre de lymphocytes T anti-OVA présents au sein de la population totale de lymphocytes T CD8 (Harberts et al., 2021).

En dépit de ce biais, les lymphocytes T $Irf4^{fl/+}$ et $Irf4^{KO/+}$ auraient une capacité de production similaire, tandis que les lymphocytes T $Irf4^{fl/-}$ et $Irf4^{KO/-}$ ont un défaut de production de cytokines, suggérant qu'IRF4 est requis pour la fonction des lymphocytes T mémoire (Harberts et al., 2021). Là aussi, un biais majeur est que les lymphocytes T $Irf4^{fl/-}$ ont un allèle d'IRF4 en moins dès le départ, donc lors de leur différenciation en cellules effectrices. Or, il a préalablement été montré que des lymphocytes T naïfs $Irf4^{+/-}$ ne se différencient pas correctement en cellules effectrices (Grusdat et al., 2014; Man et al., 2013; Raczkowski et al., 2013; Yao et al., 2013). Le défaut de production de cytokines des lymphocytes T mémoire sans IRF4 n'est-il donc pas plutôt attribuable à ce biais ?

3.5.5 Rôles positifs de l'abondance d'IRF4 dans les lymphocytes T CD8

À la vue des rôles d'IRF4 présentés, il semblerait que l'abondance d'IRF4 soit bénéfique aux lymphocytes T CD8.

En utilisant des souris $Irf4^{+/+}$, $Irf4^{+/-}$ ou $Irf4^{-/-}$, Man et al ont montré que l'effet d'IRF4 sur la prolifération et l'expansion des lymphocytes T antiviraux en réponse à une infection grippale aigüe est positivement corrélé à la quantité d'IRF4 disponible (Man et al., 2013). De plus, lorsque des lymphocytes CD8 OT-I sont stimulés par l'antigène OVA de faible affinité, leur prolifération et expansion *in vitro* et *in vivo* est moindre que celle induite par le peptide OVA de haute affinité, et ceci est corrélée aux niveaux d'IRF4 induits par la force de

stimulation du TCR (Man et al., 2013; S. Yao et al., 2013). Sans IRF4, cette réponse proportionnelle à la dose d'antigène rencontrée est nulle (Man et al., 2013). Ainsi, le comportement adopté par un lymphocyte T CD8 en fonction de la force du signal activateur qu'il a reçu est calibré par l'action d'IRF4.

L'analyse du transcriptome des lymphocytes T CD8 OT-I au 3ème jour de leur activation avec le peptide OVA de faible ou de haute affinité révèle que 683 gènes sont différentiellement exprimés. En l'absence d'IRF4, seuls 45 gènes sont différentiellement exprimés (Man et al., 2013). En d'autres termes, 95% des gènes différentiellement exprimés en réponse à des signaux activateurs du TCR de forces différentes dépendent d'IRF4. Ce constat est non sans rappeler le travail d'Iwata et al dans les lymphocytes T CD4 Th2, dans lesquels les gènes exprimés suite à une faible et forte activation du TCR sont associés à des éléments AICE de haute et faible affinité, respectivement (Iwata et al., 2017). Ainsi, dans les lymphocytes T CD8 également, IRF4 permet d'adapter la réponse cellulaire à la force du signal activateur reçu.

Il n'est donc pas surprenant que lorsqu'IRF4 est surexprimé au sein des lymphocytes OT-I stimulés par le peptide OVA de haute affinité, la prolifération augmente de manière modérée. En revanche, la surexpression d'IRF4 au sein des lymphocytes T OT-I stimulés avec le peptide OVA de faible affinité augmente considérablement la prolifération (S. Yao et al., 2013). Ceci indique que lorsqu'IRF4 est naturellement limitant, son apport exogène par transduction rétrovirale permet de compenser son abondance limitée et favorise alors la prolifération des lymphocytes T CD8 en dépit d'un faible signal activateur du TCR reçu.

Une observation similaire a été faite quant aux fonctions effectrices des lymphocytes T. Lorsque des lymphocytes OT-I sont stimulés avec le peptide OVA de haute affinité, la surexpression d'IRF4 est sans impact sur leur capacité à produire de l'IFNγ suite à leur restimulation à la PMA et ionomycine. En

revanche, lorsque IRF4 est surexprimé au sein des lymphocytes T CD8 stimulés par les peptides OVA de moyenne et faible affinité, la surexpression d'IRF4 renforce la production d'IFNγ (S. Yao et al., 2013). Ainsi, lorsqu'IRF4 est limitant, sa surexpression favorise la production d'IFNγ. Cet effet bénéfique d'IRF4 sur la production d'IFNγ a également été observé au sein de lymphocytes T CD8 polyclonaux stimulés avec anti-CD3 soluble et des cellules dendritiques, ce qui suggère soit que cette méthode d'activation induit un niveau d'IRF4 limitant, soit que même en excès, IRF4 améliore ici la production d'IFNγ.

En conclusion, IRF4 est un facteur de transcription dont le niveau d'expression est intimement liée à la force d'activation du TCR. Ceci permet en retour une réponse adaptée de la part des lymphocytes T CD8. À cet égard, IRF4 module leur prolifération, survie, expansion, besoins énergétiques, et fonctions effectrices. Puisque le phénomène d'épuisement des lymphocytes T antiviraux dans le modèle LCMV est causée par l'activation répétée du TCR et une charge virale abondante, ceci pourrait laisser présager que IRF4 permettrait là aussi de soutenir la réponse des lymphocytes T à une infection virale persistante.

3.5.6 Rôles négatifs de l'abondance d'IRF4 dans les lymphocytes T CD8

Lors d'une infection virale aigüe ou chronique avec le LCMV, les lymphocytes T CD8 anti-GP_{33-41} au jour 30 de l'infection chronique sont épuisés et expriment IRF4 en quantité 4x supérieure par rapport à une infection aigüe (Man et al., 2017). Ceci n'a rien de surprenant puisque l'antigène persistant, les signaux activateurs du TCR induisent l'expression constante d'IRF4.

Afin d'évaluer le rôle d'IRF4 en fonction de sa quantité, des souris $Irf4^{fl/fl}$, $Irf4^{+/fl}$ Cd4 Cre, et $Irf4^{fl/fl}$ Cd4 Cre ont été employées. Au jour 30 de l'infection chronique avec la souche Docile du LCMV, la virémie dans la rate des souris avec le KO complet d'IRF4 est 1000x supérieure aux souris normales. Ceci est corrélé à un défaut d'expansion des lymphocytes T CD8 anti-GP_{33-41} et anti-$NP_{396-404}$, dont la quantité est 10x et 3x inférieure, respectivement (Man et al., 2017). Ces

données sont en accord avec le rôle d'IRF4 lors d'une infection aigüe grippale (Man et al., 2013; S. Yao et al., 2013). Lorsqu'un allèle du gène encodant IRF4 est éliminé, la quantité d'IRF4 mesurée est réduite de 30%. La virémie mesurée est similaire aux souris contrôle, bien que la quantité de lymphocytes T CD8 $Irf4^{+/-}$ anti-GP_{33-41} et anti-$NP_{396-404}$ soit 2x inférieure (Man et al., 2017). En conclusion, le KO total d'IRF4 inhibe le contrôle de l'infection chronique dû à un défaut sévère d'expansion clonale, mais son KO partiel n'altère pas le contrôle de l'infection, même s'il affecte dans une moindre mesure l'expansion des lymphocytes T antiviraux.

Deux possibilités sont dès lors envisageables : la première, proposée par les auteurs, est que même s'ils sont en quantité moindre, les lymphocytes avec un KO partiel d'IRF4 exercent un contrôle viral similaire aux lymphocytes T $Irf4^{+/+}$ car ils sont fonctionnellement supérieurs. Alternativement, il est raisonnable de penser que le maxima de la réponse antivirale déployée par les lymphocytes T épuisés est déjà atteint même lorsqu'ils sont 2x moins nombreux.

Afin de répondre à cette interrogation, un mix de lymphocytes T P14 $Ly5.1^{+}$ normaux et $Ly5.2^{+}$ $Irf4^{+/fl}$ a été cotransféré dans des souris congéniques $Ly.5.1^{+}$ $Ly5.2^{+}$. Ces lymphocytes T expriment un TCR trangénique, P14, reconnaissant le peptide viral GP_{33-41} sur $H2\text{-}D^{b}$. Au jour 30 de l'infection virale chronique, la restimulation *ex vivo* avec le peptide GP_{33-41} montre que les lymphocytes T avec le KO partiel d'IRF4 sont 3 à 4x plus nombreux à produire IL-2, TNFα et IFNγ que leurs homologues normaux (Man et al., 2017). Ces résultats sont en désaccord avec la notion selon laquelle l'abondance d'IRF4 favorise la production de cytokines effectrices (Man et al., 2013; S. Yao et al., 2013). Ainsi, par rapport à des lymphocytes T normaux, le KO partiel d'IRF4 améliore la production de cytokines effectrices mais nuit à leur expansion. Ces observations de polarité opposée pourraient expliquer que la virémie soit similaire entre ces deux conditions.

Une autre observation conflictuelle par rapport au rôle d'IRF4 lors d'une infection aigüe a été rapportée. En effet, les lymphocytes T CD8 exposés à une infection chronique sont moins capables de métaboliser le glucose par rapport à ceux exposés à une infection aigüe. Si un KO partiel d'IRF4 est réalisé, ce défaut métabolique est contré (Man et al., 2017). Ainsi, l'abondance d'IRF4 défavorise la glycolyse des lymphocytes T CD8, ce qui est contradictoire avec le rôle d'IRF4 rapporté pour soutenir la glycolyse (Man et al., 2013).

Un autre constat conflictuel peut être rapporté lorsqu'on s'intéresse au rôle d'IRF4 dans les lymphocytes T CD4. En effet, dans un modèle murin de transplantation cardiaque allogénique, les lymphocytes T CD4 ont besoin d'IRF4 pour rejeter la greffe. Sans IRF4, la production d'IFNγ est diminuée (Wu et al., 2017). De plus, les lymphocytes T CD4 KO pour IRF4 sur-expriment PD-1 (Wu et al., 2017). Pourtant, dans les lymphocytes T CD8 exposés à une infection chronique, le KO partiel d'IRF4 atténue l'expression de PD-1, et sur-exprimer IRF4 rétablit l'expression abondante de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 (Man et al., 2017).

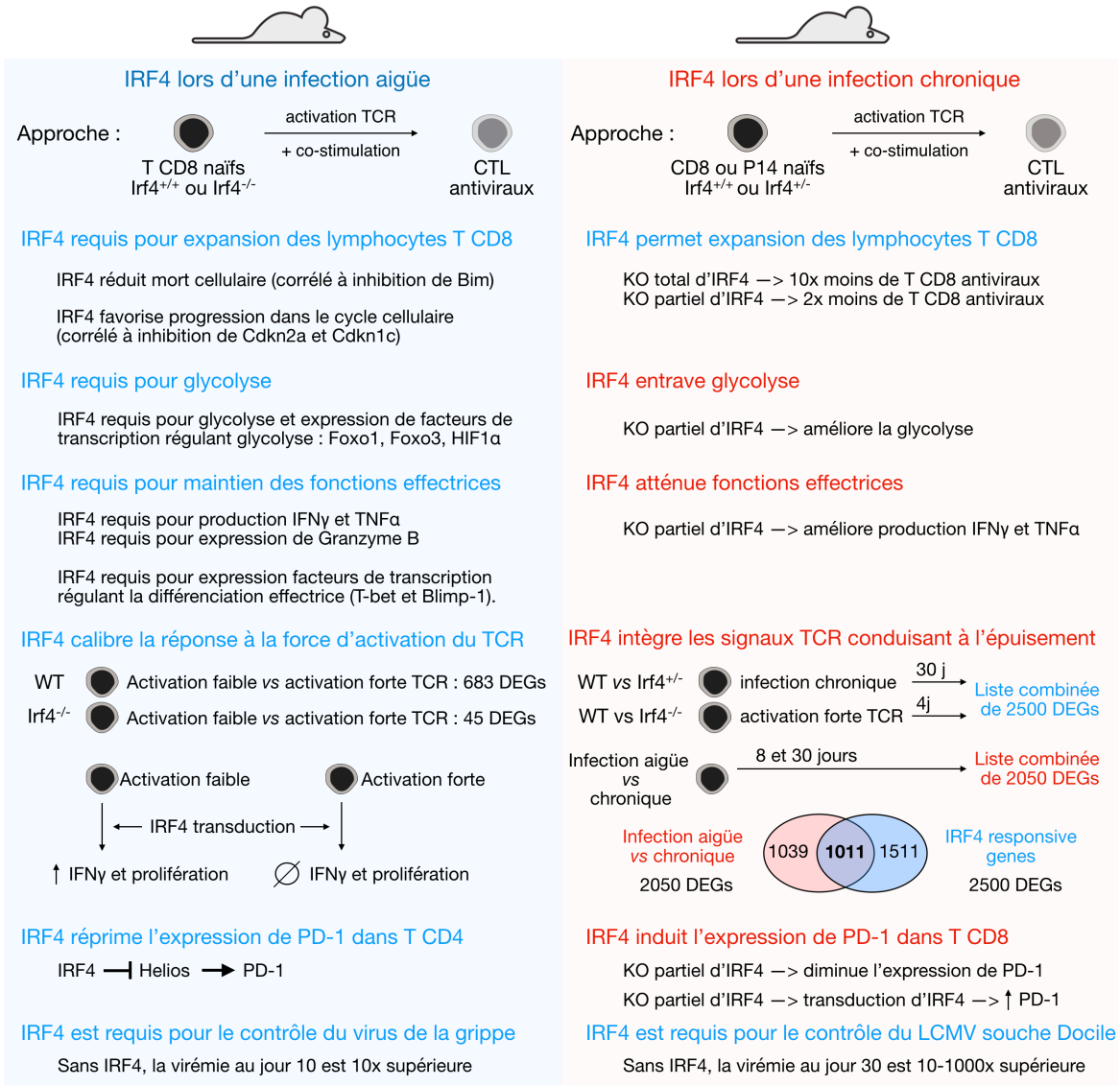


Figure 23. Récapitulatif des connaissances sur le rôle d'IRF4 dans les lymphocytes T CD8.

L'analyse du transcriptome des lymphocytes T P14 IRF4$^{+/+}$ exposés 8 et 30 jours à une infection aigüe ou chronique a identifié 2050 gènes différentiellement exprimés entre les 2 conditions (Man et al., 2017). De manière intéressante, le transcriptome des lymphocytes T P14 Irf4$^{+/-}$ exposés à une infection chronique s'apparente au transcriptome des lymphocytes T P14 au jour 30 d'une infection aigüe. Cela suggère que sans IRF4, les signaux activateurs du TCR encourus lors d'une infection chronique ne sont plus correctement intégrés, d'où un phénotype transcriptionnel qui s'apparente à celui de lymphocytes T au jour 30 d'une infection aigüe (lorsque le virus est déjà éliminé) (Man et al., 2017). En accord

avec cette suggestion, sur les 2050 gènes différentiellement exprimés lors d'une infection chronique ou aigüe, 50% d'entre eux sont des gènes dont la régulation après activation du TCR dépend de IRF4 (Man et al., 2013, 2017). En d'autres termes, la moitié des gènes impactés par IRF4 lors d'une infection chronique sont des gènes dont IRF4 régule l'expression suite à l'activation du TCR.

En conclusion, IRF4 est un facteur de transcription qui coordonne la régulation de divers gènes en fonction des signaux activateurs du TCR que le lymphocyte T reçoit. En renfort de cette proposition, il a été montré par ChIP que 25% des gènes différentiellement exprimés entre lymphocytes T P14 $Irf4^{+/+}$ et $Irf4^{+/-}$ au jour 30 d'une infection chronique, sont conjointement liés par IRF4, BATF et NFAT-1 (Man et al., 2017). Seulement, comme nous venons de le voir, les réponses biologiques produites par l'activité transcriptionnelle d'IRF4 sont globalement opposées dans un contexte infectieux aigu ou chronique (Fig 23).

4 Remarques conclusives

Les lymphocytes T CD8 murins issus d'infections persistantes sont moins fonctionnels à de nombreux égards par rapport aux lymphocytes T effecteurs et mémoire exposés à une infection aigüe. Comme nous l'avons vu, cela a mené à qualifier ces cellules comme étant « épuisées » afin d'illustrer cet état de fonctionnement diminué. Cet état d'épuisement est aujourd'hui perçu comme une voie de différenciation dans laquelle un lymphocyte T CD8 s'engage afin d'adapter ses fonctions effectrices à une situation de persistance antigénique.

Beaucoup d'acteurs moléculaires atténuant le fonctionnement des lymphocytes T CD8 épuisés ont été rapportés. Toutefois, de nombreux facteurs de confusion altèrent notre compréhension du rôle de certaines de ces molécules. Par exemple, lorsque dans de nombreuses études, les lymphocytes T CD8 issus d'une infection aigüe résolue depuis 3 semaines sont comparés à des lymphocytes T CD8 exposés à une infection chronique virale en cours, l'analyse subséquente

qui en est faite mène surtout à conclure sur des différences entre des lymphocytes T au repos et des lymphocytes T activés exposés à une infection persistante. De plus, comme nous l'avons vu, les souches LCMV utilisées diffèrent en terme de tropisme, distribution tissulaire, type de cellules présentant l'antigène viral, et dommages générés par la réponse immune. L'ensemble de ces aspects rend difficile l'interprétation du rôle joué par les nombreux acteurs moléculaires différentiellement utilisés ou exprimés par les lymphocytes T CD8.

Ceci a été illustré par l'exemple du facteur de transcription IRF4, dont l'expression est conduite par l'activation du TCR et pour lequel des rôles contradictoires ont été rapportés dans la littérature. De plus, aucune étude à ma connaissance n'a été rapporté chez l'Homme au sujet du rôle d'IRF4 dans les lymphocytes T CD8.

Enfin, les lymphocytes T CD8 (TILs) infiltrant les tumeurs chez l'Homme sont fréquemment rapportés comme étant épuisés. Cette conclusion découle d'observations selon lesquelles les TILs humains sont dysfonctionnels et expriment PD-1 ainsi que d'autres récepteurs inhibiteurs. Comme nous l'avons vu, ce raccourci est inapproprié. Récemment, le facteur de transcription TOX a émergé comme un indicateur plus fiable de l'épuisement, mais là aussi, la prudence est requise pour conclure que des TILs exprimant TOX sont épuisés.

OBJECTIF DE CE TRAVAIL DE THÈSE

Nous avons utilisé une approche expérimentale visant à élucider le rôle des facteurs de transcription dans les lymphocytes T CD8 humains.

Pour ce faire, nous avons corrélé l'expression de facteurs de transcription à la fonctionnalité des lymphocytes T CD8 infiltrés au sein d'échantillons de carcinome ovarien (Fig 24). Le phénomène d'épuisement étant au cœur des investigations réalisées sur les TILs humains, nous avons analysé si les TILs de carcinome ovarien présentent des caractéristiques de cellules épuisées. Nous avons notamment vérifié que le phénotype observé n'était pas le simple fait de l'état d'activation des TILs.

Deux facteurs de transcription ont retenu notre attention. Tout d'abord, Helios, dont le rôle a surtout été approfondi par un collègue de mon laboratoire, Damien Neyens. J'ai également activement collaboré à ce travail. Ensuite, IRF4, auquel j'ai surtout consacré mon énergie afin de clarifier son rôle dans les lymphocytes T CD8. Pour ce faire, nous avons travaillé *in vitro* à partir de lymphocytes T CD8 provenant de donneurs non cancéreux, et dans lesquels IRF4 a été exprimé par transduction lentivirale ou invalidé par CRISPR/Cas9 (Fig 24).

Mieux comprendre les fonctions d'IRF4 pourrait s'avérer utile dans une ère thérapeutique où le transfert adoptif de lymphocytes T portant des récepteurs chimériques - « les CAR T cells » - est utilisé dans des cancers hématologiques en vertu de leur efficacité, mais dont l'action est moindre face à des tumeurs solides.

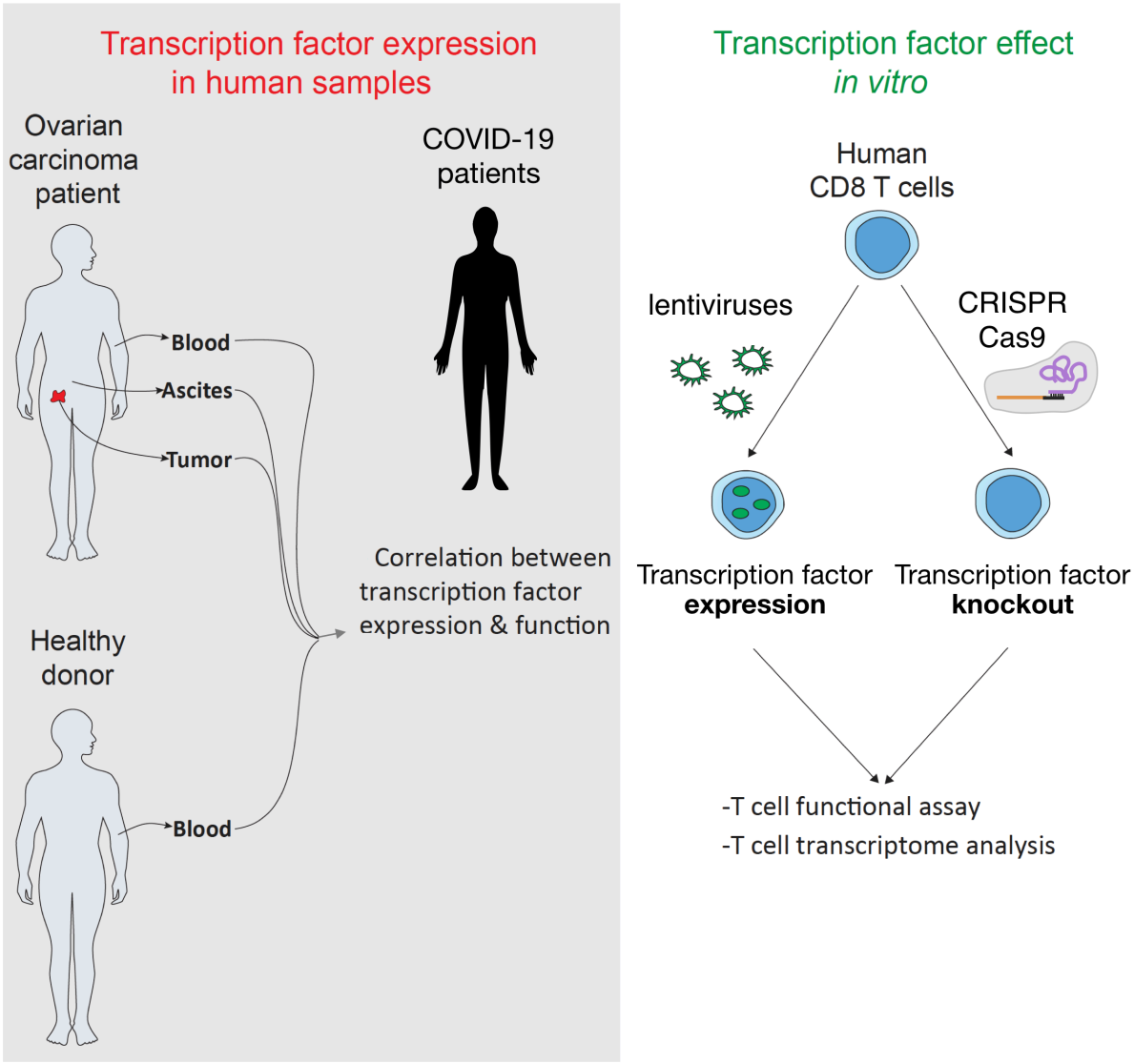


Figure 24. Aperçu global du plan expérimental suivi lors de cette thèse de doctorat.

RÉSULTATS

1 IRF4 : un rhéostat régulant l'activité des lymphocytes T CD8 ?

Nous avons entrepris de définir le rôle d'IRF4 dans les lymphocytes T CD8 chez l'Homme. Nous les avons purifiés par tri magnétique à partir de cellules mononuclées isolées du sang de donneurs atteints d'hémochromatose, puis les avons congelés. Suite à leur décongélation, nous avons procédé à la manipulation de l'expression d'IRF4 en invalidant son expression par CRISPR/Cas9 dans un cas, et en forçant son expression par transduction lentivirale dans l'autre cas (Fig25 a et b). L'utilisation d'un système inductible nous permet de contrôler le timing auquel initier l'expression d'IRF4.

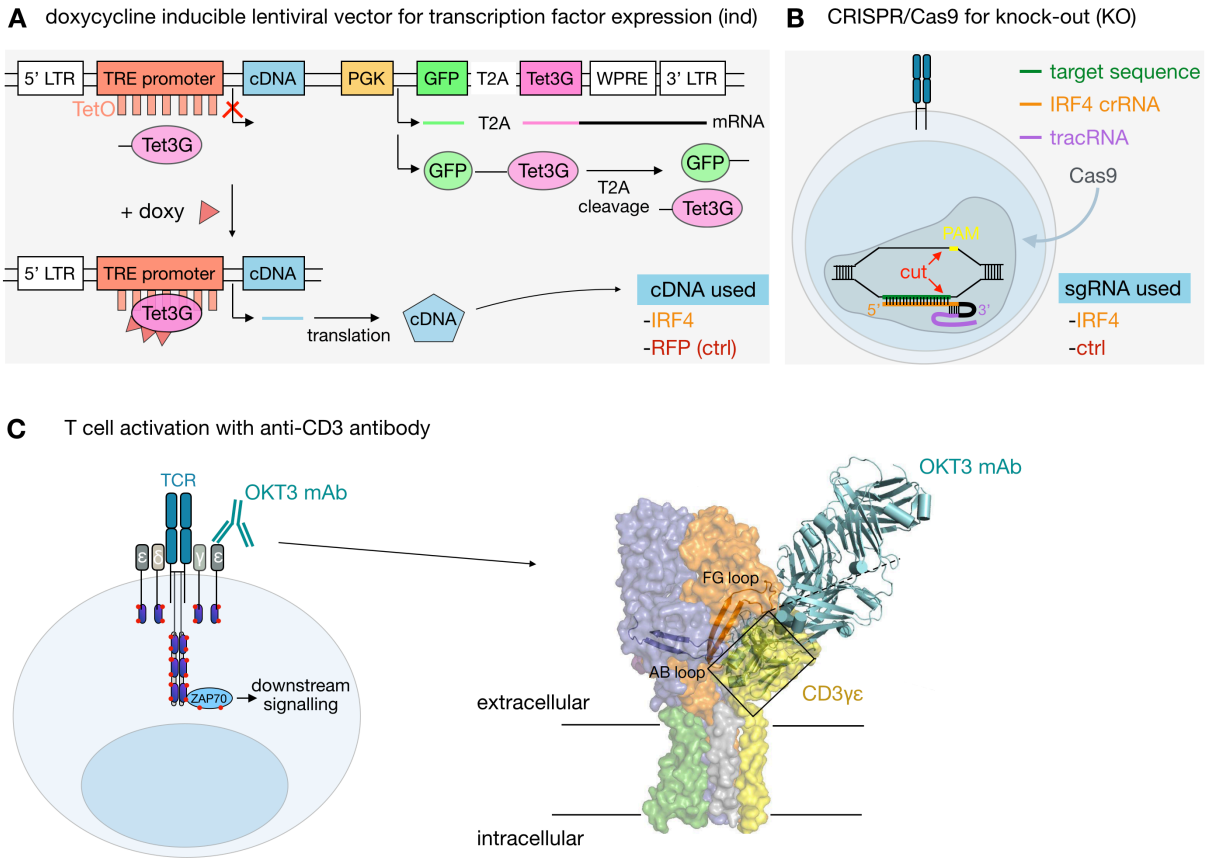


Figure 25. Approche utilisée pour examiner le rôle d'IRF4 dans les lymphocytes T CD8.
(A) Construction lentivirale permettant de contrôler l'expression d'un cDNA d'intérêt, ici IRF4 ou la Red Fluorescent Protein (RFP; cDNA contrôle). La GFP et le facteur de transcription Tet3G sont constitutivement exprimés sous contrôle du promoteur PGK, tandis que le cDNA encodant IRF4 ou la RFP n'est transcrit qu'après ajout de la doxycycline. (B) ARN guide simple brin synthétique dirigeant la nucléase Cas9 pour la réalisation d'une coupure double brin. L'ARN guide employé dans cette étude mène à une coupure environ 190 nucléotides en aval du codon initiateur de la traduction. (C) Activation aspécifique de la signalisation du TCR grâce à un anticorps (OKT3) reconnaissant CD3ε. Structure cristallographique : Dong et al., 2019.

Nous avons ensuite évalué l'effet que produit IRF4 sur la fonction et le transcriptome des lymphocytes T CD8. Ne connaissant pas leur spécificité antigénique et étant polyclonaux, les lymphocytes T CD8 sont activés de manière aspécifique avec un anticorps anti-CD3 (attaché dans un micropuits ou sur des billes anti-CD3/CD28) (Fig 25c). Cette première partie porte sur les résultats obtenus par cette approche.

1.1 IRF4 atténue la fonction des lymphocytes T CD8

1.1.1 L'expression ectopique d'IRF4 diminue la production de cytokines

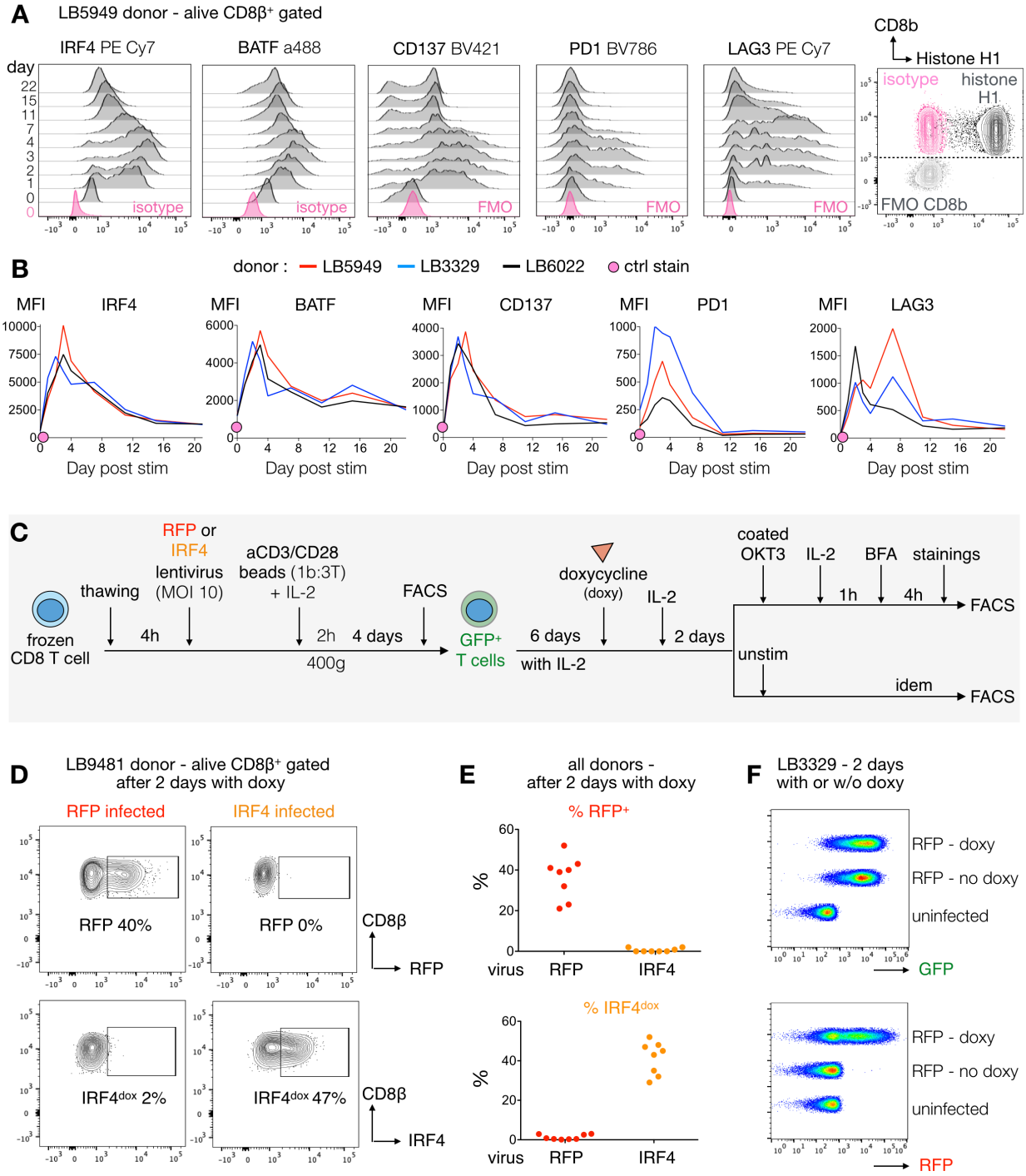
Dans le modèle LCMV, les lymphocytes T CD8 épuisés de souris chroniquement infectées expriment des récepteurs inhibiteurs et produisent moins de cytokines que leurs homologues isolés de souris ayant éliminé le virus. Lorsque les lymphocytes T épuisés sont mis au repos au sein de souris immunes, l'expression de ces récepteurs diminue, et ils regagnent partiellement la capacité à produire des cytokines effectrices (Abdel-Hakeem et al., 2021). Ceci suggère que l'activation récente des lymphocytes T par leur antigène suffit à mimer certaines caractéristiques d'un lymphocyte T épuisé, à savoir l'expression de récepteurs inhibiteurs et la perte de production de cytokines effectrices.

De nombreuses protéines telles que les facteurs de transcription IRF4 et BATF sont exprimées après activation du TCR, puis retournent progressivement à un niveau basal une fois l'antigène éliminé. Leur expression est donc sans surprise rapportée au sein des lymphocytes T épuisés mais aussi dans les lymphocytes T au pic de leur activation lors d'une infection aigüe, deux situations dans lesquelles IRF4 exerce un rôle opposé (Man et al., 2013, 2017; Wu et al., 2017; Yao et al., 2013) (voir fig 23 pour un résumé de ses rôles opposés). Afin d'isoler la part jouée par IRF4 du reste des protéines présentes au sein d'un lymphocyte T activé, forcer son expression au sein de lymphocytes T ayant passé ce pic d'activation représente une approche pertinente.

Pour ce faire, nous avons d'abord mesuré par cytométrie en flux la dynamique de l'expression d'IRF4 ainsi que celle d'autres marqueurs d'activation après stimulation des lymphocytes T CD8 avec des billes anti-CD3/CD28 et de l'IL-2. De nombreuses protéines communément exprimées par des lymphocytes T épuisés telles que PD-1, LAG-3, IRF4 et BATF sont exprimées, et leur expression suit une dynamique similaire et synchronisée avec celle du marqueur d'activation CD137. Aux alentours des jours 10-12, l'expression de ces protéines revient à un niveau basal (Fig 26a et b). Ainsi, autour du jour 10-12, le pic d'activation des lymphocytes T est passé.

Nous avons alors infecté et amplifié des lymphocytes T CD8 en présence d'IL-2 afin d'initier au jour 10 l'expression d'IRF4 ou de son gène contrôle (RFP) pendant 48h (Fig 26c, d et e). Seul l'ajout de doxycycline permet l'induction de notre gène d'intérêt, attestant qu'un éventuel effet observé au sein de notre système expérimental provient de cette fenêtre temporelle de 48h (Fig 26f).

Figure 26. Induction contrôlée de l'expression d'IRF4 au sein des lymphocytes T CD8.
(A-B) Des lymphocytes T CD8 ont été activés avec des billes anti-CD3/CD28 (1 bille pour 3 cellules) et de l'IL-2 et congelés à différents points temporels. Les échantillons à chaque point temporel ont été décongelés, marqués et analysés par cytométrie de flux. (A) Exemple représentatif de la dynamique d'expression de divers marqueurs d'activation. Les anticorps anti-IRF4 et anti-BATF ont pu pénétrer le noyau comme contrôlé par le marquage dirigé contre l'histone H1 (marquage contrôle systématiquement incorporé lors de marquages nucléaires). (B) Dynamique d'expression de divers protéines au cours du temps pour 3 donneurs analysés comme en (A). (C) Aperçu du plan expérimental suivi pour mesurer la capacité de production de cytokines par des lymphocytes T CD8 surexprimant IRF4. La BFA (Brefeldin A) inhibe la sécrétion des cytokines néo-synthétisées en bloquant leur transport entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. (D) Exemple représentatif du pourcentage d'induction obtenu et de la stratégie de gating. (E) Pourcentage de cellules surexprimant la RFP ou IRF4 au sein des 8 donneurs utilisés (3 expériences indépendantes). (F) L'expression du cDNA au sein des cellules infectées n'a lieu qu'après ajout de la doxycycline.


A
LB5949 donor - alive CD8β+ gated
IRF4 PE Cy7
BATF a488
CD137 BV421
PD1 BV786
LAG3 PE Cy7
CD8b
Histone H1
isotype
histone H1
FMO CD8b
day
22
15
11
7
4
3
2
1
0
isotype
FMO
B
donor : LB5949 LB3329 LB6022 ctrl stain
MFI IRF4
MFI BATF
MFI CD137
MFI PD1
MFI LAG3
Day post stim
C
RFP or IRF4 lentivirus (MOI 10)
aCD3/CD28 beads (1b:3T) + IL-2
thawing
FACS
frozen CD8 T cell
4h
2h
400g
4 days
GFP+ T cells
doxycycline (doxy)
IL-2
6 days
with IL-2
2 days
coated OKT3
IL-2
BFA
stainings
1h
4h
FACS
unstim
idem
FACS
D
LB9481 donor - alive CD8β+ gated after 2 days with doxy
RFP infected
IRF4 infected
RFP 40%
RFP 0%
CD8β
RFP
IRF4dox 2%
IRF4dox 47%
CD8β
IRF4
E
all donors - after 2 days with doxy
% RFP+
%
virus
RFP
IRF4
% IRF4dox
F
LB3329 - 2 days with or w/o doxy
RFP - doxy
RFP - no doxy
uninfected
GFP
RFP - doxy
RFP - no doxy
uninfected
RFP

Afin d'évaluer l'impact de l'expression ectopique d'IRF4 sur la fonction des lymphocytes T CD8, nous avons mesuré la production de cytokines effectrices après activation avec un anticorps anti-CD3 (OKT3) (Fig 27a). De manière invariable, les cellules exprimant IRF4 de manière ectopique ($IRF4^{dox}$) ont une capacité moindre de production d'IFNγ, GM-CSF et TNFα (Fig 27b et c). Cet effet est d'autant plus intéressant que le niveau d'IRF4 induit en 48h est similaire à celui observé au sein de lymphocytes T à leur pic d'activation, tandis que les lymphocytes T RFP^{+} expriment IRF4 au même niveau que des lymphocytes T au jour 12 post stimulation (Fig 27d et e). Ainsi, simuler l'activation récente d'un lymphocyte T par l'expression ectopique d'IRF4 atténue la production de cytokines. Ces résultats suggèrent que la présence d'IRF4 au sein de lymphocytes T récemment activés par leur antigène pourrait inhiber leur production de cytokines suite à leur réactivation.

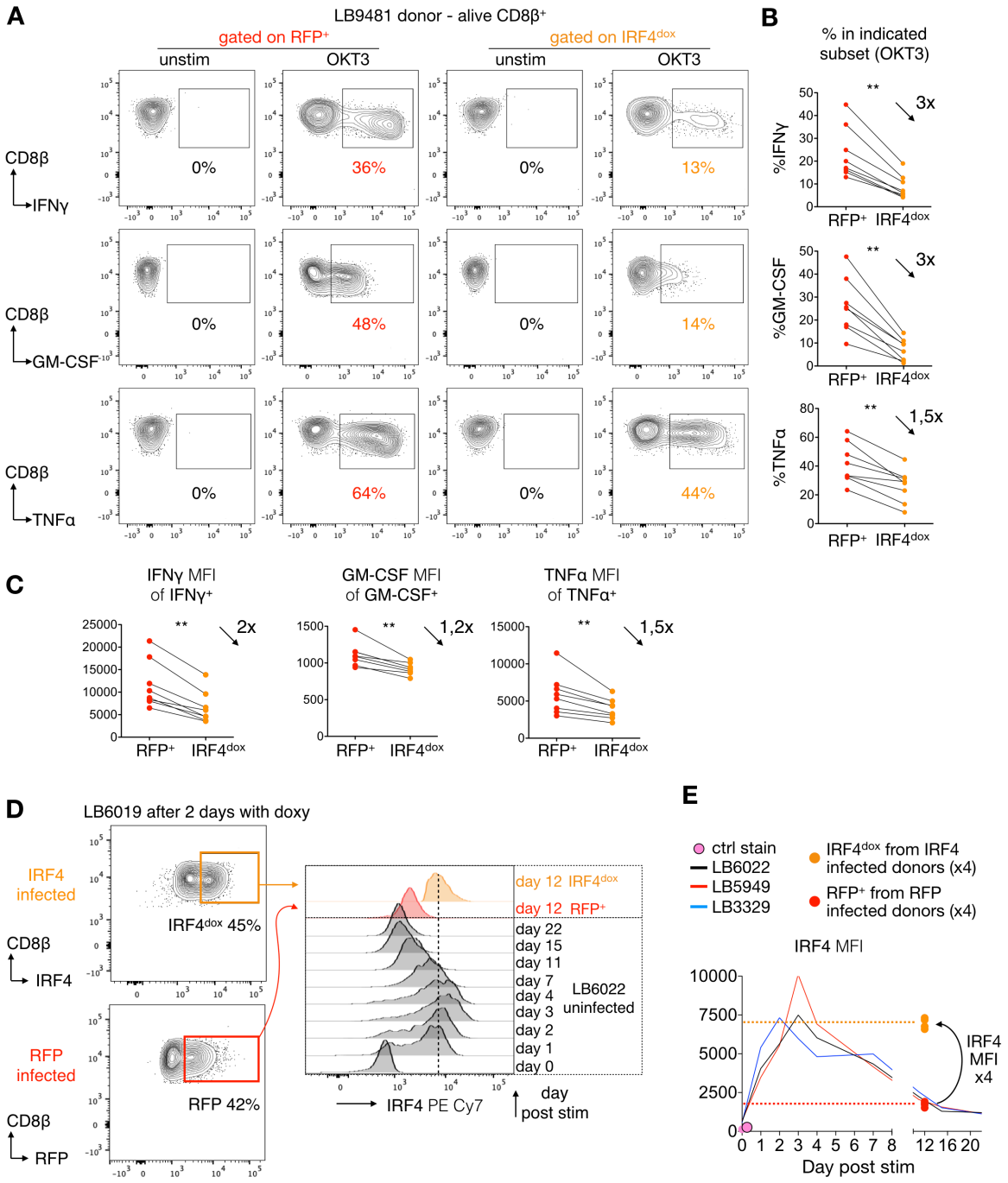


Figure 27. Simuler l'activation récente d'un lymphocyte T par l'expression ectopique d'IRF4 inhibe la production de cytokines.

*(A-C) Production de cytokines en 5h. (A) Exemple représentatif de la production de cytokines et stratégie de gating. (B) Pourcentage de cellules produisant la cytokine indiquée au sein des lymphocytes T CD8 RFP$^+$ ou IRF4^{dox} pour 8 donneurs (3 expériences indépendantes). Le ratio moyen est indiqué. (C) Intensité médiane de fluorescence (MFI) des cellules productrices de cytokines (IFNγ$^+$, GM-CSF$^+$ ou TNFα$^+$) au sein des cellules RFP$^+$ ou IRF4^{dox}. Le ratio moyen est indiqué. ** = p< 0,01 (Wilcoxon matched-pairs test pour B et C). (D-E) Des lymphocytes T CD8 au jour 2 après induction ont été congelés. Suite à leur décongélation, l'expression d'IRF4 a été mesurée en parallèle de celle au sein des lymphocytes T CD8 congelés à divers points temporels après stimulation. (D) Expression d'IRF4 au sein des lymphocytes T transduits comme indiqué, comparée à des lymphocytes T après stimulation. (E) MFI d'IRF4 au sein de 4 donneurs exprimant la RFP ou IRF4 comparé à la dynamique d'expression d'IRF4.*

1.1.2 Le KO d'IRF4 améliore la production de cytokines de lymphocytes T récemment activés

Nous avons évalué si la présence d'IRF4 au sein de lymphocytes T récemment activés pouvait réduire leur capacité de production de cytokines suite à leur réactivation. Pour ce faire, nous avons nucléofecté la nucléase Cas9 avec un ARN guide (gRNA) contre IRF4, puis avons stimulé les lymphocytes T en présence d'IL-2 avec des billes anti-CD3/CD28 pour provoquer l'expression d'IRF4. Au 5ème jour, un test de fonction est réalisé (Fig 28a).

Nous avons d'abord vérifié le fonctionnement du gRNA employé. Au jour 4 post stimulation, l'activation du TCR des lymphocytes T contrôle induit une augmentation uniforme de l'expression d'IRF4. En revanche, une partie des lymphocytes T nucléofectés avec le gRNA dirigé contre IRF4 maintient une expression basale d'IRF4, analogue à celle mesurée dans des lymphocytes T non activés. Ainsi, l'expression d'IRF4 suite à l'activation du TCR n'a pas lieu au sein de lymphocytes T ayant reçu le gRNA spécifique à IRF4 (Fig 28b).

Nous avons alors mesuré la production de cytokines par les lymphocytes T KO ou non pour IRF4 au jour 5 après stimulation (Fig 28c et d). Suite à leur réactivation, la proportion de cellules produisant IFNγ, GM-CSF ou TNFα est moindre au sein des lymphocytes T exprimant IRF4 (Fig 28d et e). Ces cellules expriment IRF4 5x plus abondamment que les cellules KO pour IRF4, un différentiel analogue à celui des lymphocytes T sur-exprimant IRF4 par rapport à leurs homologues RFP^{+} (Fig 28f). Ainsi, ces données suggèrent qu'IRF4 constitue un frein à la production de cytokines lorsqu'il est présent au sein de lymphocytes T récemment activés, et cet effet peut être mimé par l'expression ectopique d'IRF4 au sein de lymphocytes T ayant passé leur pic d'activation. Un résumé de ces observations est illustré (Fig 29 a et b).

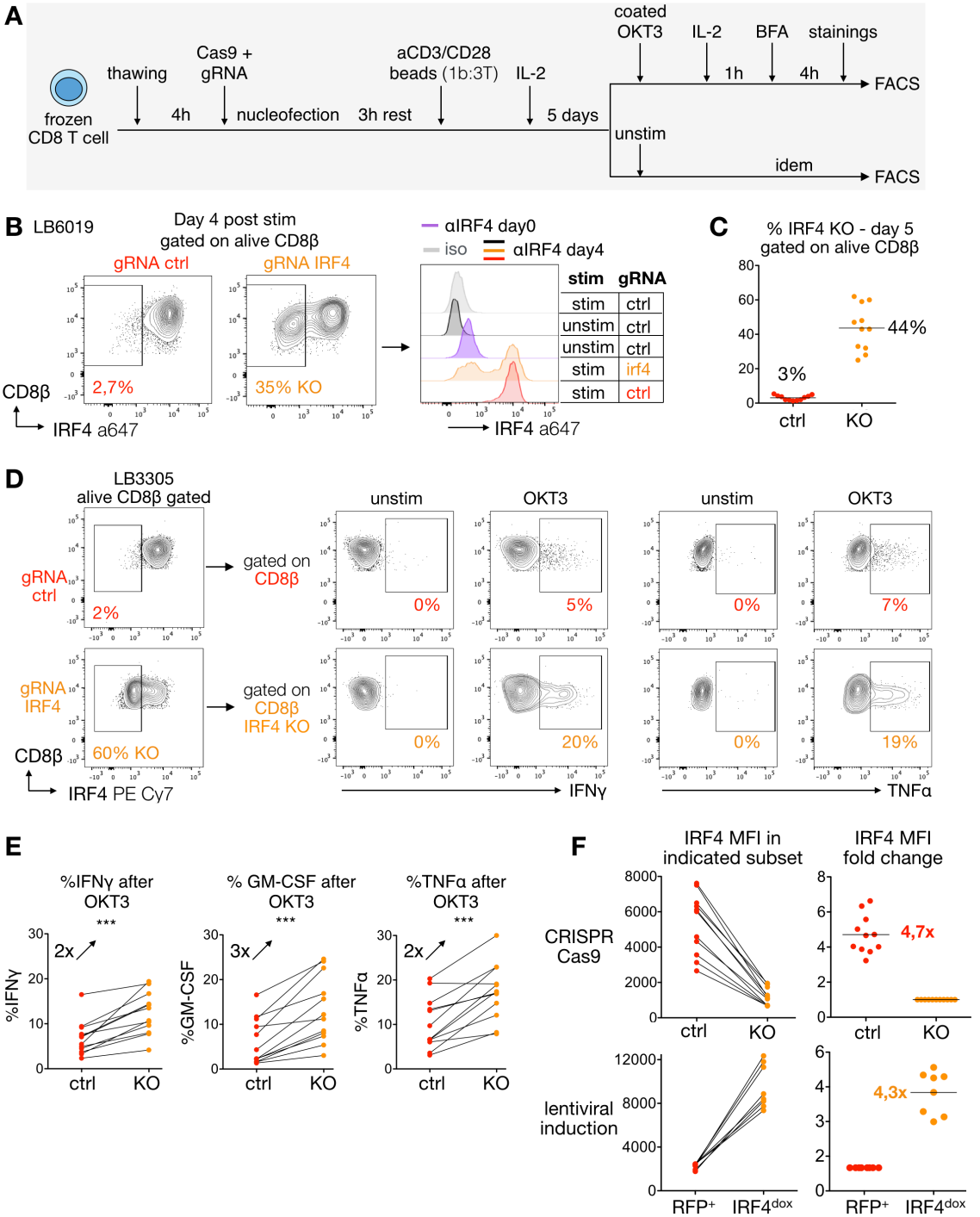


Figure 28. Réprimer l'expression d'IRF4 au sein de lymphocytes T activés améliore leur capacité de production de cytokines.

(A) Aperçu du plan expérimental suivi. (1b:3T = 1 bille pour 3 cellules). (B) Expression d'IRF4 au sein de lymphocytes T au jour 4 après CRISPR/Cas9 et stimulation. L'expression d'IRF4 au sein de ces cellules a été comparée à celle de lymphocytes T gardés en culture 4 jours sans stimulation ou avant d'être stimulés à jour 0. (C) Pourcentage de cellules KO pour IRF4 obtenu pour l'ensemble des donneurs utilisés au cours des tests de production de cytokines.
*(D) Stratégie de gating et exemple représentatif de la production de cytokines pour un donneur. (E) Pourcentage de cellules produisant la cytokine indiquée au sein des lymphocytes T CD8 ctrl ou KO pour IRF4 pour 12 donneurs (3 expériences indépendantes). Le ratio moyen est indiqué. *** = p<0,001 (Wilcoxon matched-pairs). (F) Niveau d'expression d'IRF4 au sein des lymphocytes T CD8 après CRISPR/Cas9 ou après transduction lentivirale.*

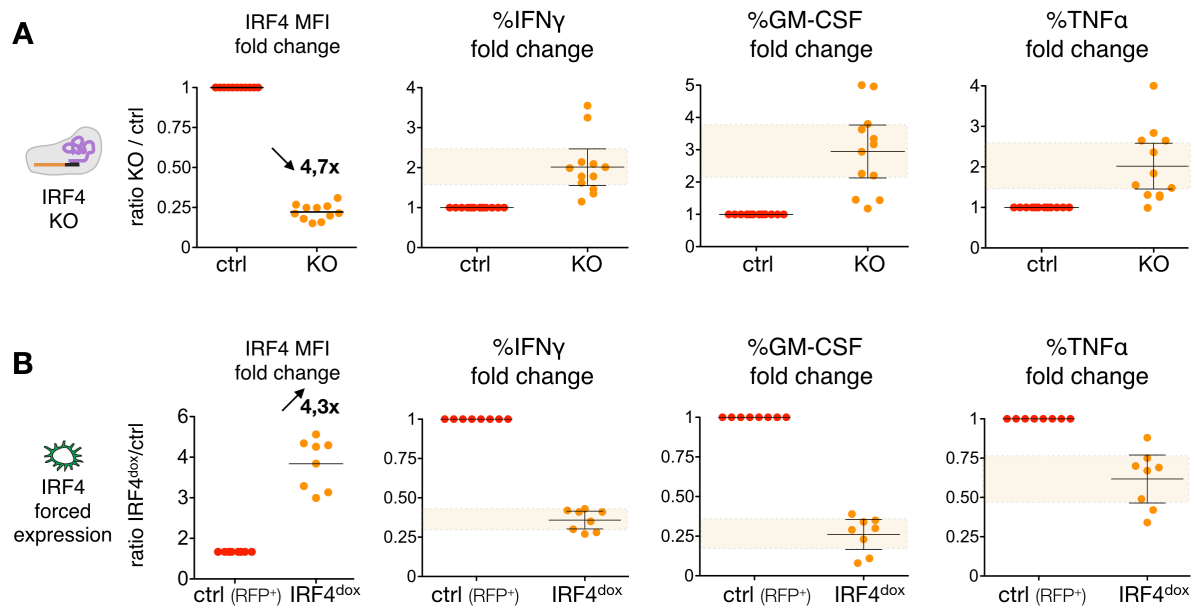


Figure 29. Impact de la manipulation de l'expression d'IRF4 par CRISPR/Cas9 ou par transduction lentivirale sur la fonction des lymphocytes T CD8.
Pour chaque patient, le changement d'expression d'IRF4 est représenté, et le ratio du % de cellules produisant la cytokine indiquée a été calculée. L'intervalle de confiance à 95% est coloré par la zone orangée, avec en son centre la valeur moyenne du ratio calculé (trait noir). (A) Synthèse des résultats obtenus sur 12 donneurs par CRISPR/Cas9 contre IRF4. (B) Synthèse des résultats obtenus sur 8 donneurs par transduction lentivirale et induction d'IRF4.

Afin de tester si IRF4 diminue également la production de cytokines lorsqu'un lymphocyte T est activé par une cellule tumorale, nous avons transduit et cloné deux lignées tumorales humaines exprimant ou non en leur surface le fragment variable (scFv) de l'anticorps anti-CD3 OKT3 (Leitner et al., 2010) (Fig 30a, b). Ces lignées tumorales scFv-OKT3 expriment l'anticorps en abondance variable (Fig 30b). Au 5ème jour après CRISPR/Cas9, les lymphocytes T ont été cocultivés avec les lignées tumorales scFv-OKT3 ou contrôle (Fig 30c). Aucune réaction allogénique mesurable n'a pu être détectée, puisque la production de cytokines n'est détectée que face aux lignées scFv-OKT3. En accord avec nos observations précédentes, le KO d'IRF4 améliore la production d'IFNγ et GM-CSF (Fig 30d et e). Ainsi, dans une situation où d'autres signaux sont intégrés par un lymphocyte T lorsqu'il interagit avec sa cible (p.ex molécules d'adhésion), IRF4 atténue également la production d'IFNγ et GM-CSF.

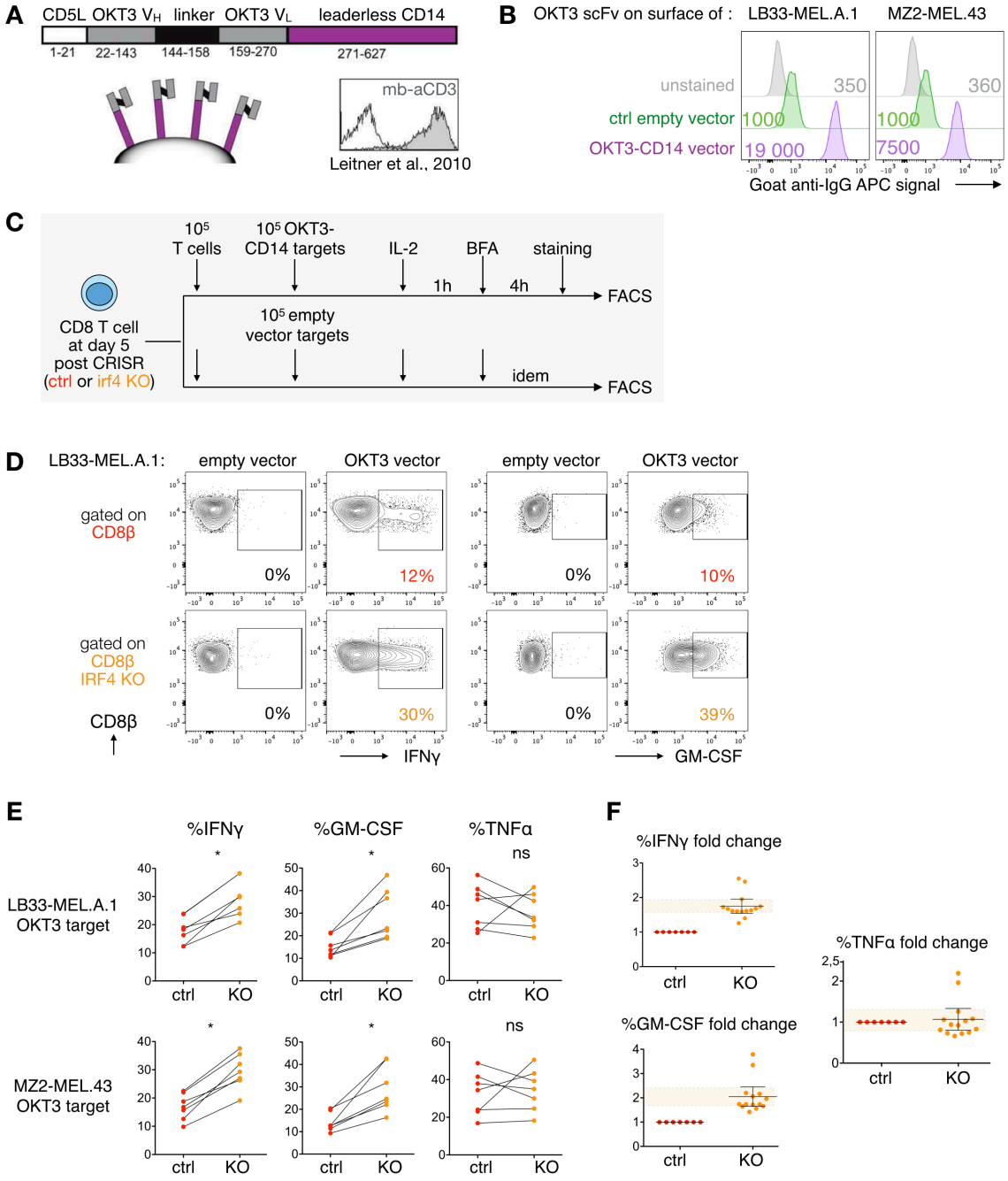


Figure 30. IRF4 atténue la production de cytokines face à des cellules tumorales.
(A) Construction employée pour exprimer le fragment variable de l'anticorps anti-CD3 (OKT3) à la surface des cellules tumorales. Méthode par Leitner et al., 2010. (B) Les lignées cancéreuses humaines LB33-MEL.A.1 et MZ2-MEL.43 ont été transduites et clonées avec des lentivirus contenant la construction en A (OKT3-CD14; violet) ou non (ctrl empty vector; vert). L'expression en surface du scFv de OKT3 a été mesurée avec un anticorps anti-IgG APC.
*(C) Aperçu du plan expérimental suivi. (D) Stratégie de gating et exemple représentatif de la production de cytokines avec les lymphocytes T du donneur LB3329 cocultivés avec la lignée LB33-MEL.A.1 exprimant ou non scFv-OKT3. (E) Pourcentage de cellules qui produisent la cytokine indiquée en condition ctrl ou KO après réactivation avec la lignée LB33-MEL.A.1 OKT3 ou MZ2-MEL.43 OKT3. Données de 7 donneurs, 2 expériences indépendantes. *=p<0,05 (Wilcoxon matched pairs). (F) Pour chaque donneur, le ratio du % de cellules produisant la cytokine indiquée a été calculé. L'intervalle de confiance à 95% est coloré par la zone orangée, avec en son centre la valeur moyenne du ratio calculé (trait noir).*

1.1.3 IRF4 atténue la dégranulation des lymphocytes T

Observant que le KO d'IRF4 améliore la production de cytokines de lymphocytes T récemment activés, nous avons ensuite mesuré si IRF4 inhibe également l'activité lytique des lymphocytes T. Leur capacité de lyse dépend notamment de la sécrétion de granules lytiques contenant les molécules effectrices perforine et granzyme. Suite à l'activation des lymphocytes T par leur cellule cible, la sécrétion de ces granules peut être mesurée par cytométrie en flux grâce à l'utilisation d'un anticorps dirigé contre CD107 (Betts and Koup, 2004) (Fig 31a).

Au 5ème jour après CRISPR/Cas9, les lymphocytes T ont été cocultivés pendant 5h avec les lignées tumorales scFv-OKT3 ou contrôle (Fig 31b). La capacité de dégranulation des lymphocytes T KO pour IRF4 est supérieure à celle des lymphocytes T exprimant IRF4 (Fig 31c et d). Bien que la dégranulation ne soit qu'une mesure indirecte de l'activité lytique d'un lymphocyte T face à sa cible, ces résultats suggèrent que l'expression d'IRF4 au sein des lymphocytes T CD8 pourrait constituer un frein à la lyse de leur cellule cible.

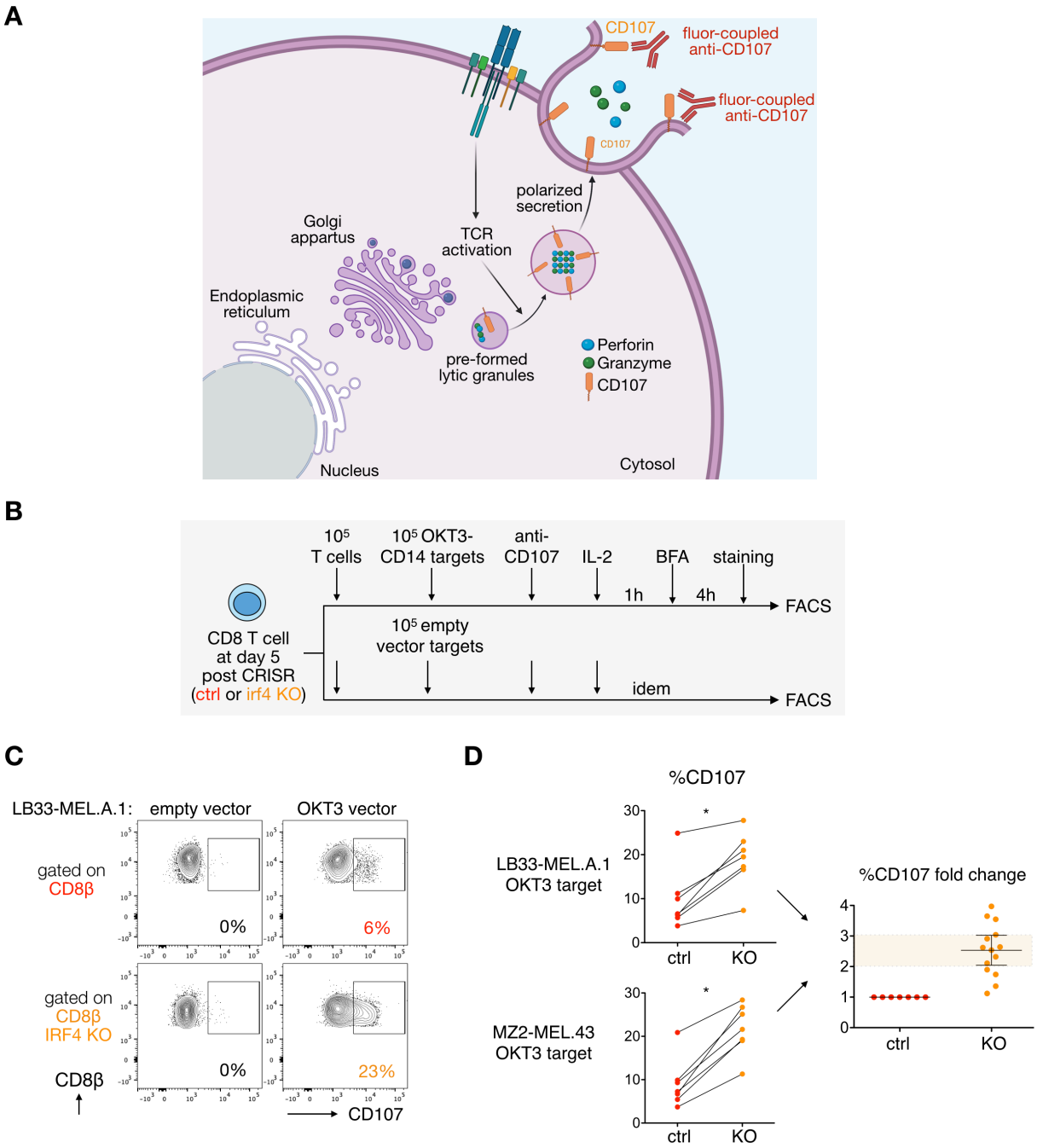


Figure 31. Le KO d'IRF4 améliore la dégranulation des lymphocytes T récemment activés. *(A) Lors de l'activation du TCR, les granules préformés dans le cytosol des lymphocytes T sont dirigés en direction de la synapse immune et fusionnent avec la membrane du lymphocyte T, permettant ainsi le relargage de perforine et granzyme à proximité de la cellule cible. La protéine CD107 est alors transitoirement accessible, et peut donc être marquée avec un anticorps spécifique couplé à un fluorochrome. (B) Aperçu du plan expérimental suivi. (C) Exemple représentatif de dégranulation (CD107) face à la lignée LB33-MELA.1 exprimant ou non scFv-OKT3 en surface. (D) Pourcentage de cellules qui dégranulent au sein des lymphocytes T CD8 ctrl ou KO pour IRF4 pour 7 donneurs (2 expériences indépendantes) après réactivation avec la lignée LB33-MEL.A.1 OKT3 ou MZ2-MEL.43 OKT3. *=p<0,05 (Wilcoxon matched-pairs). Le ratio du % de cellules qui dégranulent face à ces 2 lignées a été calculé pour chaque donneur et rassemblé sur le même graphique. L'intervalle de confiance à 95% est coloré par la zone orangée, avec en son centre la valeur moyenne du ratio calculé (trait noir).*

1.2 IRF4 favorise la prolifération des lymphocytes T CD8

Lors de la culture des lymphocytes T nucléofectés avec un gRNA contre IRF4, nous avons constaté que leur expansion semblait moindre (données non montrées). Afin de quantifier cet effet, nous avons chargé les lymphocytes T après nucléofection avec une sonde fluorescente avant de les stimuler (Fig 32a). En proliférant, le contenu cytoplasmique des lymphocytes T est divisé. La quantité de sonde est donc divisée par 2 lors de chaque division cellulaire effectuée (Fig 32b). Il est alors possible de mesurer divers paramètres de prolifération des lymphocytes T (Roederer, 2011) (Fig 32c).

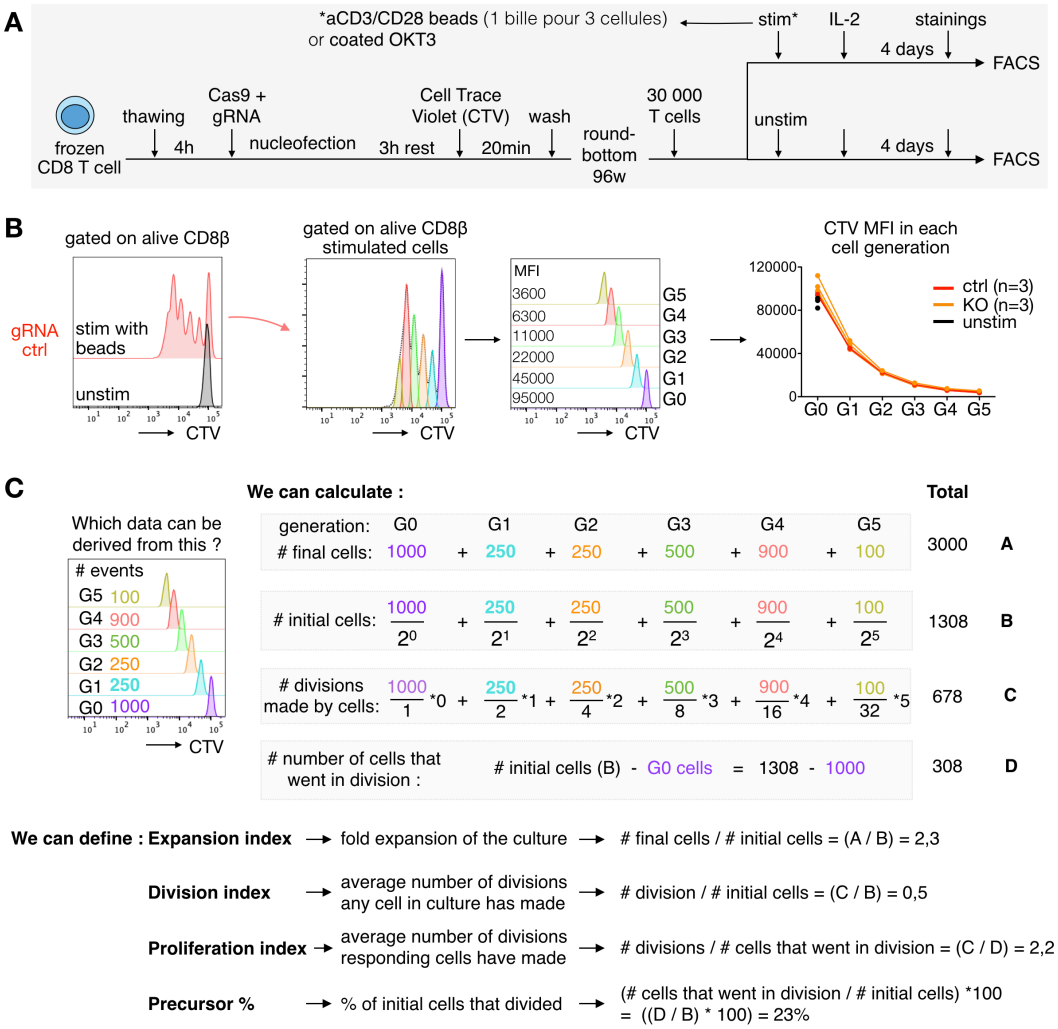


Figure 32. Principe du test de prolifération utilisé pour mesurer l'impact du KO d'IRF4. *(A) Aperçu du plan expérimental suivi.(B) Des lymphocytes T CD8 après nucléofection ont été stimulés ou non en présence d'IL-2 et la dilution de la sonde cellulaire mesurée par cytométrie en flux. Chaque pic représente une division cellulaire (G0, G1..). La fluorescence est divisée par 2 à chaque division, d'où une courbe exponentielle décroissante de la fluorescence. (C) Calcul de l'index de division, de prolifération, d'expansion, et de la fréquence de précurseurs.*

1.2.1 Le KO d'IRF4 atténue l'expansion des lymphocytes T CD8

Alors que la vaste majorité des lymphocytes T nucléofectés avec l'ARN guide contrôle ont réalisé plus de 5 divisions en 4 jours, une partie des lymphocytes T KO pour IRF4 ont proliféré de façon moindre (Fig 33a). L'expansion des lymphocytes T IRF4 KO est environ 2,5x inférieure (Fig 33b). En restreignant notre analyse aux cellules qui se sont divisées, nous avons mesuré que l'index de prolifération des cellules KO pour IRF4 était légèrement inférieur à celui des cellules contrôle (Fig 33c). Ces données suggèrent que les cellules KO pour IRF4 qui prolifèrent se divisent à un rythme proche de leurs homologues contrôle. Cette modeste différence ne peut expliquer à elle seule le défaut d'expansion observé dans la condition IRF4 KO.

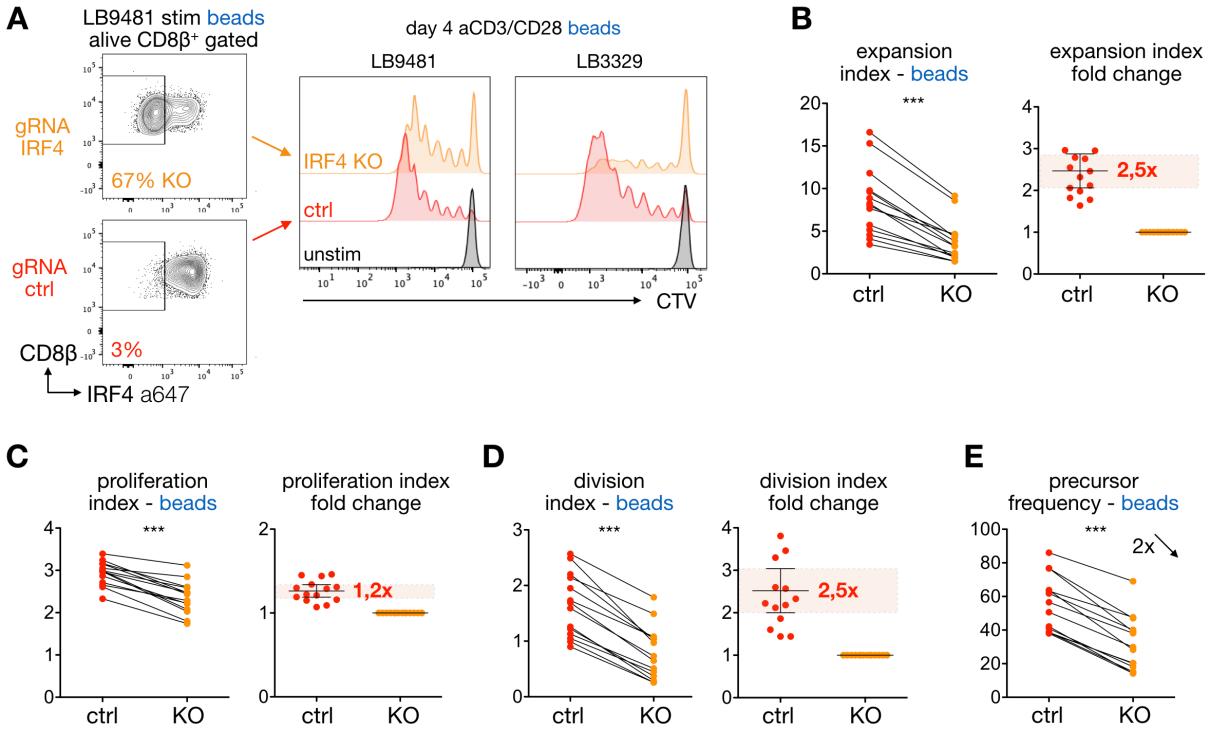


Figure 33. IRF4 favorise l'expansion des lymphocytes T stimulés avec billes anti-CD3/CD28. *(A) Exemples de stratégie de gating et de dilution du Cell Trace Violet (CTV) dans les lymphocytes T CD8 KO ou non pour IRF4. (B) Index d'expansion calculé pour chaque donneur, ainsi que le ratio de cet index. (C) Index de prolifération calculé pour chaque donneur, ainsi que le ratio de cet index. (D) Index de division calculé pour chaque donneur, ainsi que le ratio de cet index. (E) Fréquence de cellules qui se sont divisées au jour 0. Le ratio moyen est indiqué. *** = p<0,001 (Wilcoxon matched-pairs). L'intervalle de confiance à 95% du ratio calculé pour chaque index est coloré par la zone rouge, avec en son centre la valeur moyenne. Les données proviennent de 14 donneurs (4 expériences indépendantes).*

Nous avons alors utilisé l'index de division, lequel considère l'ensemble des cellules, qu'elles se soient divisées ou non. La valeur de ce paramètre est plus faible si le nombre de divisions est faible par rapport au nombre de cellules initiales dans le système. Ce paramètre est environ 2,5x inférieure au sein des lymphocytes T IRF4 KO (Fig 33d). Ces données suggèrent que moins de divisions ont été effectuées par les lymphocytes T IRF4 KO suite à leur stimulation. En accord, le pourcentage de cellules précurseurs estimé est en moyenne 2x inférieur en condition KO (Fig 33e). Collectivement, ces données indiquent que IRF4 est requis pour l'expansion des lymphocytes T suite à leur activation avec des billes anti-CD3/CD28.

Afin de définir si le rôle d'IRF4 dans l'expansion des lymphocytes T est relié aux signaux provenant du TCR ou à ceux de la costimulation CD28, nous avons réalisé les mêmes analyses, mais suite à une stimulation OKT3 et non plus avec des billes anti-CD3/CD28 comme précédemment. Des résultats similaires ont été obtenus, suggérant que l'absence d'IRF4 atténue l'expansion des lymphocytes T suite à la seule activation de leur TCR (Fig 34a à e). En accord, ajouter un anti-CD28 soluble à la stimulation OKT3 n'exacerbe que peu le défaut d'expansion observé des lymphocytes T KO pour IRF4 (Fig 34f à j). Ces données suggèrent que le rôle d'IRF4 dans l'expansion des lymphocytes T est relié à des évènements se déroulant en aval de la signalisation TCR plutôt que celle de CD28.

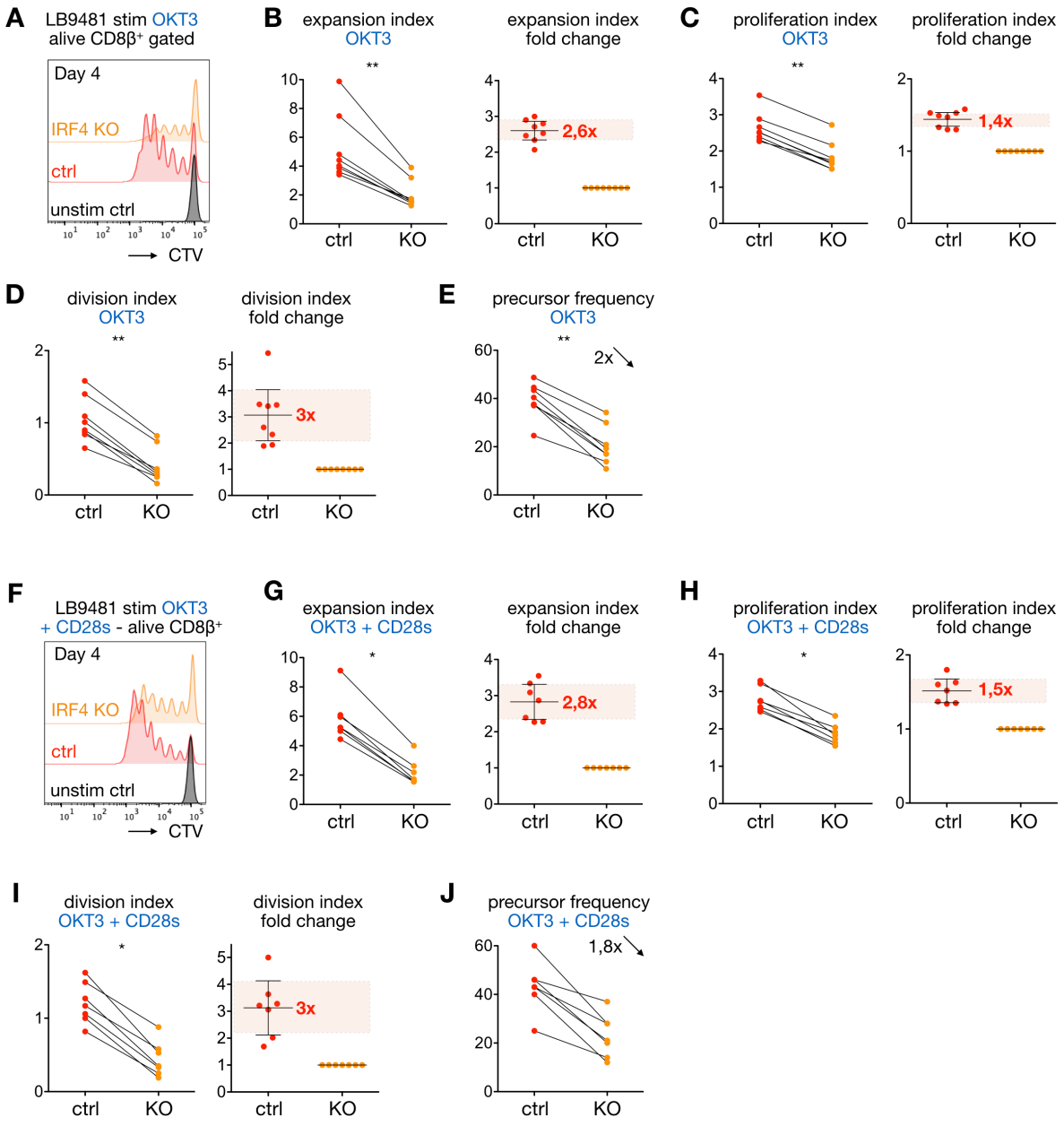


Figure 34. Le défaut d'expansion des lymphocytes T KO pour IRF4 n'est pas lié à la voie CD28.

(A-E) Données de prolifération suite à l'activation OKT3 des lymphocytes T KO ou non pour IRF4. (A) Exemple de dilution du Cell Trace Violet (CTV) dans les lymphocytes T CD8 KO ou non pour IRF4. (B-D) Index d'expansion, prolifération et division calculé pour chaque donneur, ainsi que le ratio de l'index. (E) Fréquence de cellules qui se sont divisées au jour 0. Le ratio moyen est indiqué.

(F-J) Données de prolifération suite à l'activation OKT3 + anti-CD28 soluble des lymphocytes T KO ou non pour IRF4. (F) Exemple de dilution du CTV dans les lymphocytes T CD8 KO ou non pour IRF4. (G-I) Index d'expansion, prolifération et division calculé pour chaque donneur, ainsi que le ratio de l'index. (J) Fréquence de cellules qui se sont divisées au jour 0. Le ratio moyen est indiqué.

*** = p<0,01; * = p<0,05 (Wilcoxon matched-pairs). L'intervalle de confiance à 95% du ratio calculé pour chaque index est coloré par la zone rouge, avec en son centre la valeur moyenne. Les données proviennent de 7-8 donneurs (2 expériences indépendantes).*

1.2.2 La surexpression d'IRF4 n'affecte pas l'expansion des lymphocytes T

IRF4 étant requis pour l'expansion des lymphocytes T, nous avons souhaité déterminer si la réactivation de lymphocytes T exprimant IRF4 de manière ectopique leur conférait un avantage prolifératif. Cette hypothèse semblait d'autant plus plausible que 48h après induction de IRF4 ou de la RFP, le marqueur de prolifération Ki67 est environ 1,5x supérieur au sein des lymphocytes T $IRF4^{dox}$, suggérant que des évènements du cycle cellulaire pourraient être modulés par IRF4 (Fig 35a, b et c).

Nous avons alors décongelé des lymphocytes T préalablement transduits et incubés pendant 2 jours avec de la doxycycline, les avons chargés avec une sonde cellulaire, et les avons restimulés pendant 3 jours (Fig 35d). Lorsqu'ils sont réactivés, l'abondance d'IRF4 au sein des lymphocytes T $IRF4^{dox}$ est 3-4 fois supérieure à celle des lymphocytes RFP^{+} activés (Fig 35e). Malgré son abondance, IRF4 n'a pas d'effet sur la prolifération et l'expansion des lymphocytes T $IRF4^{dox}$ par rapport à leurs homologues RFP^{+} (Fig 35f et g). Ces données suggèrent que le niveau endogène d'IRF4 synthétisé suite à l'activation du TCR n'est pas limitant pour la prolifération des lymphocytes T.

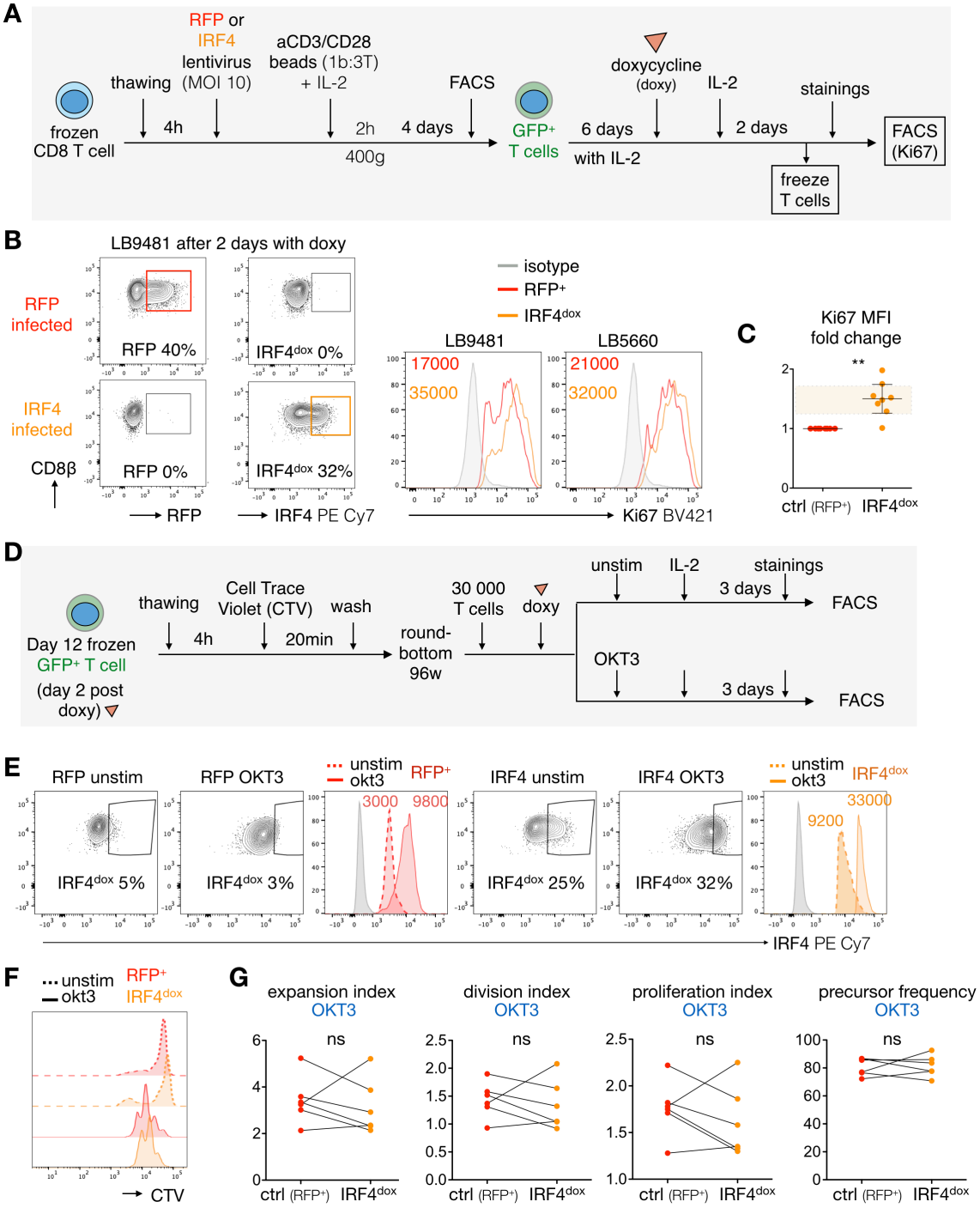


Figure 35. La surexpression d'IRF4 n'impacte pas l'expansion des lymphocytes T suite à leur réactivation.

*(A) Les lymphocytes T transduits avec la RFP ou IRF4 ont été congelés 2 jours après induction, sauf une partie des cellules pour laquelle l'expression de Ki67 a été mesurée. (B) Stratégie de gating et expression de Ki67 au sein des lymphocytes RFP⁺ ou IRF4^{dox}. Exemple de plot avec les donneurs LB9481 et LB5660. La MFI de Ki67 est indiquée. (C) Ratio de la MFI de Ki67 pour chaque donneur. L'intervalle de confiance à 95% est coloré par la zone orangée, avec en son centre la valeur moyenne du ratio calculé (trait noir). Données de 8 donneurs (3 expériences indépendantes). (D) Aperçu du test de prolifération réalisé sur les lymphocytes T à jour 2 après induction. (E) Expression d'IRF4 3 jours après initiation du test de prolifération. (F) Exemple de dilution du CTV. (G) Index calculés pour chaque donneur (6 donneurs ; 2 expériences indépendantes). ns = p>0,05. ** = p<0,01 (Wilcoxon matched-pairs).*

1.3 IRF4 induit l'expression de PD-1

1.3.1 L'expression de PD-1 et LAG-3 est diminuée en absence d'IRF4.

IRF4 est requis pour la prolifération des lymphocytes T mais atténue leurs fonctions effectrices. Cette dualité suggère que IRF4 restreint l'activité des lymphocytes T dont il favorise l'expansion. Ce mécanisme régulateur est non sans rappeler celui exercé par les récepteurs inhibiteurs exprimés après activation d'un lymphocyte T. Nous avons donc souhaité définir si IRF4 régule également l'expression de divers récepteurs inhibiteurs.

Au 3ème jour après activation avec des billes anti-CD3/CD28, l'expression de PD-1, LAG-3 et CTLA-4 a été mesurée au sein des lymphocytes T KO ou non pour IRF4 (Fig 36a). L'impact du KO de IRF4 sur l'expression de CTLA-4 est difficile à évaluer puisque CTLA-4 est faiblement exprimé au timing évalué après activation dans la majorité des patients testés (Fig 36b et c). En revanche, l'expression de PD-1 est drastiquement affectée par l'absence d'IRF4. En effet, son expression à la surface de lymphocytes T IRF4 KO s'approche de celle de lymphocytes T non stimulés (Fig 36b et c). Par ailleurs, les lymphocytes T dépourvus d'IRF4 expriment moins LAG-3 que leurs homologues exprimant IRF4 (Fig 36b et c). IRF4 participe donc à la régulation de l'expression de PD-1 et LAG-3 suite à l'activation des lymphocytes T CD8 (Fig 36d).

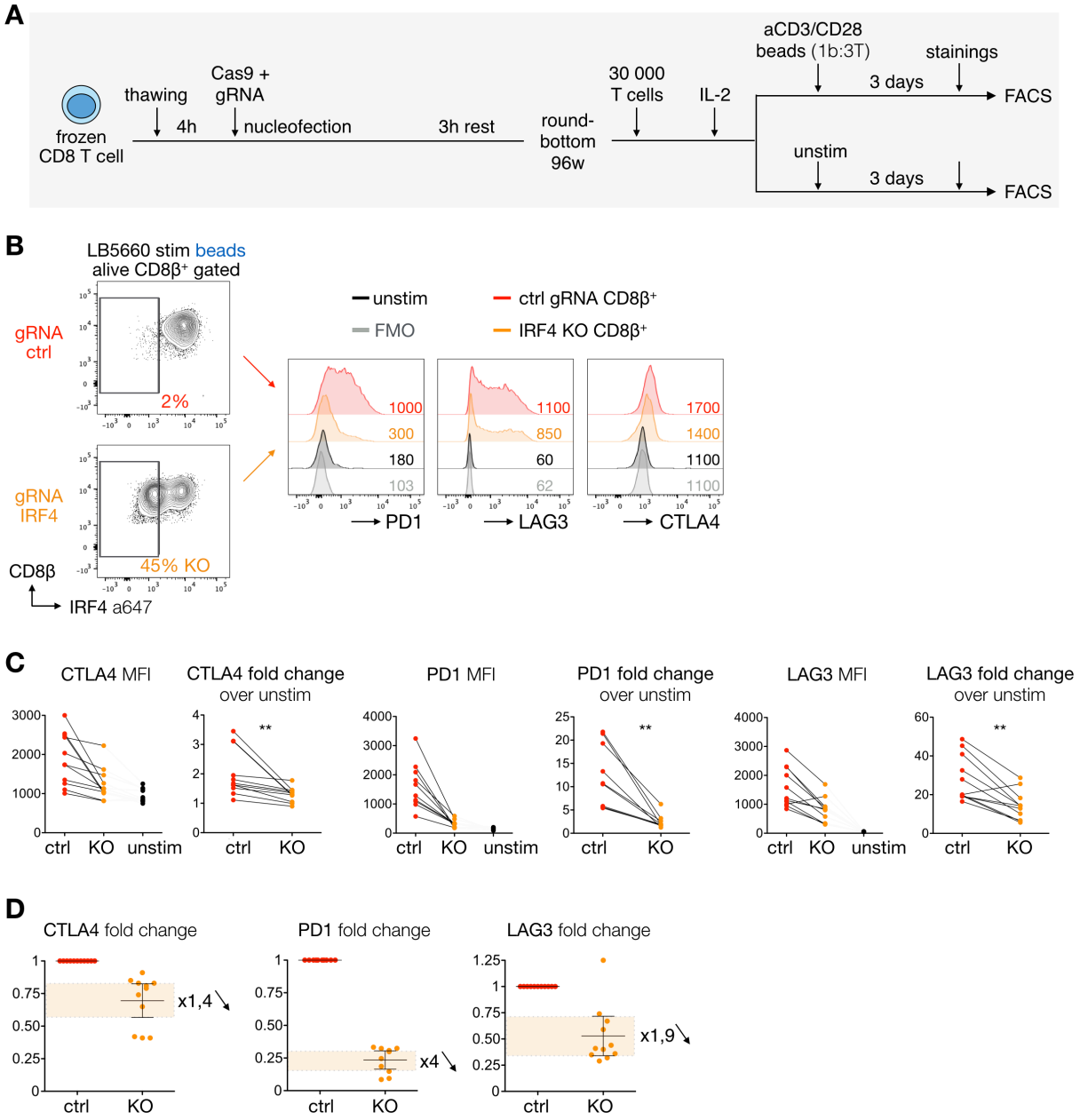


Figure 36. L'absence d'IRF4 atténue l'expression de récepteurs inhibiteurs.
*(A) Aperçu du plan expérimental suivi (1b:3T = 1 bille pour 3 cellules). (B) Stratégie de gating et exemple représentatif (donneur LB5660) de l'expression de PD-1, LAG-3 et CTLA-4 à la surface des lymphocytes T CD8 au jour 3 après activation ou non. Les intensités médianes de fluorescence (MFI) sont indiquées. (C) MFI de CTLA-4, PD-1 et LAG-3 pour chaque donneur en condition contrôle ou KO, ainsi que le ratio de la MFI par rapport aux lymphocytes T non stimulés. (D) Pour chaque donneur, le ratio de la MFI du récepteur indiqué a été calculé. L'intervalle de confiance à 95% est coloré par la zone orangée, avec en son centre la valeur moyenne du ratio calculé (trait noir ; valeur indiquée). ** = p<0,01 (Wilcoxon matched-pairs). Les données proviennent de 10 donneurs (3 expériences indépendantes) pour PD-1, 11 donneurs (3 expériences indépendantes) pour LAG-3 et CTLA-4.*

1.3.2 IRF4 est requis pour l'expression de PD-1 par les lymphocytes T en cours de division

L'expression de PD-1 et LAG-3, ainsi que la prolifération des lymphocytes T, est diminuée au sein des lymphocytes T KO pour IRF4. Ces évènements distincts étant conduits par l'activation du TCR, une raison sous-jacente à l'expression moindre de PD-1 et LAG-3 par les lymphocytes T IRF4 KO pourrait être un défaut d'activation. Nous avons donc combiné plusieurs analyses pour exclure cette possibilité. Tout d'abord, nous avons analysé d'autres marqueurs d'activation, à savoir CD69 et CD137. Nous avons aussi mesuré l'expression du facteur de transcription BATF, dont l'expression est rapidement induite et proportionnelle à la force du signal reçu par le TCR, à l'instar d'IRF4 (Iwata et al., 2017; Quigley et al., 2010). Nous avons aussi mesuré Ki67 afin de distinguer les cellules quiescentes des cellules entrées dans le cycle cellulaire. Enfin, nous avons ajouté une sonde cellulaire pour suivre l'expression de chacune de ces molécules au sein des différentes générations de lymphocytes T. Ainsi, nous pouvons comparer l'expression de PD-1 et LAG-3 avec celle de marqueurs d'activation au sein de lymphocytes T proliférant ou non.

Conformément à nos observations précédentes, la prolifération des lymphocytes T KO pour IRF4 est diminuée. Malgré cela, ces derniers expriment divers marqueurs d'activation de façon similaire à leurs homologues normaux. Dans les 2 conditions, CD137 et CD69 sont exprimés de façon analogue à la surface des lymphocytes T, et ceci avant même que les cellules ne soient entrées dans le cycle cellulaire pour se diviser (cellules G_0 $Ki67^-$) (Fig 37a et b).

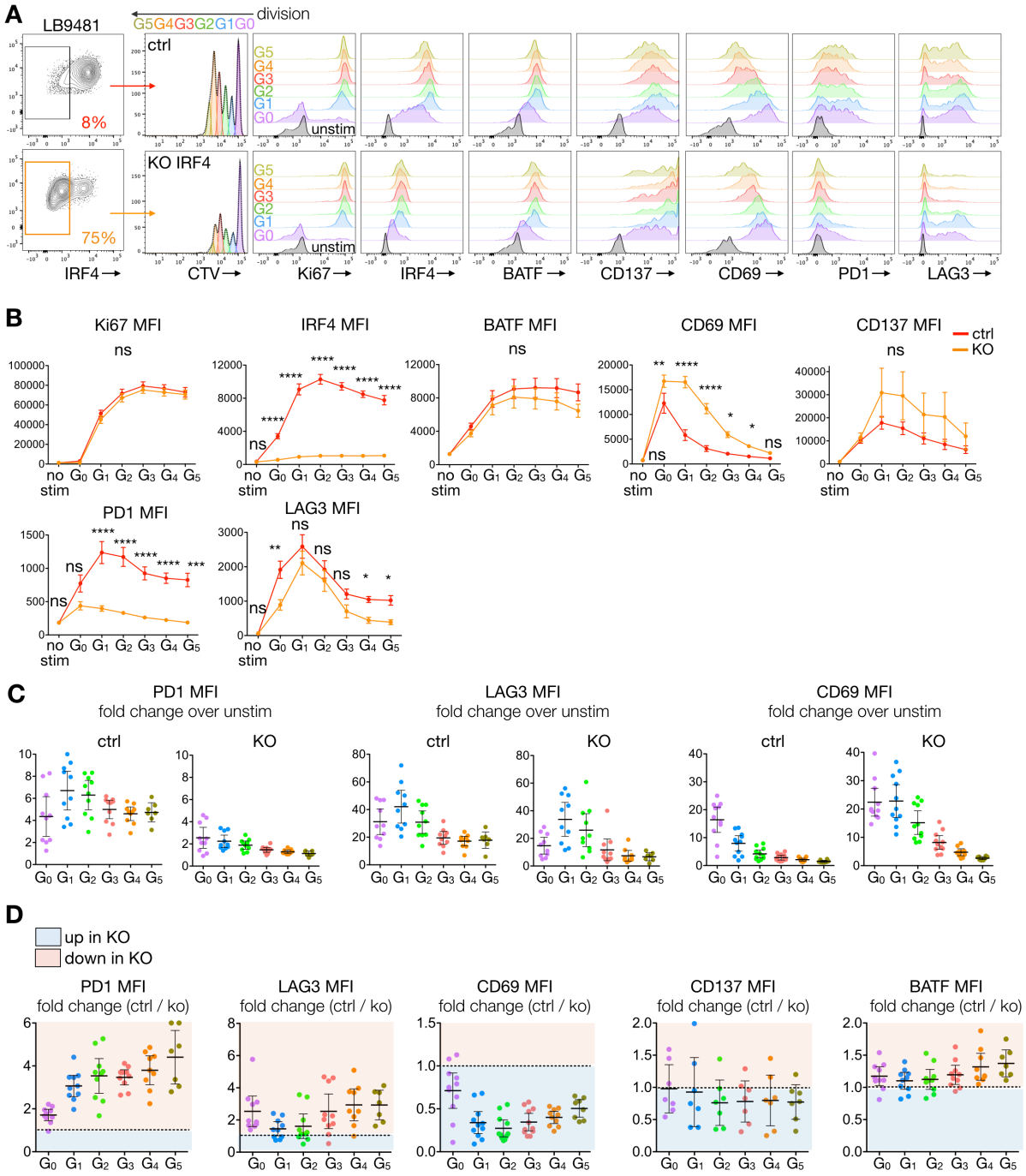


Figure 37. IRF4 est requis pour l'expression de PD-1 et LAG-3 à la surface des lymphocytes T activés qui prolifèrent.

*(A) Exemple de stratégie de gating et d'histogrammes réprésentatifs de l'expression de divers marqueurs au cours de la prolifération des lymphocytes T. (B) Intensité médiane de fluorescence (MFI) moyenne du marqueur indiqué au cours de la prolifération des lymphocytes T KO ou non pour IRF4. ns=p>0,05; *=p<0,05 ; **=p<0,01 ;***=p<0,001 ; ****=p<0,0001 (Two-way ANOVA suivi d'un test de Bonferroni).(C) Ratio de l'expression de PD-1, LAG-3 et CD69 par rapport aux lymphocytes T non stimulés. Le ratio a été calculé pour chaque patient au sein des lymphocytes T KO ou non pour IRF4. (D) Pour chaque génération de cellule de chaque patient, le ratio de l'expression du marqueur indiqué entre la condition contrôle et la condition KO est représenté. La ligne en pointillés représente un ratio de 1 (pas de changement). Les données sont issues de 7 à 11 donneurs, et proviennent de 2 expériences indépendantes pour CD137, et 3 expériences indépendantes pour le reste des marqueurs.*

L'entrée dans le cycle cellulaire, et la division cellulaire qui s'en suit, est corrélée à une expression graduelle de BATF et IRF4 qui atteignent leur maxima à la division 2 (G_2). À l'inverse, CD69, et dans une moindre mesure CD137, déclinent rapidement suite à la première division cellulaire (Fig 37b et c). Ces évènements se produisant à la fois au sein des cellules ctrl et KO pour IRF4, ceci suggère que les lymphocytes T KO pour IRF4 sont activés, qu'ils prolifèrent ou non (Fig 37b et d).

De manière surprenante, l'expression de CD69, et dans une moindre mesure celle de CD137, est plus abondante à la surface des lymphocytes T KO pour IRF4 proliférant (Fig 37b, c et d). Ceci suggère que sans IRF4, le retour à l'état basal de l'expression de ces récepteurs et marqueurs d'activation est retardée.

La division des lymphocytes T s'accompagne également de l'expression de PD-1 et LAG-3. Leur expression survient avant même que les lymphocytes T ne se soient divisés, mais leur maxima est atteint après la première division cellulaire, aux alentours du pic d'expression d'IRF4 et BATF (Fig 37b et c). Toutefois, lorsque IRF4 est KO, l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T proliférant demeure analogue à celle de lymphocytes T quiescents (G_0 $Ki67^-$) (Fig 37b, c et d). L'expression de LAG-3 est également diminuée à la surface des lymphocytes T KO pour IRF4, mais l'effet observé est moindre (Fig 37b, c et d).

Collectivement, l'ensemble de ces données démontre que les lymphocytes T KO pour IRF4 sont activés, prolifèrent, mais n'expriment que très faiblement PD-1. Ainsi, IRF4 est requis pour l'expression de PD-1 par les lymphocytes T CD8 qui se divisent suite à leur activation.

1.3.3 L'abondance d'IRF4 conditionne l'expression de PD-1

Nous avons également mesuré une expression moindre de PD-1 à la surface de lymphocytes T KO pour IRF4 activés par l'anti-CD3 OKT3 uniquement (Fig 38a, b et c). Toutefois, la différence d'expression de PD-1 entre les lymphocytes T KO et les lymphocytes ctrl est environ 2x plus importante lorsque les lymphocytes T sont activés par des billes anti-CD3/CD28 (Fig 38b, c et d).

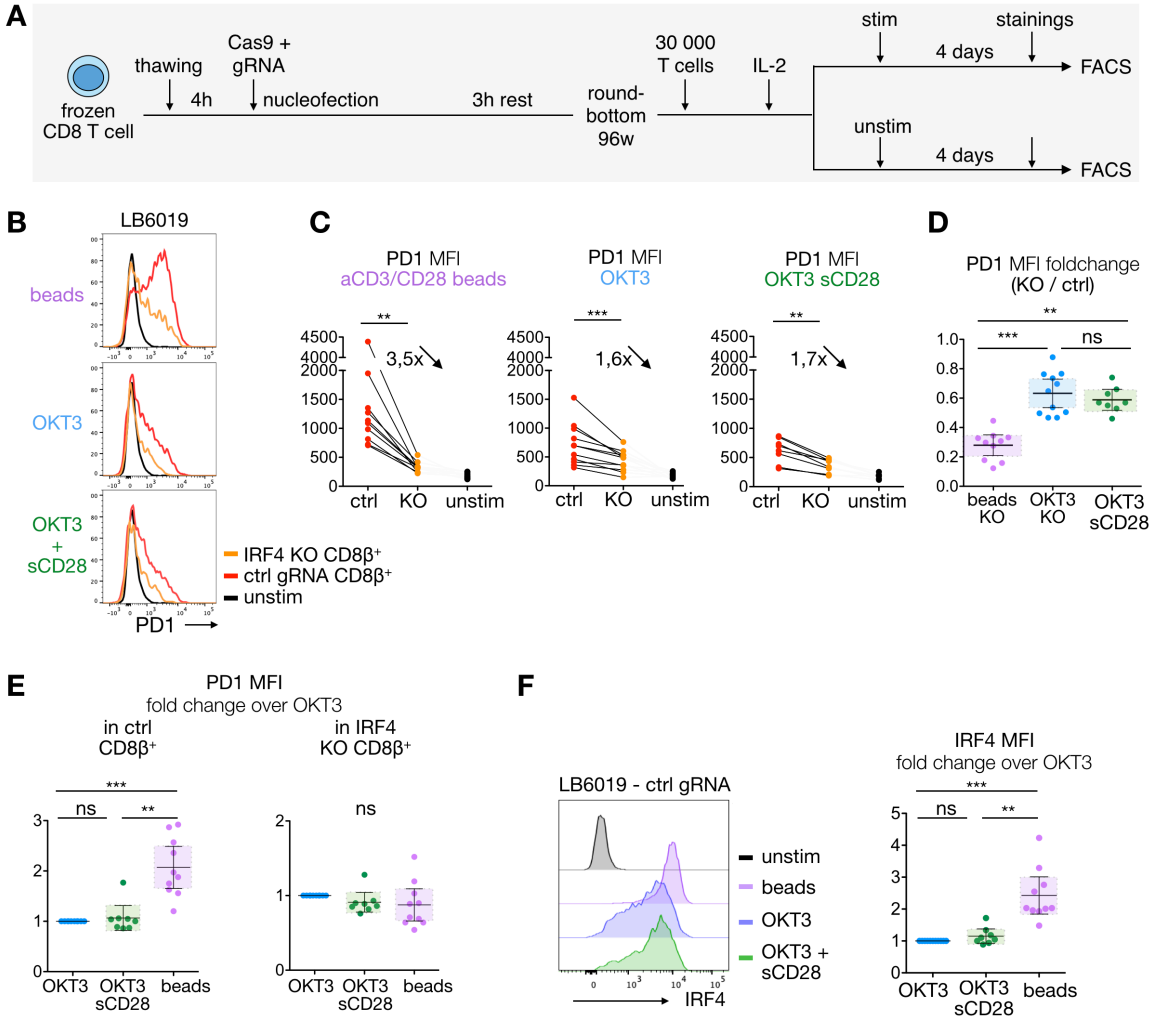


Figure 38. L'expression moindre de PD-1 est corrélée à l'expression moindre de IRF4.
*(A) Aperçu du plan expérimental suivi. (B) Exemple représentatif de l'expression de PD-1 après la stimulation indiquée (beads = 1 bille anti-CD3/CD28 pour 3 cellules; sCD28 = anti-CD28 soluble). (C) MFI de PD-1 au sein des lymphocytes T ctrl ou KO pour IRF4 après la stimulation indiquée. **=p<0,01; ***=p<0,001 (Wilcoxon matched-pair). (D) Pour chaque donneur, le ratio de l'expression de PD-1 entre les cellules KO et contrôle a été calculé après activation par le stimulus indiqué. (E) Pour chaque donneur, le ratio de l'expression de PD-1 a été calculé par rapport aux lymphocytes T stimulés OKT3. (F) Exemple représentatif de l'expression d'IRF4 et ratio de son expression par rapport à des lymphocytes T stimulés OKT3. (D-E) ** = p<0,01 ; *** = p<0,001. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn. L'intervalle de confiance à 95% est colorée avec en son centre la moyenne. Toutes les données de cette figure proviennent de 7-10 donneurs (2-3 expériences indépendantes).*

Ce résultat provient du fait que le niveau de PD-1 à la surface des lymphocytes T contrôle est plus faible après une activation OKT3 par rapport à une activation avec des billes anti-CD3/CD28 (Fig 38e). En revanche, le niveau de PD-1 demeure similaire à la surface des lymphocytes T KO pour IRF4 peu importe le stimulus (Fig 38e). D'où un ratio moindre de l'expression de PD-1 entre les lymphocytes T KO et ctrl lors d'un stimulus OKT3.

L'expression moindre de PD-1 lors d'une activation OKT3 par rapport à des billes anti-CD3/CD28 pourrait provenir de l'absence d'activation de la voie CD28. Afin de tester cette possibilité, nous avons rajouté un anti-CD28 soluble lors de l'activation OKT3. L'expression de PD-1 ne change que peu par rapport à une stimulation OKT3 seule (Fig 38b et e). En accord, le différentiel d'expression de PD-1 entre des lymphocytes T ctrl et KO demeure le même avec ou sans anti-CD28 soluble (Fig 38 c et d). Ceci suggère qu'un autre mécanisme indépendant de la voie CD28 est responsable de l'expression moindre de PD-1 lors d'une activation OKT3.

De manière notable, les lymphocytes T activés OKT3 avec ou sans anti-CD28 soluble expriment moins IRF4 que des lymphocytes T activés avec des billes anti-CD3/CD28 (Fig 38f). Ainsi, la seule activation du TCR, différente entre billes et anticorps OKT3 coaté, module l'abondance d'IRF4 et de PD-1. L'ensemble de ces informations suggère que le niveau d'expression d'IRF4 au sein des lymphocytes T pourrait être un facteur déterminant à l'expression de PD-1.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons réactivé des lymphocytes T sur-exprimant IRF4 ou son gène contrôle RFP (Fig 39a et b). Avant leur réactivation, les lymphocytes T sur-exprimant IRF4 ou la RFP n'expriment pas PD-1 (Fig 39b). Suite à leur réactivation, les lymphocytes T RFP^+ haussent l'expression d'IRF4 et PD-1 (Fig 39c et e). La réactivation des lymphocytes T sur-exprimant IRF4 les conduit à exprimer IRF4 environ 4 fois plus abondamment que leurs homologues RFP^+ réactivés (Fig 39c et d).

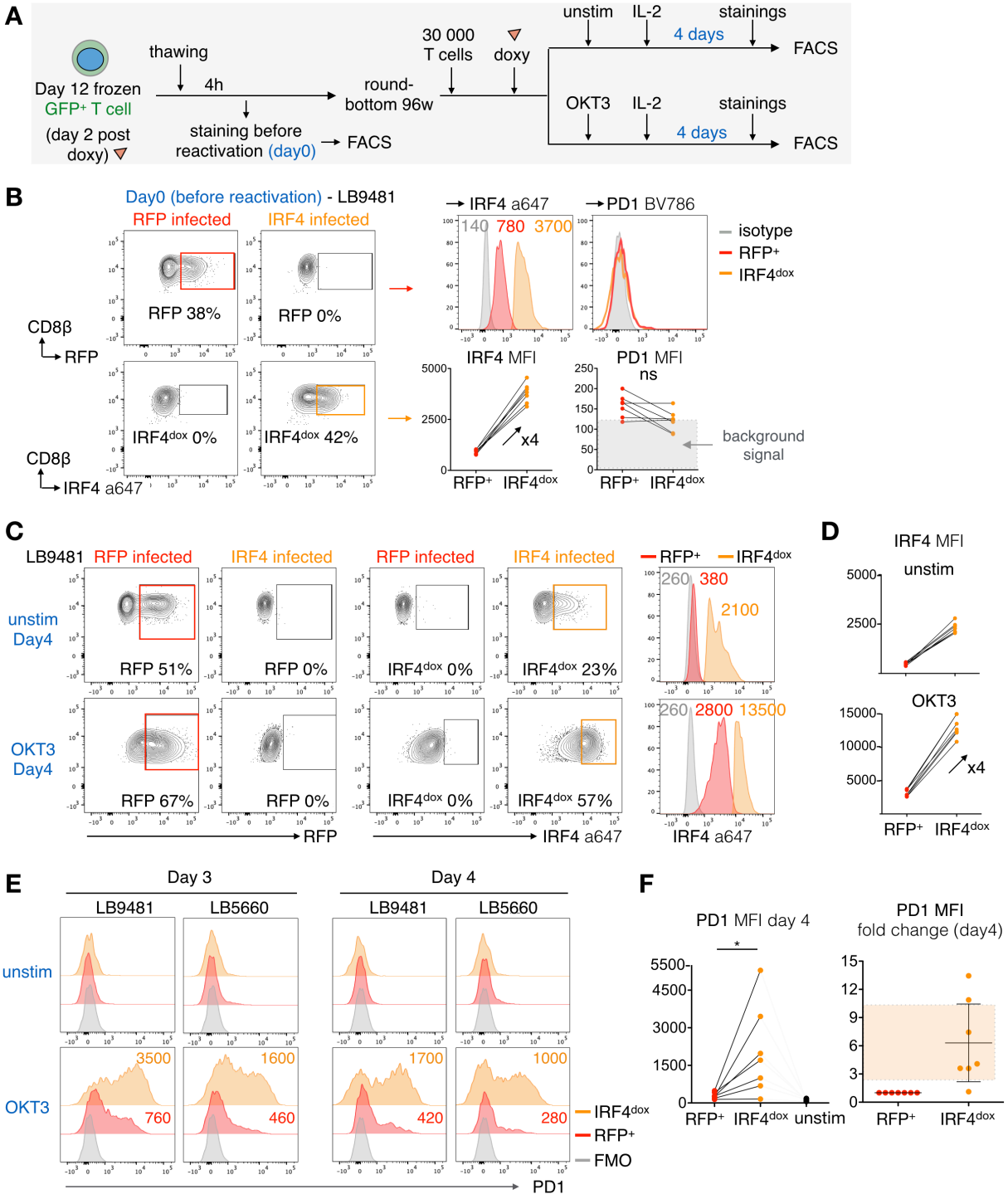


Figure 39. La surexpression d'IRF4 exacerbe l'expression de PD-1.

(A) Aperçu du plan expérimental suivi. (B) Niveau d'expression de IRF4 et PD-1 après décongélation et avant réactivation des lymphocytes T transduits et induits avec la doxycycline. (C) Stratégie de gating et niveau d'expression de IRF4 au jour 4 après réactivation ou non des lymphocytes T. (D) Niveau d'expression d'IRF4 au jour 4 après réactivation ou non pour chaque donneur. Le ratio moyen est indiqué. (E) Exemple représentatif de l'expression de PD-1 aux jours 3 et 4 après réactivation ou non des lymphocytes T. (F) Intensité médiane de fluorescence (MFI) de PD-1 pour chaque donneur au sein des lymphocytes T RFP⁺ et IRF4^{dox}, ainsi que le ratio de l'expression de PD-1 pour chaque donneur. L'intervalle de confiance à 95% est indiquée par la zone orangée avec en son centre la moyenne.

**=p<0,05 (Wilcoxon matched-pairs). Données de 7 donneurs (2 expériences indépendantes).*

Ces lymphocytes T sur-exprimant IRF4 expriment plus fortement PD-1 (Fig 39e et f). Ainsi, l'activation de lymphocytes T sur-exprimant IRF4 exacerbe l'expression de PD-1. Ces données confirment que l'abondance d'IRF4 au sein de lymphocytes T activés est un facteur déterminant pour l'expression soutenue de PD-1.

1.4 Impact d'IRF4 sur le transcriptome des lymphocytes T CD8

Nous avons montré que IRF4 est impliqué dans plusieurs phénomènes biologiques au sein d'un lymphocyte T CD8 : fonctions effectrices, prolifération, et expression de récepteurs inhibiteurs. Étant donné la pluralité des processus biologiques affectés par IRF4, nous avons souhaité analyser le transcriptome de lymphocytes T CD8 KO ou sur-exprimant IRF4 (Fig 40). Nous avons donc trié les cellules KO ou sur-exprimant IRF4 avant d'en extraire l'ARN à analyser par RNA-seq (Fig 40b et d). Cette approche est possible en ajoutant un inhibiteur de RNase lors du marquage intracellulaire des cellules, et en utilisant un kit d'extraction d'ARN pour cellules fixées et perméabilisées (Hrvatin et al., 2014).

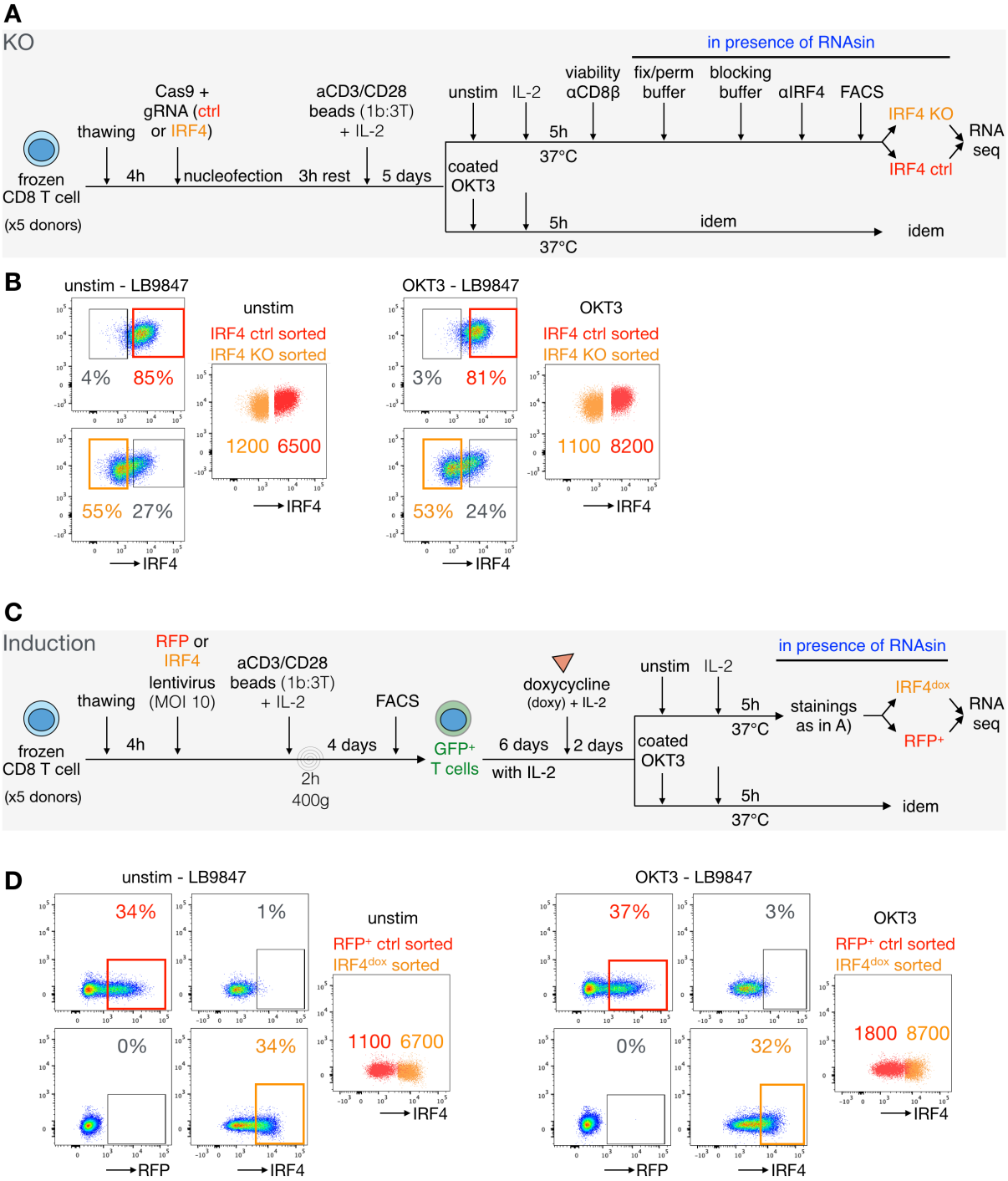


Figure 40. Isolement de lymphocytes T CD8 KO ou sur-exprimant IRF4 pour analyser leur transcriptome.

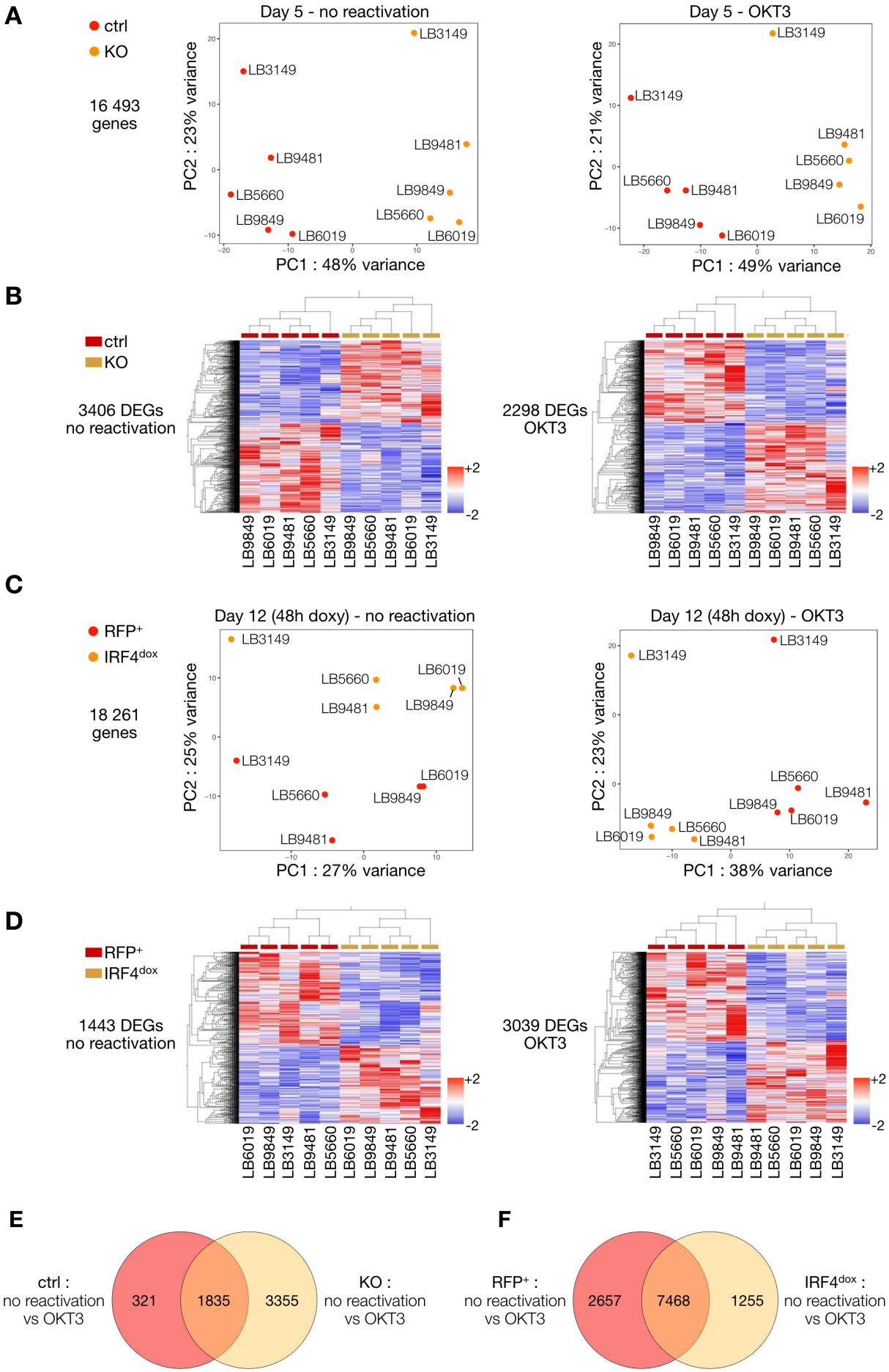
(A) Aperçu global du plan expérimental suivi pour analyser le transcriptome de lymphocytes T KO pour IRF4. L'inhibiteur de RNase est ajouté dès lors que la membrane plasmique des cellules est perméabilisée afin de préserver l'intégrité de l'ARN jusqu'à son extraction. (B) Stratégie de tri pour isoler des lymphocytes T CD8 KO ou non pour IRF4 après réactivation ou non des cellules. (C) Aperçu global du plan expérimental suivi pour analyser le transcriptome de lymphocytes T sur-exprimant IRF4. L'inhibiteur de RNase est ajouté dès lors que la membrane plasmique des cellules est perméabilisée afin de préserver l'intégrité de l'ARN jusqu'à son extraction. (D) Stratégie de tri pour isoler les lymphocytes T CD8 sur-exprimant IRF4 ou son gène contrôle (RFP) après réactivation ou non des cellules.

1.4.1 IRF4 modules des gènes distincts suite à l'activation du TCR

Afin de déterminer les gènes dont l'expression est affectée par IRF4 lorsqu'un lymphocyte T est activé, les lymphocytes T ont été réactivés ou non pendant 5h. Les lymphocytes T IRF4 KO ont été stimulés 5 jours auparavant afin d'être amplifiés (Fig 40a). Par conséquent, l'absence d'IRF4 pendant les 5 jours subséquents à cette première stimulation cause des changements transcriptionnels avant même que les cellules aient été réactivées (Fig 41a et b). Lorsque nous forçons l'expression d'IRF4, l'induction d'IRF4 a lieu à partir du 10ème jour après stimulation (Fig 40c). Dans ce contexte, de moindres changements transcriptionnels sont provoqués, à moins que les lymphocytes T n'aient été réactivés pendant 5h (Fig 41c et d) Enfin, nous avons également observé que l'activation du TCR provoque l'expression de gènes distincts en fonction de l'expression ou non d'IRF4 par les lymphocytes T CD8 (Fig 41e et f).

L'ensemble de ces données suggère que la fonction exercée par IRF4 dans des lymphocytes T se manifeste notamment lorsqu'ils sont activés, ce qui est cohérent d'un point de vue physiologique puisque IRF4 lui-même survient après activation du TCR avant de retourner progressivement à un niveau basal.

Figure 41. Impact d'IRF4 sur le transcriptome des lymphocytes T CD8 réactivés ou non.
L'expression d'IRF4 dans les lymphocytes T CD8 a été manipulée par CRISPR/Cas9 ou par transduction lentivirale, puis les cellules ont été réactivées ou non pendant 5h avec l'anticorps OKT3. Les cellules ont ensuite été triées afin d'en extraire l'ARN et d'analyser leur transcriptome par RNA-seq. (A) Analyse en composante principale (PCA) de l'ensemble des gènes exprimés après réactivation ou non des lymphocytes T CD8 KO ou non pour IRF4. Chaque point représente un échantillon. (B) Heatmap des gènes différentiellement exprimés entre les lymphocytes T CD8 ctrl et KO pour IRF4 avant ou après réactivation. (C) PCA de l'ensemble des gènes exprimés après réactivation ou non de lymphocytes T CD8 sur-exprimant la RFP ou IRF4 (IRF4^{dox}). Chaque point représente un échantillon. (D) Heatmap des gènes différentiellement exprimés entre les lymphocytes T CD8 RFP^{+} et IRF4^{dox} avant ou après réactivation. (E-F) Diagramme de Venn des gènes différentiellement exprimés entre la condition non activée et la condition réactivée au sein des lymphocytes T CD8 contrôle ou dont l'expression d'IRF4 a été invalidée (KO) ou induite avec la doxycycline (IRF4^{dox}).
Les gènes différentiellement exprimés ont été obtenus par analyse pairée dans DESeq2, et leur différence d'expression a été considérée comme statistiquement significative pour une p-value ajustée <0,05. Aucun seuil de fold-change n'a été utilisé.


A
ctrl
KO
16 493 genes
Day 5 - no reactivation
PC2 : 23% variance
PC1 : 48% variance
Day 5 - OKT3
PC2 : 21% variance
PC1 : 49% variance
B
ctrl
KO
3406 DEGs no reactivation
2298 DEGs OKT3
+2
-2
C
RFP+
IRF4dox
18 261 genes
Day 12 (48h doxy) - no reactivation
PC2 : 25% variance
PC1 : 27% variance
Day 12 (48h doxy) - OKT3
PC2 : 23% variance
PC1 : 38% variance
D
RFP+
IRF4dox
1443 DEGs no reactivation
3039 DEGs OKT3
E
ctrl : no reactivation vs OKT3
321
1835
3355
KO : no reactivation vs OKT3
F
RFP+ : no reactivation vs OKT3
2657
7468
1255
IRF4dox : no reactivation vs OKT3

Nous avons ensuite analysé si l'expression forcée d'IRF4 ou son KO altérait de manière réciproque l'expression des gènes communément affectés par IRF4. Nous avons donc analysé si les gènes surexprimés lorsque l'expression d'IRF4 est forcée sont des gènes sous-exprimés au sein des lymphocytes T KO pour IRF4, et inversement (Fig 42a et b). Avant réactivation, seuls 14% des gènes différentiellement exprimés en condition KO ont leur expression qui change de manière réciproque avec les gènes différentiellement exprimés entre les cellules sur-exprimant IRF4 et leur contrôle RFP^+ (Fig 42a). Après réactivation, plus de 30% des gènes différentiellement exprimés en condition KO ont leur expression qui change de manière réciproque avec les gènes différentiellement exprimés entre les cellules sur-exprimant IRF4 et leur contrôle RFP^+ (Fig 42b). C'est donc suite à la réactivation des lymphocytes T que la manipulation de l'expression d'IRF4 induit le plus de similitudes phénotypiques entre les 2 méthodes utilisées.

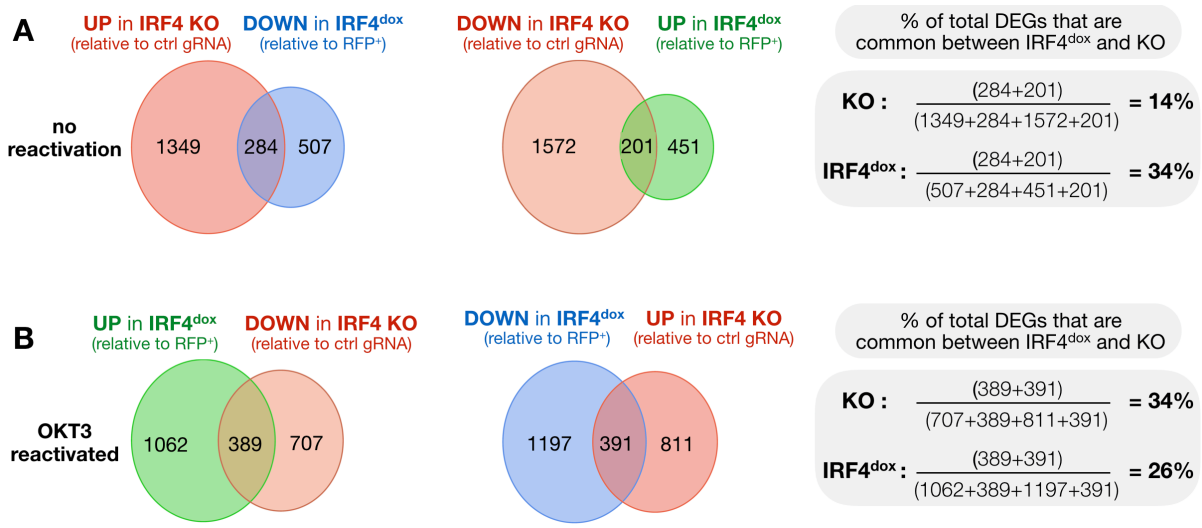


Figure 42. Identification de gènes réciproquement affectés par KO ou surexpression d'IRF4. *(A-B) Diagrammes de Venn pour identifier les gènes communs dont l'expression augmente ou diminue en fonction de l'expression ou non d'IRF4. L'analyse a été faite dans DESeq2 à partir des gènes différentiellement exprimés obtenus (A) avant réactivation des cellules ou (B) après réactivation des cellules.*

1.4.2 IRF4 inhibe l'expression de gènes régulés par la voie NFκB

Afin d'identifier les voies biologiques communément affectés par IRF4, nous avons réalisé du Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) sur 50 collections de gènes représentant une variété de processus biologiques. Ces collections de gènes ont été fondées à partir de 4000 jeux de données d'expression desquelles ont été extraits les gènes dont l'expression est communément identifiée et homogène, et la relevance des collections de gènes en étant issues a ensuite été manuellement vérifiée (Liberzon et al., 2015).

Notre analyse de GSEA sur ces collections a révélé que suite à la réactivation des lymphocytes T, des gènes dont l'expression est régulée par NFκB sont enrichis au sein des cellules KO pour IRF4 (Fig 43a), et sont moins exprimés au sein des cellules sur-exprimant IRF4 (Fig 43b). Des données similaires ont été obtenues avant réactivation des lymphocytes T, mais avec des scores d'enrichissement moindres car moins de gènes liés à cette voie sont différentiellement exprimés avant réactivation (Fig 43c).

De manière intéressante, le facteur de transcription de la famille NFκB, c-Rel, est moins exprimé lorsque IRF4 est surexprimé, tandis que le KO d'IRF4 augmente l'expression de c-Rel (Fig 43d). Par ailleurs, la protéine Trib1 empêche la formation du complexe CARMA1-Bcl10-MALT1 essentiel à la propagation du signal activant NFκB (Rome et al., 2020). Lorsque les cellules sont au repos, Trib1 est moins exprimé au sein des cellules KO pour IRF4 (Fig 43e). À l'inverse, la surexpression d'IRF4 augmente l'expression de Trib1 (Fig 43f). Collectivement, ces données suggèrent que IRF4 inhibe l'expression de gènes liés à la voie NFκB par la modulation de l'expression de c-Rel, mais aussi en augmentant l'expression de l'inhibiteur de la voie NFκB, Trib1.

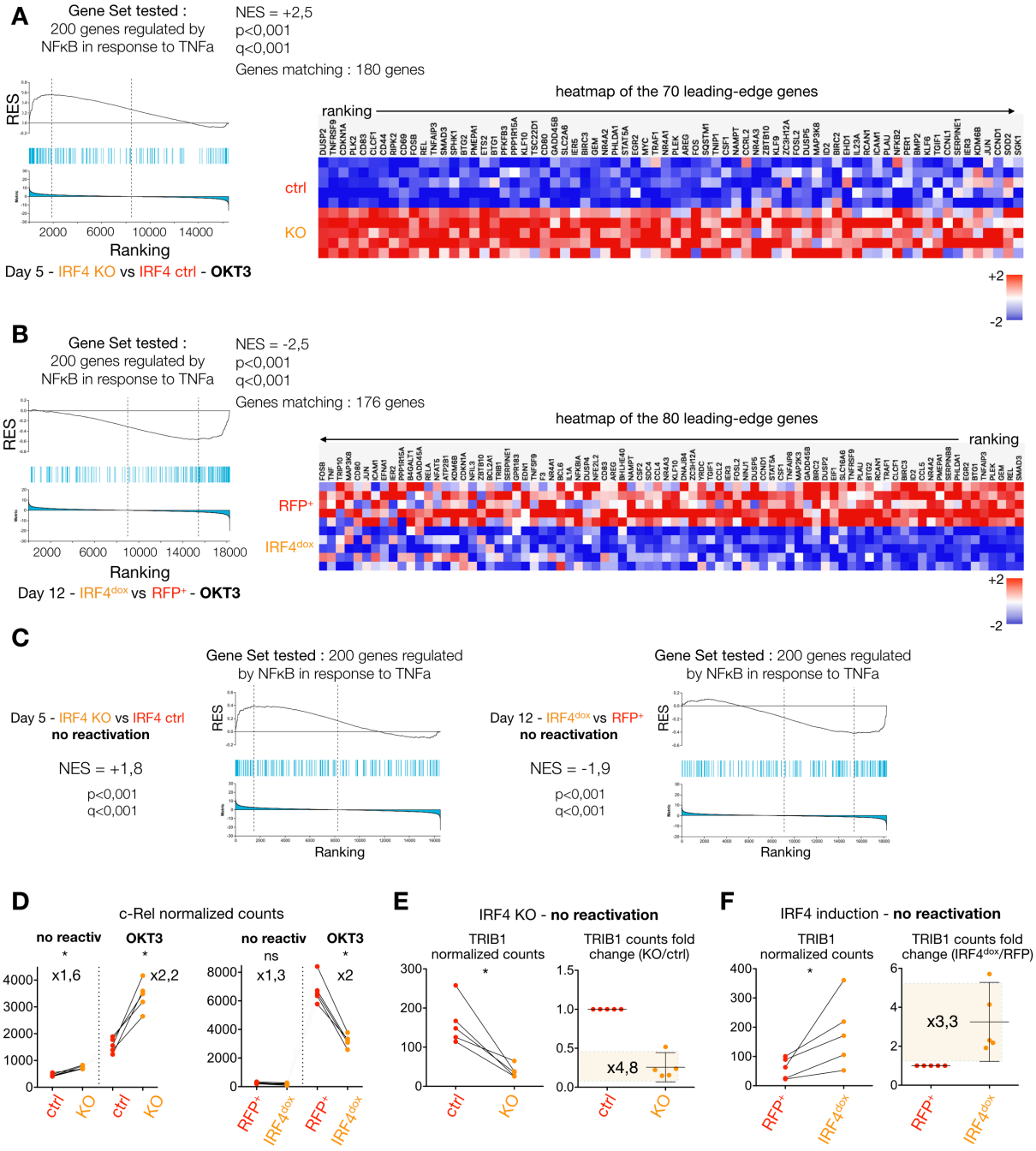


Figure 43. IRF4 inhibe l'expression de gènes contrôlés par la voie NFκB.

*(A-B) GSEA sur un ensemble de gènes dont l'expression est régulée par la voie NFκB (Hallmark TNFA signaling by NFKB). La heatmap des gènes associés au score d'enrichissement est montrée. La p-value a été obtenue en recalculant à 1000 reprises le score d'enrichissement après permutation aléatoire de notre liste de gènes. La q-value correspond au False Discovery Rate (FDR). NES = Normalized Enrichment Score. Un score positif indique que les gènes induits par NFκB sont plus exprimés dans la condition testée (KO IRF4 OKT3 en A) tandis qu'un score négatif indique que les gènes induits par NFκB sont moins exprimés dans la condition testée (cellules IRF4^{dox} OKT3 en B). (C) Valeurs d'expression de c-Rel en condition indiquée (KO à gauche, surexpression à droite). (D) Valeur d'expression de Trib1 et ratio de son expression en condition KO non réactivée. (E) Valeur d'expression de Trib1 et ratio de son expression en condition de surexpression non réactivée. (F) GSEA sur un ensemble de gènes dont l'expression est régulée par la voie NFκB. Le test a été fait comme expliqué en A et B, sur les gènes exprimés avant réactivation des lymphocytes T. *=p valeur ajustée <0,05. ns = p valeur ajustée > 0,05.*

1.4.3 IRF4 favorise l'expression de gènes régulant le cycle cellulaire

Nous avons également observé par Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) que des gènes exprimés lors de la progression dans le cycle cellulaire sont moins exprimés au sein des lymphocytes T KO pour IRF4 (Fig 44a). L'expression de ces gènes résulte de l'activité des facteurs de transcription E2F dont l'activité lors de la phase G1 du cycle cellulaire permet la progression dans la suite du cycle (Kent and Leone, 2019). Leur expression moindre en l'absence d'IRF4 témoigne qu'un blocage dans le cycle cellulaire pourrait avoir lieu en l'absence d'IRF4. Ceci est en harmonie avec nos données précédentes montrant que moins de lymphocytes T CD8 se divisent en l'absence d'IRF4 (Fig 33-34).

Ce même ensemble de gènes est enrichi au sein des lymphocytes T CD8 sur-exprimant IRF4 (Fig 44b). Ces données sont également en harmonie avec nos données précédentes montrant qu'au jour 12 après activation, les lymphocytes T CD8 sur-exprimant IRF4 pendant 48h ré-expriment d'avantage Ki67 (Fig 35 b et c). Ainsi, bien que la surexpression d'IRF4 ne confère pas d'avantage prolifératif lors de la réactivation des lymphocytes T (Fig 35 f), sa surexpression pourrait retarder l'entrée des lymphocytes T en quiescence en maintenant l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire.

Collectivement, ces données montrent un lien entre IRF4, prolifération, et modulation de l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire.

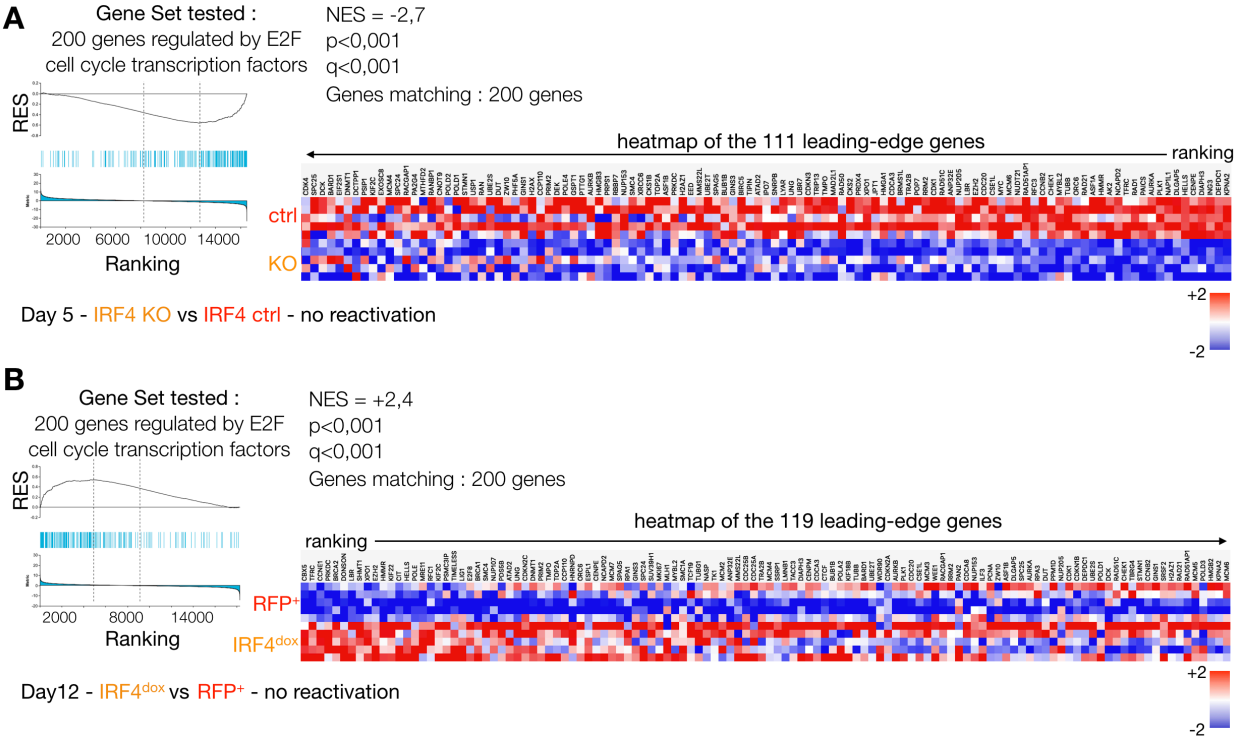


Figure 44. IRF4 favorise l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire.
(A-B) GSEA sur un ensemble de gènes impliqués dans le cycle cellulaire (Hallmark E2F Targets Gene set). La heatmap des gènes associés au score d'enrichissement est montrée. La p-value a été obtenue en recalculant à 1000 reprises le score d'enrichissement après permutation aléatoire de notre liste de gènes. La q-value correspond au False Discovery Rate (FDR). NES = Normalized Enrichment Score. Un score négatif indique que les gènes du cycle cellulaire sont moins exprimés dans la condition testée (KO IRF4 non réactivés en A) tandis qu'un score positif indique que les gènes du cycle cellulaire sont plus exprimés dans la condition testée (cellules IRF4^{dox} non réactivées en B).

Conclusion :

En manipulant l'expression d'IRF4 au sein de lymphocytes T CD8 isolés du sang de donneurs atteints d'hémochromatose, nous avons montré que IRF4 atténue les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8 tout en favorisant leur prolifération et l'expression de récepteurs inhibiteurs. En particulier, nous avons montré que PD-1 était quasiment absent à la surface des lymphocytes T KO pour IRF4 dès la 1ère division cellulaire effectuée, bien que ces cellules expriment abondamment les marqueurs d'activation CD137 et CD69, et le facteur de transcription BATF. Forcer l'expression d'IRF4 lorsqu'il est limitant pour induire PD-1 permet d'augmenter le niveau d'expression de ce dernier. Ces données indiquent collectivement que IRF4 pourrait agir comme un rhéostat : en fonction de son abondance dans les lymphocytes T CD8, il calibre leurs fonctions effectrices et l'expression du récepteur inhibiteur PD-1. Ces données ont été approfondies par nos analyses de transcriptome révélant que IRF4 inhibe l'expression de gènes régulés par la voie NFκB tout en favorisant l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire.

Dans la suite de ces résultats, nous avons examiné si IRF4 était exprimé dans les lymphocytes T CD8 infiltrés dans les tumeurs chez l'Homme.

2 Les TILs de carcinome ovarien exprimant IRF4 ont un phénotype « épuisé »

Nous avons souhaité déterminer si IRF4 est exprimé au sein des lymphocytes T CD8 infiltrés dans les tumeurs (TILs) humaines. Pour ce faire, nous avons utilisé des échantillons de cancer épithélial de l'ovaire de haut grade obtenus à partir de patientes n'ayant reçu aucun traitement préalable. Le phénomène d'épuisement étant au cœur des investigations réalisées sur les TILs, nous avons analysé si les TILs exprimant IRF4 présentent des caractéristiques de cellules épuisées. L'expression d'IRF4 a donc été simultanément analysée avec celle de TOX et PD-1, deux protéines communément employées pour identifier les lymphocytes T CD8 épuisés.

Toutefois, comme vu en introduction de cette thèse, des ambiguïtés persistent quant à la possibilité d'employer TOX et PD-1 comme marqueurs d'épuisement. Tout d'abord, leur expression peut simplement refléter l'activation récente d'un lymphocyte T. De plus, l'expression de TOX a été rapportée au sein des lymphocytes T anti-EBV et CMV fonctionnels dans le sang de donneurs sains (Sekine et al., 2020).

Afin de contourner ce biais de l'activation, nous avons comparé le phénotype des TILs à celui de lymphocytes T CD8 répondant au SARS-CoV-2 dans le sang de patients COVID-19. Aussi, nous avons mesuré la fonctionnalité des TILs afin de confirmer ou d'infirmer que TOX et PD-1 marquent des lymphocytes T dont la fonctionnalité est réduite, conséquence principale du phénomène de l'épuisement.

Cette seconde partie porte sur les résultats obtenus par cette approche, qui permet d'apporter plus de clarté quant au contexte cellulaire dans lequel IRF4 est exprimé en condition pathologique.

2.1 IRF4 est exprimé dans les TILs PD-1^{hi} TOX^{hi} activés

2.1.1 Les tumeurs épithéliales ovariennes contiennent des TILs PD-1^{hi} TOX^{hi}

Nous avons analysé l'expression de PD-1 et TOX au sein des TILs CD8 de carcinome ovarien (Fig 45a et b). Sur la base de l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 du sang et de la tumeur, 3 populations distinctes de cellules ont pu être identifiées : PD-1^{neg} (expression indétectable de PD-1), PD-1^{int} (expression détectable de PD-1), et PD-1^{hi} (expression de PD-1 supérieure à celle mesurée dans le sang de donneurs sains) (Fig 45c, haut). Suivant la même logique, 3 populations de lymphocytes T CD8 ont été identifiées selon le niveau d'expression de TOX (Fig 45c, bas). Conformément à de précédents rapports décrivant une corrélation entre PD-1 et TOX, les lymphocytes T CD8 PD-1^{hi} et TOX^{hi} sont la même population (Fig 45d) (Khan et al., 2019; Scott et al., 2019).

En moyenne, 1 à 2% des lymphocytes T du sang de donneurs sains sont PD-1^{hi}, tandis que la tumeur contient une fréquence moyenne de 50% de lymphocytes T PD-1^{hi} exprimant abondamment TOX (Fig 45e). Conformément à un rapport précédent, nous détectons des lymphocytes T CD8 exprimant TOX et PD-1 dans le sang de donneurs sains (Sekine et al., 2020) (Fig 45 e et f). Les lymphocytes T exprimant abondamment TOX (TOX^{hi}) ne sont abondamment présents que dans les TILs exprimant abondamment PD-1 (Fig 45 e et f). Ces données démontrent l'étroite corrélation entre l'expression abondante de TOX et celle de PD-1 dans les TILs de carcinome ovarien, et précisent que l'expression de TOX rapportée dans le sang de donneurs sains (Sekine et al., 2020) n'est pas comparable à celle observée dans les TILs. La coexpression abondante de TOX et PD-1 n'est pas liée à une compensation incorrecte de la fluorescence puisque le profil de fluorescence des TILs marqués seulement pour l'une ou l'autre molécule démontre que les fuites spectrales des fluorochromes sont corrigées (Fig 45g). En conclusion, l'expression abondante de TOX et PD-1 au sein des TILs suggère que ces cellules ont un phénotype épuisé (Khan et al., 2019; Scott et al., 2019).

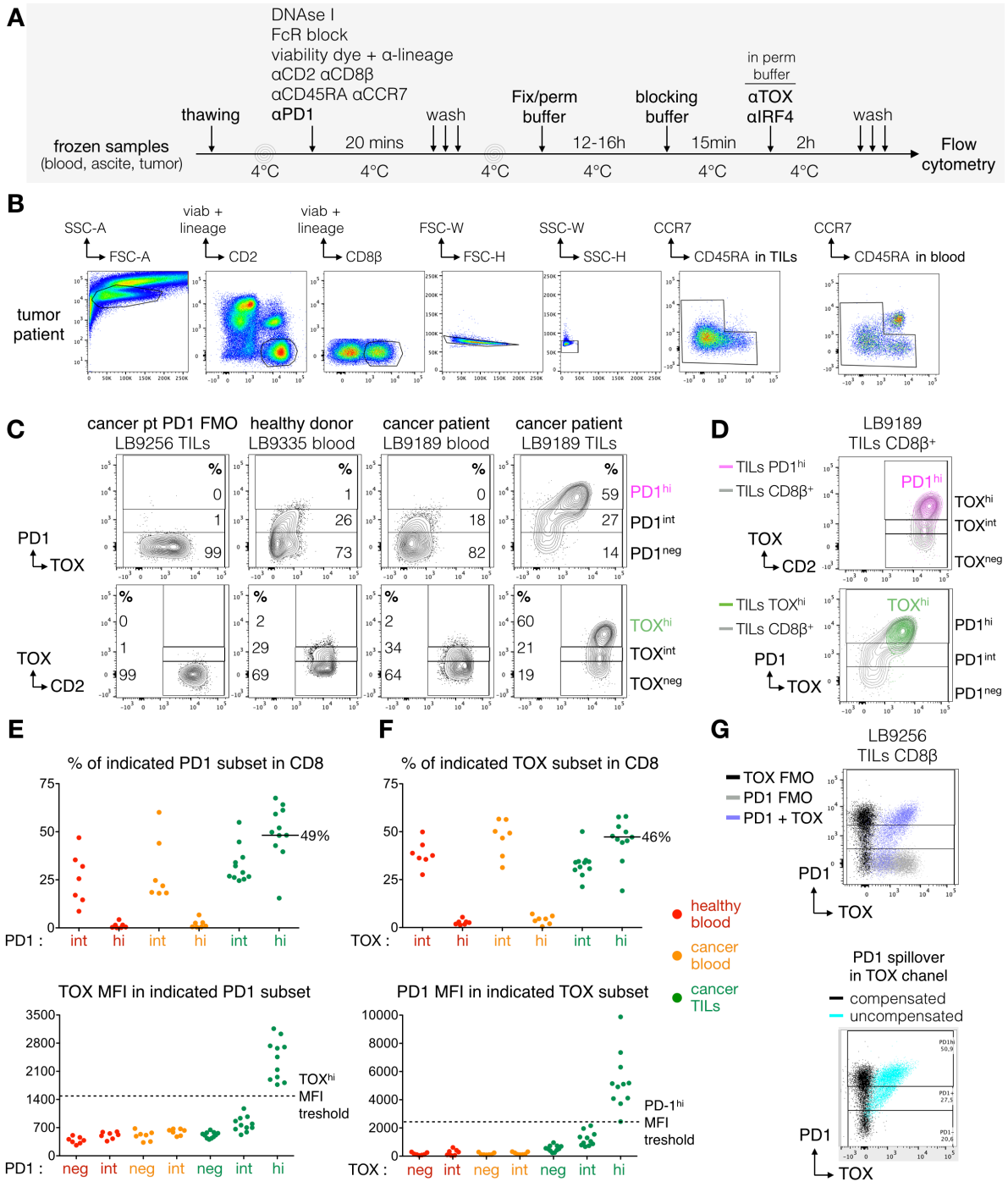


Figure 45. Les TILs de carcinome ovarien contiennent des lymphocytes T CD8 PD-1^{hi} TOX^{hi}. *(A-B) Aperçu du plan expérimental suivi et exemple de stratégie de gating sur les lymphocytes T CD8 non naïfs dans la tumeur (ou le sang). (C) Stratification des lymphocytes T CD8 en 3 populations sur la base de l'expression de PD-1 ou de TOX. (D) La population de TILs TOX^{hi} (verte) est superposée aux TILs CD8 en regard de l'expression de PD-1 et TOX. La population de TILs PD-1^{hi} (rose) est superposée aux TILs CD8 en regard de l'expression de TOX et CD2. (E) Pourcentage de la population PD-1 indiquée (haut) et intensité médiane de fluorescence (MFI) de TOX dans chacune de ces populations (bas). (F) Pourcentage de la population TOX indiquée (haut) et MFI de PD-1 dans chacune de ces populations (bas). (G) Marquage des TILs avec le panel incluant les anticorps anti-TOX et anti-PD-1 (pourpre), n'incluant pas d'anti-TOX (FMO – noir), ou n'incluant pas d'anti-PD-1 (FMO – gris). Les données proviennent de 3 expériences indépendantes, et chaque point (E-F) représente un donneur.*

2.1.2 Les TILs exprimant IRF4 sont PD-1^{hi} TOX^{hi} et sont activés

Nous avons souhaité déterminer si IRF4 était exprimé au sein des TILs avec un phénotype épuisé (Fig 46a). Environ 80% des TILs qui expriment IRF4 sont des lymphocytes T CD8 PD-1^{hi}, suggérant que IRF4 marque majoritairement des TILs avec un phénotype épuisé (Fig 46b). Cependant, l'expression d'IRF4 ne capture pas tous les TILs PD-1^{hi} puisque 40% des lymphocytes T IRF4^{-} sont PD-1^{hi} (Fig 46b). Ce constat découle du fait que seule une fraction (en moyenne 30%) des TILs PD-1^{hi} expriment IRF4 (Fig 46c). L'expression d'IRF4 étant conduite par l'activation du TCR, ces données suggèrent que les TILs PD-1^{hi} exprimant IRF4 sont activés. Afin de le confirmer, nous avons également mesuré l'expression de CD137. Environ 60% des TILs PD-1^{hi} IRF4^{+} expriment CD137, contre 20% dans les TILs PD-1^{hi} IRF4^{-} (Fig 46d et e). Ceci renforce le postulat selon lequel l'expression d'IRF4 identifie des TILs activés dans la tumeur. En accord, environ 30% des TILs PD-1^{hi} expriment CD137, une proportion égale aux TILs PD-1^{hi} exprimant IRF4 (Fig 46f). Ainsi, l'expression d'IRF4 et CD137 dans les TILs PD-1^{hi} est hautement corrélée et témoigne de leur activation (Fig 46g).

Une majeure partie des TILs PD-1^{hi} n'exprimant ni IRF4 ni CD137, ceci peut indiquer qu'ils sont soit au repos, soit dans un état d'activation qui ne coïncide pas avec l'expression d'IRF4 et CD137. Nous avons donc mesuré l'expression de Ki67 pour évaluer la proportion de cellules quiescentes ou non (Fig 46h et i). En moyenne, 50% des TILs PD-1^{hi} n'expriment pas Ki67, suggérant que ces cellules sont quiescentes (Fig 46j). En accord, ces cellules quiescentes n'expriment que peu IRF4, contrairement aux cellules Ki67^{+} (Fig 46k). Toutefois, l'expression de IRF4 ne capture pas l'ensemble des TILs PD-1^{hi} Ki67^{+} (Fig 46k et l). Ceci suggère que les TILs PD-1^{hi} Ki67^{+} sont une population hétérogène de cellules activées, dont IRF4 reflète l'un de ces états d'activation.

En conclusion, IRF4 est majoritairement exprimé dans les TILs avec un phénotype épuisé et activé.

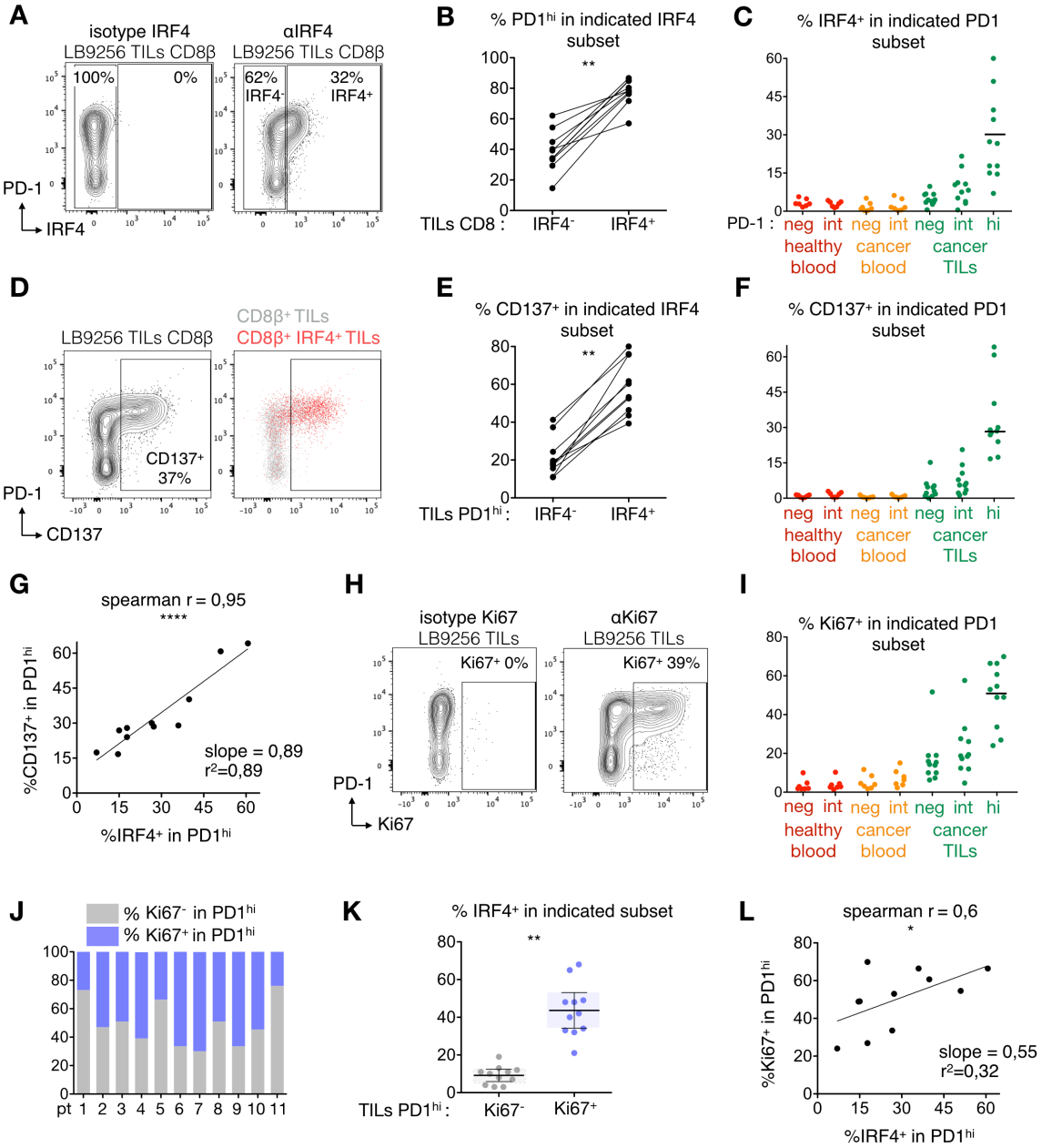


Figure 46. IRF4 est exprimé au sein des TILs PD-1^{hi} activés.

*(A) Exemple d'identification de TILs CD8 exprimant IRF4. (B) Proportion de cellules PD-1^{hi} dans les TILs CD8 exprimant IRF4 pour chaque échantillon de tumeur. (C) Proportion de cellules exprimant IRF4 dans les sous-populations PD-1 présentes dans le sang et la tumeur. (D) Exemple d'identification de TILs CD8 exprimant CD137, et superposition des TILs IRF4^{+} en regard de l'expression de PD-1 et CD137. (E) Proportion de cellules CD137^{+} dans les TILs PD-1^{hi} IRF4^{-} et IRF4^{+}. (F) Proportion de cellules exprimant CD137 dans les sous-populations PD-1 présentes dans le sang et la tumeur. (G) Corrélation entre l'expression de CD137 et de IRF4 dans les TILs PD-1^{hi}. ****=p<0,0001 (test de Spearman). La pente et précision de la droite de régression linéaire sont indiquées. (H) Exemple d'identification de TILs CD8 exprimant Ki67. (I) Proportion de cellules exprimant Ki67 dans les sous-populations PD-1 présentes dans le sang et la tumeur. (J) Pour chaque patiente, la proportion de cellules Ki67^{-} (gris) et Ki67^{+} (pourpre) dans les TILs PD-1^{hi} est représentée. (K) Proportion de cellules IRF4^{+} dans les TILs PD-1^{hi} Ki67^{-} et Ki67^{+}. (L) Corrélation entre l'expression de Ki67 et l'expression de IRF4 dans les TILs PD-1^{hi}. *=p<0,05 (test de Spearman). La pente et précision de la droite de régression linéaire sont indiquées. **=p<0,01 (Wilcoxon matched-pairs; B, E et K).*

2.2 Les TILs PD-1^{hi} TOX^{hi} sont-ils épuisés ?

Nous avons ensuite souhaité confirmer si les TILs PD-1^{hi} TOX^{hi} , dans lesquels IRF4 est en partie exprimé, sont des lymphocytes T épuisés. En effet, comme nous venons de le voir, divers marqueurs d'activation sont exprimés par ces cellules. Par conséquent, l'expression de PD-1 et TOX pourrait être le reflet de leur simple activation. Cette conjecture pourrait être infirmée en postulant qu'une partie des TILs PD-1^{hi} TOX^{hi} est quiescente, et donc que l'expression élevée de ces molécules est indépendante de leur activation. Néanmoins, nous avons montré précédemment que l'expression de récepteurs après activation survient avant même l'entrée dans le cycle cellulaire (Fig 37). De plus, nous ne pouvons pas exclure que les TILs PD-1^{hi} qui n'expriment pas Ki67 ne sont pas activés : peut-être ne parviennent-ils pas à entrer dans le cycle cellulaire suite à leur activation. Enfin, nous ne connaissons pas la cinétique d'expression de PD-1, TOX et Ki67 depuis l'activation du TCR d'un lymphocyte T CD8 *in vivo*.

Afin de confirmer que les TILs PD-1^{hi} TOX^{hi} sont épuisés, nous avons testé leur capacité de production d'IFNγ, laquelle est rapportée comme diminuée dans le phénomène d'épuisement. Puis, nous avons comparé le phénotype des TILs à celui de lymphocytes T CD8 répondant à une infection au SARS-CoV-2 dans le sang de patients COVID-19. Ceci permet de mesurer si l'activation d'un lymphocyte T CD8 *in vivo* chez l'Homme conduit également à l'expression de TOX et PD-1 comme observé au sein des TILs CD8 de carcinome ovarien.

2.2.1 Les TILs PD-1^{hi} TOX^{hi} ont un défaut de production de cytokines

Nous avons stratifié les TILs en 3 populations sur la base de l'expression de PD-1, et mesuré la fréquence de cellules productrices d'IFNγ au sein de chaque population. La quantité d'IFNγ produite par les cellules IFNγ^{+} au sein de chaque population a également été mesurée. Comparée à leurs homologues PD-1^{neg} et PD-1^{int}, la production d'IFNγ par les TILs PD-1^{hi} est en moyenne 2x moins fréquente (Fig 47a et b). De plus, l'intensité médiane de fluorescence de l'IFNγ

synthétisé au sein des cellules productrices est en moyenne 2x moins élevée dans les TILs PD-1^{hi} par rapports à leurs homologues PD-1^{neg} (Fig 47c). Stimuler les TILs avec de la PMA et ionomycine permet de forcer la production d'IFNγ par les TILs PD-1^{hi} (Fig 47d). Malgré cela, la quantité d'IFNγ synthétisée au sein des TILs PD-1^{hi} IFNγ^{+} est 2 fois inférieure (Fig 47e). Collectivement, ces données démontrent que le défaut de production d'IFNγ des TILs PD-1^{hi} est profond, et renforcent ainsi le postulat selon lequel ces lymphocytes T sont épuisés.

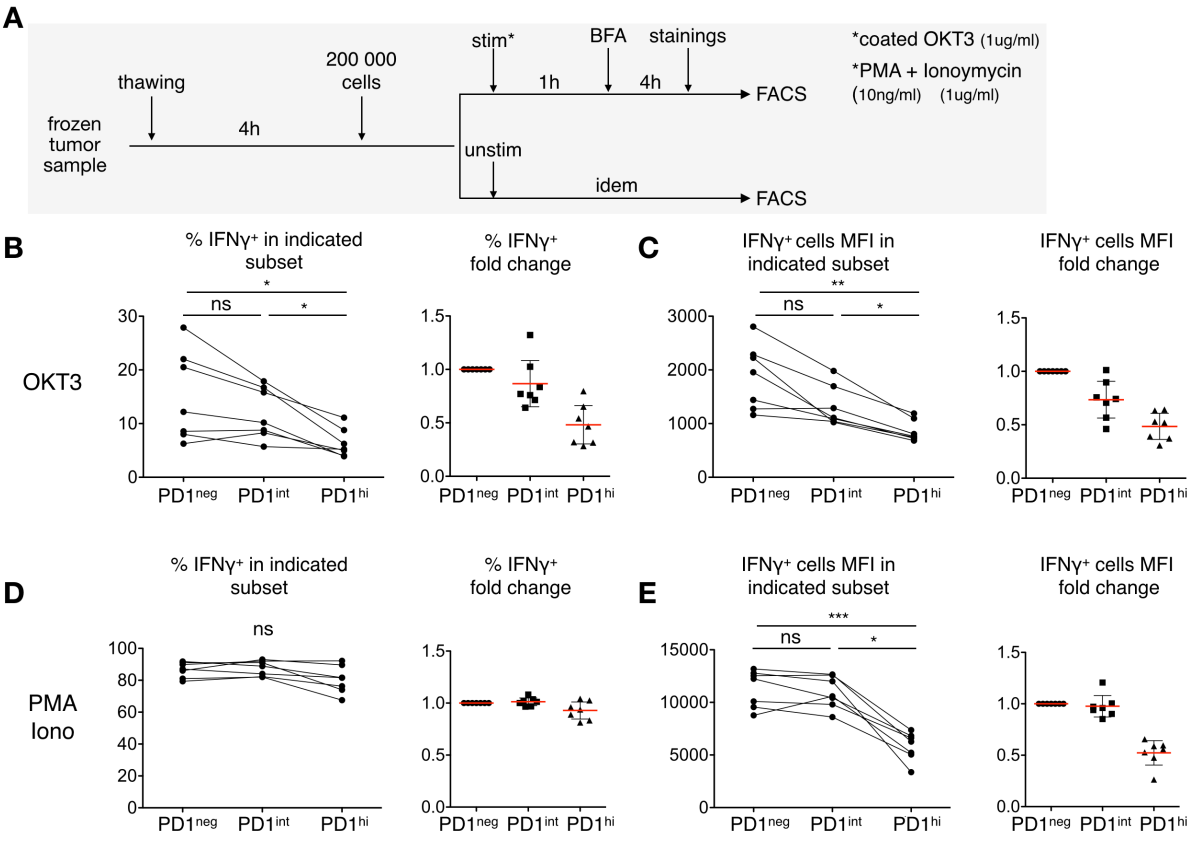


Figure 47. Les TILs PD-1^{hi} TOX^{hi} ont un défaut de production d'IFNγ.
(A) Aperçu du plan expérimental suivi.
(B et D) Pourcentage de cellules productrices d'IFNγ dans les TILs CD8 PD-1^{-}, PD-1^{+} ou PD-1^{hi}après stimulation OKT3 (B) ou avec la PMA et la ionomycine (D). Le ratio de la fréquence de cellules IFNγ^{+} par rapport aux TILs PD-1^{-} a été calculé. La moyenne (trait rouge) et l'intervalle de confiance à 95% sont représentés.
(C et E) Intensité médiane de fluorescence (MFI) des cellules productrices d'IFNγ dans les TILs CD8 PD-1^{-}, PD-1^{+} ou PD-1^{hi} après stimulation OKT3. Le ratio de la MFI de l'IFNγ dans les cellules IFNγ^{+} a été calculé par rapports aux TILs PD-1^{-} IFNγ^{+}. La moyenne (trait rouge) et l'intervalle de confiance à 95% sont représentés.
*Données issues de 7 patients (2 expériences indépendantes). Chaque point représente un patient. *=p<0,05. **=p<0,01. ***=p<0,001. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn.*

2.2.2 Les lymphocytes T CD8 réagissant au SARS-CoV-2 sont activés

Nous avons ensuite comparé le phénotype des TILs à celui de lymphocytes T CD8 répondant à une infection au SARS-CoV-2 dans le sang de patients COVID-19. Les échantillons de sang ont été collectés en moyenne 12 jours après la date de première apparition des symptômes (étendue [5-22] ; écart-type = 5). Nous avons utilisé le marqueur CD38 pour identifier les lymphocytes T CD8 répondant à l'infection par le SARS-CoV-2 (Fig 48a). Cette stratégie a préalablement été utilisée chez l'Homme pour détecter les lymphocytes T CD8 activés lors de la phase aigüe de l'infection au HIV, à Ebola, ou suite à l'administration de vaccins sous forme de virus atténué (McElroy et al., 2015; Miller et al., 2008; Ndhlovu et al., 2015).

Nous avons observé la présence de 3 populations dans le sang de patients COVID-19 sur la base de l'expression de CD38 (Fig 48b). La fréquence de cellules $CD38^{int}$ augmente dans le sang de patients infectés, tandis que la population $CD38^{hi}$ est exclusivement enrichie dans le sang de patients infectés (Fig 48c). Ces données suggèrent que CD38 est également approprié dans le cas du COVID-19 pour détecter des lymphocytes T CD8 réactifs à l'infection au SARS-CoV-2. Afin de le confirmer, nous avons aussi mesuré l'expression de marqueurs additionnels témoignant de l'activation de la population $CD38^{hi}$. À l'instar des TILs PD-1^{hi}, la population $CD38^{hi}$ dans le sang de patients COVID-19 exprime fréquemment Ki67 ainsi que IRF4, indiquant que ces cellules sont activées dans le sang des patients infectés (Fig 48 d à h). Nous avons également détecté l'expression du récepteur inhibiteur LAG-3 principalement à la surface des lymphocytes T $CD38^{hi}$, renforçant le fait que ces cellules sont activées dans le sang des patients COVID-19 (Fig 48i et j). En accord, l'expression d'IRF4 est enrichie dans les lymphocytes T $CD38^{hi}$ exprimant LAG-3 par rapport aux lymphocytes T $CD38^{hi}$ LAG-3^{-} (Fig 48k). Ce constat s'applique également aux TILs PD-1^{hi} de carcinome ovarien (Fig 48k).

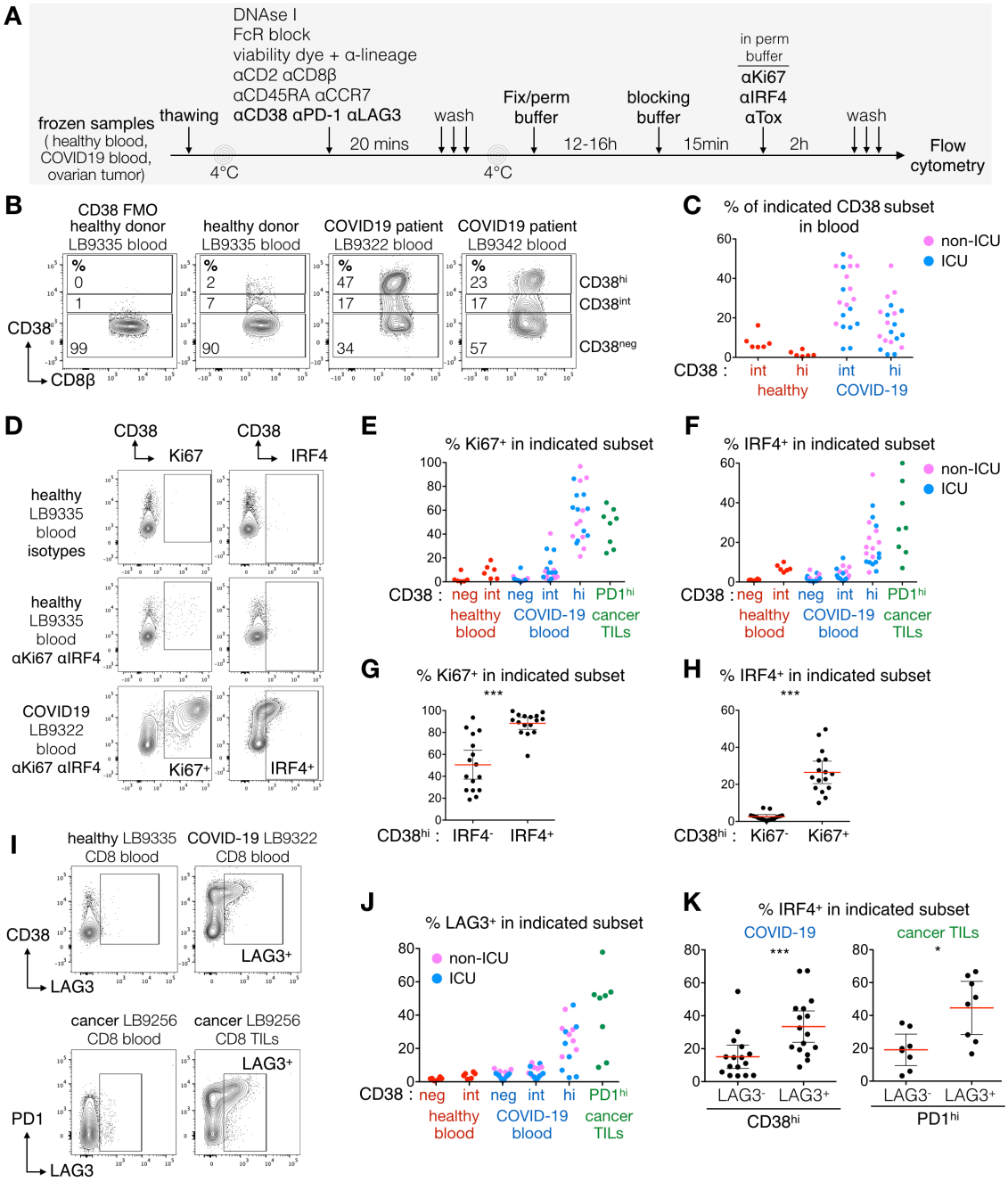


Figure 48. Le sang de patients COVID-19 contient des lymphocytes T CD8 activés.
*(A) Aperçu du plan expérimental suivi. (B) Stratification des lymphocytes T CD8 en 3 populations sur la base de l'expression de CD38. (C) Proportion de la population CD38 indiquée dans le sang de patients sains et COVID-19 en soin intensifs (ICU) ou non (non-ICU). (D) Stratégie pour identifier des lymphocytes T CD8 exprimant Ki67 ou IRF4. (E) Proportion de cellules Ki67^{+} dans les populations CD38, en comparaison avec les TILs PD-1^{hi}. (F) Proportion de cellules IRF4^{+} dans les populations CD38, en comparaison avec les TILs PD-1^{hi}. (G) Proportion de cellules Ki67^{+}dans les lymphocytes T CD38^{hi} exprimant IRF4 ou non. (H) Proportion de cellules IRF4^{+} dans les lymphocytes T CD38^{hi} exprimant Ki67 ou non. (I) Stratégie pour identifier des lymphocytes T CD8 exprimant LAG-3 dans le sang de patients COVID-19 ou dans les TILs de carcinome ovarien. (J) Proportion de cellules LAG-3^{+}dans les TILs PD-1^{hi} ou dans les populations CD38 du sang de donneurs sains ou COVID-19. (K) Proportion de cellules IRF4^{+}au sein des lymphocytes T CD38^{hi} de patients COVID-19 ou des TILs PD-1^{hi} exprimant LAG-3 ou non. *=p<0,05 ; ***=p<0,001 (Wilcoxon matched-pairs).*

Collectivement, ces données indiquent que les lymphocytes T CD38^{hi} dans le sang de patients COVID-19 expriment des marqueurs d'activation tels que IRF4, Ki67 et LAG-3, qui sont exprimés de manière analogue par les TILs PD-1^{hi} de patientes atteintes de cancer ovarien.

2.2.3 Les cellules PD-1^{hi} TOX^{hi} sont rares au sein des lymphocytes T activés par le SARS-CoV-2

Le sang de patients COVID-19 contient des lymphocytes T CD8 activés par l'infection virale en cours. Nous avons donc pu comparer l'expression de TOX et PD-1 entre ces cellules et les TILs de carcinome ovarien afin de définir si TOX et PD-1 sont exprimés de manière abondante par les TILs simplement car ils sont activés. Les cellules ont été stratifiées en 3 populations PD-1, comme préalablement présenté (Fig 49a). Conformément à nos observations précédentes, la population PD-1^{int} n'est pas spécifique d'une condition pathologique (Fig 49b). En revanche, pour plusieurs patients COVID-19, nous avons détecté 5-25% de cellules PD-1^{hi} dans la population CD38^{hi} (Fig 49c). Ces cellules PD-1^{hi} sont bien engagées dans le cycle cellulaire mais expriment moins PD-1 par rapport aux TILs PD-1^{hi} (Fig 49d et e). Ainsi, dans seulement une partie des patients infectés, une faible proportion des lymphocytes T activés par le SARS-CoV-2 est PD-1^{hi}.

Nous avons alors mesuré le niveau d'expression de TOX dans les lymphocytes T CD38^{hi} PD-1^{hi} du sang de patients COVID-19, et l'avons comparé à celui mesuré dans les TILs PD-1^{hi}. Cette comparaison n'a pu être faite que sur 8 patients COVID-19 pour lesquels la proportion de cellules CD38^{hi} PD-1^{hi} était suffisante pour calculer l'intensité médiane de fluorescence de TOX. Seuls 3 patients sur les 8 ont des lymphocytes T CD38^{hi} PD-1^{hi} exprimant TOX à un niveau similaire à celui trouvé au sein des TILs PD-1^{hi} de carcinome ovarien (Fig 49 f et g).

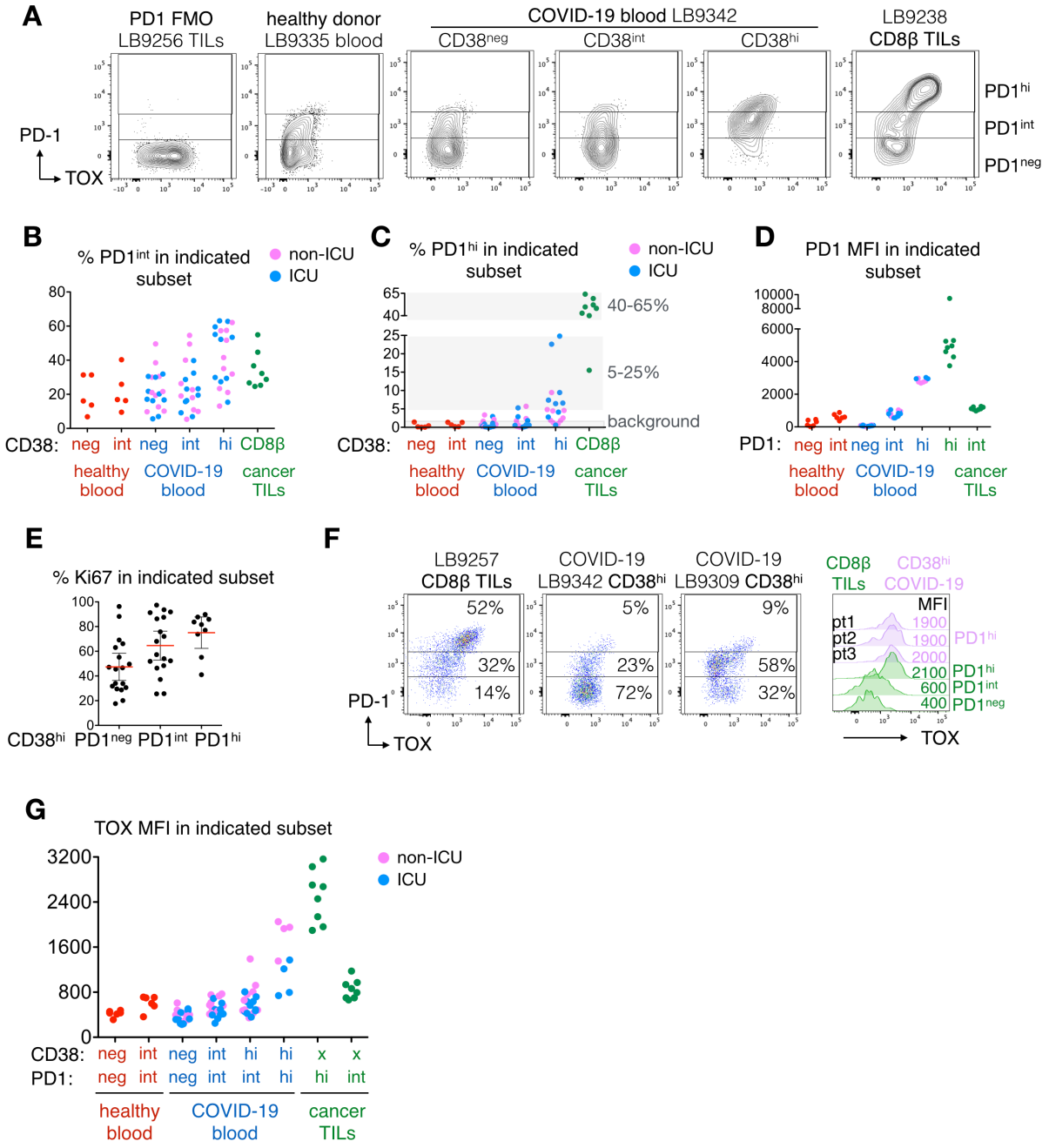


Figure 49. Le sang de patients COVID-19 contient peu de lymphocytes T CD8 PD-1^{hi} TOX^{hi}. *(A) Stratégie pour stratifier les TILs et les lymphocytes T CD8 du sang de patients COVID-19 en 3 populations sur la base de l'expression de PD-1. (B-C) Proportion de cellules PD-1^{int} (B) et PD-1^{hi} (C) dans le sang de patients sains et COVID-19 au sein des différentes populations CD38, en comparaison avec des TILs de carcinome ovarien. (D) MFI de PD-1 en fonction du niveau d'expression de PD-1 dans le sang de patients sains et COVID-19 par rapport au niveau mesuré dans les TILs. (E) Proportion de cellules Ki67^{+} dans les lymphocytes T CD38^{hi} du sang de patients COVID-19 en fonction du niveau d'expression de PD-1. (F) Comparaison de l'expression de TOX entre des TILs de carcinome ovarien et les lymphocytes T CD38^{hi} PD-1^{hi} dans le sang de patients COVID-19. (G) Intensité médiane de fluorescence de TOX (MFI) en fonction du niveau d'expression de CD38 et PD-1 dans le sang de patients sains et COVID-19 par rapport au niveau mesuré dans des TILs.*

Collectivement, l'ensemble de ces données indique que l'expression abondante et corrélée de TOX et PD-1 est un événement très peu fréquent lors de l'activation de lymphocytes T CD8 au cours de la phase aigüe d'une infection virale. Bien que plus de données soient nécessaires pour le confirmer, ceci suggère que l'expression abondante de TOX et PD-1 au sein des TILs est ici un phénomène propre au contexte tumoral et non le fruit de leur simple activation.

Conclusion :

Nous avons observé la présence dans les TILs de carcinome ovarien d'une population PD-1^{hi} TOX^{hi}, dont le phénotype évoque celui de cellules épuisées. En testant la fonctionnalité de ces cellules, nous avons observé que leur capacité à produire de l'IFNγ est amoindrie. Nous avons aussi montré que l'expression abondante de TOX et PD-1 dans les TILs avait lieu aussi bien au sein de cellules actives que quiescentes, suggérant que l'expression de TOX et PD-1 pourrait être indépendante de l'état d'activation des TILs. Nous avons confirmé cette hypothèse en observant que les lymphocytes T CD8 réagissant au SARS-CoV-2 expriment rarement PD-1 et TOX au même niveau que les TILs de carcinome ovarien. Cette succession d'observations nous a mené à conclure que les TILs PD-1^{hi} TOX^{hi} sont des cellules avec un phénotype épuisé. C'est au sein de ces mêmes cellules que IRF4 est majoritairement exprimé. L'ensemble des rôles joués par IRF4 d'après nos expériences de transduction lentivirale et KO d'IRF4, comme présentés en première partie des résultats de ce manuscrit, mène à s'interroger sur le rôle d'IRF4 dans ces TILs épuisés. C'est entre autres ce dont nous allons désormais discuter.

DISCUSSION

Préambule

Lorsqu'un lymphocyte T CD8 est activé, il prolifère, exprime des récepteurs témoignant de cette activation, et produit des cytokines lors de sa réactivation par son antigène. Nos données montrent que IRF4 exerce un rôle dans chacun de ces évènements. Dans la première partie de cette discussion, nous discuterons une par une des fonctions cellulaires régulées par IRF4. En confrontant nos données à celles de la littérature, nous verrons que l'ensemble des informations qui s'en dégagent tend à la terminologie de « rhéostat » pour qualifier le rôle global d'IRF4. En partant de ce constat, nous discuterons dans la deuxième partie de la possibilité que IRF4 puisse participer au phénomène d'épuisement. Cette partie est également motivée par l'observation selon laquelle IRF4 est exprimé dans les TILs de carcinome ovarien avec un phénotype épuisé. Enfin, nous conclurons sur l'avantage ou l'inconvénient que IRF4 pourrait représenter aux thérapies cellulaires telles que celles employant des « CAR T cells ».

1 IRF4, un rhéostat moléculaire ?

1.1 IRF4 atténue la fonction des lymphocytes T CD8

a) Avons-nous clarifié le rôle d'IRF4 dans les lymphocytes T CD8 ?

Nous avons observé que IRF4 réprime la production de cytokines effectrices et la dégranulation des lymphocytes T CD8 humains. Ce constat est en désaccord avec de nombreux travaux chez la souris rapportant un défaut de production de cytokines (p. ex IFNγ) et l'échec des lymphocytes T CD8 $Irf4^{-/-}$ à contrôler une infection aigüe. Ces travaux ont été réalisés à partir de lymphocytes T naïfs $Irf4^{-/-}$ dans lesquels IRF4 est requis pour la différenciation en cellules effectrices, d'où le dysfonctionnement des lymphocytes T CD8 $Irf4^{-/-}$ (Grusdat et al., 2014; Man et al., 2013; Raczkowski et al., 2013; Yao et al., 2013). Rien n'exclue que dans des lymphocytes T non naïfs normalement différenciés, IRF4 puisse avoir un rôle distinct. Une seule étude a analysé cette possibilité en éliminant IRF4 au stade

mémoire dans un modèle de KO inductible, mais les conclusions indiquant que IRF4 est là aussi requis à la fonction des lymphocytes T mémoires sont discutables, comme présenté en introduction (chapitre 3, partie 3.5.4) (Harberts et al., 2021).

Par ailleurs, les études évaluant le rôle d'IRF4 dans les lymphocytes T CD8 murins ont été réalisés dans un contexte d'infection aigüe, où l'élimination rapide de l'antigène ne sollicite plus l'activation du TCR, et donc l'expression d'IRF4 y est moindre. Il n'est donc pas incohérent que dans un contexte d'infection chronique où la persistance de l'antigène maintient l'expression d'IRF4, des conclusions différentes puissent être rapportées quant au rôle d'IRF4 dans les lymphocytes T CD8 murins, où IRF4 apparaît comme contributeur au dysfonctionnement des lymphocytes T CD8 épuisés (Man et al., 2017).

Enfin, lorsque des lymphocytes T CD8 épuisés de souris chroniquement infectées sont mis au repos, l'expression de récepteurs inhibiteurs diminue, et leur capacité à produire des cytokines est partiellement récupérée (Abdel-Hakeem et al., 2021). Ceci suggère que l'activation récente des lymphocytes T par leur antigène suffit à mimer certaines caractéristiques d'un lymphocyte T épuisé, telle que la perte de production de cytokines effectrices. Divers facteurs de transcription dont l'expression est liée à l'état d'activation des lymphocytes T pourraient être responsables de cet effet, et nos données montrent que IRF4 est l'un d'eux.

En forçant l'expression d'IRF4 au sein de lymphocytes T CD8 humains « au repos », nous avons montré que IRF4 pourrait être suffisant à atténuer la fonction de lymphocytes T récemment activés par leur antigène. Nous avons confirmé cette possibilité en montrant que des lymphocytes T à leur pic d'activation produisent plus de cytokines si IRF4 est absent. Ce faisant, nous avons établi un lien direct entre état d'activation, expression de IRF4, et fonctionnalité des lymphocytes T CD8. Nos données s'alignent sur le rôle joué par IRF4 lors d'infections

chroniques, où les lymphocytes T CD8 chroniquement exposés à leur antigène ont une meilleure capacité de production de cytokines lorsqu'un allèle d'IRF4 est éliminé (Man et al., 2017).

De manière importante, nos données montrent également que la simple activation aigüe d'un lymphocyte T CD8 suffit, par le biais d'IRF4, à induire un phénotype qui pourrait s'apparenter à des cellules épuisées (p. ex expression de PD-1 et production moindre d'IFNγ). Pourtant, il ne s'agit que de lymphocytes T CD8 du sang de donneurs sains quelques jours après activation. Comme nous en discuterons au chapitre 2, cette observation interroge sur la possibilité qu'une partie du dysfonctionnement attribué au phénomène « d'épuisement » ne soit que le résultat de leur activation récente ayant conduit à l'expression d'IRF4. Ce postulat est renforcé par la récupération partielle de la fonction des lymphocytes T épuisés murins après leur mise au repos (Abdel-Hakeem et al., 2021).

De plus, une étude récente a obtenu des résultats extrêmement similaires aux nôtres lors de leurs travaux sur le facteur de transcription c-Jun. Les auteurs ont isolé des lymphocytes T CD8 humains du sang et les ont transduits avec un récepteur chimérique antigénique (CAR) pour en faire des « CAR T cells » (Lynn et al., 2019). La particularité de ce CAR est qu'il induit une signalisation constante, indépendamment de la présence d'antigène, ce qui aboutit à un phénotype « épuisé ». Lorsque la fonctionnalité de ces CAR T cells est évaluée au 10ème jour de culture, leur sécrétion d'IFNγ est boostée si l'expression d'IRF4 a été invalidée 6 jours auparavant par CRISPR/Cas9 (Lynn et al., 2019).

En conclusion, IRF4 est un facteur de transcription dont le rôle premier pour la différenciation du stade naïf au stade effecteur a occulté le rôle secondaire qu'IRF4 pourrait ensuite exercer dans ces cellules une fois différenciées. En l'occurrence, IRF4 y atténue leur fonctionnalité s'il est présent au moment de leur réactivation. Cette situation implique une exposition répétée à un antigène, une condition plus encline à être trouvée lors d'une infection virale chronique que

aigüe. Ceci explique pourquoi nos données s'apparentent à ce qui a été proposé dans le modèle LCMV d'infection virale chronique où IRF4 inhibe les fonctions cellulaires, plutôt qu'au modèle d'infection aigüe où IRF4 est requis à l'acquisition de fonctions effectrices (Man et al., 2013; 2017; S.Yao et al., 2013).

b) IRF4 atténue la production de cytokines : un lien avec c-Jun ?

Dans les lymphocytes T CD8 humains transduits avec un CAR induisant une signalisation intracellulaire constante, sur-exprimer le facteur de transcription c-Jun ou invalider l'expression d'IRF4 aboutit au même effet : la sécrétion d'IFNγ et d'IL-2 est restaurée (Lynn et al., 2019). Qu'un effet similaire ait été obtenu en manipulant réciproquement ces gènes n'est pas anodin puisque c-Jun est l'un des partenaires transcriptionnels majeurs d'IRF4 et BATF dans les lymphocytes T (Glasmacher et al., 2012; Li et al., 2012). Or, c-Jun est également essentiel à la formation du complexe AP-1 activateur qui en synergie avec NFAT, induit l'expression des gènes encodant l'IFNγ et l'IL-2 (Macián et al., 2001). Par conséquent, lorsque IRF4 est en excès, un déséquilibre en faveur de la formation de complexes c-Jun-IRF4 plutôt que de complexes c-Jun-c-Fos (AP-1) est formé (Lynn et al., 2019). En accord, sur-exprimer c-Jun sans son domaine de dimérisation abolit sa capacité à restaurer la sécrétion de cytokines, et sur-exprimer c-Fos est sans effet, indiquant que c-Jun est « séquestré » par les protéines IRF4 et BATF en excès par rapport à lui. Conformément, IRF4 est co-immunoprécipité avec c-Jun dans ces CAR T cells. Les auteurs proposent aussi que la surexpression de c-Jun permettrait de déplacer les complexes IRF4-BATF-JunB répresseurs sur les motifs AICE qu'ils reconnaissent (Lynn et al., 2019).

Il est fort probable qu'un tel mécanisme soit également impliqué dans la diminution de la production d'IFNγ lorsque nous avons surexprimé IRF4, et expliquerait pourquoi empêcher par CRISPR/Cas9 le pic d'expression d'IRF4 augmente la production d'IFNγ. De manière cohérente, nous avons également

observé que IRF4 atténue la production de GM-CSF, une cytokine dont l'expression dépend aussi du complexe NFAT-AP-1 (Macián et al., 2001).

c) Et si IRF4 atténuait la voie NFκB et l'activation de c-Jun simultanément ?

Un mécanisme alternatif pouvant expliquer la diminution de la production de cytokines provient de nos analyses d'enrichissement de gènes (GSEA) sur nos données de RNA-seq. Nous avons en effet observé que les gènes régulés par la voie NFκB étaient moins exprimés en présence d'IRF4. Si ce phénomène est bien réel, il pourrait également participer à la production moindre de cytokines observée. En effet, le promoteur du gène encodant l'IFNγ ne contient pas que des sites pour NFAT-AP-1, mais également des séquences *cis* κB. Le complexe NFκB1-RelA a été montré comme capable de s'y lier et participe également à l'induction de la transcription du gène encodant l'IFNγ (Balasubramani et al., 2010; Sica et al., 1997). Dans un modèle murin de mélanome, les TILs CD8 sur-expriment la protéine A20, une protéine inhibitrice de la voie NFκB. La délétion de A20 améliore le contrôle de la tumeur, la production d'IFNγ et TNFα. Cet effet est corrélé à une translocation nucléaire supérieure de c-Rel et RelA dans le noyau des lymphocytes T CD8 $A20^{-/-}$ après activation *in vitro* (Giordano et al., 2014).

Les deux mécanismes proposés pour expliquer l'atténuation de la production de cytokines ne sont pas exclusifs, et pourraient même agir simultanément. En effet, le complexe CARMA1-Bcl10-MALT1 est central à la propagation du signal pour l'activation de NFκB. Ce même complexe participe également à l'activation de la kinase JNK, qui phosphoryle et active c-Jun (Meininger and Krappmann, 2016).

Chez la souris, l'activation de la voie NFκB par le traitement de macrophages $Irf4^{-/-}$ avec du LPS induit une translocation supérieure de NFκB dans le noyau et une phosphorylation supérieure de JNK. Il en résulte une sécrétion supérieure de TNFα par les macrophages $Irf4^{-/-}$. Sur-exprimer IRF4 atténue la phosphorylation de JNK en réponse aux LPS (Honma et al., 2005). Bien que les protéines

adaptatrices propageant la signalisation à NFκB depuis le TLR-4 soient différentes des protéines adaptatrices du TCR, ces données indiquent que IRF4 peut directement empêcher l'activation de la voie NFκB et la phosphorylation de JNK. Ce mécanisme peut-il exister dans les lymphocytes T CD8 ?

Récemment, une étude a rapporté que la protéine Trib1 inhibe la formation du complexe CARMA1-Bcl10-MALT1 essentiel à la propagation de la voie NFκB suite à l'activation du TCR. La conséquence de cet effet est la production moindre des cytokines IFNγ et TNFα par les lymphocytes T CD8 antiviraux lors d'infections chroniques (Rome et al., 2020). De manière intéressante, nos données de transcriptome ont montré que les lymphocytes T sur-exprimant IRF4 expriment plus abondamment Trib1, tandis que les cellules KO pour IRF4 expriment moins Trib1. À l'instar de son action dans les macrophages, ces données ouvrent la possibilité qu'IRF4 pourrait aussi inhiber l'activation de la voie NFκB et de JNK par le biais de Trib1 dans nos cellules (Fig 50).

L'ensemble de ces informations permet de proposer un lien entre production altérée d'IFNγ, GM-CSF, TNFα, et données de transcriptome suggérant que IRF4 module la voie NFκB. En addition de l'abondance d'IRF4 qui pourrait altérer le recrutement de complexes AP-1 activateurs sur le promoteur de gènes encodant des cytokines (Lynn et al., 2019), c-Jun pourrait être aussi impacté par un défaut d'activation de la voie NFκB (Fig 50).

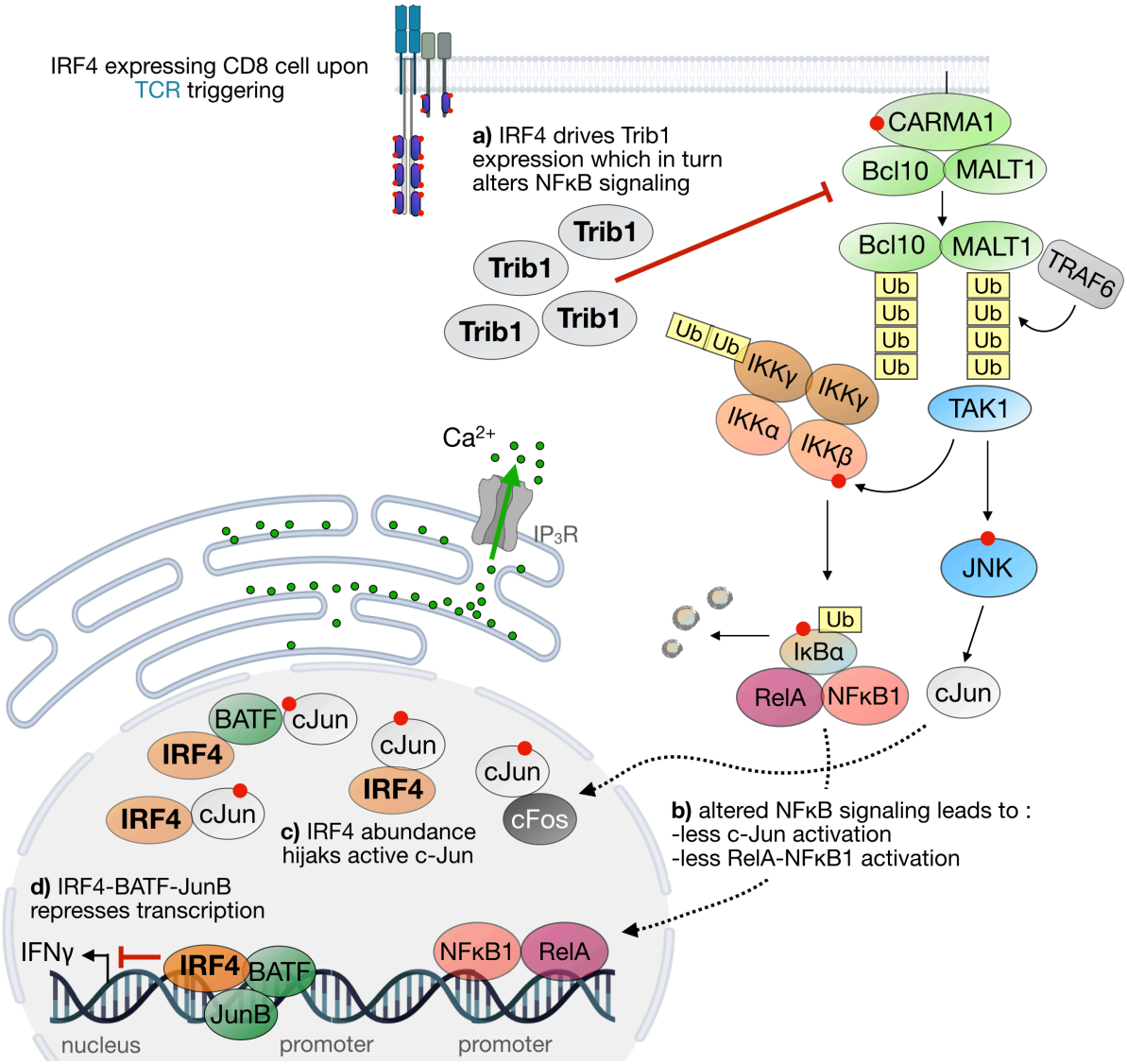


Figure 50. Mécanisme proposé d'atténuation de la production de cytokines par IRF4. *a) La présence de Trib1 au moment de l'activation des lymphocytes T CD8 exprimant IRF4 atténue l'activation de la voie NFκB. b) Parce que l'activation de la voie NFκB est inhibée par Trib1, l'activation du complexe RelA-NFκB1 est moindre, donc moins de complexes NFκB demeurent dans le noyau pour induire l'expression de leurs gènes cibles. De plus, l'inhibition de la voie NFκB altère également l'activation de JNK, la kinase activatrice de c-Jun. Par conséquent, c-Jun sous forme active est moins abondant dans le noyau. c) En addition, l'excès d'IRF4 dans le noyau monopolise c-Jun, empêchant ainsi la formation de complexes activateurs c-Jun-c-Fos (AP-1). d) Le promoteur est principalement occupé par le complexe IRF4-BATF-JunB répresseur de transcription plutôt que par le complexe c-Jun-c-Fos activateur de transcription.*

d) IRF4 inhibe la dégranulation cellulaire : quels enseignements ?

Nous avons observé que IRF4 atténue la dégranulation des lymphocytes T CD8, une mesure indirecte de leur activité lytique. Chez l'Homme, le syndrome de Chediak-Higashi est une maladie autosomale rare qui se caractérise par un défaut de relargage des lysosomes sécrétoires. Les lymphocytes T CD8 et cellules NK de ces patients sont donc incapables de dégranuler, et la lyse de leurs cellules cibles est presque inexistante lors de cocultures de 1h à 4h (Baetz et al., 1995; Targan and Oseas, 1983). En revanche, lorsque le temps de coculture est augmenté, ces cellules parviennent partiellement à lyser leur cible, indépendamment de la dégranulation (Baetz et al., 1995; Targan and Oseas, 1983). Ceci est due à la synthèse *de novo* de perforine et granzyme induite par l'activation du TCR, dont le pool néo synthétisé est majoritairement sécrété par la voie canonique de sécrétion (Isaaz et al., 1995). Ainsi, la mesure de la dégranulation et/ou de la lyse qu'elle induit sur quelques heures ne renseigne pas sur la capacité d'un lymphocyte T à éliminer plusieurs cibles sur un temps plus long (Griffiths, 1997). C'est pourquoi nous avons cocultivé pendant 5 jours des lymphocytes T sur-exprimant IRF4 ou la RFP avec des sphéroïdes tumoraux exprimant le fragment variable d'OKT3 en surface. Nous n'avons observé aucune activité cytotoxique, que ce soit avec IRF4 ou avec la RFP (données non montrées). Dès lors, que retenir de cette information selon laquelle IRF4 atténue la dégranulation?

La production de cytokines nécessite que la signalisation du TCR aboutisse à la transcription des gènes encodant ces cytokines, puis leur synthèse. À l'inverse, la sécrétion de granules lytiques est réalisée en moins de 30 minutes suivant l'activation du TCR, et ne dépend donc pas de la transcription de gènes (De La Roche et al., 2016). Autrement dit, la dégranulation mesurée n'est que le reflet de la signalisation intracellulaire dictant la sécrétion des granules vers la synapse immune. Ceci pourrait-il indiquer que IRF4 affecte la signalisation TCR ?

Comme nous venons de le voir dans le point précédent, IRF4 pourrait affecter l'activation de la voie NFκB, et cette observation est corrélée à la présence supérieure d'ARNm encodant Trib1, un déstabilisateur du complexe CARMA1-Bcl10-MALT1. Par ailleurs, des CAR T cells sur-exprimant BATF, le partenaire de transcription d'IRF4, expriment plus faiblement IRF4 suite à leur activation avec des billes anti-CD3/CD28 *in vitro* (Seo et al., 2021). Nous avons observé dans nos données de transcriptome qu'après 5h de réactivation OKT3, les lymphocytes T KO ou sur-exprimant IRF4 ont respectivement 2x plus et 2x moins d'ARNm encodant BATF (données non montrées). L'expression de BATF et IRF4 provenant de l'activation du TCR, les données dans les CAR T cells (Seo et al., 2021) ainsi que les nôtres suggèrent que IRF4 et BATF pourraient atténuer la signalisation TCR. Évidemment, nous ne pouvons pas exclure que IRF4 régule directement l'expression de BATF, indépendamment de tout impact d'IRF4 sur la signalisation cellulaire. Ce raisonnement s'applique aussi à BATF vis-à-vis d'IRF4.

En conclusion, la dégranulation moindre observée par des lymphocytes T CD8 exprimant IRF4 pourraient indiquer une capacité moindre à lyser leur cellule cible. L'origine de ce défaut pourrait provenir d'une atténuation de la signalisation cellulaire après activation du TCR par des régulateurs négatifs de cette signalisation. Alternativement, le jeu de récepteurs costimulateurs et/ou inhibiteurs exprimés à la surface cellulaire pourrait diverger entre les lymphocytes T exprimant IRF4 ou non. Dès lors, l'effet observé sur la dégranulation pourrait provenir de signaux costimulateurs différents lors de l'interaction des lymphocytes T avec les cellules tumorales utilisées pendant le test. Activer les cellules avec un anticorps anti-CD3 seul permettrait de tester cette hypothèse.

1.2 IRF4 favorise la prolifération des lymphocytes T CD8

a) Confrontation avec la littérature

Dans des modèles murins où l'expression d'IRF4 est invalidée lors de la différenciation des lymphocytes T CD8 naïfs en cellules effectrices, les lymphocytes T répondant à une infection virale aigüe ont un défaut d'expansion. Ce déficit est associé à une prolifération moindre des lymphocytes T CD8 IRF4$^{-/-}$ (Man et al., 2013; S. Yao et al., 2013). Nous avons également observé que sans IRF4, le nombre de divisions réalisées par les lymphocytes T CD8 est moindre, d'où une prolifération diminuée.

Nos expériences de manipulation de l'expression d'IRF4 ont été effectuées avec des lymphocytes T CD8 humains isolés du sang. Leur composition est hétérogène puisqu'elle consiste en un mélange de cellules naïves et non naïves (effecteurs mémoire et central mémoire). Par conséquent, il est difficile de conclure avec certitude sur la nature des cellules dans lesquelles IRF4 apparaît comme requis à leur prolifération. Toutefois, nous avons observé un défaut de prolifération des lymphocytes T IRF4 KO après une simple activation anti-CD3. Ce stimulus n'étant pas suffisant pour induire la prolifération des lymphocytes T naïfs (Chappert and Schwartz, 2010), ceci suggère que les cellules KO pour IRF4 qui prolifèrent moins sont probablement des lymphocytes T non naïfs. Ainsi, le rôle selon lequel IRF4 soutient chez la souris la prolifération des lymphocytes T effecteurs peut probablement être étendu aux lymphocytes T mémoire chez l'Homme. En accord, une étude récente a employé un modèle murin permettant d'induire le KO partiel d'IRF4 une fois que les lymphocytes T mémoire sont formés. Suite à leur réactivation *in vitro* et *in vivo*, les lymphocytes T mémoire partiellement déficients pour IRF4 prolifèrent moins (Harberts et al., 2021).

b) Mécanisme possible mis en jeu par IRF4 pour favoriser la prolifération

Nos données de GSEA suggèrent que IRF4 favorise la prolifération cellulaire en contrôlant l'expression de gènes régulant le cycle cellulaire, dont la transition de

la phase G1 à la phase S de réplication de l'ADN. Cette transition dépend de complexes CDK-cycline, dont le complexe CDK2-cycline E. Leur activité est entre autre inhibée par la protéine CDKN1a (Malumbres and Barbacid, 2001; Wade Harper et al., 1993). Ceci place CDKN1a comme un régulateur clé du cycle cellulaire et en accord, des lymphocytes T CD4 mémoire Cdkn1a$^{-/-}$ prolifèrent exagérément (Arias et al., 2007).

De manière intéressante, nos données de transcriptome montrent que IRF4 réprime l'expression de CDKN1a et favorise l'expression de CDK2 et de la cycline E (CCNE1) (Fig 51a, b et c). La prolifération cellulaire limitée des lymphocytes T KO pour IRF4 pourrait ainsi provenir d'un blocage dans le cycle cellulaire, notamment entre la phase G1 et S. Des données antérieures chez la souris suggèrent également cette possibilité, puisque les lymphocytes T CD8 Irf4$^{-/-}$ répondant au LCMV incorporent moins l'analogue de thymidine BrdU et sur-expriment CDKN1a (S. Yao et al., 2013). Ainsi, IRF4 favorise probablement la prolifération des lymphocytes T en facilitant leur progression dans le cycle cellulaire. Son action sur les gènes qu'il régule pourrait être directe, ou indirecte, comme illustré avec le facteur de transcription EZH2, également régulé par IRF4, et qui est aussi capable de réprimer CDKN1a (Fan et al., 2011) (Fig 51 d et e). De manière intéressante, la surexpression du partenaire de transcription d'IRF4, BATF, améliore l'expansion de CAR T cells, mais ce bénéfice est perdu lorsque BATF ne peut interagir avec IRF4. La surexpression de BATF est corrélée à une expression accrue de EZH2 et à la détection supérieure d'IRF4 par ChIP au locus de EZH2 (Seo et al., 2021).

Il est intéressant de noter que les lymphocytes T sur-exprimant IRF4, qui n'ont pas été réactivés et sont en culture depuis 12 jours, sur-expriment la cycline E, Cdk2, et expriment moins CDKN1a (Fig 51 a et b). Ceci suggère que dans des lymphocytes T ayant passé leur pic d'activation, la surexpression d'IRF4 pourrait retarder le retour à l'état de quiescence en prolongeant leur maintien dans le cycle

cellulaire. L'expression supérieure de Ki67 dans les lymphocytes T sur-exprimant IRF4 tend vers cette possibilité (Fig 51 f). En effet, il a récemment été montré que l'expression de Ki67 décline lorsque les cellules persistent en phase G1 puis rentrent en phase de quiescence, et augmente lorsque les cellules poursuivent en phase S, G2 et M (Miller et al., 2018). Ceci ne se retraduit pas pour autant par une prolifération homéostatique accrue des lymphocytes T sur-exprimant IRF4. En accord, des lymphocytes T mémoire dans lesquels IRF4 est partiellement éliminé plusieurs jours après leur activation ont une prolifération homéostatique identique (Harberts et al., 2021).

Collectivement, ces informations nous mènent à conclure que lors de leur activation, les lymphocytes T CD8 prolifèrent plus efficacement car IRF4 facilite leur progression dans le cycle cellulaire. Une dernière question demeure : pourquoi la surexpression d'IRF4 ne favorise-elle pas la prolifération des lymphocytes T lors de leur réactivation ?

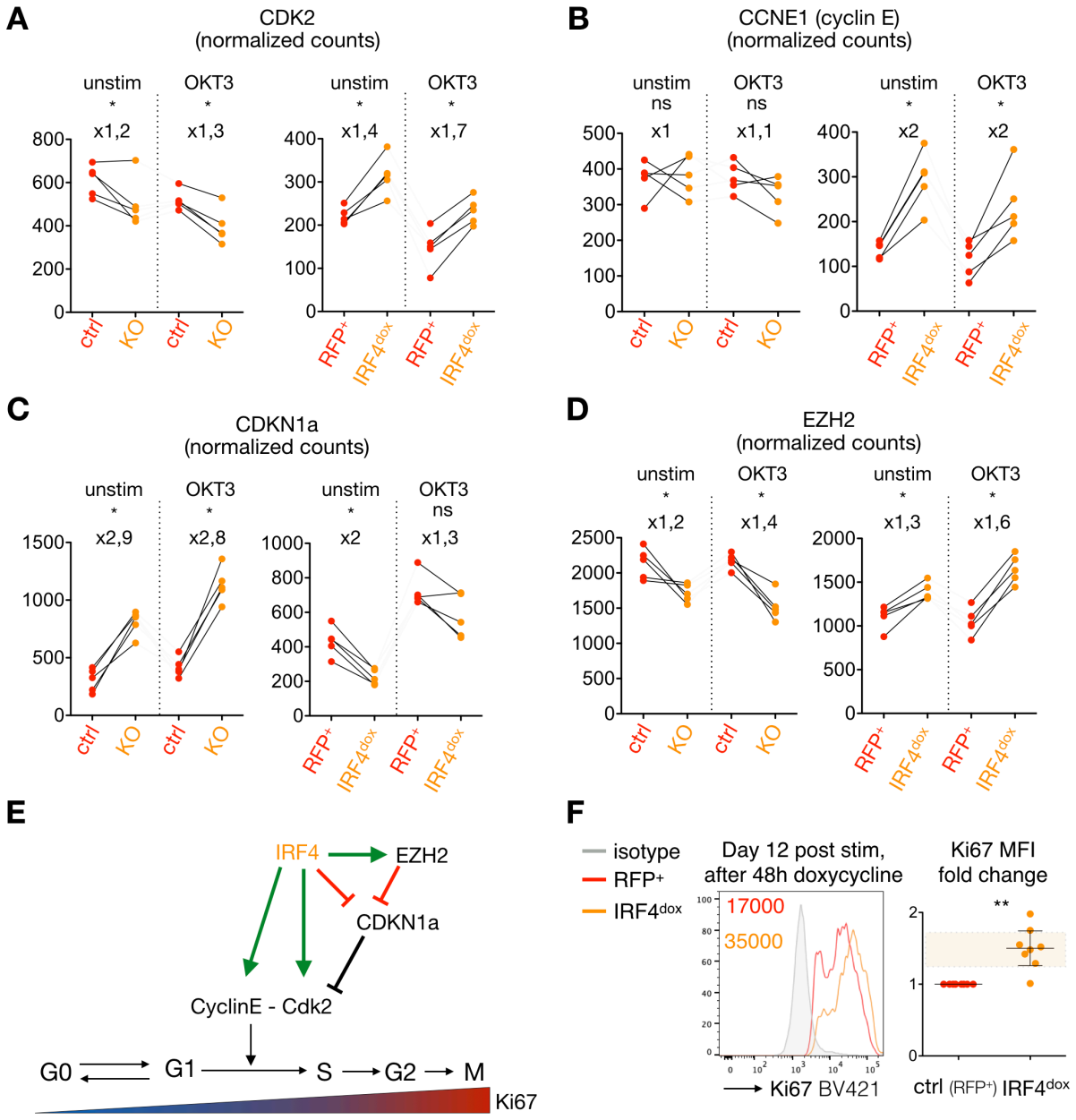


Figure 51. IRF4 régule l'expression de gènes clés à la progression dans le cycle cellulaire. *(A-D) Données d'expression normalisées obtenues par RNAseq pour CDK2 (A), CCNE1 (B), CDKN1a (C), et EZH2 (D) au sein des lymphocytes T KO ou sur-exprimant IRF4 ($IRF4^{dox}$) avant (unstim) ou après réactivation (OKT3). * = p<0,05 ; ns=p>0,05. Test pairé réalisé dans DESeq2. Ces données sont en lien avec les figures 41, 42 et 44. (E) IRF4 favorise la prolifération cellulaire en facilitant la progression de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Cet effet pourrait provenir de la capacité d'IRF4 à favoriser l'expression de Cdk2 et de son partenaire, la cycline E. Ce complexe joue un rôle critique pour la transition G1/S. De plus, IRF4 réprime directement, ou par l'intermédiaire de EZH2 dont il favorise l'expression, l'inhibiteur CDKN1a. (F) Niveau d'expression de Ki67 mesuré par cytométrie en flux au sein de lymphocytes T CD8 sur-exprimant IRF4 ou son gène contrôle (RFP) depuis 2 jours. Les lymphocytes T sont au jour 12 post activation. Données provenant de la figure 35.*

c) La surexpression d'IRF4 est-elle sans effet sur la prolifération cellulaire ?

Nos données montrent que la réactivation de lymphocytes T sur-exprimant IRF4 ne leur confère pas d'avantage prolifératif. Pourtant, chez la souris, la magnitude d'expansion des lymphocytes T CD8 est proportionnelle à la force d'activation de leur TCR et de l'abondance d'IRF4 qui en résulte (Harberts et al., 2021; Man et al., 2013; Nayar et al., 2014; Yao et al., 2013). Des lymphocytes T dont l'activation provoque une faible expression d'IRF4 bénéficient d'un apport exogène d'IRF4 par transduction rétrovirale pour leur prolifération. Mais à partir d'un certain seuil d'expression d'IRF4, son apport supplémentaire par transduction rétrovirale n'apporte qu'un bénéfice modeste pour la prolifération cellulaire (S. Yao et al., 2013).

Dès lors, il est possible que nous n'ayons pas observé d'effet sur la prolifération cellulaire en sur-exprimant IRF4 car son expression endogène provoquée par la réactivation du TCR est suffisante pour une prolifération cellulaire efficace. Il aurait été intéressant de mesurer la prolifération de nos lymphocytes T sur-exprimant IRF4 avec des quantités décroissantes d'anti-CD3 pour le confirmer. Alternativement, attendre que les lymphocytes T soient complètement sortis du cycle cellulaire avant réactivation pourrait être intéressant suivant la logique selon laquelle IRF4 accélèrera la reprise du cycle cellulaire et donc la prolifération au moment de leur réactivation.

En conclusion, nous ne pouvons pas exclure que sur-exprimer IRF4 pourrait conférer un avantage prolifératif chez l'Homme lorsque IRF4 est limitant. Dans nos données, le fait que la première division cellulaire des lymphocytes T n'est effectuée qu'à partir du moment où une quantité déterminée d'IRF4 est atteinte penche aussi en faveur de cette possibilité.

1.3 De la prolifération cellulaire à la régulation de PD-1 par IRF4

a) Confrontation avec la littérature

En examinant conjointement prolifération cellulaire, expression de marqueurs d'activation, et expression de PD-1, nous avons constaté que les lymphocytes T CD8 KO pour IRF4 sont activés avant même qu'ils ne se soient divisés. En dépit de l'absence d'IRF4, certains de ces lymphocytes parviennent à proliférer, mais n'expriment que très faiblement PD-1 alors qu'ils maintiennent l'expression d'autres marqueurs d'activation. Ainsi, IRF4 est requis à l'expression de PD-1 par les lymphocytes T CD8, et ce défaut d'expression n'est pas relié à un défaut d'activation. En accord, d'autres ont aussi montré que IRF4 n'est pas requis pour les premières étapes d'activation (Man et al., 2013; S.Yao et al., 2013).

Nos données montrent également que le niveau d'expression de PD-1 est corrélé au niveau d'expression d'IRF4, un constat partagé chez la souris (Man et al., 2013). Sans IRF4, la magnitude d'activation du TCR n'a pas d'incidence sur le niveau de PD-1, suggérant que le niveau endogène d'IRF4 est déterminant à l'expression efficace de PD-1. Nous avons renforcé cette observation en montrant que l'expression de PD-1 après activation d'un lymphocyte T est exacerbée lorsqu'il sur-exprime IRF4. Ces données s'alignent sur une étude antérieure montrant que IRF4 induit l'expression de PD-1 par les lymphocytes T CD8 anti-LCMV d'infection chronique, et sont en désaccord avec le fait que IRF4 réprime l'expression de PD-1 par les lymphocytes T CD4 dans un modèle de greffe (Man et al., 2017; Wu et al., 2017).

b) Régulation découplée de l'expression de PD-1 et de la prolifération cellulaire par IRF4

L'observation dans nos données que des lymphocytes T parviennent à proliférer en l'absence d'IRF4, sans exprimer PD-1, suggère que la régulation de la prolifération et de l'expression de PD-1 par IRF4 sont découplées. Autrement dit, l'expression de PD-1 par IRF4 pourrait impliquer des mécanismes de régulation

différents de ceux favorisant la prolifération cellulaire. De plus, en comparant prolifération cellulaire et expression de PD-1 lorsque IRF4 est surexprimé, nous avons montré que la quantité endogène d'IRF4 induite par l'activation du TCR est suffisante pour une prolifération cellulaire efficace, mais limitante pour l'expression efficace de PD-1. Ceci illustre à nouveau le découplage entre régulation de la prolifération cellulaire et expression de PD-1 par IRF4. Mais surtout, ces données posent la question suivante : comment dans un cas, la quantité d'IRF4 peut-elle être suffisante pour favoriser la prolifération cellulaire, et comment dans l'autre cas, la quantité d'IRF4 peut-elle ne pas être suffisante pour une expression élevée de PD-1 ?

c) Pourquoi l'abondance d'IRF4 impacterait différemment prolifération cellulaire et expression de PD-1 ?

Le partenaire principal avec lequel IRF4 interagit pour réguler l'expression de gènes dans les lymphocytes T est BATF. Ensemble, BATF et IRF4 se lient à des éléments *cis* composites AP1-IRF (AICE) au niveau des gènes qu'ils régulent (Glasmacher et al., 2012; Li et al., 2012). Dans les lymphocytes T CD4, selon le contexte nucléotidique, l'affinité des motifs AICE reconnus par IRF4-BATF change. Les motifs AICE de haute affinité sont associés à des gènes dont l'expression est induite par IRF4 et BATF même lorsque l'abondance d'IRF4 est faible. Les motifs AICE de faible affinité sont associés à des gènes dont l'expression est induite seulement lorsque IRF4 est présent en abondance suffisamment élevée (Iwata et al., 2017).

Le fait que IRF4 soit saturant pour réguler la prolifération cellulaire, et limitant pour induire l'expression de PD-1, peut indiquer une sensibilité différente des éléments *cis* reconnus par IRF4 et BATF au niveau des gènes régulant ces processus. Il est probable que les gènes régulés par IRF4 pour la prolifération cellulaire soit des gènes avec des motifs AICE de haute affinité. L'expression de ces gènes change de manière proportionnelle à la quantité d'IRF4 présente dans

les cellules due à la haute sensibilité de ce type de motif AICE. Ceci expliquerait la relation étroite entre quantité d'IRF4 synthétisée, et niveau de prolifération qui en résulte, et pourquoi à partir d'un niveau endogène d'IRF4 donné, sur-exprimer IRF4 n'affecte pas la prolifération, comme nos données et d'autres l'ont montré (Grusdat et al., 2014; Yao et al., 2013).

À l'inverse, le gène encodant PD-1 pourrait contenir un motif AICE de faible affinité. Seule une quantité suffisamment élevée de IRF4 permettrait le recrutement efficace de IRF4 sur cet élément AICE, d'où le fait que la transduction lentivirale d'IRF4 amplifie l'expression de PD-1. Ce mécanisme est intéressant pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la charge antigénique est un élément clé à l'expression élevée de PD-1, IRF4 et BATF, et des lymphocytes T CD8 $Irf4^{+/-}$ ou $Batf^{-/-}$ répondant à une infection chronique expriment plus faiblement PD-1 (Man et al., 2017; Utzschneider et al., 2020). De plus, certaines données dans les lymphocytes T CD4 suggèrent que IRF4 et BATF sont des facteurs de transcription pionniers, c'est à dire que leur recrutement sur leurs séquences permettrait de remodeler localement la chromatine pour permettre l'accès à d'autres facteurs de transcription clés à la régulation de la transcription (Ciofani et al., 2012; Kwon et al., 2009). Or, l'expression de PD-1 dans les lymphocytes T épuisés est associé à des remaniements de chromatine qui sont nécessaires pour son expression abondante (Sen et al., 2016). Se pourrait-il qu'IRF4 et BATF en soient responsables ? De manière intéressante, la force d'activation du TCR est positivement corrélée à une augmentation de marques épigénétiques activatrices (H3K27ac) aux locis où BATF (et donc potentiellement IRF4) est lié dans les lymphocytes T CD4 (Allison et al., 2016).

Collectivement, ces informations couplées à nos données, proposent un schéma selon lequel l'expression élevée de PD-1 dépend de l'abondance de IRF4. Dans une telle situation, IRF4 et BATF seraient recrutés aux AICE de faible

affinité où ils ouvriraient localement la chromatine, permettant alors le recrutement de facteurs supplémentaires pour amplifier l'expression de PD-1.

d) IRF4, le maillon d'une chaîne de régulation de l'expression de PD-1 ?

En analysant attentivement la cinétique d'expression de PD-1 en fonction de l'état de division des lymphocytes T proliférant, nous avons observé que PD-1 est exprimé avant la première division cellulaire (cellules G_0) (Fig 52 a, b, c). Ceci est également observé lors d'une infection aigüe (Ahn et al., 2018). Une première vague de régulation de l'expression de PD-1 a donc lieu avant la première division cellulaire. Elle est notamment attribuable à l'activité de NFAT, qui est le premier relai entre l'activation du TCR et la régulation de l'expression de gènes, dont PD-1 dont il induit l'expression (Ahn et al., 2018, Martinez et al., 2015, Oestreich et al., 2008) (Fig 52e).

Il est intéressant de noter que déjà avant leur première division, les cellules IRF4 KO ne parviennent que partiellement à exprimer PD-1 (Fig 52 a à d). Ceci suggère que dès cette première vague de régulation de l'expression de PD-1, NFAT dépend déjà partiellement de IRF4 pour initier l'expression de PD-1 (Fig 52e). Ce constat est supporté par le fait que IRF4, BATF et NFAT ont été détectés au locus de PD-1, et que IRF4 peut interagir avec NFAT-1 (Man et al., 2017; Rengarajan et al., 2002).

Alors que la première division cellulaire (cellules G_1) s'accompagne d'une hausse de l'expression de PD-1 et d'IRF4, les lymphocytes T IRF4 KO ne parviennent pas à hausser l'expression de PD-1, laquelle décline lors des divisions cellulaires subséquentes (cellules G_2, G_3..) (Fig 52 a à d). Ceci indique deux possibilités. La première est que l'activité de NFAT requiert sa collaboration continue avec IRF4 pour exacerber l'expression de PD-1. Par exemple, IRF4 ouvre une région de chromatine supplémentaire où NFAT est recruté et renforce la transcription. La seconde est que l'activité de NFAT s'est estompée en raison des mécanismes de déphosphorylation de NFAT après activation du TCR, et que

IRF4 agit en tant que deuxième facteur de transcription qui prend le relais pour soutenir l'expression de PD-1, directement ou indirectement. Dans les deux cas, IRF4 apparaît essentiel à l'expression de PD-1 (Fig 52e).

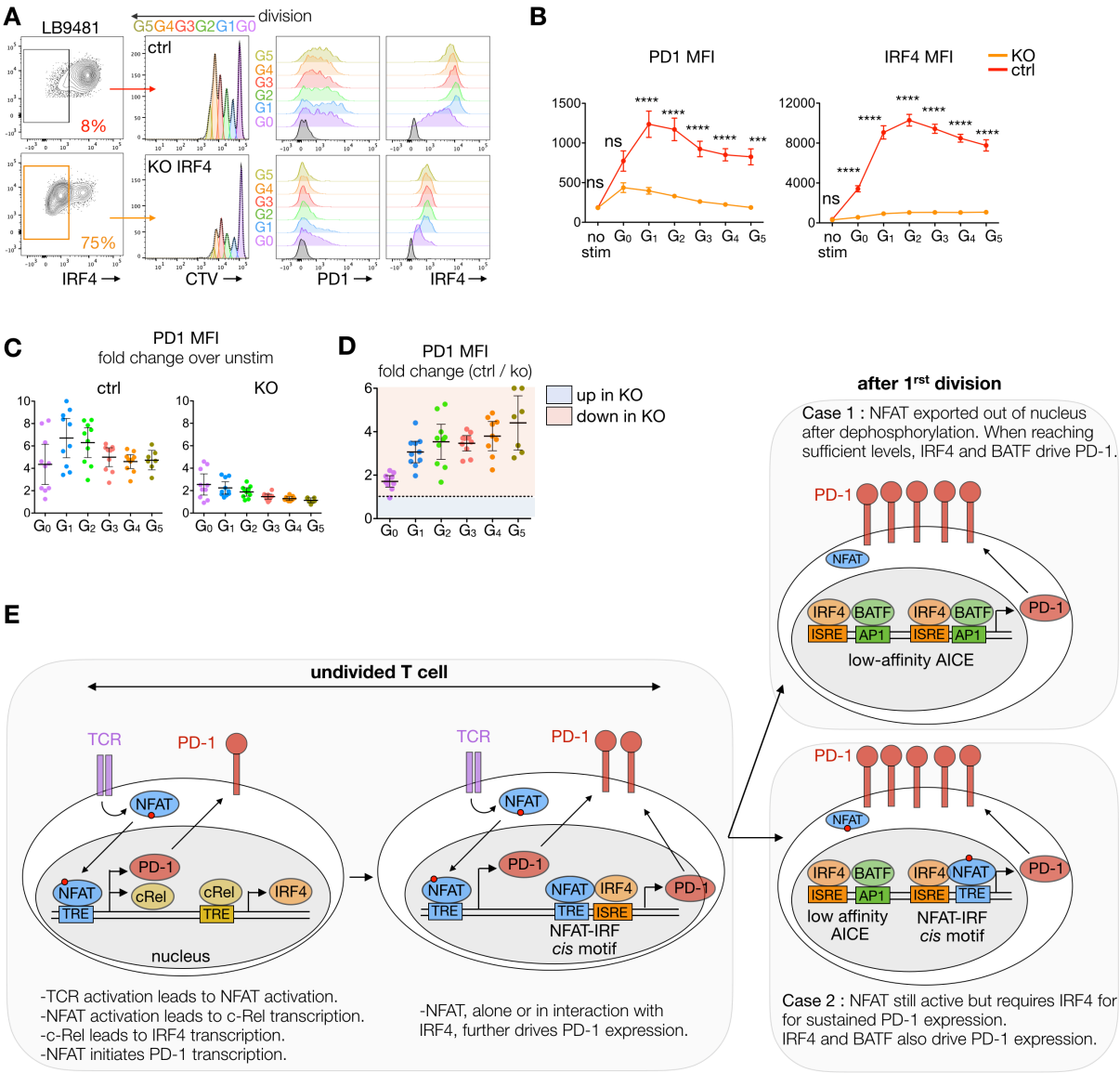


Figure 52. Dynamique de la régulation de l'expression de PD-1 par IRF4.
(A-C) Données provenant la figure 37. (A) Analyse par cytométrie en flux de l'expression de PD-1 et IRF4 en fonction du nombre de divisions cellulaires effectuées. (B) Moyenne de l'expression de IRF4 et PD-1 au cours de la prolifération des lymphocytes T KO ou non pour IRF4. (C) Ratio de l'expression de PD-1 rapport aux lymphocytes T non stimulés. Le ratio a été calculé pour chaque patient au sein des lymphocytes T KO ou non pour IRF4. (D) Pour chaque génération de cellule de chaque patient, le ratio de l'expression du marqueur indiqué entre la condition contrôle et la condition KO est représenté. La ligne en pointillés représente un ratio de 1 (pas de changement). (E) Mécanisme de régulation de l'expression de PD-1 proposé sur la base de nos données et des éléments abordés dans la discussion concernant le lien entre IRF4, prolifération cellulaire et expression de PD-1. Le rond rouge sur NFAT représente sa phosphorylation. TRE = Transcriptional Response Element. ISRE = Interferon Stimulatory Response Element. AICE = AP1-IRF Composite Element.

Si de nombreux rapports indiquent que NFAT est nécessaire à l'expression de PD-1, NFAT est également nécessaire à l'expression de IRF4 (Man et al., 2017; Matsuyama et al., 1995). Dans les lymphocytes T, NFAT induit l'expression de c-Rel qui induit à son tour l'expression de IRF4 (Grumont and Gerondakis, 2000; Grumont et al., 2004; Venkataraman et al., 1995). Ainsi, IRF4 représente un facteur de transcription agissant en aval de NFAT pour maintenir et hausser l'expression de PD-1 (Fig 52e).

1.4 IRF4 agit comme un rhéostat moléculaire

Une réponse immunitaire exacerbée est délétère pour l'organisme. De nombreux mécanismes existent pour permettre de contrôler la magnitude d'une réponse immunitaire. L'axe PD-1 - PD-L1 en est un exemple. Des souris PD-$1^{-/-}$ ou PD-$L1^{-/-}$ infectées avec une charge virale élevée de LCMV succombent en une semaine de l'infection, ce qui n'est pas observé suite à une infection avec une charge virale faible, ni observé dans des souris normales (Barber et al., 2006; Frebel et al., 2012). La mortalité résultant de l'infection est corrélée à une quantité anormalement élevée d'IFNγ et TNFa dans le sérum des souris PD-$1^{-/-}$ et à la présence exagérée de lésions dans les tissus infectés (Frebel et al., 2012; Mueller et al., 2010). Lorsque les lymphocytes T CD8 sont déplétés, les souris survivent (Frebel et al., 2012). Si des lymphocytes T CD8 antiviraux PD-$1^{-/-}$ sont transférés dans des souris WT et exposés à une charge virale élevée, ils prolifèrent plus, produisent plus d'IFNγ, et la virémie est plus faible. Mais ceci est au détriment de dégâts tissulaires sévères mettant en péril l'organisme infecté (Frebel et al., 2012). Ces études illustrent l'importance d'une réponse immunitaire contrôlée et calibrée face à un antigène qu'un lymphocyte T CD8 rencontre. L'axe PD-1/PD-L1 joue un rôle critique, et à cet effet, PD-1 a été qualifié de « rhéostat » lors de réponses immunes (Okazaki et al., 2013).

Dans les lymphocytes T CD8, IRF4 pourrait aussi endosser un tel rôle. En favorisant l'expression de PD-1 et en atténuant la fonction des lymphocytes T

CD8 dont il favorise la prolifération, IRF4 adapte le comportement d'un lymphocyte T CD8 en fonction de la force et/ou de la répétitivité du signal activateur qu'il reçoit. Ce faisant, IRF4 permet de calmer une réponse immunitaire qui pourrait autrement être délétère suite à l'expansion clonale massive qui résulte de la prolifération des lymphocytes T activés. Ceci est entre autre rendu possible par la corrélation directe qu'il y a entre force d'activation du TCR et abondance d'IRF4 qui en résulte, et par le fait que les éléments *cis* reconnus par IRF4 existent dans des versions différentes qui répondent à des doses différentes d'IRF4 (Iwata et al., 2017). En accord, 95% des gènes qui sont différentiellement exprimés entre un lymphocyte T activé avec un peptide de faible affinité et de haute affinité dépendent de la présence d'IRF4 (Man et al., 2013). Ceci place IRF4 au centre d'un circuit dans lequel le signal à son entrée est retraduit par IRF4 de sorte à ce que la puissance à la sortie du circuit soit correctement ajustée. Comme une résistance électrique réglable qui, intercalée dans un circuit électrique, permet d'y modifier l'intensité du courant qui y circule : un rhéostat.

Le fait que IRF4 régule la différenciation des cellules naïves en cellules effectrices en permettant l'expression de T-bet et Blimp-1 (S. Yao et al., 2013; Man et al., 2013), puis qu'il exerce par après un rôle antagoniste en inhibant leur fonction, peut sembler contre-intuitif. Ces informations suggèrent que IRF4 participe à un circuit transcriptionnel qui dans un premier temps, favorise l'acquisition de fonctions effectrices en induisant l'expression de T-bet et Blimp-1, et qui dans un second temps, en calibre l'utilisation appropriée. Ce mécanisme de recyclage des fonctions d'un facteur de transcription à différents stades de la vie d'un lymphocyte T semble pertinent : plutôt qu'avoir plusieurs gènes encodant différents facteurs de transcription pour chacune de ces fonctions, moduler simplement la concentration de ce facteur de transcription, son partenaire protéique, où l'environnement épigénétique dans lequel il agit, permet à une seule et même molécule d'avoir divers rôles.

De manière intéressante, le partenaire majeur d'IRF4, BATF, est essentiel à la différenciation des lymphocytes T CD8 naïfs en cellules effectrices en favorisant l'expression de T-bet et Blimp-1. Des lymphocytes T CD8 Batf$^{-/-}$ ont au 8ème jour un défaut de production d'IFNγ et TNFa (Kurachi et al., 2014), Paradoxalement, lors des premiers jours de différenciation cellulaire, ces mêmes lymphocytes T Batf$^{-/-}$ ont une meilleure production d'IFNγ et expression de granzyme B (Kurachi et al., 2014).

Le fait que BATF réprime l'expression des fonctions effectrices dont il promeut ensuite l'utilisation via T-bet et Blimp-1 a été perçu comme un mécanisme de checkpoint : BATF agirait comme un senseur qui réprime l'initiation de la réponse immune tant qu'aucun signal activateur suffisant pour contrer sa répression n'est fourni. Ceci permet d'éviter d'initier une réponse à des stimuli transitoires ou suboptimaux ne reflétant pas un danger (Kurachi et al., 2014). Ici, nous proposons qu'IRF4 agit à l'autre extrême : il permet d'éviter une réponse exagérée à des signaux activateurs soutenus. Ceci expliquerait pourquoi des CAR T cells sur-exprimant BATF contrôlent plus efficacement une tumeur que leurs homologues normaux, et pourquoi sur-exprimer IRF4 avec BATF diminue l'effet bénéfique produit par BATF (Seo et al., 2021). Ceci expliquerait également pourquoi dans les lymphocytes T exprimant un CAR constitutivement activé, le KO d'IRF4 est plus efficace que le KO de BATF pour restaurer la sécrétion d'IFNγ (Lynn et al., 2019).

2 IRF4 : du rhéostat à l'épuisement ?

Un lymphocyte T CD8 exposé à un antigène abondant ou persistant se différencie en lymphocyte T épuisé dont le transcriptome et le paysage épigénétique empêche la mobilisation efficace de ses fonctions (Pauken et al., 2016; Sen et al., 2016). Cette situation est perçue comme un mécanisme d'adaptation permettant de limiter des dégâts immunopathologiques (Blank et al., 2019). Comme nous venons de le voir dans le paragraphe précédent, IRF4 pourrait endosser un rôle de rhéostat permettant d'atténuer la réponse immune de manière proportionnée à l'abondance antigénique ou sa persistance. Dès lors, IRF4 peut-il exercer son rôle de rhéostat jusqu'à pousser les lymphocytes T CD8 vers la voie de l'épuisement ? Cette question est d'autant plus légitime que PD-1, dont IRF4 induit l'expression, serait impliqué dans le développement des lymphocytes T épuisés. De plus, nos données ont montré qu'IRF4 était exprimé au sein des TILs de carcinome ovarien PD-1^{hi} TOX^{hi}, dont la capacité à produire de l'IFNγ est atténuée.

2.1 IRF4 peut-il initier la différenciation en lymphocytes T épuisés ?

a) Via PD-1

Dans les modèles de tumeurs ou d'infection virale chronique, les lymphocytes T CD8 épuisés proviennent des cellules épuisées précurseurs Tcf-1^{+} (Im et al., 2016; Miller et al., 2019; Siddiqui et al., 2019; Utzschneider et al., 2016). De manière intéressante, il a été montré en contexte d'infection chronique que plus la charge virale administrée aux souris est élevée, plus les lymphocytes T P14 se différencient en précurseurs épuisés plutôt qu'en lymphocytes T effecteurs (Utzschneider et al., 2020). Par ailleurs, il a été montré que PD-1 est requis à la stabilisation de la population précurseur Tcf-1^{+} lors d'une infection chronique. En effet, sans PD-1, les lymphocytes T P14 répondant à une infection chronique ne forment pas de réservoir de cellules Tcf-1^{+} et se différencient principalement en cellules effectrices terminales KLRG1^{hi} (Chen et al., 2019). Nos données

montrent que lorsqu'il est abondant, IRF4 exacerbe l'expression de PD-1. Ainsi, lorsque la charge antigénique est élevée et que le virus persiste, il est possible que la différenciation en cellules effectrices soit compromise au profit de cellules avec des fonctions atténuées, et IRF4 pourrait contribuer à l'emprunt de cette voie. Des données scRNA-seq de lymphocytes T CD8 répondant à une infection chronique vont également dans ce sens (Chen et al., 2019).

b) Via TOX

Les précurseurs épuisés sont des cellules analogues aux lymphocytes T mémoire précurseurs (MPEC) pour leurs propriétés d'autorenouvèlement et différenciation. En effet, au jour 4.5 d'une infection aigüe ou chronique, MPEC et précurseurs épuisés partagent un transcriptome similaire. Mais au jour 7, bien que des similitudes subsistent, le transcriptome et épigénome des précurseurs épuisés diverge de celui des MPEC (Yao et al., 2019). Ceci provient de l'expression soutenue du facteur de transcription TOX, sans lequel le développement des lymphocytes T épuisés est entravé. Le facteur de transcription NFAT est quant à lui nécessaire à l'induction de TOX (Alfei et al., 2019; Khan et al., 2019; Scott et al., 2019; Utzschneider et al., 2020; Yao et al., 2019).

Le fait que NFAT soit à la fois nécessaire au fonctionnement des lymphocytes T CD8 mais aussi nécessaire au développement de cellules épuisées, interroge sur le mécanisme permettant cette ambivalence. Des études suggèrent que la différenciation en cellules épuisées résulte de l'absence d'interaction de NFAT avec AP-1 (Box 4) (Martinez et al., 2015). Auquel cas, ceci implique que des lymphocytes T CD8 chroniquement activés ne parviennent plus à utiliser AP-1 pour réguler l'expression de gènes clés au maintien des fonctions effectrices.

Comme discuté dans le chapitre précédent, nos données ainsi que celles de la littérature suggèrent que IRF4 pourrait inhiber l'activation de c-Jun (Lynn et al., 2019). Suivant la logique selon laquelle NFAT induit l'expression de TOX lorsqu'il agit indépendamment d'AP-1, ceci suggère que l'activation de

lymphocytes T exprimant suffisamment IRF4 pourrait mener à l'expression de TOX. Alternativement, il est possible qu'en induisant l'expression d'IRF4, NFAT collabore avec lui pour induire l'expression de TOX. Cette alternative est supportée par des données de ChIP-seq de lymphocytes T épuisés montrant que le locus de TOX est conjointement lié par plusieurs facteurs de transcription dont NFAT-1 et IRF4 (Yao et al., 2019).

Box 4 Développement en cellules épuisées : NFAT, AP-1 et TOX

Preuve de concept que NFAT seul cause un phénotype « épuisé » :
Martinez et al., 2015: Proposent que NFAT-1 pourrait jouer un rôle clé dans l'épuisement lorsqu'il n'interagit pas avec son partenaire AP-1 (Fos-Jun).
Approche : Utilisation d'une forme constitutivement active de NFAT-1, dans laquelle 3 acides aminés responsables de l'interaction de NFAT-1 avec AP-1 ont été mutés (Martinez et al., 2015). La forme constitutivement active de NFAT-1 incapable d'interagir avec AP-1 (CA-RIT NFAT) a été transduite dans des lymphocytes T P14 et son effet sur le transcriptome a été comparé à des lymphocytes T P14 normaux transduits avec un vecteur vide. L'analyse RNA-seq a été réalisée au jour 6 après activation.
Résultats: Les cellules exprimant la forme mutée de NFAT-1 sur-expriment TOX, ainsi que d'autres facteurs de transcription soupçonnés de participer au phénomène d'épuisement tels que Helios, Nr4a2, ou IRF4, ainsi que les récepteurs inhibiteurs PD-1 et LAG-3.
Remarque: Ces résultats sont peu surprenants eu égard au biais de l'approche utilisée : les cellules transduites ont une forme constitutivement active de NFAT-1, tandis que les cellules de la condition contrôle sont au repos au moment du RNA-seq. Il aurait été intéressant de restimuler les cellules de la condition contrôle afin d'activer NFAT et AP-1 et ainsi comparer l'effet induit par NFAT seul ou avec AP-1.
Conclusion à en dégager: l'activation constitutive de NFAT-1, mimant partiellement une activation répétée du TCR, peut induire l'expression de gènes liés à l'épuisement indépendamment de AP-1. Des lymphocytes T CD8 sur-exprimant un vecteur contrôle ou la forme mutée constitutivement active de NFAT-1 perdent la capacité à contrôler une infection à *L.Monocytogenes* ou la croissance de la tumeur CT26.

Et *in vivo*? Il n'existe pas de preuve qu'en situation physiologique, les lymphocytes T épuisés utilisent NFAT-1 ou NFAT-2 sans AP-1. Toutefois, quelques études mises bout à bout peuvent suggérer que cette situation pourrait exister physiologiquement.

Données suggérant que NFAT n'interagit pas avec AP-1 et que cela conduit à l'épuisement:

1) Dans les lymphocytes T épuisés, l'expression de c-Fos est diminuée tandis que NFAT-2 est sur-exprimé (Khan et al., 2019; Wherry et al., 2007). L'excès de NFAT-2 par rapport à la quantité d'AP-1 disponible pourrait faire pencher la balance en faveur d'une régulation transcriptionnelle dictée par NFAT-2 plutôt que par des dimères NFAT-2-AP1. De manière intéressante, NFAT sans AP-1 induit le phénomène d'anergie dans les lymphocytes T CD8 naïfs activés sans costimulation (Macián et al., 2002). Les mêmes régulations transcriptionnelles sont-elles mises en jeu pour atténuer la fonction des lymphocytes T épuisés?

2) Si la voie NFAT est sélectivement activée par l'utilisation du ionophore calcique qui déclenche le flux Ca^{2+} nécessaire à l'activation de la calcineurine, l'expression de TOX est induite en 24h. Lorsqu'est ajouté un analogue de diacylglycérol, la PMA, l'expression de TOX n'a pas lieu (Khan et al., 2019). Or, la PMA active la voie Ras-MAPK dont la signalisation mène à l'activation de c-Fos et c-Jun (Foletta et al., 1998). Ceci suggère que l'ajout de PMA à la ionomycine restaure la formation du complexe NFAT-AP1, ce qui inhibe l'expression de TOX autrement induite par NFAT sans AP-1.

3) La PMA active également la PKC, dont la signalisation en aval mène à l'activation du complexe MALT1-CARMA1-Bcl10, lequel mène à l'activation de c-Jun (Meininger & Krappmann, 2016). Lors d'une infection chronique avec le clone 13 du LCMV, la formation du complexe MALT1-CARM1-Bcl10 est inhibée par la protéine Trib1, et ce faisant, favorise l'expression de TOX (Rome et al., 2020). Le KO de Trib1 altère l'expression de TOX, améliore les fonctions des lymphocytes T et le contrôle de l'infection virale (Rome et al., 2020).

4) Dans un modèle de lymphocytes T CD8 humains exprimant un CAR induisant une signalisation cellulaire constante, la sur-expression de c-Jun permet de restaurer le fonctionnement des CAR T cells autrement dysfonctionnels. Sur-exprimer c-Jun n'améliore pas le fonctionnement de lymphocytes T CD8 portant un CAR normal, suggérant que c-Jun est uniquement impacté en condition d'activation chronique (Lynn et al., 2019).

c) IRF4 et TOX régulent tous les deux l'expression de PD-1

Si IRF4 induit l'expression de PD-1, il a également été montré que TOX est nécessaire à l'expression de PD-1 (Khan et al., 2019; Scott et al., 2019). De plus, nous proposons qu'IRF4 pourrait réguler l'expression de TOX. Lorsque nous avons testé l'impact de la surexpression d'IRF4 sur l'expression de PD-1, nous avions également des lymphocytes T CD8 sur-exprimant TOX (Fig 53a et b). Nos données montrent que TOX est aussi capable d'induire l'expression de PD-1 lorsque les lymphocytes T CD8 sont activés (Fig 53c). En revanche, nous n'avons pas observé de changement d'expression de TOX lorsque les lymphocytes T sur-exprimant IRF4 ont été activés, bien qu'ils parviennent à exprimer PD-1 (Fig 53c). Ces données indiquent que dans nos conditions expérimentales, l'effet d'IRF4 sur l'expression de PD-1 est indépendant de TOX. Ceci est cohérent puisque IRF4 est également nécessaire pour l'expression de PD-1 lors d'une simple activation aigüe, au cours de laquelle l'expression de TOX est faible et transitoire (Alfei et al., 2019; Khan et al., 2019; et données non montrées).

Puisque l'expression d'IRF4 survient par la simple activation d'un lymphocyte T, tandis que celle de TOX nécessite leur activation répétée, IRF4 agit en amont de TOX pour induire l'expression de PD-1. Cette expression de PD-1 pourrait restreindre la différenciation effectrice des lymphocytes T en cas de persistance antigénique, en stabilisant l'expression de Tcf-1. Dans ces cellules, l'exposition continue à l'antigène continue de susciter l'activation de NFAT, et potentiellement l'expression d'IRF4. L'expression de TOX qui en résulte induit les changements transcriptionnels et épigénétiques faisant de ces cellules des précurseurs épuisés. Déterminer si IRF4 peut directement ou indirectement participer à l'expression de TOX reste à déterminer. Nos données montrent qu'IRF4 n'a pas cette possibilité au sein de lymphocytes T CD8 déjà différenciés, ce qui n'est pas surprenant. L'expression soutenue de TOX est associée à des remaniements épigénétiques distincts à son locus, trouvés au sein de cellules

épuisées uniquement (Alfei et al., 2019; Khan et al., 2019). Ainsi, nos données ne peuvent exclure la possibilité qu'IRF4 puisse participer à l'expression de TOX lors des premières étapes de différenciation d'un lymphocyte T CD8 exposé à un antigène abondant ou persistant.

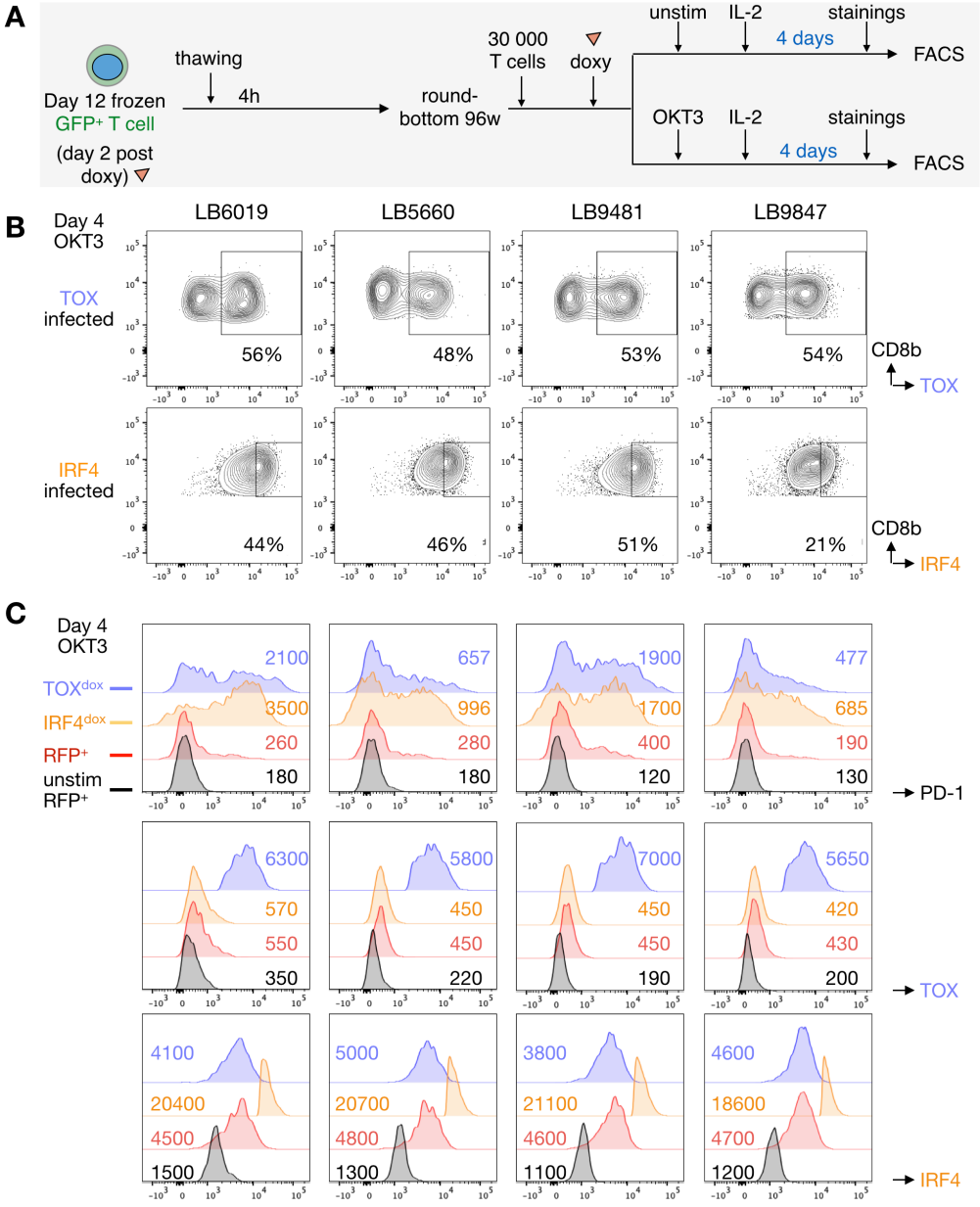


Figure 53. TOX est également capable d'induire l'expression de PD-1 chez l'Homme.
(A) Aperçu du plan expérimental suivi. (B) Stratégie de gating pour analyser les lymphocytes T sur-exprimant IRF4 ou TOX. La gate a été placée par rapport aux cellules RFP$^+$ (comme en figure 39). (C) Expression de PD-1, TOX et IRF4 au sein des lymphocytes T sur-exprimant la RFP, IRF4 ou TOX au jour 4 après activation. Les intensités médianes de fluorescence sont indiquées. L'expression de PD-1 en condition non stimulée est montrée pour la RFP, et est la même que pour les cellules sur-exprimant IRF4 ou TOX. Données de 4 donneurs (1 expérience).

2.2 Rôle d'IRF4 dans les lymphocytes T épuisés et TILs de cancer ovarien

a) Les TILs exprimant IRF4 sont-ils des lymphocytes T épuisés ?

Une fois les lymphocytes T épuisés précurseurs formés, IRF4 n'y exercerait qu'un rôle mineur. À la place, IRF4 jouerait un rôle prépondérant au sein des lymphocytes T épuisés terminaux. C'est en tout cas ce qui est suggéré par l'observation selon laquelle IRF4 est majoritairement exprimé au sein des lymphocytes T épuisés terminaux lors d'infections chroniques (Man et al., 2017). Son expression y est critique pour l'établissement de cette population : alors que 70% des lymphocytes P14 sont des lymphocytes T épuisés terminaux au jour 13, leur proportion chute à 10% lorsqu'un allèle d'IRF4 est éliminé (Man et al., 2017). Cette différence de représentativité de ces 2 populations cellulaires est majoritairement attribuable au rôle d'IRF4 dans la prolifération cellulaire. En effet, la conversion du stade précurseur au stade terminal provient de l'activation des cellules précurseurs (Im et al., 2016; Miller et al., 2019 ; Utzschneider et al., 2016). Sans IRF4, la prolifération qui accompagne cette différenciation est inhibée, tandis que les précurseurs Tcf-1$^+$ sont faiblement impactés, probablement de par leur capacité d'auto-renouvèlement (Man et al, 2017). Ainsi, au sein des lymphocytes T épuisés, IRF4 jouerait notamment un rôle au sein des cellules épuisées terminales.

En accord, nos analyses des TILs CD8 de carcinome ovarien montrent que les cellules exprimant IRF4 ont majoritairement un phénotype épuisé : expression abondante de PD-1 et Tox et production amoindrie d'IFNγ. Nous avons également montré que l'expression abondante de Tox et PD-1 est spécifique aux TILs et n'est pas induite par une activation aigüe en analysant parallèlement les TILs aux lymphocytes T CD8 activés dans le sang de patients COVID-19. Un tel comparatif chez l'Homme n'a jamais été réalisé à notre connaissance, et indique que des éléments spécifiques à une tumeur tels que persistance de l'antigène et/ou présence de facteurs solubles sont nécessaires pour l'expression soutenue de Tox

et PD-1. Ces mêmes facteurs, et notamment la persistance antigénique, sont expérimentalement la cause du phénomène d'épuisement. Ainsi, IRF4 est exprimé dans des TILs épuisés chez l'Homme.

b) Les TILs exprimant IRF4 sont-ils réactifs face à la tumeur ?

En combinant l'expression d'IRF4 avec celle de CD137, nous avons pu confirmer que IRF4 marquait probablement des cellules réactives face à la tumeur. En accord, la dynamique d'expression de IRF4 et CD137 suit la même cinétique et permet d'identifier spécifiquement des lymphocytes T CD8 antiviraux dans le sang de donneurs sains activés pendant 18h par le peptide qui leur est spécifique (Wu et al., 2019). Ceci indique que les TILs PD-1^{hi} Tox^{hi} exprimant IRF4 et CD137 sont des lymphocytes T CD8 réactifs face à la tumeur. D'autres études ont montré dans d'autres pathologies que les TILs avec un phénotype épuisé expriment CD137, sont engagés dans le cycle cellulaire, et ont un répertoire TCR surreprésenté par des clonotypes, ce qui supporte nos données (Li et al., 2019; Thommen et al., 2018; Tirosh et al., 2016; Zhang et al 2018; Zheng et al., 2017).

La spécificité des TILs PD-1^{hi} Tox^{hi} qui n'expriment ni IRF4, ni CD137, ni Ki67 reste à déterminer. Le fait que ces cellules expriment abondamment Tox mais qu'elles n'expriment pas d'autre marqueurs d'activité en cours suggèrent qu'elles ont été chroniquement activées, mais que l'antigène contre lequel elles sont dirigées a été éliminé, n'est plus présenté (p. ex perte de HLA), ou qu'elles ne sont plus en mesure de transmettre des signaux TCR activateurs. L'expression de Tox étant indépendante de l'activation du TCR à des stades plus tardifs de l'épuisement, ces 3 possibilités demeurent valides (Khan et al., 2019).

c) Fonction des TILs PD-1^{hi} Tox^{hi} exprimant IRF4

Plusieurs rapports indiquent que la capacité de production de cytokines des lymphocytes T épuisés précurseurs est supérieure à celle des lymphocytes T épuisés terminaux (Beltra et al., 2020; He et al., 2016; Hudson et al., 2019; Im et al., 2016; Utzschneider et al., 2016a). De plus, les lymphocytes T épuisés

précurseurs expriment plus faiblement PD-1 que les épuisés terminaux (He et al., 2016; Im et al., 2016; Utzschneider et al., 2016a). Or, la conversion du stade précurseur au stade épuisé terminal est conduite par l'activation des lymphocytes T et l'expression d'IRF4 qui en résulte. Par conséquent, les différences fonctionnelles entre ces 2 populations pourraient partiellement s'expliquer par leur état d'activation et l'expression d'IRF4. En accord, le retrait d'un allèle d'IRF4 dans les lymphocytes T épuisés terminaux suffit à restaurer la production de cytokines et diminue l'expression de PD-1 (Man et al., 2017).

Nos données montrent que les TILs PD-1^{hi} Tox^{hi} produisent moins d'IFNγ que leurs homologues PD-1^{int} et PD-1^{-}. Des données similaires ont été obtenues dans le cancer du poumon, où les TILs PD-1^{hi} sont les moins capables de sécréter de l'IFNγ, du TNFα et de l'IL-2 (Thommen et al., 2018). Conformément à nos données, ces TILs PD-1^{hi} sont enrichis en cellules $CD137^{+}$, témoignant d'une réactivité en cours face à la tumeur (Thommen et al., 2018). Combinées à nos données, ces informations indiquent que la présence d'IRF4 dans des lymphocytes T activés pourrait atténuer leur fonctionnalité lors de leur réactivation subséquente par des cellules tumorales persistantes présentant leur antigène. Nos données n'apportent toutefois pas de preuve directe quant à cette possibilité.

Quand bien même nous apporterions la preuve que les TILs exprimant IRF4 sont moins fonctionnels, il convient de noter que Tox est également exprimé en abondance supérieure au sein des lymphocytes T épuisés terminaux, où il participe à l'expression de PD-1 et à la perte de fonction des lymphocytes T (Abdel-Hakeem et al., 2021; Beltra et al., 2020). De plus, même lorsque des lymphocytes T épuisés sont mis au repos (et qu'ils n'expriment probablement plus IRF4), les fonctions effectrices qu'ils ont partiellement récupérés demeurent inférieures à celles de lymphocytes T mémoire (Abdel-Hakeem et al., 2021). D'autres mécanismes indépendants d'IRF4 contribuent donc au

dysfonctionnement des cellules avec un phénotype épuisé, tels que le maintien d'un environnement épigénétique prohibitif à l'expression de gènes de lymphocytes T mémoire fonctionnels (Abdel-Hakeem et al., 2021; Ghoneim et al., 2017; Pauken et al., 2016; Philip et al., 2017). De telles observations pourraient s'appliquer à l'Homme, puisque les lymphocytes T dirigés contre le virus de l'hépatite C ne récupèrent que partiellement leurs fonctions en dépit de l'élimination du virus de l'organisme par thérapie (Hensel et al., 2021; Tonnerre et al., 2021).

2.3 IRF4, une cible pour le traitement du cancer ?

Cibler IRF4 au sein des TILs chez l'Homme est délicat. Il n'existe à notre connaissance aucun inhibiteur d'IRF4. Aucune donnée n'existe quant à l'effet que produirait une inhibition aigüe d'IRF4 dans des lymphocytes T épuisés.

En revanche, les thérapies de type CAR T cells sont en développement constant (Lim and June, 2017). Dans divers modèles de tumeurs murines exprimant la forme humaine de CD19, la surexpression de BATF dans des CAR T cells murins anti-CD19 améliore le contrôle de la tumeur, et cet effet est associé à une meilleure expansion des CAR T cells dans la tumeur. La surexpression d'une forme de BATF incapable d'interagir avec IRF4 est sans effet sur le contrôle de la tumeur, et est corrélée à un défaut d'expansion des CAR T cells (Seo et al., 2021). Ceci indique qu'une collaboration est nécessaire entre BATF et IRF4, et montre l'importance de l'expansion cellulaire pour l'efficacité d'un tel traitement. En accord, lorsque IRF4 et BATF sont surexprimés ensemble dans des lymphocytes T OT-I, cette synergie est la plus efficace pour l'expansion cellulaire par rapport à ceux ne sur-exprimant que BATF ou que IRF4 (Seo et al., 2021). De plus, les auteurs observent que la surexpression d'IRF4, seule ou avec BATF, améliore la production de cytokines après une stimulation à la PMA/ionomycine (Seo et al., 2021). Ainsi, éliminer IRF4 dans des CAR T cells apparaît ici contre-productif, et sur-exprimer BATF et IRF4 semble être une approche idéale.

Pourtant, en dépit de leur production de cytokines et capacité d'expansion supérieure, ces lymphocytes T sur-exprimant IRF4 et BATF contrôlent moins efficacement la tumeur que leurs homologues sur-exprimant BATF seul. Ceci indique que lorsqu'il est en excès, IRF4 atténue l'effet bénéfique de BATF. De plus, la surexpression d'IRF4 seul n'apporte que peu de bénéfice au contrôle de la tumeur (Seo et al., 2021). Il semble donc que seule la présence modérée d'IRF4 dans les CAR T cells soit avantageuse, notamment pour permettre l'expansion des CAR T cells. Sur-exprimer BATF, seul, permet de contrebalancer l'action limitante d'IRF4 s'il est en excès. Cette notion s'illustre par le fait que les lymphocytes T CD8 OT-I sur-exprimant IRF4 coexpriment Tox et PD-1, tandis que BATF, seule ou avec IRF4, en inhibe l'expression (Seo et al., 2021). Plus d'études sont nécessaires pour comprendre ces divergences.

À plus long terme, il est envisageable que l'expression d'IRF4 dans des CAR T cells puisse être finement modulée pour atteindre des buts différents. Induire une expression modérée d'IRF4 limiterait son effet sur la fonction des CAR T cells tout en favorisant leur prolifération, maximisant ainsi leur activité dans la tumeur. À l'inverse, sur-exprimer IRF4 augmenterait aussi la quantité de CAR T cells, mais limiterait la quantité de cytokines inflammatoires qu'ils produisent. À condition qu'IRF4 n'atténue pas significativement l'activité lytique des CAR T cells, cette stratégie pourrait être avantageuse puisque des effets secondaires inflammatoires majeurs sont souvent produits par l'administration de CAR T cells chez l'Homme (Lim and June, 2017).

3 Conclusion

Notre travail a permis de clarifier le rôle du facteur de transcription IRF4 dans les lymphocytes T CD8 humains, dont il atténue la fonction tout en favorisant leur prolifération et l'expression de PD-1. Ce travail réconcilie les rôles antagonistes décrits pour IRF4 lors d'une infection virale aigüe ou chronique. Notablement, il met en évidence que des mécanismes régulateurs de la fonction des lymphocytes T CD8 sont systématiquement à l'œuvre pour adapter leur réponse face à un antigène, indépendamment du phénomène « d'épuisement ». Ce rôle d'IRF4 n'a pas été identifié lors d'infections virales aigües car l'antigène y est rapidement éliminé et que le rôle d'IRF4 était confiné à la différenciation des lymphocytes T naïfs en cellules effectrices dans ce contexte infectieux.

En confrontant nos données avec la littérature, nous avons conclu que IRF4 pourrait agir en rhéostat moléculaire afin de limiter une réponse immune excessive. Le mécanisme sous-jacent demeure à définir, mais pourrait impliquer un défaut d'activation du facteur c-Jun et/ou de la voie NFκB. Eu égard au rôle de PD-1 dont IRF4 induit l'expression, nous avons également vu qu'IRF4 pourrait être important à l'initiation du phénomène d'épuisement. Enfin, notre travail a montré que les TILs de carcinome ovarien contiennent des cellules avec un phénotype épuisé auquel IRF4 pourrait participer. Il reste à définir quelle pourrait y être sa contribution, et des études dans des modèles tumoraux sont nécessaires à cet effet. À plus long terme, l'expression d'IRF4 dans des CAR T cells pourrait être finement modulée pour favoriser l'expansion des CAR T cells produisant ou non une quantité limitée de cytokines inflammatoires. Cette dualité sous l'influence d'un seul facteur de transcription rend intéressante la manipulation de son expression afin d'atteindre l'effet désiré.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 Cultures cellulaires et milieux

La lignée tumorale LB33-MEL.A.1 a été cultivée dans du milieu Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (*Thermo Fisher, #21980065*) supplémenté avec 10% de sérum bovin (FBS) (*Sigma-Aldrich, #F7524*), 1,5mM GlutaMAX (*Thermo Fisher, #350500038*), 50µM 2-mercaptoéthanol (*Sigma-Aldrich, #M3148*), 100U/ml pénicilline et 100µg/ml streptomycine (*Sigma-Aldrich, #P4333*). Les cellules ont été maintenues à 37°C, 8% CO_2. La lignée tumorale MZ2-MEL.43 a été cultivée dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (*Thermo Fisher, #31885023*) supplémenté avec 10% FBS, 1,5mM GlutaMAX, 100U/ml pénicilline et 100µg/ml streptomycine. Les cellules ont été maintenues à 37°C, 8% CO_2. La lignée HEK293T a été cultivée dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% FBS, 1,5mM GlutaMAX, 1µM de sodium pyruvate (J.T Baker), 100U/ml pénicilline et 100µg/ml streptomycine.

Les lymphocytes T CD8 isolés du sang de donneurs atteints d'hémochromatose ont été amplifiés avec des billes anti-CD3/CD28 (*Thermo Fisher, #11132D*) à raison d'une bille pour 3 cellules dans du milieu IMDM supplémenté avec 10% de sérum humain (HS) (*Ludwig Institute for Cancer Research (LICR), Brussels Branch*), 1,5mM GlutaMAX, 100U/ml pénicilline, 100µg/ml streptomycine, et de l'interleukine-2 (IL-2) (*Proleukin, Novartis*). Les cellules ont été maintenues à 37°C, 8% CO_2. Chaque fois que nécessaire, les cellules ont été divisées en 2 et l'IL-2 rafraichie dans le milieu.

2 Isolement des cellules mononuclées de la tumeur et du sang (cancer et COVID-19)

Les prélèvements de tumeur ovarienne ont été coupées en petit morceaux puis transférées dans du PBS contenant les enzymes liberase low dispase (*Sigma-Aldrich, #5466202001*) et liberase low thermolysine (*Sigma-Aldrich,*

#5401020001) aux concentrations recommandées, ainsi que 10 Kunitz/ml de DNase I (*Worthington, #LS002060*). Une première dissociation mécanique au MACS dissociator (*Miltenyi*) a été effectuée, puis les échantillons ont été incubés 45 minutes à 37°C pour initier la digestion enzymatique. Une seconde dissociation mécanique au MACS dissociator a été effectuée, puis les cellules ont été lavées avec du PBS EDTA 1mM avant d'être centrifugées 10 minutes à 400g. Les cellules ont été resuspendues dans du PBS EDTA 1mM et passées sur filtre 40µM, et lavées avec du PBS EDTA 1mM. Les cellules ont ensuite été déposées sur une solution de Lymphoprep™ (*Alere Technologies, Oslo, Norway, 1114547*) puis centrifugées à 870g pendant 20 minutes à accélération et décélération minimale. L'anneau de cellules mononuclées a été récupéré et lavé 3 fois avec du PBS EDTA 1mM. La 1ère centrifugation a été faite à 400g pendant 10 minutes, et les 2 suivantes à 300g pendant 7 minutes. Les cellules ont été comptées au bleu de trypan (*Sigma-Aldrich, #T8154)* à l'aide d'un hématimètre, centrifugées 7 minutes à 300g et resuspendues dans une solution 50% IMDM, 40% HS, et 10% de Dimethylsulfoxyde (DMSO) (*ChemCruz, #sc-358801*) afin d'être congelées à -80°C. Les cellules congelées ont ensuite été maintenues à -180°C dans de l'azote liquide.

Les cellules mononuclées du sang (PBMCs) de patients atteints de la COVID-19 ou de carcinome ovarien ont été isolées par gradient de densité. Le sang a été ajouté au-dessus d'une solution de Lymphoprep™ puis centrifugé à 870g pendant 20 minutes à accélération et décélération minimale. L'anneau de cellules mononuclées a été récupéré et lavé 3 fois avec du PBS EDTA 1mM pour enlever les plaquettes. La 1ère centrifugation a été faite à 400g pendant 10 minutes, et les 2 suivantes à 300g pendant 7 minutes. Les PBMCs ont ensuite été comptées à la solution de Türk (*Merck, #109277)* à l'aide d'un hématimètre, centrifugées 7 minutes à 300g et resuspendues dans 50% de IMDM, 40% de HS et 10% de

DMSO afin d'être congelées à -80°C. Les cellules congelées ont ensuite été maintenues à -180°C dans de l'azote liquide.

3 Isolement des lymphocytes T CD8 du sang de donneurs hémochromateux

Les PBMCs du sang de donneurs atteints d'hémochromatose ont été isolées par gradient de densité comme décrit ci-dessus. Les PBMCs obtenus ont ensuite été resuspendues à 2.10^8/ml dans du PBS EDTA 1mM HS 1% contenant 20% de FcR block (*Miltenyi, #130-059-901*) et 20% de microbilles CD8 (*Miltenyi, 130-045-201)* pendant 15 minutes à 4°C. Les cellules ont été passées sur filtre 40µM, le volume porté à 0,5ml, et les cellules triées par AutoMACS (*Miltenyi*) en mode possel_s dans une solution de PBS EDTA 1mM HS 1% Gentamicine 15µg/ml (*Sigma-Aldrich, #G1397*). La fraction positive contenant les lymphocytes T CD8 a été comptée au bleu de trypan. Les cellules ont été lavées avec de l'IMDM et congelées dans 50% de IMDM, 40% de HS et 10% de DMSO.

4 Plasmides et production de particules lentivirales

Pour la production de particules lentivirales, les plasmides pCMV-VSV-G (*Addgene, #8454*) et psPAX2 (*Addgene, #12260*) ont été utilisés avec le plasmide de transfert pLV-TRE3G>MCS-hPGK>EGFP:T2A:Tet3G (*VectorBuilder*, commande personnalisée) encodant la RFP ou IRF4. La séquence codant la RFP a été clonée à partir du plasmide pCW57-MCS1-P2A-MCS2 (*Addgene, #80923*), et la séquence codant IRF4 a été clonée à partir du plasmide plenti-CAG-IRF4-FLAG-IRES-GFP (*Addgene, #107389*). Ces séquences ont ensuite été ligaturées dans le site de clonage multiple (MCS) du plasmide de transfert.

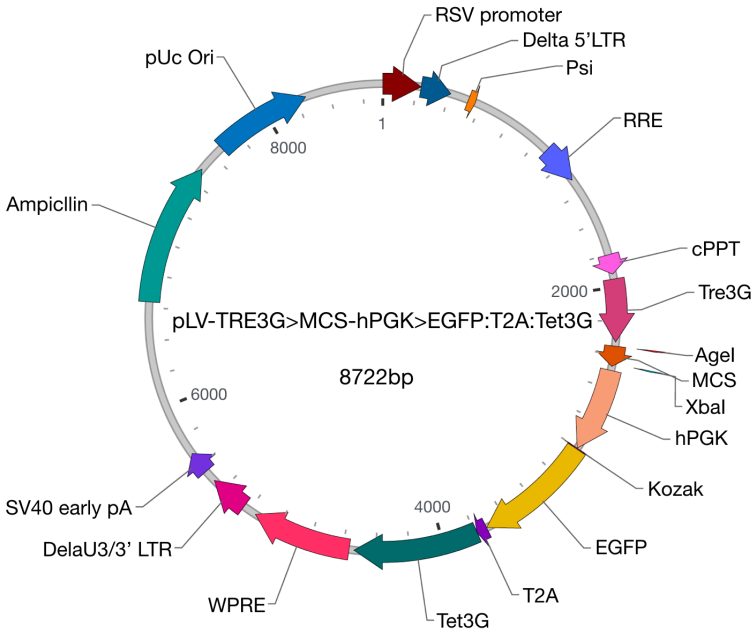


Figure 54. Vecteur de transfert dans lequel la CDS de RFP ou IRF4 a été insérée dans le MCS .

La veille de leur transfection, 10^7 HEK293T ont été plaquées en flasque 175cm^2 dans 20ml de milieu complet sans antibiotique. Pour chaque flasque, le mélange suivant a été réalisé : 15µg de plasmide pCMV-VSV-G, 30µg de plasmide psPAX2, et 45µg de plasmide de transfert (IRF4 ou RFP inductible), 400µl de chlorure de calcium ($CaCl_2$) 2M, et de l'eau portant le volume à 2,5ml. Sur ce mélange a été ajouté goutte à goutte 2,5ml de HeBS. Les 5ml de mélange plasmides-$CaCl_2$-HeBS ont alors été transférés goutte à goutte sur les HEK293T et les cellules incubées pendant 6h à 37°C 8% CO_2 avant de renouveler le milieu dans la flasque avec 20ml de milieu complet sans antibiotique. Après 3 jours à 37°C 8% CO_2, le surnageant contenant les particules virales a été collecté et centrifugée à 500g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant a été récolté et déposé sur 0,5 volume de le Lenti-X-Concentrator (*Takara, #631232*) avant d'être incubé pendant 30 minutes à 4°C puis centrifugé à 1400g pendant 45 minutes à 4°C. Le culot de particules virales a été resuspendu dans de l'Opti-MEM (*Thermo Fisher, #11058021*) et congelé à -180°C. Un aliquote de la solution de particules virales a systématiquement été utilisé afin d'estimer la concentration de particules virales effectives obtenues. Pour ce faire, l'efficacité d'infection de ces particules a été

estimé en incubant les cellules HEK293T pendant 48h avec des volumes décroissants de particules, puis la proportion de cellules infectées pour chaque condition a été évaluée par cytométrie en flux.

5 Transduction lentivirale et induction à la doxycycline

Les lymphocytes T CD8 de donneurs atteints d'hémochromatose ont été décongelés à 10^7/ml pendant 4h à 37°C 8% CO_2 dans du milieu complet en présence de 5 Kunitz/ml de DNAse I. Les cellules ont été comptées au bleu de trypan. En plaque 96 puits à fond rond (*Corning, #3799*), 50 000 cellules ont été déposées, ainsi que 500 000 particules lentivirales et 16 666 billes anti-CD3/CD28, le tout dans 100ul de milieu complet avec de l'IL-2 à 50U/ml par puits. La plaque a alors été centrifugée 2h à 400g puis placée à 37°C 8% CO_2 pendant 4 jours. Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois avec du milieu complet, avant d'être marquées dans du PBS EDTA 1mM HS 1% avec un anticorps anti-CD8β PerCP-Cy5.5 (*BD Biosciences, clone 2ST8.5H7*) et la sonde de viabilité eFluor780 (*eBioscience, #65-0865-18*) pendant 20 minutes à 4°C puis lavées 2 fois avec du PBS EDTA 1mM HS 1%. Les lymphocytes T vivants $CD8\beta^+$ GFP^+ ont été triés au FACS ARIA III (*BD Biosciences*) et replacés en culture dans du milieu complet en présence de 50U/ml d'IL-2. Après 6 jours de repos, les lymphocytes T ont été incubés pendant 48h supplémentaires avec 1µg/ml de doxycycline (*Sigma-Aldrich, #D9891)* et 50U/ml d'IL-2 avant d'analyser leurs fonctions effectrices, leur prolifération, l'expression de récepteurs inhibiteurs, ou leur transcriptome. La doxycycline a été maintenue à 1µg/ml pendant toute la durée de réalisation de ces tests.

6 CRISPR/Cas9

Les lymphocytes T CD8 de donneurs atteints d'hémochromatose ont été décongelés à 10^7/ml pendant 4h à 37°C 8% CO_2 dans du milieu complet en présence de 5 Kunitz/ml de DNAse I. Les cellules ont été comptées au bleu de

trypan et resuspendues à 2.10^6 par 100µl dans le tampon d'électroporation P3 (*Lonza*, *#V4XP-3024*). Les complexes Cas9 / ARN guide ont été préparés dans de l'eau dépourvu de RNAse (*Ambion, #AM9906*) en les incubant 5 minutes à température ambiante. Ces complexes ont été ajoutés à raison de 5µg de Cas9 (*Thermo Fisher, #A36499*) et 150pmol d'ARN guide contrôle (*Thermo Fisher, #A35526*) ou contre IRF4 (*Thermo Fisher, #CRISPR 998515_SGM*) par 2.10^6 cellules. Après 2 minutes d'incubation, le mélange cellules-Cas9-gRNA a été transféré à raison de 2.10^6 cellules par nucléocuvette (*Lonza*, *#V4XP-3024)*, et les cellules ont été électroporées avec le programme « T cell human unstim high-efficiency (FI115) » du 4D Nucleofector (*Lonza*). Immédiatement après l'électroporation, 1ml de milieu complet contenant 50U/ml d'IL-2 a été ajouté, et les cellules ont été transférées en plaque 24 puits pour reposer pendant 3h à 37°C 8% CO_2. Après repos, 1ml de milieu complet avec 50U/ml d'IL-2 et 666 666 billes anti-CD3/CD28 a été ajouté, et les cellules ont été incubées à 37°C 8% CO_2 pendant 5 jours avant d'analyser leurs fonctions effectrices ou leur transcriptome. Alternativement, les cellules ayant récupéré de leur électroporation ont immédiatement été utilisées pour initier un test de prolifération et mesurer l'expression de récepteurs inhibiteurs après activation (voir plus loin).

7 Tests de fonction, prolifération, et mesure de récepteurs

7.1 Test de production de cytokines

La veille du test de fonction, 100ul de PBS contenant 1µg/ml d'anticorps OKT3 anti-CD3ε (*Biolegend, #317326*) ont été déposés en plaque 96 puits à fond plat (*Greiner, #655061*). La plaque a été incubée sur la nuit à 4°C.

Les lymphocytes T CD8 au jour 5 après CRISPR/Cas9 ou au jour 2 après induction à la doxycycline ont été comptés au bleu de trypan. Le PBS a été retiré des puits OKT3 et 100µl de milieu complet contenant 50U/ml d'IL-2 ont immédiatement été ajoutés. Puis, 100µl supplémentaires contenant 75 000

cellules et 50U/ml d'IL-2 ont été ajoutés. Pour leur stimulation avec les lignées tumorales LB33-MELA.1 et MZ2-MEL.43 OKT3-CD14, 75 000 lymphocytes T ont été cocultivés avec 75 000 cellules tumorales en plaque 96 puits à fond rond dans 200µl avec 50U/ml d'IL-2. La plaque a été centrifugée 1 minute à 400g puis incubée à 37°C 8% CO_2. Après 1h d'incubation, 5ug/ml de Brefeldin A (BFA) (*Sigma-Aldrich, #B7651*) a été apporté dans chaque puits, et les cellules ont été incubées 4h supplémentaires à 37°C 8% CO_2. Les cellules ont ensuite été placées sur glace et transférées en plaque 96 puits à fond conique (*Corning, #3894*) avant d'être marquées pour être analysées par cytométrie en flux (voir plus loin).

Pour les échantillons de tumeur et sang de patientes atteintes de carcinome ovarien, les cellules ont été décongelées à 10^7/ml pendant 4h à 37°C 8% CO_2. Les cellules vivantes ont été comptées au bleu de trypan et resuspendues dans du milieu complet à 2.10^6/ml. Le PBS a été retiré des puits OKT3 et 100µl de milieu complet contenant ou non un cocktail de 2ng/ml de PMA (*LC laboratories, #P-*1680) et 2µg/ml de ionomycine (*Sigma-Aldrich, #*I0634) ont immédiatement été ajoutés. Puis, 100µl supplémentaires contenant 200 000 cellules ont été ajoutés. La plaque a été centrifugée 1 minute à 400g puis incubée à 37°C 8% CO_2 pendant 5h en présence de BFA comme expliqué ci-dessus. Les cellules ont ensuite été placées sur glace et transférées en plaque 96 puits à fond conique préalablement refroidie à 4°C avant d'être marquées pour être analysées par cytométrie en flux.

7.2 Test de dégranulation

Les lymphocytes T CD8 au jour 5 après CRISPR/Cas9 ont été comptés au bleu de trypan. En plaque 96 puits à fond rond, 75 000 lymphocytes T ont été cocultivés avec 75 000 cellules tumorales en plaque 96 puits à fond rond dans 200µl avec 50U/ml d'IL-2 et 1,25µg/ml d'anticorps anti-CD107a (*BD Biosciences, Clone H4A3*). La plaque a été centrifugée 1 minute à 400g puis incubée 1h à 37°C 8% CO_2. Après 1h d'incubation, 5µg/ml de BFA a été apportée dans chaque puits, et

les cellules ont été incubées 4h supplémentaires à 37°C 8% CO_2. Les cellules ont ensuite été placées sur glace et transférées en plaque 96 puits à fond conique préalablement refroidie à 4°C avant d'être marquées pour être analysées par cytométrie en flux.

7.3 Test de prolifération et mesure de l'expression de récepteurs

La veille du test de prolifération, 100µl de PBS contenant 1µg/ml d'anticorps OKT3 anti-CD3ε ont été déposés en plaque 96 puits à fond rond. La plaque a été incubée sur la nuit à 4°C. Les lymphocytes T CD8 au jour 2 après induction à la doxycycline ou mis au repos pendant 3h après leur nucléofection ont été comptés au bleu de trypan. Les cellules ont été resuspendues à 1.10^6/ml dans du PBS avec 5µM de Cell Trace Violet (CTV) (*Thermo Fisher, #C34557*) et incubées 20 minutes à 37°C 8% CO_2. Après 20 minutes, 5 volumes de milieu complet ont été ajoutés, puis après 5 minutes à température ambiante, les cellules ont été centrifugées 5 minutes à 400g. Les cellules ont été resuspendues à 3.10^5/ml dans du milieu complet avec 50U/ml d'IL-2. Le PBS contenant l'anticorps OKT3 a été retiré des puits et 30 000 cellules dans 100ul ont été ajoutés par puits. Lorsque indiqué, 2µg/ml d'anti-CD28 soluble a été ajouté (*BD Biosciences, #555725, Clone CD28.2*). Les cellules ont été centrifugées 1 minute à 400g avant d'être incubées pendant 3 à 4 jours à 37°C 8% CO_2. Au jour 3 ou 4 après activation, les cellules ont été placées sur glace et transférées en plaque 96 puits à fond conique préalablement refroidie à 4°C avant d'être marquées pour analyser par cytométrie en flux l'expression de CTLA-4, PD-1, LAG-3, et la dilution de la sonde CTV.

8 Cytométrie en flux

8.1 Marquages extracellulaires et intracellulaires pour analyse au Fortessa

Les cellules ont été récoltées et transférées en plaque 96 puits à fond conique préalablement refroidie à 4°C. La plaque a été centrifugée à 400g pendant 4 minutes à 4°C. Les cellules ont été lavées avec 150µl de PBS EDTA 1mM HS 1% et centrifugées 4 minutes à 400g, 4°C. Les cellules ont été resuspendues dans 50µl de PBS EDTA 1mM HS 1% contenant les anticorps appropriés. Après 20 minutes, les cellules ont été lavées 2x avec 150µl de PBS EDTA 1mM HS 1% et centrifugées 4 minutes à 400g, 4°C. Les cellules ont ensuite été lavées 1x avec 150µl de PBS et centrifugées 4 minutes à 400g, 4°C. Puis, les cellules ont été resuspendues dans 100µl de tampon de fixation et perméabilisation (*eBiosciences, #00-5523-00*) avant d'être incubées entre 12h et 16h à 4°C. Les cellules fixées et perméabilisées ont été centrifugées 5 minutes à 870g, 4°C. Puis les cellules ont été lavées 3x avec 100µl de tampon de perméabilisation (*eBiosciences, #00-5523-00*) et centrifugées 5 minutes à 870g, 4°C. Les cellules ont été resuspendues dans 30µl de solution de blocage (tampon de perméabilisation + HS 8%) et incubées 15 minutes à 4°C. Puis, 20µl de tampon de perméabilisation contenant les anticorps appropriés 2,5x concentrés ont été ajoutés. Les cellules ont été homogénéisées et incubées 2h à 4°C. Les cellules ont été lavées 3 fois avec 150µl de tampon de perméabilisation et centrifugées 5 minutes à 870g, 4°C. Les cellules ont été resuspendues dans du tampon de perméabilisation et analysées par cytométrie en flux avec le BD LSRII Fortessa (*BD Biosciences*). Les données ont été analysées sur Flowjo (*BD Biosciences*).

Tableau 1. *Liste des anticorps utilisés pour les marquages extracellulaires.*

Cible	Fluorochrome	Clone	µg/ml utilisé	Référence
CD19	APC-Cy7	SJ25C1	1	363010, Biolegend
CD20	APC-Cy7	2H7	1	302314, Biolegend
CD33	APC-Cy7	P67.6	1	366602, Biolegend

CD326	APC-Cy7	9C4	1	324246, Biolegend
CD2	BV480	RPA-2.10	0,4	746538, BD Bioscience
CD8β	PerCP Cy5.5	2ST8.5H7	2	Custom order, BD Bioscience
CD8β	BV421	2ST8.5H7	1	742390, BD Bioscience
CD8β	APC	2ST8.5H7	0,6	641058, BD Bioscience
CCR7	BV650	G043H7	2,5	353234, Biolegend
CCR7	PE	G043H7	2	353204, Biolegend
CD45RA	FITC	HI100	2,5	304148, Biolegend
CD45RA	Alexa700	HI100	3,33	304120, Biolegend
PD-1	BV786	EH12.2H7	2,5	329930, Biolegend
LAG-3	PE-Cy7	11C3C65	1	369310, Biolegend
CTLA-4	BV421	BNI3	1	369606, Biolegend
CTLA-4	PE	BNI3	4	369604, Biolegend
CD137	BV421	4B4-1	1	309820, Biolegend
CD137	PE	4B4-1	1	309804, Biolegend
CD69	BV650	FN50	1,25	310934, Biolegend
CD38	BV480	HIT2	10	566137, BD Bioscience
CD107a	FITC	H4A3	1,25	555800, BD Bioscience

Tableau 2. *Liste des anticorps utilisés pour les marquages intracellulaires.*

Cible	**Fluorochrome**	**Clone**	**µg/ml utilisé**	**Référence**
TOX	APC	REA473	17,5	130118335, Miltenyi
IRF4	PE-Cy7	IRF4.3E4	0,4	646414, Biolegend
IRF4	Alexa647	IRF4.3E4	0,33	646408, Biolegend
BATF	Alexa488	D7C5	0,5	8638, Cell Signaling
BATF	PE	D7C5	0,5	8638, Cell Signaling
Ki67	Alexa488	B56	0,5	558616, BD Bioscience
Ki67	BV421	B56	0,5	562899, BD Bioscience
IFNγ	Alexa700	4S.B3	3	502520, BD Bioscience
TNFα	BV421	MAb11	1	502932, Biolegend
TNFα	Alexa700	MAb11	1	502928, Biolegend
GM-CSF	APC	BVD2-21C11	1	502310, Biolegend
Histone H1	Alexa488	AE-4	4	Sc-8030, Santa Cruz
Histone H1	Alexa647	AE-4	4	Sc-8030, Santa Cruz

8.2 Particularités pour le marquage intracellulaire avant extraction d'ARN

Lorsque les cellules exprimant la RFP ou IRF4 ont été triées afin d'extraire leur ARN, l'inhibiteur de RNase, RNasin Plus (*Promega, #N2615*), a été utilisé dès lors que les cellules ont été perméabilisées. Précisément, suite au marquage avec

la sonde de viabilité eFluor780 et l'anticorps anti-CD8β, les cellules ont été lavées 2x avec du PBS EDTA 1mM HS 1% puis resuspendues dans du PBS, comme préalablement expliqué. Les cellules ont alors été transférées dans une nouvelle plaque 96 puits à fond conique stérile et RNase-free, et toute la suite des manipulations a été réalisée en condition RNase-free. La fixation/perméabilisation pendant 12h à 16h à 4°C a été faite en présence de 2U/µl de RNAsin Plus. Pendant les lavages, le RNAsin Plus a été ajouté à 0,04U/µl. Pendant le marquage intracellulaire, le RNAsin Plus a été ajouté à 2U/µl. Pendant le tri au FACS ARIA III (*BD Biosciences*), les cellules ont été gardées dans du tampon de perméabilisation avec 0,4U/µl de RNAsin Plus, et les cellules triées ont été récoltées en ependorf 1,5ml dans du tampon de perméabilisation contenant 0,04U/µl de RNAsin Plus.

9 Analyse du transcriptome par RNA-seq

9.1 Extraction d'ARN à partir de cellules fixées et perméabilisées

Les cellules fixées et perméabilisées triées et récoltées en ependorf 1,5ml ont été centrifugées à 870g pendant 10 minutes à 4°C. Les cellules ont été resuspendues dans un tampon de digestion avec une protéase (*Thermo Fisher, AM1975)* et incubées pendant 1h à 60°C afin de détruire le réseau de liaisons covalentes formées entre l'agent fixateur utilisé et les protéines et acides nucléiques (reverse cross-linking step). Les échantillons ont été homogénéisés par vortex et rapidement congelés en les plongeant dans l'azote liquide. Ils ont été maintenus à -80°C jusqu'à extraction de l'ARN. Le kit RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation (*Thermo Fisher, #AM1975*) a été utilisé conformément aux instructions indiquées pour extraire l'ARN. L'ARN élué a ensuite été précipité avec 6µl d'acétate de sodium 3M (*Thermo Fisher, #AM9740*), 20ng de glycogène (*Thermo Fisher, #R0551*), et 200µl d'éthanol 100% glacial (*VWR, #20821.310*). Les échantillons ont été incubées une nuit à -20°C puis centrifugées à 14000g pendant

30 minutes à 4°C. Les échantillons ont été lavés 2 fois avec de l'éthanol 75% glacial et centrifugés à 14000g pendant 10 minutes à 4°C. Après retrait du surnageant, les échantillons ont été séchés à température ambiante puis resuspendus dans 4,5µl d'eau RNAse-free (*Thermo Fisher, #AM9906*).

9.2 Construction des librairies et séquençage

Les librairies ont été construites par Alexandre Bayard en utilisant le protocole SMART-Seq2 (Picelli et al., 2014). Brièvement, 1,5µl d'ARN a été rétrotranscrit pendant 90 minutes à 42°C suivi de 10 cycles de 2 minutes à 50°C et 2 minutes à 42°C, en présence de 10U/µl de SuperScript II reverse transcriptase (*Thermo Fisher*, *#18064071*), 1µM d'oligo-dT et 1µM d'oligo template switch (TSO) (*Eurogentec*). Le cDNA obtenu a été amplifié sur 14 cycles de 20 secondes à 98°C, 15 secondes à 67°C et 6 minutes à 72°C, en présence de 0,02U/µl de KAPA HiFi HotStart DNA polymerase (*Roche, #07958897001*) et de 100nM d'oligo IS PCR (*Eurogentec*). Le cDNA amplifié a été purifié avec 0,9 volume de billes paramagnétiques AMPure XP (*Analis, #A63881*) pour 1 volume d'échantillon, puis dosé avec le kit QuantiFluor dsDNA System (*Promega, #E2670*). L'ADN a été tagmenté pendant 5 minutes à 55°C en présence de la Tn5 transposase et des amorces fournies avec le kit de tagmentation (*Illumina, #FC-131-1096*). L'ADN tagmenté a ensuite été amplifié sur 11 cycles de 10 secondes à 95°C, 30 secondes à 55°C, et 30 secondes à 72°C en présence des primers indexés fournis avec le kit (*Illumina, #FC-131-2004*). Le produit amplifié et indexé a été purifié avec 0,8 volume de billes paramagnétiques AMPure XP pour 1 volume d'échantillon, puis dosé avec le kit QuantiFluor dsDNA System. Les concentrations ont été normalisées et une quantité égale de chaque échantillon a été rassemblée, permettant l'obtention d'une librairie équimolaire contenant jusqu'à 16 échantillons distincts. La taille de la librairie ainsi obtenue a été vérifiée par électrophorèse capillaire à la TapeStation (*Agilent, #5067-5588, #5067-5589*). Les librairies ont été séquencées par Genewiz sur la plateforme Illumina HiSeq.

Environ 380.10^6 de paires de reads de 150bp par ligne de séquençage ont été obtenus, soit environ 20-25 millions de paires de reads de 150bp par échantillon.

9.3 Analyse des données

Les données de séquençage ont été analysées avec l'aide de Christophe Vanhaver. Après un contrôle qualité des fichiers FASTQ, les séquences adaptatrices ont été enlevées et les nucléotides de faible qualité de lecture retirés des reads à l'aide de Trimmomatic (Bolger et al., 2014). La qualité des fichiers a alors été vérifiée à nouveau. Les reads ainsi retenus ont été alignés sur le génome humain de référence GRCh38 avec HISAT2 (Kim et al., 2019b). Le nombre de reads alignés sur des séquences référencées a été déterminé avec featuresCount (Liao et al., 2014). La normalisation du nombre de reads comptés sur chaque gène et l'analyse des gènes différentiellement exprimés ont été effectuées avec DESeq2 (Love et al., 2014). Les données ont été visualisées avec Qlucore (*Qlucore, Lund, Sweden*). Les analyses d'enrichissement de gènes (GSEA) ont été effectués avec Qlucore à partir de la base de données MSigDB (*UC San Diego, Broad Institute)* contenant la collection de gènes « hallmark » (Liberzon et al., 2015).

10 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec GraphPad Prism v5 *(GraphPad, San Diego, California)* à l'exception des données de RNA-seq qui ont été analysées avec DESeq2 par test pairée, et des analyses de Gene Set Enrichment qui ont été réalisées dans Qlucore. Les tests statistiques employés sont indiqués en légende des figures. Une valeur p inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

RÉFÉRENCES

Abdel-Hakeem, M.S., Manne, S., Beltra, J.C., Stelekati, E., Chen, Z., Nzingha, K., Ali, M.A., Johnson, J.L., Giles, J.R., Mathew, D., Greenplate, A.R., Vahedi, G., and Wherry, E.J. (2021). Epigenetic scarring of exhausted T cells hinders memory differentiation upon eliminating chronic antigenic stimulation. Nat. Immunol. *22*, 1008–1019.

Ahmadzadeh, M., Johnson, L.A., Heemskerk, B., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., White, D.E., and Rosenberg, S.A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. Blood *114*, 1537–1544.

Ahmed, R., Aimo, S., Butler, L., Chiller, J., and Oldstone, M. (1984). Selection of genetic variants of lymphocytic choriomeningitis virus in spleens of persistenly infected mice. J. Exp. Med. *60*, 521–540.

Ahn, E., Araki, K., Hashimoto, M., Li, W., Riley, J.L., Cheung, J., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., Irving, B.A., and Ahmed, R. (2018). Role of PD-1 during effector CD8 T cell differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *115*, 4749–4754.

Alfei, F., Kanev, K., Hofmann, M., Wu, M., Ghoneim, H.E., Roelli, P., Utzschneider, D.T., von Hoesslin, M., Cullen, J.G., Fan, Y., Eisenberg, V., Wohlleber, D., Steiger, K., Merkler, D., Delorenzi, M., Knolle, P., Cohen, C., Thimme, R., Youngblood, B., and Zehn, D. (2019). TOX reinforces the phenotype and longevity of exhausted T cells in chronic viral infection. Nature *571*, 265–269.

Allison, K.A., Sajti, E., Collier, J.G., Gosselin, D., Troutman, T.D., Stone, E.L., Hedrick, S.M., and Glass, C.K. (2016). Affinity and dose of TCR engagement yield proportional enhancer and gene activity in CD4+ T cells. Elife *5*, 1–28.

Andreotti, A.H., Schwartzberg, P.L., Joseph, R.E., and Berg, L.J. (2010). T-cell signaling regulated by the Tec family kinase, Itk. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *2*.

Angelosanto, J.M., Blackburn, S.D., Crawford, A., and Wherry, E.J. (2012). Progressive Loss of Memory T Cell Potential and Commitment to Exhaustion during Chronic Viral Infection. J. Virol. *86*, 8161–8170.

Aramburu, J., Garcia-Cozar, F., Raghavan, A., Okamura, H., Rao, A., and Hogan, P.G. (1998). Selective Inhibition of NFAT Activation by a Peptide Spanning the Calcineurin Targeting Site of NFAT. Mol. Cell *1*, 627–637.

Arias, C.F., Ballesteros-Tato, A., García, M.I., Martín-Caballero, J., Flores, J.M., Martínez-A, C., and Balomenos, D. (2007). p21 CIP1/WAF1 Controls Proliferation of Activated/Memory T Cells and Affects Homeostasis and Memory T Cell Responses . J. Immunol. *178*, 2296–2306.

Armstrong, C., and Lillie, R.D. (1934). Experimental LCM of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 Saint Louis encephalitis epidemic.pdf. Public Health Rep. *49*, 1019–1027.

Artyomov, M.N., Lis, M., Devadas, S., Davis, M.M., and Chakraborty, A.K. (2010). CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 16916–16921.

Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: Signaling and modulation. Science (80-.). *281*, 1305–1308.

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

Bachmann, M.F., Wolint, P., Schwarz, K., and Oxenius, A. (2005). Recall Proliferation Potential of Memory CD8 + T Cells and Antiviral Protection . J. Immunol. *175*, 4677–4685.

Badovinac, V.P., Porter, B.B., and Harty, J.T. (2002). Programmed contraction of cd8+ t cells after infection. Nat. Immunol. *3*, 619–626.

Baetz, K., Isaaz, S., and Griffiths, G.M. (1995). Loss of Cytotoxic T Lymphocyte Function in Chediak-Higashi Syndrome Arises From a Secretory Defect That Prevents Lytic Granule Exocytosis. J. Immunol. *98*, 6122–6131.

Balasubramani, A., Shibata, Y., Crawford, G.E., Baldwin, A.S., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2010). Modular utilization of distal cis-regulatory elements controls Ifng gene expression in T cells activated by distinct stimuli. Immunity *33*, 35–47.

Banerjee, A., Gordon, S.M., Intlekofer, A.M., Paley, M.A., Mooney, E.C., Lindsten, T., Wherry, E.J., and Reiner, S.L. (2010). Cutting Edge: The Transcription Factor Eomesodermin Enables CD8 + T Cells To Compete for the Memory Cell Niche . J. Immunol. *185*, 4988–4992.

Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. Nature *439*, 682–687.

Barber, E.K., Dasgupta, J.D., Schlossman, S.F., Trevillyan, J.M., and Rudd, C.E. (1989). The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56(lck)) that phosphorylates the CD3 complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *86*, 3277–3281.

Bassez, A., Vos, H., Van Dyck, L., Floris, G., Arijs, I., Desmedt, C., Boeckx, B., Vanden Bempt, M., Nevelsteen, I., Lambein, K., Punie, K., Neven, P., Garg, A.D., Wildiers, H., Qian, J., Smeets, A., and Lambrechts, D. (2021). A single-cell map of intratumoral changes during anti-PD1 treatment of patients with breast cancer (Springer US).

Beals, C.R., Sheridan, C.M., Turck, C.W., Gardner, P., and Crabtree, G.R. (1997). Nuclear Export of NF-ATc Enhanced by Glycogen Synthase Kinase-3. Science (80-.). *275*, 1930–1933.

Beeman, E. (2007). Charles Armstrong, M.D.: A Biography Edward A. Beeman, M.D., F.A.C.P. 2007. Biogr. An Interdiscip. Q.

Beltra, J.C., Manne, S., Abdel-Hakeem, M.S., Kurachi, M., Giles, J.R., Chen, Z., Casella, V., Ngiow, S.F., Khan, O., Huang, Y.J., Yan, P., Nzingha, K., Xu, W., Amaravadi, R.K., Xu, X., Karakousis, G.C., Mitchell, T.C., Schuchter, L.M., Huang, A.C., and Wherry, E.J. (2020). Developmental Relationships of Four Exhausted CD8+ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms. Immunity *52*, 825-841.e8.

Bergman, M., Mustelin, T., Oetken, C., Partanen, J., Flint, N.A., Amrein, K.E., Autero, M., Burn, P., and Alitalo, K. (1992). The human p50(csk) tyrosine kinase phosphorylates p56(lck) at Tyr-505 and down regulates its catalytic activity. EMBO J. *11*, 2919–2924.

Bergthaler, A., Flatz, L., Hegazy, A.N., Johnson, S., Horvath, E., Löhning, M., and Pinschewer, D.D. (2010). Viral replicative capacity is the primary determinant of lymphocytic choriomeningitis virus persistence and immunosuppression. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 21641–21646.

Betts, M.R., and Koup, R.A. (2004). Detection of T-cell degranulation: CD107a and b. Methods Cell Biol. *2004*, 497–512.

Bjorkman, P.., Saper, M.., Samraoui, B., Bennett, W.., Strominger, J.., and Wiley, D.. (1987). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions. Nature *329*, 512–518.

Blackburn, S.D., Shin, H., Freeman, G.J., and Wherry, E.J. (2008). Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by aPD-L1 blockade. PNAS *105*, 15016–15021.

Blackburn, S.D., Shin, H., Haining, W.N., Zou, T., Workman, C.J., Polley, A., Betts, M.R., Freeman, G.J., Vignali, D.A.A., and Wherry, E.J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. Nat. Immunol. *10*, 29–37.

Blank, C.U., Haining, W.N., Held, W., Hogan, P.G., Kallies, A., Lugli, E., Lynn, R.C., Philip, M., Rao, A., Restifo, N.P., Schietinger, A., Schumacher, T.N., Schwartzberg, P.L., Sharpe, A.H., Speiser, D.E., Wherry, E.J., Youngblood, B.A., and Zehn, D. (2019). Defining 'T cell exhaustion.' Nat. Rev. Immunol. *19*, 665–674.

Blattman, J.N., Wherry, E.J., Ha, S.-J., van der Most, R.G., and Ahmed, R. (2009). Impact of Epitope Escape on PD-1 Expression and CD8 T-Cell Exhaustion during Chronic Infection. J. Virol. *83*, 4386–4394.

Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics *30*, 2114–2120.

Borrow, P., Evans, C.F., and Oldstone, M.B. (1995). Virus-induced immunosuppression: immune system-mediated destruction of virus-infected dendritic cells results in generalized immune suppression. J. Virol. *69*, 1059–1070.

Bouley, D.M., Kanangat, S., Wire, W., and Rouse, B.T. (1995). Characterization of herpes simplex virus type-1 infection and herpetic stromal keratitis development in IFN-gamma knockout mice. J. Immunol. *155*, 3964–3971.

Bouneaud, C., Garcia, Z., Kourilsky, P., and Pannetier, C. (2005). Lineage relationships, homeostasis, and recall capacities of central- and effector-memory CD8 T cells in vivo. J. Exp. Med. *201*, 579–590.

Bovolenta, C., Driggers, P.H., Marks, M.S., Medin, J.A., Politis, A.D., Vogel, S.N., Levy, D.E., Sakaguchi, K., Appella, E., Coligan, J.E., and Ozato, K. (1994). Molecular interactions between interferon consensus sequence binding protein and members of the interferon regulatory factor family. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 5046–5050.

Brass, A.L., Kehrli, E., Eisenbeis, C.F., Storb, U., and Singh, H. (1996). Pip, a lymphoid-restricted IRF, contains a regulatory domain that is important for autoinhibition and ternary complex formation with the Ets factor PU.1. Genes Dev. *10*, 2335–2347.

Brass, A.L., Zhu, A.Q., and Singh, H. (1999). Assembly requirements of PU.1-Pip (IRF-4) activator complexes: Inhibiting function in vivo using fused dimers. EMBO J. *18*, 977–991.

Brocksted, D.G., Giedlin, M.A., Leong, M.L., Bahjat, K.S., Gao, Y., Luckett, W., Liu, W., Cook, D.N., Portnoy, D.A., and Dubensky, T.W. (2004). Listeria-based cancer vaccines that segregate immunogenicity from toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 13832–13837.

Brooks, D.G., McGavern, D.B., and Oldstone, M.B.A. (2006). Reprogramming of antiviral T cells prevents inactivation and restores T cell activity during persistent viral infection. J. Clin. Invest. *116*, 1675–1685.

Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G., and Siebenlist, U. (1995). Control of IκB-α proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. Science (80-.). *267*, 1485–1488.

Brownlie, R.J., and Zamoyska, R. (2013). T cell receptor signalling networks: Branched, diversified and bounded. Nat. Rev. Immunol. *13*, 257–269.

Buchmeier, M.., Welsh, R.., Dutko, F.., and Oldstone, M.B.. (1980). The Virology and lmmunobiology of Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection. Adv. Immunol. *30*, 275–331.

Buck, M.D., O'Sullivan, D., and Pearce, E.L. (2015). T cell metabolism drives immunity. J. Exp. Med. *212*, 1345–1360.

Buday, L., Egan, S.E., Viciana, P.R., Cantrell, D.A., and Downward, J. (1994). A complex of Grb2 adaptor protein, Sos exchange factor, and a 36-kDa membrane-bound tyrosine phosphoprotein is implicated in Ras activation in T cells. J. Biol. Chem. *269*, 9019–9023.

Cao, W., Henry, M.D., Borrow, P., Yamada, H., Elder, J.H., Ravkov, E. V., Nichol, S.T., Compans, R.W., Campbell, K.P., and Oldstone, M.B.A. (1998). Identification of α-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. Science (80-.). *282*, 2079–2081.

Carrasco, S., and Merida, I. (2004). Diacylclygerol-dependent Binding Recruits PKCtheta and RasGRP1 C1 domains to Specific Subcelullar Localizations in Living T Lymphocytes. Mol. Biol. Cell *15*, 2932–2942.

Carrasco, J., Godelaine, D., Van Pel, A., Boon, T., and Van Der Bruggen, P. (2006). CD45RA on human CD8 T cells is sensitive to the time elapsed since the last antigenic stimulation. Blood *108*, 2897–2905.

Chan, A.C., Iwashima, M., Turck, C.W., and Weiss, A. (1992). ZAP-70: A 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR ζ chain. Cell *71*, 649–662.

Chang, V.T., Fernandes, R.A., Ganzinger, K.A., Lee, S.F., Siebold, C., McColl, J., Jönsson, P., Palayret, M., Harlos, K., Coles, C.H., Jones, E.Y., Lui, Y., Huang, E., Gilbert, R.J.C., Klenerman, D.,

Aricescu, A.R., and Davis, S.J. (2016). Initiation of T cell signaling by CD45 segregation at "close contacts." Nat. Immunol. *17*, 574–582.

Chappert, P., and Schwartz, R.H. (2010). Induction of T cell anergy: Integration of environmental cues and infectious tolerance. Curr. Opin. Immunol. *22*, 552–559.

Che, T., You, Y., Wang, D., Tanner, M.J., Dixit, V.M., and Lin, X. (2004). MALT1/Paracaspase Is a Signaling Component Downstream of CARMA1 and Mediates T Cell Receptor-induced NF-κB Activation. J. Biol. Chem. *279*, 15870–15876.

Chen, Y., Zander, R., Khatun, A., Schauder, D.M., and Cui, W. (2018). Transcriptional and Epigenetic Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation. Front. Immunol. *9*, 1–14.

Chen, Z., Ji, Z., Ngiow, S.F., Manne, S., Cai, Z., Huang, A.C., Johnson, J., Staupe, R.P., Bengsch, B., Xu, C., Yu, S., Kurachi, M., Herati, R.S., Vella, L.A., Baxter, A.E., Wu, J.E., Khan, O., Beltra, J.C., Giles, J.R., Stelekati, E., McLane, L.M., Lau, C.W., Yang, X., Berger, S.L., Vahedi, G., Ji, H., and Wherry, E.J. (2019). TCF-1-Centered Transcriptional Network Drives an Effector versus Exhausted CD8 T Cell-Fate Decision. Immunity *51*, 840-855.e5.

Chen, Z.J., Parent, L., and Maniatis, T. (1996). Site-specific phosphorylation of IκBα by a novel ubiquitination- dependent protein kinase activity. Cell *84*, 853–862.

Chow, L.M.L., Fournel, M., Davidson, D., and Veillette, A. (1993). Negative regulation of T-cell receptor signalling by tyrosine protein kinase p50csk. Nature *365*, 156–160.

Chowdhury, D., and Lieberman, J. (2008). Death by a thousand cuts: Granzyme pathways of programmed cell death. Annu. Rev. Immunol. *26*, 389–420.

Chuang, H.C., Lan, J.L., Chen, D.Y., Yang, C.Y., Chen, Y.M., Li, J.P., Huang, C.Y., Liu, P.E., Wang, X., and Tan, T.H. (2011). The kinase GLK controls autoimmunity and NF-κB signaling by activating the kinase PKC-θ in T cells. Nat. Immunol. *12*, 1113–1118.

Ciofani, M., Madar, A., Galan, C., Sellars, M., MacE, K., Pauli, F., Agarwal, A., Huang, W., Parkurst, C.N., Muratet, M., Newberry, K.M., Meadows, S., Greenfield, A., Yang, Y., Jain, P., Kirigin, F.K., Birchmeier, C., Wagner, E.F., Murphy, K.M., Myers, R.M., Bonneau, R., Littman, D.R. (2012). A validated regulatory network for Th17 cell specification. Cell *151*, 289–303.

Coulie, P.G., Van Den Eynde, B.J., Van Der Bruggen, P., and Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: At the core of cancer immunotherapy. Nat. Rev. Cancer *14*, 135–146.

Cui, W., Liu, Y., Weinstein, J.S., Craft, J., and Kaech, S.M. (2011). An interleukin-21- interleukin-10-STAT3 pathway is critical for functional maturation of memory CD8 + T cells. Immunity *35*, 792–805.

D'Oro, U., and Ashwell, J.D. (1999). Cutting edge: the CD45 tyrosine phosphatase is an inhibitor of Lck activity in thymocytes. J. Immunol. *162*, 1879–1883.

Dammeijer, F., van Gulijk, M., Mulder, E.E., Lukkes, M., Klaase, L., van den Bosch, T., van Nimwegen, M., Lau, S.P., Latupeirissa, K., Schetters, S., van Kooyk, Y., Boon, L., Moyaart, A., Mueller, Y.M., Katsikis, P.D., Eggermont, A.M., Vroman, H., Stadhouders, R., Hendriks, R.W., von der Thüsen, J., Grünhagen, D.J., Verhoef, C., van Hall, T., and Aerts, J.G. (2020). The PD-1/PD-L1-Checkpoint Restrains T cell Immunity in Tumor-Draining Lymph Nodes. Cancer Cell *38*, 685-700.e8.

Danilo, M., Chennupati, V., Silva, J.G., Siegert, S., and Held, W. (2018). Suppression of Tcf1 by Inflammatory Cytokines Facilitates Effector CD8 T Cell Differentiation. Cell Rep. *22*, 2107–2117.

Demotte, N., Stroobant, V., Courtoy, P.J., Van Der Smissen, P., Colau, D., Luescher, I.F., Hivroz, C., Nicaise, J., Squifflet, J.L., Mourad, M., Godelaine, D., Boon, T., and van der Bruggen, P. (2008). Restoring the Association of the T Cell Receptor with CD8 Reverses Anergy in Human Tumor-Infiltrating Lymphocytes. Immunity *28*, 414–424.

Díaz-Flores, E., Siliceo, M., Martínez-A., C., and Mérida, I. (2003). Membrane translocation of protein kinase Cθ during T lymphocyte activation requires phospholipase C-γ-generated diacylglycerol. J. Biol. Chem. *278*, 29208–29215.

Doering, T.A., Crawford, A., Angelosanto, J.M., Paley, M.A., Ziegler, C.G., and Wherry, E.J. (2012). Network Analysis Reveals Centrally Connected Genes and Pathways Involved in CD8+ T Cell Exhaustion versus Memory. Immunity *37*, 1130–1144.

Dong, D., Zheng, L., Lin, J., Zhang, B., Zhu, Y., Li, N., Xie, S., Wang, Y., Gao, N., and Huang, Z. (2019). Structural basis of assembly of the human T cell receptor–CD3 complex. Nature *573*, 546–552.

Dow, C., Oseroff, C., Peters, B., Nance-Sotelo, C., Sidney, J., Buchmeier, M., Sette, A., and Mothé, B.R. (2008). Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection Yields Overlapping CD4 + and CD8 + T-Cell Responses . J. Virol. *82*, 11734–11741.

Dower, N.A., Stang, S.L., Bottorff, D.A., Ebinu, J.O., Dickie, P., Ostergaard, H.L., and Stone, J.C. (2000). RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. Nat. Immunol. *1*, 317–321.

Downward, J., Graves, J.D., Warne, P.H., Rayter, S., and Cantrell, D.A. (1990). Stimulation of p21ras upon T-cell activation. Nature *346*, 719–723.

Durbeej, M., Henry, M.D., Ferletta, M., Campbell, K.P., and Ekblom, P. (1998). Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues. J. Histochem. Cytochem. *46*, 449–457.

Dutko, F.J., and Oldstone, M.B.A. (1983). Genomic and biological variation among commonly used lymphocytic choriomeningitis virus strains. J. Gen. Virol. *64*, 1689–1698.

Ebinu, J.O., Bottorff, D.A., Chan, E.Y.W., Stang, S.L., Dunn, R.J., and Stone, J.C. (1998). RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. Science (80-.). *280*, 1082–1086.

Ebinu, J.O., Stang, S.L., Teixeira, C., Bottorff, D.A., Hooton, J., Blumberg, P.M., Barry, M., Bleakley, R.C., Ostergaard, H.L., and Stone, J.C. (2000). RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. Blood *95*, 3199–3203.

Egan, S.E., Giddings, B.W., Brooks, M.W., Buday, L., Sizeland, A.M., and Weinberg, R.A. (1993). Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. Nature *363*, 45–51.

Eisenbeis, C.F., Singh, H., and Storb, U. (1995). Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator. Genes Dev. *9*, 1377–1387.

Escalante, C.R., Yie, J., Thanos, D., and Aggarwal, A.K. (1998). Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation. Nature *391*, 103–106.

Escalante, C.R., Brass, A.L., Pongubala, J.M.R., Shatova, E., Shen, L., Singh, H., and Aggarwal, A.K. (2002). Crystal structure of PU.1/IRF-4/DNA ternary complex. Mol. Cell *10*, 1097–1105.

Fan, T., Jiang, S., Chung, N., Alikhan, A., Chyi-Chia, C.N., Lee, R., and Hornyak, T.J. (2011). EZH2-dependent suppression of a cellular senescence phenotype in melanoma cells by inhibition of p21/CDKN1A expression. Mol. Cancer Res. *9*, 418–429.

Faris, M., Kokot, N., Lee, L., and Nel, A.E. (1996). Regulation of interleukin-2 transcription by inducible stable expression of dominant negative and dominant active mitogen-activated protein kinase kinase kinase in jurkat T cells: Evidence for the importance of Ras in a pathway that is controlled by dual . J. Biol. Chem. *271*, 27366–27373.

Feske, S., Giltnane, J., Dolmetsch, R., Staudt, L.M., and Rao, A. (2001). Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. Nat. Immunol. *2*, 316–324.

Finco, T.S., Kadlecek, T., Zhang, W., Samelson, L.E., and Weiss, A. (1998). LAT is required for TCR-mediated activation of PLCγ1 and the Ras pathway. Immunity *9*, 617–626.

Finke, D., Brinckmann, U.G., ter Meulen, V., and Liebert, U.G. (1995). Gamma interferon is a major mediator of antiviral defense in experimental measles virus-induced encephalitis. J. Virol. *69*, 5469–5474.

Fourcade, J., Sun, Z., Benallaoua, M., Guillaume, P., Luescher, I.F., Sander, C., Kirkwood, J.M., Kuchroo, V., and Zarour, H.M. (2010). Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with

tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. J. Exp. Med. *207*, 2175–2186.

Fourcade, J., Sun, Z., Pagliano, O., Guillaume, P., Luescher, I.F., Sander, C., Kirkwood, J.M., Olive, D., Kuchroo, V., and Zarour, H.M. (2012). CD8 + T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1. Cancer Res. *72*, 887–896.

Frebel, H., Nindl, V., Schuepbach, R.A., Braunschweiler, T., Richter, K., Vogel, J., Wagner, C.A., Loffing-Cueni, D., Kurrer, M., Ludewig, B., and Oxenius, A. (2012). Programmed death 1 protects from fatal circulatory failure during systemic virus infection of mice. J. Exp. Med. *209*, 2485–2499.

Fuller, M.J., and Zajac, A.J. (2003). Ablation of CD8 and CD4 T Cell Responses by High Viral Loads. J. Immunol. *170*, 477–486.

Gaide, O., Favier, B., Legler, D.F., Bonnet, D., Brissoni, B., Valitutti, S., Bron, C., Tschopp, J., and Thome, M. (2002). CARMAI is a critical lipid raft-associated regulator of TCR-induced NF-kB activation. Nat. Immunol. *3*, 836–843.

Gairin, J.E., Mazarguil, H., Hudrisier, D., and Oldstone, M.B. (1995). Optimal lymphocytic choriomeningitis virus sequences restricted by H-2Db major histocompatibility complex class I molecules and presented to cytotoxic T lymphocytes. J. Virol. *69*, 2297–2305.

Gallimore, B.A., Glithero, A., Godkin, A., Tissot, A.C., Plückthun, A., Elliott, T., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. (1998). Induction and Exhaustion of Lymphocytic Choriomeningitis Virus – specific Cytotoxic T Lymphocytes Visualized Using Class I – Peptide Complexes. J. Exp. Med. *187*, 1383–1393.

Garcia-Cozar, F.J., Okamura, H., Aramburu, J.F., Shaw, K.T.Y., Pelletier, L., Showalter, R., Villafranca, E., and Rao, A. (1998). Two-site interaction of nuclear factor of activated T cells with activated calcineurin. J. Biol. Chem. *273*, 23877–23883.

Garcia, C.K., Scott, C.A., Brunmark, A., Carbone, F.R., Peterson, P.A., Wilson, I.A., and Teyton, L. (1996). CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecules complexes. Nature *384*, 356–358.

Gaud, G., Lesourne, R., and Love, P.E. (2018). Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. Nat. Rev. Immunol. *18*, 485–497.

Gerlach, C., Moseman, E.A., Loughhead, S.M., Alvarez, D., Zwijnenburg, A.J., Waanders, L., Garg, R., de la Torre, J.C., and von Andrian, U.H. (2016). The Chemokine Receptor CX3CR1 Defines Three Antigen-Experienced CD8 T Cell Subsets with Distinct Roles in Immune Surveillance and Homeostasis. Immunity *45*, 1270–1284.

Ghoneim, H.E., Fan, Y., Moustaki, A., Abdelsamed, H.A., Dash, P., Dogra, P., Carter, R., Awad, W., Neale, G., Thomas, P.G., and Youngblood, B. (2017). De Novo Epigenetic Programs Inhibit PD-1 Blockade-Mediated T Cell Rejuvenation. Cell *170*, 142-157.e19.

Gille, H., Kortenjann, M., Thomae, O., Moomaw, C., Slaughter, C., Cobb, M.H., and Shaw, P.E. (1995). ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. EMBO J. *14*, 951–962.

Giordano, M., Roncagalli, R., Bourdely, P., Chasson, L., Buferne, M., Yamasaki, S., Beyaert, R., Van Loo, G., Auphan-Anezin, N., Schmitt-Verhulst, A.M., and Verdeil, G. (2014). The tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20) imposes a brake on antitumor activity of CD8 T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, 11115–11120.

Glasmacher, E., Agrawal, S., Chang, A.B., Murphy, T.L., Zeng, W., Vander Lugt, B., Khan, A.A., Ciofani, M., Spooner, C., Rutz, S., Hackney, J., Nurieva, R., Escalante, C.R., Ouyang, W., Littman, D.R., Murphy, K.M., and Singh, H. (2012). A genomic regulatory element that directs assembly and function of immune-specific AP-1-IRF compelxes. Science (80-.). *338*, 975–980.

Griffiths, G.M. (1997). Protein sorting and secretion during CTL killing. Semin. Immunol. *9*, 109–115.

Grumont, R.J., and Gerondakis, S. (2000). Rel induces interferon regulatory factor 4 (IRF-4)

expression in lymphocytes: Modulation of interferon-regulated gene expression by Rel/nuclear factor κB. J. Exp. Med. *191*, 1281–1291.

Grumont, R., Lock, P., Mollinari, M., Shannon, F.M., Moore, A., and Gerondakis, S. (2004). The mitogen-induced increase in T cell size involves PKC and NFAT activation of Rel/NF-κB-dependent c-myc expression. Immunity *21*, 19–30.

Grusdat, M., McIlwain, D.R., Xu, H.C., Pozdeev, V.I., Knievel, J., Crome, S.Q., Robert-Tissot, C., Dress, R.J., Pandyra, A.A., Speiser, D.E., Lang, E., Maney, S.K., Elford, A.R., Hamilton, S.R., Scheu, S., Pfeffer, K., Bode, J., Mittrücker, H.W, Lohoff, M., Huber, M., Häussinger, D., Ohashi, PS., Mak, T.W., Lang, K.S., Lang, P.A. (2014). IRF4 and BATF are critical for CD8+ T-cell function following infection with LCMV. Cell Death Differ. *21*, 1050–1060.

Guidotti, L.G., Ishikawa, T., Hobbs, M., Matzke, B., Schreiber, R., and Chisari, F. (1996). Intracellular Inactivation of the Hepatitis B Virus by Cytotoxic T Lymphocytes. Immunity *4*, 25–36.

Guo, X., Zhang, Y., Zheng, L., Zheng, C., Song, J., Zhang, Q., Kang, B., Liu, Z., Jin, L., Xing, R., Gao, R., Zhang, L., Dong, M., Hu, X., Ren, X., Kirchhoff, D., Roider, H.G., Yan, T., Zhang, Z. (2018). Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing. Nat. Med. *24*, 978–985.

Harberts, A., Schmidt, C., Schmid, J., Reimers, D., Koch-Nolte, F., Mittrücker, H.W., and Raczkowski, F. (2021). Interferon regulatory factor 4 controls effector functions of CD8+ memory T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *118*.

Harty, J.T., Tvinnereim, A.R., and White, D.W. (2000). CD8+ T Cell Effector Mechanisms in Resistance to Infection. Annu. Rev. Immunol. *18*, 275–308.

Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008). Shared Principles in NF-κB Signaling. Cell *132*, 344–362.

He, R., Hou, S., Liu, C., Zhang, A., Bai, Q., Han, M., Yang, Y., Wei, G., Shen, T., Yang, X., et al. (2016). Follicular CXCR5-expressing CD8+ T cells curtail chronic viral infection. Nature *537*, 412–416.

Henkel, T., Machleidt, T., Alkalay, I., Krönke, M., Ben-Neriah, Y., and Baeuerle, P.A. (1993). Rapid proteolysis of IκB-α is necessary for activation of transcription factor NF-κB. Nature *365*, 182–185.

Hensel, N., Gu, Z., Sagar, Wieland, D., Jechow, K., Kemming, J., Llewellyn-Lacey, S., Gostick, E., Sogukpinar, O., Emmerich, F., Price, D.A., Bengsch, B., Boettler, T., Neumann-Haefelin, C., Eils, R., Conrad, C., Bartenschlager, R., Grün, D., Ishaque, N., Thimme, R., and Hofmann, M. (2021). Memory-like HCV-specific CD8+ T cells retain a molecular scar after cure of chronic HCV infection. Nat. Immunol. *22*, 229–239.

Herndler-Brandstetter, D., Ishigame, H., Shinnakasu, R., Plajer, V., Stecher, C., Zhao, J., Lietzenmayer, M., Kroehling, L., Takumi, A., Kometani, K., Inoue, T., Kluger, Y., Kaech, S.M., Kurosaki, T., Okada, T., and Flavell, R.A. (2018). KLRG1+ Effector CD8+ T Cells Lose KLRG1, Differentiate into All Memory T Cell Lineages, and Convey Enhanced Protective Immunity. Immunity *48*, 716-729.e8.

Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., and Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. Genes Dev. *7*, 2135–2148.

Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M.L., and Baltimore, D. (2002). The IκB-NF-κB signaling module: Temporal control and selective gene activation. Science (80-.). *298*, 1241–1245.

Hoffmann, A., Natoli, G., and Ghosh, G. (2006). Transcriptional regulation via the NF-κB signaling module. Oncogene *25*, 6706–6716.

Honma, K., Udono, H., Kohno, T., Yamamoto, K., Ogawa, A., Takemori, T., Kumatori, A., Suzuki, S., Matsuyama, T., and Yui, K. (2005). Interferon regulatory factor 4 negatively regulates the production of proinflammatory cytokines by macropages in response to LPS. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 16001–16006.

Hotchin JE, and Cinits M (1958). Lymphocytic choriomeningitis infection of mice as a model for the study of latent virus infection. Can. J. Microbiol. *4*, 149–163.

Hrvatin, S., Deng, F., O'Donnell, C.W., Gifford, D.K., and Melton, D.A. (2014). MARIS: Method for analyzing RNA following intracellular sorting. PLoS One *9*, 1–6.

Hu, C.M., Jang, S.Y., Fanzo, J.C., and Pernis, A.B. (2002). Modulation of T cell cytokine production by interferon regulatory factor-4. J. Biol. Chem. *277*, 49238–49246.

Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Karin, M., and Johnson, R. (1999). Abnormal Morphogenesis but Intact IKK Activation in Mice Lacking the IKKα Subunit of IκB Kinase. Science (80-.). *284*, 316–320.

Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilček, J., Zinkernagel, R.M., and Aguet, M. (1993). Immune response in mice that lack the interferon-γ receptor. Science (80-.). *259*, 1742–1745.

Huang, T.T., Kudo, N., Yoshida, M., and Miyamoto, S. (2000). A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IκBα controls cytoplasmic localization of inactive NF-κB/IκBα complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 1014–1019.

Huber, M., and Lohoff, M. (2014). IRF4 at the crossroads of effector T-cell fate decision. Eur. J. Immunol. *44*, 1886–1895.

Hudson, W.H., Gensheimer, J., Hashimoto, M., Wieland, A., Valanparambil, R.M., Li, P., Lin, J.X., Konieczny, B.T., Im, S.J., Freeman, G.J., Leonard, W.J., Kissick, H.T., and Ahmed, R. (2019). Proliferating Transitory T Cells with an Effector-like Transcriptional Signature Emerge from PD-1+ Stem-like CD8+ T Cells during Chronic Infection. Immunity *51*, 1043-1058.e4.

Hui, E., Cheung, J., Zhu, J., Su, X., Taylor, M.J., Wallweber, H.A., Sasmal, D.K., Huang, J., Kim, J.M., Mellman, I., and Vale, R.D. (2017). T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. Science (80-.). *355*, 1428–1433.

Ichii, H., Sakamoto, A., Kuroda, Y., and Tokuhisa, T. (2004). Bcl6 Acts as an Amplifier for the Generation and Proliferative Capacity of Central Memory CD8 + T Cells . J. Immunol. *173*, 883–891.

Im, S.J., Hashimoto, M., Gerner, M.Y., Lee, J., Kissick, H.T., Burger, M.C., Shan, Q., Hale, J.S., Lee, J., Nasti, T.H., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., Germain, R.N., Nakaya, H.I., Xue, H-H., and Ahmed, R. (2016). Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. Nature *537*, 417–421.

Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Wherry, E.J., Longworth, S.A., Northrup, J.T., Palanivel, V.R., Mullen, A.C., Gasink, C.R., Kaech, S.M., Miller, J.D., Gapin, L., Ryan, K., Russ, A.P., Lindsten, T., Orange, J.S., Goldrath, A.W., Ahmed, R., Reiner, S.L. (2005). Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. Nat. Immunol. *6*, 1236–1244.

Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Takemoto, N., Gordon, S.M., DeJong, C.S., Shin, H., Hunter, C.A., Wherry, E.J., Lindsten, T., and Reiner, S.L. (2008). Anomalous type 17 response to viral infection by CD8+ T cells lacking T-bet and eomesodermin. Science (80-.). *321*, 408–411.

Isaaz, S., Baetz, K., Olsen, K., Podack, E., and Griffiths, G.M. (1995). Serial killing by cytotoxic T lymphocytes: T cell receptor triggers degranulation, re-filling of the lytic granules and secretion of lytic proteins via a non-granule pathway. Eur. J. Immunol. *25*, 1071–1079.

Iwashima, M., Irving, B.A., Oers, N.S.C. Van, Chan, A.C., and Weissf, A. (1994). Sequential Interactions of the TCR with Two Distinct Cytoplasmic Tyrosine Kinases. Science (80-.). *263*, 1136–1139.

Iwata, A., Durai, V., Tussiwand, R., Briseño, C.G., Wu, X., Grajales-Reyes, G.E., Egawa, T., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2017). Quality of TCR signaling determined by differential affinities of enhancers for the composite BATF-IRF4 transcription factor complex. Nat. Immunol. *18*, 563–572.

Jain, J., McCaffrey, P.G., Valge-Archer, V.E., and Rao, A. (1992). Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. Nature *356*, 801–804.

James, J.R., and Vale, R.D. (2012). Biophysical mechanism of T-cell receptor triggering in a reconstituted system. Nature *487*, 64–69.

Jansen, C.S., Prokhnevska, N., Master, V.A., Sanda, M.G., Carlisle, J.W., Bilen, M.A., Cardenas, M., Wilkinson, S., Lake, R., Sowalsky, A.G., Valanparambil, R.M., Hudson, W.H., McGuire, D., Melnick, K., Khan, A.I., Kim, K., Chang, Y.M., Kim, A., Filson, C.P., Alemozaffar, M., Osunkoya, A.O., Mullane, P., Ellis, C., Akondy, R., Im, S.J., Kamphorst, A.O., Reyes, A., Liu, Y., and Kissick, H. (2019). An intra-tumoral niche maintains and differentiates stem-like CD8 T cells. Nature *576*, 465–470.

Jeannet, G., Boudousquié, C., Gardiol, N., Kang, J., Huelsken, J., and Held, W. (2010). Essential role of the Wnt pathway effector Tcf-1 for the establishment of functional CD8 T cell memory. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 9777–9782.

Jin, H.T., Anderson, A.C., Tan, W.G., West, E.E., Ha, S.J., Araki, K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., and Ahmed, R. (2010). Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 14733–14738.

Johnson, C., Van Antwerp, D., and J.Hope, T. (1999). An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of Ikappa Balpha. EMBO J. *18*, 6682–6693.

Joshi, N.S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H.K., Urso, D.R., Hagman, J., Gapin, L., and Kaech, S.M. (2007). Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8+ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. Immunity *27*, 281–295.

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

Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K.J., Podack, E.R., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1994). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. Nature *369*, 31–37.

Kallies, A., Xin, A., Belz, G.T., and Nutt, S.L. (2009). Blimp-1 Transcription Factor Is Required for the Differentiation of Effector CD8+ T Cells and Memory Responses. Immunity *31*, 283–295.

Kallies, A., Zehn, D., and Utzschneider, D.T. (2020). Precursor exhausted T cells: key to successful immunotherapy? Nat. Rev. Immunol. *20*, 128–136.

Kent, L.N., and Leone, G. (2019). The broken cycle: E2F dysfunction in cancer. Nat. Rev. Cancer *19*, 326–338.

Khan, O., Giles, J.R., McDonald, S., Manne, S., Ngiow, S.F., Patel, K.P., Werner, M.T., Huang, A.C., Alexander, K.A., Wu, J.E., Attanasio, J., Yan, P., George, S.M., Bengsch, B., Staupe, R.P., Donahue, G., Xu, W., Amaravadi, R.K., Xu, X., Karakousis, G.C., Mitchell, T.C., Schuchter, L.M., Kaye, J., Berger, S.L., and Wherry, E.J. (2019). TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion. Nature *571*, 211–218.

Kim, C.G., Jang, M., Kim, Y., Leem, G., Kim, K.H., Lee, H., Kim, T.S., Choi, S.J., Kim, H.D., Han, J.W., Kwon, M., Kim, J.H., Lee, A.J., Nam, S.K., Bae, S-J., Lee, S.B., Shin, S.J., Park, S.H., Ahn, J.B., Jung, I., Lee, K.Y., Park, S-H., Kim, H., Min, B.S, and Shin, E-C. (2019a). VEGF-A drives TOX-dependent T cell exhaustion in anti-PD-1-resistant microsatellite stable colorectal cancers. Sci. Immunol. *4*, 1–18.

Kim, D., Paggi, J.M., Park, C., Bennett, C., and Salzberg, S.L. (2019b). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. Nat. Biotechnol. *37*, 907–915.

Kurachi, M., Barnitz, R.A., Yosef, N., Odorizzi, P.M., Diiorio, M.A., Lemieux, M.E., Yates, K., Godec, J., Klatt, M.G., Regev, A., Wherry, E.J., and Haining, W.N. (2014). The transcription factor BATF operates as an essential differentiation checkpoint in early effector CD8 + T cells. Nat. Immunol. *15*, 373–383.

Kwon, H., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Kim, H.P., Oh, J., Tunyaplin, C., Carotta, S., Donovan, C.E., Goldman, M.L., Tailor, P., Ozato, K., Levy, D.E., Nutt, S.L., Calame, K., and Leonard,

W.J. (2009). Analysis of Interleukin-21-Induced Prdm1 Gene Regulation Reveals Functional Cooperation of STAT3 and IRF4 Transcription Factors. Immunity *31*, 941–952.

De La Roche, M., Asano, Y., and Griffiths, G.M. (2016). Origins of the cytolytic synapse. Nat. Rev. Immunol. *16*, 421–432.

Lawrence, T., Bebien, M., Liu, G.Y., Nizet, V., and Karin, M. (2005). IKKα limits macrophage NF-κB activation and contributes to the resolution of inflammation. Nature *434*, 1138–1143.

Lee, C.G., Kang, K.H., So, J.S., Kwon, H.K., Son, J.S., Song, M.K., Sahoo, A., Yi, H.J., Hwang, K.C., Matsuyama, T., Yui, K., and Im, S-H. (2009). A distal cis-regulatory element, CNS-9, controls NFAT1 and IRF4-mediated IL-10 gene activation in T helper cells. Mol. Immunol. *46*, 613–621.

Lee, K.Y., D'Acquisto, F., Hayden, M.S., Shim, J.H., and Ghosh, S. (2005). PDK1 nucleates T cell receptor-induced signaling complex for NF-κB activation. Science (80-.). *308*, 114–118.

van Leeuwen, E.M., Gamadia, L.E., Baars, P.A., Remmerswaal, E.B., ten Berge, I.J., and van Lier, R.A. (2002). Proliferation Requirements of Cytomegalovirus-Specific, Effector-Type Human CD8 + T Cells . J. Immunol. *169*, 5838–5843.

Leitner, J., Kuschei, W., Grabmeier-Pfistershammer, K., Woitek, R., Kriehuber, E., Majdic, O., Zlabinger, G., Pickl, W.F., and Steinberger, P. (2010). T cell stimulator cells, an efficient and versatile cellular system to assess the role of costimulatory ligands in the activation of human T cells. J. Immunol. Methods *362*, 131–141.

Leonardo, M., Lo, B., and Lucas, C.L. (2016). Genomics of immune diseaes and new therapies. Annu. Rev. Immunol. *34*, 121–149.

Li, H., van der Leun, A.M., Yofe, I., Lubling, Y., Gelbard-Solodkin, D., van Akkooi, A.C.J., van den Braber, M., Rozeman, E.A., Haanen, J.B.A.G., Blank, C.U., Horlings, H.M., David, E., Baran, Y., Bercovich, A., Lifshitz, A., Schumacher, T.N., Tanay, A., and Amit, I. (2019). Dysfunctional CD8 T Cells Form a Proliferative, Dynamically Regulated Compartment within Human Melanoma. Cell *176*, 775-789.e18.

Li, P., Spolski, R., Liao, W., Wang, L., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Leonard, W.J. (2012). BATF-JUN is critical for IRF4-mediated transcription in T cells. Nature *490*, 543–546.

Li, Z.W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999). The IKKβ subunit of IκB kinase (IKK) is essential for nuclear factor κB activation and prevention of apoptosis. J. Exp. Med. *189*, 1839–1845.

Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014). FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. Bioinformatics *30*, 923–930.

Liberzon, A., Birger, C., Thorvaldsdóttir, H., Ghandi, M., Mesirov, J.P., and Tamayo, P. (2015). The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. Cell Syst. *1*, 417–425.

Lim, W.A., and June, C.H. (2017). The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. Cell *168*, 724–740.

Lin, A., Minden, A., Martinetto, H., Claret, F.X., Lange-Carter, C., Mercurio, F., Johnson, G.L., and Karin, M. (1995). Identification of a dual specificity kinase that activates the jun kinases and p38-Mpk2. Science (80-.). *268*, 286–290.

Liu, B., Hu, X., Feng, K., Gao, R., Xue, Z., Zhang, S., Zhang, Y., Corse, E., Hu, Y., Han, W. and Zhang, Z. (2022). Temporal single-cell tracing reveals clonal revival and expansion of precursor exhausted T cells during anti-PD-1 therapy in lung cancer.

Liu, K.Q., Bunnell, S.C., Gurniak, C.B., and Berg, L.J. (1998). T cell receptor-initiated calcium release is uncoupled from capacitative calcium entry in Itk-deficient T cells. J. Exp. Med. *187*, 1721–1727.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol. *15*, 1–21.

Lu, B., Ebensperger, C., Dembic, Z., Wang, Y., Kvatyuk, M., Lu, T., Coffman, R.L., Pestka, S., and Rothman, P.B. (1998). Targeted disruption of the interferon-γ receptor 2 gene results in severe immune defects in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 8233–8238.

Lu, P., Youngblood, B.A., Austin, J.J., Mohammed, A.U.R., Butler, R., Ahmed, R., and Boss, J.M. (2014). Blimp-1 represses CD8 T cell expression of PD-1 using a feed-forward transcriptional circuit during acute viral infection. J. Exp. Med. *211*, 515–527.

Luo, C., Shaw, K.T., Raghavant, A., Aramburu, J., Cozar, F.G., Perrinoii, B.A., Hogan, P.G., and Rao, A. (1996). Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 8907–8912.

Lynn, R.C., Weber, E.W., Sotillo, E., Gennert, D., Xu, P., Good, Z., Anbunathan, H., Lattin, J., Jones, R., Tieu, V., Nagaraja, S., Granja, J., de Bourcy, C.F.A., Majzner, R., Satpathy, A.T., Quake, S.R., Monje, M., Chang, H.Y., and Mackall, C.L. (2019). c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance. Nature *576*, 293–300.

Macian, F. (2005). NFAT proteins: Key regulators of T-cell development and function. Nat. Rev. Immunol. *5*, 472–484.

Macián, F., López-Rodríguez, C., and Rao, A. (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. Oncogene *20*, 2476–2489.

Macián, F., García-Cózar, F., Im, S.H., Horton, H.F., Byrne, M.C., and Rao, A. (2002). Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. Cell *109*, 719–731.

Mahuron, K.M., Moreau, J.M., Glasgow, J.E., Boda, D.P., Pauli, M.L., Gouirand, V., Panjabi, L., Grewal, R., Luber, J.M., Mathur, A.N., et al. (2020). Layilin augments integrin activation to promote antitumor immunity. J. Exp. Med. *217*.

Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. Nat. Rev. Cancer *1*, 222–231.

Man, K., Miasari, M., Shi, W., Xin, A., Henstridge, D.C., Preston, S., Pellegrini, M., Belz, G.T., Smyth, G.K., Febbraio, M.A., Nutt, S.L., and Kallies, A. (2013). The transcription factor IRF4 is essential for TCR affinity-mediated metabolic programming and clonal expansion of T cells. Nat. Immunol. *14*, 1155–1165.

Man, K., Gabriel, S.S., Liao, Y., Gloury, R., Preston, S., Henstridge, D.C., Pellegrini, M., Zehn, D., Berberich-Siebelt, F., Febbraio, M.A., Shi, W., and Kallies, A. (2017). Transcription Factor IRF4 Promotes CD8+ T Cell Exhaustion and Limits the Development of Memory-like T Cells during Chronic Infection. Immunity *47*, 1129-1141.e5.

Marais, R., Wynne, J., and Treisman, R. (1993). The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. Cell *73*, 381–393.

Mariuzza, R.A., Agnihotri, P., and Orban, J. (2020). The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma. J. Biol. Chem. *295*, 914–925.

Martinez, G.J., Pereira, R.M., Äijö, T., Kim, E.Y., Marangoni, F., Pipkin, M.E., Togher, S., Heissmeyer, V., Zhang, Y.C., Crotty, S., Lamperti, E.D., Ansel, K.M., Mempel, T.R., Lähdesmäki, H., Hogan, P.G., and Rao, A. (2015). The Transcription Factor NFAT Promotes Exhaustion of Activated CD8+ T Cells. Immunity *42*, 265–278.

Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L., and Lefrançois, L. (2001). Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. Science (80-.). *291*, 2413–2417.

Matloubian, M., Kolhekar, S.R., Somasundaram, T., and Ahmed, R. (1993). Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. J. Virol. *67*, 7340–7349.

Matsumoto, R., Wang, D., Blonska, M., Li, H., Kobayashi, M., Pappu, B., Chen, Y., Wang, D., and Lin, X. (2005). Phosphorylation of CARMA1 plays a critical role in T cell receptor-mediated NF-κB activation. Immunity *23*, 575–585.

Matsuyama, T., Grossman, A., Mittrücker, H. willi, Siderovski, D.P., Kiefer, F., Kawakami, T., Richardson, C.D., Taniguchi, T., Yoshinaga, S.K., and Mak, T.W. (1995). Molecular cloning of LSIRF, a lymphoid-specific member of the interferon regulatory factor family that binds the interferon-stimulated response element (ISRE). Nucleic Acids Res. *23*, 2127–2136.

Matsuzaki, J., Gnjatic, S., Mhawech-Fauceglia, P., Beck, A., Miller, A., Tsuji, T., Eppolito, C., Qian, F., Lele, S., Shrikant, P., Old, L.J., and Odunsi, K. (2010). Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 7875–7880.

McElroy, A.K., Akondy, R.S., Davis, C.W., Ellebedy, A.H., Mehta, A.K., Kraft, C.S., Lyon, G.M., Ribner, B.S., Varkey, J., Sidney, J., Sette, A., Campbell, S., Ströher, U., Damon, I., Nichol, S.T., Spiropoulou, C.F., and Ahmed, R. (2015). Human Ebola virus infection results in substantial immune activation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, 4719–4724.

McLane, L.M., Abdel-Hakeem, M.S., and Wherry, E.J. (2019). CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. Annu. Rev. Immunol. *37*, 457–495.

McNeill, L., Salmond, R.J., Cooper, J.C., Carret, C.K., Cassady-Cain, R.L., Roche-Molina, M., Tandon, P., Holmes, N., and Alexander, D.R. (2007). The Differential Regulation of Lck Kinase Phosphorylation Sites by CD45 Is Critical for T Cell Receptor Signaling Responses. Immunity *27*, 425–437.

Meininger, I., and Krappmann, D. (2016). Lymphocyte signaling and activation by the CARMA1-BCL10-MALT1 signalosome. Biol. Chem. *397*, 1315–1333.

Miller, B.C., Sen, D.R., Al Abosy, R., Bi, K., Virkud, Y. V., LaFleur, M.W., Yates, K.B., Lako, A., Felt, K., Naik, G.S., Manos, M., Gjini, E., Kuchroo, J.R., Ishizuka, J.J., Collier, J.L., Griffin, G.K., Maleri, S., Comstock, D.E., Weiss, S.A., Brown, F.D., Panda, A., Zimmer, M.D., Manguso, R.T., Hodi, F.S., Rodig, S.J., Sharpe, A.H., and Haining, W.N. (2019). Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. Nat. Immunol. *20*, 326–336.

Miller, I., Min, M., Yang, C., Tian, C., Gookin, S., Carter, D., and Spencer, S.L. (2018). Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. Cell Rep. *24*, 1105-1112.e5.

Miller, J.D., van der Most, R.G., Akondy, R.S., Glidewell, J.T., Albott, S., Masopust, D., Murali-Krishna, K., Mahar, P.L., Edupuganti, S., Lalor, S., Germon, S., Del Rio, C., Mulligan, M.J., Staprans, S.I., Altman, J.D., Feinberg, M.B., and Ahmed, R. (2008). Human Effector and Memory CD8+ T Cell Responses to Smallpox and Yellow Fever Vaccines. Immunity *28*, 710–722.

Minden, A., Lin, A., McMahon, M., Lange-Carter, C., Dérijard, B., Davis, R.J., Johnson, G.L., and Karin, M. (1994). Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. Science (80-.). *266*, 1719–1723.

Monks, C.R.F., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A., and Kupfer, A. (1997). Selective modulation of protein kinase C-θ during T-cell activation. Nature *385*, 83–86.

Monticelli, S., and Rao, A. (2002). NFAT1 and NFAT2 are positive regulators of IL-4 gene transcription. Eur. J. Immunol. *32*, 2971–2978.

Moskophidis, D., Lechner, F., Pircher, H., and Rolf M., Z. (1993). Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral effector T cells. Nat. Lett. *362*, 758–761.

Mueller, S.N., Matloubian, M., Clemens, D.M., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., Gangappa, S., Larsen, C.P., and Ahmed, R. (2007). Viral targeting of fibroblastic reticular cells contributes to immunosuppression and persistence during chronic infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 15430–15435.

Mueller, S.N., Vanguri, V.K., Ha, S.J., West, E.E., Keir, M.E., Glickman, J.N., Sharpe, A.H., and Ahmed, R. (2010). PD-L1 has distinct functions in hematopoietic and nonhematopoietic cells in regulating T cell responses during chronic infection in mice. J. Clin. Invest. *120*, 2508–2515.

Mueller, S.N., Gebhardt, T., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2013). Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. Annu. Rev. Immunol. *31*, 137–161.

Müller, M.R., and Rao, A. (2010). NFAT, immunity and cancer: A transcription factor comes of age. Nat. Rev. Immunol. *10*, 645–656.

Murali-Krishna, K., Altman, J.D., Suresh, M., Sourdive, D.J.D., Zajac, A.J., Miller, J.D., Slansky, J., and Ahmed, R. (1998). Counting antigen-specific CD8 T cells: A reevaluation of bystander activation during viral infection. Immunity *8*, 177–187.

Mustelin, T., Coggeshall, K.M., and Altman, A. (1989). Rapid activation of the T-cell tyrosine protein kinase pp56(lck) by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *86*, 6302–6306.

Nakane, A., Minagawa, T., and Kato, K. (1988). Endogenous tumor necrosis factor (cachetin) is essential to host resistance against Listeria monocytogenes infection. Infect. Immun. *56*, 2563–2569.

Natoli, G., Saccani, S., Bosisio, D., and Marazzi, I. (2005). Interactions of NF-κB with chromatin: The art of being at the right place at the right time. Nat. Immunol. *6*, 439–445.

Nayar, R., Enos, M., Prince, A., Shin, H.M., Hemmers, S., Jiang, J.K., Klein, U., Thomas, C.J., and Berg, L.J. (2012). TCR signaling via Tec kinase ITK and interferon regulatory factor 4 (IRF4) regulates CD8+ T-cell differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*.

Nayar, R., Schutten, E., Bautista, B., Daniels, K., Prince, A.L., Enos, M., Brehm, M.A., Swain, S.L., Welsh, R.M., and Berg, L.J. (2014). Graded Levels of IRF4 Regulate CD8 + T Cell Differentiation and Expansion, but Not Attrition, in Response to Acute Virus Infection . J. Immunol. *192*, 5881–5893.

Ndhlovu, Z.M., Kamya, P., Mewalal, N., Kløverpris, H.N., Nkosi, T., Pretorius, K., Laher, F., Ogunshola, F., Chopera, D., Shekhar, K., Ghebremichael, M., Ismail, N., Moodley, A., Malik, A., Leslie, A., Goulder, P.J.R., Buus, S., Chakraborty, A., Dong, K., Ndung'u, T., and Walker, B.D. (2015). Magnitude and Kinetics of CD8+ T Cell Activation during Hyperacute HIV Infection Impact Viral Set Point. Immunity *43*, 591–604.

Nika, K., Soldani, C., Salek, M., Paster, W., Gray, A., Etzensperger, R., Fugger, L., Polzella, P., Cerundolo, V., Dushek, O., Höfer, T., Viola, A., and Acuto, O. (2010). Constitutively active lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. Immunity *32*, 766–777.

Norment, A.M., Salter, R.D., Parham, P., Engelhard, V.H., and Littman, D.R. (1998). Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. Nature *336*, 79–81.

Ochiai, K., Maienschein-Cline, M., Simonetti, G., Chen, J., Rosenthal, R., Brink, R., Chong, A.S., Klein, U., Dinner, A.R., Singh, H., and Sciammas, R. (2013). Transcriptional Regulation of Germinal Center B and Plasma Cell Fates by Dynamical Control of IRF4. Immunity *38*, 918–929.

Odorizzi, P.M., Pauken, K.E., Paley, M.A., Sharpe, A., and John Wherry, E. (2015). Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8+ T cells. J. Exp. Med. *212*, 1125–1137.

Oestreich, K.J., Yoon, H., Ahmed, R., and Boss, J.M. (2008). NFATc1 Regulates PD-1 Expression upon T Cell Activation. J. Immunol. *181*, 4832–4839.

Okamura, H., Aramburu, J., García-Rodríguez, C., Viola, J.P.B., Raghavan, A., Tahiliani, M., Zhang, X., Qin, J., Hogan, P.G., and Rao, A. (2000). Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. Mol. Cell *6*, 539–550.

Okamura, H., Garcia-Rodriguez, C., Martinson, H., Qin, J., Virshup, D.M., and Rao, A. (2004). A Conserved Docking Motif for CK1 Binding Controls the Nuclear Localization of NFAT1. Mol. Cell. Biol. *24*, 4184–4195.

Okazaki, T., Chikuma, S., Iwai, Y., Fagarasan, S., and Honjo, T. (2013). A rheostat for immune responses: The unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. Nat. Immunol. *14*, 1212–1218.

Ostergaard, H.L., Shackelford, D.A., Hurley, T.R., Johnson, P., Hyman, R., Sefton, B.M., and Trowbridge, I.S. (1989). Expression of CD45 alters phosphorylation of the lck-encoded tyrosine protein kinase in murine lymphoma T-cell lines. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *86*, 8959–8963.

Page, N., Klimek, B., De Roo, M., Steinbach, K., Soldati, H., Lemeille, S., Wagner, I., Kreutzfeldt, M., Di Liberto, G., Vincenti, I., Lingner, T., Salinas, G., Brück, W., Simons, M., Murr, R., Kaye, J., Zehn, D., Pinschewer, D.D., and Merkler, D. (2018). Expression of the DNA-Binding Factor TOX Promotes the Encephalitogenic Potential of Microbe-Induced Autoreactive CD8+ T Cells. Immunity *48*, 937-950.e8.

Paley, M.A., Kroy, D.C., Odorizzi, P.M., Johnnidis, J.B., Dolfi, D. V., Barnett, B.E., Bikoff, E.K., Robertson, E.J., Lauer, G.M., Reiner, S.L., and Wherry, E.J. (2012). Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. Science (80-.). *338*, 1220–1225.

Paley, M.A., Gordon, S.M., Bikoff, E.K., Robertson, E.J., Wherry, E.J., and Reiner, S.L. (2013). Technical Advance: Fluorescent reporter reveals insights into eomesodermin biology in cytotoxic lymphocytes. J. Leukoc. Biol. *93*, 307–315.

Park, S.G., Schulze-Luehrman, J., Hayden, M.S., Hashimoto, N., Ogawa, W., Kasuga, M., and Ghosh, S. (2009). The kinase PDK1 integrates T cell antigen receptor and CD28 coreceptor signaling to induce NF-κB and activate T cells. Nat. Immunol. *10*, 158–166.

Pauken, K.E., Sammons, M.A., Odorizzi, P.M., Manne, S., Godec, J., Khan, O., Drake, A.M., Chen, Z., Sen, D.R., Kurachi, M., Barnitz, A., Bartman, C., Bengsch, B., Huang, A.C., Schenkel, J.M., Vahedi, G., Haining, W.N., Berger, S.L., and Wherry, E.J. (2016). Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. Science (80-.). *354*, 1160–1165.

Paul, S., and Schaefer, B.C. (2013). A new look at T cell receptor signaling to nuclear factor-κB. Trends Immunol. *34*, 269–281.

Pearce, E.L., Mullen, A.C., Martins, G.A., Krawczyk, C.M., Hutchins, A.S., Zediak, V.P., Banica, M., DiCioccio, C.B., Gross, D.A., Mao, C.A., Shen, H., Cereb, N., Yang, S.Y., Lindsten, T., Rossant, J., Hunter, C.A., and Reiner, S.L. (2003). Control of Effector CD8+ T Cell Function by the Transcription Factor Eomesodermin. Science (80-.). *302*, 1041–1043.

Perez-Villar, J.J., and Kanner, S.B. (1999). Regulated association between the tyrosine kinase Emt/Itk/Tsk and phospholipase-C gamma 1 in human T lymphocytes. J. Immunol. *163*, 6435–6441.

Perkel, J.M., and Atchison, M.L. (1998). A two-step mechanism for recruitment of Pip by PU.1. J. Immunol. *160*, 241–252.

Peters, P.J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M., Krahenbuhl, O., Tschopp, J., Slot, J.W., and Geuze, H.J. (1991). Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. J. Exp. Med. *173*, 1099–1109.

Pettitt, T.R., Martin, A., Horton, T., Liossis, C., Lord, J.M., and Wakelam, M.J.O. (1997). Diacylglycerol and phosphatidate generated by phospholipases C and D, respectively, have distinct fatty acid compositions and functions: Phospholipase D-derived diacylglycerol does not activate protein kinase C in porcine aortic endothelial cells. J. Biol. Chem. *272*, 17354–17359.

Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kündig, T.M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, P.S., Krönke, M., and Mak, T.W. (1993). Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. Cell *73*, 457–467.

Philip, M., Fairchild, L., Sun, L., Horste, E.L., Camara, S., Shakiba, M., Scott, A.C., Viale, A., Lauer, P., Merghoub, T., Hellmann, M.D., Wolchok, J.D., Leslie, C.S., and Schietinger, A. (2017). Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. Nature *545*, 452–456.

Picelli, S., Faridani, O.R., Björklund, Å.K., Winberg, G., Sagasser, S., and Sandberg, R. (2014). Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. Nat. Protoc. *9*, 171–181.

Quigley, M., Pereyra, F., Nilsson, B., Porichis, F., Fonseca, C., Eichbaum, Q., Julg, B., Jesneck, J.L., Brosnahan, K., Imam, S., Russel, K., Toth, I., Piechocka-Trocha, A., Dolfi, D., Angelosanto, J., Crawford, A., Shin, H., Kwon, D.S., Zupkosky, J., Francisco, L., Freeman, G.J., Wherry, E.J., Kaufmann, D.E., Walker, B.D., Ebert, B., and Haining, W.N. (2010). Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. Nat. Med. *16*,

1147–1151.

Raczkowski, F., Ritter, J., Heesch, K., Schumacher, V., Guralnik, A., Höcker, L., Raifer, H., Klein, M., Bopp, T., Harb, H., Kesper, D.A., Pfefferle, P.I., Grusdat, M., Lang, P.A., Mittrücker, H-W., and Huber, M. (2013). The transcription factor interferon regulatory factor 4 is required for the generation of protective effector CD8+ T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 15019–15024.

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

Remesh, S.G., Santosh, V., and Escalante, C.R. (2015). Structural studies of IRF4 reveal a flexible autoinhibitory region and a compact linker domain. J. Biol. Chem. *290*, 27779–27790.

Rengarajan, J., Mowen, K.A., McBride, K.D., Smith, E.D., Singh, H., and Glimcher, L.H. (2002). Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. J. Exp. Med. *195*, 1003–1012.

Roederer, M. (2011). Interpretation of cellular proliferation data: Avoid the panglossian. Cytom. Part A *79 A*, 95–101.

Rome, K.S., Stein, S.J., Kurachi, M., Petrovic, J., Schwartz, G.W., Mack, E.A., Uljon, S., Wu, W.W., DeHart, A.G., McClory, S.E., Xu, L., Gimotty, P.A., Blacklow, S.C., Faryabi, R.B., Wherry, E.J, Jordan, M.S., and Pear, W.S. (2020). Trib1 regulates T cell differentiation during chronic infection by restraining the effector program. J. Exp. Med. *217*.

Roose, J.P., Mollenauer, M., Gupta, V.A., Stone, J., and Weiss, A. (2005). A Diacylglycerol-Protein Kinase C-RasGRP1 Pathway Directs Ras Activation upon Antigen Receptor Stimulation of T Cells. Mol. Cell. Biol. *25*, 4426–4441.

Roose, J.P., Mollenauer, M., Ho, M., Kurosaki, T., and Weiss, A. (2007). Unusual Interplay of Two Types of Ras Activators, RasGRP and SOS, Establishes Sensitive and Robust Ras Activation in Lymphocytes. Mol. Cell. Biol. *27*, 2732–2745.

Rosenbauer, F., Waring, J.F., Foerster, J., Wietstruk, M., Philipp, D., and Horak, I. (1999). Interferon consensus sequence binding protein and interferon regulatory factor-4/Pip form a complex that represses the expression of the interferon- stimulated gene-15 in macrophages. Blood *94*, 4274–4281.

Rossy, J., Owen, D.M., Williamson, D.J., Yang, Z., and Gaus, K. (2013). Conformational states of the kinase Lck regulate clustering in early T cell signaling. Nat. Immunol. *14*, 82–89.

Rouvier, E., Luciani, M.-F., and Golstein, P. (1993). Fas Involvement in Ca 2 + -independent T Cell-mediated Cytotoxicity. J Exp. Med. *177*, 195–200.

Rutishauser, R.L., Martins, G.A., Kalachikov, S., Chandele, A., Parish, I.A., Meffre, E., Jacob, J., Calame, K., and Kaech, S.M. (2009). Transcriptional Repressor Blimp-1 Promotes CD8+ T Cell Terminal Differentiation and Represses the Acquisition of Central Memory T Cell Properties. Immunity *31*, 296–308.

Sade-Feldman, M., Yizhak, K., Bjorgaard, S.L., Ray, J.P., de Boer, C.G., Jenkins, R.W., Lieb, D.J., Chen, J.H., Frederick, D.T., Barzily-Rokni, M., Freeman, S.S., Reuben, A., Hoover, P.J., Villani, A-C., Ivanova, E., Portell, A., Lizotte, P.H., Aref, A.R., Eliane, J-P., Hammond, M.R., Vitzthum, H., Blackmon, S.M., Li, B., Gopalakrishnan, V., Reddy, S.M., Cooper, Z.A., Paweletz, C.P., Barbie, D.A., Stemmer-Rachamimov, A., Flaherty, K.T., Wargo, J.A., Boland, G.M., Sullivan, R.J., Getz, G., and Hacohen, N. (2018). Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. Cell *175*, 998-1013.e20.

Saito, M., Gao, J., Basso, K., Kitagawa, Y., Smith, P.M., Bhagat, G., Pernis, A., Pasqualucci, L., and Dalla-Favera, R. (2007). A Signaling Pathway Mediating Downregulation of BCL6 in Germinal Center B Cells Is Blocked by BCL6 Gene Alterations in B Cell Lymphoma. Cancer Cell *12*, 280–292.

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

Salvato, M., Shimomaye, E., Southern, P., and Oldstone, M.B.A. (1988). Virus-lymphocyte interactions IV. Molecular characterization of LCMV Armstrong (CTL+) small genomic segment and that of its variant, clone 13 (CTL-). Virology *164*, 517–522.

Salvato, M., Borrow, P., Shimomaye, E., and Oldstone, M.B. (1991). Molecular basis of viral persistence: a single amino acid change in the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus is associated with suppression of the antiviral cytotoxic T-lymphocyte response and establishment of persistence. J. Virol. *65*, 1863–1869.

Savas, P., Virassamy, B., Ye, C., Salim, A., Mintoff, C.P., Caramia, F., Salgado, R., Byrne, D.J., Teo, Z.L., Dushyanthen, S., Byrne, A., Wein, L., Luen, S.J., Poliness, C., Nightingale, S.S., Skandarajah, A.S., Gyorki, D.E., Thornton, C.M., Beavis, P.A., Fox, S.B., Cuningham, K., Foundation Consortium for Research into Familial Breast Cancer (kConFab)., Darcy, P.K., Speed, T.P., Mackay, L.K., Neeson, P.J., and Loi, S. (2018). Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis. Nat. Med. *24*, 986–993.

Schaeffer, E.M., Debnath, J., Yap, G., McVicar, D., Liao, C.X., Littman, D.R., Sher, A., Varmus, H.E., Lenardo, M.J., and Schwartzberg, P.L. (1999). Requirement for Tec Kinases Rlk and Itk in T cell receptor signaling and immunity. Science (80-.). *284*, 638–641.

Scherer, D.C., Brockman, J.A., Chen, Z., Maniatis, T., and Ballard, D.W. (1995). Signal-induced degradation of IκBα requires site-specific ubiquitination. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 11259–11263.

Schietinger, A., Philip, M., Krisnawan, V.E., Chiu, E.Y., Delrow, J.J., Basom, R.S., Lauer, P., Brockstedt, D.G., Knoblaugh, S.E., Hämmerling, G.J., Schell,. T.D., Garbi, N., and Greenberg, P.D. (2016). Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. Immunity *45*, 389–401.

Schmedt, C., Saijo, K., Niidome, T., Kühn, R., Aizawa, S., and Tarakhovsky, A. (1998). Csk controls antigen receptor-mediated development and selection of T-linage cells. Nature *394*, 901–904.

Schoenborn, J.R., and Wilson, C.B. (2007). Regulation of Interferon-γ During Innate and Adaptive Immune Responses. Adv. Immunol. *96*, 41–101.

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

Scott, A.C., Dündar, F., Zumbo, P., Chandran, S.S., Klebanoff, C.A., Shakiba, M., Trivedi, P., Menocal, L., Appleby, H., Camara, S., Zamarin, D., Walther, T., Snyder, A., Femia, M.R., Comen, E.A., Wen, H.Y., Hellmann, M.D., Anandasabapathy, N., Liu, Y., Altorki, N.K., Lauer, P., Levy, O., Glickman, M.S., Kaye, J., Betel, D., Philip, M., and Schietinger, A. (2019). TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. Nature *571*, 270–274.

Sekine, T., Perez-Potti, A., Nguyen, S., Gorin, J.B., Wu, V.H., Gostick, E., Llewellyn-Lacey, S., Hammer, Q., Falck-Jones, S., Vangeti, S., Yu, M., Smed-Sörensen, A., Gaballa, A., Uhlin, M., Sandberg, J.K., Brander, C., Nowak, P., Goepfert, P.A., Price, D.A., Betts, M.R., and Buggert, M. (2020). TOX is expressed by exhausted and polyfunctional human effector memory CD8+ T cells. Sci. Immunol. *5*, 1–15.

Sen, D.R., Kaminski, J., Barnitz, R.A., Kurachi, M., Gerdemann, U., Yates, K.B., Tsao, H.W., Godec, J., LaFleur, M.W., Brown, F.D., Tonnerre, P., Chung, R.T., Tully, D.C., Allen, T.M., Frahm, N., Lauer, G.M., Wherry, E.J., Yosef, N., and Haining, W.N. (2016). The epigenetic landscape of T cell exhaustion. Science (80-.). *354*, 1165–1169.

Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krähn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C., and Karin, M. (2001). Activation by IKKα of a second, evolutionary conserved, NF-κB signaling pathway. Science (80-.). *293*, 1495–1499.

Seo, H., Chen, J., Samaniego-castruita, D., Wang, Y.H., López-moyado, I.F., Georges, O., Zhang, W., and Onodera, A. (2019). TOX and TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8+ Tcell exhaustion (Proceedings of the National Academy of Sciences of the

United States of America (PLoS ONE(2019) 116 (12410–12415) DOI: 10.73/pnas.190. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *116*, 19761.

Seo, H., González-Avalos, E., Zhang, W., Ramchandani, P., Yang, C., Lio, C.W.J., Rao, A., and Hogan, P.G. (2021). BATF and IRF4 cooperate to counter exhaustion in tumor-infiltrating CAR T cells. Nat. Immunol. *22*, 983–995.

Sevilla, N., Kunz, S., Holz, A., Lewicki, H., Homann, D., Yamada, H., Campbell, K.P., De La Torre, J.C., and Oldstone, M.B.A. (2000). Immunosuppression and resultant viral persistence by specific viral targeting of dendritic cells. J. Exp. Med. *192*, 1249–1260.

Shin, H., Blackburn, S.D., Blattman, J.N., and Wherry, E.J. (2007). Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. J. Exp. Med. *204*, 941–949.

Sica, A., Dorman, L., Viggiano, V., Cippitelli, M., Ghosh, P., Rice, N., and Young, H.A. (1997). Interaction of NF-κB and NFAT with the interferon-γ promoter. J. Biol. Chem. *272*, 30412–30420.

Siddiqui, I., Schaeuble, K., Chennupati, V., Fuertes Marraco, S.A., Calderon-Copete, S., Pais Ferreira, D., Carmona, S.J., Scarpellino, L., Gfeller, D., Pradervand, S., Luther, S.A., Speiser, D.E., Held, W. (2019). Intratumoral Tcf1 + PD-1 + CD8 + T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy. Immunity *50*, 195-211.e10.

Smelt, S.C., Borrow, P., Kunz, S., Cao, W., Tishon, A., Lewicki, H., Campbell, K.P., and Oldstone, M.B.A. (2001). Differences in Affinity of Binding of Lymphocytic Choriomeningitis Virus Strains to the Cellular Receptor α-Dystroglycan Correlate with Viral Tropism and Disease Kinetics. J. Virol. *75*, 448–457.

Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., and Jordan, M.S. (2009). T cell activation. Annu. Rev. Immunol. *27*, 591–619.

Stone, J.C. (2011). Regulation and function of the rasGRP family of ras activators in blood cells. Genes and Cancer *2*, 320–334.

Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., Kallunki, T., Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (1994). JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. Cell *77*, 727–736.

Sullivan, B.M., Juedes, A., Szabo, S.J., Von Herrath, M., and Glimcher, L.H. (2003). Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 15818–15823.

Sullivan, B.M., Emonet, S.F., Welch, M.J., Lee, A.M., Campbell, K.P., De La Torre, J.C., and Oldstone, M.B. (2011). Point mutation in the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus is necessary for receptor binding, dendritic cell infection, and long-term persistence. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 2969–2974.

Sun, L., Deng, L., Ea, C.K., Xia, Z.P., and Chen, Z.J. (2004). The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. Mol. Cell *14*, 289–301.

Sun, S.C., Ganchi, P.A., Ballard, D.W., and Greene, W.C. (1993). NF-κB controls expression of inhibitor IκBα: Evidence for an inducible autoregulatory pathway. Science (80-.). *259*, 1912–1915.

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

Targan, S., and Oseas, R. (1983). The " lazy " NK cells of Chediak-Higashi syndrome. J. Immunol. *130*, 2671–2674.

Thommen, D.S., and Schumacher, T.N. (2018). T Cell Dysfunction in Cancer. Cancer Cell *33*, 547–562.

Thommen, D.S., Schreiner, J., Müller, P., Herzig, P., Roller, A., Belousov, A., Umana, P., Pisa, P., Klein, C., Bacac, M., Fischer, O.S., Moersig, W., Prince, S.S., Levitsky, V., Karanikas, V., Lardinois,

D., and Zippelius, A. (2015). Progression of lung cancer is associated with increased dysfunction of T cells defined by coexpression of multiple inhibitory receptors. Cancer Immunol. Res. *3*, 1344–1354.

Thommen, D.S., Koelzer, V.H., Herzig, P., Roller, A., Trefny, M., Dimeloe, S., Kiialainen, A., Hanhart, J., Schill, C., Hess, C., Prince, S.S., Wiese, M., Lardinois, D., Ho, P-C., Klein, C., Karanikas, V., Mertz, K.D., Schumacher, T., and Zippelius, A. (2018). A transcriptionally and functionally distinct pd-1+ cd8+ t cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with pd-1 blockade. Nat. Med. *24*, 994–1004.

Tirosh, I., Izar, B., Prakadan, S.M., Wadsworth, M.H., Treacy, D., Trombetta, J.J., Rotem, A., Rodman, C., Lian, C., Murphy, G., Fallahi-Sichani, M., Dutton-Regester, K., Lin, J-R., Cohen, O., Shah, P., Lu, D., Genshaft, A.S., Hughes, T.K., Ziegler, C.G.K., Kazer, S.W., Gaillard, A., Kolb, K.E., Villani, A-C., Johannessen, C.M., Andreev, A.Y., Van Allen, E.M., Bertagnolli, M., Sorger, P.K., Sullivan, R.J., Flaherty, K.T., Frederick, D.T., Jané-Valbuena, J., Yoon, C.H., Rozenblatt-Rosen, Orit., Shalek, A.K., Regev, A., and Garraway, L.A. (2016). Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. Science (80-.). *352*, 189–196.

Tishon, A., Lewicki, H., Rall, G., Von Herrath, M., and Oldstone, M.B.A. (1995). An Essential Role for Type 1 Interferon-γ in Terminating Persistent Viral Infection. Virology *212*, 244–250.

Tonnerre, P., Wolski, D., Subudhi, S., Aljabban, J., Hoogeveen, R.C., Damasio, M., Drescher, H.K., Bartsch, L.M., Tully, D.C., Sen, D.R., Bean, D.J., Brown, J., Torres-Cornejo, A., Robidoux, M., Kvistad, D., Alatrakchi, N., Cui, A., Lieb, D., Cheney, J.A., Gustafson, J., Lewis-Ximenez, L.L., Massenet-Regad, L., Eisenhaure, T., Aneja, J., Haining, W.N., Chung, R.T., Hacohen, N., Allen, T.M., Kim, A.Y., and Lauer, G.M. (2021). Differentiation of exhausted CD8+ T cells after termination of chronic antigen stimulation stops short of achieving functional T cell memory. Nat. Immunol. *22*, 1030–1041.

Topham, D.J., Tripp, R.A., and Doherty, P.C. (1997). CD8+ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes. J. Immunol. *159*, 5197–5200.

Townsend, A.R.M., Rothbard, J., Gotch, F.M., Bahadur, G., Wraith, D., and McMichael, A.J. (1986). The Epitopes of Influenza Nucleoprotein Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes Can Be Defined with Short Synthetic Peptides. Cell *44*, 959–968.

Traub, E. (1935). A filtrable virus recovered from white mice. Science (80-.). *81*, 298–299.

Traub, E. (1936a). An epidemic in a mouse colony due to the virus of acute lymphocytic choriomeningitis. J. Exp. Med. *63*, 533–546.

Traub, E. (1936b). The Epidemiology of Lymphocytic Choriomeningitis in white mice. J. Exp. Med. *64*, 183–200.

Tussiwand, R., Lee, W.L., Murphy, T.L., Mashayekhi, M., Kc, W., Albring, J.C., Satpathy, A.T., Rotondo, J.A., Edelson, B.T., Kretzer, N.M., Wu, X., Weiss, L.A., Glasmacher, E., Li, P., Liao, W., Behnke, M., Lam, S.S.K., Aurthur, C.T., Leonard, W.J., Singh, H., Stallings, C.L., Sibley, L.D., Schreiber, R.D., and Murphy, K.M. (2012). Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. Nature *490*, 502–507.

Utzschneider, D.T., Legat, A., Fuertes Marraco, S.A., Carrié, L., Luescher, I., Speiser, D.E., and Zehn, D. (2013). T cells maintain an exhausted phenotype after antigen withdrawal and population reexpansion. Nat. Immunol. *14*, 603–610.

Utzschneider, D.T., Charmoy, M., Chennupati, V., Pousse, L., Ferreira, D.P., Calderon-Copete, S., Danilo, M., Alfei, F., Hofmann, M., Wieland, D., Pradervand, S., Thimme, R., Zehn, D., and Werner, H. (2016a). T Cell Factor 1-Expressing Memory-like CD8+ T Cells Sustain the Immune Response to Chronic Viral Infections. Immunity *45*, 415–427.

Utzschneider, D.T., Alfei, F., Roelli, P., Barras, D., Chennupati, V., Darbre, S., Delorenzi, M., Pinschewer, D.D., and Zehn, D. (2016b). High antigen levels induce an exhausted phenotype in a chronic infection without impairing T cell expansion and survival. J. Exp. Med. *213*, 1819–1834.

Utzschneider, D.T., Gabriel, S.S., Chisanga, D., Gloury, R., Gubser, P.M., Vasanthakumar, A., Shi,

W., and Kallies, A. (2020). Early precursor T cells establish and propagate T cell exhaustion in chronic infection. Nat. Immunol. *21*, 1256–1266.

Vallabhapurapu, S., and Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-κB transcription factors in the immune system. Annu. Rev. Immunol. *27*, 693–733.

Vang, T., Abrahamsen, H., Myklebust, S., Enserink, J., Prydz, H., Mustelin, T., Amarzguioui, M., and Tasken, K. (2004). Knockdown of C-terminal Src kinase by siRNA-mediated RNA interference augments T cell receptor signaling in mature T cells. Eur. J. Immunol. *34*, 2191–2199.

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

Veillette, A., Bookman, M.A., Horak, E.M., and Bolen, J.B. (1988). The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. Cell *55*, 301–308.

Venkataraman, L., Burakoff, S.J., and Sen, R. (1995). FK506 inhibits antigen receptor-mediated induction of c-tel in B and T lymphoid cells. J. Exp. Med. *181*, 1091–1099.

Verma, K., Ogonek, J., Varanasi, P.R., Luther, S., Bünting, I., Thomay, K., Behrens, Y.L., Mischak-Weissinger, E., and Hambach, L. (2017). Human CD8+ CD57- TEMRA cells: Too young to be called "old." PLoS One *12*, 1–14.

Wade Harper, J., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell *75*, 805–816.

Waldman, A.D., Fritz, J.M., and Lenardo, M.J. (2020). A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. Nat. Rev. Immunol. *20*, 651–668.

Walsh, C.M., Matloubian, M., Liu, C.C., Ueda, R., Kurahara, C.G., Christensen, J.L., Huang, M.T.F., Young, J.D.E., Ahmed, R., and Clark, W.R. (1994). Immune function in mice lacking the perforin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 10854–10858.

Wang, D., Matsumoto, R., You, Y., Che, T., Lin, X.-Y., Gaffen, S.L., and Lin, X. (2004). CD3/CD28 Costimulation-Induced NF-κB Activation Is Mediated by Recruitment of Protein Kinase C-θ, Bcl10, and IκB Kinase β to the Immunological Synapse through CARMA1. Mol. Cell. Biol. *24*, 164–171.

Wang, X., He, Q., Shen, H., Xia, A., Tian, W., Yu, W., and Sun, B. (2019). TOX promotes the exhaustion of antitumor CD8+ T cells by preventing PD1 degradation in hepatocellular carcinoma. J. Hepatol. *71*, 731–741.

Wardenburg, J.B., Fu, C., Jackman, J.K., Flotow, H., Wilkinson, S.E., Williams, D.H., Johnson, R., Kong, G., Chan, A.C., and Findel, P.R. (1996). Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. J. Biol. Chem. *271*, 19641–19644.

Wherry, E.J., Teichgräber, V., Becker, T.C., Masopust, D., Kaech, S.M., Antia, R., von Andrian, U.H., and Ahmed, R. (2003a). Lineage relationship and protective immunity of memory CD8T cell subsets. Nat. Immunol. *4*, 225–234.

Wherry, E.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., van der Most, R., and Ahmed, R. (2003b). Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment. J. Virol. *77*, 4911–4927.

Wherry, E.J., Barber, D.L., Kaech, S.M., Blattman, J.N., and Ahmed, R. (2004). Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 16004–16009.

Wherry, E.J., Ha, S.J., Kaech, S.M., Haining, W.N., Sarkar, S., Kalia, V., Subramaniam, S., Blattman, J.N., Barber, D.L., and Ahmed, R. (2007). Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. Immunity *27*, 670–684.

Wu, C.J., and Ashwell, J.D. (2008). NEMO recognition of ubiquitinated Bcl10 is required for T cell receptor-mediated NF-κB activation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 3023–3028.

Wu, H., Witzl, A., and Ueno, H. (2019). Assessment of TCR signal strength of antigen-specific memory CD81 T cells in human blood. Blood Adv. *3*, 2153–2163.

Wu, J., Zhang, H., Shi, X., Xiao, X., Fan, Y., Minze, L.J., Wang, J., Ghobrial, R.M., Xia, J., Sciammas, R., Li, X.C., Chen., W. (2017). Ablation of Transcription Factor IRF4 Promotes Transplant Acceptance by Driving Allogenic CD4+ T Cell Dysfunction. Immunity *47*, 1114-1128.e6.

Wu, T., Ji, Y., Ashley Moseman, E., Xu, H.C., Manglani, M., Kirby, M., Anderson, S.M., Handon, R., Kenyon, E., Elkahloun, A., Wu, W., Lang, P., Gattinoni, L., McGavern, D.B., and Schwartzberg, P.L. (2016). The TCF1-Bcl6 axis counteracts type I interferon to repress exhaustion and maintain T cell stemness. Sci. Immunol. *1*, 1–13.

Xin, A., Masson, F., Liao, Y., Preston, S., Guan, T., Gloury, R., Olshansky, M., Lin, J.X., Li, P., Speed, T.P., Smyth, G.K., Ernst, M., Leonard, W.J., Pellegrini, M., Kaech., S.M., Nutt, S.L., Shi, W., Belz, G.T., and Kallies, A. (2016). A molecular threshold for effector CD8+ T cell differentiation controlled by transcription factors Blimp-1 and T-bet. Nat. Immunol. *17*, 422–432.

Yamagata, T., Nishida, J., Tanaka, S., Sakai, R., Mitani, K., Yoshida, M., Taniguchi, T., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1996). A novel interferon regulatory factor family transcription factor, ICSAT/Pip/LSIRF, that negatively regulates the activity of interferon-regulated genes. Mol. Cell. Biol. *16*, 1283–1294.

Yamaguchi, H., and Hendrickson, W.A. (1996). Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. Nature *384*, 484.

Yao, C., Sun, H.W., Lacey, N.E., Ji, Y., Moseman, E.A., Shih, H.Y., Heuston, E.F., Kirby, M., Anderson, S., Cheng, J., Khan, O., Handon, R., Reilley, J., Fioravanti, J., Hu, J., Gossa, S., Wherry, E.J., Gattinoni, L., McGavern, D.B., O'Shea, J.J., Schwartzberg, P.L., and Wu, T. (2019). Single-cell RNA-seq reveals TOX as a key regulator of CD8+ T cell persistence in chronic infection. Nat. Immunol. *20*, 890–901.

Yao, S., Buzo, B.F., Pham, D., Jiang, L., Taparowsky, E.J., Kaplan, M.H., and Sun, J. (2013). Interferon regulatory factor 4 sustains CD8+ T cell expansion and effector differentiation. Immunity *39*, 833–845.

Yokosuka, T., Takamatsu, M., Kobayashi-Imanishi, W., Hashimoto-Tane, A., Azuma, M., and Saito, T. (2012). Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. J. Exp. Med. *209*, 1201–1217.

Yost, K.E., Satpathy, A.T., Wells, D.K., Qi, Y., Wang, C., Kageyama, R., McNamara, K.L., Granja, J.M., Sarin, K.Y., Brown, R.A., Gupta, R.K., Curtis, C., Bucktrout, S.L., Davis, M.M., Chang, A.L.S., Chang, H.Y. (2019). Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade. Nat. Med. *25*, 1251–1259.

Youngblood, B., Oestreich, K.J., Ha, S.J., Duraiswamy, J., Akondy, R.S., West, E.E., Wei, Z., Lu, P., Austin, J.W., Riley, J.L., Boss, J.M., and Ahmed, R. (2011). Chronic Virus Infection Enforces Demethylation of the Locus that Encodes PD-1 in Antigen-Specific CD8+ T Cells. Immunity *35*, 400–412.

Zajac, A.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D.J.D., Suresh, M., Altman, J.D., and Ahmed, R. (1998). Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. J. Exp. Med. *188*, 2205–2213.

Zarour, H.M. (2016). Reversing T-cell dysfunction and exhaustion in cancer. Clin. Cancer Res. *22*, 1856–1864.

Zhang, L., Yu, X., Zheng, L., Zhang, Y., Li, Y., Fang, Q., Gao, R., Kang, B., Zhang, Q., Huang, J.Y., Konno, H., Guo, X., Ye, Y., Gao, S., Wang, S., Hu, X., Ren, X., Shen, Z., Ouyang, W., and Zhang, Z. (2018). Lineage tracking reveals dynamic relationships of T cells in colorectal cancer. Nature *564*, 268–272.

Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Trible, R.P., and Samelson, L.E. (1998). LAT: The ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. Cell *92*, 83–92.

Zhang, Y., Huang, S., Gong, D., Qin, Y., and Shen, Q. (2010). Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human non-small cell lung cancer. Cell. Mol. Immunol. *7*, 389–395.

Zheng, C., Zheng, L., Yoo, J.K., Guo, H., Zhang, Y., Guo, X., Kang, B., Hu, R., Huang, J.Y., Zhang, Q., Liu, Z., Dong, M., Hu, X., Ouyang, W., Peng, J., and Zhang, Z. (2017). Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. Cell *169*, 1342-1356.e16.

Zhou, H., Wertz, I., O'Rourke, K., Ultsch, M., Seshagir, S., Eby, M., Xiao, W., and Dixit, V.M. (2004). Bcl10 activates the NF-κB pathway through ubiquitination of NEMO. Nature *427*, 167–171.

Zhou, X., Yu, S., Zhao, D.M., Harty, J.T., Badovinac, V.P., and Xue, H.H. (2010). Differentiation and Persistence of Memory CD8+ T Cells Depend on T Cell Factor 1. Immunity *33*, 229–240.

Zhu, J., Shibasaki, F., Price, R., Guillemot, J.C., Yano, T., Dötsch, V., Wagner, G., Ferrara, P., and McKeon, F. (1998). Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. Cell *93*, 851–861.