



HAL
open science

Dissection des fonctions régulatrices des lymphocytes iNKT en situation auto-immune dans le modèle de la souris NOD

Ren Zhu

► **To cite this version:**

Ren Zhu. Dissection des fonctions régulatrices des lymphocytes iNKT en situation auto-immune dans le modèle de la souris NOD. Immunologie. Université René Descartes - Paris V, 2006. Français. NNT: . tel-00084227

HAL Id: tel-00084227

<https://theses.hal.science/tel-00084227v1>

Submitted on 6 Jul 2006

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

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

THÈSE
présentée pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PARIS V

Discipline : Immunologie

par

Ren ZHU

Titre :

**Dissection des fonctions régulatrices des lymphocytes iNKT en situation
auto-immune dans le modèle de la souris NOD**

Thèse dirigée par : Docteur André HERBELIN

CNRS UMR 8147 - Hôpital Necker - 161, rue de Sèvres - 75015 Paris

Soutenue le 03 juillet 2006, devant le jury composé de :

Professeur Lucienne CHATENOUD	Président
Docteur Antonino NICOLETTI	Rapporteur
Docteur François TROTTEIN	Rapporteur
Docteur Kamel BENLAGHA	Examineur
Docteur Michel DY	Examineur
Professeur Jean-Marc GOMBERT	Examineur
Professeur Roland LIBLAU	Examineur
Docteur André HERBELIN	Directeur de Thèse

Remerciements

Cette thèse rend compte de l'aventure tant scientifique qu'humaine que j'ai vécue en France. Elle est le fruit de mes travaux de recherche avec des instants de joie, de fatigue mais aussi de souffrance. Elle est le fruit de rencontres et d'échanges avec des personnes formidables, de souvenirs inoubliables et émouvants. Sur ces deux plans, les années que j'ai passées auprès de vous tous m'auront énormément enrichie.

Exprimer tout ce que je ressens m'est difficile en raison de l'émotion qui m'étreint aujourd'hui. Il est d'ailleurs possible que j'oublie quelqu'un sur le papier. Si c'est le cas, mille excuses ! Quoi qu'il en soit, sachez que vous êtes tous dans mon cœur et mon esprit !

En premier lieu, je tiens à remercier Monsieur le Docteur Michel DY, directeur du laboratoire CNRS UMR 8147 pour m'avoir accueillie au sein de son unité de recherche pendant mon stage de thèse et également pour l'honneur qu'il me fait en participant à mon jury.

Je remercie également Madame Lucienne CHATENOUD, Professeur à l'université Paris V, qui m'a fait l'honneur d'exercer les fonctions de président de mon jury.

Toute ma gratitude est acquise à Monsieur le Docteur François TROTTEIN et Monsieur le Docteur Antonino NICOLETTI qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je suis également très reconnaissante à Monsieur le Docteur Kamel BENLAGHA, Monsieur le Professeur Jean-Marc GOMBERT et Monsieur le Professeur Roland LIBLAU pour leur participation à mon jury.

Mes plus grands remerciements sont naturellement pour mon « chef », mon directeur de thèse, Monsieur le Docteur André HERBELIN, qui a dirigé mon travail dans la continuité de mon DEA. Tout au long de ces années, tu as orienté mes recherches dans le bon chemin en me faisant découvrir le monde des cellules iNKT ! Je tiens vivement à t'exprimer ma reconnaissance pour ta rigueur scientifique, ton enthousiasme, et tes précieux conseils qui m'ont guidée, m'ont permis de construire et de progresser dans ce travail. Un grand merci

surtout pour ton esprit d'ouverture, ta confiance et tes encouragements constants ; pour m'avoir permis d'initier l'étude de ces fabuleuses cellules iNKT dans le foie, de la poursuivre toujours plus loin, même dans les moments difficiles. Tu as su me faire comprendre l'esprit (ou l'âme) de la recherche. Je sais maintenant que la science est une belle histoire mêlant une curiosité insatiable à un grand plaisir !

Cette aventure que j'ai vécue n'aurait pas été aussi belle sans l'ensemble de mes collègues et amis du laboratoire. Pour vos conseils, les services que vous m'avez rendus, les discussions intéressantes que nous avons partagées et plus généralement pour la bonne ambiance que vous avez créée, je vous remercie.

Un grand merci à Madame le Docteur Elke SCHNEIDER pour ses propositions et conseils précieux, et surtout pour sa disponibilité et le temps passé à corriger les articles en anglais ! Heureusement, tu étais toujours là pour me fournir des souris C57BL/6 femelles en dernier recours avant les manips ! Merci aussi à Madame le Docteur Maria LEITE DE MORAES pour son aide, son soutien, son amitié, ses conseils et aussi sa disponibilité, sans oublier bien sûr cet outil magique qu'est le tétramère α -GalCer/CD1d sans lequel je n'aurais pu travailler ! Egalement je remercie Madame le Docteur Nathalie THIEBLEMONT pour son soutien.

Je n'oublie pas bien sûr les autres chercheurs du laboratoire, Mesdames et Messieurs les Docteurs Mireille DARDENNE, Odile DEVERGNE, Flora ZAVALA, Anne-France BERTRON, Daniella MENDES DA CRUZ, Alexandre DE CASTRO-KELLER, Luiza ARAUJO et Jean-Marie PLEAU. J'ai toujours été accueillie chaleureusement dans vos laboratoires et j'ai toujours pu compter sur votre aide, vos conseils lors de nos grandes discussions, surtout dans les couloirs et au moment des repas ! J'ai également une pensée pour Madame le Docteur Ana Claudia ROCHA CAMPOS, déjà partie du laboratoire, qui m'a accompagnée au début de ce long chemin qu'est la thèse. Je n'oublierai pas ton amitié, non plus que les jours et nuits passés ensemble à travailler...

J'ai beaucoup d'affection pour tous les membres de notre petit comité qui ne se contente pas de partager seulement un intérêt prononcé pour cette population extraordinaire que sont

les iNKT, mais également les joies et les angoisses de la recherche au quotidien. Merci à ma grande sœur brésilienne Luiza ARAUJO qui m'a aidée, soutenue et conseillée tous les jours. Je te remercie pour ton amitié qui a su établir un lien très fort entre deux continents lointains. Merci à mon coach personnel Séverine DIEM pour sa disponibilité, sa sympathie, son amitié, ses conseils pertinents, et surtout son aide et ses encouragements pour la rédaction de ce manuscrit. Merci énormément à Aude AUMEUNIER pour son aide et ses conseils précieux sur ce manuscrit. Tu as probablement repéré beaucoup de fautes d'orthographe.... Maintenant toi et Séverine comprenez parfaitement mon français particulier... Je n'oublierai pas non plus les discussions entre nous sur les questions scientifiques et humaines ! Je me suis habituée à ton grand éclat de rire, prélude à d'agréables journées. Tes nombreuses qualités te permettront, j'en suis certaine, de réaliser tes projets personnels et professionnels. Nous devons tenter une collaboration un jour ! Et surtout n'oublie pas de mettre à contribution ton grand talent littéraire pour écrire notre fabuleuse histoire au laboratoire ! Merci aussi à Françoise-Irène GRELA. J'ai gardé de bons souvenirs de nos discussions non seulement scientifiques mais aussi culturelles ! Je te remercie beaucoup pour ton amitié, ton soutien permanent, ta « zénitude » exceptionnelle et ton humour quelque peu cynique ! Je te souhaite la plus grande réussite pour ta thèse et également un bel avenir ! Ma thèse n'aurait pu exister, du moins sous sa forme actuelle, sans le concours de Jordan DENIZEAU. Pour toutes les manip que nous avons réalisées ensemble (surtout celles de tri), pour ton aide, pour ton amitié, pour ton soutien pour la fin de ma thèse, je t'exprime tous mes remerciements. Merci aussi à Emilie PHILADELPHE (alias Marie Caroline ZHISPOV et Zoé SHAMELESS) pour son aide et surtout son grand sourire adorable ! Tu réussiras pour ton ESTBA et l'avenir ! Quelques mots également à Madame le Docteur Mariette LISBONNE partie poursuivre son chemin en post-doc : je te remercie énormément pour ton soutien et ton amitié malgré la distance ! Cela m'a fait grand plaisir de te revoir ! Merci également à Marie-Laure MICHEL, nous avons eu beaucoup de conversations intéressantes. Je n'oublierai pas notre séance de bowling !

Je remercie aussi les autres étudiants du laboratoire pour leur amitié et leur aide : Patricia HACHEM, Yves LEPELLETIER, Pascaline CHARLOT, Séverine COULON, Julie VANDEKERCKHOVE, Abdulraouf RAMADAN, Hassen KARED, Michaël DUSSIOT,

Amédée RENAND...

J'ai une attention particulière pour notre double expert en bio et info : François MACHAVOINE, pour non seulement sa grande compétence mais aussi son aide, son amitié et sa bonne humeur ! Merci aussi à Emilie BARDEL pour sa disponibilité et sa sympathie ! Merci énormément de m'avoir appris à isoler le foie de la souris et à préparer l'IVIg !

Toute ma gratitude également à Fabienne PLET, Catherine SLAMA et Joëlle KERSUAL pour leur soutien quotidien.

Je tiens aussi à remercier énormément Christine GOUARIN, pour son accueil chaleureux ainsi que pour ses compétences, sa disponibilité et sa sympathie. Tu m'as appris énormément lors de mon DEA ! La présence à mes côtés d'Agathe GARCIA et de Mickaël GARCIA m'a été précieuse, non seulement pour leur soutien et conseils permanents mais aussi leur amitié sans frontière ! J'adresse aussi mes remerciements à Géraldine BOSTEL pour son soutien et son aide ainsi qu'à Olivier BABIN pour son amitié !

La réalisation de mon projet sur l'hépatite n'aurait pas été possible sans le personnel du service de biochimie dont la collaboration et la grande disponibilité m'ont permis de réaliser les dosages d'ALT. Merci aussi à Madame le Docteur Diane DAMOTTE pour sa grande compétence en histologie, sa disponibilité et les discussions profondes ! Merci également à Monsieur le Professeur Pierre GOURDY, non seulement pour sa gentillesse mais aussi pour son soutien ! Merci encore de nous avoir fourni les souris IL-12 KO et ce kit ELISA d'IL-12 particulier ! Madame Corinne CORDIER-GARCIA et Monsieur Jérôme MEGRET auront été également indispensables à l'aboutissement de mes travaux de par leur assistance technique pour trier cette population minoritaire que constituent les cellules iNKT... Merci également aux autres collaborateurs, notamment Madame le Docteur Natacha BESSIS grâce à laquelle j'ai pu découvrir l'arthrite! Je n'oublierai pas non plus la manip faite ensemble dans le jardin du chef... J'aimerais remercier aussi Monsieur le Docteur Srini KAVERI pour sa collaboration sur l'IVIg, Monsieur le Professeur Michel GOLDMAN et Madame le Docteur Patrizia LOI pour les discussions stimulantes sur le foie que nous avons partagées.

Aucune expérience n'aurait été réalisée sans le concours des personnes travaillant dans l'animalerie qui nous fabriquent les souris à la chaîne : Mickaël GARCIA, Fabrice VALETTE, Dominique HOURRI, Séverine GRIESZMANN, Abdelkader ARIBI, Stanise

FONLEBECK, G  elle DUVALLET...

Merci aussi    mes amis chinois qui m'ont énormément soutenue et qui partagent avec moi une expérience extraordinaire à Paris : CHEN Ying, YANG Kun, ZHU Limin, ZHANG Shengying, ZHANG Andi, KU Chenglun, HO Chenxuan, XIE Jun et LI Xiangmin.

Je remercie enfin ma famille, en particulier, mes parents et ma s  ur, qui me soutiennent de loin. Je vous remercie pour votre compréhension surtout durant les longues absences que vous avez d   supporter. Votre soutien moral et affectif a été un moteur pour mener à terme ce travail. J'espère que vous êtes fiers de moi...

LISTE DES ABREVIATIONS.....	1
INTRODUCTION	3
CHAPITRE I : LES LYMPHOCYTES INKT CONSTITUENT UNE POPULATION T ORIGINALE ET AMBIVALENTE	4
I-1 Historique de l'identification des lymphocytes iNKT	5
I-2 Un phénotype unique combinant des marqueurs des lymphocytes NK et T	7
I-3 Les ligands des lymphocytes iNKT	9
I-4 Le tétramère CD1d/ α -GalCer : un outil spécifique d'identification des lymphocytes iNKT	12
I-5 Origine et sélection des lymphocytes iNKT	13
I-6 Localisation et homéostasie.....	16
I-7 Interactions cellulaires et devenir des lymphocytes iNKT	19
I-8 Facteurs influençant les fonctions des lymphocytes iNKT	21
CHAPITRE II : FONCTIONS DES LYMPHOCYTES INKT EN SITUATION PATHOLOGIQUE.....	23
II-1 Fonctions des lymphocytes iNKT au cours des réponses infectieuses	24
II-2 Fonctions des lymphocytes iNKT au cours des réponses anti-tumorales	32
II-3 Fonctions tolérogènes des lymphocytes iNKT.....	35
II-4 Fonctions des lymphocytes iNKT en auto-immunité.....	37
CHAPITRE III : LA SOURIS NOD, UN MODELE PRIVILEGIE POUR L'ETUDE DES LYMPHOCYTES INKT EN SITUATION PATHOLOGIQUE.....	42
III-1 Le diabète de type 1 de la souris NOD	42
III-2 Les lymphocytes iNKT et la souris NOD	47
RESULTATS	53
RESULTATS PARTIE I.....	54
Manuscrit n°1	55

Manuscrit n°2	62
Manuscrit n°3	70
RESULTATS PARTIE II	79
Manuscrit n°4	82
Manuscrit n°5	111
DISCUSSION GENERALE	117
CONCLUSION	144
MANUSCRITS ANNEXES	147
Manuscrit annexe n°1	148
Manuscrit annexe n°2	158
Manuscrit annexe n°3	165
BIBLIOGRAPHIE	176

Liste des abréviations

ACAID	tolérance induite par l'injection d'un antigène dans la chambre antérieure de l'œil (<i>anterior chamber associated-immune deviation</i>)
α -GalCer	α -galactosylcéramide
ALT	alanine amino-transférase
BCG	bacille Calmette-Guérin
β_2 M	β_2 microglobuline
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
ConA	concanavale A
CTL	lymphocyte T cytotoxique
CPA	cellule présentatrice d'antigène
DC	cellule dendritique
DN	cellule double négative
DP	cellule double positive
EAE	encéphalite auto-immune expérimentale
GVHD	<i>graft-versus-host disease</i>
High	élevé
<i>idd</i>	Gène de susceptibilité du diabète
IFN	interféron
iGb3	isoglobotrihexosylcéramide

IL-	interleukine
iNKT	<i>invariant natural killer T cell</i>
-/-	invalidation d'un gène par recombinaison homologue
LFA-1	<i>leuckocytes function-associated antigen-1</i>
Low	faible
LPS	lipopolysaccharide
MNC	cellule mononucléée
NOD	souris diabétique non obèse (<i>non-obese diabetic</i>)
PIM ₄	phosphatidylinositol tétramannoside
PMA	<i>phorbol myristate acetate</i>
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
SLAM	<i>signaling lymphocyte activation molecule</i>
<i>scid</i>	présentant une déficience immunitaire sévère (souris)
T1D	modèle spontané de diabète de type 1
Th	<i>T helper</i>
TLR	<i>Toll-like récepteur</i>
T-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>
TNF	facteur de nécrose tumorale
TRAIL	<i>TNF related apoptosis-inducing ligand</i>
Treg	T régulatrice

Introduction

Chapitre I : les lymphocytes iNKT constituent une population T originale et ambivalente

Les lymphocytes iNKT pour « invariant Natural Killer T » constituent une population minoritaire qui par sa remarquable parenté à la fois avec les lymphocytes NK et avec les lymphocytes T mémoires, forme une interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les propriétés régulatrices de cette population T particulière qui est sélectionnée par la molécule CD1d et qui exprime une chaîne α du TCR invariante ($V\alpha 14-J\alpha 18$ chez la souris et $V\alpha 24-J\alpha 18$ chez l'homme) reposent à la fois sur son auto-réactivité et sur sa dualité fonctionnelle (production rapide et massive de cytokines T helper (Th)1 et Th2). Les lymphocytes iNKT sont donc susceptibles de contribuer activement tant aux réponses humorales que cellulaires. Mais ils exercent aussi, à l'instar des lymphocytes T régulateurs $CD4^+CD25^+$ (Treg), des fonctions tolérogènes et immuno-suppressives qui mettent en particulier en jeu l'IL-10. Du fait de leur auto-réactivité, on postule que les lymphocytes iNKT partagent aussi avec les lymphocytes Treg des fonctions régulatrices « naturelles/spontanées ».

Les lymphocytes iNKT interviennent comme éléments régulateurs tant au cours des phases afférente qu'efférente des réponses immunitaires. Dans certaines situations, ils se comportent même comme des cellules effectrices (pouvoir cytotoxique). De ce fait, les lymphocytes iNKT suscitent de grands intérêts dans les domaines de l'immunité anti-tumorale, anti-infectieuse ainsi que dans la recherche de traitements des maladies auto-immunes.

Néanmoins, les règles qui dictent le choix des fonctions régulatrices des lymphocytes iNKT dans la dynamique de la réponse immune sont encore en partie obscures. Ce constat

explique le caractère « versatile » fréquemment attribué aux lymphocytes iNKT et surtout pourquoi il est souvent difficile de prévoir la conséquence bénéfique ou délétère de leur activation. On sait désormais que le paradigme Th1/Th2 s'applique difficilement aux lymphocytes iNKT dont les productions d'IL-4 et d'IFN- γ sont rarement dissociables.

Notre étude qui porte essentiellement sur les fonctions régulatrices (production de cytokines) des lymphocytes iNKT en situation auto-immune dans le modèle de la souris NOD (pour « *non-obese diabetic* ») a logiquement intégré les progrès récents dans la connaissance de leurs différents modes d'activation par leurs ligands endogènes et exogènes et de leur grande plasticité sous l'effet des cytokines.

I-1 Historique de l'identification des lymphocytes iNKT

La découverte des lymphocytes iNKT est le fruit d'une démarche amorcée au début des années 90 par Albert Bendelac qui avait mis en évidence dans le thymus de la souris des lymphocytes T ayant un phénotype de cellules matures activées, capables de produire l'IL-4 et de conserver cette fonction lors de leur migration dans la rate (Bendelac and Schwartz, 1991). Cette démarche aboutissait en 1994 à la description d'une population lymphocytaire constituée d'un double contingent simple positif CD4⁺ et double négatif (DN) CD4⁻CD8⁻ et possédant une chaîne TCR- α invariante (V α 14-J α 18) associée à un répertoire TCR- β restreint (Lantz and Bendelac, 1994; Gombert et al., 1996a). A la différence des lymphocytes T conventionnels, ces lymphocytes au répertoire TCR restreint étaient sélectionnés par une molécule non classique de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) qui restait à identifier (Bendelac et al., 1994; Bix et al., 1993; Ohteki and MacDonald, 1994; Vicari et al., 1996b). Parallèlement, une population

lymphocytaire T équivalente était identifiée chez l'homme (Lantz and Bendelac, 1994). Entre 1995 et 1997, la démonstration que ces cellules sont activées et sélectionnées par la molécule CD1d était apportée (Bendelac et al., 1995; Mendiratta et al., 1997). L'identification de cette population ayant été permise grâce à sa propriété particulière de partager avec les lymphocytes NK l'expression du marqueur NK1.1., le terme « NKT » avait été logiquement choisi pour désigner cette population lymphocytaire T.

L'étape essentielle suivante dans la connaissance de la biologie des lymphocytes NKT se situe en 1997 (Kawano et al., 1997) et concerne le glycolipide synthétique α -galactosylcéramide (α -GalCer) qui avait à l'origine été isolé à partir d'éponges marines et été étudié pour ses propriétés anti-métastatiques des tumeurs hépatiques chez la souris (Natori et al., 1993). Présenté par la molécule CD1d, ce glycolipide synthétique active spécifiquement la production de cytokines tant de type Th1 (IFN- γ) que de type Th2 (IL-4) des lymphocytes T V α 14-J α 18 en se liant à leur TCR. Ce ligand a constitué ainsi un outil performant pour disséquer les mécanismes mettant en jeu ces cellules au cours des réponses immunitaires dans les modèles intégrés.

Au cours des dernières années, la population lymphocytaire NKT a été renommée successivement « V α 14 NKT » puis « iNKT » afin d'exclure toute confusion possible avec des populations T partageant certains de leurs marqueurs sans leur signature complète. On rappellera en particulier que la molécule NK1.1 qui est un marqueur « historique » des lymphocytes iNKT, n'est pas un marqueur satisfaisant puisque son expression est restreinte à trois lignées de souris (C57BL/6, NZB et SJL) (Bendelac et al., 1997), est diminuée lors de l'activation des lymphocytes iNKT (Wilson et al., 2003), ne recouvre pas l'ensemble des lymphocytes iNKT et qu'enfin il existe des lymphocytes T

non V α 14-J α 18 qui expriment la molécule NK1.1 (Hammond et al., 1999; Eberl et al., 1999). La même conclusion s'applique aux marqueurs CD122 et CD44 qui peuvent aussi être exprimés par les lymphocytes T conventionnels mémoires et/ou activés.

Chez la souris, il n'y a pas d'anticorps clonotypique disponible et c'est grâce à un outil développé récemment, le tétramère CD1d chargé avec l' α -GalCer (CD1d/ α -GalCer), que l'on peut désormais visualiser et étudier les lymphocytes iTNK sur le critère strict de leur répertoire TCR (Benlagha et al., 1999; Matsuda et al., 2000).

I-2 Un phénotype unique combinant des marqueurs des lymphocytes NK et T

Les lymphocytes iNKT ont des qualités uniques qui permettent de les distinguer à la fois des lymphocytes T mémoires conventionnels et des lymphocytes NK dont ils partagent certaines caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles.

Un phénotype de lymphocytes NK. Chez la souris, les lymphocytes iNKT partagent avec les lymphocytes NK l'expression des marqueurs DX5 (récepteur du CD49b) et NK1.1 (CD161C), de la chaîne β du récepteur de l'IL-2 (CD122) (à un niveau intermédiaire pour les lymphocytes iNKT) et des récepteurs inhibiteurs/activateurs de lyse appartenant à la famille des molécules Ly49 (Maeda et al., 2001). Les lymphocytes iNKT ont aussi un fort potentiel cytotoxique. Ils expriment les molécules FasL et TRAIL (pour « *TNF related apoptosis-inducing ligand* ») et sécrètent la perforine et des granzymes, aboutissant ainsi à un effet cytotoxique ciblé (Nieda et al., 2001; Arase et al., 1994; Kawano et al., 1998).

Un répertoire TCR restreint. Une des principales caractéristiques des lymphocytes

iNKT est l'expression d'une chaîne monomorphe TCR- α . Chez la souris, le segment génique V α 14 se réarrange avec le gène de jonction J α 18 formant ainsi une région hypervariable CDR3 (pour « *complementarity determining region 3* ») monomorphe. Près de la région de jonction V/J, des substitutions nucléotidiques non codantes ont été observées, résultant probablement de la délétion suivie de l'addition de nucléotides dans la région N (Lantz and Bendelac, 1994). La chaîne β du TCR des lymphocytes iNKT, codée par les trois segments géniques V, D et J, est relativement variable : 55% des lymphocytes iNKT possèdent ainsi le segment V β 8 (principalement V β 8.2), les segments V β 7 (12%) et V β 2 (8%) étant moins représentés (Bendelac et al., 1997). Ces chaînes β sont surexprimées par les lymphocytes iNKT comparativement aux lymphocytes T conventionnels (Matsuda et al., 2000). Les lymphocytes iNKT humains expriment la chaîne V α 24-J α 18 avec un biais de la chaîne V β 11 (dite J α Q), homologues respectivement des chaînes V α 14-J α 18 et V β 8 chez la souris.

Une des hypothèses du répertoire restreint TCR de ces cellules est que leur chaîne α invariante pourrait être générée par le même mécanisme que celui mis en jeu pour les lymphocytes T conventionnels, mais soumis à une telle pression de sélection que la séquence d'acides aminés serait conservée (Lantz and Bendelac, 1994). La perte d'expression de la chaîne V α 14-J α 18 chez des souris dont le segment génique J α 18 a été excisé (souris J α 18^{-/-}) conduit à une absence sélective des lymphocytes iNKT comme l'atteste la non production de cytokines en réponse au ligand α -GalCer par les souris mutées (Cui et al., 1997), démontrant clairement que la chaîne invariante V α 14-J α 18 est indispensable au développement des lymphocytes iNKT.

Des lymphocytes T auto-réactifs. Les lymphocytes iNKT expriment des marqueurs

associés aux lymphocytes T activés/mémoires comme l'atteste leur phénotype majoritairement CD44^{high} CD69⁺ CD45RB^{high} CD62L^{low} CCR7⁻ (Bendelac et al., 1997) associé à des fonctions de production de cytokines comprenant non seulement l'IFN- γ et l'IL-4 mais aussi l'IL-2, l'IL-5, l'IL-13, le TNF- α , et le GM-CSF (Arase et al., 1993; Yoshimoto and Paul, 1994; Stetson et al., 2003; Matsuda et al., 2003). L'acquisition de ce phénotype ne semble pas dépendre d'une stimulation antigénique exogène puisque qu'il est retrouvé dans les lymphocytes iNKT isolés à partir de cordons ombilicaux humains (D'Andrea et al., 2000) et chez les souris axéniques (Park et al., 2000). Le caractère auto-réactif des lymphocytes iNKT a été confirmé en montrant leur réactivité dépendante de la molécule CD1d en réponse à des cellules présentant l'antigène (CPA) autologues (Bendelac et al., 1995) sans l'ajout d' α -GalCer. Enfin, leur niveau d'expression du TCR inférieur à celui des lymphocytes T conventionnels pourrait aussi être le stigmate de la stimulation continue et à faible niveau des lymphocytes iNKT par des antigènes du soi. L'ensemble de ces données explique les efforts récents réalisés pour identifier des ligands endogènes des lymphocytes iNKT.

I-3 Les ligands des lymphocytes iNKT

A la différence des molécules classiques du CMH qui reconnaissent des fragments peptidiques, la molécule CD1d a une structure comprenant deux larges poches hydrophobes constituant un sillon étroit, assez profond, qui est compatible avec la reconnaissance de ligands glycolipidiques (Zeng et al., 1997; Berzins et al., 2004). L' α -GalCer est le premier ligand décrit des lymphocytes iNKT. N'étant pas exprimé dans les tissus de mammifères, il ne peut cependant pas être considéré comme un ligand

endogène des lymphocytes iNKT. Le ligand iGb3 pourrait être « la mimique » des antigènes endogènes qui restent à identifier. En tant que prototype, l' α -GalCer a facilité l'identification de ligands naturels exogènes d'origine bactérienne.

Le ligand historique α -GalCer et ses analogues. L' α -GalCer est constitué d'une chaîne carbonée, d'une chaîne d'acyle (C26) et d'une sphingosine (C18). Comme l'illustre la Figure 1, la chaîne acylée et la sphingosine interagissent avec les deux poches hydrophobes de la molécule CD1d tandis que la partie carbohydrate est reconnue par la chaîne V α 14 des lymphocytes iNKT (Joyce, 2001). Plusieurs analogues de l' α -GalCer ont été documentés pour leur propension à induire la synthèse préférentiellement de l'IL-4 (Miyamoto et al., 2001; Yu et al., 2005) ou de l'IFN- γ (Schmieg et al., 2003).

Les glycosphingolipides bactériens. Le concept des ligands exogènes bactériens est issu des observations montrant que lymphocytes iNKT reconnaissent de petites portions de certains glycolipides originaires de la paroi bactérienne comme le phosphatidylinositol ou le lipophosphoglycan (Fischer et al., 2004; Amprey et al., 2004). Deux équipes ont démontré qu'au cours d'infections par des bactéries *Sphingomonas* de type Gram négatif et ne contenant pas de lipopolysaccharide (LPS), les lymphocytes iNKT sont activés directement par un glycosphingolipide de la paroi bactérienne (Mattner et al., 2005; Kinjo et al., 2005).

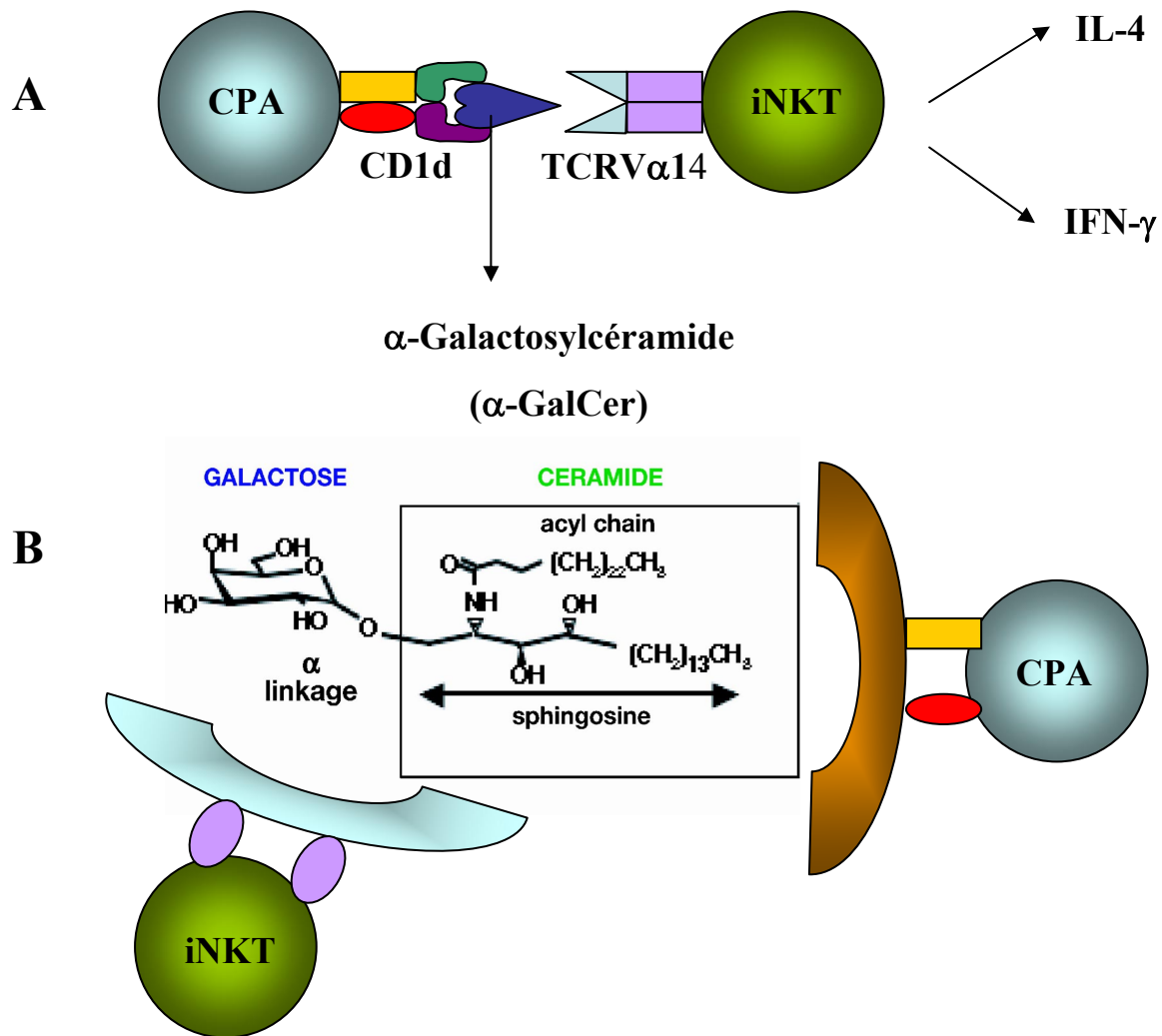


Figure 1. L' α -GalCer reconnaît spécifiquement les lymphocytes iNKT.

A. Présenté par la molécule CD1d, le glycolipide α -galactosylcéramide (α -GalCer) reconnaît spécifiquement le TCR des lymphocytes iNKT qui comprend une chaîne semi-invariante TCR- α composée des segments V α 14 et J α 18; cette reconnaissance entraîne la production massive de cytokines à la fois de type 1 (IFN- γ) et de type 2 (IL-4) par les lymphocytes iNKT.

B. La chaîne acylée et la sphingosine interagissent avec les deux poches hydrophobes de la molécule CD1d tandis que la partie carbohydrate est reconnue par la chaîne semi-invariante TCR- α des lymphocytes iNKT.

Le ligand endogène isoglobotrihexosylcéramide (iGb3). On présume que le ligand endogène des lymphocytes iNKT est un glycosphingolipide lysosomal. C'est le cas de l'iGb3 qui stimule efficacement les lymphocytes iNKT tant murins que humains, et de façon comparable au ligand synthétique α -GalCer (Zhou et al., 2004). Le fait que les souris mutées déficientes dans l'enzyme Hexb (pour « *β -hexosaminidase b subunit* »), impliquée dans la voie de dégradation des glycosphingolipides aboutissant à la formation d'iGb3; soient totalement déficientes en lymphocytes iNKT est conciliable avec une fonction endogène sélectionnant les lymphocytes iNKT. Mais cette molécule n'a jusqu'ici pas pu être décelée dans le thymus et les organes lymphoïdes périphériques tant chez l'homme que chez la souris (Zhou et al., 2004).

I-4 Le tétramère CD1d/ α -GalCer : un outil spécifique d'identification des lymphocytes iNKT

En 2000, les équipes de Bendelac et Kronenberg ont décrit un outil permettant d'identifier spécifiquement les lymphocytes iNKT. Ces cellules reconnaissant leur ligand α -GalCer *via* la molécule CD1d, les chercheurs ont créé un tétramère constitué de quatre molécules de CD1d chargées avec l' α -GalCer et couplées à un fluorochrome permettant sa visualisation (Benlagha et al., 1999; Matsuda et al., 2000; Sidobre and Kronenberg, 2002). Associé à un anticorps anti-TCR- $\alpha\beta$, le tétramère CD1d/ α -GalCer permet d'identifier spécifiquement *in vivo* ou *in vitro* les lymphocytes iNKT chez la souris aussi bien que chez l'homme. Par sa spécificité, son efficacité de fixation et sa stabilité, le tétramère CD1d/ α -GalCer constitue un outil privilégié dans le domaine de la biologie des lymphocytes iNKT, tant pour l'étude de leurs fonctions à l'échelle cellulaire dans la

dynamique des réponses immunitaires que pour l'analyse fine de leur ontogénie intrathymique (Gapin et al., 2001).

I-5 Origine et sélection des lymphocytes iNKT

L'origine des lymphocytes iNKT est restée longtemps controversée. L'hypothèse de leur développement extrathymique majoritaire est désormais exclue par les études utilisant le tétramère CD1d/ α -GalCer et apportant la démonstration définitive que le thymus est nécessaire et suffisant au développement des lymphocytes iNKT (Pellicci et al., 2002).

Les lymphocytes iNKT et les lymphocytes T conventionnels ont un précurseur commun au sein du thymus. Les lymphocytes iNKT divergent du tronc commun vraisemblablement au stade double positif $CD4^+CD8^+$ (DP) lors du réarrangement aléatoire des chaînes β et α (Gapin et al., 2001). Il faut qu'un réarrangement $V\alpha14$ - $J\alpha18$ s'apparie à une chaîne β de type $V\beta8.2$, $V\beta7$ ou $V\beta2$. Deux modèles ont été proposés pour l'explication des mécanismes de leur maturation au stade DP : 1) le modèle instructif qui postule que les thymocytes sont orientés vers la voie de différenciation en lymphocytes iNKT par la chaîne $V\alpha14$; 2) le modèle de pré-engagement qui propose que l'un des précurseurs thymiques déciderait du devenir des lymphocytes iNKT avant même le réarrangement de la chaîne TCR- $\alpha\beta$ (Kronenberg, 2005).

A la différence des lymphocytes T conventionnels dont la sélection positive dépend de cellules non hématopoïétiques, les lymphocytes iNKT sont sélectionnés par les thymocytes corticaux DP qui expriment la molécule CD1d sélectionnant les lymphocytes iNKT (Bendelac et al., 1995; Wei et al., 2005). Le ligand endogène glycolipidique permettant leur sélection positive reste à identifier. Le glycolipide iGb3 est jusqu'ici le

seul candidat (Zhou et al., 2004) mais son expression dans le thymus reste à démontrer.

L'absence de la molécule CD8 à la surface des lymphocytes iNKT résulte probablement de la forte affinité existant entre celle-ci et la molécule CD1d. Dans l'affirmative, elle témoignerait alors de l'existence d'un processus de sélection négative au cours de leur développement (Bendelac et al., 1994). L'hypothèse que les lymphocytes iNKT subissent un processus de sélection négative lors de l'engagement de leur TCR avec un glycolipide endogène a aussi été proposée à partir d'expériences montrant une inhibition de leur développement du fait de la surexpression de la molécule CD1d ou encore de l'ajout de l' α -GalCer à des cultures organotypiques de thymus fœtal (Chun et al., 2003).

Un schéma de différenciation intra-thymique des lymphocytes iNKT a été proposé par l'équipe de Bendelac (Figure 2).

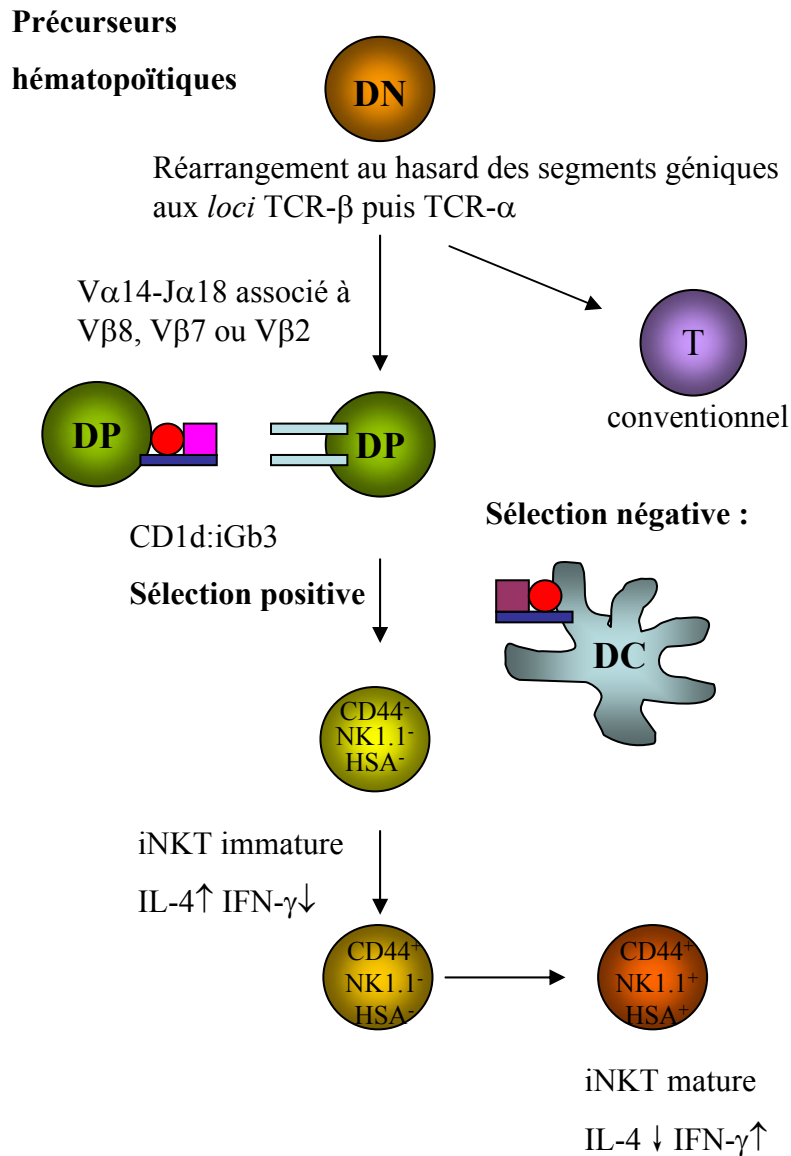


Figure 2 : Développement intra-thymique des lymphocytes iNKT.

Dans le thymus, un précurseur issu de la moelle osseuse réarrange et exprime une chaîne TCR- α semi-invariante associée à une chaîne β comprenant un segment $V\beta 8$, 7 ou 2 au stade DP. Il est alors sélectionné positivement par un thymocyte cortical DP CD1d⁺ qui lui présente un glycolipide du soi (iGb3?) et négativement par une DC de la jonction cortico-médullaire. Il acquiert successivement l'expression des molécules de surface CD44 et NK1.1. Dans ce schéma hypothétique de différenciation proposé par Bendelac et ses collaborateurs, les lymphocytes iNKT acquièrent d'abord l'expression de l'IL-4 puis celle de l'IFN- γ ; L'augmentation du niveau d'expression de l'IFN- γ accompagné d'une baisse de celui de l'IL-4 serait un critère de maturation des lymphocytes iNKT.

Au cours du premier stade de leur développement, les thymocytes iNKT expriment fortement la molécule HSA (pour « *heat stable antigen-negative* ») mais non les marqueurs CD44 et NK1.1 (premier stade). Puis ils acquièrent successivement les phénotypes HSA^{low} CD44^{high} NK1.1⁻ (deuxième stade) et enfin HSA^{low} CD44^{high} NK1.1⁺ (troisième stade). Au cours de leur différenciation, les lymphocytes iNKT basculeraient progressivement d'un profil plutôt Th2 à un profil plutôt Th1 sans pour autant que leurs productions d'IL-4 et d'IFN- γ puissent être complètement dissociées (Benlagha et al., 2002; Pellicci et al., 2002).

Certaines cytokines (IL-7 et IL-15) (Kronenberg and Gapin, 2002; Vicari et al., 1994; Vicari et al., 1996a) de même que des facteurs de transcription et des molécules de signalisation sont impliqués dans le développement des lymphocytes iNKT (Matsuda and Gapin, 2005). On citera ceux qui ont un rôle ciblant préférentiellement les lymphocytes iNKT. Il comprennent la protéine kinase Fyn, la protéine adaptatrice SAP et les récepteurs de la famille SLAM (pour « *signaling lymphocyte activation molecule* ») (Nichols et al., 2005; Pasquier et al., 2005) ainsi que le facteur de transcription T-bet (pour « *T-box expressed in T cells* ») (Townsend et al., 2004).

I-6 Localisation et homéostasie

Après leur maturation dans le thymus, les lymphocytes iNKT sont exportés dans les organes lymphoïdes périphériques où ils exercent leurs fonctions immunologiques. Chez la souris, cette exportation débute seulement entre 2 et 3 semaines de vie du fait de l'ontogenèse tardive des lymphocytes iNKT. A partir de 6-8 semaines d'âge, le nombre de lymphocytes iNKT est compris entre 0,15 et 1,5 millions selon l'organe et le fond

génétique considérés. Leur fréquence varie aussi considérablement d'un organe à l'autre. Ils représentent environ 0,5-1% des cellules thymiques, 1-2% des splénocytes, 0,5% des cellules ganglionnaires, 10-30% des cellules mononucléées du foie et 0,5% des cellules de la moelle osseuse (Bendelac et al., 1997; Brigl and Brenner, 2004). Le phénotype et le mode d'exportation des lymphocytes iNKT varient aussi en fonction des organes, rendant légitime la question de l'existence de populations lymphocytaires iNKT spécifiques d'organes. Il a aussi été proposé que certaines différences phénotypiques pourraient résulter d'une éducation locale différentielle par les cellules dendritiques (DC) (Schmieg et al., 2005).

Les lymphocytes iNKT de la rate. Environ 1,0-1,5% des lymphocytes de la rate des souris C57BL/6 sont des lymphocytes iNKT et la majorité d'entre eux (70%) exprime le marqueur CD4 (Matsuda et al., 2000) ainsi que la chaîne V β 8 (50-60%) (Matsuda et al., 2001; Benlagha et al., 1999). De même, seuls 40-60% des lymphocytes iNKT spléniques expriment le marqueur NK1.1 ; en revanche, les marqueurs DX5 et Ly49A sont plus fortement exprimés par les lymphocytes iNKT de la rate que du thymus (Eberl et al., 1999). En réponse à l'anti-CD3, les lymphocytes iNKT spléniques produisent l'IL-4 et l'IFN- γ en moindre quantité que leurs équivalents thymiques (Hammond et al., 1999).

Les lymphocytes iNKT du foie. Environ 40-60% des lymphocytes T du foie des souris C57BL/6 sont des lymphocytes iNKT. Ils résident probablement dans les sinusoides et la majorité d'entre eux (75-80%) exprime le marqueur CD4 (Matsuda et al., 2000) ainsi que la chaîne V β 8 (50-60%) (Matsuda et al., 2001; Benlagha et al., 1999). Leur profil phénotypique se rapproche de celui des lymphocytes iNKT thymiques : ils expriment le marqueur d'activation CD69 à un niveau plus élevé que dans la rate (données du

laboratoire) et la grande majorité d'entre eux (80%) exprime la molécule NK1.1 (Eberl et al., 1999). Comme ceux du thymus et de la rate, les lymphocytes iNKT du foie produisent des cytokines lors de leur stimulation par leur TCR (Emoto et al., 1995a). La possibilité de différences quantitatives entre les lymphocytes iNKT de la rate et du foie n'est pas documentée.

Certaines molécules d'adhésion et chimiokines sont essentielles au phénomène de recrutement des lymphocytes iNKT dans le foie. Ainsi, la déplétion de la molécule LFA-1 (pour « *leuckocyte function-associated antigen-1* ») (ou CD11a), qui est exprimée fortement par les lymphocytes iNKT du foie, entraîne leur quasi-disparition de cet organe (Emoto et al., 1999b). Par ailleurs, le récepteur CXCR6 semble avoir rôle primordial dans l'accumulation des lymphocytes iNKT dans le foie *via* la prolongation de leur survie (Geissmann et al., 2005).

Migration et homéostasie. La migration des lymphocytes en périphérie ou sur les sites inflammatoires où ils exercent leurs fonctions est contrôlée par l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs (Moser and Loetscher, 2001). Diverses études ont ainsi mis en évidence que la majorité des lymphocytes iNKT expriment les récepteurs de chimiokines comme CXCR3 et CXCR6 chez la souris. Ainsi les lymphocytes iNKT peuvent être recrutés dans les sites d'infection ou inflammatoires (Johnston et al., 2003).

Bien que la molécule CD1d soit impliquée dans la sélection au cours du développement des lymphocytes iNKT, leur survie chez les souris lymphopéniques ne dépend pas de cette molécule (Kronenberg and Gapin, 2002). En revanche, l'IL-15 est essentielle pour la survie, l'expansion et le renouvellement des lymphocytes iNKT en périphérie (Kronenberg and Gapin, 2002).

I-7 Interactions cellulaires et devenir des lymphocytes iNKT

La molécule CD1d est exprimée par de nombreux types cellulaires tant d'origine hématopoïétique que non hématopoïétique (hépatocytes, cellules de l'épithélium gastro-intestinal) (Brigl and Brenner, 2004; Porcelli and Modlin, 1999). Au sein du système immunitaire, les DC, les macrophages, les lymphocytes NK, les lymphocytes B et T expriment cette molécule, expliquant l'aptitude des lymphocytes iNKT à communiquer avec des cellules appartenant à la fois aux versants inné et adaptatif. Ainsi, les lymphocytes iNKT stimulés par l' α -GalCer activent les lymphocytes NK (Carnaud et al., 1999; Matsuda et al., 2003), contribuent à la différenciation des lymphocytes B (Galli et al., 2003)(et données non publiées de J.M. Gombert) et des DC (Fujii et al., 2003; Chung et al., 2004) et exercent un effet "bystander" sur les lymphocytes Th ou T effecteurs impliqués dans l'immunité adaptative (Eberl et al., 2000). Les DC constituent des partenaires efficaces pour présenter l'antigène α -GalCer et contribuer à une stimulation optimale des lymphocytes iNKT. Il faut cependant souligner que l' α -GalCer, parce qu'il est utilisé comme un stimulateur « pharmacologique » des lymphocytes iNKT, ne permet pas de rendre compte des mécanismes mis en jeu lors de leur activation naturelle.

Synapse lymphocytes iNKT/DC. Les DC constituent des partenaires essentiels des lymphocytes iNKT. Leur présentation de l'antigène α -GalCer aux lymphocytes iNKT s'accompagne d'interactions engageant les molécules CD40 et CD154 et de leur production d'IL-12 (Kitamura et al., 1999). *In vivo*, les DC CD8 α^+ sont essentielles à la présentation de l' α -GalCer et constituent la source majeure d'IL-12 en réponse au glycolipide (Schmieg et al., 2005; Bezbradica et al., 2005). Réciproquement, le dialogue entre les lymphocytes iNKT activés et les DC peut contribuer à la maturation des DC et

même orienter leurs fonctions (Fujii et al., 2003; Chung et al., 2004). Les DC peuvent alors agir comme un adjuvant de la réponse spécifique des lymphocytes T CD4 et CD8 (Fujii et al., 2003) ou relever la tolérance induite (Chung et al., 2004). Dans d'autres cas, la maturation des DC myéloïdes en présence des lymphocytes iNKT leur permet d'être accumulées dans les ganglions péri-pancréatiques, aboutissant à la tolérisation des lymphocytes T effecteurs (Chen et al., 2005). L'injection de façon continue de l' α -GalCer peut induire un profil régulateur des DC CD8 α ⁻ qui sécrètent alors de grandes quantités d'IL-10 (au lieu de l'IL-12 lors d'une injection ponctuelle) (Kojo et al., 2005).

Communication avec les lymphocytes T CD4. Dans le dialogue avec les lymphocytes iNKT, les lymphocytes T CD4 acquièrent un profil activé et peuvent être orientés vers une réponse Th1 ou Th2 (Singh et al., 1999; Cui et al., 1999). Parmi les lymphocytes T CD4, les lymphocytes Treg semblent agir de manière similaire aux lymphocytes iNKT dans certaines fonctions suppressives, ce qui est conciliable avec une coopération entre ces deux populations. Dans un modèle expérimental de la myasthénie auto-immune, les lymphocytes iNKT activés par l' α -GalCer fournissent l'IL-2 nécessaire à la survie des lymphocytes Treg qui ont un rôle protecteur dans la maladie. (Liu et al., 2005).

Devenir des lymphocytes iNKT. Après l'activation par l' α -GalCer, le destin des lymphocytes iNKT est variable. Il dépend largement du protocole de traitement comprenant la dose (forte ou faible), le mode d'administration (voie intraveineuse, intrapéritonéale ou sous-cutanée) (Furlan et al., 2003), la fréquence (unique ou itérative) et aussi du fond génétique des souris. Les premières études avaient suggéré une disparition rapide et complète des lymphocytes iNKT activés dans la rate et le foie d'animaux traités

par un anticorps anti-CD3 ou l'IL-12 (Eberl and MacDonald, 1998). L'utilisation du tétramère CD1d/ α -GalCer a permis de détecter une population résiduelle de lymphocytes iNKT après une injection d' α -GalCer et d'exclure cette hypothèse (Crowe et al., 2003; Wilson et al., 2003). L'analyse cinétique quantitative des réarrangements génomiques V α 14-J α 18 a confirmé leur survie après l'activation par l' α -GalCer (Harada et al., 2004). Ces résultats sont en faveur de l'idée que les lymphocytes iNKT résistent partiellement à l'apoptose. On sait désormais qu'après l'injection ponctuelle d' α -GalCer, les lymphocytes iNKT activés ont leurs récepteurs cellulaires de surface comprenant le TCR et la molécule NK1.1 régulés négativement, expliquant leur disparition apparente. Une seconde étape comprend leur expansion qui est suivie d'une apoptose tardive de type « homéostatique ». On sait aussi que le traitement chronique par l' α -GalCer entraîne un état d'anergie des lymphocytes iNKT qui peut dans certains cas faire suite à leur délétion et à leur repopulation dépendant du thymus (Hayakawa et al., 2004; Parekh et al., 2005).

I-8 Facteurs influençant les fonctions des lymphocytes iNKT

Un caractère remarquable des lymphocytes iNKT réside dans leur plasticité en fonction de leur micro-environnement. Des facteurs immunologiques comme les cytokines mais aussi non immunologiques comme l'oestradiol dictent ou régulent les fonctions des lymphocytes iNKT. Les travaux portant sur le rôle des molécules de co-stimulation sont rares et suggèrent une implication des couples B7/CD28 (Hayakawa et al., 2001; Kawano et al., 1997) CD40/CD154 (Hayakawa et al., 2001) et ICOS/B7RP-1 (Kaneda et al., 2005).

A l'instar des lymphocytes NK, les lymphocytes iNKT sont réactifs à l'IL-12 et à

l'IL-18 qui induisent leur production d'IFN- γ (Leite-De-Moraes et al., 1998; Leite-De-Moraes et al., 2001). Cette production d'IFN- γ peut être amplifiée lors de la stimulation concomitante du TCR des lymphocytes iNKT, laquelle entraîne en retour une sensibilisation des lymphocytes iNKT à l'IL-12 *via* l'augmentation de l'expression de leurs récepteurs (Kitamura et al., 1999). Ces données expliquent bien pourquoi en réponse à l' α -GalCer, la production de l'IFN- γ par les lymphocytes iNKT dépend en partie de l'IL-12 sécrétée par les DC. A la différence de l'IL-18 qui contribue à l'ambivalence des lymphocytes iNKT en amplifiant leurs productions à la fois d'IL-4 et d'IFN- γ sous l'impulsion de l' α -GalCer (Leite-De-Moraes et al., 2001), l'IL-7 amplifie seulement celle de l'IL-4 (Hameg et al., 1999). Enfin, la première démonstration de l'influence d'un facteur non immunologique sur les fonctions des lymphocytes iNKT a pu être apportée avec l'oestradiol. Cette hormone favorise leur production d'IFN- γ (Gourdy et al., 2005) (cf. publication annexe n°2).

Chapitre II : Fonctions des lymphocytes iNKT en situation pathologique

Comme nous l'avons déjà souligné, les fonctions des lymphocytes iNKT sont multiples et en font de véritables cellules « Janus ». Elles peuvent en effet libérer rapidement et massivement des cytokines aussi bien pro-Th1 que pro-Th2 et exercer une activité cytolytique par les voies Fas/FasL et perforine-granzyme. Ce large spectre de fonctions ainsi que leur capacité à communiquer avec les autres types cellulaires ont permis d'attribuer aux lymphocytes iNKT un rôle essentiel au cours de diverses réponses immunes. Ainsi les lymphocytes iNKT contrôlent certaines réponses anti-infectieuses et participent à la surveillance immunologique anti-tumorale ; ils auraient aussi un rôle stratégique en tant que cellules régulatrices dans le domaine de l'auto-immunité.

Les mécanismes par lesquels les lymphocytes iNKT peuvent influencer les réponses immunitaires restent à préciser. Dans certaines maladies, les lymphocytes iNKT issus de souris de fonds génétiques différents peuvent avoir des actions diamétralement opposées et qui de manière intéressante sont associées à des profils de production de cytokines Th1/Th2 différents (Hansen et al., 2003). Cette dualité fonctionnelle des cellules iNKT explique pourquoi la mise en jeu de ces cellules peut aboutir tant à des effets bénéfiques que délétères.

Plusieurs éléments moléculaires (glycolipides naturels, molécules CD1d et de co-stimulation, cytokines) influencent le développement, le recrutement et l'activation des cellules iNKT (Hameg et al., 1999; Hayakawa et al., 2001; Leite-De-Moraes et al., 2001; Leite-De-Moraes et al., 1998; McNab et al., 2005). Il est probable aussi que les lymphocytes iNKT puissent être activés par des ligands endogènes (Zhou et al., 2004). En

transmettant les signaux d'activation aux autres types cellulaires, les lymphocytes iNKT peuvent ainsi déclencher les réponses immunitaires innées et adaptatives et constituer une interface fonctionnelle entre ces deux types de réponses qu'ils coordonnent.

Les lymphocytes iNKT régulent tant les phases afférente qu'efférente des réponses immunitaires. Dans certaines situations, ils se comportent même comme des cellules effectrices (Takeda et al., 2000a; Araujo et al., 2004; Cui et al., 1997).

II-1 Fonctions des lymphocytes iNKT au cours des réponses infectieuses

L'infection microbienne : une voie « naturelle » d'activation du TCR des lymphocytes iNKT. Encore récemment, les travaux portant sur les fonctions des lymphocytes iNKT mettant en jeu leur TCR reposaient sur l'utilisation de l'agoniste synthétique α -GalCer. Il est probable que la stimulation des lymphocytes iNKT par leurs ligands naturels déclenche des réponses différentes de celle à l' α -GalCer, utilisé comme outil pharmacologique. Les travaux des deux dernières années portant sur le rôle des lymphocytes iNKT au cours des réponses anti-infectieuses ont contribué à la connaissance des modes « naturels » d'activation du TCR des lymphocytes iNKT qui sont illustrés dans la Figure 3.

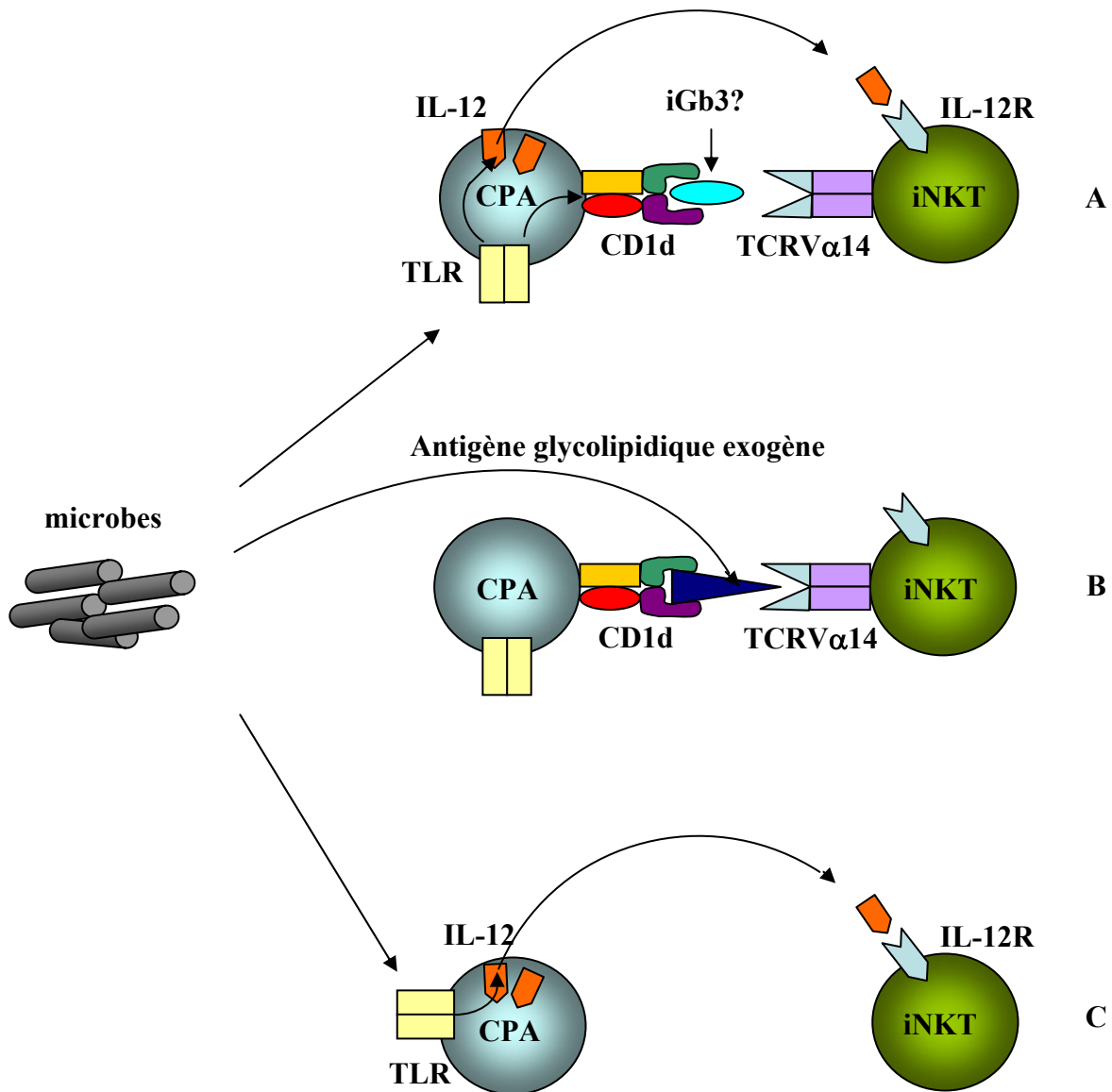


Figure 3. Trois stratégies de détection des infections bactériennes par les lymphocytes iNKT.

A. Les bactéries (Gram⁻ LPS⁺) agissent principalement en activant les DC *via* la voie TLR (pour « *Toll-like receptor* »). Secondairement, l'IL-12 sécrétée par les DC transmet un message suffisant aux lymphocytes iNKT pour amplifier leur réponse aux ligands endogènes présentés par la molécule CD1d. On n'exclut pas des effets facilitant la reconnaissance du ligand endogène (expression augmentée de la molécule CD1d ou du ligand endogène lui-même) sous l'effet de l'IL-12.

B. Les bactéries (Gram⁻ LPS⁻) comprenant *Sphingomonas* et *Ehrlichia* activent les lymphocytes iNKT *via* la présentation par la molécule CD1d d'un glycolipide bactérien ligand exogène. La production d'IL-12 permise par la synapse n'est pas illustrée.

C. Les bactéries stimulent les DC *via* la voie TLR entraînant leur production d'IL-12. Celle-ci active les lymphocytes iNKT sans engagement de leur TCR.

On sait désormais que certains agents microbiens expriment au sein de leurs parois des glycolipides capables de se lier à la molécule CD1d et d'activer les voies dépendantes du TCR des lymphocytes iNKT. C'est le cas du glycosphingolipide issu de la bactérie *Sphingomonas* (Mattner et al., 2005; Kinjo et al., 2005). De la même manière, le glycolipide PIM₄ (pour phosphatidylinositol tétramannoside) sécrété par le BCG (bacille Calmette-Guérin) *Mycobacterium bovis* pourrait activer une sous-population de lymphocytes iNKT (Fischer et al., 2004). Les lymphocytes iNKT peuvent donc dans certains cas constituer la première barrière de reconnaissance de certains agents infectieux et être ainsi l'élément déclenchant de la réponse anti-infectieuse.

La contribution des agents infectieux à la stimulation du TCR des lymphocytes iNKT peut aussi être indirecte ; elle repose alors sur le caractère auto-réactif de ces cellules qui sont susceptibles d'être activées par des ligands endogènes. Certains composés microbiens pourraient en particulier contribuer à la reconnaissance par leur TCR du ligand iGb3 (Zhou et al., 2004). C'est le cas pour un composé glycosphingolipidique dérivé de *Sphingomonas* (Kinjo et al., 2005). On soulignera aussi le travail très récent du groupe de Trottein et de ses collaborateurs montrant qu'au cours de l'infection de souris par des schistosomes, les lymphocytes iNKT hépatiques susceptibles d'être impliqués dans la réponse adaptative, sont activés de manière dépendante à la fois de la molécule CD1d et d'un ligand endogène qui pourrait être iGb3 (Mallevaey et al., 2006). De manière générale, il reste cependant à déterminer les mécanismes d'action sous-jacents. Ils pourraient comprendre la modulation de la voie de synthèse du ligand endogène, de son niveau d'expression ainsi que de celui de la molécule CD1d à la surface de la cellule présentatrice.

Par ailleurs, une étude récente suggère que la synapse auto-réactive, quasiment

silencieuse en condition normale, est révélée par la cytokine IL-12 libérée par les DC en réponse aux bactéries *via* le système de reconnaissance des récepteur Toll-like (TLR) (Brigl et al., 2003). Cette hypothèse élégante repose sur la démonstration que les lymphocytes iNKT peuvent produire l'IFN- γ en réponse à l'IL-12 de manière dépendante de la molécule CD1d. Ainsi, l'IL-12 transmettrait un message suffisant aux lymphocytes iNKT pour amplifier leurs fonctions auto-réactives.

En définitive, à côté des systèmes de détection directe de quelques microorganismes, coexisteraient donc des systèmes de détection indirecte, rendant ainsi les lymphocytes iNKT capables d'être activés *via* leur TCR suite à l'infection par des agents pathogènes n'exprimant pas de glycolipides reconnus par eux.

Les lymphocytes iNKT sont mobilisés au cours des réponses anti-infectieuses. Les lymphocytes iNKT interviennent dans de nombreuses situations infectieuses tant d'origine fongique, bactérienne, virale que parasitaire (cf. tableaux I et II récapitulatifs). Le foie joue un rôle essentiel dans les réponses immunitaires à de nombreux types d'infections. Ceci pourrait expliquer la grande réactivité des lymphocytes iNKT hépatiques qui peut se traduire par leur expansion (cas de l'infection au BCG) (Emoto et al., 1999a) ou au contraire par leur déplétion (cas de *Listéria monocytogenes*) (Emoto et al., 1995b; Ranson et al., 2005).

Au cours des infections, les lymphocytes iNKT peuvent être activés de manière dépendante de la molécule CD1d (cf. paragraphe précédent). A l'instar des lymphocytes NK, les lymphocytes iNKT peuvent aussi être activés par l'IL-12 en l'absence de la molécule CD1d. Dans les deux cas, les lymphocytes iNKT sécrèteront alors l'IFN- γ qui, à son tour, participera à l'activation d'autres types cellulaires dont les lymphocytes NK et les lymphocytes T CD8. Ce schéma d'activation cellulaire en cascade est susceptible de

contribuer à une réponse protectrice. Cependant, l'ambivalence des lymphocytes iNKT ne permet pas, en général, de présager de leur caractère bénéfique, neutre ou délétère au cours des infections.

L'ambivalence des lymphocytes iNKT au cours des réponses anti-infectieuses. On retiendra quelques exemples illustrant bien le caractère ambivalent des lymphocytes iNKT. Au cours de l'infection par *Sphingomonas*, les lymphocytes iNKT sont essentiels comme l'atteste le ralentissement de la bactériolyse chez les souris CD1d^{-/-} ou Jα18^{-/-} dépourvues de lymphocytes iNKT. Toutefois, lors d'infection par une forte charge bactérienne, ces dernières résistent mieux que les souris sauvages (Perola et al., 2002). Dans le modèle murin de la malaria cérébrale, Hansen et ses collaborateurs (Hansen et al., 2003) ont décrit que les lymphocytes iNKT ont un rôle protecteur chez la souris BALB/c et délétère chez la souris C57BL/6, montrant ainsi l'importance du fond génétique dans le déterminisme fonctionnel des cellules iNKT. En outre, l'administration de l'α-GalCer renforce l'effet protecteur des lymphocytes iNKT dans plusieurs modèles infectieux impliquant *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Trypanosma cruzi* (maladie de Chagas). Cependant, dans le modèle murin de la tuberculose, l'α-GalCer prévient la maladie sans qu'un rôle « naturel » des lymphocytes iNKT ne préexiste (Chackerian et al., 2002). Bien que les mécanismes précis par lesquels les lymphocytes iNKT ont un effet protecteur restent à identifier, il est probable que ces modèles infectieux soient très sensibles aux effets des cytokines à haute concentration, telle en particulier que l'IFN-γ dont la production par les lymphocytes iNKT est potentialisée par l'α-GalCer.

Enfin, dans divers modèles expérimentaux d'infections par des mycobactéries ou des virus, la réponse immunitaire des souris CD1d^{-/-} ou Jα18^{-/-} ne peut pas être distinguée de

celle de leurs congénères de type sauvage (Sugawara et al., 2002; Kawakami et al., 2002; Behar et al., 1999). Ces résultats révèlent la limitation du rôle « naturel » des lymphocytes iNKT dans les réponses anti-infectieuses.

Tableau I :

Rôle des lymphocytes iNKT dans les modèles infectieux bactériens et parasitaires.

Modèle murin	Effet des lymphocytes iNKT	Effet de l'̑-GalCer
<u>Mycobacterium tuberculosis</u>		
Infection par voie intra veineuse chez la souris C57BL/6 ou BALB/c	neutre	protecteur
Infection par aérosol chez la souris BALB/c	neutre	
<u>Mycobacterium bovis (BCG)</u>		
Infection par voie intra veineuse chez la souris B6 ou BALB/c	réponse inflammatoire réduite	
Infection par voie intra trachéale chez la souris BALB/c	neutre	
<u>Streptococcus pneumoniae</u>		
Souris C57BL/6	protecteur	protecteur
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>		
Infection par voie intra nasale chez la souris C57BL/6 ou BALB/c	protecteur	protecteur
Infection par voie urinaire chez la souris C57BL/6		protecteur
<u>Borrelia burgdorferi</u>		
Souris C57BL/6 ou C57BL/6x129	protecteur	
<u>Plasmodium spp (malaria)</u>		
<i>P. yoelii</i> ou <i>P. bergi</i> sporozoïtes Souris C57BL/6 ou BALB/c		protecteur
<i>P. yoelii</i> ou <i>P. bergi</i> (stade erythrocytaire) Souris C57BL/6 ou BALB/c		neutre
<i>P. bergi</i> (malaria cérébrale : stade erythrocytaire) Souris BALB/c	protecteur	
<i>P. bergi</i> (malaria cérébrale : stade erythrocytaire) Souris C57BL/6	délétère	
<u>Leishmania spp</u>		
<i>L. major</i> , infection par voie sous cutanée chez la souris C57BL/6	protecteur	
<i>L. donovani</i> , infection par voie intra veineuse chez la souris C57BL/6	protecteur	
<u>Trypanosma cruzi (maladie de Chagas)</u>		
infection par voie intra péritonéale chez la souris C57BL/6 ou BALB/c	protecteur	protecteur
infection par voie intra musculaire ou intra veineuse chez la souris C57BL/6	neutre	neutre
<u>Toxoplasma gondii</u>		
infection par voie intra péritonéale chez la souris BALB/c	délétère	
<u>Cryptococcus neoformans</u>		
infection par voie intra veineuse chez la souris C57BL/6	neutre	protecteur

En définitive, on peut considérer que les lymphocytes iNKT sont indispensables dans de nombreuses situations infectieuses ce qui peut paraître étonnant au vu de leur large spectre d'activités et de leurs modalités d'activation. On doit cependant admettre que les modèles expérimentaux utilisés qui comprennent des voies d'introduction et des charges d'agents infectieux artificielles n'ont rien de commun avec les infections induites naturellement. Quoiqu'il en soit, il est tentant de spéculer que de manière générale, les interactions entre les agents infectieux et les lymphocytes iNKT auraient comme fonction principale d'entretenir le système d'alerte constitué par les fonctions auto-réactives des lymphocytes iNKT.

Tableau II :

Rôle des lymphocytes iNKT dans les modèles d'infections virales.

Modèle murin	Effet des lymphocytes iNKT	Effet de l' α -GalCer
Hépatite B		
Souris HBV transgénique		protecteur
EMCV-D (<i>diabetogenic encéphalomyocarditis virus</i>) infection par voie intra péritonéale chez la souris BALB/c	protecteur	protecteur
RSV (<i>respiratory syncytial virus</i>)		
infection par voie intra nasale, chez la souris BALB/c	protecteur	protecteur
HSV (<i>Herpes simplex virus</i>)		
infection chez la souris C57BL/6 (HSV-1)	protecteur	
infection par voie intra vaginale chez la souris C57BL/6 (HSV-2)	protecteur	

II-2 Fonctions des lymphocytes iNKT au cours des réponses anti-tumorales

Du fait principalement de sa capacité remarquable à produire des cytokines de type Th1 comme l'IFN- γ et de son pouvoir cytotoxique, la population iNKT est susceptible de jouer un rôle essentiel au cours des réponses anti-tumorales et fait l'objet de nombreux travaux à visée thérapeutique dans ce domaine.

Parmi une littérature abondante, nous avons choisi délibérément de rapporter les travaux soulignant le rôle essentiel de l'IL-12 dans les fonctions Th1 des lymphocytes iNKT. Nous abordons aussi la question nouvelle et originale de la diversité fonctionnelle de ces cellules en fonction de leur localisation dans l'organisme.

L'IL-12 et les lymphocytes iNKT, deux acteurs complémentaires et interdépendants.

Les défenses anti-tumorales s'accompagnent souvent d'une inflammation qui peut entraîner la sécrétion de cytokines parmi lesquelles l'IL-12. La place centrale de l'IL-12 comme acteur anti-tumoral est bien reconnue dans la littérature (Tahara and Lotze, 1995). Cette cytokine est capable de mobiliser les DC, d'induire et/ou d'augmenter la cytotoxicité des lymphocytes NK et iNKT ainsi que leur production d'IFN- γ . La sécrétion d'IFN- γ est indispensable aux réponses anti-tumorales induites par les lymphocytes iNKT (Smyth et al., 2002). Elle contribue à l'activation des lymphocytes T CD8 aboutissant à une réponse protectrice adaptative.

Des études utilisant les souris $J\alpha 18^{-/-}$ ont démontré que les lymphocytes iNKT sont indispensables à l'effet protecteur de l'IL-12 endogène (Smyth et al., 2000a) ou exogène (Cui et al., 1997) dans plusieurs modèles de tumeurs. D'autres études montrent cependant qu'à la différence des lymphocytes NK, les lymphocytes iNKT sont dispensables pour

développer une réponse anti-tumorale (Park et al., 2003). En définitive, les lymphocytes iNKT étant plus sensibles à l'IL-12 que les lymphocytes NK du fait de l'expression en surface d'un nombre plus important de récepteurs de cette cytokine, la réponse anti-tumorale pourrait dépendre des lymphocytes iNKT lorsque la quantité d'IL-12 produite et/ou sa biodisponibilité sont réduites (Kitamura et al., 1999; Takeda et al., 2000b).

On connaît deux modes d'action de l'IL-12 sur les lymphocytes iNKT contribuant à leurs activités anti-tumorales : l'augmentation du pouvoir cytotoxique dépendant de la voie perforine-granzyme (Smyth et al., 2000b) et l'induction de la production d'IFN- γ . Ces deux fonctions des lymphocytes iNKT en réponse à l'IL-12 ne nécessitant pas exclusivement la mise en jeu de la molécule CD1d, les lymphocytes iNKT sont susceptibles de participer à l'activité anti-tumorale de façon non CD1d dépendante, quel que soit le type de tumeur.

Il n'est cependant pas exclu que les lymphocytes iNKT puissent aussi exercer leurs fonctions anti-tumorales *via* la reconnaissance de ligands endogènes qui seraient exprimés par les cellules tumorales. Ce mode de stimulation des cellules iNKT met aussi en jeu l'IL-12 comme l'attestent les résultats obtenus avec le ligand α -GalCer qui constitue une arme efficace pour valoriser les fonctions anti-tumorales des cellules iNKT (Smyth et al., 2000a). La synapse lymphocytes iNKT/DC permise par la reconnaissance de l' α -GalCer présentée par la molécule CD1d entraîne une augmentation du niveau d'expression de la molécule CD154 à la surface des lymphocytes iNKT (Kitamura et al., 1999). Les interactions CD154/CD40 ainsi favorisées déclenchent l'activation et la production d'IL-12 des DC. Les lymphocytes iNKT activés par leur ligand participent donc

eux-mêmes à la production d'IL-12 dans leur environnement direct, renforçant ainsi en retour l'efficacité de leur action anti-tumorale.

Les lymphocytes iNKT ont des fonctions de surveillance anti-tumorale. Les activités anti-tumorales des lymphocytes iNKT sont efficaces tant contre les tumeurs établies que contre celles en formation. Il a en effet été démontré que les souris dépourvues de lymphocytes iNKT sont particulièrement sensibles à la carcinogenèse chimique induite par le méthylcholanthrène. Ces souris développent des fibrosarcomes plus nombreux et plus rapidement que leurs congénères de type sauvage (Smyth et al., 2000a; Smyth et al., 2001) témoignant de l'implication des lymphocytes iNKT dans la surveillance anti-tumorale. Il reste à déterminer les mécanismes sous-jacents y compris l'implication possible de l'IL-12.

Le pouvoir anti-tumoral des lymphocytes iNKT du foie: une fonction spécialisée? Très récemment, Crowe et ses collaborateurs ont comparé les fonctions anti-tumorales des lymphocytes iNKT en fonction de leur localisation (thymus, rate et foie). Seuls les lymphocytes iNKT hépatiques, et plus précisément leur contingent DN, se sont montrés capables d'inhiber efficacement le développement de métastases dans plusieurs modèles tumoraux (Crowe et al., 2005). Les auteurs proposent qu'il existe des sous populations de lymphocytes iNKT « spécialisées » en fonction de leur localisation tissulaire. Bien qu'il reste à déterminer si ce concept peut être étendu à l'ensemble des fonctions des lymphocytes iNKT, il s'agit là d'un axe de recherche émergent qui devrait contribuer à mieux comprendre les bases de la dualité des lymphocytes iNKT au cours des réponses immunitaires.

La dualité fonctionnelle des lymphocytes iNKT s'applique aux réponses anti-tumorales. La réponse anti-tumorale peut également être régulée négativement par

les lymphocytes iNKT *via* leur action sur les autres types cellulaires, notamment les CTL (lymphocyte T cytotoxique) CD8 chez la souris et les lymphocytes Treg chez l'homme. Dans le modèle murin, la réponse anti-tumorale assurée par les CTL CD8 peut être supprimée par la cytokine IL-13 libérée par les lymphocytes iNKT CD4 *via* la voie de signalisation IL-4R/STAT6 (Terabe et al., 2000). Cet effet paradoxal est probablement la conséquence d'interactions multiples des lymphocytes iNKT avec les CPA qui leur transmettent différents signaux.

II-3 Fonctions tolérogènes des lymphocytes iNKT

Les lymphocytes iNKT participent aussi au processus de tolérance périphérique comme l'illustre bien le modèle de l'ACAID (pour « *anterior chamber associated-immune deviation* »).

L'œil est un site immunitaire privilégié où une tolérance est induite contre toutes les agressions de la chambre de l'œil. Le modèle expérimental de l'ACAID a révélé le rôle central de la rate dans la tolérance périphérique. Lors de l'induction de l'ACAID, le nombre de lymphocytes iNKT est augmenté dans la rate. Les souris $J\alpha 18^{-/-}$ et $CD1d^{-/-}$ peuvent développer l'ACAID, pourvu qu'elles soient reconstituées en lymphocytes iNKT. A l'inverse, le traitement par l'anticorps anti-CD1d empêche le développement de l'ACAID chez les souris sauvages (Sonoda et al., 1999). Ces résultats indiquent que l'induction de l'ACAID dépend tant des lymphocytes iNKT que de leur interaction avec la molécule CD1d.

Les mécanismes moléculaires par lesquels les lymphocytes iNKT contribuent au développement de l'ACAID sont partiellement identifiés. Ils comprennent la sécrétion

d'IL-10 par les lymphocytes iNKT (Sonoda et al., 2001). On sait aussi que les lymphocytes iNKT sécrètent RANTES (pour « *regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted* ») mais pas l'IL-4 lors de l'induction de l'ACAID (Faunce and Stein-Streilein, 2002).

Une activité tolérogène des lymphocytes iNKT a aussi pu être mise en évidence dans plusieurs modèles de GVHD (pour « *graft-versus-host disease* »). Cette maladie qui est caractérisée par une réponse des cellules T dérivées du donneur contre celles du receveur est un obstacle majeur à la transplantation de moelles osseuses allogéniques. Récemment il a été montré que l'injection de l' α -GalCer lors de la greffe est capable d'inhiber le développement de la GVHD aiguë et également de réduire la mortalité (Morecki et al., 2004). Le traitement par l' α -GalCer favorise la polarisation des cellules T issues de donneurs vers un profil Th2, connu pour être protecteur vis-à-vis de la GVHD. Le même traitement entraîne aussi une réduction de la production de TNF- α , cytokine réputée pour faciliter la GVHD. Cet effet bénéfique n'étant pas constaté chez les souris CD1d^{-/-} et IL-4^{-/-}, il a été conclu que l'effet protecteur de l' α -GalCer dans le modèle de la GVHD dépend de la production d'IL-4 par les lymphocytes iNKT (Hashimoto et al., 2005).

Une tolérisation induite par les lymphocytes iNKT a pu être mise en évidence dans d'autres modèles de transplantation (Sonoda et al., 2002; Seino et al., 2001; Sharif et al., 2001). Seule l'équipe de Taniguchi a montré un effet néfaste des lymphocytes iNKT dans un modèle de transplantation d'îlots de Langerhans, ces cellules étant responsables du rejet précoce de cette transplantation, à cause de leur production d'IFN- γ qui entraîne l'apoptose des cellules β des îlots (Yasunami et al., 2005).

En résumé, ces études apportent la démonstration que les mécanismes sous-jacents de

la tolérisation dans les organes périphériques impliquent les lymphocytes iNKT ; ces études ont aussi confirmé la dualité fonctionnelle des lymphocytes iNKT et révélé que leurs fonctions peuvent dépendre non seulement de l'IL-4 et de l'IFN- γ mais aussi de l'IL-10.

II-4 Fonctions des lymphocytes iNKT en auto-immunité

Les données de la littérature portant sur les fonctions des lymphocytes iNKT dans diverses maladies auto-immunes sont rassemblées dans le tableau III. Leur rôle peut être bénéfique, neutre, ou même délétère selon le modèle de maladie considéré et le fond génétique des souris. Le traitement par le ligand α -GalCer s'est avéré nécessaire dans certains modèles pour obtenir un effet (Kaer, 2005). Dans d'autres, il permet de moduler une activité pré-existante des lymphocytes iNKT. L'emploi de ce ligand a aussi montré que la dualité fonctionnelle des lymphocytes iNKT s'applique aux situations auto-immunes.

La plupart des études concerne des modèles de maladies auto-immunes induites expérimentalement. Elles comprennent le lupus induit par le pristane (Yang et al., 2003), la colite ulcéreuse (Heller et al., 2002), la polyarthrite rhumatoïde (Ohnishi et al., 2005) et l'EAE (pour « *experimental auto-immune encephalomyelitis* ») (Zeng et al., 2003). Dans ces modèles, la démonstration directe de l'implication des lymphocytes a pu être apportée par l'utilisation de souris $J\alpha 18^{-/-}$ disponibles dans le fond génétique C57BL/6 ou BALB/c.

Le constat est différent s'agissant des modèles auto-immuns spontanés. Les seuls travaux existants reposent sur l'utilisation du marqueur NK1.1 et concernent le lupus spontané de la souris NZW x NZW (Morshed et al., 2002). Un rôle délétère des lymphocytes iNKT a ainsi été proposé car la maladie peut être induite par le transfert de

cellules T exprimant la molécule NK1.1 (Morshed et al., 2002). Toutefois, on sait désormais que le marqueur NK1.1 n'est pas un critère suffisant pour une définition pertinente des lymphocytes iNKT.

Le modèle spontané de diabète de type 1 (T1D) de la souris NOD a aussi beaucoup été utilisé pour aborder la question du rôle des lymphocytes iNKT en situation auto-immune. Le chapitre III de notre introduction générale est consacré aux connaissances acquises dans ce domaine de recherche qui a fait l'objet de mon travail de thèse.

Les mécanismes d'action des lymphocytes iNKT dans les maladies auto-immunes restent en partie obscurs. Selon certaines études, dans les maladies dites « de type Th1 », l'action protectrice des lymphocytes iNKT s'accompagnerait d'une orientation de la population T auto-réactive vers un profil Th2 (Yang et al., 2003). Un biais de la production des cytokines Th1 et Th2 par les lymphocytes iNKT eux-mêmes pourrait expliquer partiellement leur rôle protecteur (Chiba et al., 2004; Yamamura et al., 2004). Dans d'autres études, aucune immuno-déviaton de la réponse auto-réactive n'est mise en évidence et l'effet protecteur mettant en jeu les lymphocytes iNKT dépend de l'IL-10 (Miellot et al., 2005)(cf : manuscrit annexe n°3) mais non de la cytokine « prototype Th2 » IL-4 (Mars et al., 2002).

Tableau III :

Rôle des lymphocytes iNKT dans les modèles expérimentaux auto-immuns.

Maladie auto-immune	Effet des lymphocytes iNKT	Effet de l' α -GalCer
modèle induit :		
<u>EAE</u>		
induit (MBP) chez la souris SJL		délétère
induit (MBP) chez la souris PL	neutre	protecteur
Induit (MOG 35-55) chez la souris C57BL/6	neutre	protecteur sans effet
<u>Maladies rhumatoïde et inflammatoires</u>		
Arthrite induite (collagène) chez la souris C57BL/6		protecteur
Arthrite induite (collagène) chez la souris DBA/1		protecteur
Arthrite induite (collagène) chez la souris SJL		sans effet
Arthrite induite (anticorps de sérum) chez la souris C57BL/6	délétère	délétère
Lupus (néphrite) induit (pristane) chez la souris BALB/c	protecteur	protecteur
Lupus (néphrite) induit (pristane) chez la souris SJL		délétère
<u>Colite induite (sulfate de dextran) chez la souris C57BL/6 ou C57BL/6x129</u>		protecteur
Modèle spontané :		
T1D (cf. chapitre III de l'introduction)		
Lupus (néphrite) chez la souris NZWxNZW	délétère ?	délétère
Dermatite chez la souris MRL-lpr/lpr	neutre	protecteur ou neutre

Pour illustrer la complexité des actions des lymphocytes iNKT en situation auto-immune, nous avons choisi de rapporter les données de la littérature acquises dans plusieurs modèles d'EAE.

Induite par les antigènes du système nerveux central, l'EAE est un bon modèle de sclérose en plaque. Dans ce modèle, ce sont les lymphocytes T auto-réactifs dirigés spécifiquement contre la myéline qui déclenchent la maladie. On admet généralement que les lymphocytes effecteurs sont de profil Th1 tandis que leurs équivalents auto-réactifs de

profil Th2 jouent un rôle régulateur (Owens et al., 2001). Les souris SJL qui ont un nombre réduit de lymphocytes iNKT, phénotype associé à une faible capacité de production d'IL-4 et d'IgE, sont très susceptibles au développement de l'EAE (Yoshimoto et al., 1995) alors que les souris TCR V α 14 transgéniques enrichies en lymphocytes iNKT développent une EAE moins sévère (Mars et al., 2002). Ces résultats joints à ceux montrant que le transfert adoptif de cellules TCR $\alpha\beta^+$ DX5 $^+$ (qui comprennent en partie des lymphocytes iNKT) prévient la maladie chez des souris receveuses déficientes en lymphocytes iNKT sont en faveur d'un rôle protecteur de ces cellules dans l'EAE (Fritz and Zhao, 2001). Néanmoins les études ayant documenté que les souris J α 18 $^{-/-}$ ou CD1d $^{-/-}$ développent une EAE similaire à celle de leur congénères de type sauvage (Furlan et al., 2003) indiquent que les lymphocytes iNKT n'ont pas de rôle « naturel » essentiel dans le déclenchement de l'EAE.

En ce qui concerne les stratégies de traitement basées sur l'utilisation du glycolipide α -GalCer, les données de la littérature sont difficiles à interpréter du fait de résultats non concordants. Ainsi, le traitement par l' α -GalCer peut entraîner la guérison (Jahng et al., 2001; Singh et al., 2001) ou au contraire l'exacerbation (Jahng et al., 2001) de la maladie. Il peut aussi être sans effet (Pal et al., 2001). On retiendra que le résultat délétère ou bénéfique obtenu par le traitement avec l' α -GalCer dépend non seulement du fond génétique des souris (Singh et al., 2001) mais aussi de la posologie du glycolipide (Furlan et al., 2003). Les études portant sur l'implication des cytokines dans la protection obtenue sous l'impulsion de ligands des lymphocytes iNKT sont là encore difficiles à concilier. La production d'IL-4 semble essentielle dans étude a démontré que la neutralisation de l'IL-4 n'influence pas l'effet bénéfique induit l'effet protecteur obtenu avec plusieurs

ligands des lymphocytes iNKT (Pal et al., 2001; Miyamoto et al., 2001). Cependant, une par l' α -GalCer alors que le traitement par l'anti-IFN- γ supprime cet effet (Furlan et al., 2003).

En résumé, on retiendra le rôle « régulateur » majeur exercé par les lymphocytes iNKT dans de nombreuses situations auto-immunes. Mais cette conclusion concerne exclusivement des modèles dans lesquels la maladie auto-immune est induite expérimentalement. Dans de nombreux cas, il s'agit de la mise en évidence d'un potentiel régulateur obtenu sous l'impulsion de leur ligand α -GalCer dans un cadre expérimental à visée thérapeutique.

Un point important restant posé est donc celui du rôle de l'induction « expérimentale » de la maladie dans le recrutement des lymphocytes iNKT ; cette induction, en comprenant le plus souvent une immunisation et l'administration d'adjuvants inflammatoires, est-elle nécessaire pour mobiliser les lymphocytes iNKT ? Autrement dit, en situation où la maladie se développe spontanément, les lymphocytes iNKT exercent-ils aussi un rôle régulateur ? Dans notre travail, nous tenterons de répondre à cette question essentielle en prenant appui sur le modèle spontané de diabète auto-immun de la souris NOD.

Chapitre III : La souris NOD, un modèle privilégié pour l'étude des lymphocytes iNKT en situation pathologique

III-1 Le diabète de type 1 de la souris NOD

Une maladie spontanée. La souris NOD est le modèle murin le plus utilisé pour l'étude du T1D. Cette souris développe spontanément un T1D très proche de la maladie humaine (Anderson and Bluestone, 2005; Delovitch and Singh, 1997; Bach, 1994).

L'histoire naturelle de la maladie chez la souris NOD débute à l'âge de 3-4 semaines par une infiltration progressive des régions péri-insulaires et péri-vasculaires des îlots de Langerhans par les cellules dendritiques et les macrophages puis par les lymphocytes. Cette étape est suivie par une destruction des cellules β des îlots de Langerhans qui produisent l'insuline. A partir de 12-14 semaines de vie, cette destruction peut déboucher sur un diabète clinique. Entre 25 et 30 semaines de vie, l'ensemble des souris est atteint de péri-insulite et l'incidence du diabète est de 70-90% chez les souris femelles.

De manière concomitante, la souris NOD peut développer spontanément d'autres maladies auto-immunes comme la thyroïdite auto-immune (Many et al., 1996) et la sialite (Hu et al., 1992). De plus, il est bien documenté que le fond génétique de la souris NOD est particulièrement favorable au développement de maladies auto-immunes induites expérimentalement comme l'EAE (encéphalite auto-immune expérimentale) (Mars et al., 2002) et le lupus induit par le BCG (Silveira and Baxter, 2001).

Une maladie polygénique. Le T1D est contrôlé par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Chez la souris NOD, la molécule de classe II du CMH I-A^{g7} est indispensable mais non suffisante pour le développement du diabète (Wicker et al.,

1995). En fait, il s'agit d'une maladie polygénique comme l'attestent la vingtaine de gènes de susceptibilité (*idd*) déjà identifiés. Les éléments structuraux ou régulateurs liés à ces *loci* restent inconnus dans la plupart des cas (Todd and Wicker, 2001). On soulignera cependant l'existence de gènes candidats comme ceux codant la molécule de co-stimulation CTLA-4 (Ueda et al., 2003) ou la cytokine IL-2 (Wicker et al., 2005).

L'existence de multiples *loci* de susceptibilité chez la souris NOD montre la complexité génétique du T1D et est conciliable avec l'existence de multiples déficits, en particulier immunitaires.

Les effecteurs de la maladie sont des lymphocytes T. Les cellules T CD4 et CD8 sont responsables du déclenchement du T1D (Wicker et al., 1986; Bendelac et al., 1987; Bach, 1994). L'administration d'anticorps déplaçant ces cellules supprime la maladie; les lymphocytes T isolés de souris diabétiques sont capables de transférer un T1D à des receveurs syngéniques immuno-incompétents (Shizuru et al., 1988). Des expériences de transfert adoptif ont montré le rôle essentiel et coopératif des lymphocytes T CD4 et CD8 dans le développement de la maladie (Wang et al., 1996).

Mécanismes protecteurs actifs mettant en jeu des lymphocytes T CD4. Dès 1989, Boitard et ses collaborateurs apportaient la démonstration de l'existence de lymphocytes T CD4 capables de contrecarrer l'activité diabétogène des lymphocytes effecteurs auto-réactifs (Boitard et al., 1989). Cette démonstration repose sur des expériences dans lesquelles les lymphocytes testés pour leurs fonctions suppressives et provenant de souris jeunes et non diabétiques sont co-transférés à des receveurs syngéniques immuno-incompétents (souris NOD-*scid*) avec des cellules spléniques provenant de souris diabétiques et donc capables par elles-mêmes de transférer le diabète. Ces expériences, dites de co-transfert, ont permis à plusieurs autres équipes, y compris dans notre

laboratoire, de préciser la nature des lymphocytes T CD4 régulateurs/suppresseurs. On sait ainsi que les populations de splénocytes et de thymocytes matures $CD4^+CD62L^+$ contiennent des cellules supprimant le diabète (Herbelin et al., 1998; Lepault et al., 1995). Il n'y a jusqu'à ce jour aucune description d'un rôle protecteur exercé par une sous population lymphocytaire de phénotype $CD4^+CD62L^-$. Le fait qu'on ne révèle pas d'activité suppressive dans la fraction de splénocytes $CD4^+CD62L^-$ peut être lié au fait que celle-ci est enrichie en cellules diabétogènes (Lepault et al., 1995; Lepault and Gagnerault, 2000). On ne peut donc pas exclure l'existence de lymphocytes contrecarrant le diabète ayant le phénotype $CD4^+CD62L^-$. Il s'agit d'un point important puisque les lymphocytes iNKT expriment un phénotype dit de cellules T mémoires caractérisé par la non expression de la molécule CD62L. A cet égard, en prenant appui sur le même modèle de co-transfert, une étude conclut à un rôle protecteur des lymphocytes iNKT (Lehuen et al., 1998).

Depuis l'année 2000, on sait grâce aux travaux de Salomon et de ses collaborateurs que l'activité suppressive des lymphocytes T CD4 mise en évidence en situation de co-transfert doit être attribuée, au moins en partie, à la population Treg (Salomon et al., 2000). Cette population cellulaire qui exprime le marqueur CD25 et le facteur de transcription « *Forkhead box* » (Fox)p3, bien qu'en partie déficiente en nombre chez la souris NOD, semble efficace pour prévenir le diabète au cours des trois premiers mois de vie (Salomon et al., 2000).

Les hypothèses pathogéniques. Différents mécanismes immunologiques pouvant expliquer la susceptibilité de la souris NOD au T1D ont été proposés. Ils comprennent en particulier des défauts de tolérance centrale et périphérique (Anderson and Bluestone, 2005). Dans le thymus de la souris NOD, les cellules T auto-réactives échappent à la délétion tandis que la génération des cellules T régulatrices est freinée. Dans les organes

périphériques, en rencontrant leurs antigènes dans les ganglions pancréatiques, les cellules auto-réactives prolifèrent et deviennent des cellules effectrices au lieu de subir la délétion, l'anergie ou la suppression de leurs fonctions par des cellules T régulatrices.

Le paradigme Th1/Th2 appliqué au T1D : une source lymphocytaire d'IL-4 défectueuse en lien avec le T1D ? Il est généralement admis que le T1D de la souris NOD met en jeu des effecteurs Th1 dont le développement peut être contrecarré par des cytokines Th2. De ce fait, l'hypothèse d'un défaut intrinsèque de la voie Th2 est attrayante. A cet égard, de nombreux travaux ont été axés au cours des années 1990 sur l'identification des populations T productrices d'IL-4 et de leur défaut éventuel chez la souris NOD. On notera cependant aussi que plusieurs facteurs extrinsèques comprenant les molécules de co-stimulation CD28 et B7 (Lenschow et al., 1995) et les facteurs de transcription STAT-4 (Yang et al., 2004) et STAT6 (Chatenoud et al., 2001) ont aussi été évoqués comme pouvant affecter la susceptibilité du T1D en influençant l'équilibre Th1/Th2 de la réponse auto-réactive.

Les arguments principaux en faveur d'un déséquilibre Th1/Th2 favorisant le versant Th1 de la réponse auto-réactive et le développement du diabète chez la souris NOD sont les suivants : 1) l'insulite destructrice est caractérisée par un rapport IFN- γ /IL-4 élevé *in situ* (Rabinovitch et al., 1995); 2) les cytokines produites dans l'environnement immédiat des îlots sont plutôt aussi de type Th1 et favorisent le recrutement des cellules T CD4 réactives à l'îlot (Hill et al., 2003); 3) plus généralement, les CPA issues de la souris NOD produisent des cytokines plutôt de type Th1 par rapport aux autres souches de souris (Poligone et al., 2002; Marleau and Singh, 2002); 4) ces dysfonctions de production de cytokines sont apparues en lien avec certaines régions génétiques de la souris NOD (Simpson et al., 2003); 5) le traitement de la souris NOD par les cytokines favorisant la

réponse Th1 comme l'IL-12 (Trembleau et al., 1995) entraîne un déclenchement plus précoce du T1D alors qu'à l'inverse, le traitement par l'IL-4 diminue l'incidence du T1D (Delovitch and Singh, 1997; Falcone and Sarvetnick, 1999; Rabinovitch, 1994).

Ces données jointes à la démonstration que la progression du T1D est prévenue ou retardée par des mécanismes protecteurs actifs faisant intervenir les cellules T CD4 ont conduit plusieurs équipes à proposer que celles-ci pourraient agir en polarisant la réponse auto-réactive vers un profil Th2 par le biais de la production de cytokines et en particulier de l'IL-4 (Delovitch and Singh, 1997).

Dès 1993, le groupe de Delovitch décrivait un défaut de production d'IL-4 par les thymocytes de la souris NOD (Rapoport et al., 1993). En 1996, notre laboratoire a pu apporter la démonstration que ce défaut thymique était conscrit à la population minoritaire iNKT (Gombert et al., 1996a). Il s'agissait là de la démonstration *princeps* d'un déficit des cellules iNKT chez la souris en situation pathologique.

Comme nous l'avons déjà souligné, lors de l'engagement de leur TCR, les lymphocytes iNKT produisent rapidement plusieurs cytokines dont en particulier l'IL-4 (Bendelac et al., 1997). De plus, au sein du contingent de lymphocytes CD4, ils constituent la source quasi-exclusive d'IL-4 comme l'illustrent bien les travaux de l'équipe de Stetson montrant que ces cellules possèdent 1000 fois plus de mRNA codant l'IL-4 que les cellules T CD4 conventionnelles (Stetson et al., 2003). Les lymphocytes iNKT sont donc une source tant prédominante que précoce d'IL-4.

Si l'on considère l'élaboration d'une réponse auto-réactive Th2 comme étant protectrice ou neutre vis-à-vis du diabète de la souris NOD, les lymphocytes iNKT doivent alors bien être considérés comme un candidat cellulaire idéal pour contrecarrer le diabète. En effet, l'IL-4 est quasi-indispensable au développement de la réponse Th2 inhibant

simultanément le développement de la réponse Th1 et c'est la production précoce et massive de l'IL-4 dans l'environnement immédiat de la réponse immune primaire qui détermine la différenciation des cellules naïves en cellules effectrices de type Th2 (Seder et al., 1992).

Un défaut numérique et/ou fonctionnel de cette population T particulière pourrait donc à lui seul expliquer le défaut de production d'IL-4 de la souris NOD et par voie de conséquence l'orientation Th1 de la réponse auto-réactive qui est effectrice de la maladie.

III-2 Les lymphocytes iNKT et la souris NOD

Le déficit en lymphocytes iNKT de la souris NOD. Bien que partiel, le déficit des lymphocytes iNKT de la souris NOD est à la fois numérique et fonctionnel. Il préexiste dans le thymus, berceau ontogénique de ces cellules, avec un nombre réduit de cellules dès 3 semaines de vie, s'accompagnant d'un défaut de production des cytokines (IL-4 et IFN- γ) ; il persiste dans la rate où il est encore aggravé à l'âge adulte (Gombert et al., 1996a). Le fait que ces résultats acquis dans le laboratoire aient été confirmés par plusieurs autres équipes indépendantes utilisant d'autres colonies de souris NOD (Baxter et al., 1997; Falcone et al., 1999) permet d'exclure que le phénotype pertinent mis en évidence résulte d'une dérive génétique de notre colonie.

L'origine des défauts quantitatif et qualitatif des lymphocytes iNKT reste inconnue. L'hypothèse d'un déficit lié à la molécule CD1d, bien qu'attrayante, est incertaine. Nous avons documenté que le niveau d'expression basale de cette molécule par les thymocytes DP n'est pas modifié entre la souris NOD et la souris C57BL/6 (DEA, Ren Zhu, 2000). Par ailleurs, l'équipe de Sarvetnick montre que l'expression de la molécule CD1d des DC

activées issues de moelles osseuses de souris NOD est plus faible que celle des souris C57BL/6 (Falcone et al., 2004) mais nos études utilisant des CPA de souris NOD et congéniques B6.H-2NOD n'ont révélé aucune modification dans les fonctions de présentation de l' α -GalCer entre la souris NOD et C57BL/6 (DEA, Ren Zhu, 2000).

La possibilité d'un défaut d'un facteur impliqué dans la prolifération et le développement de la population iNKT peut aussi être évoquée. Nous avons documenté que l'IL-7, qui est sécrétée par le stroma thymique, est un facteur essentiel de différenciation et d'expansion des lymphocytes iNKT (Gombert et al., 1996b; Hameg et al., 1999; Leite-de-Moraes et al., 1997; Vicari et al., 1994; Vicari et al., 1996a). De plus, le déficit des lymphocytes iNKT peut être corrigé tant *in vitro* que *in vivo* dans la rate par un traitement par l'IL-7 (Hameg et al., 1999). Malgré tout, un déficit et/ou une bioindisponibilité de l'IL-7, s'ils existaient, seraient alors discrets, très localisés et donc difficiles à documenter. En effet, on sait que la souris déficiente en IL-7 (IL-7^{-/-}) a une lymphopénie majeure alors que l'on ne note aucune lymphopénie, même mineure, chez la souris NOD. Enfin, en prenant appui sur des expériences de reconstitution du compartiment lymphocytaire T de souris NOD-*scid* ou BALB/c-*scid* par des précurseurs thymiques provenant de souris NOD, NOR et AKR, Yang et ses collaborateurs ont conclu en l'existence d'un défaut intrinsèque des précurseurs des lymphocytes iNKT de la souris NOD plutôt que de leur microenvironnement thymique (Yang et al., 2001).

Les études génétiques ont contribué à l'identification de *loci* impliqués dans l'ontogénèse et les fonctions des lymphocytes iNKT et faisant défaut chez la souris NOD (Esteban et al., 2003; Carnaud et al., 2001; Rocha-Campos et al., 2006). En particulier, nous avons décrit une souris NOD congénique d'intérêt (souris NOD Fcgr2.B6) qui a sa population iNKT en partie normalisée (Rocha-Campos et al., 2006). Parmi les gènes

localisés dans la région congénique d'intérêt, on citera ceux codant les molécules de la famille SLAM, qui du fait de leur implication bien documentée dans le développement des lymphocytes iNKT (Pasquier et al., 2005), constituent d'excellents candidats pour expliquer, au moins en partie, le statut particulier des lymphocytes iNKT de la souris NOD.

L'hypothèse d'un rôle protecteur des lymphocytes iNKT dans le T1D. Le déficit des cellules iNKT chez la souris NOD pose la question de son lien avec la susceptibilité au T1D. Il s'agit d'une question essentielle si on se réfère aux travaux documentant aussi chez l'homme un déficit de ces cellules associé à la maladie (Wilson et al., 1998; Kukreja et al., 2002). Autrement dit, certains des mécanismes protecteurs actifs prévenant la progression de l'insulite feraient intervenir les lymphocytes iNKT mais du fait de leurs anomalies fonctionnelles et de leur trop faible représentation en périphérie, ces cellules seraient incapables à terme de prévenir le diabète.

Au cours des dernières années, plusieurs stratégies ont été employées pour rechercher si la restauration d'un nombre normal de cellules iNKT peut entraîner une suppression du diabète. Les résultats obtenus par plusieurs groupes, bien que difficiles à interpréter du fait de l'utilisation de modèles intégrés éloignés de la maladie spontanée (comportant notamment des transferts semi-allogéniques, la manipulation *in vitro* de sources enrichies de cellules iNKT, l'utilisation de souris transgéniques V α 14-J α 18 et CD1d) suggèrent néanmoins que les cellules iNKT ont une activité suppressive/protectrice vis-à-vis du T1D (Lehuen et al., 1998; Hammond et al., 1998; Falcone et al., 2004; Beaudoin et al., 2002).

Dès 1997, l'équipe de Baxter a montré que le transfert adoptif semi-allogénique (NOD x BALB/c) de cellules DN thymiques enrichies en lymphocytes iNKT protège les receveurs NOD contre le T1D (Hammond et al., 1998; Baxter et al., 1997). En 1998,

Lehuen et ses collaborateurs ont décrit chez des souris NOD transgéniques V α 14-J α 18 une fréquence de diabète significativement réduite. Cette protection partielle a pu être corrélée avec une augmentation de la fréquence des lymphocytes iNKT. De manière intéressante, cette restauration des lymphocytes iNKT s'accompagnait bien d'une normalisation de leur production d'IL-4 en réponse à une stimulation polyclonale par l'anticorps anti-CD3 (Lehuen et al., 1998).

Une approche complémentaire a reposé sur la construction de lignées NOD chez lesquelles la population iNKT est soit partiellement restaurée, soit à l'inverse délétée. L'intérêt de l'utilisation de ces lignées, contrairement aux lignées transgéniques V α 14-J α 18, est qu'elles sont supposées conserver un répertoire diabétogène polyclonal et complet. C'est le cas en particulier de la souris NOD congénique pour le locus *NKR-PI* provenant de la lignée de souris C57BL/6 qui a été produite dans le laboratoire. Chez cette souris, la restauration partielle du nombre de cellules iNKT s'est accompagnée d'une réduction partielle mais significative de l'incidence du diabète (Carnaud et al., 2001).

Plusieurs équipes ont aussi produit des lignées NOD CD1d^{-/-} (dépourvues de cellules iNKT du fait de l'absence de la molécule CD1d qui les sélectionne) mais les résultats obtenus ne sont pas concordants. En fonction de la lignée CD1d^{-/-} considérée, l'incidence du diabète spontané est accélérée (Shi et al., 2001; Wang et al., 2001) ou inchangée (Hong et al., 2001). Ces résultats divergents peuvent être liés à des différences dans les statuts sanitaires des animaleries hébergeant ces lignées. Ils peuvent aussi être la conséquence d'une hétérogénéité liée au fond génétique ; on sait en particulier que quatre *loci* de susceptibilité du diabète (*idd3*, *idd10*, *idd17* et *idd18*) sont localisés dans les régions flanquantes du gène codant CD1d.

Démonstration d'une fonction pro-Th2 efficace des lymphocytes iNKT de la souris

NOD. La littérature s'accorde à considérer la souris NOD comme une lignée dans laquelle la réponse auto-immune Th1 est facilitée du fait d'un défaut de la voie de différenciation Th2. Cependant, plusieurs études ont montré que cette souris est capable avant l'âge adulte de développer une réponse Th2 efficace vis-à-vis d'antigènes protéiques (Tian et al., 1997; Tian et al., 2002).

Des travaux du laboratoire ont eu pour but de déterminer si le déficit partiel en cellules iNKT de la souris NOD était susceptible d'être responsable de défauts de différenciation Th2 au cours d'une réponse immunitaire conventionnelle protéique à l'âge adulte. Dans ce but, un modèle Th2 pour lequel une dépendance vis-à-vis des cellules iNKT avait été démontrée au préalable chez les souris normales C57BL/6 et BALB/c (Akbari et al., 2003; Lisbonne et al., 2003) a été appliqué à la souris NOD. Il s'agit d'un modèle d'asthme allergique expérimental dans lequel l'immunisation et la provocation intra-nasale par l'antigène entraînent une inflammation pulmonaire de type Th2, comprenant en particulier la production locale de mucus, des cytokines IL-4, IL-5, IL-13 et éotaxine, une éosinophilie et l'augmentation de la réactivité bronchique.

De manière remarquable, la souris NOD s'est avérée développer un asthme allergique expérimental exacerbé comparativement à celui de la souche de référence Th2 BALB/c (Araujo et al., 2004) (cf : manuscrit annexe n°1). Cette exacerbation concerne tous les paramètres biologiques et clinique associés à l'asthme. Mais de manière inattendue, une diminution significative de la réaction asthmatique a été obtenue chez les souris NOD CD1d^{-/-} qui sont déficientes en cellules dépendant de la molécule CD1d, y compris les lymphocytes iNKT, comparativement aux souris NOD sauvages. Par conséquent, malgré leur défaut partiel, les lymphocytes iNKT de la souris NOD restent efficaces pour contribuer à une réponse Th2. Cette conclusion a pu être récemment

confirmée par l'emploi de souris NOD $J\alpha 18^{-/-}$, qui sont dépourvues strictement des cellules iNKT et que nous avons produites dans le laboratoire (données du laboratoire non publiées).

En définitive, bien que reposant sur un faisceau d'arguments solides, l'hypothèse que le déficit des lymphocytes iNKT de la souris NOD facilite l'émergence du diabète doit être confirmée. Par ailleurs, comme l'attestent les résultats obtenus dans un modèle d'asthme allergique expérimental, malgré ses défauts, la population iNKT de la souris NOD reste efficace comme co-effecteur Th2. Il est donc envisageable d'évaluer le potentiel protecteur de cette population cellulaire vis-à-vis du T1D. Une telle évaluation a été permise par le traitement des souris NOD par le ligand spécifique des lymphocytes iNKT, l' α -GalCer. Elle fait l'objet de la première partie de mon travail de thèse.

Résultats

Résultats Partie I

Dans cette première partie de notre travail, nous avons utilisé le modèle spontané de T1D de la souris NOD afin de déterminer si les lymphocytes iNKT, d'une part, constituent un outil essentiel de traitement du T1D lorsqu'ils sont activés par leur ligand α -GalCer (manuscrit n°1), et d'autre part, ont une fonction protectrice « naturelle » vis-à-vis de cette maladie (manuscrits n°2 et n°3).

Manuscrit n°1

Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of auto-immune Type 1 diabetes

Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, Mi QS, Sondhi J, Naidenko V, Kronenberg M, Koezuka Y, Delovitch TL, Gombert JM, Leite-De-Moraes M, Gouarin C, Zhu R, Hameg A, Nakayama T, Taniguchi M, Lepault F, Lehuen A, Bach JF, Herbelin A. *Nature Medicine* 2001. 7:1057-1062

Malgré leur défaut numérique et fonctionnel, les lymphocytes iNKT de la souris NOD peuvent être activés spécifiquement par leur ligand α -GalCer en produisant rapidement des cytokines. Ceci nous a conduits à évaluer si le traitement par l' α -GalCer pouvait prévenir le développement du T1D. Le traitement itératif de la souris NOD par l' α -GalCer entre 3 et 5 semaines de vie ralentit l'apparition de la maladie et réduit significativement son incidence. Cette protection par l' α -GalCer est associée successivement à une suppression spécifique et à une immuno-déviations Th2 des réponses auto-réactives T et B dirigées contre les îlots de Langerhans. La stimulation du TCR par le ligand exogène est nécessaire comme l'atteste la non modification de l'incidence du T1D après correction du défaut des lymphocytes iNKT de la souris NOD par l'IL-7.

Ainsi l'activation « pharmacologique » du TCR des lymphocytes iNKT par leur antigène synthétique α -GalCer constitue une arme thérapeutique de traitement du T1D de la souris NOD.



Activation of natural killer T cells by α -galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes

SHAYAN SHARIF¹, GUILLERMO A. ARREAZA¹, PETER ZUCKER¹, QING-SHENG MI¹, JITIN SONDHI¹, OLGA V. NAIDENKO², MITCHELL KRONENBERG², YASUHIKO KOEZUKA³ & TERRY L. DELOVITCH^{1,4}

¹Autoimmunity/Diabetes Group, The John P. Robarts Research Institute, London, Ontario, Canada

²La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego, California, USA

³Pharmaceutical Research Laboratory, Kirin Brewery Co, Ltd., Gumma, Japan

⁴Departments of Microbiology and Immunology, and Medicine, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada

JEAN-MARC GOMBERT^{5,6}, MARIA LEITE-DE-MORAES⁷, CHRISTINE GOUARIN⁵, REN ZHU⁵, AGATHE HAMEG⁵, TOSHINORI NAKAYAMA⁸, MASARU TANIGUCHI⁸, FRANÇOISE LEPAULT⁷, AGNÈS LEHUEN⁵, JEAN-FRANÇOIS BACH⁵ & ANDRÉ HERBELIN⁵

⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM),

U 25 et Centre de l'Association Claude Bernard, Hôpital Necker, Paris, France

⁶Present adress: Laboratoire d'Immunologie,

Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers-FRE, Poitiers 86000, France

⁷Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 8603, Hôpital Necker, Paris, France

⁸Core Research for Evolutional Science and Technology, Chiba University, Chiba, Japan

These two groups contributed equally to this study.

Correspondence should be addressed to T.L.D.; email: del@rri.on.ca or J.F.B.; email: bach@necker.fr

Type 1 diabetes (T1D) in non-obese diabetic (NOD) mice may be favored by immune dysregulation leading to the hyporesponsiveness of regulatory T cells and activation of effector T-helper type 1 (Th1) cells¹. The immunoregulatory activity of natural killer T (NKT) cells is well documented^{2,3}, and both interleukin (IL)-4 and IL-10 secreted by NKT cells have important roles in mediating this activity^{4,5}. NKT cells are less frequent and display deficient IL-4 responses in both NOD mice^{6,7} and individuals at risk for T1D (ref. 8), and this deficiency may lead to T1D (refs. 1,6–9). Thus, given that NKT cells respond to the α -galactosylceramide (α -GalCer) glycolipid in a CD1d-restricted manner by secretion of Th2 cytokines^{10–12}, we reasoned that activation of NKT cells by α -GalCer might prevent the onset and/or recurrence of T1D. Here we show that α -GalCer treatment, even when initiated after the onset of insulinitis, protects female NOD mice from T1D and prolongs the survival of pancreatic islets transplanted into newly diabetic NOD mice. In addition, when administered after the onset of insulinitis, α -GalCer and IL-7 displayed synergistic effects, possibly via the ability of IL-7 to render NKT cells fully responsive to α -GalCer. Protection from T1D by α -GalCer was associated with the suppression of both T- and B-cell autoimmunity to islet β cells and with a polarized Th2-like response in spleen and pancreas of these mice. These findings raise the possibility that α -GalCer treatment might be used therapeutically to prevent the onset and recurrence of human T1D.

The putative involvement of natural killer T (NKT) cells in the control of islet β -cell reactive T cells was suggested by prevention of diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice following infusion of

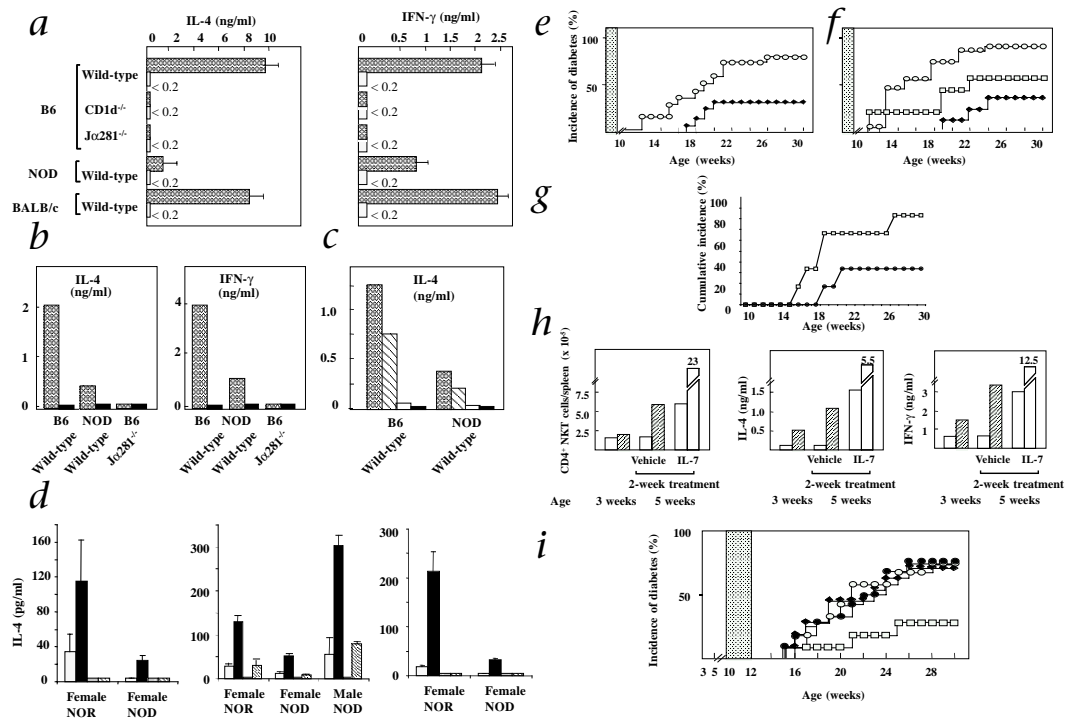
NKT-cell enriched thymocyte preparations and by over-expression of NKT cells in V α 14-J α 281 transgenic NOD mice^{9,13}. Although the mechanisms underlying these findings are unclear^{1,3,14,15}, we reasoned that the onset of Type 1 diabetes (T1D) and its recurrence after islet transplantation might be prevented in NOD mice by stimulating NKT-cell function. This approach was enabled by the availability of a selective NKT-cell ligand, α -galactosylceramide (α -GalCer)¹⁰, a synthetic glycolipid that binds to CD1d and strongly stimulates NKT-cell function such as cytokine production^{10,16,17}.

We first examined whether α -GalCer stimulates cytokine production in NOD mice despite the reduced NKT-cell pool present in these mice^{3,7}. Treatment of NOD mice with α -GalCer resulted in the rapid appearance of cytokines in the serum, although the responses were significantly lower than those in non-autoimmune mice (Fig. 1a). This cytokine response was CD1d-dependent, as it was blocked in J α 281-deficient and CD1d-deficient B6 mice as well as by *in vitro* treatment of NOD cells with a monoclonal antibody against CD1d (anti-CD1d). *In vitro* cytokine production by enriched CD4⁺ or NKT splenocytes in response to α -GalCer was substantially weaker in NOD than in B6 mice, in agreement with our previous studies of stimulation of NKT cells by a polyclonal antibody against TCR (anti-TCR)^{7,18} (Fig. 1b and c). Moreover, the deficit in interleukin (IL)-4 production was more apparent in female than male NOD mice and was evident at various times during progression to onset of T1D (Fig. 1d).

We next investigated whether modulation of NKT cells by α -GalCer prevents T1D even when administered after the onset of insulinitis. Treatment with α -GalCer (2 μ g/d/mouse, intravenous (i.v.) + intraperitoneal (i.p.)) begun at 3–4 weeks of age significantly de-



Fig. 1 α -GalCer stimulates IL-4 and IFN- γ production by NKT cells and prevents T1D in NOD mice. **a-d**, Cytokine deficiency in splenic NKT cells of NOD mice. **a**, Mice were injected either with α -GalCer (■) or vehicle alone (□). IL-4 and IFN- γ levels in the serum were measured. **b** and **c**, Splenic CD4⁺ (b) or sorted CD4⁺CD44⁺CD122⁺ NKT (c) cells were cultured with α -GalCer (■), immobilized anti-TCR (⊞) or vehicle alone (□) in the presence (■) or absence (□) of blocking anti-CD1d. IL-4 and IFN- γ levels in the culture supernatants were determined by ELISA. Data from 3 experiments are shown as mean \pm s.e.m. values from 3 or 4 mice/group. **d**, α -GalCer-induced IL-4 response in splenocyte culture supernatants from mice treated with α -GalCer (□), treated *in vivo* and stimulated *in vitro* with α -GalCer (■), stimulated only *in vitro* (⊞), or not stimulated (⊞). Mean values from either 6-wk-old (left panel), 8-wk-old (middle panel) or 10-wk-old (right panel) mice (≥ 3 /group). NOR, non-obese diabetes resistant. The difference within each group was significant ($P \leq 0.05$). **e-g**, Protective effects of α -GalCer against spontaneous T1D. **e** and **f**, Female NOD mice were treated daily with α -GalCer (◆; $n = 15$ in **e** and $n = 9$ in **f**), α -GalCer every other day (□; $n = 9$ in **f**) or vehicle every day (○; $n = 14$ in **e** and $n = 17$ in **f**) for different periods (⊞). Differences in 30 wk old mice between vehicle and α -GalCer treatments were significant (α -GalCer every day: $P = 0.014$ (**e**) and $P < 0.001$ (**f**), α -GalCer every other day: $P = 0.018$ (**e**)). **g**, Female NOD mice ($n = 6$ /group) received α -GalCer (●), or vehicle (□) starting at 10 wk of age and booster at 11 and 14 wk of age. **h**, IL-7 treatment



of female NOD mice is accompanied by an increase in NKT-cell number and cytokine production capacity. NKT-cell number (CD4⁺CD122⁺CD44⁺CD3^{int}) per spleen and cytokine production by CD4⁺ spleen cells before and after IL-7 treatment in NOD (□) and B6 (⊞) mice. CD4⁺ spleen cells were immobilized anti-TCR for 60 h and cytokine levels in supernatants determined by ELISA. Data represent mean \pm s.e.m. of 2 or 3 mice/group. **i**, Treatment with IL-7 plus α -GalCer prevents T1D after the onset of insulinitis. Female NOD mice (10–12-wk-old) were injected daily for the period shown (⊞) with either vehicle (◆; $n = 12$), IL-7 (●; $n = 12$), α -GalCer (○; $n = 11$) or α -GalCer + IL-7 (□; $n = 11$). Differences observed at 30 wk of age between vehicle- and α -GalCer + IL-7-treated mice were significant ($P = 0.005$).

layed (by 5–8 wk) and reduced the incidence of T1D from 80–90% to 33% in female NOD mice at 30 weeks of age (Figs. 1e and f). Administration of only one or two injections of α -GalCer did not protect against T1D, despite the initial burst of cytokine production (data not shown). In addition, when α -GalCer treatment was initiated at 10 weeks of age, no significant protection from T1D was evident (see Fig. 1i). However, the use of a higher dose (5 μ g/mouse, i.p.) and a different treatment protocol¹¹ begun at 10 weeks of age yielded significant protection ($P \leq 0.05$) (Fig. 1g). Thus, α -GalCer treatment can protect against T1D when initiated even long after the onset of insulinitis.

Our previous observations showed that a short (2-h) *in vitro* or *in vivo* treatment with IL-7 normalizes the deficient IL-4 production upon ligation by anti-TCR in NOD mice¹⁸. Here we extend these data and show that continuous treatment of NOD mice with IL-7 normalizes NKT-cell numbers and anti-TCR-induced IL-4 and interferon (IFN)- γ production relative to untreated B6 mice (Fig. 1h). Accordingly, we examined the potential synergistic effects of IL-7 and α -GalCer under conditions in which no protection was detected upon α -GalCer treatment alone (2 μ g/dose, i.p. + i.v., starting at 10 wk of age). The latter protocol, which used a combination of α -GalCer + IL-7, demonstrated the efficacy of α -GalCer treatment when administered at 10 weeks of age provided this treatment was accompanied by IL-7 (Fig. 1i). Together, these data indicate that IL-7 might render NOD NKT cells fully responsive to α -GalCer by

restoring the normal maturation of NKT cells, as reported for IL-7-deficient B6 mice¹⁹.

Regulatory T cells, including T-helper type 2 (Th2) cells, are more susceptible than effector Th1 cells to cytolysis induced by treatment with cyclophosphamide (CY)²⁰. This might explain why CY accelerates T1D in NOD mice²¹. The transgenic expression of V α 14J α 281⁺ NKT cells in NOD mice renders them resistant to CY-induced T1D (ref. 9). The latter result, together with our finding that α -GalCer protects against T1D when administered after the onset of insulinitis (Fig. 1g), prompted us to test whether α -GalCer can modulate CY-induced depletion of regulatory T cells and protect NOD mice against CY-accelerated T1D. We found that a multi-dose treatment regimen of α -GalCer on days 0, 2, 4, 6 and 8 after CY challenge protects female NOD mice against CY-accelerated T1D ($P \leq 0.05$) (Fig. 2a). This protection is not mediated by the ceramide backbone shared among glycosylceramides, as treatment with α -mannosylceramide (α -ManCer) did not protect NOD mice against CY-accelerated T1D (Fig. 2b). We also confirmed that the α -GalCer-mediated protection is CD1d dependent, as blocking the interaction between CD1d and NKT cells abrogated protection (Fig. 2c).

NKT cells have an important role in the acceptance of islet xenografts²¹, allograft tolerance²² and prolongation of pancreatic duodenal graft survival²³. During syngeneic pancreatic islet transplantation in NOD mice, Th2 cytokines, including IL-4 and IL-10, prolong graft survival²⁴. Because α -GalCer polarizes NKT cells to

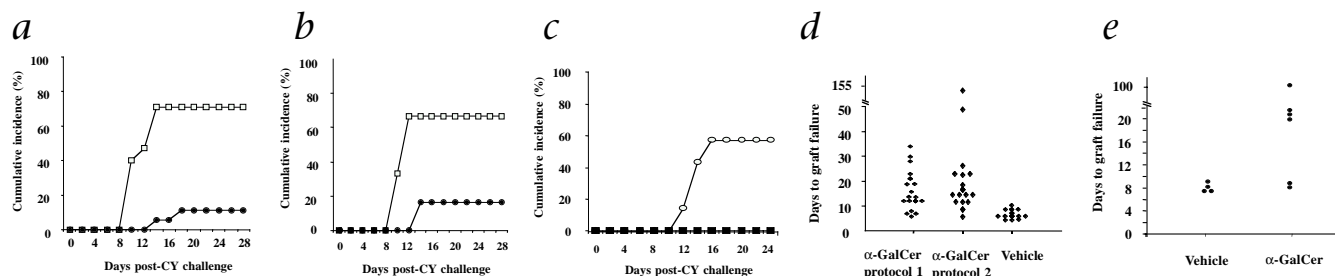


Fig. 2 α -GalCer treatment protects female NOD mice from CY-accelerated T1D and recurrent T1D in recipients in a CD1d-dependent manner. **a**, α -GalCer protects against CY-induced T1D. Female NOD mice were challenged with CY and received α -GalCer (●; $n = 18$) or vehicle (□; $n = 17$) i.p. on days 0, 2, 4, 6 and 8 after CY challenge. **b**, α -ManCer does not protect against T1D. Female NOD mice were challenged with CY and given α -ManCer (□; $n = 6$) or α -GalCer (●; $n = 6$) as above. **c**, α -GalCer-mediated protection is CD1d-dependent. Female NOD mice were challenged with CY and then treated with α -GalCer plus 100 μ g of anti-CD1d (○; $n = 7$) mice or

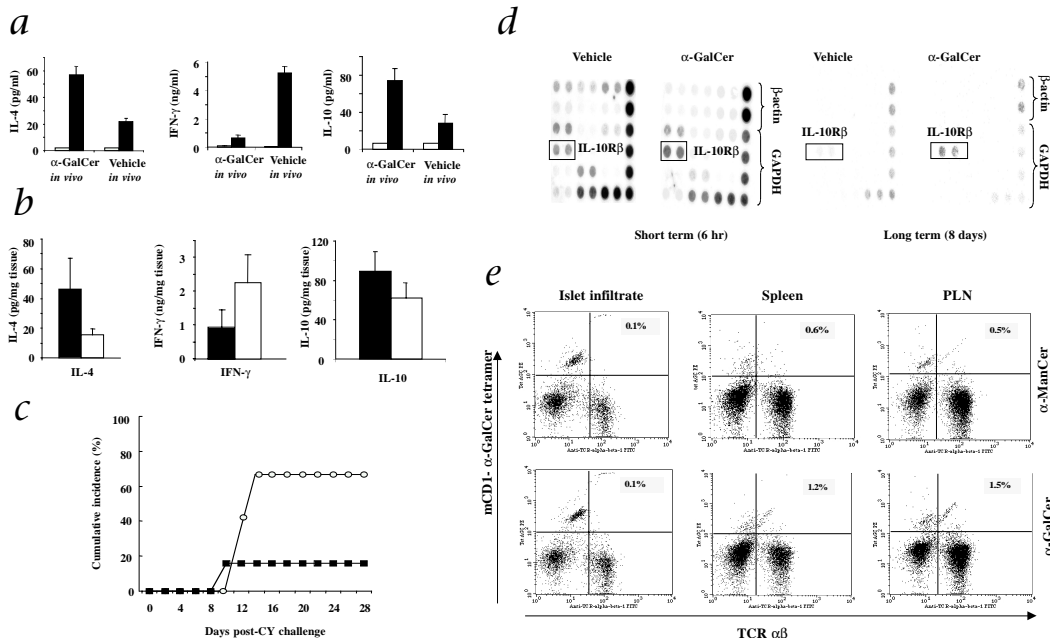
control rat IgG (■; $n = 5$ mice). **d**, Prolongation of islet graft survival by α -GalCer. Newly diabetic female NOD mice were transplanted with syngeneic islets and then treated with α -GalCer by protocol 1 ($n = 18$) or protocol 2 ($n = 17$). Control mice ($n = 13$) were treated with vehicle on days -7 , -4 , -1 , $+2$, $+7$, $+14$ and $+21$ relative to day of transplantation. **e**, Prolongation of islet graft survival is independent of the presence of T and B cells in the grafted tissue. Newly diabetic female NOD mice were transplanted with approximately 400 donor NOD/SCID islets. Recipients received α -GalCer ($n = 6$, protocol 2) or vehicle ($n = 4$).

ward Th2 cytokine production¹², we tested whether treatment of spontaneous diabetic NOD mice with α -GalCer prolongs graft function in recipients of islet transplants. Whereas islet grafts failed in 90% of control vehicle-treated recipients by day 8 after transplantation, grafts in over 80% of α -GalCer-treated mice were still functional, as shown by the maintenance of euglycemia (Fig. 2d). By day 10 post-transplantation, islet grafts in all control mice had failed, whereas this period was extended to as long as 22 weeks in α -GalCer-treated mice ($P \leq 0.05$) (Fig. 2d). Moreover, the effect of α -GalCer was independent of the presence of resident T and B cells in the grafted tissue, as α -GalCer was equally effective in prolonging

islet grafts obtained from NOD/SCID donors (Fig. 2e). Thus, α -GalCer significantly delays the recurrence of T1D in NOD recipients of syngeneic islet transplants.

The α -GalCer-induced protection is associated with the ability of splenocytes from CY-challenged and α -GalCer-treated female NOD mice to secrete 3-fold more IL-4, 2-fold more IL-10 and 6-fold less IFN- γ than splenocytes from vehicle-treated mice upon *in vitro* re-stimulation with α -GalCer (Fig. 3a). We verified that the immune deviation observed was not dependent on the CY treatment (data not shown). Similar patterns of cytokine secretion, that is, decreased levels of IFN- γ and increased levels of IL-4 and IL-10, were detected

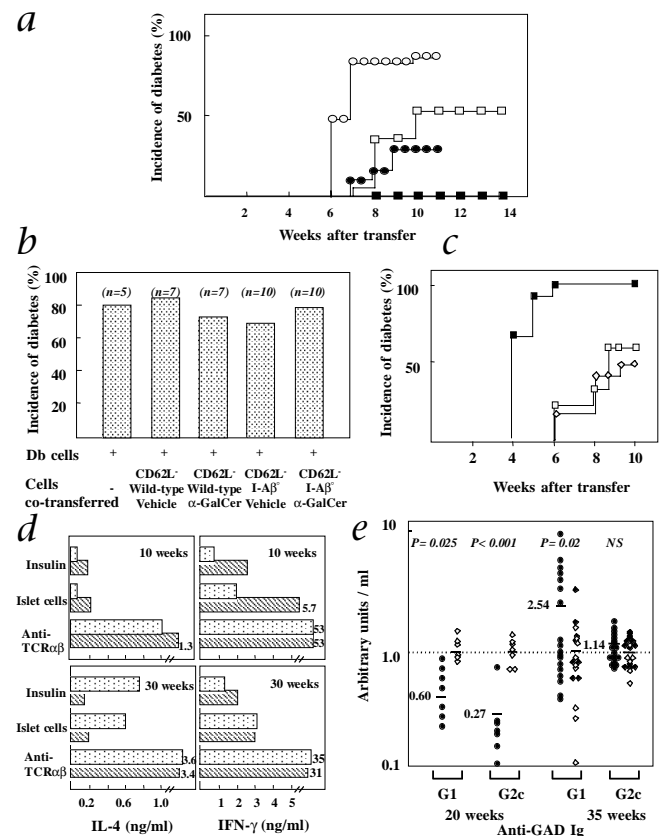
Fig. 3 α -GalCer-mediated protection from CY-induced T1D is associated with a Th2-enriched environment in spleen and pancreas and an increased frequency of NKT cells in spleen and PLN. **a**, Cytokine production by splenocytes. Splenocytes from CY-challenged and α -GalCer-treated or control vehicle-treated mice were cultured for 48 hr in the presence of α -GalCer (■) or vehicle (□) and cytokine concentrations in culture supernatants determined. Differences within each group were significant ($P \leq 0.05$). **b**, Cytokine concentrations in pancreata. The relative levels of cytokines in the pancreas of CY-challenged mice treated with α -GalCer (■) or vehicle (□) were determined by ELISA. Differences within each group were significant ($P \leq 0.05$). **c**, Abrogation of α -GalCer-mediated protection from T1D by blocking IL-10 activity. Female NOD mice (9–10-wk-old) were challenged with CY and then treated with α -GalCer as above plus either 200 μ g of anti-IL-10R (○; $n = 7$) or control rat IgG (■; $n = 6$). **d**, IL-10R mRNA is upregulated in spleen following α -GalCer therapy. Female NOD mice (9–10-wk-old) were treated with 5 μ g/dose of α -GalCer or vehicle control. In short-term treatments, mice received only 1 dose of α -GalCer and



spleens collected 6 h later. In long-term treatments, mice were treated on days 0, 2, 4, 6 and 8 and spleens collected 18 h after that. A more than 2-fold difference was detected between control and treatment samples. **e**, Frequency of NKT cells is increased in spleen and PLN following long-term α -GalCer treatment. Female NOD mice (9–10-wk-old) were treated with 5 μ g/dose of α -GalCer and α -ManCer on days 0, 2, 4, 6 and 8. On day 10, spleen, PLN and islets were collected and double stained. 1 of 2 representative experiments is shown.



Fig. 4 α -GalCer inhibits the diabetogenic activity of spleen T cells, suppresses β -cell specific autoimmunity and promotes a Th2 response against autoantigens. Female NOD mice were treated at 3–5 wk of age every day (2 μ g/mouse/day). **a**, Spleen cells from α -GalCer-treated mice do not transfer T1D. Splenocytes from individual α -GalCer- (■; $n = 15$) and vehicle-treated (□; $n = 15$) NOD mice or CD62L⁻ splenocytes from individual α -GalCer- (●; $n = 20$) and vehicle-treated (○; $n = 21$) mice were collected 2 wk after the last injection and transferred into 3 or 4 NOD/SCID recipients. Data are from 1 of 2 representative experiments. **b**, NKT cells from α -GalCer-treated mice do not reduce the ability of diabetogenic T cells to transfer disease. Splenocytes from recently diabetic (Db) mice were either mixed or not mixed with CD62L⁻ splenocytes from individual α -GalCer- or vehicle-treated NOD mice or mutant I-A β ^o NOD mice collected 2 wk after the last injection. These cell mixtures were then transferred into NOD/SCID mice. Incidence of T1D is shown at 6 wk after transfer. **c**, α -GalCer treatment does not modify the protective activity of CD62L⁺ regulatory splenic cells. Splenocytes (0.5×10^6 CD62L⁻ T-cell equivalents) from recently diabetic (Db) mice were either transferred alone (■; $n = 15$) or were mixed with CD62L⁺ splenocytes (20×10^6 T-cell equivalents) from individual α -GalCer- (◆; $n = 15$) or vehicle-treated (□; $n = 15$) NOD mice collected 2 wk after the last injection, and were then transferred into 3–4 NOD/SCID recipients. Data from 1 of 2 representative experiments are shown. **d** and **e**, α -GalCer early suppresses β -cell specific autoimmunity and ultimately promotes Th2 responses against autoantigens. **d**, Pooled CD4⁺ spleen cells from 3 or 4 α -GalCer- (□) or vehicle-treated (▨) NOD mice were cocultured with the indicated autoantigens, or were stimulated with immobilized anti-TCR for 60 h. Cytokines in the culture supernatants were measured by ELISA. Data from 1 of either 2 or 3 representative experiments are shown. **e**, GAD-specific antibody responses in untreated (◆), vehicle- (◇) and α -GalCer-treated (●) mice. Significance is indicated; NS, not significant.



in the pancreas of CY-challenged and α -GalCer-treated mice (Fig. 3b). To further investigate the mechanism of α -GalCer-mediated protection from the CY-accelerated T1D, we examined the effect of α -GalCer treatment after neutralization of IL-10 activity using a monoclonal antibody against the IL-10 receptor (anti-IL-10R) *in vivo*. Treatment of NOD mice with the anti-IL-10R abrogated the protective effect of α -GalCer (Fig. 3c), consistent with the recent reports of an immunoregulatory role for IL-10 derived from NKT cells^{5,13}. Importantly, IL-10R gene expression in spleen was upregulated after short- or long-term treatment with α -GalCer (Fig. 3d). Thus, protection from T1D by multi-dose treatment with α -GalCer might be mediated by IL-10/IL-10R interactions and possibly a Th2-like enriched cytokine environment in spleen and pancreas of NOD mice. This supports the notion that the same α -GalCer treatment polarizes splenic NKT cells towards a Th2-like phenotype in other mouse strains¹¹.

To determine whether α -GalCer promotes the expansion of NKT cells in secondary lymphoid organs as well as in the pancreas, we examined this population in spleen, pancreatic lymph nodes (PLN) and islet-infiltrating mononuclear cells following long-term α -GalCer treatment. NKT cells were tracked by double staining with a monoclonal antibody against TCR $\alpha\beta$ and CD1d tetramers loaded with α -GalCer²⁵. Cells obtained from α -GalCer- or vehicle-treated CD1d-deficient NOD mice were included as controls. The frequency of NKT cells in α -GalCer-treated mice was increased three-fold in the PLN and two-fold in spleen, whereas these cells were absent from the islet-infiltrating cells, regardless of the treatment (Fig. 3e). These findings indicate that NKT-mediated immunoregulation can occur upstream of the pancreas, either in spleen or PLN. Further experimentation will explore whether α -GalCer selectively promotes the recruitment of NKT cells to the site of immunoregulation and/or the expansion of NKT cells at this site.

Next, we show that spleen cells collected from NOD mice two

weeks after α -GalCer treatment did not transfer T1D into NOD/SCID recipients (Fig. 4a), whereas cells obtained from vehicle-treated mice did. We obtained similar results with a subset of CD62L⁻ spleen cells known to be enriched for diabetogenic T cells²⁶. Importantly, CD62L⁻ spleen cells also contain the vast majority of NKT cells as assessed by the detection of V α 14-J α 281 transcripts at a higher level (4- to 8-fold increase) than in CD62L⁺ cells, regardless of α -GalCer treatment (data not shown). To determine whether α -GalCer-activated NKT cells downregulate diabetogenic T cells assessed in transfer experiments, we co-transferred T cells from untreated diabetic mice into NOD/SCID recipients with CD62L⁻ splenic T cells obtained from NOD mice two weeks after α -GalCer treatment. No inhibition of T1D transfer occurred, even when NKT-enriched CD62L⁻ cells were derived from I-A β ^o NOD mice that lack CD4⁺ effector T cells (Fig. 4b). These results indicate that spleen NKT cells from α -GalCer-treated mice might not directly act on diabetogenic T cells, even if they are present in increased numbers in PLN as assessed by tetramer binding. This finding prompted us to test whether NKT-cell stimulation with α -GalCer promotes the differentiation or maturation of other regulatory T cells, as initially suggested in the model of anterior-chamber-associated immune deviation^{2,5}. Autoimmune regulatory T (ART) cells, recently identified as CD4⁺CD25⁺ T cells and CD62L⁺ T cells, are depleted by thymectomy and inhibit diabetogenic T cells in co-transfer models^{15,27–29}. No difference in the overall number of CD4⁺CD25⁺ T cells was detected between α -GalCer- and vehicle-treated mice. Moreover, the regulatory activity of spleen CD62L⁺ T cells was not enhanced after α -GalCer treatment (Fig. 4c). These data indicate that α -GalCer protects from T1D without a direct causal relationship between NKT cells and ART cells.

To explain why splenocytes obtained from mice at two weeks



after α -GalCer treatment are unable to transfer T1D, we reasoned that pathogenic T cells are deleted or anergized following α -GalCer treatment. This hypothesis is supported by the reduced capacity of spleen cells from α -GalCer-treated mice to produce IFN- γ and, to a lesser degree, IL-4 in response to stimulation with pancreatic islet cells or insulin at 10 weeks of age (Fig. 4d). Whereas IL-4 production in response to islet cells and insulin increased (> 3–4-fold) at 30 weeks of age, IFN- γ production remained the same at this time. The α -GalCer-induced suppression appeared to be specific to islet β -cell-reactive cells, as polyclonal anti-TCR stimulation of splenic T cells from α -GalCer- and vehicle-treated animals yielded similar levels of cytokine secretion (Fig. 4d). Production by B cells of autoantibodies against glutamic acid decarboxylase (GAD) was similarly reduced at 20 weeks of age (Fig. 4e). Moreover, the IgG1/IgG2c ratio (Th2/Th1 ratio) was increased in α -GalCer-treated mice but not in vehicle or untreated mice at both 20 and 30–35 weeks of age. In control studies, no inhibition of production of antibodies against ovalbumin (OVA) occurred in α -GalCer-treated NOD mice immunized with OVA (data not shown). Thus, by 25–30 weeks of age, we observed increased islet-autoantigen Th2-like responses. These findings extend those of Hong *et al.*³⁰, and indicate that an enriched Th2-type of environment at 30 weeks of age is dominant over the residual destructive Th1 response and leads to protection from T1D.

Our data point to a new approach for prevention of onset and recurrence of T1D by targeting NKT cells. NOD mice^{6,7} and individuals at risk for T1D (ref. 8) display numerical and functional deficits in NKT cells. Importantly, the CD1d-dependent NKT-cell response to α -GalCer is phylogenetically conserved in mouse and man¹⁶, and although α -GalCer is hepatotoxic in mice³¹ it lacks severe toxicity in humans³². It is therefore conceivable that these NKT-cell deficits might be corrected by administration of α -GalCer, either alone or in combination with IL-7, to pre-diabetic and imminently diabetic individuals as well as to diabetic recipients of islet transplants. This treatment regimen might prove useful as an intervention therapy that blocks the development of disease at an early stage, and, at a later stage, as a maintenance therapy once insulinitis has been eliminated by other treatments such as anti-CD3. Alternatively, it may have beneficial effects in diabetic recipients of islet transplants to dampen the recurrent autoimmune response. In this manner, the selective inhibition of islet β -cell autoreactivity might circumvent the risk of over-immunosuppression often associated with the use of conventional non-antigen-specific drugs.

Methods

Mice. Wild-type and mutant (CD1d-deficient, J α 281-deficient) C57BL/6 (B6) mice, wild-type and mutant (I- β ², CD1d-deficient) NOD female mice, NOD/SCID mice and BALB/c mice were bred and maintained in our animal facilities under specific pathogen-free conditions.

Reagents. Synthetic forms of α -GalCer (KRN7000), β -GalCer and α -ManCer (Kirin Brewery, Gunma, Japan) were used¹⁰. Anti-CD1d mAb (20H2) and anti-IL-10R (1B1.3a) were purified from hybridoma culture supernatant by HiTrap protein G columns (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Both hybridomas were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Maryland). Human rIL-7 (ref. 18), produced in *Escherichia coli* was obtained from Sanofi (Labège, France). Insulin and (OVA) were purchased from Sigma. GAD65 was produced in SF9 insect cells by a baculovirus system, and was further purified first by Ni²⁺ affinity and then by SDS-PAGE followed by electroelution³³.

In vivo treatments. For protection studies against CY-induced diabetes and the late treatment protocol, 5 μ g/dose of α -GalCer or an appropriate amount of control vehicle (polysorbate), both diluted in sterile saline, was injected i.p. Graft recipients were treated with 5 μ g/dose of α -GalCer on days -7, -4, -1, +2, +7, +14 and +21 (protocol 1) or on days -1, +2, +7, +14 and +21 (proto-

col 2). In other protocols, α -GalCer (2 μ g/mouse) or vehicle was injected into mice, every day for 2 wk, i.p. (1 μ g) plus i.v. (1 μ g), unless otherwise noted. By using this latter regimen, it was verified that β -GalCer, which is not recognized by NKT cells¹⁰, did not afford diabetes protection. For IL-7 treatment, mice received two subcutaneous injections daily of 1 μ g IL-7 diluted in a pyrogen-free solution containing BSA (500 μ g/ml, Gibco/BRL, Gaithersburg, Maryland). Control mice were injected with an identical volume of the BSA solution alone.

Cyclophosphamide challenge and detection of diabetes. Pre-diabetic (9–10-wk-old) female NOD mice were challenged with 1 dose (300 mg/kg) of cyclophosphamide (Sigma, Oakville, Canada). Mice were screened for glycosuria (Glukotest, Boehringer) or glycemia (Haemoglukotest and Reflolux F; Boehringer) twice a week (spontaneous diabetes) or every other day (CY-induced diabetes and islet transplantation studies). Mice with BGL > 11.1 mmol/l on 2 consecutive readings were considered diabetic.

Cultures of responder spleen cells from untreated mice. Enriched CD4⁺ and sorted NKT spleen cells were incubated either with α -GalCer (100 ng/ml), excipient alone (0.1% DMSO) or immobilized anti-TCR- $\alpha\beta$ (clone H57-597; 10 μ g/ml) in culture medium (RPMI 1640 Glutamax medium supplemented with 10% FCS, 2-ME 0.05 mM and antibiotics) (all purchased from Gibco-BRL Gaithersburg, Maryland) in 96-well round-bottomed microplates (Nunc, Roskilde, Denmark). Cells were mixed with autologous γ -irradiated (2,500 rads) splenocytes (2×10^5 /well), used as CD1d-expressing antigen-presenting cells. When specified, a blocking monoclonal antibody against CD1d (clone 20H2, 10 μ g/ml) was added.

Cytokine secretion following in vivo α -GalCer treatment. Mice were injected either with α -GalCer or vehicle alone (2 μ g/dose, i.v.) and were bled 2 h later. Cytokine levels in the serum were measured by ELISA. In another set of experiments, splenocytes (5×10^6 /ml) from α -GalCer- or vehicle-treated (24 h) mice were cultured for 48 h in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 10 mM Hepes buffer, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin and 0.05 mM 2-ME (all purchased from Gibco-BRL) in the presence of 100 ng/ml α -GalCer in 24-well plates (Nunc). Culture supernatants were analyzed for their IL-4, IL-10 and IFN- γ concentrations by ELISA (BD Pharmingen, Mississauga, Canada).

ELISA. A standard sandwich ELISA was used to measure cytokines and antibody isotype specific for GAD or OVA, as described^{17,33}. The sensitivity of cytokine assays was 20 pg/ml and 200 pg/ml in culture supernatants and in serum, respectively.

Intra-pancreatic cytokine ELISA. Pancreata were isolated and snap frozen. Immediately before analysis, tissues were homogenized and sonicated in an anti-protease buffer (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Canada). Homogenates were centrifuged to remove debris and then passed through 1.2- μ m filters (Gelman Sciences, Ann Arbor, Michigan), and the filtrates were analyzed for cytokine concentrations by ELISA.

Preparation of islet cells. Pancreata of 5- to 6-wk-old NOD mice were treated with collagenase P (Boehringer) for 6 min at 37 °C with vigorous shaking in PBS supplemented with 5% FCS. Islets were handpicked under an inverted microscope and then treated with trypsin-EDTA (Gibco/BRL) for 20 min at 37 °C to obtain single-cell suspensions.

Measurement of T-cell and antibody responses. For measurement of islet- and insulin-specific T-cell responses, spleen responder CD4⁺ cells (2×10^5 per well) were cultured with islet cells (3×10^4 pretreated with mitomycin (Sigma; 50 μ g/ml)) or with insulin (300 μ g/ml) for 60 h at 37 °C. As a control, the same number of responder cells were stimulated with immobilized anti-TCR- $\alpha\beta$. Levels of IL-4 and IFN- γ in supernatants were measured by ELISA. For measurement of OVA-specific T-cell and antibody responses, mice were immunized with OVA (100 μ g/mouse) emulsified in complete Freund's adjuvant. After 7 or 14 days, mice were killed and OVA-specific T-cell cytokine production and immunoglobulin isotypes were measured.

Analysis of V α 14-J α 281 mRNA expression. Total RNA was extracted from purified CD62L⁺ splenocytes and then reverse transcribed. Semi-quantitative



kinetic ELISA PCR was carried out using oligonucleotides specific for C α , V α 14 and J α 281, as described¹⁷. TCR- α chain mRNA was used as a reference to normalize all the samples.

Adoptive cell transfer. Diabetogenic cells (splenocytes pooled from 3–5 overtly diabetic NOD mice) were transferred i.v. in the absence or presence of various T-cell subpopulations to 4–6-wk-old NOD/SCID recipient mice, as described^{26,28–29}.

Cell purification and flow cytometry analysis. The numbers of NKT cells (CD4⁺CD122⁺CD44⁺CD3^{int}) and ART cells (CD4⁺CD25⁺) per spleen were determined by flow cytometry¹¹. Enrichment of splenocytes for CD4⁺ T cells, CD62L⁺ T cells, CD62L⁻ T cells and CD4⁺CD122⁺CD44⁺CD62L⁻ (NKT) cells was achieved by magnetic-activated cell sorting (MACS, Miltenyi Biotec, Bergish-Gladbach, Germany) and a FACS Vantage cell sorter (Becton Dickinson, Mountain View, California), respectively, as described^{17,26,28–29}. A FACScalibur cytometer (Becton Dickinson) was used for cell-surface marker analysis¹⁷. For CD1 tetramer studies, NOD mice (9–10-wk-old) were treated with α -GalCer or α -ManCer on days 0, 2, 4, 6 and 8. Tissues were collected on day 10, and single-cell suspensions were prepared from spleen and PLN. Islet-infiltrating cells were obtained by culturing islets overnight in complete RPMI, followed by density-gradient centrifugation of the cells migrating out of the islets. Cells were then treated with monoclonal antibodies against Fc- γ R (BD Pharmingen) and Neutravidin (Molecular Probes, Eugene, Oregon) for 15 min at 4 °C, and were subsequently stained for 20 min at 23 °C with anti-TCR- $\alpha\beta$ (BD Pharmingen) and empty or α -GalCer-loaded CD1 tetramers. The specificity of staining in all tissues was verified by examining NOD/CD1-deficient tissues.

cDNA array analysis. Total RNA was extracted from spleen after long- and short-term α -GalCer treatment by RNeasy protect Midi Kit (Qiagen, Mississauga, Canada). Aliquots of RNA (5–10 μ g) were used to analyze gene expression of cytokine receptor by GEArray technology (SuperArray Inc., Bethesda, Maryland). Relative amounts of mRNA transcripts were quantified using a Molecular Imager System and Molecular Analyst imaging software (BioRad, Hercules, California). The relative amount of a given gene transcript was estimated by comparing its signal intensity with the signal derived from GAPDH and β -actin. A more than 2-fold increase in signal intensity was considered significant.

Islet transplantation. Pancreatic islets were isolated from 5–6-wk-old male NOD mice by collagenase digestion and discontinuous density gradient purification. After overnight culture, islets ($n \approx 400$) were transplanted to the renal subcapsular space of newly (< 7 days) diabetic (spontaneous) female NOD mice.

Statistical analysis. Data were expressed as the mean \pm s.e.m. (or \pm s.d.). Statistical analyses were performed using the Student's or Welch *t*-tests (for quantitative data) and logrank or χ^2 tests (for incidence and transplantation data). *P* values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Acknowledgments

We thank L. Van Kaer for sharing his findings before publication and for providing mutant CD1d-deficient mice; S. Chakrabarti and K. Mukerjee for their assistance with pancreas histology analyses; O. Babin and M.C. Gagnerault for technical assistance; E. Schneider for critical reading of the manuscript; all members of our laboratories for advice and encouragement; O. Lantz and D. Mouton for advice on kinetic PCR and OVA immunization, respectively; and the Sanofi Co. and A. Bendelac for providing human rIL-7 and antibody against CD1d, respectively. This work was supported by grants from the Juvenile Diabetes Research Foundation International, Canadian Institutes of Health Research and London Health Sciences Center Multi-Organ Transplant Program (to T.L.D.), a postdoctoral fellowship from the Canadian Diabetes Association (to S.S.) and a grant from the Fondation pour la Recherche Medicale (to A.H.).

RECEIVED 12 MARCH; ACCEPTED 6 AUGUST 2001

- Delovitch, T.L. & Singh, B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: Immune dysregulation gets the NOD. *Immunity* **7**, 727–738 (1997).

- Sonoda, K.H., Exley, M., Snapper, S., Balk, S.P. & Stein-Streilein, J. CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. *J. Exp. Med.* **190**, 1215–1226 (1999).
- Godfrey, D.I., Hammond, K.J., Poulton, L.D., Smyth, M.J. & Baxter, A.G. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol. Today* **21**, 573–83 (2000).
- Yoshimoto, T. & Paul, W.E. CD4⁺pos, NK1.1⁺pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to *in vivo* challenge with anti-CD3. *J. Exp. Med.* **179**, 1285–1295 (1994).
- Sonoda K.H. *et al.* NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. *J. Immunol.* **166**, 42–50 (2001).
- Baxter, A.G., Kinder, S.J., Hammond, K.J., Scollay, R. & Godfrey, D.I. Association between α betaTCR⁺CD4⁺CD8⁻ T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes* **46**, 572–582 (1997).
- Gombert, J.M. *et al.* Early quantitative and functional deficiency of NK1⁺-like thymocytes in the NOD mouse. *Eur. J. Immunol.* **26**, 2989–2998 (1996).
- Wilson, S.B. *et al.* Extreme Th1 bias of invariant V α 24J α Q T cells in type 1 diabetes. *Nature* **391**, 177–181 (1998).
- Lehuen, A. *et al.* Overexpression of natural killer T cells protects V α 14- J α 281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J. Exp. Med.* **188**, 1831–1839 (1998).
- Kawano, T. *et al.* CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V α 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* **278**, 1626–1629 (1997).
- Burdin, N., Brossay, L. & Kronenberg, M. Immunization with α -galactosylceramide polarizes CD1-reactive NKT cells towards Th2 cytokine synthesis. *Eur. J. Immunol.* **29**, 2014–2025 (1999).
- Singh, N. *et al.* Activation of NK T cells by CD1d and α -galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype. *J. Immunol.* **163**, 2373–2377 (1999).
- Hammond, K.J.L. *et al.* α/β -T cell receptor (TCR)⁺CD4⁺CD8⁻ (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J. Exp. Med.* **187**, 1047–1056 (1998).
- Bendelac, A., Rivera M.N., Park S.H. & Roark J.H. Mouse CD1-specific NK1T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 535–562 (1997).
- Shevach, E.M. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 423–449 (2000).
- Brossay, L. *et al.* CD1d-mediated recognition of an α -galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J. Exp. Med.* **188**, 1521–1528 (1998).
- Hameg, A. *et al.* A subset of NKT cells that lacks the NK1.1 marker, expresses CD1d molecules, and autoperforms the α -galactosylceramide antigen. *J. Immunol.* **165**, 4917–26 (2000).
- Gombert, J.M. *et al.* IL-7 reverses NK1⁺ T cell-defective IL-4 production in the nonobese diabetic mice. *Int. Immunol.* **8**, 1751–1758 (1996).
- Vicari, A. *et al.* NK1.1⁺ T cells from IL-7-deficient mice have a normal distribution and selection but exhibit impaired cytokine production. *Int. Immunol.* **8**, 1759–1766 (1996).
- Yasunami, R. & Bach, J.F. Anti-suppressor effect of cyclophosphamide on the development of spontaneous diabetes in NOD mice. *Eur. J. Immunol.* **18**, 481–484 (1988).
- Ikehara, Y. *et al.* CD4(+) V α 14 natural killer T cells are essential for acceptance of rat islet xenografts in mice. *J. Clin. Invest.* **105**, 1761–1767 (2000).
- Seino Ki, K. *et al.* Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 2577–2581 (2001).
- Tori, M. *et al.* Proliferation of donor-derived NKR-P1⁺TCR $\alpha\beta$ + (NKT) cells in the nonrecurrent spontaneous diabetic BB rats transplanted with pancreatic duodenal grafts of Wistar-Furth donors. *Transplant. Proc.* **31**, 2741–2742 (1999).
- Rabinovitch, A.O. Suarez-Pinzon, W.L. Sorensen, O. Rajotte, R.V. & Power, R.F. Combination therapy with cyclosporine and interleukin-4 or interleukin-10 prolongs survival of syngeneic pancreatic islet grafts in nonobese diabetic mice: islet graft survival does not correlate with mRNA levels of type 1 or type 2 cytokines, or transforming growth factor-beta in the islet grafts. *Transplantation* **64**, 1525–1531 (1997).
- Matsuda, J.L. *et al.* Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J. Exp. Med.* **192**, 741–754 (2000).
- Lepault, F., Gagnerault, M.C., Faveeuw, C., Bazin, H. & Boitard, C. Lack of L-selectin expression by cells transferring diabetes in NOD mice: Insights into the mechanisms involved in diabetes prevention by Mel-14 antibody treatment. *Eur. J. Immunol.* **25**, 1502–1507 (1995).
- Salomon, B. *et al.* B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* **12**, 431–440 (2000).
- Herbelin, A., Gombert, J.M., Lepault, F., Bach, J.F. & Chatenoud, L. Mature mainstream TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺ thymocytes expressing L-selectin mediate “active tolerance” in the nonobese diabetic mouse. *J. Immunol.* **161**, 2620–2628 (1998).
- Lepault, F. & Gagnerault, M.C. Characterization of peripheral regulatory CD4⁺ T cells that prevent diabetes onset in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* **164**, 240–247 (2000).
- Hong, S. *et al.* The natural killer T-cell ligand α -galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nature Med.* **7**, 1052–1056 (2001).
- Osman Y. *et al.* Activation of hepatic NKT cells and subsequent liver injury following administration of α -galactosylceramide. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1919–1928 (2000).
- Van Der Vliet, H.J. *et al.* Effects of α -galactosylceramide (KRN7000), interleukin-12 and interleukin-7 on phenotype and cytokine profile of human V α 24V β 11⁺ T cells. *Immunology* **98**, 557–563 (1999).
- Laloux, V., Beaudoin, L., Jeske, D., Carnaud, C. & Lehuen, A. NKT cell-induced protection against diabetes in V α 14-J α 281 transgenic NOD mice is associated with a Th2 shift circumscribed regionally to the islets and functionally to islet auto-antigen. *J. Immunol.* **166**, 749–756 (2001).

Manuscrit n°2

Germ line deletion of the Jalpha18 locus does not exacerbate auto-immune diabetes in NOD mice: evidence against a natural protective role of CD1d-restricted Valpha14-Jalpha18 NKT cells.

Zhu R, Rocha-Campos ACR, Gouarin C, Diem S, Damotte D, Taniguchi M, Dy M, Bach JF and Herbelin A. *Manuscrit en préparation.*

Bien que les lymphocytes iNKT constituent une cible thérapeutique dans le modèle de la souris NOD sous l'impulsion de leur ligand α -GalCer, il reste à déterminer si cette population, à l'instar des lymphocytes Treg, a un rôle régulateur naturel dans l'histoire du T1D. Dans ce but, nous avons produit une lignée NOD $J\alpha 18^{-/-}$ dépourvue totalement de lymphocytes iNKT. L'histoire naturelle de la maladie n'est pas modifiée chez les souris NOD mutées $J\alpha 18^{-/-}$, comparativement aux souris NOD sauvages ($J\alpha 18^{+/+}$) et hétérozygotes mutées ($J\alpha 18^{+/-}$). Par ailleurs, cette absence de lymphocytes iNKT n'a aucun impact sur les fonctions protectrices des splénocytes et des thymocytes évaluées par leur co-transfert avec des cellules diabétogènes chez des receveurs NOD immunoincompétents. A l'inverse, les cellules provenant de souris NOD $Ia-\beta^0$ contenant des lymphocytes iNKT mais totalement dépourvues de lymphocytes T CD4 conventionnels n'ont montré aucune activité protectrice. En conclusion, nos résultats suggèrent qu'au contraire des lymphocytes Treg, les lymphocytes iNKT n'ont pas d'activité « naturelle/spontanée » protectrice contre les lymphocytes T diabétogènes.

Nous avons précédemment montré que l'activation des lymphocytes iNKT par leur ligand synthétique α -GalCer prévient remarquablement le T1D de la souris NOD. Cette manipulation pharmacologique a révélé une fonction régulatrice inductible de cette population dans la maladie. Mais quel est son rôle dans l'histoire naturelle du T1D et même plus largement dans l'auto-immunité ?

Comme nous l'avons déjà souligné dans le chapitre II de l'introduction générale, les seules données de la littérature montrant un rôle des lymphocytes iNKT en situation auto-immune concernent des modèles comprenant des protocoles susceptibles de recruter les lymphocytes iNKT par des voies « exogènes » de stimulation. Sans manipulation avec des ligands spécifiques ou bien avec des adjuvants, la synapse auto-réactive est-elle capable de mobiliser les lymphocytes iNKT ? Cette question est pertinente si l'on considère les données récentes de la littérature montrant clairement qu'il existe bien des lymphocytes T ayant des fonctions protectrices « naturelles/spontanées » contre le T1D. Ils comprennent en particulier les lymphocytes Treg comme l'a révélé l'incidence de diabète accélérée chez les souris NOD déficientes pour la molécule CD28, laquelle est essentielle pour l'ontogenèse de ces lymphocytes (Salomon et al., 2000).

Nous avons appliqué une stratégie similaire pour la population lymphocytaire iNKT qui a reposé sur la production dans le laboratoire d'une lignée de souris NOD totalement dépourvues de ces cellules du fait de la délétion du gène $J\alpha 18$. Nous avons postulé que si les lymphocytes iNKT ont un rôle protecteur naturel contre le T1D, l'incidence de la maladie se trouverait accélérée dans la lignée NOD $J\alpha 18^{-/-}$.

Validation de la lignée NOD $J\alpha 18^{-/-}$. La lignée NOD $J\alpha 18^{-/-}$ qui a été obtenue à partir de souris C57BL/6 $J\alpha 18^{-/-}$ par 10 croisements successifs en retour dans le fond génétique

NOD est bien totalement déficiente en lymphocytes iNKT comme l'attestent : 1) la non détection de lymphocytes TCR $\alpha\beta$ fixant le tétramère CD1d chargé avec le ligand α -GalCer dans le foie et la rate (Figure1A); et 2) la non réactivité au traitement par l' α -GalCer, lequel se traduit chez la souris NOD sauvage par une augmentation des taux sériques d'IL-4 et d'IFN- γ (Figure1B).

Non modification de l'histoire naturelle de la maladie dans la lignée NOD J α 18^{-/-}.

L'analyse de l'incidence du T1D dans la lignée de souris mutées J α 18^{-/-} a montré que l'histoire naturelle de la maladie n'est pas affectée par la délétion du gène J α 18. Ainsi, tant au 6^{ème} qu'au 10^{ème} croisement en retour, l'incidence de diabète n'est ni accélérée ni ralentie dans le groupe des souris NOD homozygotes mutées J α 18^{-/-} comparativement aux groupes homozygote non muté (NOD J α 18^{+/+}) et hétérozygote muté (NOD J α 18^{+/-}) issus de la même génération (Figure 2). L'analyse histologique des îlots pancréatiques n'a pas montré non plus de modification significative entre les animaux mutés et sauvages. (Tableau 1). A 4 semaines d'âge, on ne note aucune infiltration des îlots par des cellules mononucléées tandis qu'entre 8 et 12 semaines d'âge, les proportions d'îlots intacts, atteints dans leur périphérie (péri-insulite) ou de manière invasive (insulite) sont similaires chez les souris NOD mutées J α 18^{-/-} et sauvages. Enfin, le pouvoir diabétogène des splénocytes est totalement conservé chez les souris mutées J α 18^{-/-}. Ainsi, le transfert du T1D à des receveurs NOD-*scid* a été obtenu à partir des splénocytes de souris prédiabétiques NOD tant mutées J α 18^{-/-} que sauvages avec la même efficacité (Figure 3A).

Les lymphocytes T CD4 conventionnels et non les lymphocytes iNKT ont des fonctions protectrices contre les effecteurs diabétogènes. La lignée NOD mutée $J\alpha 18^{-/-}$ a aussi permis d'évaluer l'impact de l'absence totale de lymphocytes iNKT sur les fonctions protectrices des splénocytes et des thymocytes qui avaient été initialement décrites par Boitard et ses collaborateurs à partir d'expériences comprenant leur co-transfert avec des lymphocytes T diabétogènes (Boitard et al., 1989). Des travaux récents ont montré que les lymphocytes Treg participent à la protection (Salomon et al., 2000; Tang et al., 2006) révélée dans ces expériences de co-transfert. En reprenant les mêmes protocoles, nous avons d'abord confirmé que les splénocytes et les thymocytes provenant de souris NOD sauvages jeunes et non diabétiques sont capables de prévenir le T1D induit chez des souris NOD-*scid* par le transfert de lymphocytes T d'animaux diabétiques (Figure 3B). Nous avons ensuite pu montrer que ces fonctions protectrices sont maintenues intactes chez les souris NOD mutées $J\alpha 18^{-/-}$. A l'inverse, les splénocytes et les thymocytes provenant de souris NOD $Ia-\beta^0$ qui ont la particularité de pouvoir sélectionner les lymphocytes iNKT mais pas les lymphocytes T CD4 conventionnels, n'ont montré aucune activité protectrice. Cette série de résultats, tout en montrant que les lymphocytes iNKT n'ont pas d'activité protectrice directe suggère aussi qu'ils sont dispensables dans l'effet protecteur des lymphocytes Treg.

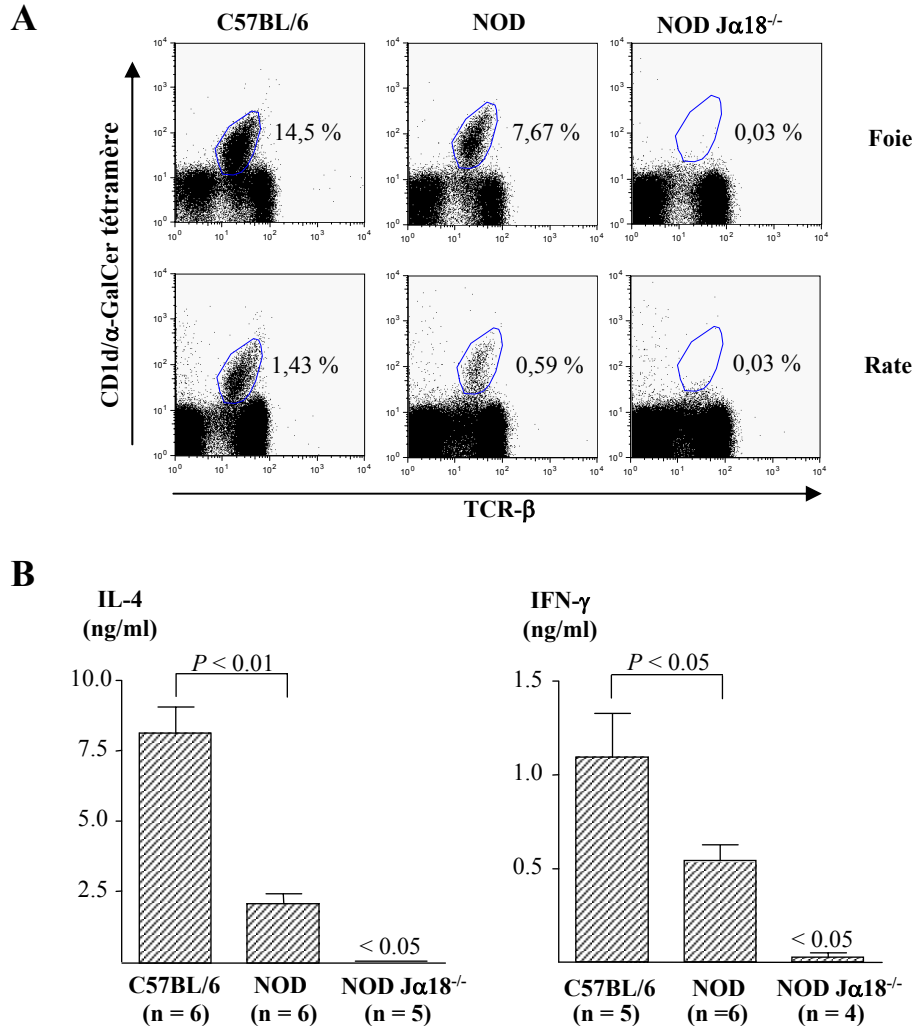


Figure 1 : Validation de la lignée NOD $J\alpha 18^{-/-}$. Une lignée de souris NOD $J\alpha 18^{-/-}$ a été obtenue à partir de souris C57BL/6 $J\alpha 18^{-/-}$ par 10 croisements successifs en retour dans le fond génétique NOD. *A) Analyse phénotypique* : les cellules mononucléées isolées de la rate et du foie sont analysées en cytométrie de flux après leur marquage avec le tétramère CD1d/ α -GalCer marqué avec le fluorochrome APC et avec un anticorps dirigé contre la partie constante de la chaîne β du TCR marqué avec le fluorochrome FITC. Les valeurs indiquées en pourcentage correspondent aux proportions de cellules CD1d/ α -GalCer⁺ TCR- β ⁺ au sein de la population indiquée de cellules mononucléées. La proportion de cellules TCR- β ⁺ fixant le tétramère contrôle (CD1d non chargé avec l' α -GalCer) est inférieure ou égale à 0,03 %. *B) Analyse fonctionnelle* : le ligand α -GalCer des lymphocytes iNKT est administré aux souris par voie intrapéritonéale (2 μ g). Deux heures après l'injection, le sérum est recueilli puis congelé à -20° C avant le dosage des cytokines IL-4 et IFN- γ par une technique ELISA. Les concentrations de cytokines mesurées dans le serum des souris traitées avec la solution excipient sont inférieures au seuil de sensibilité de 0,05 ng/ml pour l'IL-4 et l'IFN- γ . Le nombre de souris dans chaque groupe est indiqué entre parenthèses.

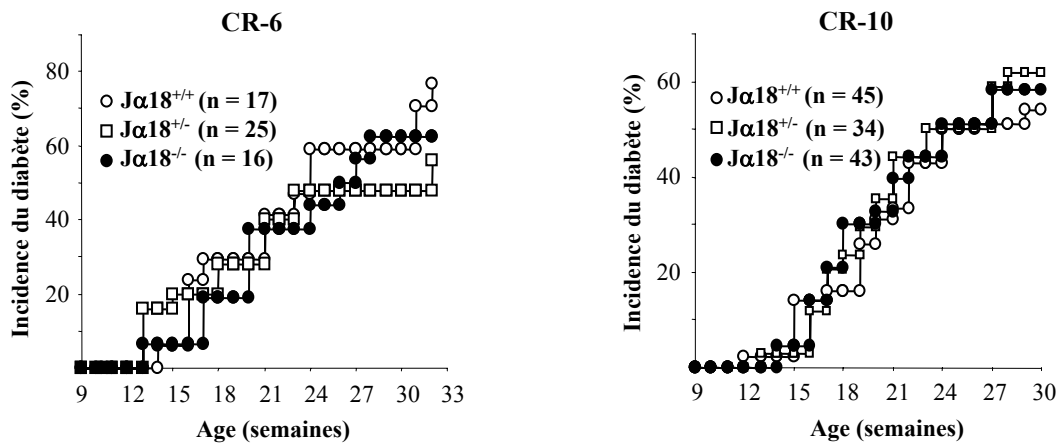


Figure 2 : L'incidence du T1D n'est pas modifiée chez les souris NOD totalement dépourvues de lymphocytes iNKT (NOD $J\alpha 18^{-/-}$). Les souris hétérozygotes NOD $J\alpha 18^{+/-}$ obtenues à l'issue de 6 croisements en retour (CR-6) et de 10 croisements en retour (CR-10) dans le fond génétique NOD sont croisées entre elles. L'incidence du diabète est déterminée chez les animaux homozygotes mutés ($J\alpha 18^{-/-}$), hétérozygotes mutés ($J\alpha 18^{+/-}$) et homozygotes non mutés ($J\alpha 18^{+/+}$) de la première génération en mesurant la glycosurie (Glukotest, Roche) et/ou la glycémie (Glucotrend, Boehringer-Mannheim) une fois par semaine. Les souris sont considérées diabétiques sur la base de deux tests positifs (> 300 mg/dL) successifs. Les résultats sont exprimés en % de diabète cumulé au sein de chaque groupe dont le nombre de souris est indiqué entre parenthèses. Aucune différence significative n'est mise en évidence lors de la comparaison des différents groupes CR-6 ou CR-10 (*log rank test*).

souris NOD	âge (semaines)	nombre (souris)	normal	péri-insulite	insulite
sauvage	4	4	100 %	0 %	0 %
J α 18 ^{-/-}	4	4	100 %	0 %	0 %
sauvage	8	12	57 %	9 %	35 %
J α 18 ^{-/-}	8	12	58 %	7 %	35 %
sauvage	12	8	54 %	9 %	37 %
J α 18 ^{-/-}	12	14	42 %	12 %	46 %

Tableau 1 : Analyse histologique des îlots β de Langerhans chez la souris NOD totalement dépourvue de lymphocytes iNKT (NOD J α 18^{-/-}). Une analyse histologique des cellules β de Langerhans a été réalisée chez des animaux homozygotes mutés (J α 18^{-/-} CR-10) et sauvages non diabétiques. Les résultats sont exprimés en % d'îlots normaux (grade 0), partiellement atteints (grade 1 ou 2 : péri-insulite) ou totalement atteints (grade 3 ou 4 : insulite) rapportés au nombre total d'îlots analysés dans un pancréas donné. Un minimum de 20 îlots par pancréas a été analysé. Aucune différence significative (test t) n'est mise en évidence lors de la comparaison des groupes mutés J α 18^{-/-} et sauvages, quel que soit l'âge considéré. Le degré de sévérité de l'insulite est fonction de l'intensité de l'infiltration par des cellules mononucléées et est mesuré de manière semi-quantitative en utilisant les critères suivants. Grade 0 : aucune cellule infiltrante; Grades 1 et 2 : cellules infiltrantes situées en bordure de l'îlot et/ou couvrant moins de 20 % de l'aire de l'îlot; Grades 3 et 4 : infiltration couvrant plus de 20 % de l'aire de l'îlot.

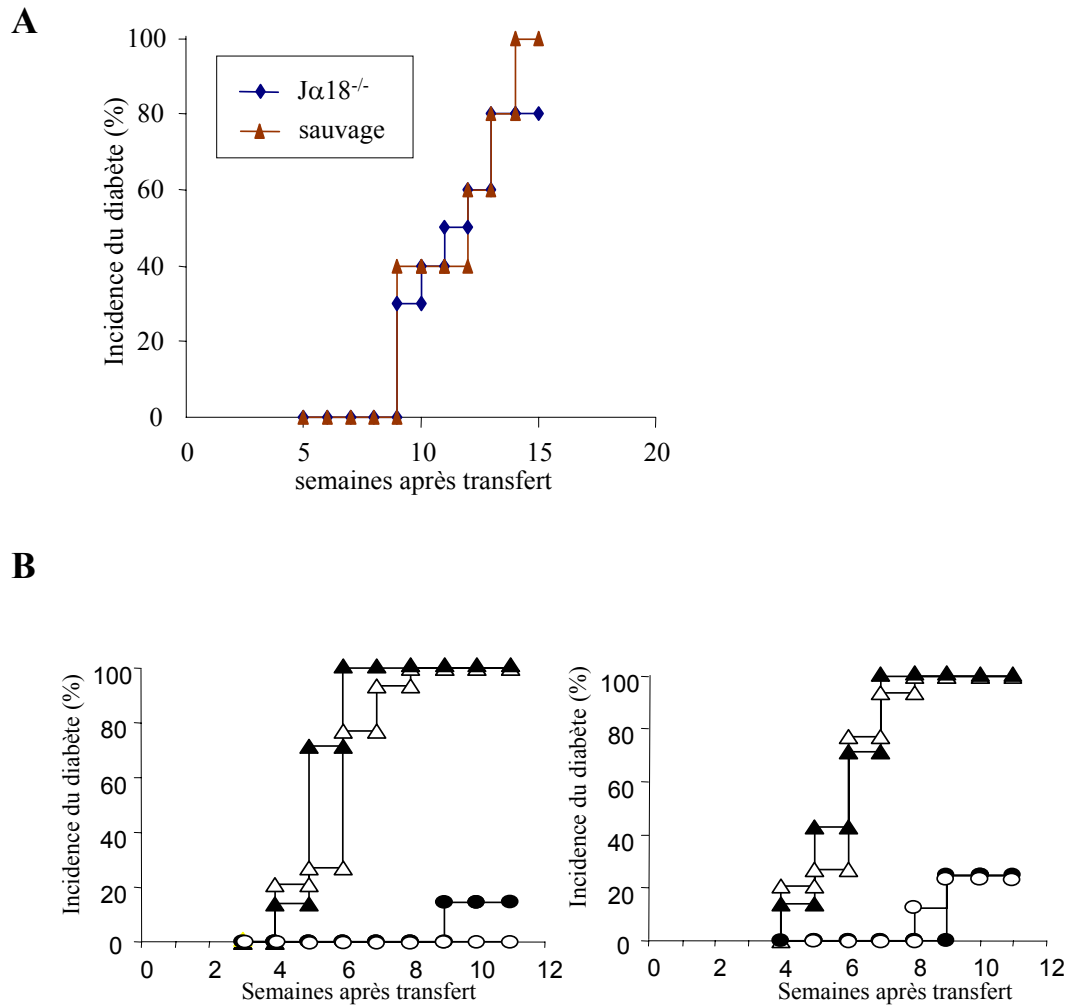


Figure 3 : A) La capacité de transfert du T1D par les splénocytes n'est pas modifiée chez la souris NOD totalement dépourvue de lymphocytes iNKT (NOD $J\alpha 18^{-/-}$). L'incidence du diabète est déterminée chez des animaux immuno-déficients NOD-*scid* receveurs par voie intra-veineuse de cellules spléniques (20×10^6) provenant de souris NOD mutées $J\alpha 18^{-/-}$ CR-10 ou sauvages de 8 semaines d'âge non diabétiques. Les résultats sont exprimés en % de diabète cumulé. Chaque groupe comprend 8 souris NOD-*scid*, chacune ayant reçu des cellules provenant d'un unique animal sauvage ou muté. Aucune différence significative n'est mise en évidence lors de la comparaison des deux groupes (*log rank test*). **B) La capacité de protection des thymocytes (figure de gauche) et des splénocytes (figure de droite) vis-à-vis du diabète est conservée chez la souris NOD totalement dépourvue de lymphocytes iNKT (NOD $J\alpha 18^{-/-}$) mais non chez la souris NOD totalement dépourvue de lymphocytes CD4 conventionnels (NOD $IA-\beta^{\circ}$).** L'incidence du diabète est déterminée chez des animaux immuno-déficients NOD-*scid* recevant par voie intra-veineuse des cellules spléniques (1×10^7) provenant d'un groupe de 5 souris NOD ayant développé un diabète (cellules Db) depuis moins de 2 semaines. Les cellules Db sont injectées seules (Δ) ou simultanément avec des thymocytes totaux (50×10^6 cellules), des splénocytes totaux (20×10^6 cellules) provenant de souris NOD âgées de 6 semaines, sauvages (\circ), mutées $J\alpha 18^{-/-}$ CR-10 (\bullet) ou $IA-\beta^{\circ}$ (\blacktriangle). Les résultats sont exprimés en % de diabète cumulé. Chaque groupe receveur comprend 7 à 8 souris NOD-*scid*. Aucune différence significative n'est mise en évidence entre les groupes sauvages et mutés $J\alpha 18^{-/-}$ ni entre le groupe ayant reçu seulement des cellules Db et celui ayant reçu simultanément des cellules provenant de souris $IA-\beta^{\circ}$ (*log rank test*). La différence d'incidence entre le groupe ayant reçu des cellules Db seules et ceux ayant simultanément reçu des thymocytes ou des splénocytes provenant de souris sauvages ou mutées $J\alpha 18^{-/-}$ est significative ($P < 0.01$; *log rank test*).

Manuscrit n°3

Genetic and functional analysis of the Nkt1 locus using congenic non-obese diabetic (NOD) mice: improved invariant Natural Killer T cell performance but failure to protect against type 1 diabetes.

Rocha-Campos AC, Melki R, Zhu R, Deruytter N, Boulard O, Damotte D, Dy M, Herbelin A, Garchon HJ. *Diabetes*, 2006, 55:1163-1170

Ce travail porte sur la description du statut des lymphocytes iNKT dans une lignée NOD particulière dénommée NOD FcγR2.B6 qui est congénique pour une région génétique du chromosome 1 provenant de la lignée C57BL/6. Cette région contient un locus d'intérêt impliqué dans l'ontogenèse et/ou les fonctions des lymphocytes iNKT comme l'atteste la correction significative du défaut tant numérique que fonctionnel des lymphocytes iNKT dans la lignée congénique. Malgré cette normalisation, l'incidence du T1D spontané de ces souris ne s'est pas trouvée modifiée comparativement à celle des souris NOD sauvages.

Ces résultats joints à ceux obtenus avec la lignée de souris NOD mutées $J\alpha 18^{-/-}$ (manuscrit n°2) permettent de conclure définitivement qu'il n'y a pas de lien privilégié entre le statut de ces cellules et le développement du T1D spontané dans le modèle de la souris NOD.

Genetic and Functional Analysis of the *Nkt1* Locus Using Congenic NOD Mice

Improved V α 14-NKT Cell Performance but Failure to Protect Against Type 1 Diabetes

Ana-Claudia Rocha-Campos,¹ Rahma Melki,² Ren Zhu,¹ Nathalie Deruytter,² Diane Damotte,^{2,3} Michel Dy,¹ André Herbelin,¹ and Henri-Jean Garchon²

Defective invariant natural killer T-cells (iNKT cells) have been implicated in the etiology of type 1 diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. In a genome scan of a cross between NOD and C57BL/6 mice, the most significant locus controlling the number of iNKT cells, referred to as *Nkt1*, was recently mapped to distal chromosome 1. Here, using congenic mice for this chromosomal segment, we definitively demonstrate the existence of *Nkt1* and show that introgression of the C57BL/6 allele onto the NOD background improves both the number of iNKT cells and their rapid production of cytokines elicited by α -galactosylceramide treatment, explaining at least half of the difference between the NOD and C57BL/6 strains. Using new subcongenic lines, we circumscribed the *Nkt1* locus to a 8.7-cM segment, between the NR1i3 and D1Mit458 markers, that notably includes the SLAM (signaling lymphocytic activation molecule) gene cluster, recently involved in murine lupus susceptibility. However, despite a significant correction of the iNKT cell defect, the *Nkt1* locus did not alter the course of spontaneous diabetes in congenic mice. Our findings indicate a complex relationship between iNKT cells and autoimmune susceptibility. Congenic lines nonetheless provide powerful models to dissect the biology of iNKT cells. *Diabetes* 55:1163–1170, 2006

From the ¹Centre National de Recherche (CNRS) Unité Mixte de Recherche (UMR) 8147, Université Paris 5, Paris, France; the ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U580, Université Paris 5, Paris, France; and ³Hôpital Européen George Pompidou, Paris, France.

Address correspondence and reprint requests to Henri-Jean Garchon, INSERM U580, Hôpital Necker, 161 rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France. E-mail: garchon@necker.fr. Or André Herbelin, CNRS INSERM 8147, Hôpital Necker, 161 rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France. E-mail: herbelin@necker.fr.

Received for publication 15 July 2005 and accepted in revised form 3 January 2006.

A.-C.R.-C. and R.M. contributed equally to this work.

APC, allophycocyanin; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FITC, fluorescein isothiocyanate; α -GalCer, α -galactosylceramide; IFN- γ , γ -interferon; IL, interleukin; iNKT cell, invariant natural killer T-cell; mAb, monoclonal antibody; SLAM, signaling lymphocytic activation molecule; TCR, T-cell antigen receptor.

© 2006 by the American Diabetes Association.

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

The development of type 1 diabetes results from T-cell-mediated destruction of insulin-producing β -cells in the pancreas (1). Expression of effector lymphocytes seems to be caused in large part by a defect of immunoregulatory cells (2), among which invariant natural killer T-cells (iNKT cells) are currently the focus of considerable attention. This unique population of $\alpha\beta$ -T-cells shows an invariant T-cell antigen receptor (TCR) α -chain, including V α 14J α 18 in the mouse and V α 24J α Q in humans, and also expresses natural killer cell receptors (3). Most remarkably, these cells are capable of rapidly producing large amounts of cytokines on stimulation by glycolipid-type ligands that must be presented by the major histocompatibility complex class I-like CD1d molecule (4). Although α -galactosylceramide (α -GalCer), a glycolipid isolated from marine sponge, has long been used as a surrogate antigen for iNKT cells, their endogenous ligand has been only recently characterized (5).

Remarkably, mice of the nonobese diabetic (NOD) strain, the well-established murine model of spontaneous type 1 diabetes (6), exhibit both a numerical and a functional defect of their iNKT cells as early as 3 weeks of age compared with nondiabetic strains (7–9). The protective role of iNKT cells is strongly suggested by adoptive transfer experiments (10) and by the study of NOD mice transgenic for a V α 14-J α 18 TCR (11) or for CD1d overexpressed in pancreatic islets (12). Conversely, diabetes is exacerbated in CD1d knockout NOD mice, which are devoid of iNKT cells (13,14). Finally, diabetes can be prevented by in vivo treatment with α -GalCer (15,16), opening a path for the therapeutic manipulation of this cell subset.

Interstrain differences suggest that the number and function of iNKT cells might be under genetic control (8). Recently, a genome-wide screen of a cross between NOD and C57BL/6 mice localized two main loci controlling iNKT cell number: *Nkt1* on distal chromosome 1 and *Nkt2* on chromosome 2 (17). Importantly, the *Nkt2* locus overlapped with the *Idd13* locus for insulin-dependent diabetes (*Idd*) susceptibility, suggesting that the iNKT cell defect of NOD mice might be a genetically determined component of their diabetes susceptibility. Consistent with this finding, mice congenic for certain *Idd* loci, including *Idd6*, *Idd9*, and *Idd13*, showed a significant

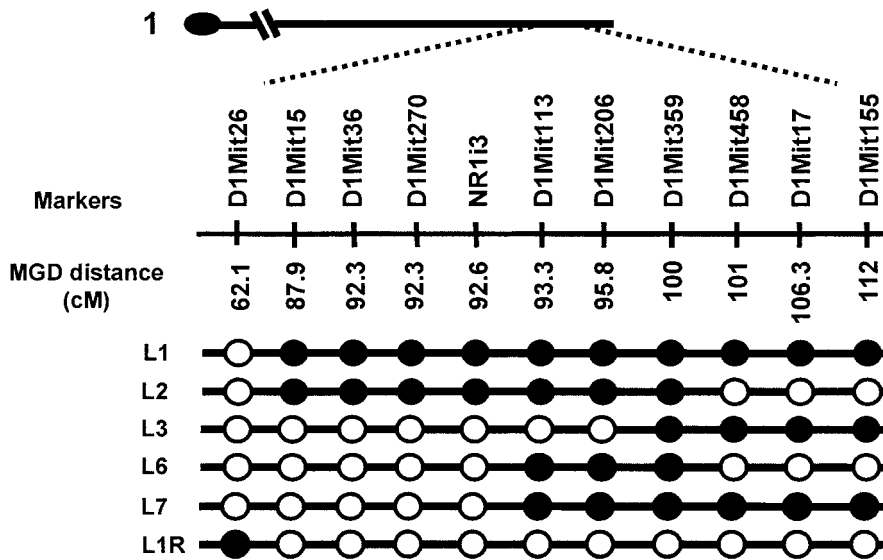


FIG. 1. Schematic representation of the genetic intervals on distal chromosome 1 defining the various congenic and subcongenic strains used in the current study. Only the most representative markers are shown. The following microsatellites were also used to strengthen the mapping data: D1Mit353, D1Mit146, D1Mit540, D1Mit149, D1Mit456, D1Mit354, D1Mit356, D1Mit355, D1Mit115, D1Mit457, D1Mit150, D1Mit403, D1Mit166, D1Mit407, D1Mit361, and D1Mit273. The genetic distances from the centromere (in cM) were obtained at the Mouse Genome Database (MGD; release 3.01, available at <http://www.informatics.jax.org>). ●, NOD allele; ○, C57BL/6 allele.

modulation of their iNKT cell number and function (18,19). In contrast, however, diabetes-free mice of the NOD-related nonobese diabetes-resistant (NOR) strain harbor the same iNKT cell defect as NOD mice, whereas lupus-prone mice demonstrate an increased number and activity of iNKT cells (18). Taken together, these observations indicate that there is no simple relationship between the genetic control of iNKT cell variation and that of autoimmune susceptibility.

Although the *Nkt1* locus does not map to a known *Idd* locus, we previously characterized a major quantitative trait locus in the same chromosomal region that controls the increased IgG₁ and IgG_{2b} serum levels of NOD mice compared with C57BL/6 mice (20). Moreover, this region was also associated with the propensity of NOD mice to express anti-nuclear autoantibodies (21). We had also derived reciprocally congenic strains for this chromosomal region. Such strains provide an essential tool both to confirm the existence of a locus controlling a complex trait as well as to undertake its detailed analysis. Here, we have used these congenic strains and new subcongenic lines to further investigate the *Nkt1* locus and its potential influence on type 1 diabetes.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

NOD, C57BL/6J, and congenic mice were bred in our animal facility under specific pathogen-free conditions. Congenic strains for distal chromosome 1, including L1 (formerly designated NOD.C57BL/6-fcgr2) and L1R (formerly C57BL/6.NOD-fcgr2), were previously described (20) and have been backcrossed for 20 generations. Subcongenic strains, L2, L3, L6, and L7 (Fig. 1) were derived from L1 mice backcrossed with the NOD parent and by genotypic selection of mice carrying a chromosomal interval of interest. Homozygous mice were then obtained by brother-sister matings. Genomic DNA was genotyped for chromosome 1 microsatellite markers referenced in the Mouse Genome Database (available from www.informatics.jax.org).

Reagents. A synthetic form of α -GalCer (KRN-7000; Pharmaceutical Research Laboratory, Kirin Brewery, Tokyo) was used. Empty and α -GalCer-loaded CD1d tetramers labeled with allophycocyanin (APC) were prepared in our laboratory. Monoclonal antibodies (mAbs) were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA) and included fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti- $\alpha\beta$ -TCR (clone H57-597), phycoerythrin-labeled anti-CD4 (clone RM4-5), phycoerythrin-labeled anti-interleukin (IL)-4 (clone 11B11), phycoerythrin-labeled anti- γ -interferon (IFN- γ) (clone XMG1.2), and corresponding isotype control antibodies. The Fc-receptor-blocking mAb (anti-CD16/CD32, clone 24G2, culture supernatant) was added to staining mixtures to prevent nonspecific binding by labeled mAbs.

In vivo challenge with α -GalCer and cytokine production. Mice were injected with α -GalCer (1 μ g/dose, i.p. and i.v.) diluted in saline and were bled

90 min later. In some experiments, splenocytes (2.5×10^6 per ml) were prepared from treated animals and cultured without further stimulation for 90 min in RPMI 1640 Glutamax culture medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 10 mmol/l HEPES, pH 7.4, 1 mmol/l sodium pyruvate, 100 units/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, and 0.05 mmol/l β -mercaptoethanol. IFN- γ and IL-4 contents were measured in supernatants and in sera by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Priming with α -GalCer-pulsed dendritic cells. Dendritic cells were grown from bone marrow cells cultured in RPMI 1640 supplemented with 200 units/ml granulocyte macrophage colony-stimulating factor (R&D Systems, Minneapolis, MN) as previously described (22). After 10 days, dendritic cells (5×10^4 cells per well) were pulsed or not pulsed with α -GalCer (100 ng/ml) for 40 h and then injected intravenously into 6- to 7-week-old mice (5×10^4 dendritic cells per mouse). Sera were collected 24 h later and assayed for cytokine content by sandwich ELISA.

Cell preparation and flow cytometry analysis. Single-cell suspensions of splenocytes were prepared by standard techniques. Livers were perfused with PBS and pressed through a 70- μ m cell strainer, and cells were washed three times. Hepatic lymphocytes were then separated, using a 35% Percoll solution (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), and red cells were lysed in hemolysis buffer. Spleen and liver cells were then incubated with appropriate dilutions of different fluorochrome-coupled mAbs, fixed in 4% paraformaldehyde, and analyzed using a FACScalibur cytometer and CellQuest v3.3 software (BD Biosciences, Mountain View, CA). Dead cells were excluded, using forward and side scatter parameters. A minimum of 1.5×10^5 events gated from live lymphoid cells were acquired in each run. Gates on populations of interest contained at least 1×10^3 events. The absolute number of iNKT cells was calculated from the percentage of the CD1d tetramer-positive cells and the total cell number harvested from each organ.

For detection of intracellular IL-4 and IFN- γ in iNKT cells, cells were stained with APC-labeled CD1d/ α -GalCer tetramer and FITC-labeled anti- $\alpha\beta$ -TCR mAbs. Fixed cells were then permeabilized with PBS containing 1% BSA and 0.5% saponin and further stained with phycoerythrin-labeled anti-IL-4, phycoerythrin-labeled anti-IFN- γ , or control phycoerythrin-labeled isotype for 30 min at room temperature. The percentages of cytoplasmic IL-4- and IFN- γ -expressing cells were determined by cytometry.

Assessment of diabetes. The 10-week-old female mice were followed for glycosuria (Glukotests; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) once a week. Mice were recorded as diabetic when the glucose concentration was >500 mg/dl on three consecutive readings.

Data analysis. Data were expressed as the means \pm SE, and differences between means were evaluated by Student's *t* test or the nonparametric Wilcoxon-Mann-Whitney test. A log-rank test was used to compare incidences of type 1 diabetes. *P* values ≤ 0.05 were reported.

RESULTS

In vivo α -GalCer induced production of IFN- γ and IL-4 in congenic mice. One of the original features of iNKT cells is their capacity to promptly release large amounts of both of the prototypical T helper-1 and -2

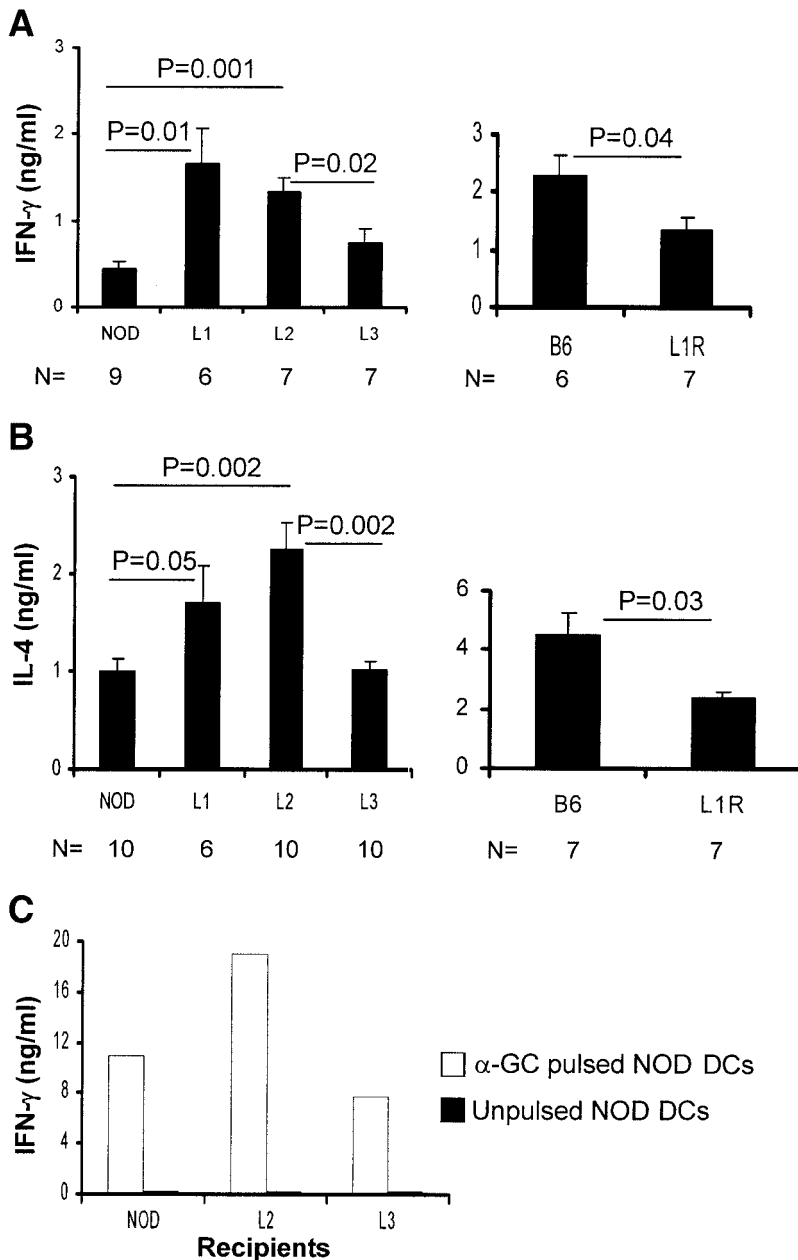


FIG. 2. Influence of distal chromosome 1 on cytokine production by in vivo stimulated iNKT cells. Serum levels (means \pm SE) of IFN- γ (A) and IL-4 (B) in NOD and NOD congenic mice (left panels) or in C57BL/6 and C57BL/6 congenic mice (right panels) were measured by ELISA 90 min after an injection of α -GalCer. The number of mice analyzed in each group is given below the horizontal axis. C: Increase in IFN- γ production stimulated by α -GalCer-pulsed dendritic cells (DCs) is influenced by the recipient genotype. Mice were injected intravenously with 5×10^4 dendritic cells prepared from NOD mice and pulsed or not pulsed with α -GalCer. Serum concentration of IFN- γ was determined by ELISA 24 h later. The data are the means of two independent experiments.

cytokines, IFN- γ and IL-4, after in vivo treatment with their cognate ligand, α -GalCer. To test an effect of the distal chromosome 1 region on iNKT cells, we injected congenic and parent mice once with the ligand and assessed their serum levels of cytokines 2 h later. As shown in Fig. 2A and B (left panels), IFN- γ and IL-4 were detected in sera within 2 h of treatment with α -GalCer at levels significantly higher in congenic L1 than in parent NOD mice (1.67 ± 0.39 vs. 0.45 ± 0.08 ng/ml for IFN- γ , $P = 0.01$, and 1.71 ± 0.38 vs. 0.99 ± 0.13 ng/ml for IL-4, $P = 0.05$). Conversely, the reciprocal L1R congenic mice showed decreased levels compared with their C57BL/6 parents (Fig. 2A and B, right panels). Similarly, freshly explanted spleen cells from α -GalCer-primed L1 mice released higher levels of the cytokines compared with NOD splenocytes (0.11 ± 0.03 vs. 0.04 ± 0.01 ng/ml for IFN- γ , $P = 0.008$, and 0.08 ± 0.02 vs. 0.02 ± 0.01 ng/ml for IL-4, $P = 0.012$) (not displayed on Fig. 2). Altogether, this first series of experiments based on congenic stocks definitively demonstrated the existence of

a locus on chromosome 1 controlling iNKT cell activity, likely closely related to that previously identified as *Nkt1* by linkage analysis (17).

We then assessed the in vivo α -GalCer response in L2 and L3 subcongenic mice to narrow down the interval of interest. Both lines were derived from L1 and harbor complementary intervals (Fig. 1). As shown in Fig. 2A and B (left panels), serum levels of cytokines were significantly higher in L2 than in NOD mice ($P = 0.001$ for IFN- γ and $P = 0.002$ for IL-4) and comparable to those of their L1 parents, whereas L3 mice responded similarly to NOD mice. Based on this observation, the *Nkt1* locus was therefore mapped to a 15-cM interval toward the distal end of the chromosome, excluding its most telomeric segment.

To investigate whether the differential response of congenic mice was caused by an alteration at the level of the presenting cells or of the responding cells, the source of dendritic cells was made constant. Thus, dendritic cells from NOD mice were prepared, pulsed or not with α -Gal-

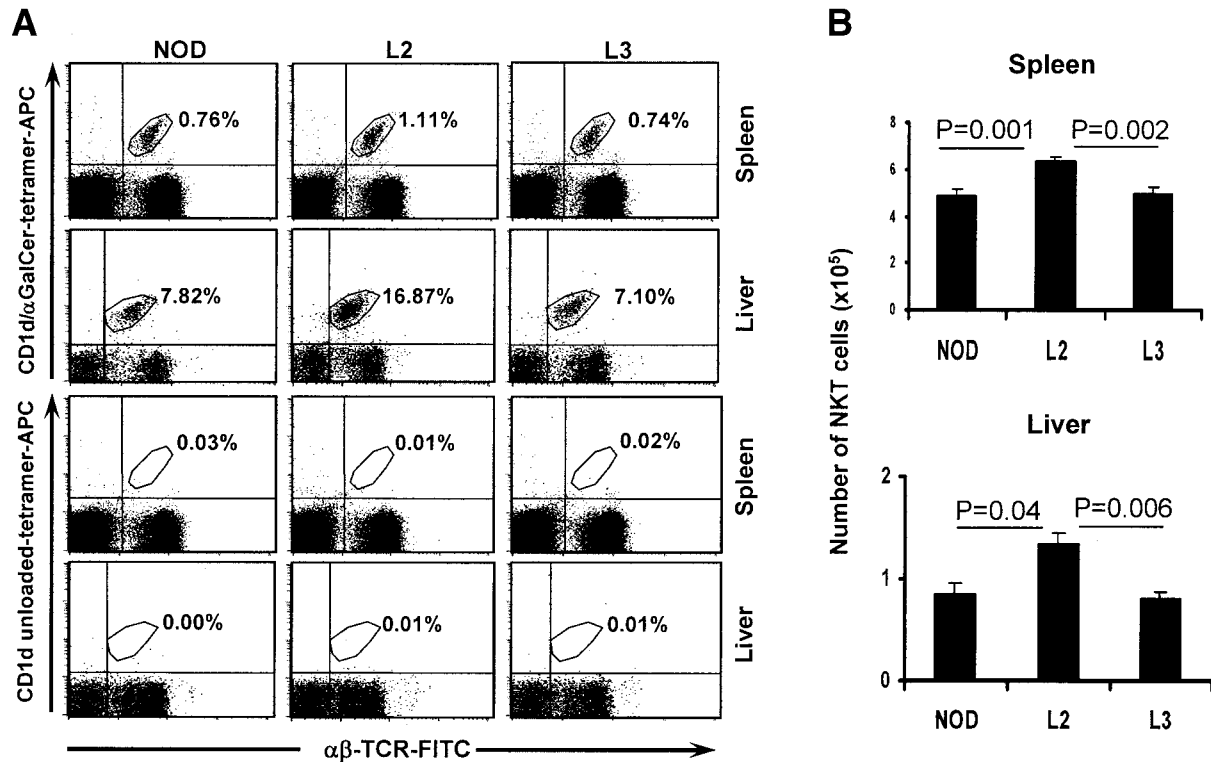


FIG. 3. Enumeration of iNKT cells in NOD, L2, and L3 mice by flow cytometry. Mononuclear cells were prepared from spleen and liver and labeled with the APC-conjugated CD1d tetramer loaded or not loaded with α -GalCer and with FITC-labeled anti- $\alpha\beta$ -TCR antibody. Double-positive cells were compared between strains. **A:** Values indicate the mean percentage of iNKT cells visualized among electronically gated live lymphocytes. Dot plots are representative of at least three experiments per strain. The specificity of α -GalCer-loaded CD1d tetramer binding was controlled with an unloaded CD1d tetramer. **B:** Absolute numbers of iNKT cells in spleen and liver of NOD, L2, and L3 congenic mice. Results represent the means \pm SE from three to eight mice.

Cer, and injected into L2, L3, or NOD mice. As illustrated in Fig. 2C, for IFN- γ production, the response of L2 mice to dendritic cells pulsed with the glycolipid was higher than that of L3 and NOD mice. This observation suggested that the *Nkt1* locus might exert its control at the level of iNKT cells directly.

Numerical and functional profiles of iNKT cells in L2 and L3 subcongenic mice. Spleen and liver iNKT cells were enumerated in NOD and in subcongenic mice by flow cytometry, using a CD1d tetramer probe. As shown in the dot plot (Fig. 3A), iNKT cells could be clearly resolved among total lymphocytes by the binding of the α -GalCer-loaded CD1d tetramer and the expression of an intermediate level of $\alpha\beta$ -TCR. Relative frequencies of iNKT cells are known to vary widely with tissues. In both the spleen and in the liver, L2 mice showed a significant increase in the proportions and in the absolute numbers of iNKT cells compared with NOD or L3 mice (Fig. 3B). By comparison with the parent strains, the numbers of iNKT cells in L2 mice ($1.33 \times 10^5 \pm 0.12 \times 10^5$ in the liver and $6.3 \times 10^5 \pm 0.2 \times 10^5$ in the spleen) were intermediate between those of NOD ($9.4 \times 10^4 \pm 2.2 \times 10^4$ and $4.9 \times 10^5 \pm 2.4 \times 10^4$) and C57BL/6 parent mice ($2.5 \times 10^5 \pm 2.2 \times 10^4$ and $7.3 \times 10^5 \pm 7 \times 10^4$).

The CD4 marker was reported to delineate two functionally distinct subsets of iNKT cells (23,24). A detailed analysis in the liver indicated that both the proportions and the absolute numbers of CD4⁺, but not CD4⁻, iNKT cells were significantly influenced by the L2 interval (Fig. 4).

Next, we assessed cytokine expression at the single-cell level in iNKT cells. Mice were treated in vivo by α -GalCer,

and the magnitude of IL-4 and IFN- γ expression in iNKT cells was determined 2 h after stimulation by intracellular fluorescence staining. A representative experiment is depicted in Fig. 5. Liver iNKT cells from L2 mice had an improved expression of IL-4 and IFN- γ compared with NOD mice. In contrast, L3 mice behaved as NOD mice (data not shown). These findings indicate that the L2 segment alters both the number and the cytokine production of iNKT cells.

Numerical profiles of iNKT cells in L6 and L7 subcongenic mice. To refine the localization of the *Nkt1* locus, we derived two additional subcongenic strains: L6 from L2, and L7 from L1 (Fig. 1). Both of these new strains lack the proximal part of the interval, most notably that including the *Fcgr2* locus, whereas they share 8.7 cM of the distal end of the L2 segment. As shown in Fig. 6, the absolute numbers of liver iNKT cells in L6 and L7 mice were higher than those of NOD mice and similar to those of L2 mice. This observation situates the *Nkt1* locus in the L6 segment, between the NR1i3 and D1Mit458 markers.

The C57BL/6 allele at the *Nkt1* locus does not affect diabetes incidence in NOD mice. Given the well-established immunoregulatory role of iNKT cells, it was important to investigate the effect of the *Nkt1* locus on diabetes susceptibility in NOD mice. As shown in Fig. 7, the course of spontaneous diabetes was very similar in the L2 and the control NOD mice housed at same time and in the same conditions. Up to 60% of L2 mice were diabetic at 30 weeks of age (Fig. 7). Also, the inflammatory infiltrate of the islets of Langerhans was not different in NOD and L2 mice (not shown).

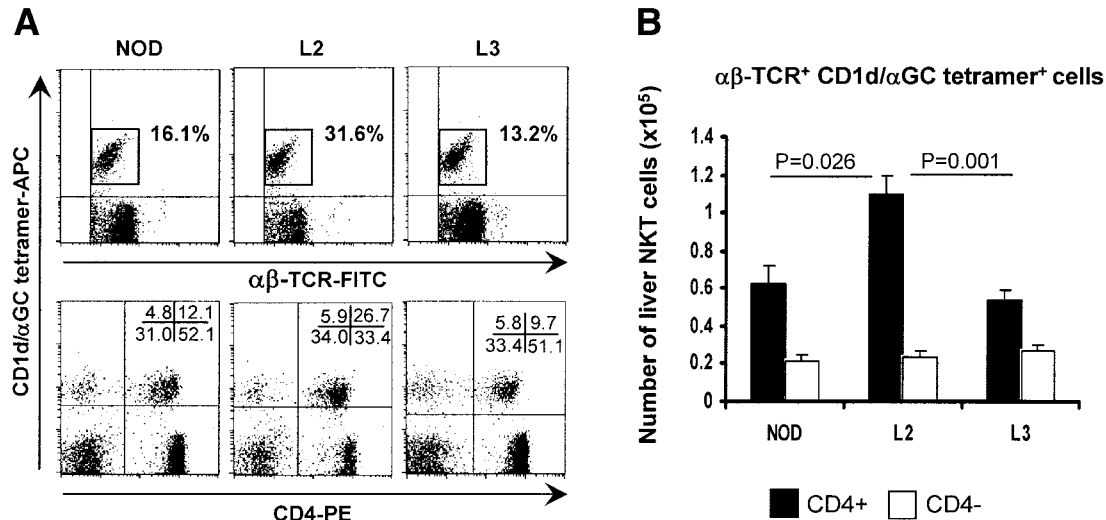


FIG. 4. Distribution of iNKT cells according to CD4 expression. Mononuclear cells were recovered from liver of NOD, L2, and L3 subcongenic mice and stained with APC-conjugated CD1d/α-GalCer tetramer, FITC-labeled anti-αβ-TCR, and phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD4 mAbs. **A: Upper panels:** representative dot plots of iNKT cells among αβ-TCR-gated cells. The numbers indicate the proportion of iNKT cells in the windows. **Lower panels:** CD1d/α-GalCer tetramer binding depending on CD4 expression among αβ-TCR-positive cells. The numbers indicate the proportion of cells in each quadrant. **B:** Increased number of CD4-positive iNKT cells in L2 subcongenic mice compared with wild-type NOD and L3 subcongenic mice. Data represent the means ± SE of three to five experiments.

DISCUSSION

The genetic basis of numerical and functional variations of iNKT cells among mouse strains has been the matter of several recent investigations. Three studies exploited available congenic strains and therefore investigated predefined genetic segments (18,19,25). These strains had

been developed to determine the genetic basis of quantitative antibody response or of susceptibility to autoimmune diseases, including type 1 diabetes and systemic lupus erythematosus. In contrast, two other studies were aimed at a genomewide screen of loci influencing iNKT cells (17,26). Altogether, these studies indicated that the number and function of iNKT cells behave as complex traits, having a strain-dependent polygenic and heterogeneous genetic control. The most notable loci mapped to chromosomes 1, 2, 4, 6, 11, and 18.

The genome scan conducted by Esteban et al. (17) was particularly relevant to the current study because it involved the NOD and C57BL/6J strains and identified two main loci. The strongest of these loci, *Nkt1*, was located on distal chromosome 1 in a region not reported to influence diabetes susceptibility in the NOD strain but that nonetheless was already known for its role in controlling serum levels of IgG (20) and production of anti-nuclear autoantibodies in NOD mice (21). Using mice congenic for this interval, which had been previously derived in our laboratory, we were able to obtain definitive proof of the

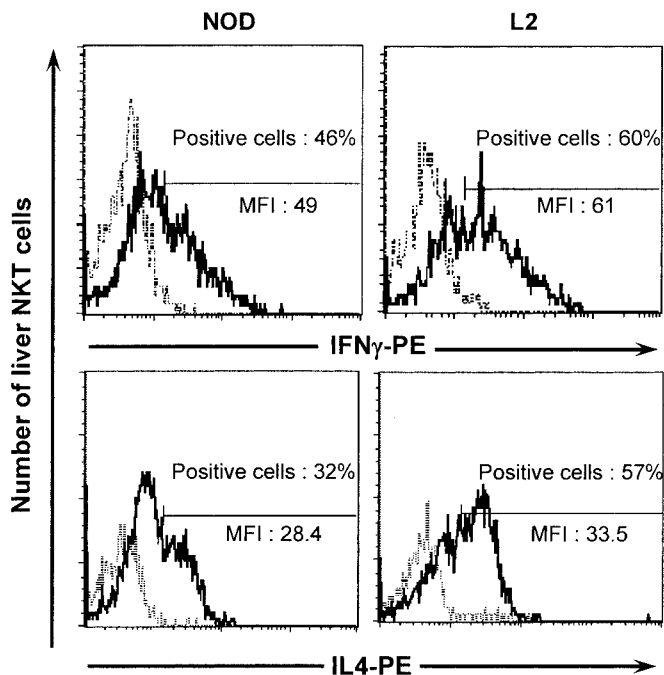


FIG. 5. Increased expression of IFN-γ and IL-4 in liver iNKT cells in L2 mice. Activated liver iNKT cells were harvested from wild-type NOD and L2 subcongenic mice 2 h after administration of α-GalCer and were examined by flow cytometry for production of IFN-γ (**upper panels**) and IL-4 (**lower panels**). Solid lines represent the labeling for cytokines and the dotted lines the background staining with phycoerythrin (PE)-labeled control Ig of the same isotype. The percentage of positive cells and the mean fluorescence intensity (MFI) for IFN-γ and IL-4 staining are given. The histograms are representative of three independent experiments.

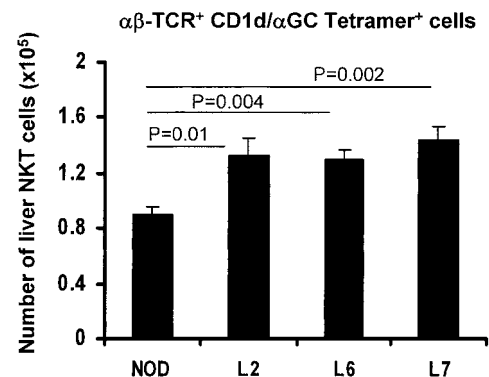


FIG. 6. Increased number of iNKT cells in the liver of L6 and L7 subcongenic mice. Liver mononuclear cells were prepared and labeled as described in the legend of Fig. 3. Data represent absolute numbers of iNKT cells (means ± SE from four to five mice).

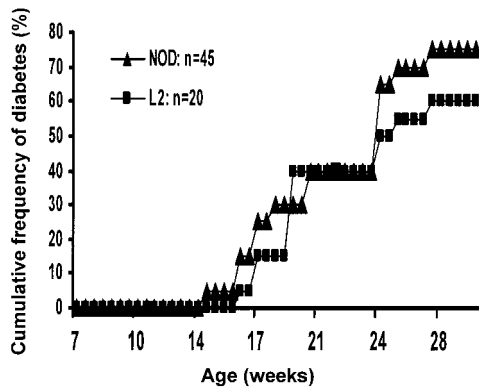


FIG. 7. Cumulative incidence of spontaneous diabetes in L2 congenic and control NOD female mice. Two other experiments using L1 mice yielded similar results (not shown).

existence of *Nkt1*. These congenic mice also provided us with a powerful tool to further investigate the effect of this region on both iNKT cell activity and diabetes susceptibility. We found that the locus affects both the number of iNKT cells and the rapid burst of cytokines induced by α -GalCer, explaining at least half of the difference between the NOD and C57BL/6 strains. It was detected by transferring the C57BL/6 allele onto the NOD background and vice versa, indicative of its strong significance. Interestingly, it concerned preferentially the CD4⁺ subset of iNKT cells. This finding is consistent with this subset being the major producer of cytokines on activation with α -GalCer (27,28 and A.H., unpublished results). Whether the locus is expressed intrinsically in iNKT cells remains to be investigated. However, our experiment showing that the genotype of iNKT cells responding to fixed-genotype stimulatory dendritic cells influences their response strongly is consistent with this possibility.

Using subcongenic strains, we narrowed down the *Nkt1* interval to a segment of 8.7 cM between markers NR1i3 and D1Mit458. Several genes of immunological importance map within the new interval. They most notably include the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)/CD2 family cluster (CD244, CD229, CS1, CD48, CD84, and Ly108), which are major candidates to explain the loss of self-tolerance in NZM2410 lupus mice, corresponding to the *Sle1* locus (29,30). The NOD strain appears to share the same haplotype in this region as NZW mice, the donor strain of the susceptibility allele in NZM2410 mice. The SLAM/CD2 family members have been shown to regulate important aspects of lymphocyte function, such as proliferation, cytokine secretion, and cytotoxicity (31). Their intracellular domain binds to an adaptor molecule, SLAM-associated protein, and this interaction was shown to be critical for T-cell signaling (32). Moreover, recent studies showed that SLAM-associated protein is a crucial regulator of iNKT cell ontogeny in both humans and mice (33–35). However, which SLAM member(s) is expressed and interacts with SLAM-associated protein in NKT cells is currently not known.

It should be also stressed that the SLAM/CD2 gene cluster extends over just 400 Kb, a minor portion of the current *Nkt1* interval, which contains numerous other potential candidates. Therefore, additional subcongenic strains with smaller intervals will be necessary before a detailed investigation of the polymorphism and expression of candidates can be undertaken.

Experiments of several types point to a relationship

between type 1 diabetes susceptibility and iNKT cells, at least in mice. Findings obtained with transgenic mice and after pharmacological treatments clearly indicate a strong impact of iNKT cells on the course of type 1 diabetes (11–13,15,16). In addition, analysis of iNKT cells in NOD mice congenic with a protective interval, including *Idd6* and *Idd9.1*, favors a role for iNKT cells in spontaneous diabetes because these protective intervals modify the number and the function of iNKT cells (18,19). Conversely, the NOR strain shows depressed number and function of iNKT cells similar to NOD mice (18), even though the *Idd13* locus, which contributes to diabetes resistance in NOR mice and maps on chromosome 2 (36), overlaps with the *Nkt2* locus and significantly attenuates iNKT cell activity when transferred onto the C57BL/6 background (18). Therefore, our present finding that the *Nkt1* locus does not affect the course of spontaneous diabetes in NOD.C57BL/6-*Nkt1* (L2 or L6) mice is not entirely unexpected.

Several explanations should be considered to account for such complexity. First, IL-4 plays a significant role in the protection against diabetes afforded by iNKT cells after activation by α -GalCer (37), and it was also put forward as the mediator of protection against diabetes in V α 14J α 81 transgenic mice (11). In these model systems, however, large amounts of IL-4 are made artificially available. In contrast, in NOD congenic mice, the improvement of IL-4 production is physiological and limited in magnitude, and it is probably not sufficient to alter the course of diabetes significantly. Other genetic factors might then be necessary and interact with *Nkt1* to restore the defect of iNKT cells beyond a certain threshold required for a significant effect on the course of diabetes. Importantly, such interactions might influence the outcome of autoimmunity in both directions and be either beneficial or detrimental to the host. This concern was recently highlighted in systemic lupus erythematosus, where iNKT cells can play both a protective and a pathogenic role in a manner that is genetically determined (38). The development of mice congenic for two or more loci should therefore shed more light on the relationship with type 1 diabetes susceptibility and iNKT cell functions.

Second, other mechanisms might be involved as well. They might depend on different cytokines or even be independent of cytokines, such as cell-cell contacts (39). Such mechanisms have not been yet investigated in genetic studies. Altogether, these observations indicate that the genetic models provide a powerful tool to dissect the complexity of iNKT cell activation mechanisms and their role in pathophysiology. Their study should also help to better anticipate the outcome of pharmacological activation of iNKT cells.

The distal chromosome 1 region is of broad significance in the immune response, as suggested by its involvement in several animal models of systemic lupus (29,40,41) and in anti-nuclear antibody production in NOD mice (21). This region has also been mapped to susceptibility to collagen-induced arthritis (42) and it was linked to murine cerebral malaria (43). Finally, the human equivalent synteny, which lies on distal chromosome 1q, was linked to type 1 diabetes susceptibility (44,45). This region, therefore, seems to be an important one to investigate the genetic basis of autoimmune disorders, notably including type 1 diabetes.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by funds from INSERM, CNRS, University Paris 5 René Descartes, and the Programme National de Recherche sur le Diabète (PNRD) and by fellowships from the Ministère de la Recherche (A.-C.R.-C), the Fondation pour la Recherche Médicale (to R.M.), and the Association pour la Recherche sur le Cancer and the Académie de Médecine (to R.Z.).

We are especially indebted to Kirin Brewery (Gumma, Japan) for providing α -GalCer, to Mitchell Kronenberg (La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego, CA), and to Peter Van Endert (INSERM U580) for providing plasmids containing *CD1d* and *B2m* genes and helping with CD1d/ α -GalCer-tetramer preparation. We are most grateful to Guy Fluteau, Laure Eloy, and Séverine Diem for technical assistance and to Fabrice Valette and Mickaël Garcia for animal care.

REFERENCES

- Castano L, Eisenbarth GS: Type-I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. *Annu Rev Immunol* 8:647–679, 1990
- Delovitch TL, Singh B: The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity* 7:727–738, 1997
- Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH: Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 15:535–562, 1997
- Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, Koseki H, Taniguchi M: CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278:1626–1629, 1997
- Zhou D, Mattner J, Cantu C 3rd, Schrantz N, Yin N, Gao Y, Sagiv Y, Hudspeth K, Wu YP, Yamashita T, Teneberg S, Wang D, Proia RL, Lavery SB, Savage PB, Teyton L, Bendelac A: Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 306:1786–1789, 2004
- Kikutani H, Makino S: The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol* 51:285–322, 1992
- Gombert JM, Herbelin A, Tancrede-Bohin E, Dy M, Carnaud C, Bach JF: Early quantitative and functional deficiency of NK1+ like thymocytes in the NOD mouse. *Eur J Immunol* 26:2989–2998, 1996
- Hammond KJ, Pellicci DG, Poulton LD, Naidenko OV, Scalzo AA, Baxter AG, Godfrey DI: CD1d-restricted NKT cells: an interstrain comparison. *J Immunol* 167:1164–1173, 2001
- Poulton LD, Smyth MJ, Hawke CG, Silveira P, Shepherd D, Naidenko OV, Godfrey DI, Baxter AG: Cytometric and functional analyses of NK and NKT cell deficiencies in NOD mice. *Int Immunol* 13:887–896, 2001
- Baxter AG, Kinder SJ, Hammond KJ, Scollay R, Godfrey DI: Association between alphabetaTCR+CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes* 46:572–582, 1997
- Lehuen A, Lantz O, Beaudoin L, Laloux V, Carnaud C, Bendelac A, Bach JF, Monteiro RC: Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14-Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J Exp Med* 188:1831–1839, 1998
- Falcone M, Facciotti F, Ghidoli N, Monti P, Olivieri S, Zaccagnino L, Bonifacio E, Casorati G, Sanvito F, Sarvetnick N: Up-regulation of CD1d expression restores the immunoregulatory function of NKT cells and prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 172:5908–5916, 2004
- Wang B, Geng YB, Wang CR: CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes. *J Exp Med* 194:313–320, 2001
- Shi FD, Flodstrom M, Balasa B, Kim SH, Van Gunst K, Strominger JL, Wilson SB, Sarvetnick N: Germ line deletion of the CD1 locus exacerbates diabetes in the NOD mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6777–6782, 2001
- Hong S, Wilson MT, Serizawa I, Wu L, Singh N, Naidenko OV, Miura T, Haba T, Scherer DC, Wei J, Kronenberg M, Koezuka Y, Van Kaer L: The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med* 7:1052–1056, 2001
- Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, Mi QS, Sondhi J, Naidenko OV, Kronenberg M, Koezuka Y, Delovitch TL, Gombert JM, Leite-De-Moraes M, Gouarin C, Zhu R, Hameg A, Nakayama T, Taniguchi M, Lepault F, Lehuen A, Bach JF, Herbelin A: Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune type 1 diabetes. *Nat Med* 7:1057–1062, 2001
- Esteban LM, Tsoutsman T, Jordan MA, Roach D, Poulton LD, Brooks A, Naidenko OV, Sidobre S, Godfrey DI, Baxter AG: Genetic control of NKT cell numbers maps to major diabetes and lupus loci. *J Immunol* 171:2873–2878, 2003
- Matsuki N, Stanic AK, Embers ME, Van Kaer L, Morel L, Joyce S: Genetic dissection of V alpha 14J alpha 18 natural T cell number and function in autoimmune-prone mice. *J Immunol* 170:5429–5437, 2003
- Carnaud C, Gombert J, Donnars O, Garchon H, Herbelin A: Protection against diabetes and improved NK/NKT cell performance in NOD.NK1.1 mice congenic at the NK complex. *J Immunol* 166:2404–2411, 2001
- Luan JJ, Monteiro RC, Sautes C, Fluteau G, Eloy L, Fridman WH, Bach JF, Garchon HJ: Defective Fc gamma RII gene expression in macrophages of NOD mice: genetic linkage with up-regulation of IgG1 and IgG2b in serum. *J Immunol* 157:4707–4716, 1996
- Jordan MA, Silveira PA, Shepherd DP, Chu C, Kinder SJ, Chen J, Palmisano LJ, Poulton LD, Baxter AG: Linkage analysis of systemic lupus erythematosus induced in diabetes-prone nonobese diabetic mice by *Mycobacterium bovis*. *J Immunol* 165:1673–1684, 2000
- Fujii S, Shimizu K, Kronenberg M, Steinman RM: Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs. *Nat Immunol* 3:867–874, 2002
- Bendelac A, Killeen N, Littman DR, Schwartz RH: A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science* 263:1774–1778, 1994
- Vicari A, de Moraes Mdo C, Gombert JM, Dy M, Penit C, Papiernik M, Herbelin A: Interleukin 7 induces preferential expansion of V beta 8.2+CD4-8- and V beta 8.2+CD4+8- murine thymocytes positively selected by class I molecules. *J Exp Med* 180:653–661, 1994
- Araujo LM, Puel A, Gouarin C, Hameg A, Mevel JC, Koezuka Y, Bach JF, Mouton D, Herbelin A: NKT lymphocyte ontogeny and function are impaired in low antibody-producer Biozzi mice: gene mapping in the interval-specific congenic strains raised for immunomodulatory genes. *Int Immunol* 12:1613–1622, 2000
- Zhang F, Liang Z, Matsuki N, Van Kaer L, Joyce S, Wakeland EK, Aune TM: A murine locus on chromosome 18 controls NKT cell homeostasis and Th cell differentiation. *J Immunol* 171:4613–4620, 2003
- Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB: Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* 195:625–636, 2002
- Lee PT, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A: Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med* 195:637–641, 2002
- Morel L, Blenman KR, Croker BP, Wakeland EK: The major murine systemic lupus erythematosus susceptibility locus, Sle1, is a cluster of functionally related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1787–1792, 2001
- Wandstrat AE, Nguyen C, Limaye N, Chan AY, Subramanian S, Tian XH, Yim YS, Pertsemliadis A, Garner HR Jr, Morel L, Wakeland EK: Association of extensive polymorphisms in the SLAM/CD2 gene cluster with murine lupus. *Immunity* 21:769–780, 2004
- Engel P, Eck MJ, Terhorst C: The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat Rev Immunol* 3:813–821, 2003
- Howie D, Okamoto S, Rietdijk S, Clarke K, Wang N, Gullo C, Bruggeman JP, Manning S, Coyle AJ, Greenfield E, Kuchroo V, Terhorst C: The role of SAP in murine CD150 (SLAM)-mediated T-cell proliferation and interferon gamma production. *Blood* 100:2899–2907, 2002
- Chung B, Aoukaty A, Dutz J, Terhorst C, Tan R: Signaling lymphocytic activation molecule-associated protein controls NKT cell functions. *J Immunol* 174:3153–3157, 2005
- Nichols KE, Hom J, Gong SY, Ganguly A, Ma CS, Cannons JL, Tangye SG, Schwartzberg PL, Koretzky GA, Stein PL: Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nat Med* 11:340–345, 2005
- Pasquier B, Yin L, Fondaneche MC, Relouzat F, Bloch-Queyrat C, Lambert N, Fischer A, de Saint-Basile G, Latour S: Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J Exp Med* 201:695–701, 2005
- Serreze DV, Prochazka M, Reifsnnyder PC, Bridgett MM, Leiter EH: Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene. *J Exp Med* 180:1553–1558, 1994
- Mi QS, Ly D, Zucker P, McGarry M, Delovitch TL: Interleukin-4 but not interleukin-10 protects against spontaneous and recurrent type 1 diabetes by activated CD1d-restricted invariant natural killer T-cells. *Diabetes* 53:1303–1310, 2004
- Singh AK, Yang JQ, Parekh VV, Wei J, Wang CR, Joyce S, Singh RR, Van Kaer L: The natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide prevents or promotes pristane-induced lupus in mice. *Eur J Immunol* 35:1143–1154, 2005

39. Novak J, Beaudoin L, Griseri T, Lehuen A: Inhibition of T cell differentiation into effectors by NKT cells requires cell contacts. *J Immunol* 174:1954–1961, 2005
40. Kono DH, Burlingame RW, Owens DG, Kuramochi A, Balderas RS, Balomenos D, Theofilopoulos AN: Lupus susceptibility loci in New Zealand mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10168–10172, 1994
41. Vyse TJ, Rozzo SJ, Drake CG, Izui S, Kotzin BL: Control of multiple autoantibodies linked with a lupus nephritis susceptibility locus in New Zealand black mice. *J Immunol* 158:5566–5574, 1997
42. Johansson AC, Sundler M, Kjellen P, Johannesson M, Cook A, Lindqvist AK, Nakken B, Bolstad AI, Jonsson R, Alarcon-Riquelme M, Holmdahl R: Genetic control of collagen-induced arthritis in a cross with NOD and C57BL/10 mice is dependent on gene regions encoding complement factor 5 and FcγRIIb and is not associated with loci controlling diabetes. *Eur J Immunol* 31:1847–1856, 2001
43. Bagot S, Campino S, Penha-Goncalves C, Pied S, Cazenave PA, Holmberg D: Identification of two cerebral malaria resistance loci using an inbred wild-derived mouse strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9919–9923, 2002
44. Concannon P, Gogolin-Ewens KJ, Hinds DA, Wapelhorst B, Morrison VA, Stirling B, Mitra M, Farmer J, Williams SR, Cox NJ, Bell GI, Risch N, Spielman RS: A second-generation screen of the human genome for susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nat Genet* 19:292–296, 1998
45. Ewens KG, Johnson LN, Wapelhorst B, O'Brien K, Gutin S, Morrison VA, Street C, Gregory SG, Spielman RS, Concannon P: Linkage and association with type 1 diabetes on chromosome 1q42. *Diabetes* 51:3318–3325, 2002

Résultats Partie II

Afin de compléter notre étude sur l'impact des défauts naturels de la population lymphocytaire iNKT en situation auto-immune chez la souris NOD, nous avons utilisé un modèle murin d'hépatite fulminante induite par la lectine Concanavaleine A (ConA) (Tiegs et al., 1992), une maladie expérimentale dépendante des lymphocytes iNKT (Takeda et al., 2000a; Kaneko et al., 2000). Le choix de ce modèle a reposé principalement sur notre objectif de mieux comprendre le rôle régulateur des lymphocytes iNKT au niveau hépatique. Il faut en effet souligner que 10 à 30 % des cellules mononucléées du foie sont des lymphocytes iNKT contre seulement 1 à 1,5 % dans la rate (Emoto and Kaufmann, 2003) et la signification physiologique de cette fréquence élevée de lymphocytes iNKT dans le foie n'est pas élucidée.

Chez l'homme, l'hépatite est déclenchée généralement par agression immunitaire, soit de manière directe (cas d'une toxicité induite par des médicaments), soit de manière indirecte (cas des infections virales) (Herkel et al., 2005). C'est par l'activation généralisée du système immunitaire que l'hépatite expérimentale induite par la ConA mime parfaitement l'hépatite auto-immune humaine et fournit un outil remarquable pour des études variées sur les réactions immunitaires dans le foie.

L'hépatite induite par la ConA. Une injection unique de ConA par voie intra-veineuse est suffisante pour entraîner une hépatite fulminante chez la souris. On sait que cette lectine mobilise de nombreux types de cellules du système immunitaire et en particulier les lymphocytes T en se fixant et en rapprochant les molécules de mannose des rameaux glucidiques présents à la surface de ces cellules (Tiegs et al., 1992). La maladie expérimentale se caractérise par des infiltrats cellulaires, localisés surtout au niveau de la

veine porte et qui comprennent essentiellement des lymphocytes T. Cette infiltration cellulaire est intimement associée à une réaction inflammatoire locale qui aboutit à une nécrose des hépatocytes, laquelle se traduit par une augmentation du taux plasmatique d'alanine amino-transférase (ALT) 8 à 24 heures après l'injection de la ConA.

L'implication des cytokines Th1 et Th2. L'hépatite induite par la ConA dépend du compartiment lymphocytaire T CD4 et a la caractéristique rare de mettre en jeu des cytokines tant Th1 que Th2 (Tiegs et al., 1992; Sass et al., 2002). On sait que les cytokines IL-4, IFN- γ et TNF- α ont une action cytotoxique directe vis-à-vis des hépatocytes et qu'elles sont produites *via* de multiples cascades d'activation. L'injection de la ConA entraîne en effet la production rapide et massive par les lymphocytes T CD4 des cytokines IL-4 et IFN- γ . L'IFN- γ ainsi produite contribue à l'activation des cellules de Kupffer et des macrophages et à leur production de TNF- α (Kusters et al., 1996). Sans que son origine cellulaire soit documentée, une production d'IL-12 à laquelle on a attribué un rôle déterminant dans la production d'IFN- γ au cours de la maladie a pu être décrite (Nicoletti et al., 2000). L'administration de cytokines exogènes, d'antagonistes spécifiques de cytokines et l'utilisation de souris génétiquement modifiées ont permis d'apporter la démonstration définitive que chacune des cytokines IL-4 (Jaruga et al., 2003), IFN- γ (Kusters et al., 1996), TNF- α (Kusters et al., 1997) et IL-12 (Nicoletti et al., 2000) est essentielle dans le développement de la maladie. Au contraire, l'IL-10 diminue la réaction inflammatoire des cellules hépatiques (Louis et al., 1997).

L'implication des lymphocytes iNKT. Bien que les sources cellulaires des cytokines mises en jeu restent à préciser, il est indéniable que la découverte récente que des souris C57BL/6 ou BALB/c génétiquement déficientes en lymphocytes iNKT (mutées $\alpha 18^{-/-}$ ou

CD1d^{-/-}) ne développent pas la maladie (Takeda et al., 2000a; Kawano et al., 1997) est en faveur d'un rôle essentiel des cytokines produites par les lymphocytes iNKT.

Nous avons postulé que la souris NOD, par son défaut partiel et naturel en lymphocytes iNKT accompagné d'un environnement de production de cytokines Th1 et Th2 dérégulé, constitue un outil complémentaire des souris non auto-immunes totalement dépourvues de lymphocytes iNKT pour révéler et/ou préciser les mécanismes sous-jacents par lesquels les lymphocytes iNKT sont impliqués dans le développement de l'hépatite induite par la ConA.

Ayant préalablement établi que la lignée NOD est moins susceptible que les lignées non auto-immunes de référence C57BL/6 et BALB/c et qu'elle présente un déficit de production d'IL-12 en réponse à la ConA, nous avons pu aborder la question de la place des lymphocytes iNKT dans le déterminisme génétique de la maladie, montrer le caractère dominant du rôle délétère de la production d'IL-4 des lymphocytes iNKT et révéler que l'IL-12 contribue à la maladie en potentialisant cette fonction des lymphocytes iNKT (manuscrit n°4). Dans le manuscrit n°5, nous avons étudié le rôle respectif des lymphocytes iNKT de la rate et du foie dans le déclenchement de l'hépatite induite par la ConA et avons pu apporter la démonstration inattendue que les lymphocytes iNKT de la rate sont essentiels dans la maladie, probablement parce qu'ils sont bien meilleurs producteurs d'IL-4 que leurs équivalents résidents du foie.

Manuscrit n°4

Partial V α 14 NKT cell deficiency together with low IL-12 secretion alleviate IL-4-dependent T cell-mediated hepatitis

Zhu R, Diem S, Araujo LM, Aumeunier A, Denizeau J, Damotte D, Gourdy P, Dy M, Schneider E and Herbelin A. *Manuscrit soumis*.

La souris NOD constitue un outil privilégié pour la dissection des mécanismes immunologiques mettant en jeu les lymphocytes iNKT : elle a un défaut partiel dans ces cellules associé à une dérégulation de production des cytokines. Nous montrons ici dans le modèle de l'hépatite induite par la ConA, une maladie expérimentale dépendante des lymphocytes iNKT, que la lignée NOD est moins susceptible à la maladie que les lignées de référence C57BL/6 et BALB/c. Cette susceptibilité réduite résulte directement de sa déficience partielle en lymphocytes iNKT et d'un défaut de production d'IL-12. Alors que les lymphocytes iNKT produisent tant l'IL-4 que l'IFN- γ , c'est en tant que producteurs exclusifs d'IL-4 que ces cellules ont un rôle dominant dans la maladie. Enfin, l'IL-12, connue jusqu'ici pour ses fonctions pro-Th1, lorsqu'elle est administrée à la souris NOD, restaure totalement la susceptibilité à la maladie en amplifiant la production d'IL-4 des lymphocytes iNKT activés par la ConA. A l'inverse, les souris déficientes en IL-12 sont moins susceptibles à la maladie et ont un défaut de production d'IL-4 par les lymphocytes iNKT qui peut être corrigé par l'administration d'IL-12. En conclusion, notre travail a permis de préciser les mécanismes d'action des lymphocytes iNKT dans la maladie sous l'influence de l'IL-12 et de conclure en l'existence d'un déterminisme génétique de la maladie dicté par le statut fonctionnel de cette population cellulaire.

Title Page

Partial V α 14 NKT cell deficiency together with low IL-12 secretion alleviate IL-4-dependent T cell-mediated hepatitis

Ren Zhu¹, Séverine Diem¹, Luiza M. Araujo¹, Aude Aumeunier¹, Jordan Denizeau¹, Diane Damotte², Pierre Gourdy³, Michel Dy¹, Elke Schneider¹ and André Herbelin¹.

¹CNRS UMR 8147, Université Paris V, Hôpital Necker, 161 rue de Sèvres; 75783 Paris Cedex 15, France.

²Hôpital Européen Georges Pompidou, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France.

³INSERM U589, Institut L. Bugnard, Centre Hospitalier et Universitaire (CHU) Rangueil, Toulouse, France.

Short title: iNKT cells and hepatitis in NOD mice

Contact Information: A. Herbelin, CNRS UMR 8147, Institut Necker, Hôpital Necker, 161 rue de Sèvres, 75783 Paris Cedex 15, France. Tel: 33 1 44 49 53 88. Fax: 33 1 44 49 06 76. Email: herbelin@necker.fr

Electronic word count: 3579

Abstract

Background: Studies in genetically deficient mice indicate that cytokines and iNKT cells play a determinant role in the development of T cell-dependent hepatic injuries in mice. **Aims and Methods:** We took advantage of the naturally occurring abnormalities in terms of cytokine production and iNKT cells in NOD mice to examine their effect on ConA-induced hepatitis. **Results:** We found that the relative unresponsiveness of NOD mice to disease induction was typically associated with a less efficient generation of IL-4 by iNKT cells and low IL-12 secretion. We provide evidence for a direct interplay between these two cytokines through the capacity of IL-12 to enhance IL-4 production by iNKT cells and to maintain this subset locally in an activated state in the liver. It can therefore be assumed that the alleviation of hepatitis syndromes in NOD mice results from the decreased production of both cytokines. Interestingly, IL-12 exerts its deleterious effect through IL-4 induction, which is unusual for a cytokine of the pro-Th1 type. **Conclusion:** Our findings underscore the functional plasticity of iNKT cells and show that even minor variations of this regulatory subset and IL-12 have important consequences for disease development.

Electronic word count: 190

Keywords: natural killer T cells, cytokines, concanavalinA, autoimmunity, non obese diabetic mouse.

Introduction

Experimental hepatitis models associated with T-cell activation are useful tools for understanding of the physiopathology of human hepatic injury [1]. Previous studies have demonstrated that intravenous administration of concanavalin A (ConA) to mice leads to T-cell activation-dependent acute liver-specific injury that closely resembles human autoimmune hepatitis [2,3]. The experimental disease is characterized by a marked increase of plasma alanine transaminase (ALT) levels within 8 to 24 hours after injection, as well as simultaneous hepatic infiltration by immune cells, including T cells, followed by apoptosis and necrosis of hepatocytes. Although the precise etiology of autoimmune hepatitis is not known, animal studies indicate that the action of T cells in the liver is largely mediated and/or controlled through the release of a variety of cytokines that trigger multiple signaling cascades in their hepatic and immune target cells. Using mice treated with cytokines, specific cytokine antagonists or genetically engineered, it has been established that IL-4, IFN- γ , TNF- α and IL-12 are each essential for disease development, in contrast with IL-10, which down-regulates the immuno-inflammatory attack on liver cells [3-9].

In addition to the cytokines themselves it is important to identify their cellular source during ConA-mediated hepatitis. Tieg *et al* initially demonstrated a requirement for CD4⁺ T cells [2]. More recently, based on experiments with genetically engineered mice, a critical contribution of a distinctive subpopulation of mature T cells, namely invariant Natural Killer T (iNKT) cells has been proposed [10,11]. These cells are identified by their capacity to recognize glycolipids presented by the MHC class I-like CD1d molecule [12,13]. Their typical regulatory functions and tissue distribution [14-16] are consistent with a potential involvement in ConA-mediated hepatitis. Indeed, iNKT cells have the unique ability to promptly release large amounts of the two prototypical Th1 and Th2 cytokines IFN- γ and IL-4 simultaneously upon TCR engagement [14-16] and are abundant in the liver [17,18]. Yet, so far, the data supporting the involvement of cytokines and iNKT in experimental hepatitis have are based exclusively on non-physiological models in mice in which these molecular or cellular elements were biologically and/or genetically deleted. It remains to be confirmed that the susceptibility to autoimmune hepatitis is still affected when iNKT cells and cytokines are present at subnormal levels.

The Non-Obese Diabetic (NOD) mouse, which has proved to be a relevant model for insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), closely resembling the human disease [19-21], is also currently used for immunological studies in general, because of its natural abnormalities in both cytokine production [22] and iNKT cell development and functions [23-25]. More than 20 years after the discovery of these mice and a great number of studies, many investigators have ascribed their propensity to develop both spontaneous and induced Th1 type-mediated-autoimmune diseases to these abnormalities. However, NOD iNKT cells are only partially deficient, as attested by their residual regulatory functions in several immune responses including type 1 diabetes [25,26] and allergic asthma [27].

Starting from our observation that NOD mice did not develop severe autoimmune hepatitis in response to ConA, in contrast to non-autoimmune strains, we investigated whether this relative resistance resulted from deficiencies in Th1 or/and Th2 type cytokines and in iNKT cells. From our results, we conclude that their intrinsic capacity to promptly produce IL-4 endows iNKT cells with a critical role in the onset of autoimmune hepatitis. In addition we provide an explanation for the deleterious effect attributed to IL-12 in this model, which is most likely due to its ability to enhance IL-4 production by iNKT cells.

Materials and Methods

Reagents.

ConA and rmIL-12 were purchased from Sigma (St. Louis, MO) and R&D Systems (Abingdon, UK), respectively. α -GalCer was provided by the pharmaceutical Research Laboratory of Kirin Brewery (Gunma, Japan). Fluorochrome-conjugated anti- β TCR (clone H57-597), anti-CD5 (55-7.3), anti-CD19 (clone 1D3), anti-NK1.1 (clone PK136), anti-IFN- γ (clone XMG1-2), anti-IL-4 (clone 11B11), and corresponding isotype controls were from BD Pharmingen (San Diego, SA). The Fc γ R blocking mAb (clone 24G2.3) was from DNAX (Palo Alto, CA). Tetramers were prepared in our laboratory from the mCD1d/m β 2m expression vector constructed by Kronenberg's group [28], loaded or not with α -GalCer.

Mice.

Seven- to 8-wk-old wild-type and mutant (CD1d^{-/-}, J α 18^{-/-} and IL-4^{-/-}) NOD and wild-type and mutant (IL-12-p40^{-/-}) C57BL/6 mice were bred and maintained in our animal facility under specific pathogen-free conditions with free access to food and water.

Hepatitis induction.

ConA was dissolved in sterile PBS and injected intravenously into mice in a final volume of 200 μ l. Animals were sacrificed after 12 hours, when blood and livers were recovered. In some experiments, groups of mice were injected i.p. with IL-12 (250ng/mouse), or PBS alone, 1 hour before ConA injection; anti-IL-4 mAb (clone 11B11, 0.5mg/mouse), was injected i.p. 24 hours before ConA.

In vivo α -GalCer challenge.

Mice received one i.p. injection of α -GalCer (1 μ g/mouse) diluted in saline and were bled 2 hours later.

Transaminase measurement.

Plasma from individual mice was recovered 12 hours after ConA injection when alanine transaminase (ALT) activities were measured as units per liter by an automated photometric assay.

Cell preparation and flow cytometry analysis.

After perfusion with PBS, livers were removed and gently pressed through a 70- μ m cell strainer. Parenchymal cells (pellet) were separated from mononuclear cells (MNC) by centrifugation at 50g for 5 minutes [29]. After a single washing, MNC were separated using a 35% Percoll solution (Amersham Biosciences Europe; Orsay, France), and red blood cells were lysed in an ammonium chloride buffer. For cell sorting, liver MNC were stained with FITC-labeled anti-CD19,

PE-labeled anti-NK1.1 and APC-labeled anti-CD5. Then, CD19⁻ NK1.1⁺ CD5⁺ cells (iNKT) were sorted using a fluorescence-activated cell sorting (FACS) Vantage sorter (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Purity was more than 98% after reanalysis. Membrane labeling as well as intracellular cytokine staining was performed as previously described [30]. At least 1000 events gated among the population of interest were analyzed on a FacsCalibur cytometer using CellQuest software (Becton Dickinson). The proportion of α -GalCer unloaded-CD1d tetramer positive cells in gated β TCR⁺ T cells was always below 0.5%.

Cytokine assays.

IL-4 and IFN- γ in sera and supernatants were quantified using standard sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), as previously described [31]. IL-10 and IL-12 (p40) were quantified by ELISA kits from R&D Systems and Becton Dickinson, respectively. Note that the monoclonal capture antibody used in the IL-12 immunoassay is not allele specific and recognizes IL-12 variants represented in both C57BL/6 and NOD mouse strains [32]. The sensitivity limits of the assays were 20pg/mL.

Culture of liver mononuclear cells.

Liver MNC were suspended in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FCS, antibiotics and 0.05mM 2-mercapto-ethanol. MNC (1.5×10^5 /well) were seeded into 96-well flat-bottom culture plates and incubated directly with or without α -GalCer (100ng/mL) for 48 hours. In some experiments total liver MNC (1.2×10^5 /well) or purified liver iNKT cells (2.5×10^4 /well) were stimulated with IL-12 (25ng/ml) or medium for 24 hours followed by additional culture with α -GalCer (100ng/ml) or ConA (5 μ g/ml) for 24 hours. Culture supernatants were collected for cytokine determination.

Histological examination.

Hematoxylin/eosin (H&E) staining of paraffin-embedded liver sections was performed and histological examination was evaluated by light microscopy in a blinded fashion by a pathologist (D.D.). Liver damage was semiquantitatively scored using the following criteria (none denoted as grade 0; mild denoted as grade 1 in which hepatocyte death is <20%; moderate denoted as grade 2 in which hepatocyte death is between 20 and 50%; severe denoted as grade 3 in which hepatocyte damage is >50%).

Statistical analysis.

Data are expressed as means \pm SEM. Nonparametric unpaired comparisons were performed using the Mann-Whitney test. *P* values under 0.05 were considered significant.

Results

NOD mice injected with ConA develop less severe hepatic injury than C57BL/6 mice and release less IL-4 into the serum.

The severity of hepatic injury induced by ConA injection at different doses was compared between female NOD and C57BL/6 mice. Hepatitis was evaluated by measuring the activity of plasma ALT 12 hours post-treatment. At this time point, enzymatic activity peaked in both strains (not shown). As expected [33], ALT levels were maximal in control C57BL/6 mice having received 20 mg/kg of ConA (Figure 1A), while they were three-fold lower in NOD mice treated with the same dose. A similarly striking difference occurred between NOD and BALB/c mice, a strain commonly used in this model [34] (Figure 1B). The increased ALT activity in the plasma was followed within 24 hours by an important hepatic damage that was much attenuated in NOD mice (Figure 1C). Indeed, H&E staining of liver sections from ConA-treated NOD mice revealed only tiny foci of hepatocellular necrosis (grade 1 liver damage), while the damage in livers from C57BL/6 mice attained nearly 50%, with randomly distributed necrosis throughout the liver (grade 2-3).

To assess whether the lower susceptibility of NOD mice to hepatitis was related to alterations in the typical ConA-induced cytokine pattern [35], we measured IFN- γ , IL-4 and IL-10 in the serum of mice 2 hours post-treatment. As shown in Figure 2, only circulating IL-4 was drastically reduced in NOD mice relative to C57BL/6 controls, whereas IFN- γ and IL-10 levels were similar in both strains.

iNKT cells are responsible for the defective IL-4 production in NOD mice treated with ConA.

To establish whether the selective reduction of IL-4 production in NOD mice injected with ConA resulted from iNKT cell deficiency in the liver, we analyzed IL-4 production by hepatic MNC on the single cell level, using intracellular staining. As illustrated in Figure 3, liver iNKT cells, gated as β TCR⁺CD1d/ α -GalCer-tetramer⁺ cells produced IL-4 very rapidly in response to ConA, whether they were recovered from NOD or C57BL/6 mice, while conventional T cells were virtually incapable of doing so at the same time point. It is noteworthy that iNKT cell counts were significantly diminished in the liver of Con-A-stimulated NOD mice, as was the percentage of IL-4-producing iNKT cells and the amount produced per cell. ConA-induced IFN- γ production was likewise reduced in these conditions. Yet, in contrast with IL-4, this cytokine was not exclusively generated by iNKT cells but produced at high levels by conventional T cells in both strains (not shown).

The decreased IL-4 production by hepatic iNKT cells was confirmed *in vitro* in response to their specific ligand α -GalCer. Indeed, liver MNC from NOD mice produced five-fold less IL-4 and IFN- γ upon α -GalCer stimulation than those recovered from control C57BL/6 mice (Figure 4A). In addition, CD1d/ α -GalCer-tetramer⁺ cells were clearly less present in the liver of NOD mice, both in terms of frequency and total cell counts (Figure 4B and C).

Pathogenesis of ConA-induced hepatitis in NOD mice depends on iNKT cells and IL-4.

Notwithstanding the partial quantitative and qualitative defect of iNKT cells in NOD mice, we hypothesized that they were responsible for the remaining moderate liver injury in this strain. Hence, we examined disease progression in $J\alpha 18$ mutant NOD mice, in which iNKT cells are completely lacking. As shown in Figure 5A, a substantial reduction of circulating ALT occurred in these mutants 12 hours post-ConA injection. It coincided with a marked decrease of IL-4 production resulting from the total loss of iNKT cells (Figure 5B). In contrast, the lack of iNKT cells had no impact on IFN- γ production, which was as high or even higher in $J\alpha 18^{-/-}$ NOD mice compared with their wild-type counterpart (Figure 5C). In accordance with a deleterious role of IL-4 in ConA-treated NOD mice, hepatitis did not develop in wild-type NOD mice treated with anti-IL-4 antibodies (Figure 5D) and in IL-4-deficient NOD mice (Figure 5E).

Normal IL-4 production and severe ConA-induced hepatitis are restored in response to exogenous IL-12.

It has previously been reported that IL-12 contributes to the development of ConA-induced hepatitis [8] and is aberrantly produced in NOD mice [36,37]. Knowing that it can also influence the regulatory functions of iNKT cells [38-40], we examined whether IL-12 production in response to ConA was also impaired. This was effectively the case, as evidenced by a significant decrease in this strain relative to C57BL/6 mice 5 hours after ConA injection (Figure 6A).

This finding suggested that IL-4 and IL-12 deficiencies in NOD mice were somehow connected, prompting us to investigate whether IL-4 production and ConA-induced hepatitis could be restored in partially iNKT-deficient mice after injection of IL-12. As illustrated in Figure 6B, a 1-hour pretreatment with IL-12 was sufficient to elicit a four-fold increase in ALT plasma levels in NOD mice having received ConA. This exacerbation of hepatitis by exogenous IL-12 coincided with improved cytokine release. Indeed, both IL-4 (Figure 6C) and IFN- γ levels (Figure 6D) were significantly increased in NOD mice injected with IL-12 before ConA challenge, as compared with mice pretreated with saline.

Exacerbated hepatitis and improved IL-4 production in IL-12-pretreated NOD mice depend on iNKT cells.

Once again we made use of iNKT-cell-depleted $J\alpha 18$ mutant NOD mice to assess to what extent this cell population was required for the exacerbation of hepatitis and increased IL-4 production promoted by IL-12. As shown in Figure 6B, the substantial increase in circulating ALT induced by IL-12 in wild-type NOD mice occurred no longer in $J\alpha 18^{-/-}$ NOD mutants. Similarly, the IL-4-promoting effect of IL-12 was totally abolished in this strain (Figure 6C). In contrast, the capacity of IL-12 to promote IFN- γ production was not affected by the lack of iNKT cells (Figure 6D).

IL-12 enhances α -GalCer or ConA-induced IL-4 production by iNKT cells both *in vitro* and *in vivo*.

A likely mechanism for the disease-promoting effect of IL-12 in NOD mice would be its capacity to enhance IL-4 production by iNKT cells. To test this possibility, we checked first whether IL-12 affected the functions of iNKT cells by pre-treating liver MNC with IL-12 for 24 hours before stimulation with α -GalCer or ConA for further 24 hours. As illustrated in Figure 7A, liver MNC from both wild-type C57BL/6 and NOD mice produced more IL-4 after exposure to IL-12, which did not affect IL-4 production in iNKT-deficient NOD mice. Moreover, IL-12 enhanced IL-4 production in response to α -GalCer or ConA in purified iNKT cells sorted as CD19⁻NK1.1⁺CD5⁺ cells from the liver of C57BL/6 rather than NOD mice in which the NK1.1 antigen is not expressed (Figure 7B).

These results are consistent with a direct effect of IL-12 on iNKT cells and prompted us, together with the fact that these cells do actually express the IL-12 receptor [41], to address their physiological relevance *in vivo*. We examined first whether the number of iNKT cells in the liver was affected by IL-12. As expected, iNKT cells were depleted in the liver of mice having received IL-12 or ConA separately (Figure 8A and [11,42]). In contrast, pretreatment with IL-12 before ConA injection resulted in a higher cell recovery. Furthermore, analysis of IL-4 production on the single cell level revealed that the percentage of IL-4-producing iNKT cells was significantly higher in ConA-induced NOD mice pretreated with IL-12 than in saline-injected controls, while conventional T cells produced virtually no IL-4 at the same time point and in the same conditions (Figure 8B).

IL-12-deficient mice are less susceptible to ConA-induced hepatitis.

To ascertain the role of IL-12 in the susceptibility to ConA-induced hepatitis, we evaluated the severity of the disease in C57BL/6 mice in which the p40 chain had been deleted. As shown in Figure 9A and 9B, these mice developed not only less severe hepatitis than their wild-type counterpart but released also markedly less IL-4 into the serum. We further examined IL-4 production by iNKT in response to their specific activation by α -GalCer and found once again that IL-12 deficiency resulted in lower circulating IL-4 2 hours after stimulation, as compared with wild-type controls (Figure 9C).

Lastly, we investigated whether the number of iNKT cells in the liver was affected in naïve and ConA-induced IL-12-deficient mice. We found no significant difference between β -TCR⁺CD1d/ α -GalCer-tetramer⁺ cell counts in the liver of wild-type (240,100 \pm 8,220; n=5) and IL-12-deficient (183,400 \pm 20,610; n=7) untreated mice. However, the depletion of iNKT cells in response to ConA was significantly stronger in mice lacking IL-12 than in wild-type controls (Figure 9D), in agreement with the data in Figure 8A.

Taken together, these results establish that IL-12 enhances the severity of ConA-induced hepatitis not only by enhancing IL-4 production by iNKT but also by maintaining the pool of these activated cells in the liver.

Discussion

Recent studies support the notion that iNKT cells contribute to the development of ConA-induced hepatitis. Yet, this conclusion was based on experiments with mice entirely deficient for this particular subset either by germ line deletion of CD1d or homologous recombination of the $J\alpha 18$ locus [10,11], thus rendering further investigations of the mechanism of action difficult.

In the present study, we examined the role of iNKT cells in ConA-induced hepatitis in a model in which this cell subset is only partially deficient. Indeed, the NOD mouse is known to harbor a numerically and functionally abnormal iNKT cell population in thymus and spleen that conserves its typical cytokine profile. Using this particular strain, we show that the deficiency we have previously reported in thymus and spleen [23] occurs likewise in the liver and has a major impact on the severity of the disease induced by ConA. The following lines of evidence support our conclusion: 1) NOD mice developed less severe hepatic injury in response to ConA than conventional C57BL/6 mice with a normal iNKT cell pool, 2) the mild hepatitis in NOD mice remained completely dependent on iNKT cells, as demonstrated by the quasi-abrogation of the disease in $J\alpha 18^{-/-}$ NOD mutants that are devoid of iNKT cells and 3) ALT activity in serum, a typical hallmark of ConA-induced hepatitis, was five-fold lower in NOD $J\alpha 18^{-/-}$ mice than in wild-type NOD mice, proving that iNKT cells are the major contributors to pathogenesis.

Few studies have addressed the mechanisms through which iNKT cells affect the development of ConA-induced hepatitis [10,11], as no model with a partial deficiency of this population in the liver has been examined so far. Combining specific labeling with CD1d/ α -GalCer-tetramers and intracellular cytokine staining, we assessed that iNKT cells are targeted and functionally affected during disease progression. Indeed, two hours after ConA injection, iNKT cells were activated in terms of CD69 expression (not shown) as well as concomitant IFN- γ and IL-4 production.

Since it is well established that IL-4 and IFN- γ are each essential for ConA-induced hepatitis [4-6], we hypothesized that iNKT cells exert their deleterious functions by promptly releasing large amounts of these two cytokines in response to ConA. It is also well known that the presence of IL-12 in the microenvironment facilitates the activation of iNKT cells [38,43], and since both IFN- γ and IL-4 increase in the serum of NOD mice treated with IL-12, a contribution of either cytokine to disease onset was equally plausible. However, we demonstrate that IL-4 rather than IFN- γ is critical for the onset of the disease since in resistant ConA-treated NOD $J\alpha 18^{-/-}$ mice IL-4 production was totally abrogated, while IFN- γ levels remained unchanged. Moreover, the early release of IL-4 in response to ConA was exclusively due to iNKT cells in both NOD and C57BL/6 mice, while conventional T cells produced only IFN- γ at this time point. Furthermore, ConA-induced hepatitis did not occur in IL-4-deficient NOD mice and in wild-type NOD mice pretreated with a neutralizing mAb directed against IL-4. These results agree with those reported by Taniguchi *et al* who proposed a major role for iNKT cell-derived IL-4 in disease progression [10]. They argue

against the prevailing opinion that IL-12 exerts mainly a pro-Th1 effect during the immune response by inducing the production of IFN- γ by several T cell subsets and NK cells [44] and the assumption that its deleterious effect on ConA-induced hepatitis results from this pro-Th1 effect[8]. Even though the precise mechanisms of action are not clear, our *in vitro* data indicate that IL-12 acts directly on iNKT cells exposed to ConA or α -GalCer. Furthermore, experiments with IL-12-deficient mice support the notion that IL-12 can also increase the severity of hepatitis through its capacity to maintain a locally activated pool of iNKT cells in the liver.

It is important to note that NOD mice generate less IL-12 upon *in vivo* stimulation with ConA than C57BL/6 mice. This result is in accordance with other reports showing that IL-12 production by myeloid dendritic cells and macrophages is deficient in this strain [36,37]. It is likely that this partial deficiency contributes to the lower frequency of IL-4-producing iNKT cells in NOD mice, and ultimately to their relative unresponsiveness to ConA-induced hepatitis. In support of this view, we found that IL-12-deficient mice develop less severe hepatic injury in response to ConA than their wild-type controls and produce less IL-4 *in vivo* and *in vitro* after stimulation of iNKT cells. Finally, according to our data, the recent demonstration that responses of iNKT cells to CD1d-presented self antigens resulting in IFN- γ secretion are amplified by IL-12 can be extended to IL-4 [38].

We do not know yet in how far the conclusions drawn from the animal model apply to the human disease. It has been reported that the number of iNKT cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) varies considerably between healthy subjects, ranging from the limit of detection at 0.01% up to 1% [45]. It should also be mentioned that in a recent study of children suffering from autoimmune hepatitis IL-4 and IL-12 could be detected in PBMC [46]. Whether increased levels of these two molecules are associated with abnormally high numbers or activity of iNKT in patients with T-cell mediated liver injuries remains to be established. If this were the case and increased iNKT cell frequency turned out to be a reliable indication of susceptibility to autoimmune hepatitis in humans, novel therapies based on depletion of iNKT cells could eventually be proposed.

Acknowledgements: We are grateful to Maria Leite de Moraes (CNRS UMR 8147) for helpful discussions and critical comments. We are especially indebted to Kirin Brewery Co, Ltd (Gunma, Japan) for providing α -GalCer, and to Mitchel Kronenberg (La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego, CA) and Peter Van Eendert (INSERM U580) for providing plasmid containing *CD1d* and *β 2m* genes and helping with CD1d/ α -GalCer-tetramer preparation. This work was supported by institute funds from the CNRS, University René Descartes - Paris V, the Chancellerie des Universités de Paris (legs Poix) and from INSERM (PNRD 2004) and by fellowships from the Association pour la Recherche sur le Cancer (R.Z.), the Académie de Médecine (R.Z.), the Fondation pour la Recherche Médicale (L.M.A.) and the Association Française des Diabétiques (A.A.).

References

1. Jaeckel E. Animal models of autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 2002; 22: 325-38.
2. Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest* 1992; 90: 196-203.
3. Tiegs G. Experimental hepatitis and role of cytokines. *Acta Gastroenterol Belg* 1997; 60: 176-9.
4. Nishikage T, Seki S, Toyabe S, Abo T, Kagata Y, Iwai T, et al. Inhibition of concanavalin A-induced hepatic injury of mice by bacterial lipopolysaccharide via the induction of IL-6 and the subsequent reduction of IL-4: the cytokine milieu of concanavalin A hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 18-26.
5. Jaruga B, Hong F, Sun R, Radaeva S, Gao B. Crucial Role of IL-4/STAT6 in T Cell-Mediated Hepatitis: Up-Regulating Eotaxins and IL-5 and Recruiting Leukocytes. *J Immunol* 2003; 171: 3233-44.
6. Kusters S, Gantner F, Kunstle G, Tiegs G. Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concanavalin A. *Gastroenterology* 1996; 111: 462-71.
7. Kusters S, Tiegs G, Alexopoulou L, Pasparakis M, Douni E, Kunstle G, et al. In vivo evidence for a functional role of both tumor necrosis factor (TNF) receptors and transmembrane TNF in experimental hepatitis. *Eur J Immunol* 1997; 27: 2870-5.
8. Nicoletti F, Di Marco R, Zacccone P, Salvaggio A, Magro G, Bendtzen K, et al. Murine concanavalin A-induced hepatitis is prevented by interleukin 12 (IL-12) antibody and exacerbated by exogenous IL-12 through an interferon-gamma-dependent mechanism. *Hepatology* 2000; 32: 728-33.
9. Louis H, Le Moine O, Peny MO, Quertinmont E, Fokan D, Goldman M, et al. Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 1997; 25: 1382-9.
10. Kaneko Y, Harada M, Kawano T, Yamashita M, Shibata Y, Gejyo F, et al. Augmentation of Valpha14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J Exp Med* 2000; 191: 105-14.
11. Takeda K, Hayakawa Y, Van Kaer L, Matsuda H, Yagita H, Okumura K. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 5498-503.

12. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of Valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997; 278: 1626-9.
13. Zhou D, Mattner J, Cantu C, III, Schrantz N, Yin N, Gao Y, et al. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 2004; 306: 1786-9.
14. Taniguchi M, Nakayama T. Recognition and function of Valpha14 NKT cells. *Semin Immunol* 2000; 12: 543-50.
15. Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 535-62.
16. Lisbonne M, Leite-de-Moraes MC. Invariant Valpha14 NKT lymphocytes: a double-edged immuno-regulatory T cell population. *Eur Cytokine Netw* 2003; 14: 4-14.
17. Emoto M, Kaufmann SH. Liver NKT cells: an account of heterogeneity. *Trends Immunol* 2003; 24: 364-9.
18. Exley MA, Koziel MJ. To be or not to be NKT: natural killer T cells in the liver. *Hepatology* 2004; 40: 1033-40.
19. Bach JF. The Non Obese Diabetic (NOD) mouse, as a model of T cell mediated autoimmune disease. *C R Acad Sci III* 1992; 314: 45-6.
20. Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 447-85.
21. Wong FS, Janeway CA, Jr. Insulin-dependent diabetes mellitus and its animal models. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 643-7.
22. Meagher C, Sharif S, Hussain S, Cameron MJ, Arreaza GA, Delovitch TL. Cytokines and chemokines in the pathogenesis of murine type 1 diabetes. *Adv Exp Med Biol* 2003; 520: 133-58.
23. Gombert JM, Herbelin A, Tancrede-Bohin E, Dy M, Carnaud C, Bach JF. Early quantitative and functional deficiency of NK1+/-like thymocytes in the NOD mouse. *Eur J Immunol* 1996; 26: 2989-98.
24. Godfrey DI, Kinder SJ, Silvera P, Baxter AG. Flow cytometric study of T cell development in NOD mice reveals a deficiency in alphabetaTCR+CD8- thymocytes. *J Autoimmun* 1997; 10: 279-85.
25. Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, Mi QS, Sondhi J, Naidenko OV, et al. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment

- prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat Med* 2001; 7: 1057-62.
26. Hong S, Wilson MT, Serizawa I, Wu L, Singh N, Naidenko OV, et al. The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med* 2001; 7: 1052-6.
 27. Araujo LM, Lefort J, Nahori MA, Diem S, Zhu R, Dy M, et al. Exacerbated Th2-mediated airway inflammation and hyperresponsiveness in autoimmune diabetes-prone NOD mice: a critical role for CD1d-dependent NKT cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 327-35.
 28. Sidobre S, Kronenberg M. CD1 tetramers: a powerful tool for the analysis of glycolipid-reactive T cells. *J Immunol Methods* 2002; 268: 107-21.
 29. Trobonjaca Z, Leithauser F, Moller P, Schirmbeck R, Reimann J. Activating immunity in the liver. I. Liver dendritic cells (but not hepatocytes) are potent activators of IFN-gamma release by liver NKT cells. *J Immunol* 2001; 167: 1413-22.
 30. Gourdy P, Araujo LM, Zhu R, Garmy-Susini B, Diem S, Laurell H, et al. Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN- γ production by invariant natural killer T cells. *Blood* 2005; 105: 2415-20.
 31. Hameg A, Gouarin C, Gombert JM, Hong S, Van Kaer L, Bach JF, et al. IL-7 up-regulates IL-4 production by splenic NK1.1+ and NK1.1- MHC class I-like/CD1-dependent CD4+ T cells. *J Immunol* 1999; 162: 7067-74.
 32. Ymer SI, Huang D, Penna G, Gregori S, Branson K, Adorini L, et al. Polymorphisms in the *Il12b* gene affect structure and expression of IL-12 in NOD and other autoimmune-prone mouse strains. *Genes Immun* 2002; 3: 151-7.
 33. Matsumoto G, Tsunematsu S, Tsukinoki Ki, Ohmi Y, Iwamiya M, Oliveira-dos-Santos A, et al. Essential Role of the Adhesion Receptor LFA-1 for T Cell-Dependent Fulminant Hepatitis. *J Immunol* 2002; 169: 7087-96.
 34. Mizuhara H, Kuno M, Seki N, Yu WG, Yamaoka M, Yamashita M, et al. Strain difference in the induction of T-cell activation-associated, interferon gamma-dependent hepatic injury in mice. *Hepatology* 1998; 27: 513-9.
 35. Sass G, Heinlein S, Agli A, Bang R, Schumann J, Tiegs G. Cytokine expression in three mouse models of experimental hepatitis. *Cytokine* 2002; 19: 115-20.

36. Peng R, Bathjat K, Li Y, Clare-Salzler MJ. Defective maturation of myeloid dendritic cell (DC) in NOD mice is controlled by IDD10/17/18. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1005: 184-6.
37. Bouma G, Nikolic T, Coppens JM, Helden-Meeuwsen CG, Leenen PJ, Drexhage HA, et al. NOD mice have a severely impaired ability to recruit leukocytes into sites of inflammation. *Eur J Immunol* 2005; 35: 225-35.
38. Brigl M, Bry L, Kent SC, Gumperz JE, Brenner MB. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* 2003; 4: 1230-7.
39. Shin T, Nakayama T, Akutsu Y, Motohashi S, Shibata Y, Harada M, et al. Inhibition of tumor metastasis by adoptive transfer of IL-12-activated Valpha14 NKT cells. *Int J Cancer* 2001; 91: 523-8.
40. Nakui M, Ohta A, Sekimoto M, Sato M, Iwakabe K, Yahata T, et al. Potentiation of antitumor effect of NKT cell ligand, alpha-galactosylceramide by combination with IL-12 on lung metastasis of malignant melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2000; 18: 147-53.
41. Kitamura H, Iwakabe K, Yahata T, Nishimura Si, Ohta A, Ohmi Y, et al. The Natural Killer T (NKT) Cell Ligand alpha -Galactosylceramide Demonstrates Its Immunopotentiating Effect by Inducing Interleukin (IL)-12 Production by Dendritic Cells and IL-12 Receptor Expression on NKT Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 1999; 189: 1121-8.
42. Eberl G, MacDonald HR. Rapid death and regeneration of NKT cells in anti-CD3epsilon- or IL-12-treated mice: a major role for bone marrow in NKT cell homeostasis. *Immunity* 1998; 9: 345-53.
43. Leite-De-Moraes MC, Moreau G, Arnould A, Machavoine F, Garcia C, Papiernik M, et al. IL-4-producing NK T cells are biased towards IFN-gamma production by IL-12. Influence of the microenvironment on the functional capacities of NK T cells. *Eur J Immunol* 1998; 28: 1507-15.
44. Trinchieri G. Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. *Immunol Today* 1993; 14: 335-8.
45. Lee PT, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med* 2002; 195: 637-41.
46. Chernavsky AC, Paladino N, Rubio AE, De Biasio MB, Periolo N, Cuarterolo M, et al. Simultaneous expression of Th1 cytokines and IL-4 confers severe characteristics to type I autoimmune hepatitis in children. *Hum Immunol* 2004; 65: 683-91.

Figure Legends

Figure 1. ConA-induced hepatitis is alleviated in NOD mice. (A-B) Female NOD, C57BL/6 and BALB/c mice were injected with 200 μ l of PBS containing the indicated doses of ConA. Plasma ALT activities were determined 12 hours after injection and are expressed as means \pm SEM. ALT levels represent means \pm SEM of 6 to 8 mice per experimental group. (C) Comparison of the severity of liver damage between NOD mice and C57BL/6 mice. Representative H&E staining of liver sections (original magnification x100 and x400) at 24 hours after injection of ConA (20 mg/kg) into 4 mice per group. Limited foci of hepatocellular necrosis, with hepatocyte damage under 20% could be seen in the liver in ConA-treated NOD mice, whereas in livers from C57BL/6 mice hepatocyte damage exceeded 50%.

Figure 2. IL-4 release is selectively impaired in NOD mice having received ConA. Female C57BL/6 and NOD mice were injected with 20 mg/kg of ConA and sacrificed 2 hours later. Serum IL-4 (A), IFN- γ (B) and IL-10 (C) concentrations were determined by ELISA and expressed as means \pm SEM from 5 to 7 mice per group for IFN- γ and IL-4, and from 3 to 4 mice per group for IL-10. In control mice having received an identical volume of PBS alone, cytokines were not detectable (<20 pg/mL).

Figure 3. iNKT cells are responsible for the defective IL-4 production in NOD mice treated with ConA. Female C57BL/6 and NOD mice were injected with ConA (20 mg/kg) and killed 90 minutes later. Liver MNCs were analyzed in iNKT and conventional T cell gates, here defined as β TCR⁺CD1d/ α -GalCer-tetramer positive and β TCR⁺CD1d/ α -GalCer-tetramer negative cells, respectively (see upper dot-plots), for IL-4 synthesis by intracytoplasmic staining (see lower dot-plots). Controls were stained with irrelevant isotype-matched anti-immunoglobulin G (IgG) mAb. Values indicated in dot-plots correspond to the percentages of IL-4-producing cells among total iNKT cells and conventional T cells. Data are representative of two experiments, each including 2 mice per group. Mean percentages of IL-4-producing cells among iNKT cells: $28.6 \pm 2.2\%$ for NOD mice *versus* $54.5 \pm 3.9\%$ for C57BL/6 mice ($P = 0.03$, $n = 4$). Amount of IL-4 produced per cell, as assessed by the mean fluorescence intensity: 13.04 ± 0.3 for NOD mice *versus* 16.6 ± 0.97 for C57BL/6 mice ($P = 0.03$, $n = 4$). The proportion of IL-4-producing cells among iNKT cells was less than 0.5 % in mice injected with saline alone.

Figure 4. iNKT cells are defective in the liver of NOD mice. MNC were isolated from the liver of naïve female NOD and C57BL/6 mice. (A) Liver MNC from NOD mice produced less IL-4 and IFN- γ in response to α -GalCer *in vitro* than their C57BL/6 counterpart (means \pm SEM). (B) Liver MNC were labeled with fluorochrome-conjugated anti- β TC and CD1d/ α -GalCer-tetramer. The

percentages of iNKT cells are indicated in each dot-plot. **(C)** A 25 % decrease in the percentages of β TCR⁺CD1d/ α -GalCer-tetramer positive (iNKT) cells among total liver MNC along with a 2.5-fold reduction of their absolute numbers was found in NOD mice, as compared with the C57BL/6 strain. The data are representative of 4 experiments except for cytokine production (2 experiments).

Figure 5. iNKT cells and IL-4 play a determinant role in the development of ConA-induced hepatitis in NOD mice. Wild-type, IL-4-deficient and iNKT cell-deficient female NOD mice were injected with 20 mg/kg of ConA or PBS. Plasma ALT activity and serum IL-4 and IFN- γ concentrations were determined 12 hours and 2 hours after ConA injection, respectively. **(A)** Means \pm SEM from 7 mice per group. **(B-C)** Means \pm SEM from 3 to 4 mice per group. In control mice having received PBS alone, cytokines were not detectable (<20 pg/mL). **(D)** Wild-type female NOD mice were pretreated or not with anti-IL-4 mAb 24 hours before ConA (20 mg/kg) injection. Means \pm SEM from 4 to 5 mice per group. **(E)** Means \pm SEM from 4 to 6 mice per group.

Figure 6. Hepatitis and IL-4 production, which depend both on iNKT cells, are restored in NOD mice pretreated with IL-12. **(A)** Five hours after ConA injection (20 mg/kg), IL-12 in the sera was measured by ELISA in NOD and C57BL/6 mice. Data are expressed as means \pm SEM from 7 to 11 mice in each group. IL-12-deficient C57BL/6 mice (n=2) were used here as negative controls. **(B-D)** Male NOD mice were injected 1 hour before ConA (20 mg/kg) administration with IL-12 or PBS. **(B)** Plasma levels of ALT were measured 12 hours after ConA injection (means \pm SEM from 3-5 mice in each group). Serum levels of IL-4 **(C)** and IFN- γ **(D)** were measured 2 hours after ConA injection (means \pm SEM from 3-5 mice in each group). Of note, the susceptibility of female NOD mice to ConA-induced hepatitis was also significantly increased by exogenous IL-12 but the ensuing acute liver injury led to rapid death within 12 hours.

Figure 7. IL-12 enhances α -GalCer and ConA-induced IL-4 production by iNKT cells *in vitro*. **(A)** 1.2×10^5 total liver MNC from wild-type or iNKT cell-deficient mice of the indicated strain or **(B)** 2.5×10^4 purified liver iNKT (CD19⁻NK11⁺CD5⁺) cells obtained from wild-type C57BL/6 mice were pretreated with IL-12 or medium for 24 hours followed by additional culture with α -GalCer or ConA for 24 hours. Concentrations of IL-4 in supernatants are expressed as means \pm SEM from 4 to 8 mice per group (A) and of 3 independent experiments, each including 6 to 8 pooled livers (B).

Figure 8. Production of IL-4 by maintained liver iNKT cells is amplified by exogenous IL-12 in ConA-treated mice. Wild-type female NOD mice were injected with IL-12 or PBS 1 hour before ConA (20 mg/kg) or PBS administration. See legend of Figure 3 for details. **(A)** The numbers of iNKT cells per liver are expressed as means \pm SEM of 3 experiments, each including 3 to 5 mice per group. **(B)** Values indicated in dot-plots correspond to the percentages of IL-4-

producing cells among total iNKT cells and conventional T cells. Data are representative of 2 experiments, each including 2 mice per group.

Figure 9. IL-12-deficient mice are less susceptible to ConA-induced hepatitis and their iNKT cells produce less IL-4. Wild-type and IL-12-p40^{-/-} female C57BL/6 mice were injected with 20 mg/kg of ConA (A, B and D) or α -GalCer (C). Plasma ALT activities were determined 12 hours after injection of ConA. Serum levels of IL-4 as well as the number of iNKT cells per liver were measured 2 hours after ConA or α -GalCer injection. See legend of Figure 3 for details. Data are expressed as means \pm SEM from 5 to 9 mice in each group. iNKT cell counts per liver do not differ significantly between IL-12-deficient and wild-type controls.

Figure 1

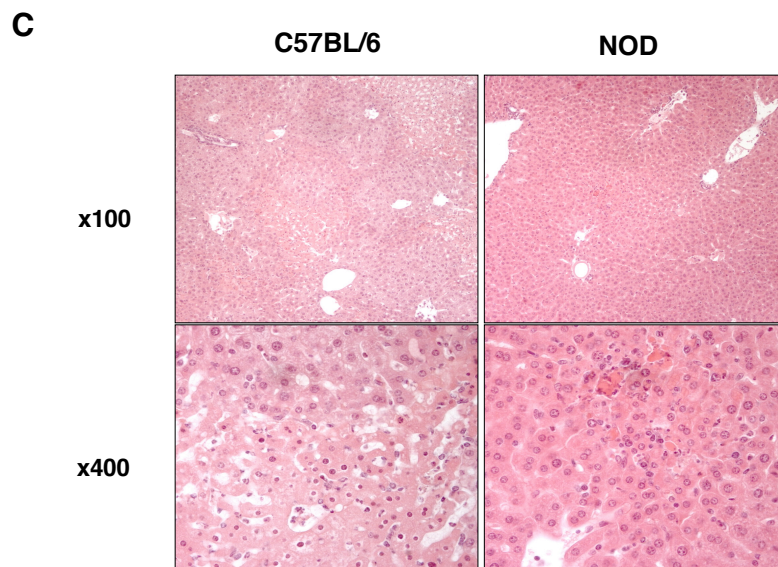
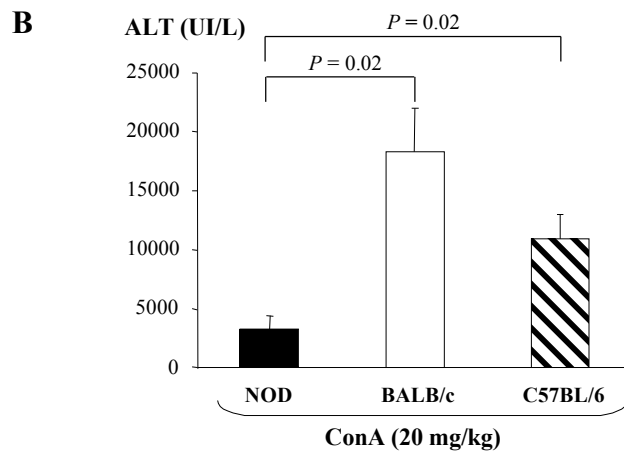
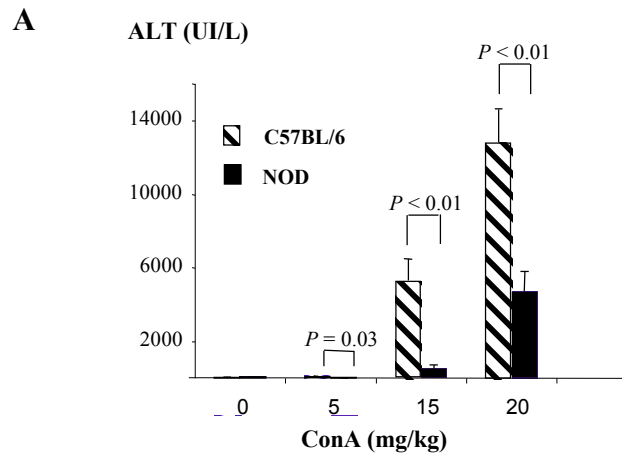


Figure 2

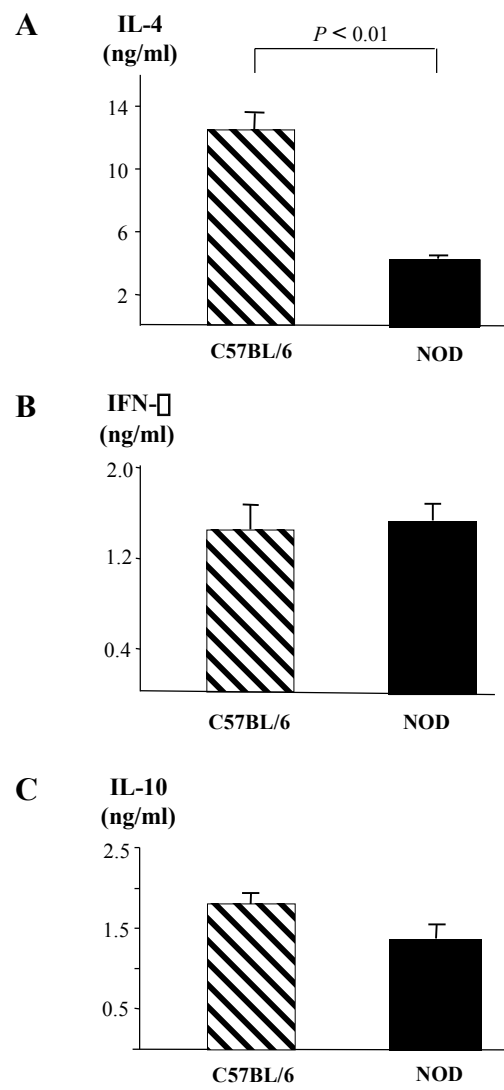


Figure 3

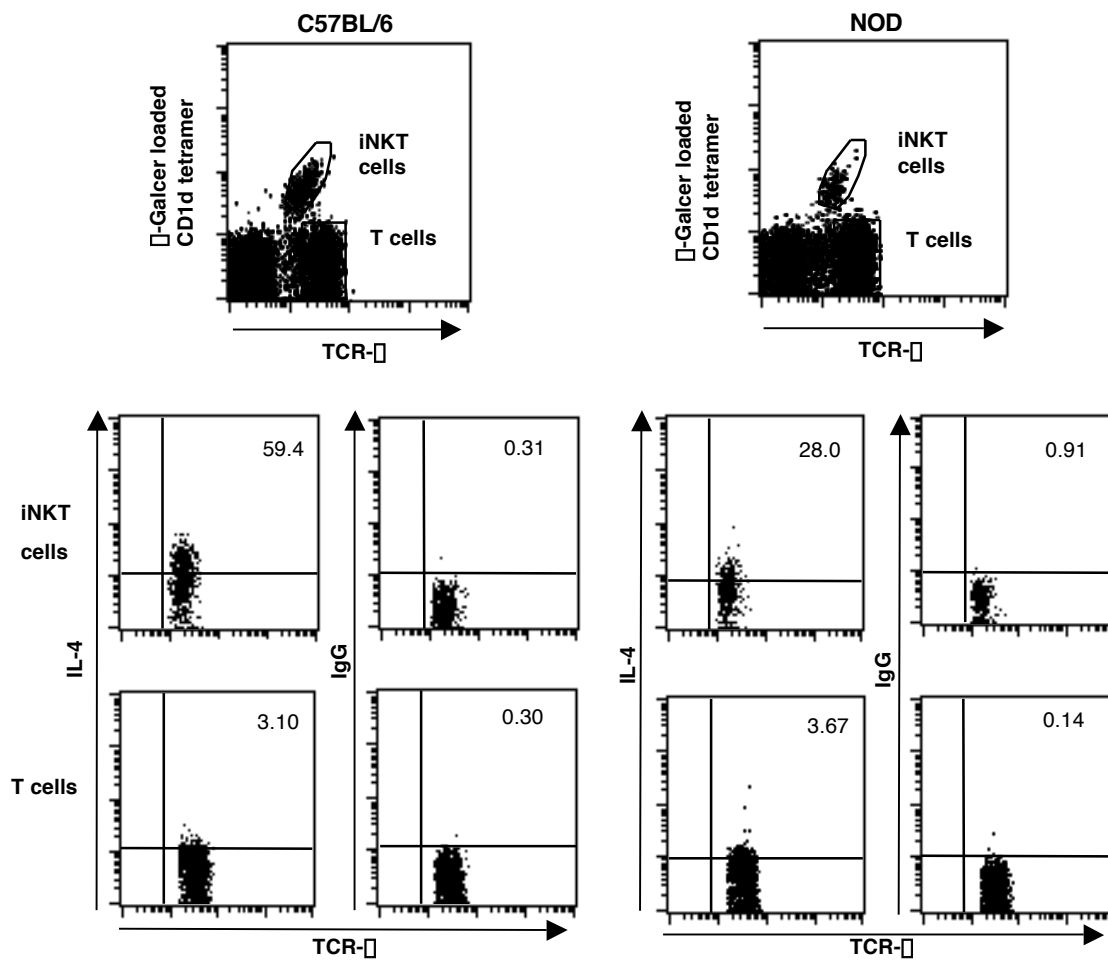


Figure 4

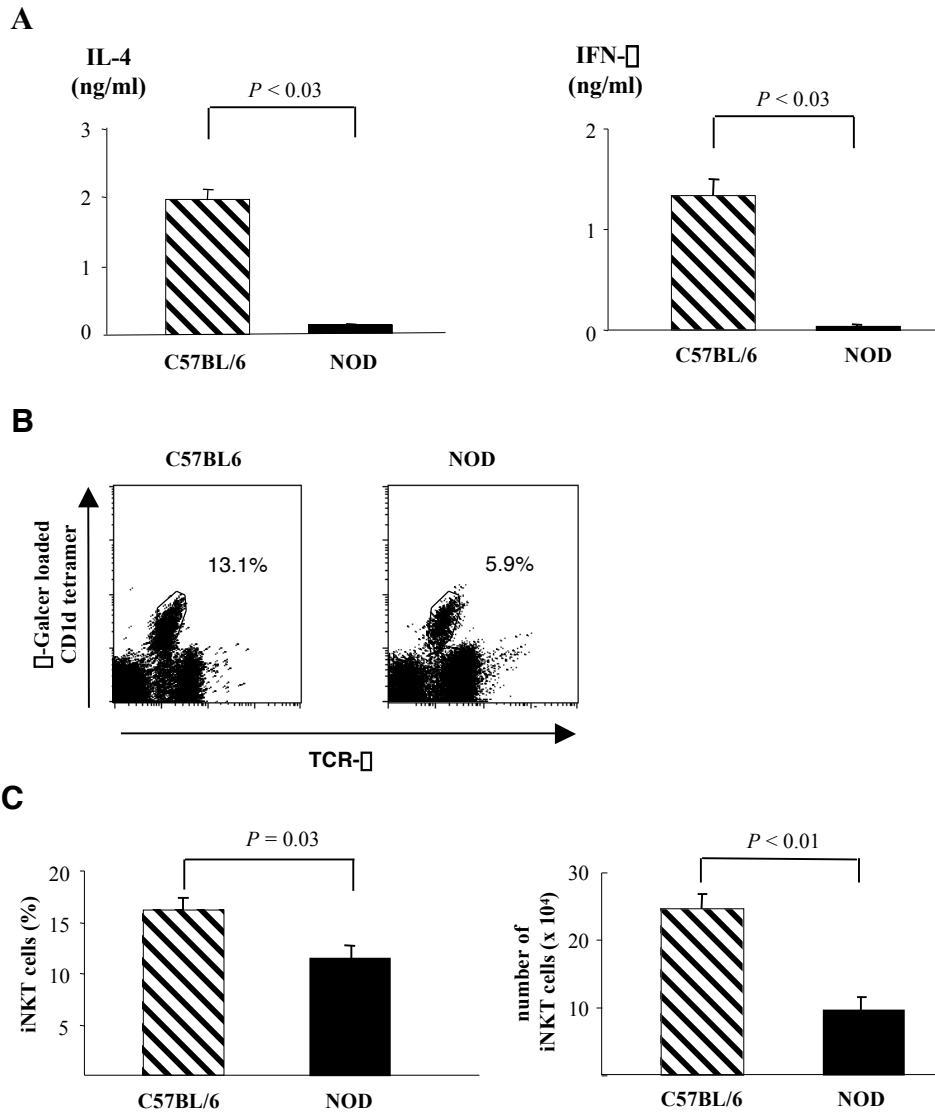


Figure 5

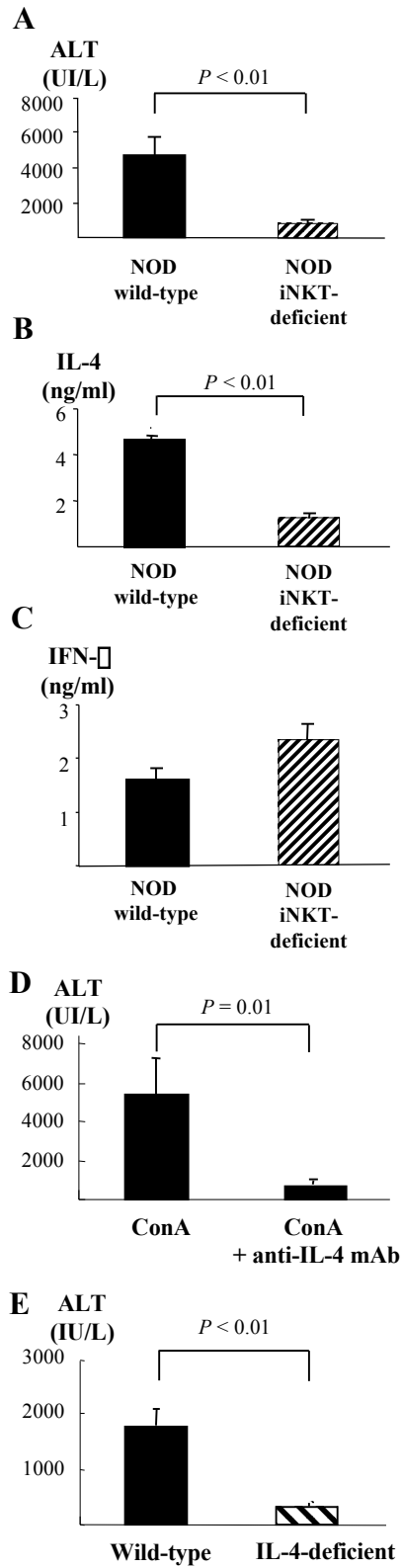


Figure 6

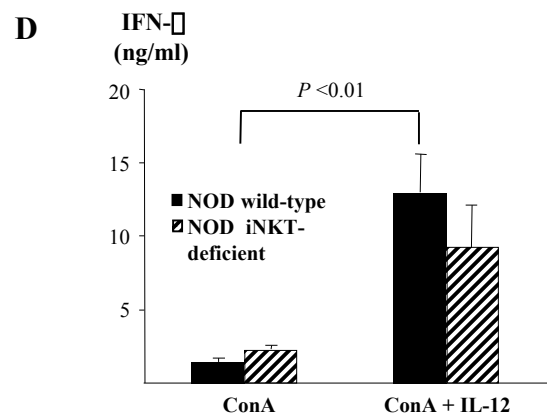
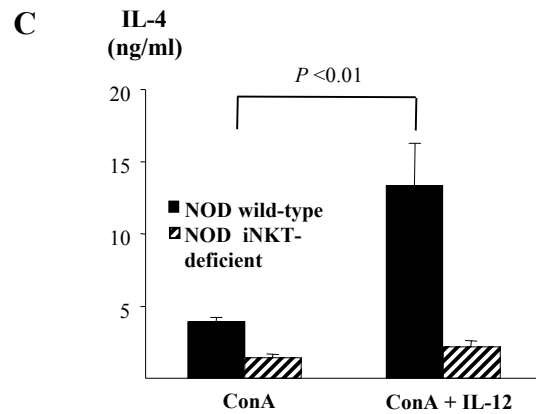
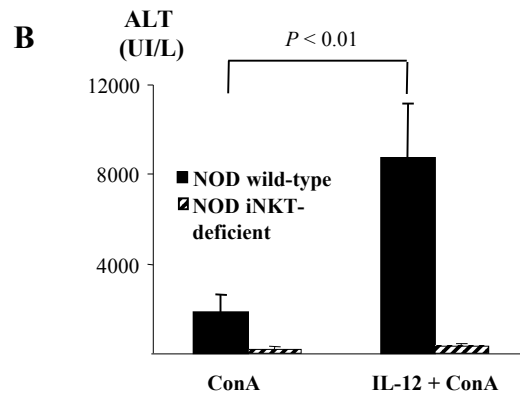
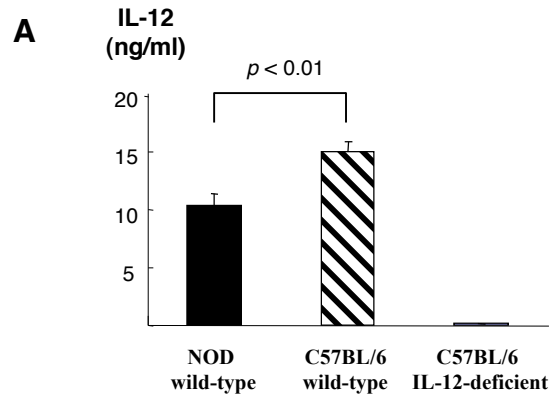
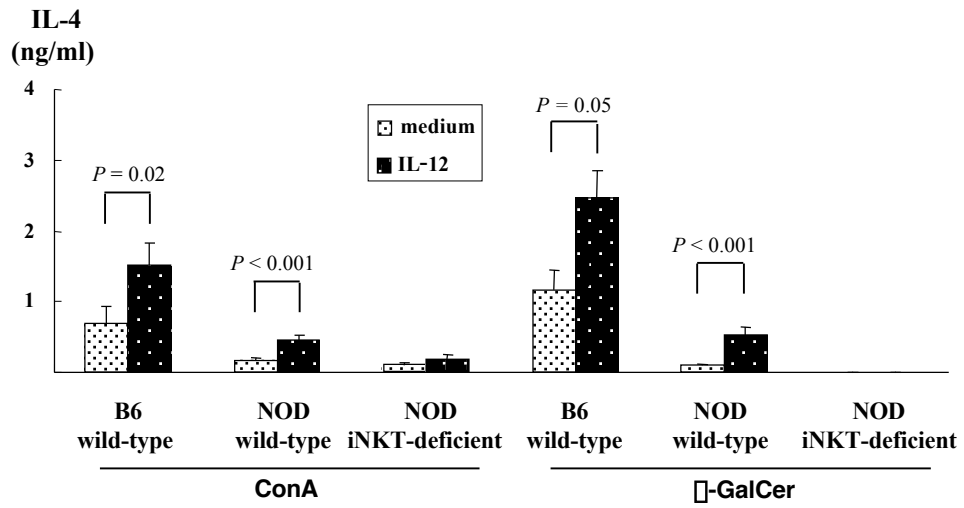


Figure 7

A



B

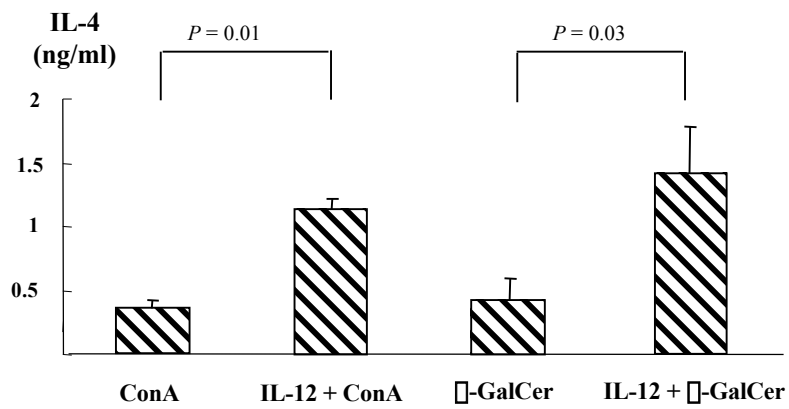
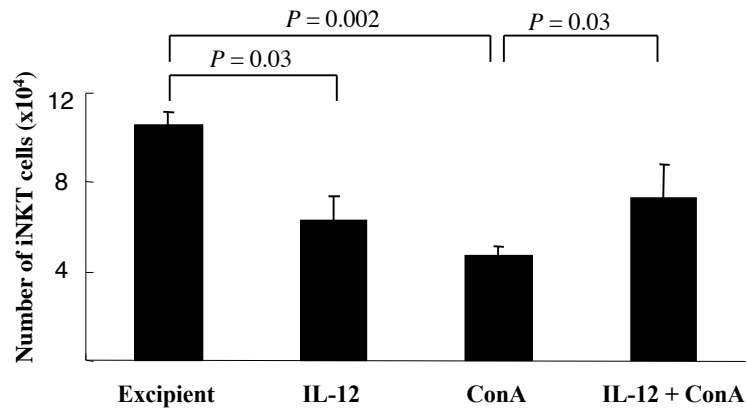


Figure 8

A



B

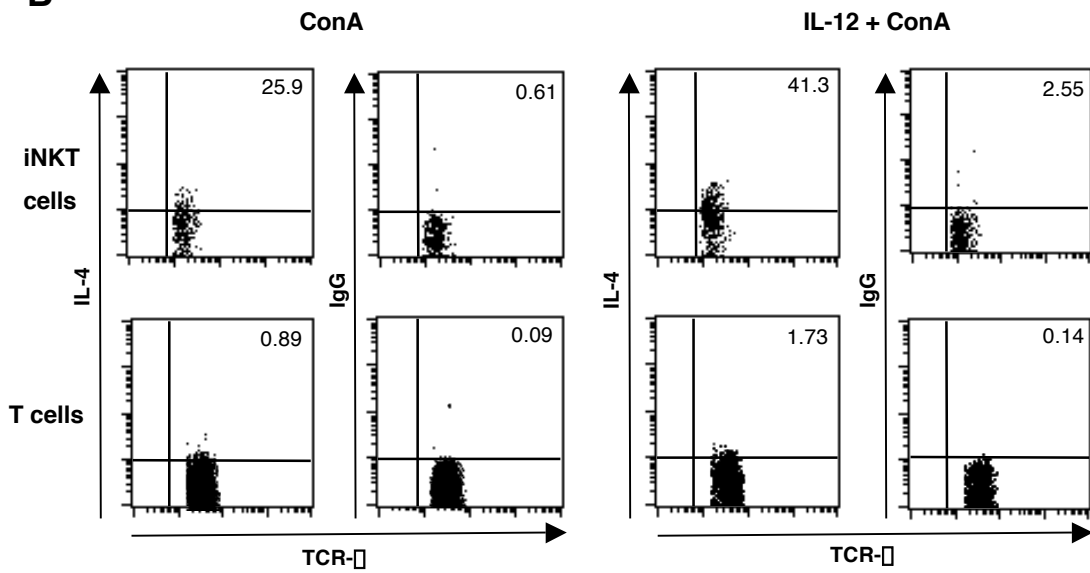
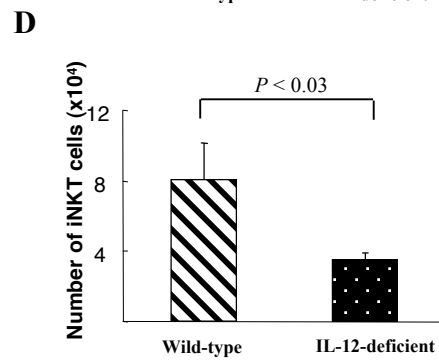
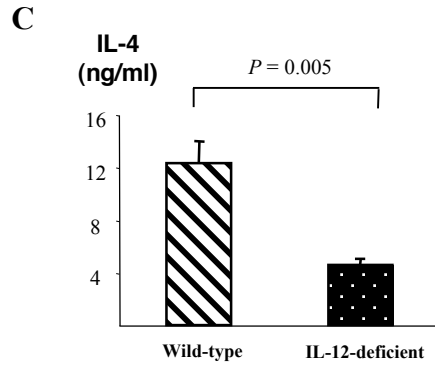
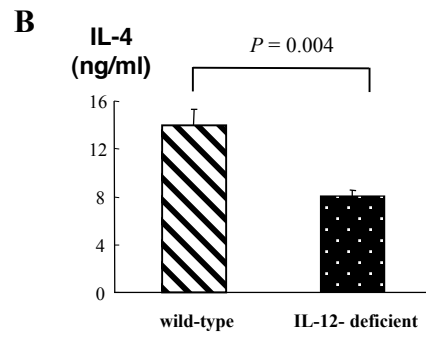
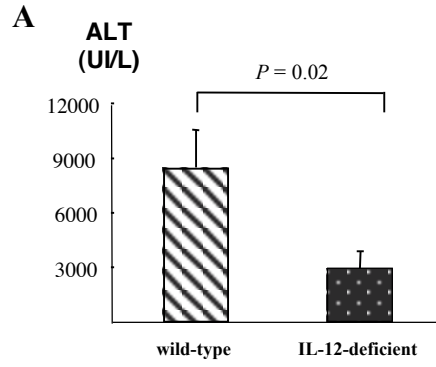


Figure 9



Manuscrit n°5

Spleen but not liver V α 14 NKT cells are required to promote T cell-mediated hepatitis through robust production of IL-4

Zhu R, Dy M and Herbelin A. *Manuscrit en preparation.*

Les lymphocytes iNKT sont essentiels dans le développement de l'hépatite induite par la ConA. Dans cette étude, nous avons recherché le rôle respectif des lymphocytes iNKT de la rate et du foie dans la maladie. Nos résultats révèlent le rôle primordial des lymphocytes iNKT spléniques : 1) le transfert des lymphocytes iNKT de la rate et non du foie confère une susceptibilité à l'hépatite induite par la ConA à des receveurs déficients en lymphocytes iNKT ; 2) les animaux splénectomisés sont réfractaires à la maladie ; 3) leur reconstitution par des lymphocytes iNKT de la rate permet de restaurer la susceptibilité à la maladie. Le fait que la splénectomie s'accompagne d'une diminution importante des taux d'IL-4 dans le serum et le foie suivant le traitement par la ConA nous a conduits à comparer les lymphocytes iNKT de la rate et du foie dans la production de cette cytokine qui joue un rôle essentiel dans la maladie. Les lymphocytes iNKT spléniques constituent une bien meilleure source d'IL-4 que leurs équivalents hépatiques, expliquant par là même leur fonction délétère irremplaçable dans la maladie hépatique.

Ces résultats joints à ceux de la littérature qui attribuent aux lymphocytes iNKT du foie une spécialisation dans les fonctions cytotoxiques permettent de postuler que les lymphocytes iNKT de la rate, par leur grande propension à produire les cytokines, assureraient les fonctions régulatrices tandis que les lymphocytes iNKT du foie assureraient localement surtout des fonctions effectrices.

De nombreuses études ont tenté d'identifier les éléments moléculaires et/ou cellulaires permettant aux lymphocytes iNKT de quitter leur ambivalence pour exercer une fonction efficace et adaptée. Mais jusqu'ici, aucune sous-population iNKT produisant exclusivement les cytokines Th1 ou Th2 n'a pu être identifiée. Une hypothèse non exclusive repose sur l'existence de populations iNKT dont les fonctions dépendraient de leur localisation dans l'organisme. A cet égard, l'existence d'une sous-population de lymphocytes iNKT « spécialisée » dans les fonctions cytotoxiques et localisée dans le foie a été récemment décrite (Crowe et al., 2005).

Notre travail a eu pour objectif de déterminer si ce concept de sous-populations iNKT spécialisées en fonction de leur localisation peut être étendu aux fonctions de production de cytokines. Pour répondre à cette question, nous avons pris appui sur le modèle d'hépatite induite par la ConA qui dépend de l'IL-4 produite par les lymphocytes iNKT et qui a l'avantage de cibler le foie.

Le transfert des lymphocytes iNKT de la rate et non du foie restaure partiellement la susceptibilité à l'hépatite induite par la ConA chez des receveurs déficients en lymphocytes iNKT. Du fait du rôle essentiel des lymphocytes iNKT dans l'hépatite induite par la ConA, les souris mutées C57BL/6 $J\alpha 18^{-/-}$ qui sont totalement dépourvues de lymphocytes iNKT ne sont pas susceptibles à la maladie (Kaneko et al., 2000). Ces souris ont pu ainsi être utilisées comme animaux receveurs pour comparer les cellules mononucléées (MNC) de la rate et du foie dans leur capacité à restaurer par leur transfert adoptif la susceptibilité à l'hépatite induite par la ConA. Dans nos expériences, le degré de sévérité de l'hépatite a été quantifié en mesurant les taux d'alanine transférase (ALT) dans le serum 12 heures après l'injection de la ConA. Le transfert des splénocytes de souris C57BL/6 sauvages restaure la susceptibilité de l'hépatite induite par la ConA chez les

souris receveuses $J\alpha 18^{-/-}$. En référence à la susceptibilité de souris C57BL/6 sauvages, cette normalisation, bien que significative, est partielle ; elle est par ailleurs « dose-dépendante » du nombre de cellules transférées et dépend bien des lymphocytes iNKT puisqu'elle n'est pas retrouvée lorsqu'on transfère les splénocytes de souris mutées $J\alpha 18^{-/-}$ (Figure 1).

Au contraire, aucune susceptibilité à la maladie n'a pu être mise en évidence après le transfert de MNC du foie comprenant 150 000 lymphocytes iNKT, un nombre équivalent à celui transféré à partir des MNC de la rate. Deux autres équipes avaient précédemment bien réussi à restaurer la susceptibilité à la maladie en transférant 5×10^6 MNC du foie ou bien de 2×10^6 lymphocytes iNKT hépatiques purifiés par leur injection dans les lobes du foie (Takeda et al., 2000a; Diao et al., 2004). Outre le fait que ces quantités de cellules correspondent à l'utilisation de plusieurs foies de souris et que l'injection directe dans le foie induit localement des lésions, ces expériences jointes aux nôtres indiquent que les lymphocytes iNKT de la rate sont 10 à 15 fois plus efficaces que ceux du foie.

La splénectomie supprime la susceptibilité à l'hépatite induite par la ConA : restauration par des lymphocytes iNKT spléniques. Afin de confirmer que les lymphocytes iNKT de la rate jouent un rôle déterminant dans l'hépatite induite par la ConA, nous avons réalisé des expériences de splénectomie. L'ablation de la rate rend les animaux C57BL/6 sauvages insensibles à l'induction de la maladie comme l'attestent la réduction de plus de 90 % des taux d'ALT dans le groupe splénectomisé comparativement au groupe opéré sans ablation (sham) (Figure 2A). La reconstitution des souris splénectomisées par des splénocytes syngéniques entraîne une restauration complète de la maladie pourvu que les cellules transférées contiennent des lymphocytes iNKT (Figure 2B).

La splénectomie n'affecte pas le compartiment hépatique des lymphocytes iNKT.

La fréquence et le nombre de lymphocytes iNKT du foie identifiés sur le critère de l'expression du TCR $\alpha\beta$ et de leur fixation au tétramère CD1d chargé avec le ligand α -GalCer ne sont pas modifiés par la splénectomie (Figure 3) ce qui permet d'exclure l'hypothèse selon laquelle la suppression de l'hépatite chez les animaux splénectomisés résulterait d'une diminution des lymphocytes iNKT du foie. Ainsi, la seule délétion des lymphocytes iNKT de la rate est suffisante pour supprimer la maladie.

Les lymphocytes T CD4 non iNKT de la rate sont dispensables. La splénectomie entraîne la disparition non seulement des lymphocytes iNKT mais aussi de lymphocytes T CD4 non iNKT dont le rôle dans la maladie ne peut être exclu si on se réfère aux données de la littérature montrant que la déplétion des cellules exprimant le marqueur CD4 supprime la maladie (Tiegs et al., 1992). Afin de déterminer le rôle respectif des différentes sous-populations lymphocytaires T CD4 de la rate qui comprennent les lymphocytes iNKT, les lymphocytes T CD4 conventionnels et les lymphocytes T CD4 à la fois non conventionnels et non iNKT, nous avons comparé la susceptibilité à l'hépatite induite par la ConA des souris C57BL/6 sauvages avec celle des souris C57BL/6 mutées Ia- β° (déficientes en lymphocytes T CD4 conventionnels) et C57BL/6 Ia- β° x J α 18 $^{-/-}$ (double déficientes en lymphocytes T CD4 conventionnels et lymphocytes iNKT). Des taux d'ALT élevés et non significativement différents sont mis en évidence dans les groupes de souris sauvage et Ia- β° , tandis qu'à l'instar du groupe J α 18 $^{-/-}$, le groupe double déficient développe peu ou pas la maladie (Figure 4). L'absence des lymphocytes iNKT mais non celle des autres compartiments lymphocytaires T CD4 de la rate affecte donc la susceptibilité à la maladie.

La splénectomie affecte la production sérique et hépatique d'IL-4 des animaux traités par la ConA. Nous avons montré dans un travail antérieur (manuscrit n°4) que le caractère indispensable des lymphocytes iNKT dans l'hépatite induite par la ConA repose sur leur production d'IL-4. Nous avons donc recherché si la splénectomie affecte la production de cette cytokine après le traitement par la ConA. Une étude cinétique préalable réalisée chez des souris non splénectomisées a montré des taux sériques d'IL-4 et d'IFN- γ dont les pics sont atteints 2 heures après l'injection de la ConA (Figure 5A). Dans le groupe splénectomisé, la production sérique d'IL-4 mesurée au même temps est abaissée significativement comparativement au groupe opéré sans ablation de la rate (sham) (Figure 5B). Le taux d'IFN- γ est relativement réduit mais pas significativement dans le groupe splénectomisé.

A partir des mêmes protocoles, les taux de cytokines ont aussi été déterminés *in situ* dans la rate et le foie. Dans les deux organes, les pics de production d'IL-4 et d'IFN- γ sont atteints 2 heures après l'administration de la ConA mais leurs taux sont environ 2 fois plus élevés dans la rate que dans le foie (Figure 6A). La splénectomie entraîne une altération considérable des taux intra-hépatiques d'IL-4 au cours de l'hépatite induite par la ConA (Figure 6B), ceux d'IFN- γ étant aussi réduits mais pas de manière significative.

Les lymphocytes iNKT spléniques constituent une meilleure source d'IL-4 que leurs équivalents hépatiques. Les résultats obtenus *in vivo* suggèrent que les lymphocytes iNKT de la rate et du foie diffèrent dans leur production de cytokines. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons évalué leur capacité de production d'IL-4 et d'IFN- γ *in vitro* dans différentes conditions de stimulation. Une première approche a consisté à comparer des MNC de la rate et du foie de souris sauvages C57BL/6 comprenant un nombre équivalent

de lymphocytes iNKT. En réponse à la ConA et au ligand α -GalCer, la production des cytokines IL-4 et IFN- γ par les MNC du foie est 5 à 10 fois plus faible en comparaison de celle de la rate (Figure 7). Afin d'analyser si ce résultat peut être expliqué par des différences dans les capacités intrinsèques des lymphocytes iNKT de la rate et du foie à produire les cytokines, les lymphocytes iNKT provenant des deux organes ont été triés électriquement. Pour ne pas affecter leurs fonctions dépendantes de leur TCR, nous avons choisi de purifier ces cellules sans employer le tétramère CD1d/ α -GalCer. Les lymphocytes iNKT ont donc été triés sur la base de l'expression des marqueurs membranaires CD5 et NK1.1 puis incubés *in vitro* en la présence des *stimuli* suivants : ConA, PMA et calcium ionophore, et CPA syngéniques provenant de souris C57BL/6 $J\alpha 18^{-/-}$ et chargées avec le ligand α -GalCer (Figure 8A-C). Les résultats apportent la démonstration définitive que les lymphocytes iNKT spléniques constituent une meilleure source d'IL-4 que leurs équivalents hépatiques. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'IFN- γ avec cependant des niveaux de production très bas dans les deux populations cellulaires (résultats non montrés). Nous avons enfin recherché une différence de présentation par les CPA. Les résultats ont montré une efficacité équivalente des CPA du foie et de la rate à présenter l' α -GalCer aux lymphocytes iNKT spléniques (Figure 8D).

En conclusion, notre étude montre que les fonctions de production de cytokines des lymphocytes iNKT diffèrent entre la rate et le foie. Cette découverte est à mettre en parallèle avec celle de Crowe et ses collaborateurs (Crowe et al., 2005) montrant que les lymphocytes iNKT du foie ont des activités cytotoxiques supérieures à celles de leurs équivalents spléniques.

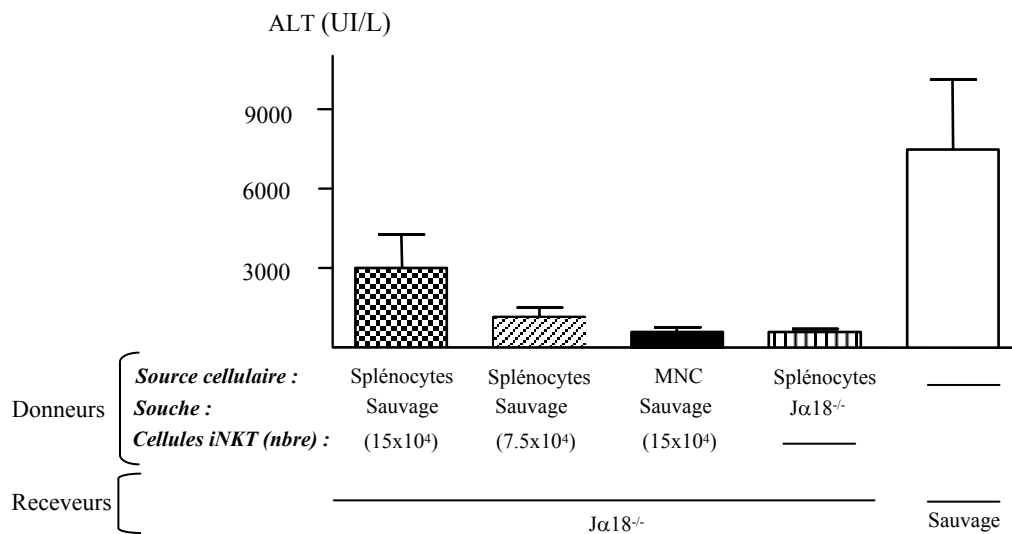


Figure 1 : Le transfert de lymphocytes iNKT de la rate et non du foie restaure la susceptibilité à l'hépatite induite par la ConA chez des receveurs déficients en lymphocytes iNKT ($J\alpha 18^{-/-}$). Les cellules mononucléées (MNC) isolées de la rate (▨, ▩, III) ou du foie (■) provenant de souris C57BL/6 sauvages ou mutées $J\alpha 18^{-/-}$ sont transférées par voie intra-splénique à des souris receveuses C57BL/6 $J\alpha 18^{-/-}$ 1 heure avant l'injection de la ConA (10 mg/kg) par voie intra-veineuse. Le dosage des transaminases ALT est réalisé dans le plasma 12 heures après le traitement par la ConA. Chaque groupe comprend 3 à 4 souris.

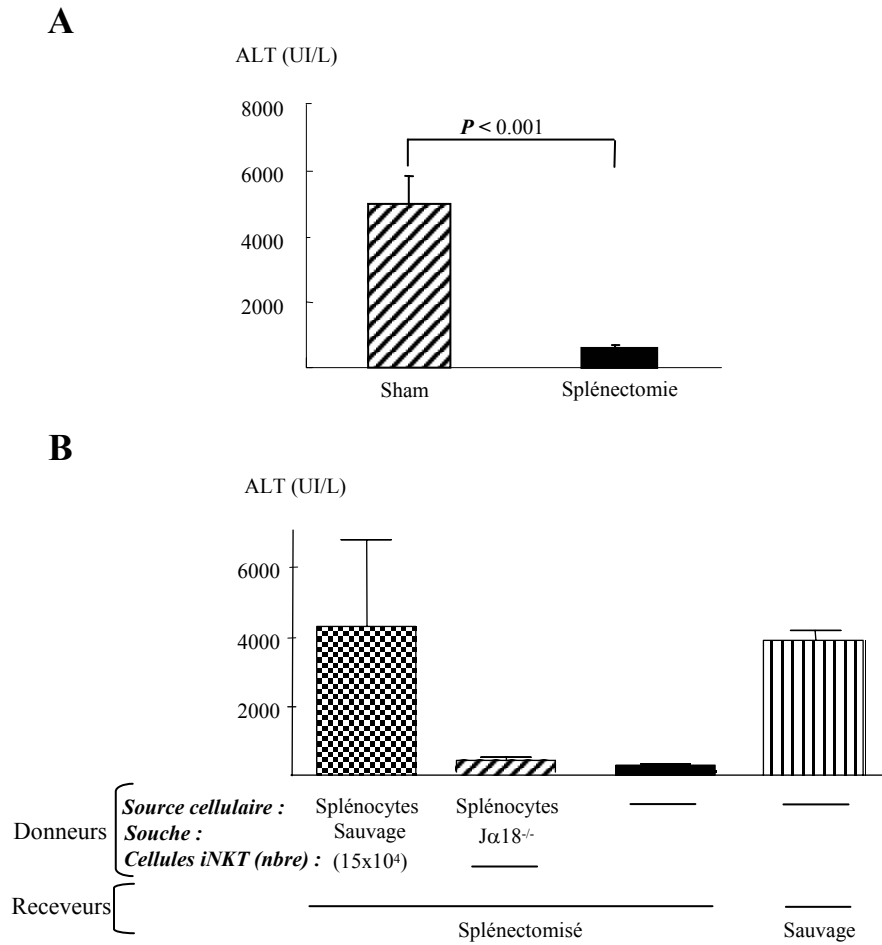


Figure 2 : La splénectomie supprime la susceptibilité à l'hépatite induite par la ConA : restauration par des lymphocytes iNKT spléniques. A) Les souris C57BL/6 Sham (n = 6) et splénectomisées (n = 9) reçoivent la ConA (10 mg/kg) par voie intra-veineuse 1 heure après l'intervention chirurgicale. B) Les cellules isolées de la rate ($20 \cdot 10^6$) provenant de souris C57BL/6 sauvages (▣) ou mutées Jα18^{-/-} (▤) sont transférées par voie intra-veineuse à des souris receveuses C57BL/6 splénectomisées 1 heure avant l'injection de la ConA (10 mg/kg) par voie intra-veineuse. Le dosage des transaminases ALT est réalisé dans le sérum 12 heures après le traitement par la ConA. Chaque groupe comprend 3 à 4 souris.

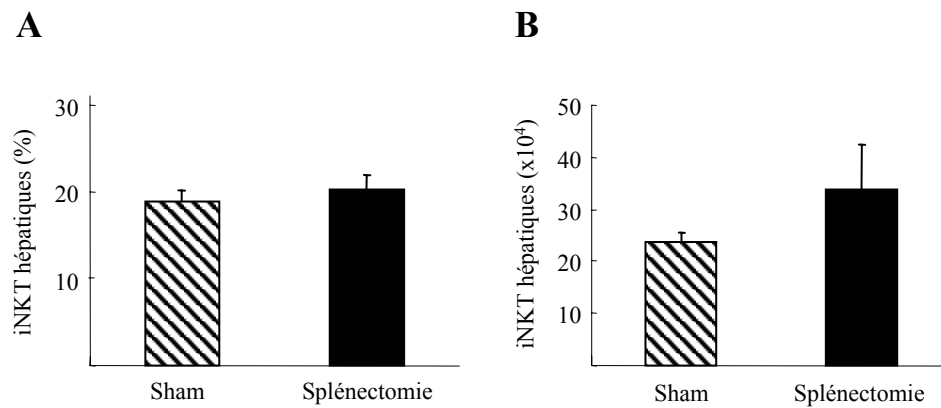


Figure 3 : La splénectomie n'affecte pas le nombre des lymphocytes iNKT hépatiques. Les cellules mononucléées du foie de souris C57BL/6 Sham (n = 3) et splénectomisées (n = 4) sont prélevées 1 heure après l'intervention chirurgicale et analysées pour leur contenu en lymphocytes iNKT (tétramère CD1d/ α -GalCer⁺ TCR⁺) par cytométrie de flux. A) % de lymphocytes iNKT au sein des cellules mononucléées du foie; B) nombre total de lymphocytes iNKT par foie. Les différences ne sont pas significatives.

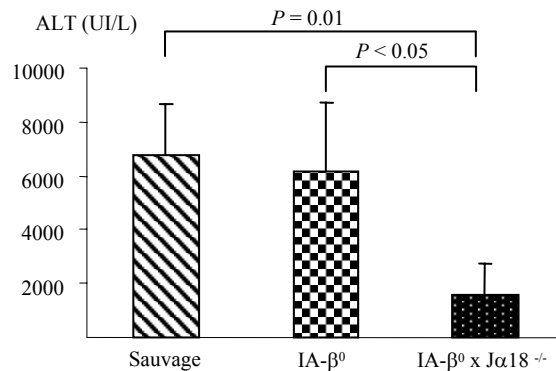
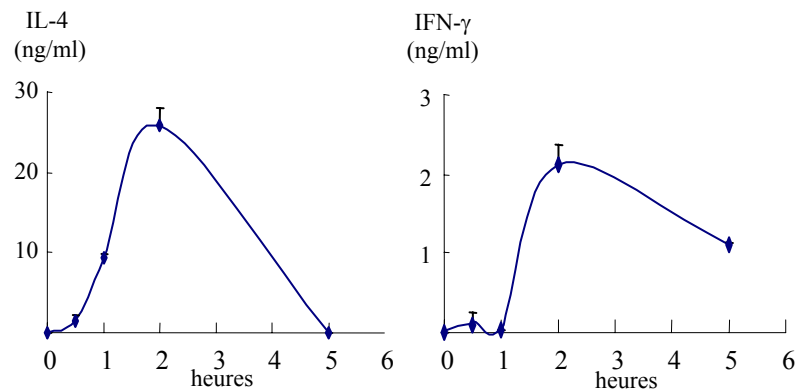


Figure 4 : Les lymphocytes iNKT mais non les lymphocytes T CD4 conventionnels de la rate sont indispensables pour l'induction de l'hépatite induite par la ConA. Des souris C57BL/6 sauvages (n = 8), déficientes en lymphocytes T CD4⁺ conventionnels (IA- β^0 ; n = 6) ou déficientes à la fois en lymphocytes T CD4⁺ conventionnels et iNKT (IA- β^0 xJ α 18^{-/-}; n = 5) reçoivent la ConA (10 mg/kg) par voie intra-veineuse. Le dosage des transaminases ALT est réalisé dans le plasma 12 heures après le traitement par la ConA.

A



B

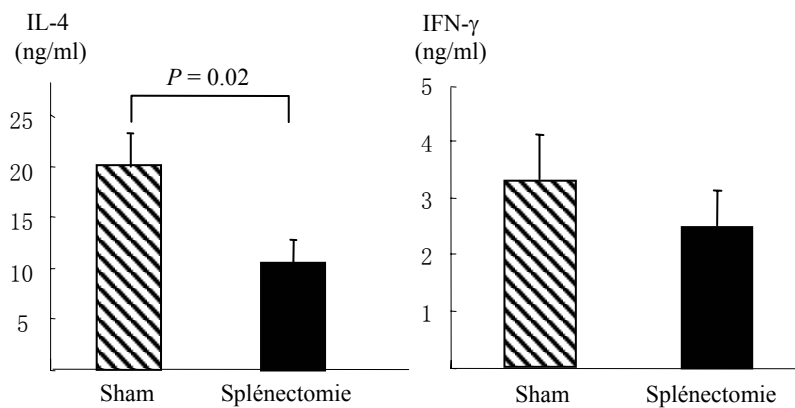
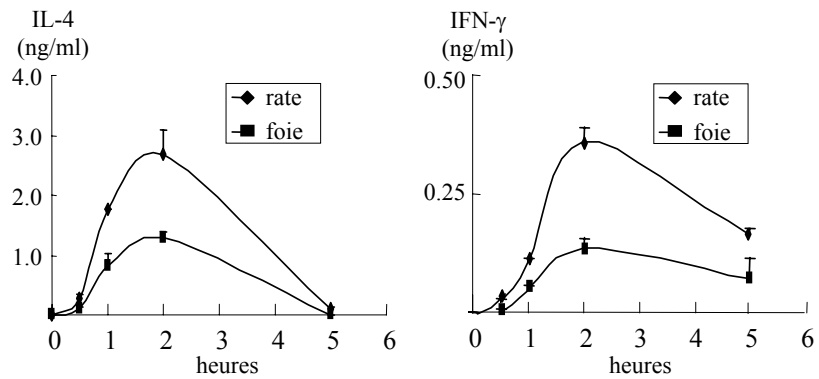


Figure 5 : La splénectomie entraîne une altération des taux sériques d'IL-4 au cours de l'hépatite induite par la ConA. Des souris C57BL/6 Sham ou splénectomisées reçoivent la ConA (10 mg/kg) par voie intra-veineuse 1 heure après l'intervention chirurgicale. *A*) Cinétique des taux sériques d'IL-4 et d'IFN- γ ; expérience représentative parmi deux. *B*) Moyennes des taux sériques d'IL-4 et d'IFN- γ 2 heures après l'injection de ConA calculées à partir d'un total de 10 souris pour le groupe Sham et de 11 à 12 souris pour le groupe splénectomisé.

A



B

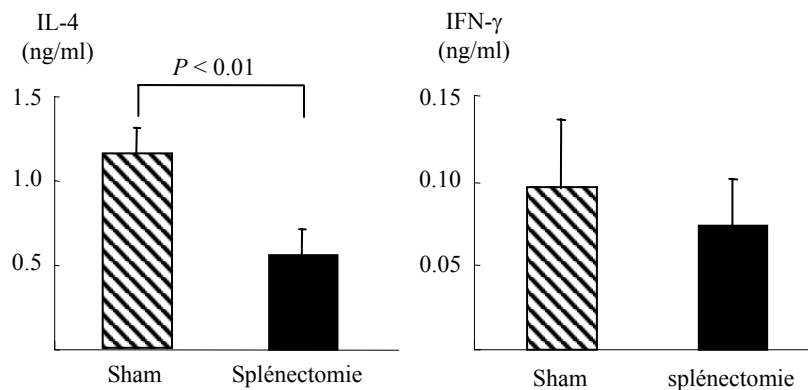


Figure 6 : La splénectomie entraîne une altération des taux intra-hépatiques d'IL-4 au cours de l'hépatite induite par la ConA. Des souris C57BL/6 Sham ou splénectomisées reçoivent la ConA (10 mg/kg) par voie intra-veineuse 1 heure après l'intervention chirurgicale. *A*) Cinétique des taux intra-hépatiques d'IL-4 et d'IFN- γ ; expérience représentative parmi deux. *B*) Moyennes des taux intra-hépatiques d'IL-4 et d'IFN- γ 2 heures après l'injection de ConA calculées à partir d'un total de 9 à 10 souris pour le groupe Sham et de 11 à 12 souris pour le groupe splénectomisé.

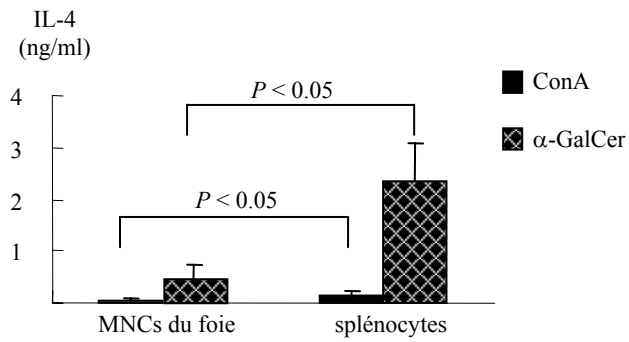
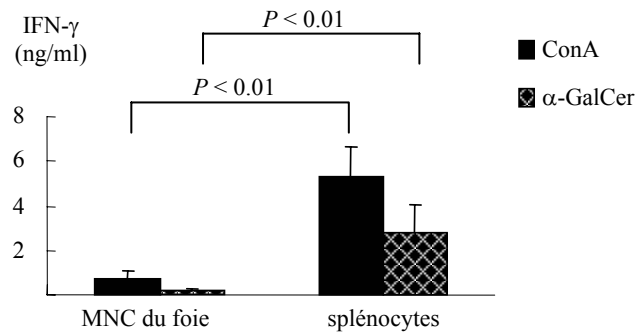
A**B**

Figure 7 : Les splénocytes sont meilleurs producteurs d'IL-4 et d'IFN- γ que les cellules mononucléées du foie. Les cellules mononucléées (MNC) isolées de la rate ou du foie (nombre équivalent en lymphocytes iNKT : 15 000 cellules/puits) provenant de souris C57BL/6 sauvage sont stimulées *in vitro* en présence de la ConA (5 μ g/ml) ou d' α -GalCer (100 ng/ml) pendant 48 heures. Les moyennes des concentrations des cytokines IL-4 et IFN- γ dans les surnageants sont calculées à partir d'un total de 3 à 4 expériences indépendantes.

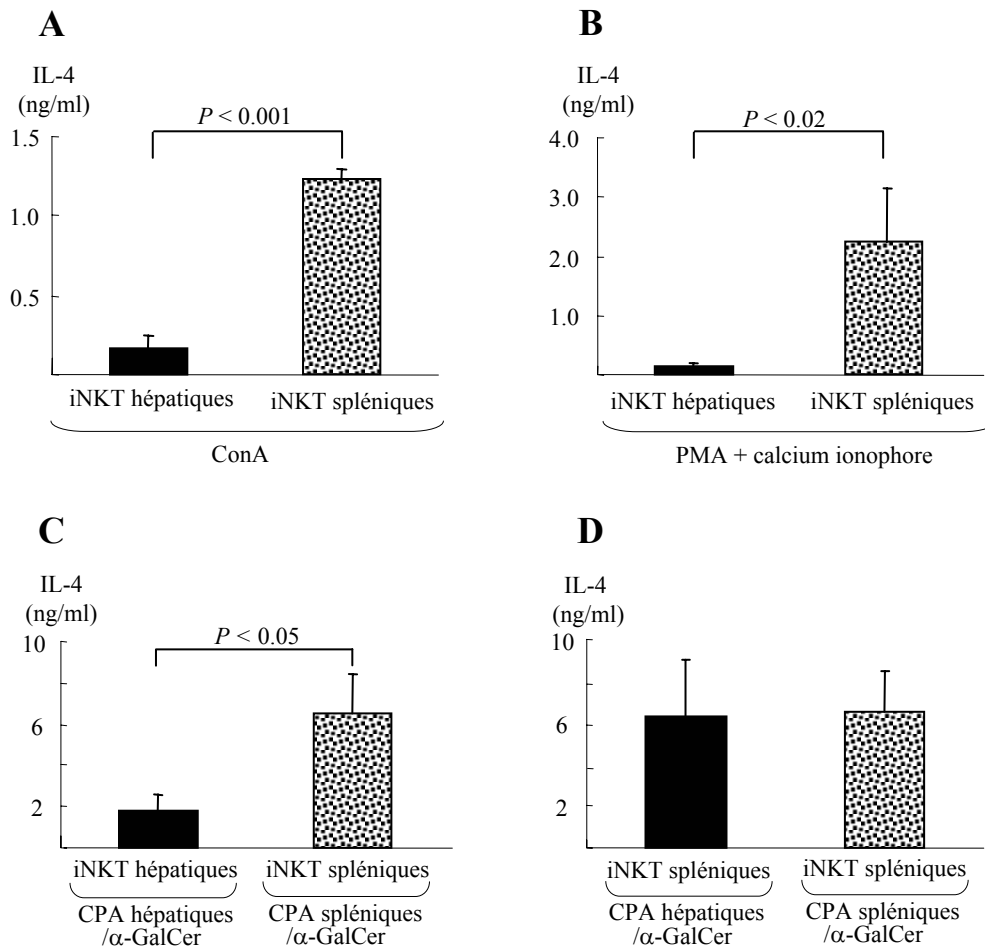


Figure 8 : Les lymphocytes iNKT spléniques constituent une meilleure source d'IL-4 que leurs équivalents hépatiques. Les lymphocytes iNKT provenant de la rate ou du foie de souris C57BL/6 sauvages sont triés électroniquement sur la base de l'expression des marqueurs membranaires CD5 et NK1.1 puis incubés *in vitro* (25 000 cellules/puits) en la présence des *stimuli* suivants : *A*) ConA (5 μ g/mL); *B*) PMA ($5 \cdot 10^{-9}$ M) + calcium ionophore ($5 \cdot 10^{-7}$ M); *C et D*) CPA : 100 000 MNC spléniques ou MNC hépatiques totales provenant de souris C57BL/6 $J\alpha 18^{-/-}$ et chargées avec le ligand α -GalCer (500 ng/mL). Les moyennes des concentrations d'IL-4 dans les surnageants à l'issue d'une culture de 48 heures sont calculées à partir d'un total de 9 expériences indépendantes, chacune d'entre elles étant réalisée à partir d'un pool de 8 à 12 souris.

Discussion Générale

La population lymphocytaire iNKT exerce de multiples activités régulatrices grâce à son auto-réactivité jointe à sa dualité fonctionnelle (production rapide et massive des cytokines Th1 et Th2, pouvoir cytotoxique). De ce fait, cette population suscite de grands intérêts en immuno-pathologie. Mais cette conclusion repose principalement sur l'analyse différentielle de souris sauvages et mutées déficientes en lymphocytes iNKT dans les lignées de référence C57BL/6 et BALB/c. A la différence des lignées sauvages C57BL/6 et BALB/c, la lignée NOD a un défaut partiel tant numérique que fonctionnel de la population cellulaire iNKT (Gombert et al., 1996a), lequel est associé à une dérégulation de la production des cytokines Th1 et Th2 (Falcone et al., 1999; Poulton et al., 2001).

En nous appuyant sur la souris NOD, nous avons étudié les fonctions régulatrices des lymphocytes iNKT avec pour objectif de mesurer l'impact de ces défauts partiels et naturels et de révéler les mécanismes sous-jacents mis en jeu par ces cellules dans deux situations pathologiques distinctes : 1) le T1D dans sa forme développée spontanément par la souris NOD ; 2) l'hépatite induite par la ConA qui a été récemment documentée comme une maladie expérimentale dépendant des lymphocytes iNKT.

1) Etude du rôle des lymphocytes iNKT dans le T1D

1-1) L' α -GalCer : un outil thérapeutique de traitement du T1D révélant un potentiel régulateur des lymphocytes iNKT dans la maladie

Nous avons en premier lieu postulé que si le T1D a son développement facilité par un déficit en lymphocytes iNKT, l' α -GalCer pourrait alors constituer un outil de choix pour impulser les fonctions supposées protectrices mais déficientes de cette population. Cette stratégie a pu être validée en montrant successivement que : 1) les lymphocytes iNKT de la souris NOD, bien que déficients, restent réactifs au ligand α -GalCer et produisent les cytokines IL-4 et IFN- γ ; 2) cette réactivité s'accompagne d'une protection efficace contre le diabète qui est obtenue avec un traitement continu par le ligand α -GalCer entre 3 et 5 semaines de vie. Ces résultats ont été confirmés avec des protocoles similaires par trois autres groupes de recherche (Hong et al., 2001; Naumov et al., 2001a; Sharif et al., 2001). Les mécanismes sous-jacents qui ont été beaucoup explorés restent cependant seulement en partie identifiés.

A partir de notre démonstration de la perte de la capacité de transfert de la maladie par les splénocytes issus des souris traitées par l' α -GalCer, trois hypothèses principales non exclusives qui sont illustrées dans la Figure n° 4 peuvent être proposées. Le développement des lymphocytes T effecteurs serait perturbé du fait de leur immunosuppression (hypothèse 1), de leur immunodéviations Th2 (hypothèse 2) ou de leur tolérisation sous l'impulsion de DC (hypothèse 3).

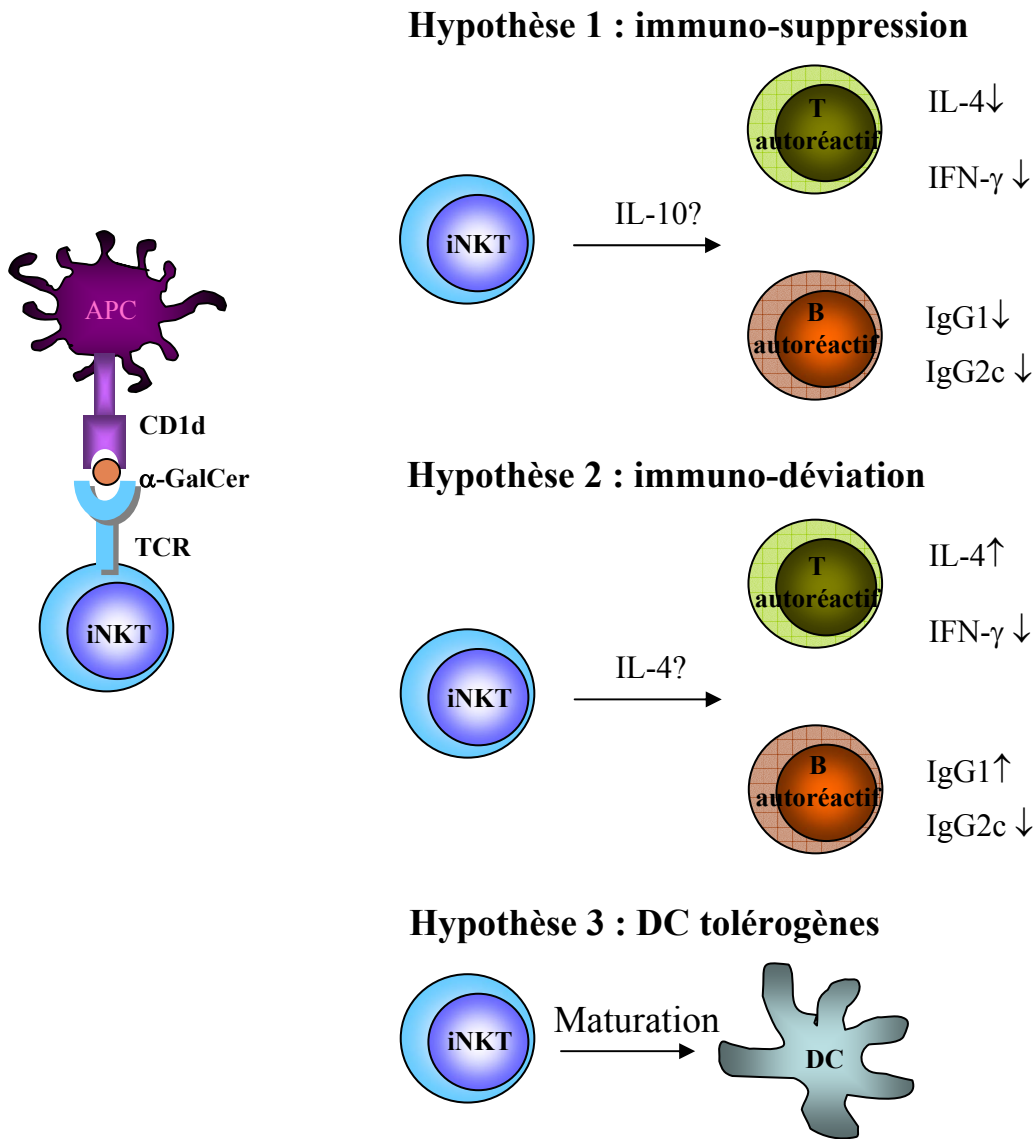


Figure 4. Trois hypothèses de mécanisme de protection par l' α -GalCer dans le modèle de T1D de la souris NOD.

Hypothèse 1 : la réponse auto-réactive des lymphocytes T et B est spécifiquement immunosupprimée. Les questions de la mise en jeu de l'IL-10 et de sa source cellulaire restent posées. *Hypothèse 2* : la réponse auto-réactive des lymphocytes T et B est immuno-déviée dans son versant Th2 non pathogène sous l'effet de l'IL-4 produite par les lymphocytes iNKT. *Hypothèse 3* : une maturation de DC toléro-gènes permise par le contact direct entre les lymphocytes iNKT et les DC. Les hypothèses 1 et 3 n'excluent pas la mise en jeu des lymphocytes Treg. Ils ne sont pas intégrés dans notre schéma car nos résultats ne sont pas en faveur de leur implication dans la protection.

Pour les deux premières hypothèses, le mécanisme sous-jacent de protection peut comprendre un renforcement de populations lymphocytaires T dont les fonctions régulatrices seraient amplifiées; nous avons donc en premier lieu recherché l'existence de relais de protection par des lymphocytes T régulateurs conventionnels. Les expériences de co-transfert avec des cellules diabétogènes n'ont révélé aucune modification de l'activité protectrice des lymphocytes T conventionnels chez les animaux traités par l' α -GalCer. De plus, les lymphocytes iNKT des mêmes souris n'ont aucune activité protectrice pouvant expliquer la suppression du T1D après leur transfert. Parallèlement, une analyse phénotypique portant sur les lymphocytes T $CD4^+CD25^+$ et $CD62L^+$ n'a montré aucune modification de leur nombre au cours du traitement par l' α -GalCer, suggérant aussi qu'il n'y a pas de lien entre les lymphocytes T régulateurs conventionnels et les lymphocytes iNKT activés chez les animaux protégés

Par ailleurs, nos résultats obtenus dans l'analyse des réponses auto-réactives T et B, ont montré leur suppression spécifique puis leur immunodéviations Th2 chez les animaux traités par l' α -GalCer. Les mécanismes moléculaires de ces effets ne sont pas encore clairs. Les cytokines et les DC pourraient jouer un rôle central.

L'hypothèse de l'immunosuppression. L'IL-10 est décrite pour ses effets immunosuppresseurs ainsi que pour sa mise en jeu dans les effets tolérogènes des lymphocytes iNKT (Sonoda et al., 2001; Hammond et al., 1998). Néanmoins, le traitement concomitant par l' α -GalCer avec un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de l'IL-10 n'a pas relevé la protection (nos données non publiées).

L'hypothèse des DC tolérogènes. La disparition du pouvoir diabétogène peut aussi résulter de la mise en jeu de DC tolérogènes (Steinman et al., 2003). Les DC sont des éléments déterminants dans l'induction de la tolérance des lymphocytes T et il est bien

documenté que les lymphocytes iNKT peuvent influencer leur différenciation (Vincent et al., 2002). Il est donc raisonnable d'envisager que les lymphocytes iNKT puissent supprimer la réaction auto-immune *via* les DC. A cet égard, l'administration de l' α -GalCer conduit à une accumulation de lymphocytes iNKT et de DC dans les ganglions pancréatiques de la souris NOD dont le transfert à des souris receveuses NOD prédiabétiques s'accompagne d'une tolérance des lymphocytes T auto-réactifs aboutissant à la protection contre le diabète (Naumov et al., 2001b; Chen et al., 2005).

On peut enfin évoquer l'anergie d'effecteurs transgéniques diabétogènes BDC2.5 sous l'action des lymphocytes iNKT provenant de souris transgéniques V α 14, même si dans ce cas particulier l'emploi de l' α -GalCer ne s'est pas avéré nécessaire (Beaudoin et al., 2002; Novak et al., 2005).

*L'hypothèse de l'immunodéviat*ion. Plusieurs études montrent que sous l'impulsion de l' α -GalCer, les lymphocytes iNKT peuvent immunodévier la réponse immune par les cytokines Th2 dont en particulier l'IL-4 (Singh et al., 1999; Burdin et al., 1999). Cette conclusion s'applique-t-elle aux réponses auto-réactives ? En accord avec ceux du groupe de Van Kaer, nos résultats montrent une déviation de réponses auto-réactives T et B qui deviennent dominantes Th2 entre 20 et 30 semaines d'âge chez les souris traitées par l' α -GalCer (Hong et al., 2001). En utilisant des souris NOD déficientes pour IL-4, Delovitch et ses collaborateurs ont décrit que le traitement par l' α -GalCer réduit l'incidence du diabète de manière dépendante de l'IL-4 (Mi et al., 2004). Ces résultats sont en accord avec ceux plus anciens de la même équipe (Cameron et al., 1997) montrant que le traitement par l'IL-4 prévient le T1D de la souris NOD. L'équipe de Van Kaer, en étudiant le devenir des lymphocytes iNKT au décours d'un traitement continu par l' α -GalCer, a mis en évidence une anergie partielle des lymphocytes iNKT associant une

réduction de la production d'IL-4 à une quasi-disparition de la production d'IFN- γ (Parekh et al., 2005). En conséquence, ce phénomène « d'anergie partielle biaisée » pourrait contribuer à l'effet protecteur du traitement chronique par l' α -GalCer dans le modèle du diabète de la souris NOD.

Tout expliquer par l'immunodéviatation et l'intervention de l'IL-4 est cependant un peu simpliste et en tout cas non satisfaisant puisque dès la seconde injection d' α -GalCer et pendant les trois mois qui suivent, nous avons constaté une disparition quasi-complète de la fonction de production des cytokines par les lymphocytes iNKT de la souris NOD (nos données non publiées). Or, une seule injection du ligand n'est pas suffisante pour assurer la protection.

L'ensemble de ces résultats suggère que sous l'effet de l' α -GalCer, les lymphocytes iNKT pourraient agir sur le développement du T1D de manière complexe par plusieurs mécanismes. La poursuite de leur identification dans le modèle de la souris NOD contribuera à la compréhension des règles qui dictent les fonctions des lymphocytes iNKT dans la dynamique des réponses auto-réactives et servira l'objectif de développer une nouvelle voie de traitement des maladies auto-immunes axée sur leur manipulation.

1-2) Pré-existe-il une fonction protectrice « naturelle » des lymphocytes iNKT dans le T1D ?

Ayant clairement montré que les lymphocytes iNKT activés par l' α -GalCer constituent un outil essentiel de traitement du T1D, il restait à déterminer si cette population, en l'absence de stimulation exogène engageant son TCR, a un rôle régulateur dans le développement des maladies auto-immunes. Bien que cible thérapeutique de l' α -GalCer, on ne peut en effet pas préjuger de son rôle naturel : l'IL-4 n'est peut-être pas produite suffisamment en conditions basales pour qu'il préexiste un rôle protecteur des

lymphocytes iNKT dépendant de l'IL-4. En accord avec cette hypothèse, les souris NOD déficientes en IL-4 (Wang et al., 1998) développent normalement le T1D témoignant de la limite du concept de dérégulation Th1/Th2 comme élément unique déterminant le diabète de la souris NOD.

Notre stratégie reposant sur la construction d'une lignée NOD $J\alpha 18^{-/-}$ totalement dépourvue de lymphocytes iNKT n'a pas permis de démasquer « par défaut » de fonctions protectrices naturelles de ces cellules, au contraire de ce qui a pu être rapporté pour les lymphocytes Treg avec les souris mutées NOD $CD28^{-/-}$ (Salomon et al., 2000). Nous avons aussi pu conclure que les lymphocytes iNKT sont sans influence sur les activités protectrices conférées aux lymphocytes Treg. En accord avec ces résultats, la lignée congénique NOD.6.VIII.C3H récemment décrite pour sa protection partielle vis-à-vis du T1D, laquelle s'accompagne d'une fonction protectrice des lymphocytes Treg augmentée (Rogner et al., 2006), s'est avérée avoir un déficit fonctionnel en lymphocytes iNKT aggravé d'un facteur 2 à 3, comparativement à la lignée NOD sauvage de référence (données personnelles, Françoise Lepault & André Herbelin).

Notre stratégie complémentaire reposant sur une normalisation des lymphocytes iNKT n'a pas non plus permis de révéler d'activité protectrice naturelle des lymphocytes iNKT. Le laboratoire avait bien rapporté antérieurement que l'introduction dans le génome de la souris NOD de la région génétique « NKRP1 » comprenant le locus *NKI.1* de la lignée C57BL/6 confère une restauration des fonctions des lymphocytes iNKT et NK qui s'accompagne d'une protection partielle contre le T1D (Carnaud et al., 2001). Néanmoins, nous montrons désormais aussi que la normalisation numérique et fonctionnelle des lymphocytes iNKT, tant celle obtenue par un traitement par l'IL-7 (Sharif et al., 2001) que celle observée dans la lignée congénique NOD FcγR2.B6 (Rocha-Campos et al., 2006) ne

s'accompagnent pas d'une modification de l'incidence de la maladie.

Jusqu'ici, l'argument principal en faveur d'une fonction protectrice naturelle des lymphocytes iNKT reposait sur des données obtenues avec certaines lignées NOD $CD1d^{-/-}$. Deux groupes ont ainsi rapporté une accélération du T1D dans leur lignée mais le groupe de Van Kaer n'a observé aucune modification de l'incidence de la maladie dans la sienne (Hong et al., 2001). Cette discordance pourrait résulter d'une hétérogénéité dans la région génétique délétée comprenant le locus *CD1d* dont les parties flanquantes contiennent quatre gènes de susceptibilité du T1D. En accord avec cette hypothèse, notre propre lignée NOD $CD1d^{-/-}$ dont l'incidence de T1D était accélérée après 6-9 rétrocroisements dans le fond génétique NOD a désormais, après un total de 12 retrécroisements, une incidence comparable à celle de la lignée NOD sauvage (nos données non publiées).

Tableau IV :

**Apport des souris NOD mutées et congéniques pour l'évaluation
du rôle naturel des lymphocytes iNKT dans le T1D spontané.**

Lignée NOD	Statut des lymphocytes iNKT	Incidence du T1D spontané
sauvage	déficit partiel	oui
$J\alpha 18^{-/-}$	déficit total	inchangé
$CD1d^{-/-}$ (CR-12 Necker)	déficit total	inchangé
NKRP1.B6	restauration partielle	protection partiel
Fcgr2R2.B6	restauration partielle	inchangé
6.VIII.C3H	déficit partiel aggravé	protection partielle

Nous concluons donc que dans le modèle expérimental de la souris NOD, les

lymphocytes iNKT n'ont pas d'activité protectrice « spontanée » et qu'il n'existe pas de lien évident entre le défaut de ces cellules et l'histoire naturelle du T1D (Tableau IV).

Pourquoi n'avons nous pas constaté de fonction régulatrice des lymphocytes iNKT dans le modèle de T1D spontané alors que l'implication de ces cellules a pu être documentée dans plusieurs autres situations auto-immunes ? Comme nous l'avons déjà souligné dans le chapitre II de la partie introductive, à l'opposé du modèle de T1D spontané de la souris NOD, les modèles auto-immuns ayant révélé une activité régulatrice mettant en jeu les lymphocytes iNKT dépendent de stimulations exogènes (immunisation, adjuvants). Nous postulons que la synapse immunologique « auto-réactive » lymphocyte T/DC présentant l'auto-antigène n'est pas suffisante pour recruter les lymphocytes iNKT, mais qu'appuyés par certains éléments de l'environnement, les lymphocytes iNKT seraient efficacement recrutés/stimulés pour impulser spécifiquement la régulation de la réponse auto-réactive. En accord avec cette proposition, les lymphocytes iNKT pourraient être impliqués dans la protection induite par certains composés microbiens ou lors d'infections parasitaires dont les activités protectrices dépendent de l'expression de la molécule CD1d (Alyanakian et al., 2006; Mallevaey et al., 2006). Dans ce contexte, les agents pathogènes pourraient agir en modulant l'expression de ligand(s) endogène(s) (Brigl et al., 2003; Mattner et al., 2005) ou bien celle de la molécule CD1d comme cela a été décrit en situation infectieuse (Skold et al., 2005). A cet égard, on retiendra le travail du groupe de Sarvetnick qui a décrit un effet protecteur apporté par la surexpression de la molécule CD1d murine dans le pancréas sous le contrôle du promoteur de l'insuline (Falcone et al., 2004).

Dans ces conditions, nous proposons une nouvelle stratégie de traitement de T1D axée sur la l'identification d'agonistes de TLR capables d'entraîner une stimulation

naturelle et efficace du TCR des lymphocytes iNKT qui serait obtenue *via* la présentation optimisée de ligands endogènes. De tels outils thérapeutiques seraient probablement aussi efficaces, plus souples sans entraîner autant d'effets secondaires délétères que l' α -GalCer (Osman et al., 2000).

En définitive, la question du rôle des lymphocytes iNKT vis-à-vis du T1D chez l'homme reste entièrement posée. Nos résultats obtenus à partir d'une colonie de souris NOD ayant un statut sanitaire exempt d'organismes pathogènes ne sont en effet pas directement applicables à la situation de l'homme chez lequel on peut envisager que les infections et l'environnement contribuent à l'induction efficace des activités naturelles des lymphocytes iNKT dirigées contre le T1D. Il est dorénavant raisonnable et légitime de rechercher à intégrer les lymphocytes iNKT dans « l'hypothèse de l'hygiène », un concept qui repose sur la constatation que le manque de contact avec les agents pathogènes qui est permis dans les pays industrialisés s'accompagne d'une augmentation de l'incidence des maladies auto-immunes (Bach, 2002).

2) Etude du rôle des lymphocytes iNKT dans le modèle d'hépatite induite par la ConA

La deuxième partie de notre travail qui a porté sur l'étude de l'impact du déficit des lymphocytes iNKT de la souris NOD dans l'hépatite induite par la ConA a permis de préciser le mode d'action des lymphocytes iNKT et de révéler une dimension « pro-Th2 » jusque là insoupçonnée de l'IL-12 dans ce modèle expérimental. Enfin, ce modèle nous a permis de mettre en lumière un rôle différentiel des lymphocytes iNKT de la rate et du foie.

2-1) Mode d'activation des lymphocytes iNKT dans l'hépatite induite par la ConA ?

Nous avons d'abord tenté de préciser le mode d'activation des lymphocytes iNKT par la ConA. Il est généralement admis que la ConA agit comme un activateur polyclonal des lymphocytes iNKT, impulsant leurs fonctions de production de cytokines qui sont connues pour mettre en jeu les voies de signalisation associées au TCR. Nos travaux montrent que les lymphocytes iNKT sont directement ciblés par la ConA et ne nécessitent aucun intermédiaire/relais cellulaire dans leur production d'IFN- γ et d'IL-4 en réponse à la lectine. En accord avec cette conclusion, ce mode d'activation ne nécessite pas la mise en jeu de ligands endogènes puisque l'activation des lymphocytes iNKT en réponse à la ConA *in vivo* et *in vitro* n'est pas abrogée par un anticorps anti-CD1d, témoignant l'absence d'interaction directe entre ces lymphocytes iNKT et la molécule CD1d dans ce modèle (nos données non publiées).

2-2) Un rôle dominant des lymphocytes iNKT reposant sur leur qualité unique de production d'IL-4

La ConA activant l'ensemble des lymphocytes T, il était légitime de rechercher si

pour le déclenchement de l'hépatite, les lymphocytes iNKT sont « auto-suffisants » ou au contraire nécessitent une coopération avec d'autres lymphocytes T. Bien que la maladie dépende des lymphocytes exprimant le marqueur CD4 (Tiegs et al., 1992), nous avons pu montrer que les différentes autres populations lymphocytaires T CD4 sont dispensables pour l'induction de la maladie par les lymphocytes iNKT.

En fait, nous avons pu apporter la démonstration que le rôle indispensable et direct dans la maladie des lymphocytes iNKT repose sur leur qualité unique de production d'IL-4. Leur production d'IFN- γ est dispensable du fait que contrairement à l'IL-4, cette cytokine a de nombreuses sources cellulaires.

L'idée généralement admise est qu'au sein des lymphocytes T CD4, à la fois les lymphocytes iNKT et T mémoires sont susceptibles de produire l'IL-4 et l'IFN- γ . Il est donc frappant de constater qu'en réponse à la ConA, seuls les lymphocytes iNKT sont producteurs d'IL-4. Des expériences complémentaires ont montré que les lymphocytes T CD4 mémoires conventionnels (excluant les lymphocytes iNKT) de souris naïves produisent l'IFN- γ mais pas l'IL-4 en réponse primaire *in vitro* aux agents activateurs ConA, anti-CD3, ou PMA (données non publiées). Tout se passe donc comme s'il existait un compartiment T CD4 conventionnel « mémoire naturel Th1 » et que son équivalent « mémoire naturel Th2 » serait exclusivement constitué par les lymphocytes iNKT.

2-3) L'IL-12, un partenaire privilégié des lymphocytes iNKT pour valoriser leurs fonctions Th2 ?

Partant de notre démonstration d'un déficit partiel d'IL-12 en réponse à la ConA chez la souris NOD, nous avons pu normaliser la susceptibilité à la maladie chez cette souris par l'apport exogène d'IL-12. Jusqu'ici, le rôle attribué à cette cytokine dans l'hépatite induite par la ConA était celui d'un inducteur majeur de la production d'IFN- γ (Nicoletti et al.,

2000). Nos résultats permettent de conclure que c'est surtout en potentialisant la production d'IL-4 des lymphocytes iNKT en les ciblant directement que l'IL-12 contribue à l'hépatite induite par la ConA. Il est très probable que l'IL-12 participe aussi à la maladie en recrutant dans le foie les lymphocytes iNKT activés producteurs d'IL-4 de la rate. En effet, le traitement par l'IL-12 entraîne une augmentation du nombre de lymphocytes iNKT dans le foie des souris NOD exposées à la ConA. Cet effet est trop rapide pour être expliqué par une expansion locale des lymphocytes iNKT hépatiques. Et le fait que cette augmentation concerne principalement des cellules en apoptose n'est pas en faveur d'une survie facilitée par l'IL-12 (nos données non publiées). L'hypothèse d'un recrutement dans le foie facilité par l'IL-12 est d'autant plus probable que nous connaissons désormais le rôle majeur des lymphocytes iNKT producteurs d'IL-4 de la rate dans la maladie (cf. paragraphe 2-4). Il reste à compléter nos expériences en recherchant si l'augmentation du nombre des lymphocytes iNKT dans le foie sous l'impulsion de l'IL-12 est abrogée après splénectomie. Enfin, l'utilisation de souris IL-12^{-/-} a permis de vérifier « par défaut » l'influence majeure de l'IL-12 dans sa forme endogène tant sur la maladie que sur la fonction de production d'IL-4 des lymphocytes iNKT. Il reste à déterminer si le concept proposé par l'équipe de Brenner suggérant que l'IL-12 amplifie la production d'IFN- γ dérivée des lymphocytes iNKT en réponse aux ligands endogènes (Brigl et al., 2003) s'applique aussi à la production d'IL-4. Dans l'affirmative, l'IL-12 devrait alors être considérée comme un amplificateur de l'ambivalence fonctionnelle auto-réactive des lymphocytes iNKT et une re-évaluation de son influence sur les lymphocytes iNKT au cours des infections et en situation immune pourrait être envisagée.

2-4) un rôle régulateur primordial des lymphocytes iNKT de la rate

Nos expériences de splénectomie mais aussi de reconstitution par transfert adoptif

chez des receveurs $J\alpha 18^{-/-}$ ont apporté la démonstration que l'hépatite induite par la ConA dépend des lymphocytes iNKT de la rate et que les populations lymphocytaires iNKT du foie et de la rate sont distinctes sur le plan fonctionnel. Ainsi, les lymphocytes iNKT de la rate sont bien meilleurs producteurs d'IL-4 que ceux du foie, raison qui à elle seule explique qu'ils sont indispensables pour induire l'hépatite.

La principale raison pour laquelle on attribuait jusqu'ici les effets délétères des lymphocytes iNKT dans l'hépatite induite par la ConA au contingent iNKT résident du foie est leur fréquence (10-30 % des MNC du foie contre 1 à 1,5% dans la rate). Il n'en reste pas moins que la population iNKT de la rate constitue un contingent d'environ $1,0$ à $1,5 \cdot 10^6$ cellules contre $0,2$ à $0,4 \cdot 10^6$ cellules dans le foie. De plus, les caractéristiques anatomiques du foie permettent l'entrée des cellules sortant directement de la rate, cette dernière n'étant pas drainée par la lymphe. De cette façon, les lymphocytes iNKT activés provenant de la rate qui exerceraient leurs fonctions régulatrices en produisant des cytokines finiraient leur vie dans le foie.

2-5) Existence de populations lymphocytaires iNKT distinctes dans la rate et le foie ?

Les éléments cellulaires et moléculaires qui sont à l'origine des différences fonctionnelles des populations lymphocytaires iNKT dans le foie et la rate restent en grande partie à identifier. Cette question ne pourra pas être abordée sans prendre en considération le fait que le foie est exposé à une pression sanguine basse favorisant les contacts entre les cellules hématopoïétiques sanguines et endothéliales et constitue le site de réception des antigènes alimentaires et de la flore intestinale. De ce fait, le foie joue aussi un rôle stratégique et complexe sur le plan immunitaire : il exerce des fonctions à la fois de surveillance immunitaire et de tolérance vis-à-vis des antigènes alimentaires et bactériens de la flore intestinale (Crispe, 2003). L'hypothèse d'une sélection ou d'une

éducation « locale » des lymphocytes iNKT résultant d'une biodisponibilité particulière de ligands endogènes ou exogènes des lymphocytes iNKT dans le foie mérite d'être considérée. Le fait que le répertoire de la chaîne TCR V β des lymphocytes iNKT V β 8.2 montre des variations de la région DJ selon leur localisation dans la rate ou le foie suggère bien la possibilité d'une sélection périphérique (Masuda et al., 1997). Par ailleurs, les CPA du foie pourraient constituer un site d'éducation particulier pour les lymphocytes iNKT. Nos résultats préliminaires ont montré une efficacité équivalente des CPA du foie et de la rate à présenter l' α -GalCer aux lymphocytes iNKT spléniques. Il reste à déterminer si le rôle tolérogène essentiel récemment attribué aux cellules dendritiques plasmacytoïdes du foie vis-à-vis de la réponse lymphocytaire T aux antigènes oraux (Le Borgne et al., 2006) s'applique aussi à celle des lymphocytes iNKT. Enfin, on ne peut pas exclure que la population lymphocytaire intra-hépatique iNKT soit prédéterminée dans le thymus. Certaines molécules d'adhésion, telle que LFA-1, les chimiokines ou leur récepteurs tels que CCR5 et CXCR6 (Geissmann et al., 2005; Ajuebor et al., 2005) contrôlent la migration et l'homéostasie des lymphocytes iNKT dans le foie.

2-6) Réévaluation de l'acteur principal dans le scénario de l'hépatite induite par la ConA

A la lumière de l'ensemble de nos résultats, nous pouvons attribuer un rôle central aux lymphocytes iNKT de la rate dans notre modèle expérimental d'hépatite. Nous proposons le scénario principal (Figure 5) suivant : les lymphocytes iNKT de la rate activés par la ConA sont recrutés dans le foie permettant une diffusion efficace de l'IL-4 qu'ils produisent. Cette dernière est directement toxique pour les hépatocytes (Guillot et al., 2001). Il s'agirait du mécanisme essentiel mettant en jeu les lymphocytes iNKT. La nécrose ainsi induite peut s'accompagner d'une éventuelle apoptose qui résulterait de la

mise en jeu des fonctions cytotoxiques dépendant du couple Fas/FasL assurées par les lymphocytes iNKT intra-hépatiques. Cette fonction des lymphocytes iNKT dirigés contre les hépatocytes serait elle-même potentialisée par l'IL-4 (Kaneko et al., 2000). Nous n'excluons pas non plus la possibilité de fonctions cytotoxiques partagées avec les lymphocytes iNKT de la rate. Dans tous les cas, il reste à préciser où et à quelle phase de ce scénario l'IL-12 est produite et intervient pour augmenter la production d'IL-4 des lymphocytes iNKT de la rate.

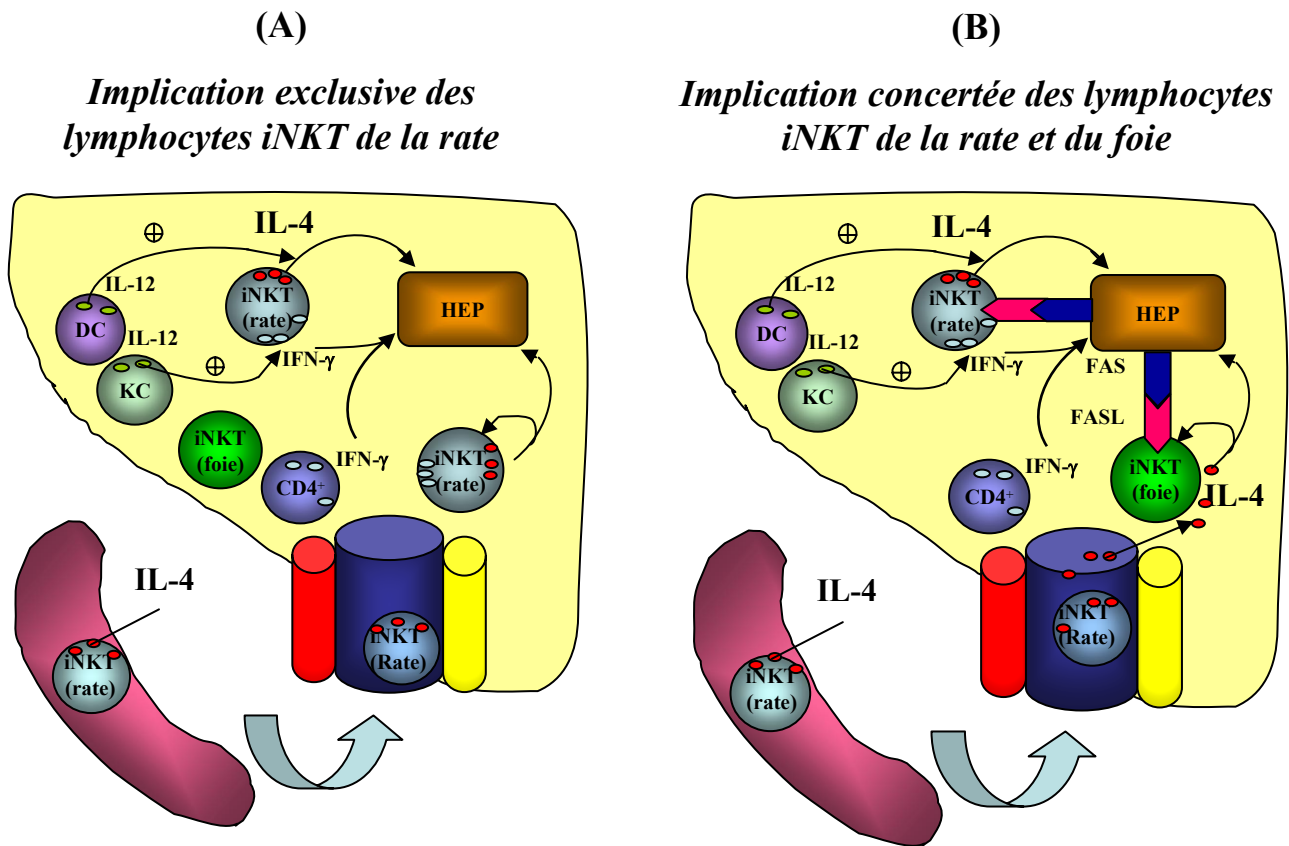


Figure 5. Le lymphocyte iNKT de la rate est l'acteur principal producteur d'IL-4 au cours de l'hépatite induite par la ConA.

Prenant appui sur nos résultats, les deux scénarios A et B peuvent être proposés. Dans les deux scénarios, les lymphocytes iNKT spléniques sont mobilisés dans le foie où ils délivrent l'IL-4 qui est directement toxique pour les hépatocytes. L'IL-12 (produite localement?) aggrave les lésions inflammatoires du foie en amplifiant leur production d'IL-4. Le scénario B intègre un mécanisme complémentaire par lequel les lymphocytes iNKT de la rate et de la foie exercent ensemble leurs fonctions cytotoxiques mettant en jeu le couple Fas/FasL vis-à-vis des hépatocytes. HEP : hépatocyte. KC : cellule de Kupffer.

2-7) un déterminisme génétique de la maladie dicté par la production d'IL-4 des lymphocytes iNKT ?

La question de l'influence du fond génétique sur l'hépatite induite par la ConA n'avait encore jamais été abordée en lien avec le statut des lymphocytes iNKT. Notre étude dans le modèle de la souris NOD complète les travaux antérieurs réalisés avec des souris C57BL/6 génétiquement modifiées totalement dépourvues de lymphocytes iNKT ; elle permet de proposer l'existence d'un déterminisme génétique de la maladie dépendant essentiellement de la fonction de production d'IL-4 des lymphocytes iNKT. En effet, cette fonction des lymphocytes iNKT est indispensable pour l'induction de la maladie quel que soit le fond génétique C57BL/6 ou NOD ; de plus, en prenant appui sur notre découverte que l'IL-12 influence la production d'IL-4 par les lymphocytes iNKT, nos expériences réalisées à partir de souris NOD reconstituées en IL-12 et de souris C57BL/6 IL-12^{-/-} ont permis de moduler cette activité des lymphocytes iNKT et de la corrélérer avec la susceptibilité à la maladie.

2-8) Les lymphocytes iNKT et l'IL-12 : des acteurs essentiels dans l'hépatite auto-immune chez l'homme ?

Les lymphocytes iNKT pourraient constituer un indicateur important dans l'hépatite auto-immune et même au cours de maladies virales ciblant le foie. Il a été déjà documenté que leur nombre est augmenté dans le foie des patients atteints de cirrhose biliaire primaire, une maladie auto-immune très proche de l'hépatite auto-immune (Kita et al., 2002), et également de ceux atteints d'hépatite C chronique (Nutti et al., 1998). La révélation du rôle de l'IL-12 vis-à-vis des lymphocytes iNKT au cours de l'hépatite expérimentale induite par la ConA soulève la question du rôle de cette cytokine dans la progression des maladies du foie jusqu'aux stades de fibrose et/ou de cirrhose et de son lien avec les infections.

Dans ces conditions, la question d'une nouvelle stratégie thérapeutique dans l'hépatite auto-immune axée sur la manipulation des lymphocytes iNKT doit être posée. La mise en évidence de leurs fonctions différentielles en fonction de leur localisation dans le foie et la rate implique un nouveau défi, celui de pouvoir cibler sélectivement les lymphocytes iNKT d'un organe particulier. A cet égard, nos études apportent une nouvelle compréhension immunologique du traitement classique par la splénectomie qui est largement pratiqué en clinique lors de l'hypertension portale. Il reste à déterminer, si au moins dans certains cas, ce traitement doit être proposé aux patients atteints d'hépatite fulminante.

Conclusion

En prenant appui sur la souris NOD dans deux modèles expérimentaux de maladies auto-immunes, nos études ont montré que les lymphocytes iNKT, bien que partiellement défectueux, ont un rôle régulateur/protecteur efficace lorsqu'ils sont manipulés *in vivo* par leur ligand α -GalCer. Revers de la médaille, l'IL-4 des lymphocytes iNKT qui est nécessaire pour prévenir le T1D sous l'impulsion de l' α -GalCer contribue aussi au déclenchement d'une autre maladie auto-immune, l'hépatite induite par la ConA à laquelle la souris NOD reste susceptible malgré son déficit partiel en lymphocytes iNKT. Ce constat rappelle qu'une meilleure connaissance des règles qui régissent les différentes fonctions des lymphocytes iNKT est obligatoire avant que leur manipulation à but thérapeutique soit proposée.

Une seconde conclusion importante de notre travail est que dans le modèle du T1D de la souris NOD les lymphocytes iNKT sont inactifs sans manipulation. Nous postulons que la synapse auto-réactive n'est pas suffisante et doit être aidée par des stimulations exogènes fournies par l'environnement pour déclencher la mise en place des fonctions protectrices des lymphocytes iNKT. A cet égard, nous montrons que l'IL-12, une cytokine récemment décrite pour valoriser les fonctions auto-réactives des lymphocytes iNKT, potentialise par cette voie autant leur versant Th2 producteur d'IL-4 que leur versant Th1 producteur d'IFN- γ . La production en quantité insuffisante de l'IL-12 du fait d'un déficit de sa production (cas de la souris IL-12^{-/-} ou dans une moindre mesure de la souris NOD) ou bien encore du fait d'un manque de stimulation exogène lié à un environnement

dépourvu d'agents pathogènes (cas de notre animalerie) pourrait à elle seule expliquer l'absence de recrutement efficace des lymphocytes iNKT.

On pourra aussi ajouter que ces résultats remettent en question l'idée généralement acquise d'un rôle essentiel de l'IL-12 dans le déterminisme Th1 des lymphocytes iNKT. Au contraire, cette cytokine, en renforçant les deux versants Th1 et Th2 contribue elle-même à l'ambivalence de ces cellules « mi ange, mi démon » en situation pathologique.

En fin de compte, nos études portant sur l'effet de la splénectomie dans le modèle d'hépatite induite par la ConA révèlent des activités différentielles des lymphocytes iNKT en fonction de leur localisation. Par cette voie de recherche, nous espérons qu'une partie du mystère du déterminisme effecteur/régulateur des lymphocytes iNKT pourra être levé.

Manuscrits Annexes

Manuscrit annexe n°1

Exacerbated Th2-mediated airway inflammation and hyperresponsiveness in auto-immune diabetes-prone NOD mice: a critical role for CD1d-dependent NKT cells.

Araujo LM, Lefort J, Nahori MA, Diem S, Zhu R, Dy M, Leite-de-Moraes M C, Bach JF, Vargaftig BB, and Herbelin A. *Eur. J. Immunol.*, 2004, 34:327-335

Exacerbated Th2-mediated airway inflammation and hyperresponsiveness in autoimmune diabetes-prone NOD mice: a critical role for CD1d-dependent NKT cells

Luiza M. Araujo^{1,2}, Jean Lefort³, Marie-Anne Nahori³, Séverine Diem¹, Ren Zhu¹, Michel Dy¹, Maria C. Leite-de-Moraes¹, J. F. Bach², B. Boris Vargaftig³ and André Herbelin¹

¹ CNRS FRE 2444, Paris V, Hôpital Necker, Paris, France

² INSERM U580, Hôpital Necker, Paris, France

³ Unité de Pharmacologie Cellulaire, Unité Associée Institut Pasteur-INSERM U485, Paris, France

The NOD mouse has proved to be a relevant model of insulin-dependent diabetes mellitus, closely resembling the human disease. However, it is unknown whether this strain presents a general bias toward Th1-mediated autoimmunity or remains capable of mounting complete Th2-mediated responses. Here, we show that NOD mice have the capacity to develop a typical Th2-mediated disease, namely experimental allergic asthma. In contrast to what might have been expected, they even developed a stronger Th2-mediated pulmonary inflammatory response than BALB/c mice, a strain that shows a typical Th2 bias in this model. Thus, after allergen sensitization and intra-nasal challenge, the typical features of experimental asthma were exacerbated in NOD mice, including enhanced bronchopulmonary responsiveness, mucus production and eosinophilic inflammation in the lungs as well as specific IgE titers in serum. These hallmarks of allergic asthma were associated with increased IL-4, IL-5, IL-13 and eotaxin production in the lungs, as compared with BALB/c mice. Notwithstanding their quantitative and functional defect in NOD mice, CD1d-dependent NKT cells contribute to aggravate the disease, since in OVA-immunized CD1d^{-/-} NOD mice, which are deficient in this particular T cell subset, airway eosinophilia was clearly diminished relative to NOD littermates. This is the first evidence that autoimmune diabetes-prone NOD mice can also give rise to enhanced Th2-mediated responses and might thus provide a useful model for the study of common genetic and cellular components, including NKT cells that contribute to both asthma and type 1 diabetes.

Key words: Th1/Th2 cells / Autoimmunity / Diabetes / Allergy / Cytokines

Received	5/5/03
Revised	10/11/03
Accepted	8/12/03

1 Introduction

Type 1 insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is an autoimmune disorder characterized by lymphocyte-mediated destruction of insulin-producing β -cells in the pancreatic Langerhans' islets [1]. The nonobese diabetic (NOD) mouse has proved a relevant model for IDDM, closely resembling the human disease [2]. This strain develops spontaneous diabetes resulting from an autoimmune response directed against the pancreatic

islets of Langerhans, with subsequent destruction of the insulin-producing β -cells, insulin deficiency and hyperglycemia [2]. This process is preceded by macrophage, B and T lymphocyte infiltration of pancreatic islets [2].

Autoreactive T cells play a major pathogenic role, as demonstrated by the capacity of purified cells or T cell clones to transfer the disease to immuno-incompetent NOD mice [2, 3]. Among these, the contribution of Th1 cells seems to be determinant [4–8]. Indeed, destructive insulinitis is paralleled by predominant secretion of IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α and IL-18, while the Th2 type cytokine IL-4 is associated with non-destructive insulinitis [4, 9–11]. The role of Th1 cells as inducers of diabetes is also supported by findings obtained with cytokine/anti-cytokine treatments. Thus, systemic treatment with IL-12, which

[DOI 10.1002/eji.200324151]

Abbreviations: **BALF:** Bronchoalveolar lavage fluid **BHR:** Bronchopulmonary hyperreactivity **IDDM:** Insulin-dependent diabetes mellitus **PAS:** Periodic acid-Schiff

promotes the development of Th1 cells, accelerates disease onset in NOD mice [9]. Conversely, diabetes is delayed by systemic treatment with anti-IFN- γ mAb or IL-12 antagonists [12, 13].

Converging data indicate that cytokine imbalance plays a key role in disease emergence, with overexpression of Th1 diabetogenic T cells together with a defective differentiation of Th2 autoreactive T lymphocytes, probably due to inappropriate regulatory cells [3, 4]. Consistent with this view, efficient induction of regulatory Th2 cells in NOD mice has been achieved by systemic treatment with IL-4 or its local expression in pancreatic β -cells in insulin-promoter-IL-4 transgenic mice [14, 15]. Based on the Th1/Th2 paradigm, it has been postulated that IL-4 induces a shift in the balance of anti-islet T cells from the pathogenic Th1 toward a less harmful Th2 phenotype.

Whether the defective differentiation of autoreactive Th2 lymphocytes in NOD mice is due to a more general defect in the efficient induction of Th2 cells is still unclear. NOD mice can be manipulated to mount Th2 responses against conventional antigens including myelin basic protein, hen egg lysozyme or β -galactosidase [16, 17]. However, induction of such unipolar Th2 responses has been obtained only when NOD mice were neonatally immunized, whereas the ability of adult NOD mice to develop Th2 responses against exogenous antigens has not been investigated.

Here, we addressed this issue by evaluating whether adult NOD mice are capable of developing a typical Th2-mediated response outside the pancreas. To do so, we studied a Th2-mediated pulmonary inflammatory disease, *i.e.* experimental allergic asthma, which is induced after allergen sensitization and intra-nasal (*i.n.*) challenge with ovalbumin (OVA). We evaluated the principal symp-

toms of allergic asthma in NOD mice, namely elevated serum IgE, mucus production, eosinophilia, and enhanced bronchial reactivity. These are all associated with a Th2 cytokine profile, which is obligatory for disease development [18, 19].

In the present report, we show that NOD mice display a complete asthmatic phenotype with increased Th2 responses and more severe bronchial inflammation and hyperresponsiveness than BALB/c mice, known for their typical Th2 bias in this model. From these findings, we conclude that adult NOD mice are not generally Th1 biased and can develop exacerbated Th2-mediated responses.

2 Results

2.1 OVA-challenged NOD mice exhibit airway eosinophilia and lung inflammation

Experimental OVA-dependent allergic asthma is characterized by airway eosinophilia and mucus hyperproduction [18]. These parameters were compared in NOD and BALB/c mice, a strain which develops a typical Th2 bias in this model [19]. Fig. 1A shows that total cell counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were augmented after *i.n.* challenge with OVA both in NOD and in BALB/c mice immunized with 1 or 10 μ g of OVA. The number of eosinophils was even higher in BALF of NOD than of BALB/c mice for either dose (Fig. 1B), reaching 28% of total cells in NOD versus 7% in BALB/c mice when 10 μ g of OVA were injected. The difference between NOD and BALB/c mice was even more striking at the low dose, which induced a ten-fold increase of eosinophils, as compared with a four-fold increase in mice having received 10 μ g of OVA.

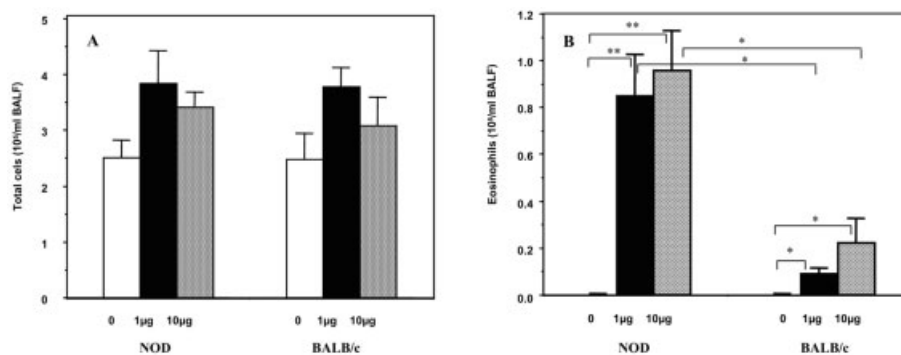


Fig. 1. Eosinophil recruitment into the BALF of NOD and BALB/c mice after OVA-immunization and challenge. (A) Total and (B) differential cell counts were determined in the BALF of NOD and BALB/c mice immunized with 1 μ g or 10 μ g OVA and challenged *i.n.* with 10 μ g OVA. Each value represents the mean \pm SEM of 6–18 mice. Significant differences were observed between saline and OVA-sensitized and challenged mice, and between NOD or BALB/c animals, as indicated. * p < 0.005 and ** p < 0.0001.

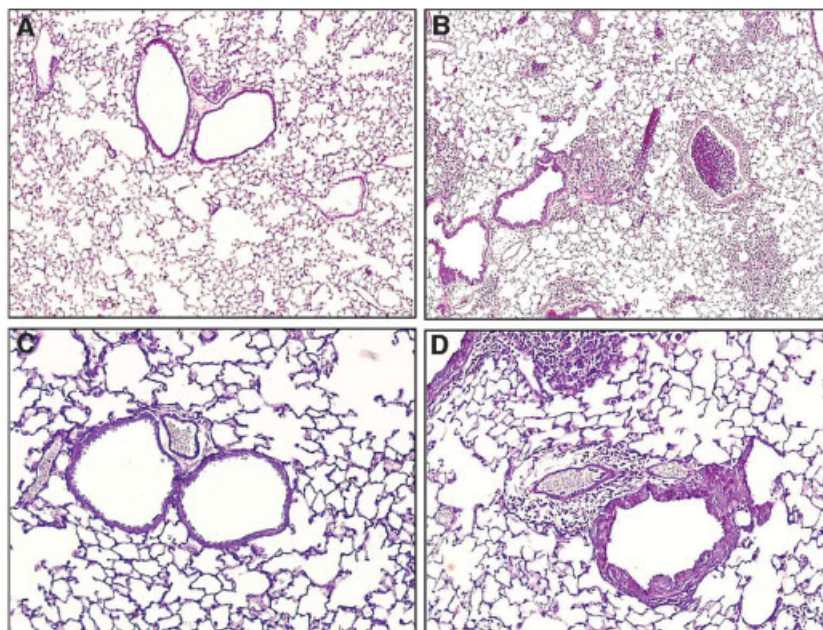


Fig. 2. OVA-induced inflammation and mucus production in the lungs of NOD mice. Lung sections from NOD mice immunized with 1 μg OVA and challenged with saline (A and C) or 10 μg OVA (B and D) were stained with HE and PAS. (A, B) Representative lung sections stained with HE (magnification $\times 100$) from saline- or OVA-challenged NOD mice. Bronchioles without inflammation or dense perivascular and peribronchiolar infiltrates mainly composed of eosinophils are present in lung of saline- or OVA-challenged NOD mice, respectively. (C, D) PAS-stained slides (magnification $\times 100$) show that mucin is absent from the epithelium of NOD mice challenged with saline, while it is increased in the bronchiolar lining cells in OVA-challenged NOD mice.

Since OVA challenge induces eosinophil migration into BALF after lung eosinophil sequestration [20], we examined this feature in NOD mice. We observed intense airway inflammation, characterized by peribronchiolar infiltrates composed mainly of eosinophils (Fig. 2B) and intense mucus production (Fig. 2D). Conversely, eosinophil recruitment and mucosal cells in the bronchiolar lining cells were virtually absent in saline-challenged animals (Fig. 2A and Fig. 2C) or in OVA-challenged non-immunized animals (data not shown).

These findings clearly show that OVA immunization and challenge induce both eosinophilia and airway inflammation in NOD mice.

2.2 NOD mice produce high levels of Th2 cytokines and eotaxin after OVA challenge

Allergic airway inflammation is accompanied by the generation of IL-4, IL-5 and IL-13 as well as CCR3 chemokines, such as eotaxin [18–21]. Fig. 3 shows elevated levels of IL-4, IL-5 and eotaxin in BALF and lungs of NOD mice after OVA challenge, but no difference was noted for IL-13 (Fig. 3). In both compartments, NOD mice challenged with OVA produced higher cytokine levels than

BALB/c mice and IFN- γ was detected in neither strain (data not shown).

2.3 NOD mice secrete OVA-specific serum IgE following immunization and challenge

To investigate the peripheral immune response in immunized and challenged mice, we measured serum levels of OVA-specific IgE, the production of which depends on both IL-4 and IL-13 in this model [18, 22, 23]. Fig. 4 shows that OVA immunization induced specific IgE in both NOD and BALB/c mice, with increased titers after OVA challenge. As expected from the absence of IFN- γ in these conditions, IgG2a was detected in neither strain (data not shown). These findings support the concept that OVA-induced changes in NOD mice result from a strong Th2 immune response.

2.4 Anti-CD4 mAb treatment inhibits Th2 cytokine secretion, OVA-specific IgE production and airway eosinophilic inflammation in NOD mice

It is well established that CD4⁺ T cells are the major population responsible for eosinophilic airway inflammation,

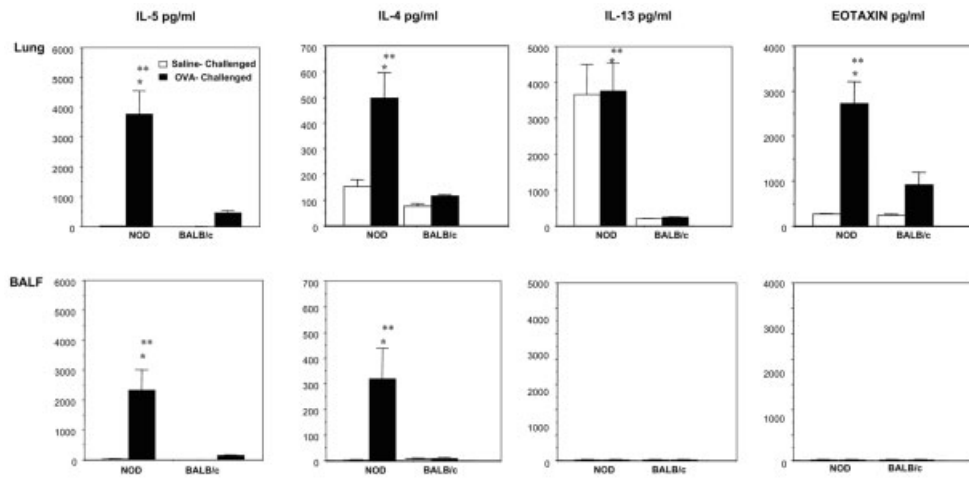


Fig. 3. Th2 cytokines and eotaxin in lung homogenates and BALF from OVA-sensitized and challenged mice. IL-5, IL-4, IL-13 and eotaxin levels in lung homogenates (upper panels) and BALF (lower panels) of NOD and BALB/c mice immunized with 1 μ g OVA and challenged i.n. with 10 μ g OVA or saline were collected immediately after methacholine provocation and measured by ELISA. Data are expressed as means \pm SEM. Significant differences were observed between saline and OVA-sensitized and challenged mice, and between NOD and BALB/c mice, as indicated. * p < 0.005 compared to control and ** p < 0.005 compared to BALB/c animals.

Th2 cytokine and IgE production in murine allergic asthma [18]. For this reason, we examined the consequences of CD4 depletion on the development of experimental asthma in NOD mice. As depicted in Fig. 5, anti-CD4 mAb treatment blocked airway eosinophilia as well as IL-4 and IL-5 production in the lung. Under the same conditions, OVA-specific IgE production was also suppressed (Fig. 5), indicating that CD4 cells are also determinant for the development of allergic asthma in diabetes-prone mice.

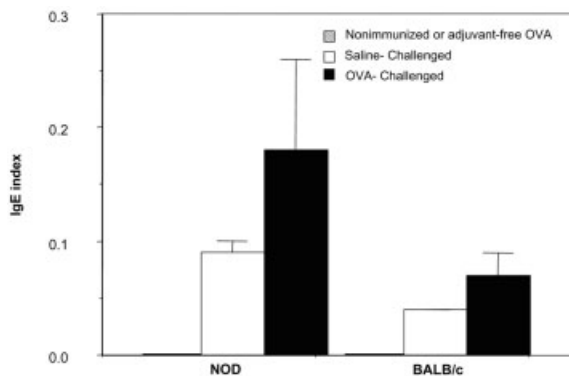


Fig. 4. OVA-specific IgE production in NOD and BALB/c mice. NOD and BALB/c mice were immunized with 1 μ g OVA and challenged i.n. with 10 μ g OVA or saline. Three days later, animals were bled and OVA-specific IgE levels were determined in the serum by ELISA. Results are expressed as mean \pm SEM of at least six mice.

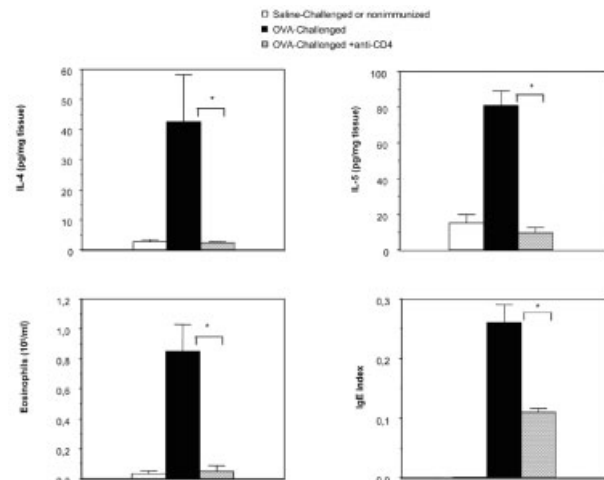


Fig. 5. Effects of the anti-CD4 mAb treatment on Th2 cytokine levels, OVA-specific IgE production and airway eosinophilic inflammation in NOD mice. Groups of NOD mice were immunized (day 0) with 10 μ g OVA and boosted (day 7) with 10 μ g OVA. Three days later, these mice were treated i.p. with anti-CD4 mAb (0.5 mg/mouse) for 3 consecutive days. After the last treatment, mice were challenged i.n. with 10 μ g OVA (day 14). In one set of experiments BALF and lungs were collected 24 h after the OVA-challenge. IL-4 and IL-5 levels were measured in the supernatants of lung biopsies (see Sect. 4) and eosinophil numbers into the BALF. In another group, mice were sacrificed after 72 h and the serum levels of OVA-specific IgE were determined by ELISA. Results represent the mean \pm SEM of five mice. * p < 0.02.

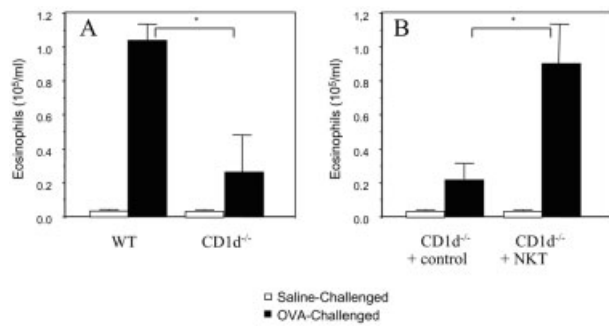


Fig. 6. Marked decrease in specific airway eosinophilia and IL-5 production in OVA-challenged CD1d^{-/-} NOD mice: restoration by adoptive transfer of NKT cells before challenge. Groups of WT and CD1d^{-/-} NOD mice were immunized with 1 μ g OVA and challenged i.n. with 10 μ g OVA or saline. Eosinophil numbers were measured 1 day after the challenge into the BALF. In one set of experiments (B), groups of OVA-immunized CD1d^{-/-} mice were adoptively transferred 24 h before challenge with enriched CD1d/ α -galactosylceramide-positive splenocytes from WT mice. As controls, CD1d^{-/-} mice were adoptively transferred 24 h before challenge with splenocytes from CD1d^{-/-} animals. Results are expressed as mean \pm SEM of five to seven mice. * p < 0.05 and ** p < 0.01.

2.5 Airway eosinophilic inflammation and IL-5 production are markedly reduced in NKT cell-deficient NOD mice

Others and we have recently documented that CD1d-restricted NKT cells are required for experimental allergic asthma in mice which are not susceptible to autoimmune diseases [24, 25]. Although NKT cells from NOD mice have been shown to be quantitatively and functionally deficient [26–28], we evaluated whether they are nevertheless critical for developing an exacerbated disease in NOD mice. As shown in Fig. 6A, OVA-immunized CD1d^{-/-} NOD mice, which are deficient in the CD1d-restricted NKT cell subset, exhibited impaired airway eosinophilia and decreased IL-5 in the lung (data not shown) as compared to their control littermates. However, IL-4 and IL-13 production in the lungs as well as OVA-specific IgE titers in the serum remained unaffected (data not shown). To confirm the implication of NKT cells in the severity of eosinophilic inflammation in NOD mice, we reconstituted OVA-sensitized CD1d^{-/-} NOD mice with splenic NKT cells 24 h before airway challenge with OVA. Adoptive transfer of syngenic CD1d-restricted NKT cells fully restored the capacity of CD1d^{-/-} NOD mice to develop airway eosinophilia, while spleen cells from CD1d^{-/-} mice did not (Fig. 6B).

2.6 OVA-sensitized and -challenged NOD mice develop bronchopulmonary hyperreactivity (BHR)

Several components of airway inflammation, such as eosinophil-derived mediators, Th2 cytokines like IL-13, IL-5, IL-4 and elevated serum IgE titers are associated with the development of BHR, although their specific mechanism of action remains controversial [18]. Since these elements are effectively enhanced in NOD mice, we addressed their capacity to express BHR. As shown in Fig. 7, immunization with 1 μ g OVA, promoted a significant BHR after methacholine inhalation, which was even stronger than in BALB/c mice receiving 10 μ g of OVA, *i.e.* the optimal dose in this strain. BHR required both immunization and challenge with OVA, since it did not occur in NOD mice immunized with alum alone and challenged with OVA (data not shown).

3 Discussion

Diabetes in NOD mice occurs through a Th1-mediated autoimmune process [4–8]. For this reason, this strain is generally considered “Th1-prone”. However, the ability of adult NOD mice to mount Th2-mediated diseases remains unexplored. This issue is important with regard to the Th1/Th2 paradigm, which predicts that Th1- and Th2-mediated diseases are mutually exclusive.

In the present study, we demonstrate that NOD mice can develop an exacerbated Th2-mediated pulmonary inflammatory response, which implies that adult NOD mice are not generally Th1-biased but conserve the capacity to mount strong Th2 responses to exogenous Ag. Indeed, after immunization and i.n. challenge with OVA, adult NOD mice expressed a typical Th2 phenotype both locally and systemically, including the induction of elevated IL-4, IL-5, IL-13 and eotaxin secretion by lungs, along with increased OVA-specific IgE levels in serum. Moreover, this clear-cut Th2 profile was concomitant with the appearance of several symptoms of airway inflammation in the lungs.

Overall, the Th2-mediated inflammatory response to OVA developed by NOD mice was more pronounced than in the BALB/c strain, which is known for its propensity to mount intense Th2 responses [29]. This finding led us to explore the role of CD4⁺ T cells which play a key role in OVA-induced asthma in BALB/c mice [30]. *In vivo* depletion of CD4⁺ T cells in NOD mice abolished tissue eosinophilia, lung-derived Th2 cytokine production and increased OVA-specific serum IgE. Thus the general notion that CD4⁺ T cells are obligatory for the development and expression of the disease applies to NOD

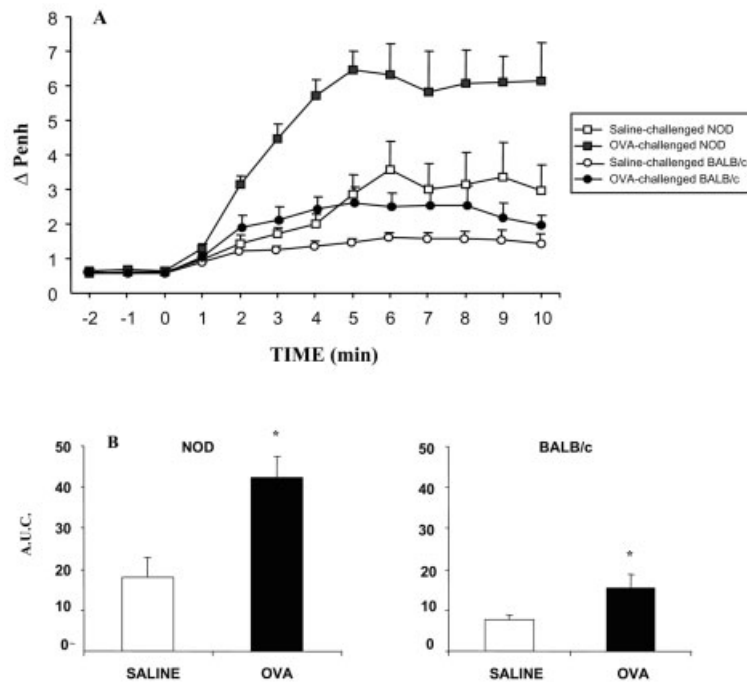


Fig. 7. Antigen-induced bronchopulmonary hyperreactivity in NOD and BALB/c mice. NOD and BALB/c mice were immunized with 1 μ g and 10 μ g OVA, respectively. One day after saline or OVA challenge, BHR was evaluated using the barometric plethysmographic method. The graphics correspond to the Penh (A) and the area under the curve (A.U.C.) (B), calculated for 10 min, and express the intensity of BHR (see Sect. 4). Each value represents the mean \pm SEM of 6–18 mice. Significant differences were observed between saline and OVA-sensitized and challenged mice, and between NOD and BALB/c mice, as indicated. * $p < 0.005$.

mice. This is also true for BHR, another hallmark of allergic asthma engendered by augmented Th2 responses. Here again, the response was exacerbated and more pronounced than in BALB/c mice, which are currently used in studies on OVA-induced asthma [19]. Thus, NOD mice display a complete asthmatic phenotype with increased Th2 responses and more severe bronchial inflammation and hyperresponsiveness than BALB/c mice.

What are the immunological mechanisms accounting for the different intensities of the Th2 response in NOD and BALB/c mice? Several reports point to a role of IFN- γ -secreting Th1 cells in the modulation of Th2-mediated allergic inflammatory responses [18, 31, 32]. Since IFN- γ was not detected in lungs and BALF of either strain, it cannot account for the differences observed. In agreement with this finding, other authors have suggested that the immune regulation of asthma and allergic diseases is much more complex than a mere imbalance between Th1 and Th2 cells. In particular, Th2 cell-induced inflammation could not be diminished in an adoptive transfer model with antigen-specific Th1 cells, which did effectively reduce airway mucus production and eosinophilia, when they were given in excess [32, 33].

Among the other cellular components that may provide an explanation of our findings, T regulatory (Tr) cells deserve particular attention. Thus, recent studies demonstrate that allergen-specific Tr cells are critically involved in down-regulating Th2 effectors and inflammation in asthma [34–37]. Yet, it remains to be examined whether in a model of immune dysregulation like that of NOD mice, allergen-specific Tr cells are defective. NKT cells, another subset of Tr lymphocytes regulate immune responses in several models of autoimmunity in the NOD strain, including EAE and type 1 diabetes [28, 38, 39]. They have recently been shown to be required in allergen-induced Th2 airway inflammation in mice, which are not susceptible to autoimmune diseases [24, 25]. We report here that this notion applies to NOD mice, as far as airway eosinophilia and IL-5 production in lungs are concerned. These hallmarks of allergic asthma are significantly reduced in NKT-deficient NOD mice, dropping approximately to the same levels as in BALB/c mice. Yet, contrasting with non-autoimmune mouse strains [25, 26], production of the Th2-type cytokine IL-4 and specific Th2-mediated IgE levels were not affected in NKT cell-deficient NOD mice, as compared with their control littermates. In this regard, it should be underlined that the

IL-4 production by NKT from NOD mice is partially deficient [26–28] and needs to be activated by the specific NKT cell ligand alpha-galactosylceramide to efficiently counteract the development of the Th1-mediated autoimmune disease type 1 diabetes [28, 39]. Therefore, it would be important to further elucidate the origin of the particular efficiency of NKT cells to promote eosinophilia and IL-5 production in the NOD genetic background. Altogether, these findings lead us to conclude that the difference between the intensities of Th2 responses in NOD and BALB/c mice could in part be explained by NKT cells.

More generally, the NOD strain can be proposed as a new experimental model to address the question of the common immunological factors that influence susceptibility to type 1 diabetes and asthma. This approach might provide new insights for the clinical situation since emerging evidence suggests that the current increase of Th2-mediated allergies in developed countries correlates with that of Th1-mediated autoimmune diseases [40]. To this end, the large panel of congenic NOD strains that have been developed to map the genetic regions controlling this affection [41] might also be useful for the identification of new genes controlling asthma. Since NOD mice were also suitable for allergen (OVA)-dependent allergic asthma in terms of BHR they also allow the dissection of the complex interactions between immunological and non-immunological mechanisms controlling asthma.

4 Materials and methods

4.1 Mice

NOD wild-type (WT) and CD1d^{-/-} mice (backcrossed for at least six generations into the NOD background) [39], and BALB/c mice were bred and maintained in our animal facility under specific pathogen-free conditions. For experiments, 7–8-week-old males were used.

4.2 Immunization, booster and challenge protocols

Mice were immunized (day 0) and boosted (day 7) by subcutaneous injections of 1 or 10 µg OVA (ICN Biomedicals, Inc, OH) adsorbed to 1.6 mg alum (Merck, Darmstadt, Germany) adjuvant in 0.4 ml saline. Seven days after the second immunization, mice received an intra-nasal (i.n.) challenge with 10 µg OVA or saline under ketamine anesthesia (Imalgene 1000, 35 mg/kg body mass, Merial, Lyon, France).

4.3 Measurement of bronchopulmonary hyperreactivity

Bronchopulmonary hyperreactivity (BHR) was assessed 24 h after the i.n. challenge by delivering an aerosol of methacholine for 20 s at 100 mM (Sigma Aldrich, Stenheim,

Germany) to unrestrained, conscious mice placed in a plethysmographic chamber (EMKA technologies, Paris, France). The index of airflow obstruction was expressed as enhanced pause (Penh), calculated as: $Penh = [Te \text{ (expiratory time)} - Tr \text{ (relaxation time)}] / Tr \times [Pef \text{ (peak expiratory flow)} / Pif \text{ (peak inspiratory flow)}]$. The values of Penh were expressed per minute and are the average of three determinations recorded every 20 s. In order to simplify the interpretations, the area under the curve (A.U.C.) was calculated for 10 min after methacholine inhalation. The resulting A.U.C. values are indicated in graphs and represent the quantitative expression of BHR.

4.4 Serum and bronchoalveolar lavage fluids

Immediately after evaluating BHR, mice were anesthetized by the intraperitoneal injection of urethane (ethylcarbamate, 2 g/kg body mass, Sigma Aldrich, Stenheim, Germany) and bled for serum antibody and cytokine determinations by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The abdominal cavity was opened, the trachea was cannulated and lungs were lavaged with 2 ml of sterile PBS solution. Total and differential cell counts were determined in the bronchoalveolar-lavage fluid (BALF). BALF were centrifuged and supernatants were removed and stored at –20°C until cytokine measurement.

4.5 Measurement of OVA-specific IgE in the serum

OVA-specific IgE were determined by sandwich ELISA. Microplates were coated with appropriate anti-isotype capture mAb, purified from cell culture supernatants and incubated overnight at 4°C. After washing, the plates were blocked with PBS containing 1% of BSA (fraction V, Euro-medex, Mundolsheim, France) for 2 h at room temperature (RT). Samples were then added and incubated overnight at 4°C. The plates were washed and 10 µg/ml of biotinylated OVA was added for 2 h at RT. After washing, the ExtrAvidin peroxidase conjugate was added for 45 min at RT. The OVA-biotin and ExtrAvidin conjugate was revealed by tetramethylbenzidine substrate (Kirkegaard Perry Laboratories, Maryland). Data were expressed as IgE index calculated as follows: $IgE \text{ index} = [OD \text{ sample} - OD \text{ buffer only}] / [OD \text{ positive control} - OD \text{ buffer only}]$.

4.6 Determination of lung histology

Immediately after BALF collection, the lungs were perfused to eliminate residual blood, removed and fixed in paraformaldehyde. Paraffin-embedded tissues were sliced and 3–µm sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) for optic microscopy examination or with periodic acid-Schiff (PAS) for determination of mucus-producing cells.

4.7 Lung homogenates

Lungs were removed and homogenized in PBS. Lung homogenates were centrifuged for 15 min at 1600×g at 4°C.

Supernatants were removed and stored at -20°C until cytokine measurement.

4.8 Lung explants

On the day following i.n. challenge, lungs were perfused through the pulmonary artery with saline to remove residual blood. They were chopped into 16 small pieces, four of which were used per well. Lung biopsies were incubated for 24 h at 37°C in 5% CO_2 atmosphere in AIM V medium (Life Technologies, Grant Island, NY) supplemented with 1% L-glutamine (Life Technologies) and gentamicin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma). The supernatants were harvested and stored at -20°C until cytokine assay. Results are expressed in pg/ml of cytokine produced per mg of lung tissue (dry weight), which was determined after removal of medium.

4.9 Cytokine and eotaxin levels in the BALF, lung homogenates and lung biopsies

IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ and IL-12 levels in the BALF, lung homogenates and lung biopsies were measured by ELISA with appropriate capture mAb and with biotinylated detection mAb according to the manufacturer's protocol (PharMingen, San Diego, CA). Conjugation of streptavidin-peroxidase (Amersham-Pharmacia, Les Ulis, France) was revealed using peroxidase substrate (Sigma). The cytokine concentrations were expressed as pg/ml based on a regression curve established for each assay with recombinant murine cytokines (PharMingen). The sensitivity of assays was ~ 10 pg/ml .

4.10 Anti-CD4 mAb treatment

Three days after OVA-immunization (day 7), NOD mice were treated i.p. with 0.5 mg/mouse anti-CD4 mAb (clone GK 1.5) for three consecutive days. After the last treatment, the mice were challenged i.n. with 10 μg OVA (day 14).

4.11 Adoptive transfer

Spleen cells from WT or CD1d $^{-/-}$ NOD mice were depleted of CD8 $^{+}$ T cells, CD62L $^{+}$, and CD19 $^{+}$ B cells labeled with the corresponding mAb with anti-rat-coated magnetic beads (DynaL, Compiègne, France). Among the mAb used for cell depletion CD8 (clone 53.67) and CD62L (clone Mel14) were purified in our laboratory while the CD19 (1D3) was purchased from PharMingen. The enriched negative selected NKT spleen cell population (containing 1×10^5 invariant V α 14 NKT cells as assessed by CD1d/ α -galactosylceramide tetramer staining) [25], as well as negative controls (equivalent numbers of similarly depleted spleen cells from CD1d $^{-/-}$ mice) were injected i.v. into CD1d $^{-/-}$ mice that had been immunized twice with OVA.

4.12 Statistical analysis

Results are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Mann-Whitney non-parametric or Student's *t*-test were used for analysis of significance among the groups.

Acknowledgements: We thank Dr. L. Van Kaer and Dr. M. Kronenberg for providing the CD1d $^{-/-}$ NOD mice [39] and the CD1d-tetramer, respectively. We acknowledge Dr. Elke Schneider for critically reviewing the manuscript. We thank Diane Damotte for pathological analysis of lung sections. We thank also Olivier Babin for histology technical support and Isabelle Renault for managing the specific pathogen-free mouse colonies. This work was supported by Institute funds from the Association pour la Recherche sur le cancer (no. 5889). L.M.A. and R.Z. were supported by personal grants from the INSERM and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Brazil), and from the Association pour la Recherche sur le Cancer, respectively.

References

- Makino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K. and Tochino, Y., Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* 1980. **29**: 1–13.
- Bach, J. F., Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr. Rev.* 1994. **15**: 516–542.
- Bach, J. F. and Chatenoud, L., Tolerance to islet autoantigens in type 1 diabetes. *Annu. Rev. Immunol.* 2001. **19**: 131–161.
- Delovitch, T. L. and Singh, B., The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity* 1997. **7**: 727–738.
- Katz, J. D., Benoist, C. and Mathis, D., T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science* 1995. **268**: 1185–1188.
- Liblau, R. S., Singer, S. M. and McDevitt, H. O., Th1 and Th2 CD4 $^{+}$ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol. Today* 1995. **16**: 34–38.
- Haskins, K. and McDuffie, M., Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4 $^{+}$ islet-specific T cell clone. *Science* 1990. **249**: 1433–1436.
- Healey, D., Ozegbe, P., Arden, S., Chandler, P., Hutton, J. and Cooke, A., In vivo activity and in vitro specificity of CD4 $^{+}$ Th1 and Th2 cells derived from the spleens of diabetic NOD mice. *J. Clin. Invest.* 1995. **95**: 2979–2985.
- Trembleau, S., Penna, G., Bosi, E., Mortara, A., Gately, M. K. and Adorini, L., Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. *J. Exp. Med.* 1995. **2**: 817–821.
- Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W. L., Sorensen, O., Bleackley, R. C. and Power, R. F., IFN- γ gene expression in pancreatic islet-infiltrating mononuclear cells correlates with autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 1995. **154**: 4874–4882.
- Fox, C. J. and Danska, J. S., IL-4 expression at the onset of islet inflammation predicts nondestructive insulinitis in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 1997. **158**: 2414–2424.
- Debray-Sachs, M., Carnaud, C., Boitard, C., Debray-Sachs, M., Carnaud, Boitard, C. C., Gresser, I., Cohen, H., Bedossa, P. and Bach, J. F., Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN gamma. *J. Autoimmun.* 1991. **4**: 237–248.

- 13 Trembleau, S., Penna, G., Gregori, S., Gately, M. K. and Adorini, L., Deviation of pancreas-infiltrating cells to Th2 by interleukin-12 antagonist administration inhibits autoimmune diabetes. *Eur. J. Immunol.* 1997. **27**: 2330–2339.
- 14 Rapoport, M. J., Jaramillo, A., Zipris, D., Lazarus, A. H., Serreze, D. V., Leiter, E. H., Cyopick, P., Danska, J. S. and Delovitch, T. L., Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Exp. Med.* 1993. **178**: 87–99.
- 15 Mueller, R., Krahl, T. and Sarvetnick, N., Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J. Exp. Med.* 1996. **184**: 1093–1099.
- 16 Tian, J., Olcott, P. A. and Kaufman, L. D., Antigen-based immunotherapy drives the precocious development of autoimmunity. *J. Immunol.* 2002. **169**: 6564–6569.
- 17 Tian, J., Lehmann, V. P. and Kaufman, L. D., Determinant spreading of T helper cell 2 (Th2) responses to pancreatic islet autoantigens. *J. Exp. Med.* 1997. **186**: 2039–2043.
- 18 Haile, S., Lefort, J., Joseph, D., Gounon, P., Huerre, M. and Vargaftig, B. B., Mucous-cell metaplasia and inflammatory-cell recruitment are dissociated in allergic mice after antibody- and drug-dependent cell depletion in a murine model of asthma. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 1999. **20**: 891–902.
- 19 Vargaftig, B. B., What can we learn from murine models of asthma? *Clin. Exp. Allergy* 1999. **29 Suppl 1**: 9–13.
- 20 Proust, B., Ruffie, C., Lefort, J. and Vargaftig, B. B., Bronchopulmonary hyperreactivity and lung eosinophil sequestration but not their migration to the alveolar compartment are independent of interleukin-5 in allergic mice. *Eur. Cytokine Netw.* 2002. **13**: 340–349.
- 21 Matsukura, S., Stellato, C., Georas, S. N., Casolaro, V., Plitt, J. R., Miura, K., Kurosawa, S., Schindler, U. and Schleimer, R. P., Interleukin-13 upregulates eotaxin expression in airway epithelial cells by a STAT6-dependent mechanism. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2001. **24**: 755–761.
- 22 Snapper, C. M., Finkelman, F. D. and Paul, W. E., Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. *J. Exp. Med.* 1988. **167**: 183–196.
- 23 Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T. Y., Karp, C. L. and Donaldson, D. D., Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998. **282**: 2258–2261.
- 24 Akbari, O., Stock, P., Meyer, E., Kronenberg, M., Sidobre, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Grusby, M. J., DeKruyff, R. H. and Umetsu, D. T., Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* 2003. **9**: 582–588.
- 25 Lisbonne, M., Diem, S., de Castro Keller, A., Lefort, J., Araujo, L. M., Hachem, P., Fourneau, J. M., Sidobre, S., Kronenberg, M., Taniguchi, M., et al. Cutting edge: invariant Valpha14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J. Immunol.* 2003. **171**: 1637–1641.
- 26 Gombert, J. M., Herbelin, A., Tancrede-Bohin, E., Dy, M., Carnaud, C. and Bach, J. F., Early quantitative and functional deficiency of NK1⁺-like thymocytes in the NOD mouse. *Eur. J. Immunol.* 1996. **26**: 2989–2998.
- 27 Baxter, A. G., Kinder, S. J., Hammond, K. J., Scollay, R. and Godfrey, D. I., Association between alphabetaTCR⁺CD4⁺CD8⁻ T cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes* 1997. **46**: 572–582.
- 28 Sharif, S., Arreaza, G. A., Zucker, P., Mi, Q. S., Sondhi, J., Naidenko, O. V., Kronenberg, M., Koezuka, Y., Delovitch, T. L., Gombert, T. L. et al., Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat. Med.* 2001. **7**: 1057–1062.
- 29 Scott, B., Liblau, R., Degermann, S., Marconi, L. A., Ogata, L., Caton, A. J., McDevitt, H. O. and Lo, D., A role for non-MHC genetic polymorphism in susceptibility to spontaneous autoimmunity. *Immunity* 1994. **1**: 73–83.
- 30 Hogan, S. P., Matthaei, K. I., Young, J. M., Koskinen, A., Young, I. G. and Foster, P. S., A novel T cell-regulated mechanism modulating allergen-induced airway hyperreactivity in BALB/c mice independently of IL-4 and IL-5. *J. Immunol.* 1998. **161**: 1501–1509.
- 31 Gavett, S. H., O'Hearn, D. J., Li, X., Huang, S. K., Finkelman, F. D. and Wills-Karp, M., Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *J. Exp. Med.* 1995. **182**: 1527–1536.
- 32 Huang, T. J., MacAry, P. A., Eynott, P., Moussavi, A., Daniel, K. C., Askenase, P. W., Kemeny, D. M. and Chung, K. F., Allergen-specific Th1 cells counteract efferent Th2 cell-dependent bronchial hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation partly via IFN-gamma. *J. Immunol.* 2001. **166**: 207–217.
- 33 Randolph, D. A., Stephens, R., Carruthers, C. J. and Chaplin, D. D., Cooperation between Th1 and Th2 cells in a murine model of eosinophilic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 1999. **104**: 1021–1029.
- 34 Akbari, O., Freeman, G. J., Meyer, E. H., Greenfield, E. A., Chang, T. T., Sharpe, A. H., Berry, G., DeKruyff, R. H., Umetsu, D. T., et al., Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* 2002. **8**: 1024–1032.
- 35 Yssel, H., Lécart, S. and Pène, J., Regulatory T cells and allergic asthma. *Microbes Infect.* 2001. **3**: 899–904.
- 36 Umetsu, D. T., McIntire, J. J., Akbari, O., Macaubas, C. and DeKruyff, R. H., Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat. Immunol.* 2002. **3**: 713–720.
- 37 Zuany-Amorim, C., Sawicka, E., Manlius, C., Le Moine, A., Brunet, L. R., Kemeny, D. M., Bowen, G., Rook, G. and Walker, C., Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae*-induced allergen-specific regulatory T cells. *Nat. Med.* 2002. **8**: 625–629.
- 38 Mars, L. T., Laloux, V., Goude, K., Desbois, S., Saoudi, A., Van Kaer, L., Lassmann, H., Herbelin, A., Lehuen, A. and Liblau, R. S., Cutting edge: V alpha 14-J alpha 281 NKT cells naturally regulate experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 2002. **168**: 6007–6011.
- 39 Hong, S., Wilson, M. T., Serizawa, I., Wu, L., Singh, N., Naidenko, O. V., Miura, T., Haba, T., Scherer, D. C., Wei, J., et al., The natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat. Med.* 2001. **7**: 1052–1056.
- 40 Stene, L. C. and Nafstad, P., Relation between occurrence of type 1 diabetes and asthma. *Lancet* 2001. **357**: 607–608.
- 41 Serreze, D. V. and Leiter, E. H., Genes and cellular requirements for autoimmune diabetes susceptibility in nonobese diabetic mice. *Curr. Dir. Autoimmun.* 2001. **4**: 31–67.

Correspondence: André Herbelin, CNRS FRE 2444, Paris V, Hôpital Necker, F-75015, Paris, France
 Fax: +33-1-4449-0676
 e-mail: herbelin@necker.fr

B. B. Vargaftig's present address: Department of Pharmacology, Instituto de Ciencias Biomedicas, University of S. Paulo, S. Paulo, Brazil

Manuscrit annexe n°2

Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol selectively promotes IFN- γ production by invariant Natural Killer T cells

Gourdy P, L. Araujo L, Zhu R, Garmy-Susini B, Diem S, Laurell H, Leite-de-Moraes M, Dy M, Arnal JF, Bayard F, Herbelin A. *Blood*, 2005, 105:2415-2420

Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN- γ production by invariant natural killer T cells

Pierre Gourdy, Luiza M. Araujo, Ren Zhu, Barbara Garmy-Susini, Séverine Diem, Henrik Laurell, Maria Leite-de-Moraes, Michel Dy, Jean François Arnal, Francis Bayard, and André Herbelin

Mechanisms accounting for gender dimorphism during immune responses are still poorly understood. Since invariant natural killer T (iNKT) cells exert important regulatory functions through their capacity to produce both T helper 1 (Th1) and Th2 cytokines, we addressed the question of whether these activities could be modulated by sexual hormones. We found that in vivo challenge with the specific ligand of iNKT cells, α -galactosylceramide (α -GalCer), induced significantly higher concentrations of interferon γ

(IFN- γ) in the serum of female than in that of male mice, while interleukin 4 (IL-4) production was not modified. In support of a crucial role of ovarian hormones in this phenomenon, a significant decrease of serum IFN- γ concentrations occurred in ovariectomized females, in response to treatment with α -GalCer, while orchidectomy affected neither IFN- γ nor IL-4 serum concentrations in males. The implication of estrogens in this selective enhancement of IFN- γ production by iNKT cells was demonstrated by (1) the in-

creased α -GalCer-induced IFN- γ synthesis by iNKT cells upon both in vitro and in vivo exposure to estradiol and (2) the abolition of the sex-linked difference in α -GalCer-induced IFN- γ release in estrogen receptor α -deficient mice. These results provide the first evidence that estrogens influence iNKT cells leading to this gender dimorphism in their cytokine production profile. (Blood. 2005;105:2415-2420)

© 2005 by The American Society of Hematology

Introduction

Both genetic and hormonal factors are thought to participate in sexual dimorphism affecting the incidence and the severity of various infectious and autoimmune diseases.^{1,2} Since the influence of gender on immune responsiveness usually becomes apparent after sexual maturity, a crucial role in this process has been attributed to sex steroid hormones, such as estrogens and androgens.^{3,4} Compared with males, female mice display increased T-cell proliferative responses⁵ and higher interferon γ (IFN- γ) production.^{6,7} Because estradiol (E2) has the ability to promote IFN- γ production by effector CD4⁺ T cells after in vivo antigenic challenge⁸ and upon in vitro activation,^{9,10} its implication as a modulator of the immune response seems plausible. However, it is still unknown whether the effect of estrogens on cytokine production is restricted to conventional effector T cells or may also concern immunoregulatory T cells such as invariant natural killer T (iNKT) cells.

iNKT cells constitute a population of T cells, which share some characteristics of NK cells. In this respect, iNKT cells occupy a strategic position halfway between adaptive and innate immunity.¹¹ In mice, this subset includes CD4⁺ and CD4⁻CD8⁻ T cells, characterized by the usage of an invariant V α 14-J α 18 T-cell receptor (TCR)- α -chain.¹² The TCR/CD3 complex allows iNKT cells to sense their antigenic environment with a predilection for lipids and glycolipid ligands presented by the nonpolymorphic

major histocompatibility complex (MHC) class I-like molecule CD1d.¹³⁻¹⁵ Although natural ligand(s) of iNKT cells remain unknown, α -galactosylceramide (α -GalCer), a synthetic glycolipid that binds to CD1d, strongly stimulates iNKT cell functions: namely, cytokine production.

The hypothesis that iNKT cells are targeted and functionally affected by estrogens is relevant. Indeed, it is generally acknowledged that the various regulatory functions they can accomplish during the effector phase of the immune responses proceed from their unique capacity to promptly release large amounts of IFN- γ and interleukin 4 (IL-4) upon TCR engagement.^{12,16} It is also clear that iNKT cells participate in situations for which sex dimorphism is well documented: namely, autoimmune conditions.^{12,16,17} Furthermore, the influence of estrogens on the incidence and the course of autoimmune diseases has been clearly established in mouse models of systemic lupus erythematosus,¹⁸ multiple sclerosis, and autoimmune encephalomyelitis (EAE).¹⁹

Starting from our observation that female mice injected with the specific iNKT cell ligand α -GalCer generated higher serum IFN- γ concentrations than males, we investigated whether this sex difference in iNKT cell function could be ascribed to estrogens. To this end, we examined the respective effect of ovariectomy, continuous administration of E2, and deficiency in estrogen receptor α on the IFN- γ /IL-4 cytokine production profile of iNKT

From the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U589, Institut L. Bugnard, Centre Hospitalier et Universitaire (CHU) Rangueil, Toulouse, France, and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Unité Mixte de Recherche (UMR) 8147 and Paris V, Hôpital Necker, Paris, France.

Submitted July 27, 2004; accepted September 10, 2004. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, September 21, 2004; DOI 10.1182/blood-2004-07-2819.

Supported by INSERM, the Ministère de la Recherche et de la Technologie (ACI 2001 and 2003), the Fondation de France, and the European Vascular

Genomics Network no 503254; by a grant from INSERM (Poste d'accueil 2001-2003) (P.G.); by personal grants from INSERM (Poste vert 2001-2003) (L.A.) and from the Association pour la Recherche sur le Cancer (R.Z.).

Reprints: André Herbelin, CNRS UMR 8147, Hôpital Necker, 161 rue de Sèvres, 75743 Paris cedex 15, France; e-mail: herbelin@necker.fr.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2005 by The American Society of Hematology

cells. From our results, it can be concluded that the gender dimorphism in IFN- γ production by iNKT cells is totally due to estrogens.

Materials and methods

Mice and surgical procedure

Male and female C57BL/6J mice were bred in our animal facilities under specific pathogen-free conditions. Estrogen receptor α -deficient (ER- $\alpha^{-/-}$) mice, which were kindly provided by P. Chambon's group (Strasbourg, France), were bred in our animal facilities and screened by polymerase chain reaction (PCR) genotyping as previously described.²⁰ All procedures were performed in accordance with the recommendations of the European Accreditation of Laboratory Animal Care. In some experiments, male and female mice were either gonadectomized or sham-operated at 4 weeks of age. To study the specific effect of E2, ovariectomized female mice were given either placebo or E2 60-day time-release pellets (0.1 mg estradiol-17 β , releasing 80 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; Innovative Research of America, Sarasota, FL) implanted subcutaneously in the scapular region with a sterile trocar. They were killed at 8 to 9 weeks of age, after a 4- to 5-week placebo or E2 treatment period, and wet uterine weight was systematically recorded. Sera were prepared and immediately frozen until cytokine assays. Liver and spleen were carefully removed from exsanguinated mice for mononuclear cell preparation.

In vivo challenge with α -GalCer and IL-12/IL-18

α -GalCer was synthesized by the Pharmaceutical Research Laboratory of Kirin Brewery (Gunma, Japan) as described previously.²¹ Mice received a single injection of either α -GalCer (1 μg intravenously + 1 μg intraperitoneally) or mrIL-12 (0.2 μg intravenously; R&D Systems, Abingdon, United Kingdom) plus mrIL-18 (1 μg intravenously; R&D Systems) diluted in NaCl. They were killed 90 minutes later when serum, spleen cells, and liver mononuclear cells were recovered as previously described.^{16,22} In control mice that received an identical volume of vehicle solution alone, cytokines were not detectable (< 20 pg/mL).

Cell preparation

Spleen cell suspensions were prepared using a homogenizer, and red blood cells (RBCs) were lysed in hemolysis buffer. Liver was perfused with phosphate-buffered saline (PBS), then pressed through a 70- μm cell strainer. Total liver cells were resuspended in a 40% isotonic Percoll solution (Amersham Biosciences Europe, Orsay, France) underlain with a 70% isotonic Percoll solution. After centrifugation for 20 minutes at 900g, mononuclear cells were isolated at the 40% to 70% interface before RBCs were lysed. For cytokine intracellular staining experiments, total splenocytes were enriched for CD4⁺ and CD4⁻CD8⁻ T cells.²³ For in vitro experiments, splenocytes were enriched for CD4⁺ T cells using anti-CD4-coated magnetic beads (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Germany).²² Purity of enriched-CD4⁺ cell fractions was 85% to 95% after reanalysis. For cell sorting, liver mononuclear cells were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti- $\alpha\beta$ -TCR, and allophycocyanin (APC)-CD1d/ α -GalCer-tetramer. Then, $\alpha\beta$ TCR⁺CD1d/ α -GalCer-tetramer⁺ cells (iNKT) were sorted using a fluorescence activated cell sorting (FACS) Vantage sorter (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Purity was more than 98% after reanalysis.

Antibodies and flow cytometry analysis

Fluorochrome or biotin-conjugated anti-NK1.1 (clone PK136), anti- $\alpha\beta$ -TCR (clone H57-597), anti-IFN- γ (clone XMG1.2), anti-IL-4 (clone 11B11), and corresponding isotype controls were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA), as well as Cy-chrome and APC-conjugated streptavidin. The Fc γ R blocking monoclonal antibody (mAb; 24G2.3 clone) was obtained from DNAX (Palo Alto, CA). Tetramers were prepared in our laboratory from the mCD1d/m β 2m expression vector constructed by

Kronenberg's group (Matsuda et al²⁴), then loaded or not with α -GalCer. Membrane labeling^{22,23} as well as intracellular cytokine staining¹⁶ was performed as previously described. The proportion of IL-4- or IFN- γ -positive cells in the $\alpha\beta$ -TCR⁺ NK1.1⁺ gate was less than 0.5% in mice injected with vehicle alone. Cells were analyzed on a FACScalibur cytometer using Cellquest software (Becton Dickinson). Dead cells were excluded by forward and side scatter characteristics. Statistics presented are based on at least 1500 events gated on the population of interest.

Cytokine assays by specific ELISA

IL-4 and IFN- γ in sera and supernatants were quantified using standard sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) as previously described.²² IL-4 and IFN- γ concentrations are expressed in nanogram per milliliter, as calculated from calibration curves from serial dilutions of mouse recombinant standards (R&D Systems) in each assay. The sensitivity of both IL-4 and IFN- γ assays was 20 pg/mL.

In vitro E2 treatment and α -GalCer-induced activation of CD4⁺ T cells

To obtain antigen-presenting cells (APCs), cells isolated from spleens of 6-week-old female mice were incubated for 2 hours at 37°C, 5% CO₂ with 200 ng/mL α -GalCer or with the vehicle only, resuspended in PBS at 2×10^6 /mL, then fixed with 0.001% glutaraldehyde (Sigma, St Louis, MO) at room temperature for 15 minutes. CD4⁺ splenocytes from 6- to 8-week-old female mice were washed and suspended in phenol-red-free RPMI 1640 supplemented with steroid-free serum (10%; Hyclone, Logan, UT). The cells (2×10^5 /well) were seeded into 96-well round-bottom cultured plates and incubated in the presence of mrIL-2 (50 U/mL; Genzyme, Cambridge, MA) for 60 hours. The cells were reincubated in phenol-red-free RPMI 1640 supplemented with 10% steroid-free serum in the presence or not of E2 (10^{-8} M, estradiol-17 β ; Sigma) for 20 hours. The cells were then harvested and incubated again at 2×10^5 per well with α -GalCer-pulsed or unloaded fixated APCs (5×10^5 cells/well) for an additional 60 hours period. The culture supernatants were collected for cytokine determination.

Reverse transcriptase (RT)-PCR analysis of estrogen receptor- α expression

Total RNA was extracted from $\alpha\beta$ -TCR⁺ CD1d/ α -GalCer-tetramer⁺ (iNKT) sorted cells ($2-4 \times 10^5$ cells) of C57BL/6 wild-type female mice. TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used according to the manufacturer's instructions. RNA from Total RNA was reverse-transcribed as previously described¹⁰ and submitted to PCR. The following gene-specific primers were used: ER- α sense (5'-ATAGCCCTGCCTTGTCTTAC-3') and antisense (5'-TCATGCGGAACCGACTTGA-3'), corresponding to sequences in exon 9 and 13, respectively; β -actin sense (5'-TCACGCCATCCTGCGTCTGGACCT-3') and antisense 5'-CCGGACTCATCGTACTCTGCTT-3'), corresponding to sequences in exon 4 and 6, respectively. Amplified products were separated by agarose gel electrophoresis.

Statistics

Data were expressed as means \pm SEMs. Mean differences between mice groups were evaluated using Student *t* test. To analyze the in vitro effect of E2, nonparametric paired comparisons were performed using the Mann and Whitney test. *P* less than .05 was considered statistically significant.

Results

Differential α -GalCer-induced IFN- γ production in male and female C57BL/6 mice

One of the original features of iNKT cells consists of their capacity to release large amounts of both T helper 1 (Th1) and Th2

cytokines, mainly IFN- γ and IL-4, following *in vivo* treatment with their cognate ligand α -GalCer.^{16,22} To assess the influence of gender on the production of these cytokines, iNKT cells were stimulated *in vivo* by their specific ligand α -GalCer in 4- and 8-week-old male and female C57BL/6 mice, which received a single injection of the antigen. They were killed 90 minutes later, when cytokine concentrations were determined in the serum. In recently weaned 4-week-old animals, IFN- γ and IL-4 concentrations were not influenced by gender (Figure 1A). By contrast, at 8 weeks of age, female mice produced significantly more IFN- γ (2.6-fold increase, $P < .001$) than males, while IL-4 production was similar in both genders (Figure 1A). The differences between sexes were even more pronounced at 16 weeks of age when IFN- γ production in females reached its maximum (4.6-fold increase, $P < .001$), while IL-4 remained unchanged (data not shown).

Since gender dimorphism in α -GalCer-induced IFN- γ production became apparent after sexual maturation, it was likely that sexual steroid hormones were involved in this process. To test this assumption, we gonadectomized or sham-operated 4-week-old male and female C57BL/6J mice and injected them 4 to 5 weeks later with α -GalCer. No significant differences were observed between sham-operated and orchidectomized males in terms of circulating IFN- γ and IL-4 (Figure 1B). By contrast, IFN- γ concentrations were substantially diminished after ovariectomy, which did not affect IL-4 production (Figure 1B). This differential effect of ovariectomy on IFN- γ rather than IL-4 secretion by iNKT cells was confirmed at the single cell level, by intracellular staining (Figure 2). Indeed, this treatment decreased both the percentage of IFN- γ -producing cells in the spleen ($62.6\% \pm 3.7\%$ for sham-operated versus $47.2\% \pm 5.1\%$ for ovariectomized mice; $P < .05$) and the amount produced per cell, as assessed by the lower mean fluorescence intensity (MFI). In contrast, ovariectomy changed neither the percentage of IL-4-producing iNKT cells nor the intensity of intracellular staining.

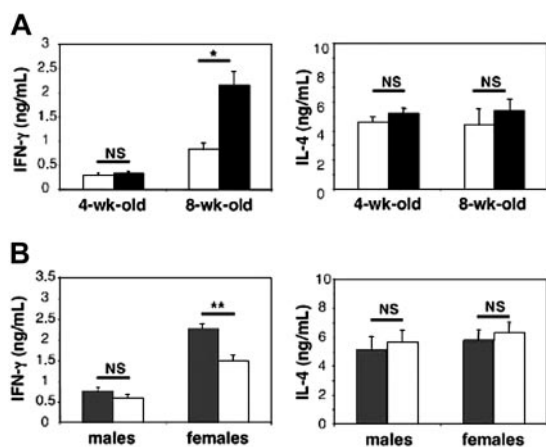


Figure 1. Sexual dimorphism in serum IFN- γ release following *in vivo* challenge with the iNKT cell ligand α -GalCer: contribution of ovarian hormones. Male and female mice received a single injection of α -GalCer and were killed 90 minutes later. Serum IFN- γ and IL-4 concentrations were determined by ELISA and expressed as means \pm SEMs (6-10 mice per group from 3 separate experiments). In control mice that received an identical volume of vehicle solution alone, both cytokines were not detectable (< 20 pg/mL). (A) IFN- γ but not IL-4 serum release is higher in female (■) than in male (□) adult mice; * $P < .001$. (B) Ovariectomy leads to decreased IFN- γ serum concentrations in females while orchidectomy is ineffective in males. Mice were gonadectomized (□) or sham-operated (■) at 4 weeks of age, then challenged with α -GalCer at 8 weeks of age; ** $P < .01$.

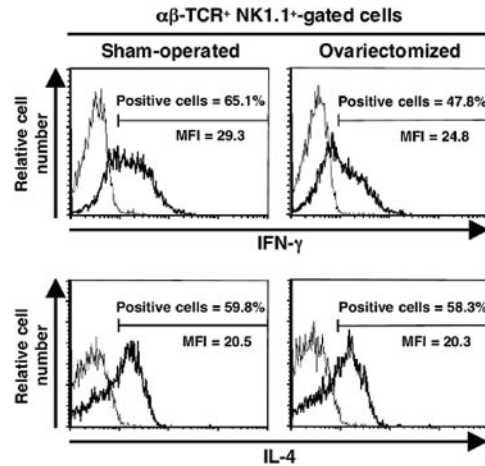


Figure 2. Ovariectomy leads to decreased IFN- γ production by iNKT cells. Female mice were ovariectomized or sham-operated at 4 weeks of age, then challenged with α -GalCer at 8 weeks of age, and killed 90 minutes later. Spleen cells were analyzed in the $\alpha\beta$ -TCR⁺ NK1.1⁺ cell gate for IFN- γ and IL-4 synthesis by intracytoplasmic staining (bold line). As controls, cells were stained with irrelevant isotype-matched anti-immunoglobulin G (IgG) mAb (thin line). Histograms are representative of 3 separate experiments, each carried out with 2 mice per group. The proportion of IL-4- or IFN- γ -positive cells in the $\alpha\beta$ -TCR⁺ NK1.1⁺ gate was less than 0.5% in mice injected with vehicle alone. MFI indicates mean fluorescence intensity.

Estradiol promotes α -GalCer-induced IFN- γ production by iNKT cells both *in vitro* and *in vivo*

Before examining the effect of E2 on cytokine production by stimulated iNKT cells *in vivo*, we wanted to make sure that this female hormone could influence the functional capacities of these cells *in vitro*. To avoid the contribution of endogenous or contaminating estrogens during culture, we used CD4⁺ spleen cells that had been incubated for 2 days in IL-2-containing phenol-red-free medium supplemented with steroid-free serum. These cells were cultured further for 20 hours with or without E2 before stimulation with α -GalCer-pulsed APCs for 60 hours. In this experimental setup, we found that E2 treatment significantly increased IFN- γ production by α -GalCer-activated cells (43%), while IL-4 concentrations remained unchanged (Figure 3A).

This result, together with the expression of estrogen receptor- α transcripts in purified iNKT cells (Figure 4), prompted us to further investigate the differential effect of E2 *in vivo*. To this end, 4-week-old ovariectomized female mice were administered during 4 to 5 weeks either with placebo or E2 at physiologic and constant doses.^{8,19} The efficacy of hormone administration was systematically verified by uterine weight measurement (< 20 mg in all placebo-treated mice versus 148 ± 11 mg in E2-treated mice). As shown in Figure 3B, this treatment resulted in a significant increase in serum IFN- γ concentrations following *in vivo* challenge with α -GalCer, whereas changes in serum IL-4 concentrations were not significant between placebo- and E2-treated mice. To verify whether iNKT cells were responsible for this differential effect, we analyzed IFN- γ and IL-4 production by iNKT cells on the single-cell level, using intracellular staining. As shown in Figure 3C, E2 administration augmented not only the percentage of IFN- γ -positive cells among iNKT spleen cells ($47.9\% \pm 4.4\%$ for placebo-treated versus $68.9\% \pm 3.3\%$ for E2-treated ovariectomized mice, $P < .05$) but also the amounts produced per cell, as assessed by the enhanced MFI of IFN- γ -producing iNKT cells. By contrast, the same treatment affected neither the percentage of IL-4-producing iNKT cells nor their MFI (Figure 3C). Since E2

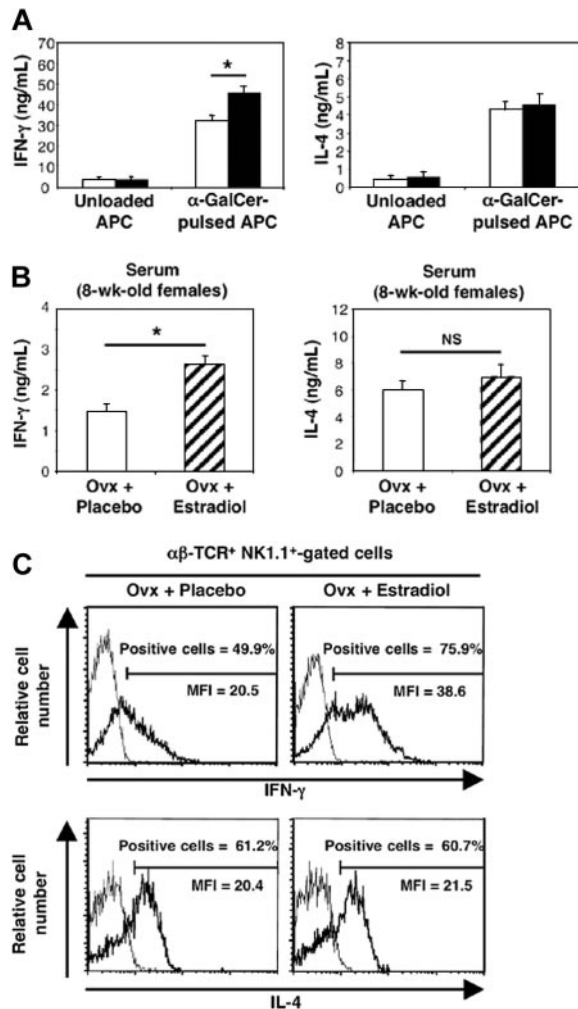


Figure 3. Both in vitro and in vivo estradiol exposure promotes α -GalCer-induced IFN- γ production by iNKT cells. (A) E2 treatment in vitro enhances IFN- γ but not IL-4 production by α -GalCer-activated iNKT cells. After a first set of culture with IL-2, CD4⁺ spleen cells were incubated in the presence (■) or not (□) of E2 (10^{-8} M) for 20 hours, then harvested, and incubated with unloaded or α -GalCer-pulsed fixed APCs for an additional 60-hour period. IFN- γ and IL-4 concentrations in culture supernatants were expressed as means \pm SEMs from 4 separate experiments. * P = .02, Mann and Whitney test. (B) E2 administration in vivo increases serum IFN- γ concentration induced by α -GalCer challenge. Placebo- (□) and E2-treated (▨) ovariectomized (Ovx) females received a single injection of α -GalCer (10 mice per group) or vehicle (5 mice per group) and were killed 90 minutes later. Serum IFN- γ and IL-4 concentrations were expressed as means \pm SEMs. * P = .002. (C) E2 administration in vivo selectively promotes IFN- γ production by iNKT cells. Spleen cells from placebo- or E2-treated mice challenged with α -GalCer were analyzed for IFN- γ and IL-4 synthesis in the $\alpha\beta$ -TCR⁺ NK1.1⁺ cell gate by intracytoplasmic staining (bold line). Staining with irrelevant isotype-matched anti-IgM mAb was used as control (thin line). Histograms are representative of 3 separate experiments, each carried out with 2 mice per group. The proportion of IL-4- or IFN- γ -positive cells in the $\alpha\beta$ -TCR⁺ NK1.1⁺ gate was less than 0.5% in mice injected with vehicle alone.

treatment diminished the number of spleen cells, mainly because of the loss of B cells (data not shown) and T conventional cells, namely, $\alpha\beta$ -TCR⁺ NK1.1⁻ lymphocytes (Figure 5A), we examined whether the number of iNKT cells was also affected by E2. We found no significant difference in the total number of iNKT lymphocytes, namely $\alpha\beta$ -TCR⁺ NK1.1⁺ (Figure 5B) or $\alpha\beta$ -TCR⁺ CD1d/ α -GalCer-tetramer⁺ cells (Figure 5C) per spleen between untreated, placebo-, and E2-treated ovariectomized mice. Thus, E2 specifically promotes the production of IFN- γ by iNKT cells following TCR engagement by enhancing their functional capacities rather than their number.

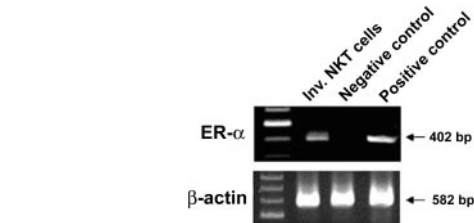


Figure 4. iNKT cells express estrogen receptor- α (ER- α) mRNA. Liver mononuclear cells were isolated from 8-week-old female mice, and $\alpha\beta$ -TCR⁺ CD1d/ α -GalCer-tetramer⁺ (iNKT cells) cells were sorted using a FACS Vantage sorter. Purity was more than 98% after reanalysis. Total cellular RNA was extracted and subjected to RT-PCR using specific primers for ER- α (40 cycles) and β -actin (30 cycles). RNAs from uterine extracts of C57BL/6 wild-type and ER- $\alpha^{-/-}$ mice were used as positive and negative controls, respectively. bp indicates base pair.

Estradiol enhances IFN- γ production by iNKT cells following IL-12 plus IL-18 in vivo challenge

iNKT cells are known to participate not only in acquired but also in innate immune responses, since these cells can be fully activated and produce large amounts of IFN- γ in the absence of TCR engagement, after exposure to the proinflammatory cytokine IL-12 together with IL-18.¹⁶ To determine whether E2 influences this TCR-independent function of iNKT cells, sham-operated and ovariectomized female mice treated or not with E2 received a single intravenous injection of IL-12 plus IL-18 and were killed 90 minutes later. Serum IFN- γ concentrations were significantly decreased in ovariectomized mice in comparison with their sham-operated controls (Figure 6A). We then demonstrated that iNKT cells directly participate in this phenomenon even though NK cells and conventional T cells produce IFN- γ production under IL-12 plus IL-18 challenge. Indeed, intracellular staining clearly showed that both the percentage of IFN- γ -positive cells among liver iNKT cells and the level of IFN- γ production by IFN- γ -producing iNKT cells were lower in ovariectomized than in sham-operated females (Figure 6B). In addition, a normal IFN- γ production could be restored in ovariectomized mice having received the treatment with

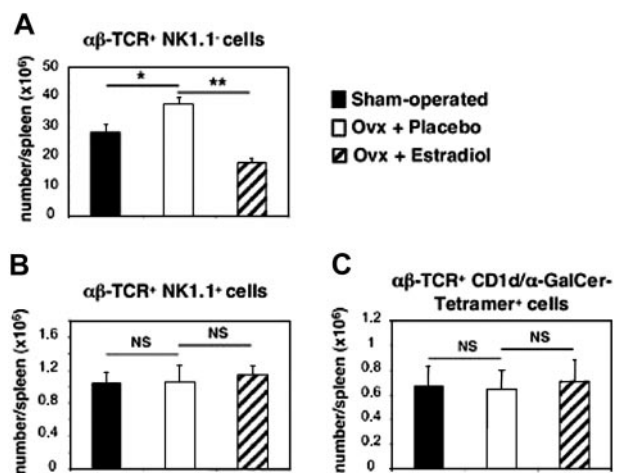


Figure 5. Spleen iNKT cell number is not affected by E2 treatment. Sham-operated (■) and either placebo- (□) or E2-treated (▨) ovariectomized (ovx) female mice were killed at 8 weeks of age. Splenocytes were labeled with fluorochrome-conjugated anti- $\alpha\beta$ -TCR and anti-NK1.1 Abs and with either CD1d/ α -GalCer-tetramer or CD1d/vehicle-tetramer, then analyzed by flow cytometry. Absolute number of conventional T ($\alpha\beta$ -TCR⁺ NK1.1⁻) lymphocytes (A) and iNKT cells—namely, $\alpha\beta$ -TCR⁺ NK1.1⁺ (B) and $\alpha\beta$ -TCR⁺ CD1d/ α -GalCer-tetramer positive cells (C)—are given as means \pm SEMs from 16 individual mice per group. In each group, control staining with CD1d/vehicle-tetramer was less than 0.05%. * P < .05; ** P < .01. NS indicates not significant.

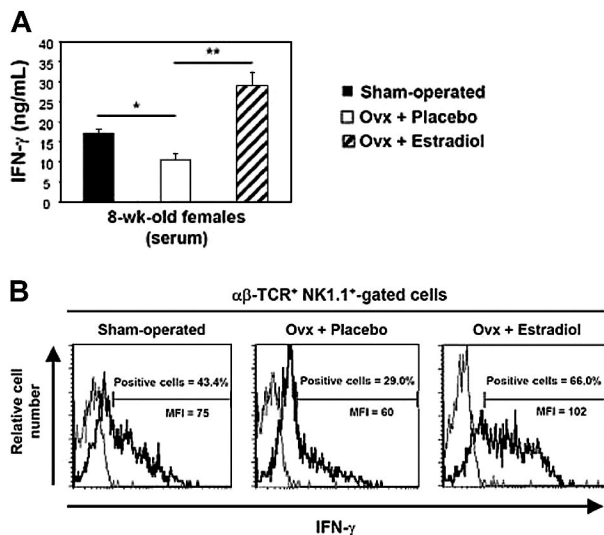


Figure 6. Estradiol promotes IFN- γ production by iNKT cells following in vivo IL-12/IL-18 challenge. Sham-operated (■) and either placebo- (□) or E2-treated (▨) ovariectomized (Ovx) female mice received or not a single intravenous injection of IL-12 plus IL-18 and were killed 90 minutes later. Two separate experiments each including 3 mice per group are considered. (A) Serum IFN- γ concentrations are expressed as means \pm SEMs. * P < .01; ** P < .005. (B) Total liver mononuclear cells were analyzed in the $\alpha\beta$ -TCR⁺ NK1.1⁺ cell gate for IFN- γ synthesis by intracytoplasmic staining (bold line). As controls, cells were stained with irrelevant isotype-matched anti-IgG mAb (thin line). Mean percentages of IFN- γ -positive cells among iNKT cells: 45.6 \pm 2.7 for sham-operated mice, 27.0 \pm 2.0 for placebo-treated Ovx mice (P < .05 versus sham-operated mice), and 64.6 \pm 4.0 for E2-treated Ovx mice (P < .01 versus placebo-treated mice). The proportion of IFN- γ -positive cells in the $\alpha\beta$ -TCR⁺ NK1.1⁺ gate was less than 0.5% in mice injected with vehicle alone.

E2, both in terms of circulating IFN- γ (Figure 6A) and intracytoplasmic staining (Figure 6B). From our study, it can, therefore, be concluded that E2 promotes IFN- γ synthesis by iNKT cells in response to both proinflammatory cytokine stimulation and TCR engagement.

Sexual dimorphism in α -GalCer-induced IFN- γ release is abolished in estrogen receptor α -deficient mice

Finally, we determined to which extent endogenous estrogens could explain the sexual dimorphism in IFN- γ production by iNKT cells. To this end, 10-week-old estrogen receptor α -deficient (ER α ^{-/-}) and wild-type littermate (ER α ^{+/+}) male and female mice were challenged with α -GalCer, and serum cytokine release was measured 90 minutes later as described in "Differential α -GalCer-induced IFN- γ production in male and female C57BL/6 mice." As shown in Figure 7, the sexual dimorphism in α -GalCer-induced serum IFN- γ concentrations, which was confirmed in ER α ^{+/+} mice, was totally abolished in ER α ^{-/-} mice. In ER α ^{-/-} mice as well as in littermate ER α ^{+/+} mice, changes in IL-4 concentrations were not significantly different between males and females (Figure 7). These observations definitely demonstrate that the sexual dimorphism in IFN- γ production by iNKT cells can be attributed to endogenous estrogens.

Discussion

It is generally acknowledged that the regulatory functions of iNKT cells are explained by their apparent self-reactivity and their capacity to rapidly secrete large amounts of both Th1 and Th2 cytokines, including IFN- γ and IL-4. However, how these contrast-

ing functional activities are controlled remains poorly understood. Although genetic background,²⁵ cytokine environment,^{12,16} and costimulatory factors²⁶ have been recognized as important factors in this context, it is also quite obvious by now that mouse iNKT cells are not easily polarized toward the classic Th1 or Th2 phenotype.²⁷

By demonstrating that the female hormone E2 promotes IFN- γ production by iNKT cells, we show that the range of molecules influencing iNKT cell functions can be extended to hormonal factors. Several lines of evidence support this conclusion. First, E2 administration to ovariectomized female mice resulted in a striking increase in serum IFN- γ concentrations following in vivo treatment with the cognate α -GalCer ligand for iNKT cells. Second, this effect of E2 in vivo occurred likewise after exposure to the proinflammatory cytokines IL-12 plus IL-18, known for their particular efficiency in activating IFN- γ production by iNKT cells. Third, the frequency of IFN- γ -producing iNKT cells from mice challenged either with α -GalCer ligand or with IL-12 plus IL-18 was selectively increased in E2-treated mice. Finally, the effect of E2 on IFN- γ production by α -GalCer-reactive iNKT cells was confirmed in vitro. These in vitro results, together with the expression of ER- α transcripts in purified iNKT cells support the possibility of a direct effect of E2.

From our data, it can also be assumed that E2 exerts its action on iNKT cells qualitatively by enhancing the synthesis of IFN- γ but has no influence on the absolute number of iNKT cells. Accordingly, on the basis of CD1d- α -GalCer-tetramer specificity, the absolute number of iNKT cells in spleen remained unmodified after E2 administration, in contrast to conventional T-cell populations. Moreover, no preferential proliferation was observed when iNKT cells were exposed to E2 in vitro (data not shown).

To the best of our knowledge, this is the first demonstration that a hormonal factor influences biologic activities of iNKT cells. Overall, our data support the notion that E2 exerts differential effects on Th1 and Th2 cytokine secretion by iNKT cells. Indeed, our in vitro and in vivo experiments are in perfect agreement to assert that E2 exposure enhances α -GalCer-induced IFN- γ production but not that of IL-4 by iNKT cells. This finding is in agreement with previous observations demonstrating that E2 markedly increases IFN- γ production by both mouse and human T cells to reinforce the concept that E2 may favor Th1 responses.^{8,9,28} Since in vitro studies of human T cells have suggested that E2 may increase IFN- γ secretion at low concentrations but enhance IL-10 production by the same cells at higher supraphysiologic concentrations (> 5000 pg/mL),²⁸ it is important to note that our experiments were all performed with physiologic doses of the hormone. The significant decrease in IFN- γ production by iNKT cells from ovariectomized mice challenged either with IL-12 plus IL-18 or

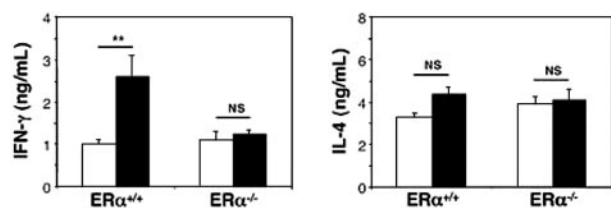


Figure 7. Sexual dimorphism in serum IFN- γ release following in vivo challenge with α -GalCer is abolished in ER- α -deficient mice. Ten-week-old male (□) and female (■) ER- α ^{-/-} mice received a single injection of α -GalCer and were killed 90 minutes later. Serum IFN- γ and IL-4 concentrations were determined by ELISA and expressed as means \pm SEMs (4-6 mice per group from 2 separate experiments). In control mice that received an identical volume of vehicle solution alone, both cytokines were not detectable (< 20 pg/mL). ** P < .01. NS indicates not significant.

with α -GalCer ligand, as compared with sham-operated controls, lends further support to a critical role of endogenous estrogens. Conversely, orchidectomy did not affect α -GalCer-induced cytokine production in males, supporting the notion that estrogens but not androgens promote sexual dimorphism in iNKT cell activity. Moreover, the sex-linked difference in α -GalCer-induced IFN- γ release was abolished in ER- $\alpha^{-/-}$ mice, providing further evidence for this crucial influence of endogenous estrogens on iNKT cell functions.

Further investigations are now needed to determine to what extent E2 contributes to sex-linked differences in immunity by targeting iNKT cells. Indeed, the regulatory effect of estrogens on iNKT cell functions may be of pathophysiologic interest since this lymphocyte subset is well recognized for its pivotal role during anti-infection and antitumor immune responses.^{12,16,17} It is tempting to speculate that the influence of E2 on such immune responses could be at least in part mediated through the enhancement of iNKT-derived IFN- γ . Consistent with this idea, we found that in vivo E2 administration indirectly enhances NK cell activation through its capacity to amplify IFN- γ production by α -GalCer-activated iNKT cells (data not shown). In addition, the present results may help to understand how gender or E2 administration influences the incidence and/or the course of autoimmune diseases, such as EAE,¹⁹ type 1 diabetes,^{4,19} or concanavalin A-induced hepatitis,²⁹ the development of which involves iNKT cells. Finally, regarding gestational immune surveillance, it should be mentioned

that human decidual CD4⁺ iNKT cells exhibit a striking Th1-like bias, characterized by IFN- γ production.³⁰ This latter observation, along with data obtained in mice showing that iNKT cells play a unique role in the defense against pathogens in the pregnant uterus in a mechanism, which involves IFN- γ ,³¹ support the hypothesis of a critical role of estrogens in this phenomenon.

In conclusion, our study provides the first evidence for the influence of a hormonal factor on a regulatory T-cell subset and contributes to elucidate how the contrasting activities of iNKT cells are differentially regulated. Because of the crucial role attributed to iNKT cells in immune regulation, it seems highly probable that estrogens participate in the sexual dimorphism associated with autoimmunity and infectious diseases, at least in part, by targeting iNKT cells and modulating their functions.

Acknowledgments

We are grateful to E. Schneider (CNRS UMR 8147, Paris, France) for critical review of the manuscript. We are also specially indebted to Pharmaceutical Research Laboratory; Kirin Brewery Co, Ltd (Gunma, Japan) for providing α -GalCer; and to M. Kronenberg, P. Van Endert, and J.M. Fournau for providing plasmid containing *CD1d* and *β 2m* genes and assisting in the preparation of CD1d/ α -GalCer-tetramer, respectively.

References

- Klein SL. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000;24:627-638.
- Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol*. 2001;2:777-780.
- Grossman CJ. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science*. 1985;227:257-261.
- Homo-Delarche F, Fitzpatrick F, Christeff N, Nunez EA, Bach JF, Dardenne M. Sex steroids, glucocorticoids, stress and autoimmunity. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1991;40:619-637.
- Weinstein Y, Ran S, Segal S. Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. *J Immunol*. 1984;132:656-661.
- Huygen K, Pailliet K. Strain variation in interferon gamma production of BCG-sensitized mice challenged with PPD II. Importance of one major autosomal locus and additional sexual influences. *Cell Immunol*. 1984;85:75-81.
- Cua DJ, Hinton DR, Stohlman SA. Self-antigen-induced Th2 responses in experimental allergic encephalomyelitis (EAE)-resistant mice. Th2-mediated suppression of autoimmune disease. *J Immunol*. 1995;155:4052-4059.
- Maret A, Coudert JD, Garidou L, et al. Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells. *Eur J Immunol*. 2003;33:512-521.
- Fox HS, Bond BL, Parslow TG. Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *J Immunol*. 1991;146:4362-4367.
- Bao M, Yang Y, Jun HS, Yoon JW. Molecular mechanisms for gender differences in susceptibility to T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 2002;168:5369-5375.
- Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:535-562.
- Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today*. 2000;21:573-583.
- Porcelli SA, Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:297-329.
- Bendelac A. CD1: presenting unusual antigens to unusual T lymphocytes. *Science*. 1995;269:185-186.
- Kawano T, Cui J, Koezuka Y, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of Valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science*. 1997;278:1626-1629.
- Lisbonne M, Leite-de-Moraes MC. Invariant Valpha14 NKT lymphocytes: a double-edged immuno-regulatory T cell population. *Eur Cytokine Netw*. 2003;14:4-14.
- Hammond KJ, Kronenberg M. Natural killer T cells: natural or unnatural regulators of autoimmunity? *Curr Opin Immunol*. 2003;15:683-689.
- Roubinian JR, Talal N, Greenspan JS, Goodman JR, Siiteri PK. Effect of castration and sex hormone treatment on survival, anti-nucleic acid antibodies, and glomerulonephritis in NZB/NZW F1 mice. *J Exp Med*. 1978;147:1568-1583.
- Bebo BF Jr, Fyfe-Johnson A, Adlard K, Beam AG, Vandenbark AA, Offner H. Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains. *J Immunol*. 2001;166:2080-2089.
- Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development*. 2000;127:4277-4291.
- Morita M, Motoki K, Akimoto K, et al. Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice. *J Med Chem*. 1995;38:2176-2187.
- Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, et al. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat Med*. 2001;7:1057-1062.
- Leite-de-Moraes MC, Herbelin A, Gouarin C, Koezuka Y, Schneider E, Dy M. Fas/Fas ligand interactions promote activation-induced cell death of NK T lymphocytes. *J Immunol*. 2000;165:4367-4371.
- Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, et al. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med*. 2000;192:741-754.
- Hansen DS, Siomos MA, Buckingham L, Scalzo AA, Schofield L. Regulation of murine cerebral malaria pathogenesis by CD1d-restricted NKT cells and the natural killer complex. *Immunity*. 2003;18:391-402.
- Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Van Kaer L, Saiki I, Okumura K. Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways. *J Immunol*. 2001;166:6012-6018.
- Matsuda JL, Gapin L, Baron JL, et al. Mouse V alpha 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:8395-8400.
- Gilmore W, Weiner LP, Correale J. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J Immunol*. 1997;158:446-451.
- Takamoto S, Nakamura K, Yoneda M, Makino I. Gender-related differences in concanavalin A-induced liver injury and cytokine production in mice. *Hepatology*. 2003;27:221-229.
- Boyson JE, Rybalov B, Koopman LA, et al. CD1d and invariant NKT cells at the human maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:13741-13746.
- Ito K, Karasawa M, Kawano T, et al. Involvement of decidual Valpha14 NKT cells in abortion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:740-744.

Manuscrit annexe n°3

Activation of invariant Natural Killer T cells protects against experimental rheumatoid arthritis by an interleukin-10-dependent pathway.

Miellot A, Zhu R, Diem S, Boissier MC, Herbelin A, Bessis N. *Eur. J. Immunol.*, 2005, 35:3704-3713

Activation of invariant NK T cells protects against experimental rheumatoid arthritis by an IL-10-dependent pathway

Aurore Miellot¹, Ren Zhu², Séverine Diem², Marie-Christophe Boissier¹, André Herbelin² and Natacha Bessis¹

¹ UPRES EA-3408 and Rheumatology Department, University Paris 13 and CHU Avicenne (AP-HP), Bobigny, France

² CNRS UMR 8147 and University Paris V, Necker Hospital, Paris, France

Invariant natural killer T (iNKT) cells are a unique lymphocyte subtype implicated in the regulation of autoimmunity and a good source of protective Th2 cytokines. Agonist α -galactosylceramide (α -GalCer) of iNKT cells exert a therapeutic effect in type 1 diabetes. We investigated whether iNKT activation with α -GalCer was protective in collagen-induced arthritis (CIA) in DBA/1 mice, a standard model of rheumatoid arthritis. Here, we have shown that *in vivo* iNKT cell function was altered in DBA/1 mice since stimulation with α -GalCer led to decreased IL-4 and IFN- γ levels in sera, as compared with C57BL/6 mice. α -GalCer induced a clear-cut diminution of clinical and histological arthritides. An anti-IL-10 receptor antibody abrogated the protective effect of α -GalCer, suggesting a key role for IL-10 in the protection against CIA by activated iNKT cells. Confirming these data, disease protection conferred by α -GalCer correlated with the ability of LN CD4⁺ cells to secrete larger amounts of IL-10. These findings suggest that in CIA susceptibility to autoimmunity is associated with dysfunctions of iNKT cells. Our demonstration that iNKT cell activation by α -GalCer remains efficient in CIA-prone DBA/1 mice to provide protective IL-10 suggests that this could be used therapeutically to treat autoimmune arthritis.

Received 7/7/05

Revised 22/8/05

Accepted 17/10/05

[DOI 10.1002/eji.200535235]

Key words:

IL-10 · iNKT cells

· Rheumatoid arthritis

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune chronic systemic inflammatory disease that primarily affects the synovial membranes of multiple joints [1]. A cardinal feature of joint inflammation in RA is proliferative inflammation of synovial cells, i.e., synovitis, which results in the destruction of the adjacent cartilage and

bone. Although its precise etiology is not clearly understood, it is generally accepted that the proinflammatory cytokines TNF and IL-1 are critical mediators in the inflammatory process of arthritis [2], whereas Th2 cells producing IL-4 and IL-10 suppress the disease [3]. The fact that RA is a Th1-dominant autoimmune disease [4] is also supported by findings obtained with cytokine/anti-cytokine treatments. In particular, studies with animal models have demonstrated that systemic or locally administered Th2 cytokines can effectively protect against arthritis in mice. We and others have previously shown the therapeutic effect of IL-4 and IL-13 administration in mouse collagen-induced arthritis (CIA), a typical model for RA [1, 5–10]. Similar results were also obtained with the administration of IL-10, a potent immunosuppressive cytokine [11], in various arthritis models [12–15,

Correspondence: Natacha Bessis, UPRES EA-3408, University Paris 13, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny Cedex, France
Fax: +33-1-4838-8893

e-mail: bessis@smbh.univ-paris13.fr

Abbreviations: α -GalCer: α -galactosyl ceramide · CIA: collagen-induced arthritis · CII: collagen type II · CII/CFA: collagen type II emulsified in CFA · iNKT cells: invariant natural killer T cells · RA: rheumatoid arthritis

16]. However, the Th1/Th2 cytokine effects on experimental models of RA are complex since, for example, in some models, IL-10-deficient mice get more severe disease [17], suggesting a protective role of IL-10, but at the same time, IL-4-deficient mice are protected from arthritis [18], suggesting a deleterious role of this Th2 cytokine on the disease.

Considering the pathogenic role played by Th1 cells in RA development along with the fact that Th1/Th2 imbalance also participates in the perpetuation of chronic inflammation associated with this disease [3], it is tempting to exploit immunoregulatory mechanisms to inhibit the autoimmune response in experimental models of RA. In this regard, it is of interest to underline the peculiar capacity of a particular subset of immunoregulatory T cells to influence the Th1/Th2 profile during immune responses, *i.e.*, invariant V α 14 NK T (iNKT) cells.

iNKT cells represent a unique T cell lineage that are potent producers of immunoregulatory cytokines, and have been implicated in several autoimmune diseases in mice and humans, including type 1 diabetes, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), systemic lupus erythematosus, uveitis, colitis and scleroderma [19–23]. In several situations, quantitative and/or qualitative defects in iNKT cells have been reported, and they are believed to be associated with the emergence of autoimmune diseases [24].

iNKT cells co-express NK markers such as CD161 and a highly restricted TCR repertoire, composed of a single invariant α chain (V α 14-J α 18 in mice and V α 24-J α 18 in humans) together with a limited TCR V β repertoire [25]. They recognize glycolipid antigens in the context of the non-classical MHC class I molecule CD1d that include the exogenous glycosphingolipid antigen α -galactosyl ceramide (α -GalCer), obtained from a marine sponge, but absent in mammalian cells [26], and the glycolipid isoglobotrihexosylceramide (iG β 3) that has been recently identified as an endogenous molecule endowed with the capacity to positively select iNKT cells [27].

Based on the demonstration that iNKT cell stimulation with α -GalCer *in vitro* and *in vivo* leads to the rapid secretion of large quantities of the regulatory cytokines IL-4 and IL-10 [28], we and others have investigated the possibility of inhibiting Th1 autoimmune diseases by treatment with this cognate iNKT cell ligand. Convincing results showing a therapeutic effect of α -GalCer in animal models have been obtained in type 1 diabetes [22, 29] and in EAE [19, 30].

The role of iNKT cells in RA has not been extensively studied until now. Despite the fact that iNKT cell stimulation by OCH, another synthetic ligand, have been shown to inhibit CIA in C57BL/6 mice [31], no study to date has been performed in the standard, well-characterized model of RA, namely CIA in DBA/1 mice,

a genetically predisposed strain for development of CIA [32–35].

By examining the effect of α -GalCer on the development of CIA in DBA/1 mice, we show here a clear cut decrease in clinical and histological signs of arthritis despite a reduced responsiveness of iNKT cells in these mice. Importantly, this protection was not mediated through a Th1/Th2 deviation but rather by an IL-10-dependent suppressive pathway.

Results

Analysis of iNKT cells in CIA-susceptible DBA/1 mice

We first examined whether α -GalCer stimulates cytokine secretion in DBA/1 mice, and compared the levels to that obtained in non-autoimmune prone C57BL/6 mice. Mice received a single injection of the antigen and were killed 2 h later; cytokine concentrations were then determined in the serum. Treatment of DBA/1 mice with α -GalCer led to a rapid appearance of IL-4 and IFN- γ in the serum, but, interestingly, for both cytokines, responses were about twice lower than those in C57BL/6 mice (Fig. 1) (IL-4: 693 \pm 154 pg/mL vs. 1557 \pm 137 pg/mL, $p=0.009$; IFN- γ : 2077 \pm 378 pg/mL vs. 4005 \pm 581 pg/mL, $p=0.009$).

The lower iNKT cell responses in DBA/1 mice were obtained despite a non-reduced iNKT cell pool in these mice, as referenced to C57BL/6 mice. Indeed, in both spleen and liver, the frequency of iNKT cells that were identified by double staining with a monoclonal antibody against TCR- $\alpha\beta$ and CD1d-tetramers loaded with α -GalCer (α -GalCer/CD1d-tetramer) was superimposable in the two strains of mice (Fig. 2A, B). Moreover, the absolute numbers of α -GalCer/CD1d-tetramer⁺ cells in both the liver and the spleen did not significantly differ between DBA/1 and C57BL/6 mice (Fig. 2C). Taken together, these data clearly indicate that the deficiency of iNKT cells in DBA/1 mice concerns their functional capacities rather than their number.

α -GalCer treatment confers protection against CIA

We next investigated whether stimulation of iNKT cells by α -GalCer affected the course of arthritis. We determined the effect of α -GalCer treatment on CIA in DBA/1 mice immunized with collagen type II (CII). To determine whether the timing of iNKT cell activation (prior, during or after CIA induction) is important in modulating CIA, we performed different sets of experiments. In the first group, mice received α -GalCer *i.p.* on the day of CII immunization, and 8 and 4 days before immunization. In the second group, α -GalCer was

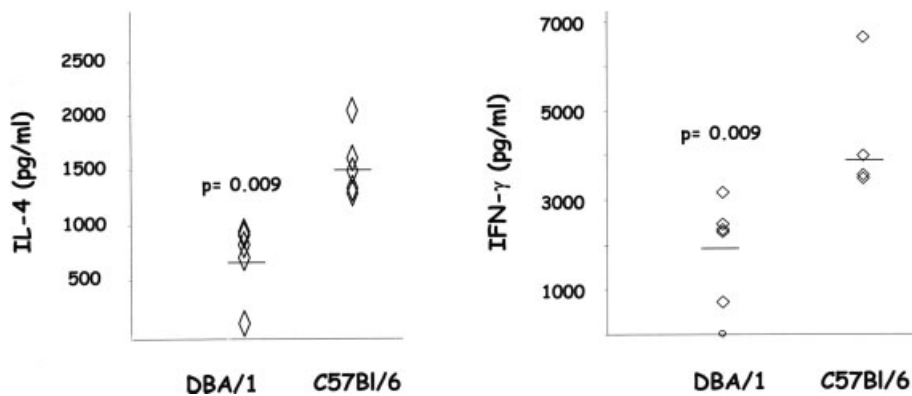


Figure 1. Cytokine responses to α -GalCer *in vivo*. DBA/1 ($n=5$) and C57BL/6 ($n=5$) mice were injected i.p. with 2 μ g α -GalCer. IL-4 and IFN- γ levels were measured by ELISA in the serum 2 h after the injection. Each point represents an individual mouse, and horizontal bars correspond to the mean of cytokine levels. Differences in IL-4 and IFN- γ levels are statistically significant between DBA/1 and C57BL/6 ($p=0.009$ for IL-4 and IFN- γ).

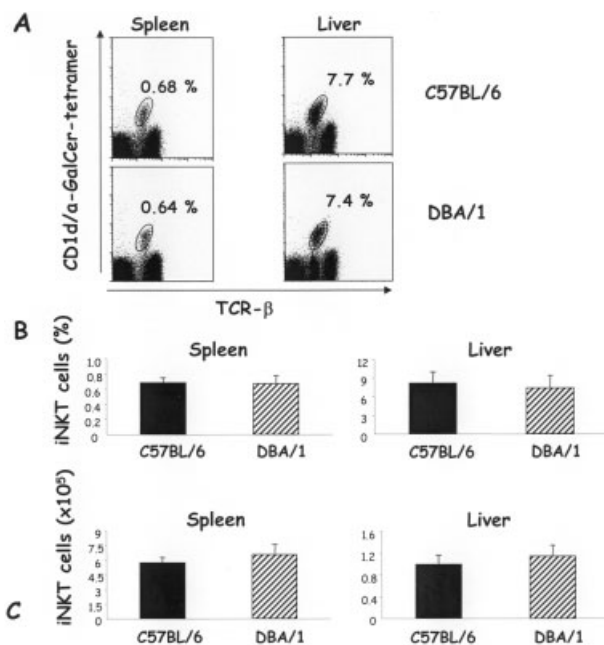


Figure 2. Spleen and mononuclear liver iNKT cell percentages and numbers in C57BL/6 and DBA/1 mice. Splenocytes and mononuclear liver cells from C57BL/6 and DBA/1 mice were labeled with fluorochrome-conjugated anti- β -TCR and with either CD1d/ α -GalCer-tetramer or CD1d/vehicle-tetramer, and then analyzed by flow cytometry. (A) The percentage of iNKT cells, defined here as β -TCR⁺ CD1d/ α -GalCer-tetramer-positive cells, among lymphocytes is indicated in each dot-plot. A representative experiment out of three is shown. The percentages among lymphocytes (B) and absolute numbers (C) of iNKT cells are given as mean values \pm SEM from five or six individual mice. Control staining with CD1d/vehicle-tetramer was less than 0.05% and 0.2% in splenocytes and liver mononuclear cells, respectively.

injected i.p. on the day of CII immunization only. Lastly, in the third group, α -GalCer was given on the day of CII immunization, and 4, 7, 12 and 17 days after immunization. Fig. 3 shows the evolution of arthritis assessed by

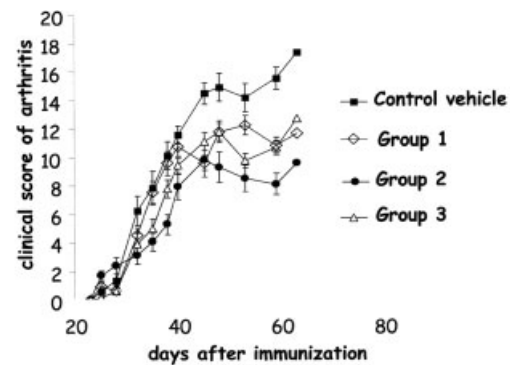


Figure 3. Effect of α -GalCer on the clinical scores of CIA. All DBA/1 mice were immunized with CII/CFA on day 0 for arthritis induction. α -GalCer was injected i.p. (4 μ g/dose) following three regimens: group 1 ($n=10$): α -GalCer injected on days -8, -4 and 0; group 2 ($n=9$): α -GalCer injected on day 0; group 3 ($n=10$): α -GalCer injected at days 0, +4, +7, +12, +17. As controls ($n=8$; closed squares), CII/CFA immunized mice received vehicle at days -8, -4, 0, +4, +7, +12, +17. Arthritis scores were evaluated in the four paws. Each point represents the mean arthritis score in the corresponding group on a given day. Group 1 vs. control vehicle group: $p=0.03$ at day 45; $p=0.03$ at day 59; $p=0.007$ at day 63. Group 2 vs. control vehicle group: $p=0.05$ at day 53; $p=0.006$ at day 59; $p=0.007$ at day 63. Group 3 vs. control vehicle group: $p=0.03$ at day 45; $p=0.04$ at day 53; $p=0.01$ at day 59; $p=0.01$ at day 63.

clinical evaluation. All of the α -GalCer-treated groups showed attenuated clinical signs of arthritis in comparison to control mice (see statistics in legend), although the best therapeutic effect was obtained in the group that received only one α -GalCer injection, on day 0. The clinical evaluation also shows that α -GalCer treatment neither influenced the onset of arthritis, nor modified the incidence of the disease (Table 1). However, the maximum score of arthritis, which represents the absolute severity of the disease, is slightly lower in group 1 (α -GalCer injection prior to immunization) and

Table 1. Clinical and histological parameters of arthritis in mice treated with α -GalCer^{a)}

Group	Treatment	Clinical parameters			Histological scores	
		Onset (days)	Arthritis scores maximum	Incidence	Inflammation	Destruction
Control (n=8)	Vehicle	31.8 ± 1.4	18.6 ± 1.6	8/8 (100%)	2.08 ± 0.20	1.85 ± 0.19
Group 1 (n=10)	α -GalCer days -8, -4, 0	32.6 ± 1.38	14.3 ± 0.8	10/10 (100%)	1.90 ± 0.12	1.64 ± 0.14
Group 2 (n=9)	α -GalCer day 0	30.6 ± 3.29	12.3 ± 1.9	8/9 (88%)	1.66 ± 0.19*	1.19 ± 0.18***
Group 3 (n=10)	α -GalCer days 0, +4, +7, +12, +17	31.1 ± 1.46	14.8 ± 0.9	10/10 (100%)	1.60 ± 0.18**	1.52 ± 0.20

^{a)} The time of arthritis onset and the mean maximum scores are expressed as mean ± SEM. Histological scores are reported as mean ± SEM: inflammation arthritis scores and destruction of bone and cartilage were measured. *p* values are given vs. control vehicle: **p*=0.05, ***p*=0.03, ****p*=0.006.

group 2 (α -GalCer injected on day 0). We also performed an histological evaluation of arthritis, showing a statistically significant decrease of inflammation and destruction parameters of arthritis as compared to controls, in mice treated only once with α -GalCer the day of CII immunization (Table 1 and Fig. 4). A statistically significant decrease of inflammation parameters was also shown in mice treated on days 4, 7, 12 and 17 with α -GalCer. A reduction in histological scores was observed between mice treated with α -GalCer prior to CIA induction and control mice, although differences are not statistically significant (Table 1).

When α -GalCer was given on day 0, it was administered separately from collagen type II emulsified in CFA (CII/CFA) Considering the importance of the method of injection in other models of autoimmune diseases like EAE [36], we evaluated, in another experiment, the effect of α -GalCer diluted within the CII/CFA given on

day 0. Both clinical and histological analysis highlighted a therapeutic effect on arthritis exerted by this treatment, confirming the experiment shown in Table 1 and Fig. 4: the onset was not modified by treatment with α -GalCer diluted in CII/CFA (39.1 ± 1.9 vs. 40.8 ± 3.5 days for α -GalCer- and vehicle-injected group, respectively), and histological evaluation also showed a reduction of inflammation and destruction signs of arthritis in α -GalCer + CII/CFA-treated group (inflammation: 1.79 ± 0.28 vs. 0.84 ± 0.29 , *p*=0.05, and destruction: 1.57 ± 0.26 vs. 0.8 ± 0.27 , *p*=0.05 for vehicle- and α -GalCer-injected group, respectively).

Taken together, our results clearly demonstrate that α -GalCer administration prior and/or during CIA induction is accompanied by a reduction in clinical and histological signs of arthritis, either when α -GalCer was injected within the CII/CFA or separately.

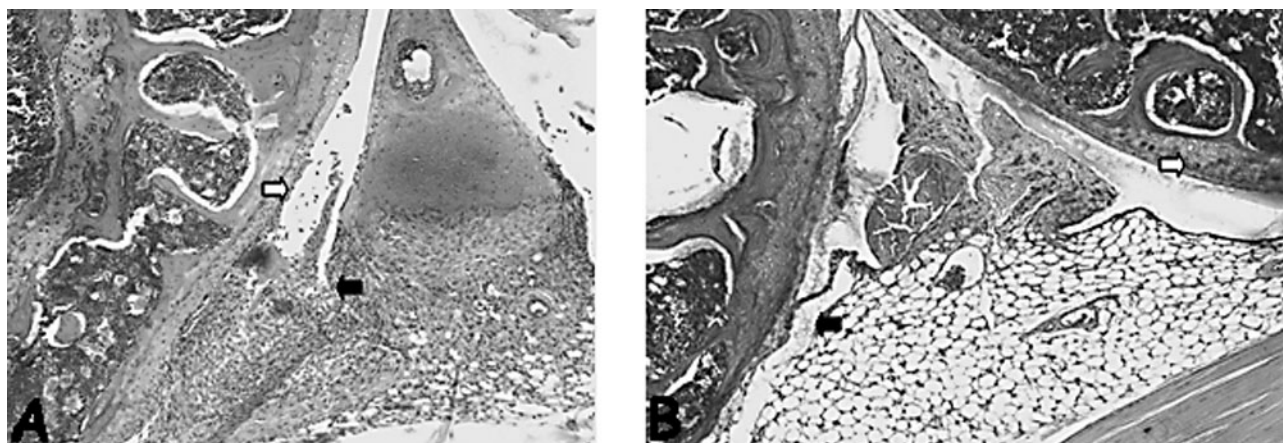


Figure 4. Histopathological assessment of arthritic joints of mice treated with control vehicle or α -GalCer. DBA/1 mice were immunized with CII/CFA at day 0 for arthritis induction, and treated with vehicle: cell infiltration, synovitis and cartilage destruction (A) or with α -GalCer intraperitoneally (4 μ g/dose) at day 0: aspect of normal synovial and cartilage (B) (black arrow: synovial membrane, white arrow: cartilage). Hematoxylin and eosin stained; original magnification $\times 100$.

In these experiments, the antibody response to CII was also evaluated by measuring immunoglobulin (total IgG, IgG1 and IgG2a isotypes) directed to CII. No statistically significant differences in antibody levels or in the anti-CII IgG1/IgG2a ratio were observed in any group of α -GalCer-treated animals as compared to controls (data not shown).

α -GalCer treatment promotes IL-10 secretion during CII-specific Th response

The immunological mechanism for arthritis protection by α -GalCer was investigated by measuring CD4 T cell response to the CII-immunizing antigen. DBA/1 mice were immunized with CII/CFA in hind paws and treated or not with α -GalCer within the immunizing CII/CFA. Eleven days later, CD4⁺ T cells from draining lymph nodes were assayed for cytokines production in response to an *in vitro* challenge with CII (Fig. 5). Lymph node CD4⁺ cells from CII-immunized and α -GalCer-treated mice secreted levels of IFN- γ and IL-4 similar to that in their counterparts from vehicle-treated mice upon *in vitro* re-stimulation with CII (Fig. 5A, B).

In contrast, the α -GalCer-induced protection was associated with a clear cut increase in IL-10 production

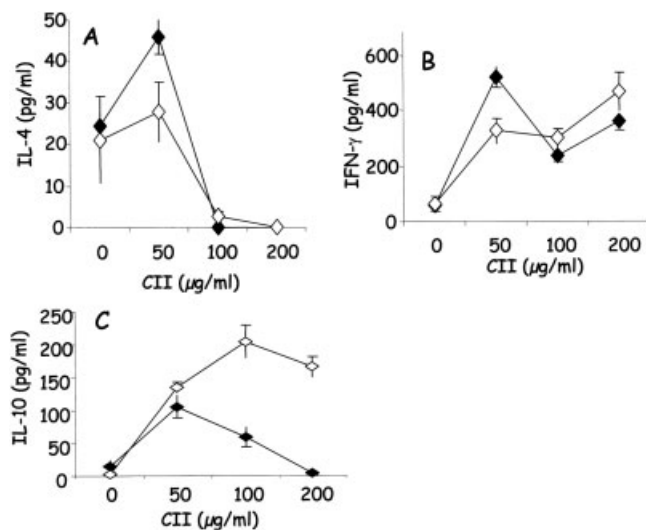


Figure 5. *In vitro* proliferation and cytokines responses of CII-specific CD4 cells from lymph nodes of mice immunized with CII and treated with α -GalCer. DBA/1 mice were immunized with CII/CFA in hind paws and treated with α -GalCer (empty symbols) or vehicle (filled symbols) the same day, as described in the Material and methods section. At 11 days after immunization, CD4 cells from draining lymph nodes were cultured with the indicated concentrations of CII. A–C show IL-4, IFN- γ and IL-10 levels, respectively, in the culture supernatants of CII-specific CD4 cells from lymph nodes obtained from CII-immunized mice treated with α -GalCer or vehicle. Each point is the mean value \pm SEM of three mice studied simultaneously.

by lymph node CD4⁺ cells in response to the *in vitro* re-stimulation with CII (Fig. 5C).

Neutralization of IL-10 activity reverses the therapeutic effect of α -GalCer in CIA

To further investigate whether the protective role of α -GalCer in CIA was mediated via an IL-10-dependent pathway, neutralizing experiments were performed in CIA mice treated with α -GalCer by co-administering an mAb against the IL-10 receptor (anti-IL-10R). α -GalCer + control IgG-treated mice were used as control and, as expected, a decrease in clinical scores of arthritis was observed in this group as compared to vehicle-injected control mice (Fig. 6). Conversely, treatment of CIA mice with the anti-IL-10R completely abrogated the protective effect of α -GalCer (Fig. 6); the maximum arthritis scores were decreased in the α -GalCer + IgG-treated group as compared with the α -GalCer + anti-IL-10R-treated group (6.8 ± 1.9 vs. 12.8 ± 3.4 , respectively). Incidence of arthritis was 75% in α -GalCer + IgG-treated group, 100% in α -GalCer + anti-IL-10R and in vehicle group. Moreover, a reduction in histological scores was observed in mice treated with α -GalCer + IgG as compared with mice treated with α -GalCer + anti-IL-10R (mean \pm SEM of destruction and inflammation parameters: 0.52 ± 0.26 vs. 1.01 ± 0.28 , respectively).

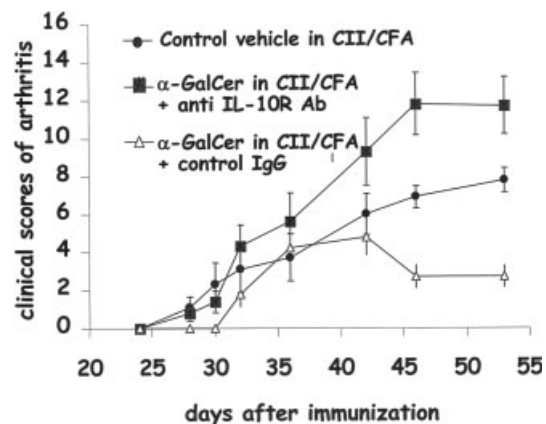


Figure 6. Effect of IL-10R neutralization in CIA-mice treated with α -GalCer. All DBA/1 mice were immunized with CII/CFA at day 0 for arthritis induction, and clinical scores were evaluated in mice treated with α -GalCer + anti-IL-10R mAb ($n=7$, filled squares). As controls, mice received α -GalCer + control Ig ($n=8$, empty triangles), or vehicle only ($n=8$, filled circles). α -GalCer was administrated within the CII/CFA immunizing solution at day 0. Arthritis scores were evaluated in the four paws. Each point represents the mean arthritis score in the corresponding group on a given day. α -GalCer + control Ig vs. α -GalCer + anti-IL-10R: $p=0.01$ at days 46 and 53

Discussion

iNKT cell targeting with α -GalCer has proven to be therapeutic in some autoimmune disease models such as in NOD mice for diabetes or the EAE model for multiple sclerosis [19, 22, 30, 36, 37]. In this study, we asked whether this therapeutic strategy was also applicable in a well-characterized model of RA, *i.e.*, CIA in DBA/1 mice. We show here that treatment with α -GalCer prevents CIA since it leads to an amelioration in the course and the severity of the disease, regarding clinical and histological signs of arthritis. This therapeutic effect was shown whatever way (*i.p.* or within the CII/CFA mixture) the α -GalCer was administered, and whatever injection timing we tested.

Our results differ from those of a previous study by Chiba *et al.* [31], who showed that α -GalCer was ineffective in CIA. However, α -GalCer therapeutic efficiency varies on a strain of mouse used, as attested by a very recent study in a lupus model in SJL/J or BALB/c mice [23]. Indeed, genetic susceptibility to autoimmunity is linked to MHC class II in animal models, as well as in humans, and it is likely that α -GalCer preferentially exerts its therapeutic effect in susceptible mouse strains. In this context, it should be underlined that our study was performed with DBA/1 (H-2^d) mice that are highly susceptible to CIA [32, 33, 35, 38, 39], while the study from Chiba *et al.* was performed in C57BL/6 mice (H-2^b). The latter are only partly susceptible to the disease, with a lower incidence and less severity [40], and in some studies, they show a resistance to CIA [41]. Moreover, mice were aged less than 16 weeks at the end of all CIA experiments, thus eliminating the risk of a psoriasis arthritis-like disease that occurs spontaneously in DBA/1 male mice aged more than 4 months [42] and that could have interfered with CIA.

One important point to elucidate is the mechanism by which α -GalCer exerts its therapeutic properties. In Th1-like autoimmune diseases, such as diabetes and multiple sclerosis, two distinct mechanisms have been proposed: (i) a shift from a Th1 toward a Th2 pattern with IL-4 secretion [19, 22, 30, 36, 37, 43, 44], and (ii) induction of immunosuppressive cytokine production like IL-10 [30, 37] (which is also considered as a Th2 cytokine in mouse).

In accordance with an IL-10-dependent mechanism rather than a shift from IFN- γ to IL-4 secretion, our study shows that the therapeutic effect of α -GalCer was completely reversed when it was given together with an antibody-neutralizing IL-10 receptor. Moreover, CII-specific lymph nodes CD4⁺ T cells from mice immunized with CII and injected with α -GalCer produced *in vitro* increased levels of IL-10, while IL-4 and IFN- γ levels were not modified. Furthermore, CIA mice treated with

α -GalCer did not display any modification in anti-CII IgG1 and IgG2a levels.

Our demonstration that the α -GalCer therapeutic effect against CIA in DBA/1 mice is mediated through the stimulation of IL-10 secretion is in concordance with the known therapeutic effect of IL-10 in RA models. Indeed, it has been repetitively shown that the administration of IL-10 was efficient in DBA/1 mice with CIA, and most of these studies were performed using gene transfer strategies to obtain high and continuous IL-10 *in vivo* secretion [12, 45, 46]. We demonstrated also a therapeutic effect of IL-10 in TNF- α transgenic mice, another model for RA [15].

It is still unclear, however, which cells secrete IL-10 after iNKT stimulation with α -GalCer. IL-10 has been shown to be produced by iNKT cells themselves upon exogenous stimulation [47], but it is also likely that up-regulation of IL-10 production results from an indirect effect of α -GalCer-activated iNKT cells. One possibility could be an IL-10 production by B cell after their activation by iNKT [48] cells through a CD1d-restricted mechanism. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are also able to secrete high quantities of IL-10, but it is unclear whether iNKT cells induce IL-10 secretion by those cells. In fact, several observations in diabetes have shown that iNKT cells did not exert their effects through other regulatory T cells [22]. Further investigations are therefore required to elucidate the exact mechanism of the IL-10 therapeutic effect upon iNKT cell stimulation by an exogenous ligand.

Our results show that the most effective treatment with α -GalCer was obtained when it was administered the day of CIA induction, which corresponds to the phase of initiation of the disease. Indeed, the importance of treatment timing in iNKT cell stimulation protocols has been documented in studies on other models of autoimmune diseases, such as EAE. In this model, early immunization with α -GalCer protects against the disease, while a later immunization potentiates it [36]. Thus, we could hypothesize that α -GalCer is more efficient during the initiation period of the disease, while it could be deleterious during the amplification phase. According to this hypothesis, a very recent report shows a deleterious effect of iNKT cells in the K/BxN serum transfer model of RA [49]. This model is confined to the inflammatory responses induced by the deposition of autoantibody in joint spaces, and thus corresponds to the amplification phase of RA.

These considerations lead to the question of the natural role of iNKT cells, in absence of their exogenous stimulation, in autoimmune diseases. A link between an iNKT cell deficiency and the susceptibility of various mouse strains to autoimmunity has been proposed in various models such as diabetes in NOD mice and EAE in SJL mice, and it has also been evoked in humans

suffering from both pathologies [50, 51]. Importantly, in patients with RA, iNKT cells were also shown to be depressed in the peripheral blood [52–54], supporting the idea that susceptibility to RA may be associated with iNKT cell defects. In this regard, our study shows a partial iNKT cell deficiency at the functional level in CIA susceptible DBA/1 mice.

Our demonstration that α -GalCer is efficient in CIA-prone mice displaying iNKT cell dysfunctions is an important point regarding the question of its therapeutic use to treat autoimmune arthritis. However, even if α -GalCer has already been used in cancer clinical trials [55], the precise mechanism by which IL-10-dependent iNKT cell activation leads to the protection of CIA should be elucidated before using iNKT cell ligands to treat RA.

Materials and methods

Mice

Male mice aged 5–9 weeks and belonging to the DBA/1 strain, which is susceptible to CIA, and male C57BL/6 mice, aged 6–9 weeks were purchased from Harlan Olac (Bicester, UK).

Cell preparation

Spleen cell suspensions were prepared using a homogenizer, and red blood cells were lysed in hemolysis buffer (NH_4Cl , KHCO_3 , EDTA). Afferent popliteal and inguinal lymph nodes were dissected out of the hind limbs. Cell suspensions were obtained after teasing of the lymph nodes. Liver was perfused with $1 \times$ PBS, and then pressed through a mesh. Liver mononuclear cells (MNC) were separated from parenchymal cells (pellet) by centrifugation at $50 \times g$ for 5 min. MNC were collected and resuspended in a 35% Percoll solution (Amersham Biosciences Europe, Orsay, France) and centrifuged for 25 min at $750 \times g$. MNC were collected from the pellet and red blood cells were lysed as described above. MNC were then washed and resuspended in PBS/5% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Gibco-BRL). For measurement of collagen-specific T cell responses, lymph node cells were enriched for CD4^+ T cells by magnetic-activated cell sorting (MACS, Miltenyi biotech, Bergisch-Gladbach, Germany) using a quadriMACS magnet fitted with a MACS LS+ column. Purity of CD4^+ cell-enriched fractions was 85–95% after reanalysis.

Antibodies and flow cytometry analysis

PE-labeled anti-NK1.1 (clone PK136), PE-labeled anti-CD69 (clone H1-2F3), Cy-5.5-labeled anti-CD4 (clone RM4-5) and FITC-labeled anti-TCR- $\alpha\beta$ (clone H57-597) were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA). Allophycocyanin-labeled tetramers were prepared in our laboratory from the mCD1d/m β 2 m expression vector constructed by Kronenberg's group [56], then loaded or not with α -GalCer (Pharmaceutical Research Laboratory of Kirin Brewery Co., Tokyo, Japan).

Cells were stained at 4°C in PBS containing 2% heat-inactivated FCS and 0.01 M sodium azide, incubated for 5 min with 2.4G2.3 mAb for blocking Fc γ receptors, then incubated for 30 min with appropriate dilutions of various mAb coupled to PE, fluorescein or allophycocyanin. Flow cytometry was performed on a four-color FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain view, CA). Dead cells were excluded on the basis of forward and side scatter characteristics. Statistics presented are based on at least 1000 events gated on the population of interest. Results were analyzed using Mac CellQuest software.

In vivo challenge with α -GalCer

To explore iNKT cell activation *in vivo*, DBA/1 and C57BL/6 mice received a single injection of α -GalCer (2 $\mu\text{g}/\text{dose}$, i.p.). They were killed 2 h later and sera were recovered, as previously described [22]. Control mice were injected with an identical volume of vehicle solution alone.

CIA induction and evaluation

Arthritis was induced with native bovine CII (Chondrex, Morwell Diagnostics, Zurich, Switzerland) as previously described [32, 57]. Male DBA/1 mice were injected subcutaneously at the base of the tail with 100 μg CII emulsified in 2 μL CFA (Sigma Aldrich, Lyon, France) containing 1 mg/mL *Mycobacterium tuberculosis*. On day 21, mice were boosted with a subcutaneous injection of CII in IFA (Difco Laboratories, Detroit, MI). Mice were monitored for evidence of arthritis in the four paws using a blind procedure. For each mouse, clinical severity of arthritis was scored (0: normal; 1: erythema; 2: swelling; 3: deformity; and 4: necrosis) in ten joints: three joints of the two hind legs (toes, tarsus, ankle) and two joints of the two forelegs (toes and tarsus). The maximum score reached for each of the ten joints was 4, so the maximum score of clinical arthritis reached for a single mice on a given day was 40. The mean arthritic score on each clinical observation day was calculated in each treatment group. For histological analysis, the animals were killed 62 days after induction of CIA, and their legs were dissected free and processed for histological studies, as described elsewhere [57]. Extensive sections were cut for each paw and at least four were examined. The lesions were blindly evaluated for each joint as previously described using a four-point scale (0–3, where 0 is normal and 3 severe). This global histological score reflects both synovitis (synovial proliferation, inflammatory cell infiltration) and joint destruction (bone and cartilage thickness and irregularity and presence of erosions). We also evaluated separately the articular destruction by taking into account the degradation of bone and cartilage regardless of inflammation on a four-point scale 0–3, where 0 is no destruction and 3 the presence of subchondral bone erosions.

Individual sera were tested using a standard ELISA to look for antibodies to papain-solubilized native CII (kindly given by D Herbage, Lyon, France) (total IgG, IgG1, IgG2a) as described elsewhere [58].

Treatment of CIA with α -GalCer

For protection studies against CIA, DBA/1 mice immunized with CII (day 0) received i.p. a 4 μ g/dose of α -GalCer or an appropriate amount of control vehicle (polysorbate), both diluted in sterile saline on day 0, or on days –8, –4, 0, or on days 0, +4, +7, +12, +17. In a second set of experiments, mice received 4 μ g/dose of α -GalCer added in the CII/CFA immunizing solution or an equal volume of vehicle at day 0. Using this latter regimen, the effect of α -GalCer after neutralization of IL-10 activity was examined. α -GalCer-treated mice received a 200 μ g/dose of an anti-IL-10R (hybridoma 1B1.3a) or rat IgG1 (isotype control [22]) i.p. at days 0, +3, +7, +9, +14.

Measurement of T cell response

For measurement of collagen-specific T cell responses, lymph node responder CD4⁺ cells were suspended in complete culture medium composed of RPMI 1640 supplemented with glutamax-1, PS, gentamycin (160 μ g/mL), 10% heat-inactivated FCS and 50 μ M β -mercaptoethanol (all purchased from Gibco-BRL). Syngeneic splenocytes treated with mitomycin (50 μ g/mL) at 37°C for 105 min were prepared as antigen-presenting cells (APC). Cultures were done in triplicate in flat-bottom microplates by mixing 4 \times 10⁵ CD4⁺ cells and 7 \times 10⁵ APC with several dilutions of papain-solubilized native CII [59] (50, 100, 200 μ g/mL) or medium alone. After a 3-day incubation at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, culture supernatants were collected and assessed for the presence of cytokines by ELISA.

Cytokine assays by specific ELISA

IL-4, IL-10 and IFN- γ levels in serum and in culture supernatants were measured using commercially available ELISA kits (Duoset, R&D Systems, Abingdon, UK), according to the manufacturer's instructions. The sensitivity of cytokine assays was 20 pg/mL and 200 pg/mL in culture supernatants and in serum, respectively.

Statistical analysis

All statistics were done using the StatView version 5.0 Software. For all results (differences in cytokine production, A max, histological scores, and quantitative clinical scores data on a given day) a Mann-Whitney test was used. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Acknowledgements: We are grateful to Delphine Lemeiter (UPRES EA-3408), Monique Etienne and Simone Beranger (UPRES EA-3410) for their outstanding technical assistance. We thank Maria Leite-de-Moraes (CNRS UMR 8147) for critical review of the manuscript. We are especially indebted to Kirin Brewery Co, Ltd (Gunma, Japan) for providing α -GalCer, and to Mitchel Kronenberg (La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego, CA), Peter Van Endert, and Jean-Marie Fournieu (INSERM U580) for providing plasmid contain-

ing CD1d and β 2m genes and assisting in the preparation of CD1d/ α -GalCer-tetramer, respectively. This work was supported by the Association de Recherche sur la polyarthrite rhumatoïde (ARP), and the Société française de Rhumatologie (SFR), grants from Wyeth and from INSERM (PNRD 2004). This work was also supported by personal grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (R.Z.) and from l'Académie de Médecine (R.Z.).

References

- Harris, E. D., Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N. Engl. J. Med.* 1990. **322**: 1277–1289.
- Arend, W. P. and Dayer, J. M., Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995. **38**: 151–160.
- van Roon, J. A., Bijlsma, J. W. and Lafeber, F. P., Suppression of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis may require a concerted action of Th2 cytokines. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2002. **3**: 1011–1016.
- Miossec, P. and van den Berg, W., Th1/Th2 cytokine balance in arthritis. *Arthritis Rheum.* 1997. **40**: 2105–2115.
- Lubbers, E., Joosten, L. A., van Den Bersselaar, L., Helsen, M. M., Bakker, A. C., van Meurs, J. B., Graham, F. L. *et al.*, Adenoviral vector-mediated overexpression of IL-4 in the knee joint of mice with collagen-induced arthritis prevents cartilage destruction. *J. Immunol.* 1999. **163**: 4546–4556.
- Ho, S. H., Hahn, W., Lee, H. J., Kim, D. S., Jeong, J. G., Kim, S., Yu, S. S. *et al.*, Protection against collagen-induced arthritis by electrotransfer of an expression plasmid for the interleukin-4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. **321**: 759–766.
- Woods, J. M., Amin, M. A., Katschke, K. J., Jr., Volin, M. V., Ruth, J. H., Connors, M. A., Woodruff, D. C. *et al.*, Interleukin-13 gene therapy reduces inflammation, vascularization, and bony destruction in rat adjuvant-induced arthritis. *Hum. Gene Ther.* 2002. **13**: 381–393.
- Bessis, N., Boissier, M. C., Ferrara, P., Blankenstein, T., Fradelizi, D. and Fournier, C., Attenuation of collagen-induced arthritis in mice by treatment with vector cells engineered to secrete interleukin-13. *Eur. J. Immunol.* 1996. **26**: 2399–2403.
- Boyle, D. L., Nguyen, K. H., Zhuang, S., Shi, Y., McCormack, J. E., Chada, S., Firestein, G. S., Intra-articular IL-4 gene therapy in arthritis: anti-inflammatory effect and enhanced th2 activity. *Gene Ther.* 1999. **6**: 1911–1918.
- Kim, S. H., Evans, C. H., Kim, S., Oligino, T., Ghivizzani, S. C. and Robbins, P. D., Gene therapy for established murine collagen-induced arthritis by local and systemic adenovirus-mediated delivery of interleukin-4. *Arthritis Res.* 2000. **2**: 293–302.
- Willems, F., Marchant, A., Delville, J. P., Gerard, C., Delvaux, A., Velu, T., de Boer, M. *et al.*, Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 1994. **24**: 1007–1009.
- Whalen, J. D., Lechman, E. L., Carlos, C. A., Weiss, K., Kovesdi, I., Glorioso, J. C., Robbins, P. D. *et al.*, Adenoviral transfer of the viral IL-10 gene periarticularly to mouse paws suppresses development of collagen-induced arthritis in both injected and uninjected paws. *J. Immunol.* 1999. **162**: 3625–3632.
- Quattrocchi, E., Dallman, M. J., Dhillon, A. P., Quaglia, A., Bagnato, G. and Feldmann, M., Murine IL-10 gene transfer inhibits established collagen-induced arthritis and reduces adenovirus-mediated inflammatory responses in mouse liver. *J. Immunol.* 2001. **166**: 5970–5978.
- Apparailly, F., Verwaerde, C., Jacquet, C., Auriault, C., Sany, J. and Jorgensen, C., Adenovirus mediated transfer of viral IL-10 gene inhibits collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* 1998. **160**: 5213–5220.
- Bessis, N., Chiochia, G., Kollias, G., Minty, A., Fournier, C., Fradelizi, D. and Boissier, M. C., Modulation of proinflammatory cytokine production in

- tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-transgenic mice by treatment with cells engineered to secrete IL-4, IL-10 or IL-13. *Clin. Exp. Immunol.* 1998. **111**: 391–396.
- 16 Kim, K. N., Watanabe, S., Ma, Y., Thornton, S., Giannini, E. H. and Hirsch, R., Viral IL-10 and soluble TNF receptor act synergistically to inhibit collagen-induced arthritis following adenovirus-mediated gene transfer. *J. Immunol.* 2000. **164**: 1576–1581.
 - 17 Johansson, A. C., Hansson, A. S., Nandakumar, K. S., Backlund, J., Holmdahl, R., IL-10-deficient B10.Q mice develop more severe collagen-induced arthritis, but are protected from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies. *J. Immunol.* 2001. **167**: 3505–3512.
 - 18 Svensson, L., Nandakumar, K. S., Johansson, A., Jansson, L. and Holmdahl, R., IL-4-deficient mice develop less acute but more chronic relapsing collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* 2002. **32**: 2944–2953.
 - 19 Singh, A. K., Wilson, M. T., Hong, S., Olivares-Villagomez, D., Du, C., Stanic, A. K., Joyce, S. et al., Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 2001. **194**: 1801–1811.
 - 20 Shao, H., Van Kaer, L., Sun, S. L., Kaplan, H. J. and Sun, D., Infiltration of the inflamed eye by NKT cells in a rat model of experimental autoimmune uveitis. *J. Autoimmun.* 2003. **21**: 37–45.
 - 21 Shibolet, O., Kalish, Y., Klein, A., Alper, R., Zolotarov, L., Thalenfeld, B., Engelhardt, D. et al., Adoptive transfer of *ex vivo* immune-programmed NKT lymphocytes alleviates immune-mediated colitis. *J. Leukoc. Biol.* 2004. **75**: 76–86.
 - 22 Sharif, S., Arreaza, G. A., Zucker, P., Mi, Q. S., Sondhi, J., Naidenko, O. V., Kronenberg, M. et al., Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat. Med.* 2001. **7**: 1057–1062.
 - 23 Singh, A. K., Yang, J. Q., Parekh, V. V., Wei, J., Wang, C. R., Joyce, S., Singh, R. R. et al., The natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide prevents or promotes pristane-induced lupus in mice. *Eur. J. Immunol.* 2005. **35**: 1143–1154.
 - 24 Hammond, K. J. and Kronenberg, M., Natural killer T cells: natural or unnatural regulators of autoimmunity? *Curr. Opin. Immunol.* 2003. **15**: 683–689.
 - 25 Bendelac, A., Rivera, M. N., Park, S. H. and Roark, J. H., Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 1997. **15**: 535–562.
 - 26 Brigl, M. and Brenner, M. B., CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu. Rev. Immunol.* 2004. **22**: 817–890.
 - 27 Zhou, D., Mattner, J., Cantu, C., 3rd, Schrantz, N., Yin, N., Gao, Y., Sagiv, Y. et al., Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 2004. **306**: 1786–1789.
 - 28 Taniguchi, M., Harada, M., Kojo, S., Nakayama, T. and Wakao, H., The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 2003. **21**: 483–513.
 - 29 Falcone, M., Facciotti, F., Ghidoli, N., Monti, P., Olivieri, S., Zaccagnino, L., Bonifacio, E. et al., Up-regulation of CD1d expression restores the immunoregulatory function of NKT cells and prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 2004. **172**: 5908–5916.
 - 30 Furlan, R., Bergami, A., Cantarella, D., Brambilla, E., Taniguchi, M., Dellabona, P., Casorati, G. et al., Activation of invariant NKT cells by alphaGalCer administration protects mice from MOG35–55-induced EAE: critical roles for administration route and IFN-gamma. *Eur. J. Immunol.* 2003. **33**: 1830–1838.
 - 31 Chiba, A., Oki, S., Miyamoto, K., Hashimoto, H., Yamamura, T. and Miyake, S., Suppression of collagen-induced arthritis by natural killer T cell activation with OCH, a sphingosine-truncated analog of alpha-galactosylceramide. *Arthritis Rheum.* 2004. **50**: 305–313.
 - 32 Courtenay, J. S., Dallman, M. J., Dayan, A. D., Martin, A. and Mosedale, B., Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 1980. **283**: 666–668.
 - 33 Boissier, M.-C., Feng, X. Z., Carlzio, A., Roudier, R. and Fournier, C., Experimental autoimmune arthritis in mice. I. Homologous type II collagen is responsible for self-perpetuating chronic polyarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 1987. **46**: 691–700.
 - 34 Anthony, D. D. and Haqqi, T. M., Collagen-induced arthritis in mice: an animal model to study the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1999. **17**: 240–244.
 - 35 Holmdahl, R., Bockermann, R., Backlund, J. and Yamada, H., The molecular pathogenesis of collagen-induced arthritis in mice—a model for rheumatoid arthritis. *Ageing Res. Rev.* 2002. **1**: 135–147.
 - 36 Jahng, A. W., Maricic, I., Pedersen, B., Burdin, N., Naidenko, O., Kronenberg, M., Kozuka, Y. et al., Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 2001. **194**: 1789–1799.
 - 37 Hong, S., Wilson, M. T., Serizawa, I., Wu, L., Singh, N., Naidenko, O. V., Miura, T. et al., The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat. Med.* 2001. **7**: 1052–1056.
 - 38 Myers, L. K., Rosloniec, E. F., Cremer, M. A. and Kang, A. H., Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sci.* 1997. **61**: 1861–1878.
 - 39 Durie, F. H., Fava, R. A. and Noelle, R. J., Collagen-induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1994. **73**: 11–18.
 - 40 Campbell, I. K., Hamilton, J. A. and Wicks, I. P., Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 2000. **30**: 1568–1575.
 - 41 Pan, M., Kang, I., Craft, J. and Yin, Z., Resistance to development of collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is due to a defect in secondary, but not in primary, immune response. *J. Clin. Immunol.* 2004. **24**: 481–491.
 - 42 Corthay, A., Hansson, A. S. and Holmdahl, R., T lymphocytes are not required for the spontaneous development of enthesal ossification leading to marginal ankylosis in the DBA/1 mouse. *Arthritis Rheum.* 2000. **43**: 844–851.
 - 43 Hammond, K. J., Poulton, L. D., Palmisano, L. J., Silveira, P. A., Godfrey, D. I. and Baxter, A. G., Alpha/beta-T cell receptor (TCR)⁺CD4⁺CD8⁻ (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J. Exp. Med.* 1998. **187**: 1047–1056.
 - 44 Araki, M., Kondo, T., Gumperz, J. E., Brenner, M. B., Miyake, S. and Yamamura, T., Th2 bias of CD4⁺ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int. Immunol.* 2003. **15**: 279–288.
 - 45 Perez, N., Plence, P., Millet, V., Greuet, D., Minot, C., Noel, D., Danos, O. et al., Tetracycline transcriptional silencer tightly controls transgene expression after *in vivo* intramuscular electrotransfer: application to interleukin 10 therapy in experimental arthritis. *Hum. Gene Ther.* 2002. **13**: 2161–2172.
 - 46 Fellowes, R., Etheridge, C. J., Coade, S., Cooper, R. G., Stewart, L., Miller, A. D. and Woo, P., Amelioration of established collagen induced arthritis by systemic IL-10 gene delivery. *Gene Ther.* 2000. **7**: 967–977.
 - 47 Sonoda, K. H., Faunce, D. E., Taniguchi, M., Exley, M., Balk, S. and Stein-Streilein, J., NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. *J. Immunol.* 2001. **166**: 42–50.
 - 48 Galli, G., Nuti, S., Tavarini, S., Galli-Stampino, L., De Lalla, C., Casorati, G., Dellabona, P. et al., Innate immune responses support adaptive immunity: NKT cells induce B cell activation. *Vaccine* 2003. **21 Suppl 2**: S48–54.
 - 49 Kim, H. Y., Kim, H. J., Min, H. S., Kim, S., Park, W. S., Park, S. H. and Chung, D. H., NKT cells promote antibody-induced joint inflammation by suppressing transforming growth factor beta1 production. *J. Exp. Med.* 2005. **201**: 41–47.
 - 50 Demoulin, T., Gachelin, G., Bequet, D. and Dormont, D., A biased Valpha24⁺ T-cell repertoire leads to circulating NKT-cell defects in a multiple sclerosis patient at the onset of his disease. *Immunol. Lett.* 2003. **90**: 223–228.
 - 51 Wilson, S. B., Kent, S. C., Patton, K. T., Orban, T., Jackson, R. A., Exley, M., Porcelli, S. et al., Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 1998. **391**: 177–181.
 - 52 Yanagihara, Y., Shiozawa, K., Takai, M., Kyogoku, M. and Shiozawa, S., Natural killer (NK) T cells are significantly decreased in the peripheral blood

- of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.* 1999. **118**: 131–136.
- 53 **Kojo, S., Adachi, Y., Keino, H., Taniguchi, M. and Sumida, T.**, Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18⁺, BV11⁺ double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases. *Arthritis Rheum.* 2001. **44**: 1127–1138.
- 54 **Linsen, L., Thewissen, M., Baeten, K., Somers, V., Geusens, P., Raus, J. and Stinissen, P.**, Peripheral blood but not synovial fluid natural killer T cells are biased towards a Th1-like phenotype in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2005. **7**: R493–502.
- 55 **Nieda, M., Okai, M., Tazbirkova, A., Lin, H., Yamaura, A., Ide, K., Abraham, R. et al.**, Therapeutic activation of Valpha24⁺Vbeta11⁺ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood* 2004. **103**: 383–389. Epub 2003 Sep 2025.
- 56 **Matsuda, J. L., Naidenko, O. V., Gapin, L., Nakayama, T., Taniguchi, M., Wang, C. R., Koezuka, Y. et al.**, Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J. Exp. Med.* 2000. **192**: 741–754.
- 57 **Saidenberg-Kermanac'h, N., Bessis, N., Lemeiter, D., de Vernejoul, M. C., Boissier, M. C. and Cohen-Solal, M.**, Interleukin-4 cellular gene therapy and osteoprotegerin decrease inflammation-associated bone resorption in collagen-induced arthritis. *J. Clin. Immunol.* 2004. **24**: 370–378.
- 58 **Manoury-Schwartz, B., Chiocchia, G., Bessis, N., Abehsira-Amar, O., Batteux, F., Muller, S., Huang, S. et al.**, High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. *J. Immunol.* 1997. **158**: 5501–5506.
- 59 **Vingsbo, C., Larsson, P., Andersson, M. and Holmdahl, R.**, Association of pepsin with type II collagen (CII) breaks control of CII autoimmunity and triggers development of arthritis in rats. *Scand. J. Immunol.* 1993. **37**: 337–342.

Bibliographie

- Ajuebor,M.N., Aspinall,A.I., Zhou,F., Le,T., Yang,Y., Urbanski,S.J., Sidobre,S., Kronenberg,M., Hogaboam,C.M., and Swain,M.G. (2005). Lack of Chemokine Receptor CCR5 Promotes Murine Fulminant Liver Failure by Preventing the Apoptosis of Activated CD1d-Restricted NKT Cells. *J Immunol* 174, 8027-8037.
- Akbari,O., Stock,P., Meyer,E., Kronenberg,M., Sidobre,S., Nakayama,T., Taniguchi,M., Grusby,M.J., DeKruyff,R.H., and Umetsu,D.T. (2003). Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med.* 9, 582-588.
- Alyanakian,M.A., Grela,F., Aumeunier,A., Chiavaroli,C., Gouarin,C., Bardel,E., Normier,G., Chatenoud,L., Thieblemont,N., and Bach,J.F. (2006). Transforming Growth Factor- β and Natural Killer T-Cells Are Involved in the Protective Effect of a Bacterial Extract on Type 1 Diabetes. *Diabetes* 55, 179-185.
- Amprey,J.L., Im,J.S., Turco,S.J., Murray,H.W., Illarionov,P.A., Besra,G.S., Porcelli,S.A., and Spath,G.F. (2004). A Subset of Liver NK T Cells Is Activated during *Leishmania donovani* Infection by CD1d-bound Lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 200, 895-904.
- Anderson,M.S. and Bluestone,J.A. (2005). The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu. Rev Immunol* 23, 447-485.
- Arase,H., Arase,N., Kobayashi,Y., Nishimura,Y., Yonehara,S., and Onoe,K. (1994). Cytotoxicity of fresh NK1.1+ T cell receptor alpha/beta+ thymocytes against a CD4+8+ thymocyte population associated with intact Fas antigen expression on the target. *J. Exp. Med.* 180, 423-432.
- Arase,H., Arase,N., Nakagawa,K., Good,R.A., and Onoe,K. (1993). NK1.1+ CD4+ CD8- thymocytes with specific lymphokine secretion. *Eur. J Immunol* 23, 307-310.
- Araujo,L.M., Lefort,J., Nahori,M.A., Diem,S., Zhu,R., Dy,M., Leite-de-Moraes,M.C., Bach,J.F., Vargaftig,B.B., and Herbelin,A. (2004). Exacerbated Th2-mediated airway inflammation and hyperresponsiveness in autoimmune diabetes-prone NOD mice: a critical role for CD1d-dependent NKT cells. *Eur. J Immunol* 34, 327-335.
- Bach,J.F. (1994). Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr. Rev* 15, 516-542.
- Bach,J.F. (2002). The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases. *N Engl J Med* 347, 911-920.
- Baxter,A.G., Kinder,S.J., Hammond,K.J., Scollay,R., and Godfrey,D.I. (1997). Association between alphabetaTCR+CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes* 46, 572-582.
- Beaudoin,L., Laloux,V., Novak,J., Lucas,B., and Lehuen,A. (2002). NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells. *Immunity* 17, 725-736.

- Behar,S.M., Dascher,C.C., Grusby,M.J., Wang,C.R., and Brenner,M.B. (1999). Susceptibility of Mice Deficient in CD1D or TAP1 to Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* *189*, 1973-1980.
- Bendelac,A., Carnaud,C., Boitard,C., and Bach,J.F. (1987). Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *J Exp. Med.* *166*, 823-832.
- Bendelac,A., Killeen,N., Littman,D.R., and Schwartz,R.H. (1994). A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science* *263*, 1774-1778.
- Bendelac,A., Lantz,O., Quimby,M.E., Yewdell,J.W., Bennink,J.R., and Brutkiewicz,R.R. (1995). CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* *268*, 863-865.
- Bendelac,A., Rivera,M.N., Park,S.H., and Roark,J.H. (1997). Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev Immunol* *15*, 535-562.
- Bendelac,A. and Schwartz,R.H. (1991). CD4+ and CD8+ T cells acquire specific lymphokine secretion potentials during thymic maturation. *Nature* *353*, 68-71.
- Benlagha,K., Kyin,T., Beavis,A., Teyton,L., and Bendelac,A. (2002). A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* *296*, 553-555.
- Benlagha,K., Weiss,A., Beavis,A., Teyton,L., and Bendelac,A. (1999). In Vivo Identification of Glycolipid Antigen-specific T Cells Using Fluorescent CD1d Tetramers. *J. Exp. Med.* *191*, 1895-1904.
- Berzins,S.P., Uldrich,A.P., Pellicci,D.G., McNab,F., Hayakawa,Y., Smyth,M.J., and Godfrey,D.I. (2004). Parallels and distinctions between T and NKT cell development in the thymus. *Immunol Cell Biol.* *82*, 269-275.
- Bezbradica,J.S., Stanic,A.K., Matsuki,N., Bour-Jordan,H., Bluestone,J.A., Thomas,J.W., Unutmaz,D., Van Kaer,L., and Joyce,S. (2005). Distinct Roles of Dendritic Cells and B Cells in Va14Ja18 Natural T Cell Activation In Vivo. *J Immunol* *174*, 4696-4705.
- Bix,M., Coles,M., and Raulet,D. (1993). Positive selection of V beta 8+ CD4-8- thymocytes by class I molecules expressed by hematopoietic cells. *J Exp. Med.* *178*, 901-908.
- Boitard,C., Yasunami,R., Dardenne,M., and Bach,J.F. (1989). T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice. *J Exp. Med.* *169*, 1669-1680.
- Brigl,M., Bry,L., Kent,S.C., Gumperz,J.E., and Brenner,M.B. (2003). Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* *4*, 1230-1237.
- Brigl,M. and Brenner,M.B. (2004). CD1: Antigen Presentation and T Cell Function. *Annual Review of Immunology* *22*, 817-890.
- Burdin,N., Brossay,L., and Kronenberg,M. (1999). Immunization with alpha-galactosylceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis.

Eur. J Immunol 29, 2014-2025.

Cameron,M.J., Arreaza,G.A., Zucker,P., Chensue,S.W., Strieter,R.M., Chakrabarti,S., and Delovitch,T.L. (1997). IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. *J Immunol* 159, 4686-4692.

Carnaud,C., Gombert,J., Donnars,O., Garchon,H., and Herbelin,A. (2001). Protection against diabetes and improved NK/NKT cell performance in NOD.NK1.1 mice congenic at the NK complex. *J Immunol* 166, 2404-2411.

Carnaud,C., Lee,D., Donnars,O., Park,S.H., Beavis,A., Koezuka,Y., and Bendelac,A. (1999). Cutting Edge: Cross-Talk Between Cells of the Innate Immune System: NKT Cells Rapidly Activate NK Cells. *J Immunol* 163, 4647-4650.

Chackerian,A., Alt,J., Perera,V., and Behar,S.M. (2002). Activation of NKT Cells Protects Mice from Tuberculosis. *Infect. Immun.* 70, 6302-6309.

Chatenoud,L., Salomon,B., and Bluestone,J.A. (2001). Suppressor T cells--they're back and critical for regulation of autoimmunity! *Immunol Rev* 182, 149-163.

Chen,Y.G., Choisy-Rossi,C.M., Holl,T.M., Chapman,H.D., Besra,G.S., Porcelli,S.A., Shaffer,D.J., Roopenian,D., Wilson,S.B., and Serreze,D.V. (2005). Activated NKT Cells Inhibit Autoimmune Diabetes through Tolerogenic Recruitment of Dendritic Cells to Pancreatic Lymph Nodes. *J Immunol* 174, 1196-1204.

Chiba,A., Oki,S., Miyamoto,K., Hashimoto,H., Yamamura,T., and Miyake,S. (2004). Suppression of collagen-induced arthritis by natural killer T cell activation with OCH, a sphingosine-truncated analog of alpha-galactosylceramide. *Arthritis Rheum.* 50, 305-313.

Chun,T., Page,M.J., Gapin,L., Matsuda,J.L., Xu,H., Nguyen,H., Kang,H.S., Stanic,A.K., Joyce,S., Koltun,W.A., Chorney,M.J., Kronenberg,M., and Wang,C.R. (2003). CD1d-expressing Dendritic Cells but Not Thymic Epithelial Cells Can Mediate Negative Selection of NKT Cells. *J. Exp. Med.* 197, 907-918.

Chung,Y., Chang,W.S., Kim,S., and Kang,C.Y. (2004). NKT cell ligand alpha-galactosylceramide blocks the induction of oral tolerance by triggering dendritic cell maturation. *Eur. J Immunol* 34, 2471-2479.

Crispe,I.N. (2003). HEPATIC T CELLS AND LIVER TOLERANCE. *Nat Rev Immunol* 3, 51-62.

Crowe,N.Y., Coquet,J.M., Berzins,S.P., Kyparissoudis,K., Keating,R., Pellicci,D.G., Hayakawa,Y., Godfrey,D.I., and Smyth,M.J. (2005). Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *J Exp. Med.* 202, 1279-1288.

Crowe,N.Y., Uldrich,A.P., Kyparissoudis,K., Hammond,K.J.L., Hayakawa,Y., Sidobre,S., Keating,R., Kronenberg,M., Smyth,M.J., and Godfrey,D.I. (2003). Glycolipid Antigen Drives Rapid Expansion and Sustained Cytokine Production by NK T Cells. *J Immunol* 171,

4020-4027.

Cui,J., Shin,T., Kawano,T., Sato,H., Kondo,E., Toura,I., Kaneko,Y., Koseki,H., Kanno,M., and Taniguchi,M. (1997). Requirement for V α 14 NKT Cells in IL-12-Mediated Rejection of Tumors. *Science* 278, 1623-1626.

Cui,J., Watanabe,N., Kawano,T., Yamashita,M., Kamata,T., Shimizu,C., Kimura,M., Shimizu,E., Koike,J., Koseki,H., Tanaka,Y., Taniguchi,M., and Nakayama,T. (1999). Inhibition of T Helper Cell Type 2 Cell Differentiation and Immunoglobulin E Response by Ligand-activated V α 14 Natural Killer T Cells. *J. Exp. Med.* 190, 783-792.

D'Andrea,A., Goux,D., De Lalla,C., Koezuka,Y., Montagna,D., Moretta,A., Dellabona,P., Casorati,G., and Abrignani,S. (2000). Neonatal invariant Valpha24+ NKT lymphocytes are activated memory cells. *Eur. J Immunol* 30, 1544-1550.

Delovitch,T.L. and Singh,B. (1997). The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity* 7, 727-738.

Diao,H., Kon,S., Iwabuchi,K., Kimura,C., Morimoto,J., Ito,D., Segawa,T., Maeda,M., Hamuro,J., Nakayama,T., Taniguchi,M., Yagita,H., Van Kaer,L., Onoe,K., Denhardt,D., Rittling,S., and Uede,T. (2004). Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases
1. *Immunity* 21, 539-550.

Eberl,G., Lees,R., Smiley,S.T., Taniguchi,M., Grusby,M.J., and MacDonald,H.R. (1999). Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. *J Immunol* 162, 6410-6419.

Eberl,G. and MacDonald,H.R. (1998). Rapid death and regeneration of NKT cells in anti-CD3epsilon- or IL-12-treated mice: a major role for bone marrow in NKT cell homeostasis. *Immunity* 9, 345-353.

Eberl,G., Brawand,P., and MacDonald,H.R. (2000). Selective Bystander Proliferation of Memory CD4+ and CD8+ T Cells Upon NK T or T Cell Activation. *J Immunol* 165, 4305-4311.

Emoto,M., Emoto,Y., Buchwalow,I.B., and Kaufmann,S.H. (1999a). Induction of IFN-gamma-producing CD4+ natural killer T cells by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin. *Eur. J Immunol* 29, 650-659.

Emoto,M., Emoto,Y., and Kaufmann,S.H. (1995a). IL-4 producing CD4+ TCR alpha beta int liver lymphocytes: influence of thymus, beta 2-microglobulin and NK1.1 expression. *Int. Immunol* 7, 1729-1739.

Emoto,M., Emoto,Y., and Kaufmann,S.H. (1995b). Interleukin-4-producing CD4+ NK1.1+ TCR alpha/beta intermediate liver lymphocytes are down-regulated by *Listeria monocytogenes*. *Eur. J Immunol* 25, 3321-3325.

Emoto,M. and Kaufmann,S.H. (2003). Liver NKT cells: an account of heterogeneity. *Trends*

Immunol. *24*, 364-369.

Emoto,M., Mittrucker,H.W., Schmits,R., Mak,T.W., and Kaufmann,S.H.E. (1999b). Critical Role of Leukocyte Function-Associated Antigen-1 in Liver Accumulation of CD4+NKT Cells. *J Immunol* *162*, 5094-5098.

Esteban,L.M., Tsoutsman,T., Jordan,M.A., Roach,D., Poulton,L.D., Brooks,A., Naidenko,O.V., Sidobre,S., Godfrey,D.I., and Baxter,A.G. (2003). Genetic Control of NKT Cell Numbers Maps to Major Diabetes and Lupus Loci. *J Immunol* *171*, 2873-2878.

Falcone,M., Facciotti,F., Ghidoli,N., Monti,P., Olivieri,S., Zaccagnino,L., Bonifacio,E., Casorati,G., Sanvito,F., and Sarvetnick,N. (2004). Up-regulation of CD1d expression restores the immunoregulatory function of NKT cells and prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* *172*, 5908-5916.

Falcone,M. and Sarvetnick,N. (1999). Cytokines that regulate autoimmune responses. *Curr. Opin. Immunol* *11*, 670-676.

Falcone,M., Yeung,B., Tucker,L., Rodriguez,E., and Sarvetnick,N. (1999). A defect in interleukin 12-induced activation and interferon gamma secretion of peripheral natural killer T cells in nonobese diabetic mice suggests new pathogenic mechanisms for insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp. Med.* *190*, 963-972.

Faunce,D.E. and Stein-Streilein,J. (2002). NKT cell-derived RANTES recruits APCs and CD8+ T cells to the spleen during the generation of regulatory T cells in tolerance. *J Immunol* *169*, 31-38.

Fischer,K., Scotet,E., Niemeyer,M., Koebernick,H., Zerrahn,J., Maillet,S., Hurwitz,R., Kursar,M., Bonneville,M., Kaufmann,S.H.E., and Schaible,U.E. (2004). Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *PNAS* *101*, 10685-10690.

Fritz,R.B. and Zhao,M.L. (2001). Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in the C57BL/6J mouse by NK1.1+, DX5+, alpha beta+ T cells. *J Immunol* *166*, 4209-4215.

Fujii,S.i., Shimizu,K., Smith,C., Bonifaz,L., and Steinman,R.M. (2003). Activation of Natural Killer T Cells by α -Galactosylceramide Rapidly Induces the Full Maturation of Dendritic Cells In Vivo and Thereby Acts as an Adjuvant for Combined CD4 and CD8 T Cell Immunity to a Coadministered Protein. *J. Exp. Med.* *198*, 267-279.

Furlan,R., Bergami,A., Cantarella,D., Brambilla,E., Taniguchi,M., Dellabona,P., Casorati,G., and Martino,G. (2003). Activation of invariant NKT cells by alphaGalCer administration protects mice from MOG35-55-induced EAE: critical roles for administration route and IFN-gamma. *Eur. J Immunol* *33*, 1830-1838.

Galli,G., Nuti,S., Tavarini,S., Galli-Stampino,L., De Lalla,C., Casorati,G., Dellabona,P., and Abrignani,S. (2003). CD1d-restricted Help To B Cells By Human Invariant Natural Killer T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* *197*, 1051-1057.

- Gapin,L., Matsuda,J.L., Surh,C.D., and Kronenberg,M. (2001). NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol* 2, 971-978.
- Geissmann,F., Cameron,T.O., Sidobre,S., Manlongat,N., Kronenberg,M., Briskin,M.J., Dustin,M.L., and Littman,D.R. (2005). Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids. *PLoS. Biol.* 3, e113.
- Gombert,J.M., Herbelin,A., Tancrede-Bohin,E., Dy,M., Carnaud,C., and Bach,J.F. (1996a). Early quantitative and functional deficiency of NK1+-like thymocytes in the NOD mouse. *Eur. J. Immunol.* 26, 2989-2998.
- Gombert,J.M., Tancrede-Bohin,E., Hameg,A., Leite-de-Moraes,M.C., Vicari,A., Bach,J.F., and Herbelin,A. (1996b). IL-7 reverses NK1+ T cell-defective IL-4 production in the non-obese diabetic mouse. *Int. Immunol* 8, 1751-1758.
- Gourdy,P., Araujo,L.M., Zhu,R., Garmy-Susini,B., Diem,S., Laurell,H., Leite-de-Moraes,M., Dy,M., Arnal,J.F., Bayard,F., and Herbelin,A. (2005). Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN- γ production by invariant natural killer T cells. *Blood* 105, 2415-2420.
- Guillot,C., Coathalem,H., Chetritt,J., David,A., Lowenstein,P., Gilbert,E., Tesson,L., van Rooijen,N., Cuturi,M.C., Soulillou,J.P., and Anegon,I. (2001). Lethal Hepatitis After Gene Transfer of IL-4 in the Liver Is Independent of Immune Responses and Dependent on Apoptosis of Hepatocytes: A Rodent Model of IL-4-Induced Hepatitis. *J Immunol* 166, 5225-5235.
- Hameg,A., Gouarin,C., Gombert,J.M., Hong,S., Van Kaer,L., Bach,J.F., and Herbelin,A. (1999). IL-7 Up-Regulates IL-4 Production by Splenic NK1.1+ and NK1.1- MHC Class I-Like/CD1-Dependent CD4+ T Cells. *J Immunol* 162, 7067-7074.
- Hammond,K.J., Pelikan,S.B., Crowe,N.Y., Randle-Barrett,E., Nakayama,T., Taniguchi,M., Smyth,M.J., van Driel,I.R., Scollay,R., Baxter,A.G., and Godfrey,D.I. (1999). NKT cells are phenotypically and functionally diverse. *Eur. J Immunol* 29, 3768-3781.
- Hammond,K.J., Poulton,L.D., Palmisano,L.J., Silveira,P.A., Godfrey,D.I., and Baxter,A.G. (1998). α/β -T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp. Med.* 187, 1047-1056.
- Hansen,D.S., Siomos,M.A., Buckingham,L., Scalzo,A.A., and Schofield,L. (2003). Regulation of murine cerebral malaria pathogenesis by CD1d-restricted NKT cells and the natural killer complex. *Immunity* 18, 391-402.
- Harada,M., Seino,K., Wakao,H., Sakata,S., Ishizuka,Y., Ito,T., Kojo,S., Nakayama,T., and Taniguchi,M. (2004). Down-regulation of the invariant Valpha14 antigen receptor in NKT cells upon activation. *Int. Immunol* 16, 241-247.
- Hashimoto,D., Asakura,S., Miyake,S., Yamamura,T., Van Kaer,L., Liu,C., Tanimoto,M., and Teshima,T. (2005). Stimulation of Host NKT Cells by Synthetic Glycolipid Regulates Acute

- Graft-versus-Host Disease by Inducing Th2 Polarization of Donor T Cells. *J Immunol* 174, 551-556.
- Hayakawa, Y., Berzins, S.P., Crowe, N.Y., Godfrey, D.I., and Smyth, M.J. (2004). Antigen-induced tolerance by intrathymic modulation of self-recognizing inhibitory receptors. *Nat Immunol* 5, 590-596.
- Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., Van Kaer, L., Saiki, I., and Okumura, K. (2001). Differential Regulation of Th1 and Th2 Functions of NKT Cells by CD28 and CD40 Costimulatory Pathways. *J Immunol* 166, 6012-6018.
- Heller, F., Fuss, I.J., Nieuwenhuis, E.E., Blumberg, R.S., and Strober, W. (2002). Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 17, 629-638.
- Herbelin, A., Gombert, J.M., Lepault, F., Bach, J.F., and Chatenoud, L. (1998). Mature Mainstream TCR α β +CD4+ Thymocytes Expressing L-Selectin Mediate "Active Tolerance" in the Nonobese Diabetic Mouse. *J Immunol* 161, 2620-2628.
- Herkel, J., Schuchmann, M., Tiegs, G., and Lohse, A.W. (2005). Immune-mediated liver injury. *J Hepatol.* 42, 920-923.
- Hill, N.J., Van Gunst, K., and Sarvetnick, N. (2003). Th1 and Th2 pancreatic inflammation differentially affects homing of islet-reactive CD4 cells in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 170, 1649-1658.
- Hong, S., Wilson, M.T., Serizawa, I., Wu, L., Singh, N., Naidenko, O.V., Miura, T., Haba, T., Scherer, D.C., Wei, J., Kronenberg, M., Koezuka, Y., and Van Kaer, L. (2001). The natural killer T-cell ligand α -galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med.* 7, 1052-1056.
- Hu, Y., Nakagawa, Y., Purushotham, K.R., and Humphreys-Beher, M.G. (1992). Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. *Am. J Physiol* 263, E607-E614.
- Jahng, A.W., Maricic, I., Pedersen, B., Burdin, N., Naidenko, O., Kronenberg, M., Koezuka, Y., and Kumar, V. (2001). Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp. Med.* 194, 1789-1799.
- Jaruga, B., Hong, F., Sun, R., Radaeva, S., and Gao, B. (2003). Crucial Role of IL-4/STAT6 in T Cell-Mediated Hepatitis: Up-Regulating Eotaxins and IL-5 and Recruiting Leukocytes. *J Immunol* 171, 3233-3244.
- Johnston, B., Kim, C.H., Soler, D., Emoto, M., and Butcher, E.C. (2003). Differential Chemokine Responses and Homing Patterns of Murine TCR α β NKT Cell Subsets. *J Immunol* 171, 2960-2969.
- Joyce, S. (2001). CD1d and natural T cells: how their properties jump-start the immune system. *Cell Mol. Life Sci* 58, 442-469.

- Kaer,L.V. (2005). [alpha]-GALACTOSYLCERAMIDE THERAPY FOR AUTOIMMUNE DISEASES: PROSPECTS AND OBSTACLES. *Nat Rev Immunol* 5, 31-42.
- Kaneda,H., Takeda,K., Ota,T., Kaduka,Y., Akiba,H., Ikarashi,Y., Wakasugi,H., Kronenberg,M., Kinoshita,K., Yagita,H., and Okumura,K. (2005). ICOS costimulates invariant NKT cell activation. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 327, 201-207.
- Kaneko,Y., Harada,M., Kawano,T., Yamashita,M., Shibata,Y., Gejyo,F., Nakayama,T., and Taniguchi,M. (2000). Augmentation of Valpha14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J. Exp. Med.* 191, 105-114.
- Kawakami,K., Kinjo,Y., Uezu,K., Yara,S., Miyagi,K., Koguchi,Y., Nakayama,T., Taniguchi,M., and Saito,A. (2002). Minimal contribution of Valpha14 natural killer T cells to Th1 response and host resistance against mycobacterial infection in mice. *Microbiol. Immunol* 46, 207-210.
- Kawano,T., Cui,J., Koezuka,Y., Toura,I., Kaneko,Y., Motoki,K., Ueno,H., Nakagawa,R., Sato,H., Kondo,E., Koseki,H., and Taniguchi,M. (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278, 1626-1629.
- Kawano,T., Cui,J., Koezuka,Y., Toura,I., Kaneko,Y., Sato,H., Kondo,E., Harada,M., Koseki,H., Nakayama,T., Tanaka,Y., and Taniguchi,M. (1998). Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha 14 NKT cells. *PNAS* 95, 5690-5693.
- Kinjo,Y., Wu,D., Kim,G., Xing,G.W., Poles,M.A., Ho,D.D., Tsuji,M., Kawahara,K., Wong,C.H., and Kronenberg,M. (2005). Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* 434, 520-525.
- Kita,H., Naidenko,O.V., Kronenberg,M., Ansari,A.A., Rogers,P., He,X.S., Koning,F., Mikayama,T., Van De,W.J., Coppel,R.L., Kaplan,M., and Gershwin,M.E. (2002). Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology* 123, 1031-1043.
- Kitamura,H., Iwakabe,K., Yahata,T., Nishimura,S.i., Ohta,A., Ohmi,Y., Sato,M., Takeda,K., Okumura,K., Van Kaer,L., Kawano,T., Taniguchi,M., and Nishimura,T. (1999). The Natural Killer T (NKT) Cell Ligand alpha -Galactosylceramide Demonstrates Its Immunopotentiating Effect by Inducing Interleukin (IL)-12 Production by Dendritic Cells and IL-12 Receptor Expression on NKT Cells. *J. Exp. Med.* 189, 1121-1128.
- Kojo,S., Seino,K.i., Harada,M., Watarai,H., Wakao,H., Uchida,T., Nakayama,T., and Taniguchi,M. (2005). Induction of Regulatory Properties in Dendritic Cells by V{alpha}14 NKT Cells. *J Immunol* 175, 3648-3655.
- Kronenberg,M. (2005). TOWARD AN UNDERSTANDING OF NKT CELL BIOLOGY: Progress and Paradoxes. *Annual Review of Immunology* 23, 877-900.
- Kronenberg,M. and Gapin,L. (2002). THE UNCONVENTIONAL LIFESTYLE OF NKT CELLS. *Nat Rev Immunol* 2, 557-568.

- Kukreja,A., Cost,G., Marker,J., Zhang,C., Sun,Z., Lin-Su,K., Ten,S., Sanz,M., Exley,M., Wilson,B., Porcelli,S., and Maclaren,N. (2002). Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin. Invest* 109, 131-140.
- Kusters,S., Gantner,F., Kunstle,G, and Tiegs,G. (1996). Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concanavalin A. *Gastroenterology* 111, 462-471.
- Kusters,S., Tiegs,G, Alexopoulou,L., Pasparakis,M., Douni,E., Kunstle,G, Bluethmann,H., Wendel,A., Pfizenmaier,K., Kollias,G, and Grell,M. (1997). In vivo evidence for a functional role of both tumor necrosis factor (TNF) receptors and transmembrane TNF in experimental hepatitis. *Eur. J. Immunol.* 27, 2870-2875.
- Lantz,O. and Bendelac,A. (1994). An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J. Exp. Med.* 180, 1097-1106.
- Le Borgne,M., Etchart,N., Goubier,A., Lira,S.A., Sirard,J.C., van Rooijen,N., Caux,C., Ait-Yahia,S., Vicari,A., Kaiserlian,D., and Dubois,B. (2006). Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8+ T cell crosspriming in vivo. *Immunity* 24, 191-201.
- Lehuen,A., Lantz,O., Beaudoin,L., Laloux,V., Carnaud,C., Bendelac,A., Bach,J.F., and Monteiro,R.C. (1998). Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J Exp. Med.* 188, 1831-1839.
- Leite-De-Moraes,M.C., Hameg,A., Pacilio,M., Koezuka,Y., Taniguchi,M., Van Kaer,L., Schneider,E., Dy,M., and Herbelin,A. (2001). IL-18 enhances IL-4 production by ligand-activated NKT lymphocytes: a pro-Th2 effect of IL-18 exerted through NKT cells. *J Immunol* 166, 945-951.
- Leite-de-Moraes,M.C., Herbelin,A., Gombert,J.M., Vicari,A., Papiernik,M., and Dy,M. (1997). Requirement of IL-7 for IL-4-producing potential of MHC class I-selected CD4-CD8-TCR alpha beta+ thymocytes. *Int. Immunol* 9, 73-79.
- Leite-De-Moraes,M.C., Moreau,G, Arnould,A., Machavoine,F., Garcia,C., Papiernik,M., and Dy,M. (1998). IL-4-producing NK T cells are biased towards IFN-gamma production by IL-12. Influence of the microenvironment on the functional capacities of NK T cells. *Eur. J Immunol* 28, 1507-1515.
- Lenschow,D.J., Ho,S.C., Sattar,H., Rhee,L., Gray,G, Nabavi,N., Herold,K.C., and Bluestone,J.A. (1995). Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Exp. Med.* 181, 1145-1155.
- Lepault,F., Gagnerault,M.C., Faveeuw,C., Bazin,H., and Boitard,C. (1995). Lack of L-selectin expression by cells transferring diabetes in NOD mice: insights into the mechanisms involved in diabetes prevention by Mel-14 antibody treatment. *Eur. J Immunol* 25, 1502-1507.

- Lepault,F. and Gagnerault,M.C. (2000). Characterization of Peripheral Regulatory CD4+ T Cells That Prevent Diabetes Onset in Nonobese Diabetic Mice. *J Immunol* *164*, 240-247.
- Lisbonne,M., Diem,S., de Castro,K.A., Lefort,J., Araujo,L.M., Hachem,P., Fourneau,J.M., Sidobre,S., Kronenberg,M., Taniguchi,M., Van Endert,P., Dy,M., Askenase,P., Russo,M., Vargaftig,B.B., Herbelin,A., and Leite-de-Moraes,M.C. (2003). Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J Immunol* *171*, 1637-1641.
- Liu,R., La Cava,A., Bai,X.F., Jee,Y., Price,M., Campagnolo,D.I., Christadoss,P., Vollmer,T.L., Van Kaer,L., and Shi,F.D. (2005). Cooperation of Invariant NKT Cells and CD4+CD25+ T Regulatory Cells in the Prevention of Autoimmune Myasthenia. *J Immunol* *175*, 7898-7904.
- Louis,H., Le Moine,O., Peny,M.O., Quertinmont,E., Fokan,D., Goldman,M., and Deviere,J. (1997). Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* *25*, 1382-1389.
- Maeda,M., Lohwasser,S., Yamamura,T., and Takei,F. (2001). Regulation of NKT cells by Ly49: analysis of primary NKT cells and generation of NKT cell line. *J Immunol* *167*, 4180-4186.
- Mallevaey,T., Zanetta,J.P., Faveeuw,C., Fontaine,J., Maes,E., Platt,F., Capron,M., de Moraes,M.L., and Trottein,F. (2006). Activation of Invariant NKT Cells by the Helminth Parasite *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* *176*, 2476-2485.
- Many,M.C., Maniratunga,S., and Deneff,J.F. (1996). The non-obese diabetic (NOD) mouse: an animal model for autoimmune thyroiditis. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* *104 Suppl 3*, 17-20.
- Marleau,A.M. and Singh,B. (2002). Myeloid dendritic cells in non-obese diabetic mice have elevated costimulatory and T helper-1-inducing abilities. *J Autoimmun.* *19*, 23-35.
- Mars,L.T., Laloux,V., Goude,K., Desbois,S., Saoudi,A., Van Kaer,L., Lassmann,H., Herbelin,A., Lehuen,A., and Liblau,R.S. (2002). Cutting edge: V alpha 14-J alpha 281 NKT cells naturally regulate experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice. *J Immunol* *168*, 6007-6011.
- Masuda,K., Makino,Y., Cui,J., Ito,T., Tokuhisa,T., Takahama,Y., Koseki,H., Tsuchida,K., Koike,T., Moriya,H., Amano,M., and Taniguchi,M. (1997). Phenotypes and invariant alpha beta TCR expression of peripheral V alpha 14+ NK T cells. *J Immunol* *158*, 2076-2082.
- Matsuda,J.L. and Gapin,L. (2005). Developmental program of mouse Valpha14i NKT cells. *Curr. Opin. Immunol* *17*, 122-130.
- Matsuda,J.L., Gapin,L., Baron,J.L., Sidobre,S., Stetson,D.B., Mohrs,M., Locksley,R.M., and Kronenberg,M. (2003). Mouse V{alpha}14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo. *PNAS* *100*, 8395-8400.
- Matsuda,J.L., Gapin,L., Fazilleau,N., Warren,K., Naidenko,O.V., and Kronenberg,M. (2001). Natural killer T cells reactive to a single glycolipid exhibit a highly diverse T cell receptor beta repertoire and small clone size. *PNAS* *98*, 12636-12641.

- Matsuda,J.L., Naidenko,O.V., Gapin,L., Nakayama,T., Taniguchi,M., Wang,C.R., Koezuka,Y., and Kronenberg,M. (2000). Tracking the Response of Natural Killer T Cells to a Glycolipid Antigen Using CD1d Tetramers. *J. Exp. Med.* 192, 741-754.
- Mattner,J., Debord,K.L., Ismail,N., Goff,R.D., Cantu,C., III, Zhou,D., Saint-Mezard,P., Wang,V., Gao,Y., Yin,N., Hoebe,K., Schneewind,O., Walker,D., Beutler,B., Teyton,L., Savage,P.B., and Bendelac,A. (2005). Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 434, 525-529.
- McNab,F.W., Berzins,S.P., Pellicci,D.G., Kyparissoudis,K., Field,K., Smyth,M.J., and Godfrey,D.I. (2005). The Influence of CD1d in Postselection NKT Cell Maturation and Homeostasis. *J Immunol* 175, 3762-3768.
- Mendiratta,S.K., Martin,W.D., Hong,S., Boesteanu,A., Joyce,S., and Van Kaer,L. (1997). CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity* 6, 469-477.
- Mi,Q.S., Ly,D., Zucker,P., McGarry,M., and Delovitch,T.L. (2004). Interleukin-4 but not interleukin-10 protects against spontaneous and recurrent type 1 diabetes by activated CD1d-restricted invariant natural killer T-cells. *Diabetes* 53, 1303-1310.
- Miellot,A., Zhu,R., Diem,S., Boissier,M.C., Herbelin,A., and Bessis,N. (2005). Activation of invariant NK T cells protects against experimental rheumatoid arthritis by an IL-10-dependent pathway. *Eur. J Immunol* 35, 3704-3713.
- Miyamoto,K., Miyake,S., and Yamamura,T. (2001). A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 413, 531-534.
- Morecki,S., Panigrahi,S., Pizov,G., Yacovlev,E., Gelfand,Y., Eizik,O., and Slavin,S. (2004). Effect of KRN7000 on induced graft-vs-host disease. *Exp. Hematol.* 32, 630-637.
- Morshed,S.R., Mannoor,K., Halder,R.C., Kawamura,H., Bannai,M., Sekikawa,H., Watanabe,H., and Abo,T. (2002). Tissue-specific expansion of NKT and CD5+B cells at the onset of autoimmune disease in (NZBxNZW)F1 mice. *Eur. J Immunol* 32, 2551-2561.
- Moser,B. and Loetscher,P. (2001). Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2, 123-128.
- Natori,T., koezuka,Y., and Higa,T. (1993). Agelasphins, novel a-galactosylceramides from the marines sponge *Agelas Maurititanus*. *Tetrahedron lett* 34, 5591-5592.
- Naumov,Y.N., Bahjat,K.S., Gausling,R., Abraham,R., Exley,M.A., Koezuka,Y., Balk,S.B., Strominger,J.L., Clare-Salzer,M., and Wilson,S.B. (2001a). Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets. *Proc. Natl. Acad Sci U. S. A* 98, 13838-13843.
- Naumov,Y.N., Bahjat,K.S., Gausling,R., Abraham,R., Exley,M.A., Koezuka,Y., Balk,S.B., Strominger,J.L., Clare-Salzer,M., and Wilson,S.B. (2001b). Activation of CD1d-restricted T

cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets
2. Proc. Natl. Acad Sci U. S. A 98, 13838-13843.

Nichols,K.E., Hom,J., Gong,S.Y., Ganguly,A., Ma,C.S., Cannons,J.L., Tangye,S.G., Schwartzberg,P.L., Koretzky,G.A., and Stein,P.L. (2005). Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nat Med.* 11, 340-345.

Nicoletti,F., Di Marco,R., Zacccone,P., Salvaggio,A., Magro,G., Bendtzen,K., and Meroni,P. (2000). Murine concanavalin A-induced hepatitis is prevented by interleukin 12 (IL-12) antibody and exacerbated by exogenous IL-12 through an interferon-gamma-dependent mechanism. *Hepatology* 32, 728-733.

Nieda,M., Nicol,A., Koezuka,Y., Kikuchi,A., Lapteva,N., Tanaka,Y., Tokunaga,K., Suzuki,K., Kayagaki,N., Yagita,H., Hirai,H., and Juji,T. (2001). TRAIL expression by activated human CD4+V α 24NKT cells induces in vitro and in vivo apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Blood* 97, 2067-2074.

Novak,J., Beaudoin,L., Griseri,T., and Lehuen,A. (2005). Inhibition of T Cell Differentiation into Effectors by NKT Cells Requires Cell Contacts. *J Immunol* 174, 1954-1961.

Nuti,S., Rosa,D., Valiante,N.M., Saletti,G., Caratozzolo,M., Dellabona,P., Barnaba,V., and Abrignani,S. (1998). Dynamics of intra-hepatic lymphocytes in chronic hepatitis C: enrichment for V α 24+ T cells and rapid elimination of effector cells by apoptosis. *Eur. J Immunol* 28, 3448-3455.

Ohnishi,Y., Tsutsumi,A., Goto,D., Itoh,S., Matsumoto,I., Taniguchi,M., and Sumida,T. (2005). TCR V α 14 natural killer T cells function as effector T cells in mice with collagen-induced arthritis. *Clin. Exp. Immunol* 141, 47-53.

Ohteki,T. and MacDonald,H.R. (1994). Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4+8- and CD4-8- subsets of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells in the liver of mice. *J Exp. Med.* 180, 699-704.

Osman,Y., Kawamura,T., Naito,T., Takeda,K., Van Kaer,L., Okumura,K., and Abo,T. (2000). Activation of hepatic NKT cells and subsequent liver injury following administration of alpha-galactosylceramide. *Eur. J Immunol* 30, 1919-1928.

Owens,T., Wekerle,H., and Antel,J. (2001). Genetic models for CNS inflammation. *Nat Med.* 7, 161-166.

Pal,E., Tabira,T., Kawano,T., Taniguchi,M., Miyake,S., and Yamamura,T. (2001). Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of V α 14 NK T cells. *J Immunol* 166, 662-668.

Parekh,V.V., Wilson,M.T., Olivares-Villagomez,D., Singh,A.K., Wu,L., Wang,C.R., Joyce,S., and Van Kaer,L. (2005). Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice. *J Clin. Invest* 115, 2572-2583.

Park,S.H., Benlagha,K., Lee,D., Balish,E., and Bendelac,A. (2000). Unaltered phenotype,

tissue distribution and function of V α 14(+) NKT cells in germ-free mice. *Eur. J Immunol* 30, 620-625.

Park,S.H., Kyin,T., Bendelac,A., and Carnaud,C. (2003). The Contribution of NKT Cells, NK Cells, and Other γ -Chain-Dependent Non-T Non-B Cells to IL-12-Mediated Rejection of Tumors. *J Immunol* 170, 1197-1201.

Pasquier,B., Yin,L., Fondaneche,M.C., Relouzat,F., Bloch-Queyrat,C., Lambert,N., Fischer,A., Saint-Basile,G., and Latour,S. (2005). Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J. Exp. Med.* 201, 695-701.

Pellicci,D.G., Hammond,K.J., Uldrich,A.P., Baxter,A.G., Smyth,M.J., and Godfrey,D.I. (2002). A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. *J Exp. Med.* 195, 835-844.

Perola,O., Nousiainen,T., Suomalainen,S., Aukee,S., Karkkainen,U.M., Kauppinen,J., Ojanen,T., and Katila,M.L. (2002). Recurrent *Sphingomonas paucimobilis* -bacteraemia associated with a multi-bacterial water-borne epidemic among neutropenic patients. *J Hosp. Infect.* 50, 196-201.

Poligone,B., Weaver,D.J., Jr., Sen,P., Baldwin,A.S., Jr., and Tisch,R. (2002). Elevated NF-kappaB activation in nonobese diabetic mouse dendritic cells results in enhanced APC function. *J Immunol* 168, 188-196.

Porcelli,S.A. and Modlin,R.L. (1999). The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu. Rev Immunol* 17, 297-329.

Poulton,L.D., Smyth,M.J., Hawke,C.G., Silveira,P., Shepherd,D., Naidenko,O.V., Godfrey,D.I., and Baxter,A.G. (2001). Cytometric and functional analyses of NK and NKT cell deficiencies in NOD mice. *Int. Immunol.* 13, 887-896.

Rabinovitch,A. (1994). Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes* 43, 613-621.

Rabinovitch,A., Suarez-Pinzon,W.L., Sorensen,O., Bleackley,R.C., and Power,R.F. (1995). IFN-gamma gene expression in pancreatic islet-infiltrating mononuclear cells correlates with autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 154, 4874-4882.

Ranson,T., Bregenholt,S., Lehuen,A., Gaillot,O., Leite-de-Moraes,M.C., Herbelin,A., Berche,P., and Di Santo,J.P. (2005). Invariant V α 14+ NKT Cells Participate in the Early Response to Enteric *Listeria monocytogenes* Infection. *J Immunol* 175, 1137-1144.

Rapoport,M.J., Jaramillo,A., Zipris,D., Lazarus,A.H., Serreze,D.V., Leiter,E.H., Cyopick,P., Danska,J.S., and Delovitch,T.L. (1993). Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp. Med.* 178, 87-99.

Rocha-Campos,A.C., Melki,R., Zhu,R., Deruytter,N., Damotte,D., Dy,M., Herbelin,A., and

- Garchon,H.J. (2006). Genetic and Functional Analysis of the Nkt1 Locus Using Congenic NOD Mice: Improved V α 14-NKT Cell Performance but Failure to Protect Against Type 1 Diabetes. *Diabetes* 55, 1163-1170.
- Rogner,U.C., Lepault,F., Gagnerault,M.C., Vallois,D., Morin,J., Avner,P., and Boitard,C. (2006). The diabetes type 1 locus Idd6 modulates activity of CD4+CD25+ regulatory T-cells. *Diabetes* 55, 186-192.
- Salomon,B., Lenschow,D.J., Rhee,L., Ashourian,N., Singh,B., Sharpe,A., and Bluestone,J.A. (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12, 431-440.
- Sass,G., Heinlein,S., Agli,A., Bang,R., Schumann,J., and Tiegs,G. (2002). Cytokine expression in three mouse models of experimental hepatitis. *Cytokine* 19, 115-120.
- Schmieg,J., Yang,G., Franck,R.W., and Tsuji,M. (2003). Superior Protection against Malaria and Melanoma Metastases by a C-glycoside Analogue of the Natural Killer T Cell Ligand α -Galactosylceramide. *J. Exp. Med.* 198, 1631-1641.
- Schmieg,J., Yang,G., Franck,R.W., Van Rooijen,N., and Tsuji,M. (2005). Glycolipid presentation to natural killer T cells differs in an organ-dependent fashion. *PNAS* 102, 1127-1132.
- Seder,R.A., Paul,W.E., Davis,M.M., and Fazekas de St.G.B. (1992). The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp. Med.* 176, 1091-1098.
- Seino,K.i., Fukao,K., Muramoto,K., Yanagisawa,K., Takada,Y., Kakuta,S., Iwakura,Y., Van Kaer,L., Takeda,K., Nakayama,T., Taniguchi,M., Bashuda,H., Yagita,H., and Okumura,K. (2001). Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *PNAS* 98, 2577-2581.
- Sharif,S., Arreaza,G.A., Zucker,P., Mi,Q.S., Sondhi,J., Naidenko,O.V., Kronenberg,M., Koezuka,Y., Delovitch,T.L., Gombert,J.M., Leite-De-Moraes,M., Gouarin,C., Zhu,R., Hameg,A., Nakayama,T., Taniguchi,M., Lepault,F., Lehuen,A., Bach,J.F., and Herbelin,A. (2001). Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat Med.* 7, 1057-1062.
- Shi,F.D., Flodstrom,M., Balasa,B., Kim,S.H., Van Gunst,K., Strominger,J.L., Wilson,S.B., and Sarvetnick,N. (2001). Germ line deletion of the CD1 locus exacerbates diabetes in the NOD mouse. *Proc. Natl. Acad Sci U. S. A* 98, 6777-6782.
- Shizuru,J.A., Taylor-Edwards,C., Banks,B.A., Gregory,A.K., and Fathman,C.G. (1988). Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes. *Science* 240, 659-662.
- Sidobre,S. and Kronenberg,M. (2002). CD1 tetramers: a powerful tool for the analysis of glycolipid-reactive T cells. *J Immunol Methods* 268, 107-121.

- Silveira,P.A. and Baxter,A.G. (2001). The NOD mouse as a model of SLE. *Autoimmunity* 34, 53-64.
- Simpson,P.B., Mistry,M.S., Maki,R.A., Yang,W., Schwarz,D.A., Johnson,E.B., Lio,F.M., and Alleva,D.G. (2003). Cutting edge: diabetes-associated quantitative trait locus, *Idd4*, is responsible for the IL-12p40 overexpression defect in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Immunol* 171, 3333-3337.
- Singh,A.K., Wilson,M.T., Hong,S., Olivares-Villagomez,D., Du,C., Stanic,A.K., Joyce,S., Sriram,S., Koezuka,Y., and Van Kaer,L. (2001). Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp. Med.* 194, 1801-1811.
- Singh,N., Hong,S., Scherer,D.C., Serizawa,I., Burdin,N., Kronenberg,M., Koezuka,Y., and Van Kaer,L. (1999). Cutting Edge: Activation of NK T Cells by CD1d and α -Galactosylceramide Directs Conventional T Cells to the Acquisition of a Th2 Phenotype. *J Immunol* 163, 2373-2377.
- Skold,M., Xiong,X., Illarionov,P.A., Besra,G.S., and Behar,S.M. (2005). Interplay of cytokines and microbial signals in regulation of CD1d expression and NKT cell activation. *J Immunol* 175, 3584-3593.
- Smyth,M.J., Crowe,N.Y., and Godfrey,D.I. (2001). NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int. Immunol.* 13, 459-463.
- Smyth,M.J., Crowe,N.Y., Pellicci,D.G., Kyparissoudis,K., Kelly,J.M., Takeda,K., Yagita,H., and Godfrey,D.I. (2002). Sequential production of interferon-gamma by NK1.1+ T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of α -galactosylceramide. *Blood* 99, 1259-1266.
- Smyth,M.J., Thia,K.Y.T., Street,S.E.A., Cretney,E., Trapani,J.A., Taniguchi,M., Kawano,T., Pelikan,S.B., Crowe,N.Y., and Godfrey,D.I. (2000a). Differential Tumor Surveillance by Natural Killer (NK) and NKT Cells. *J. Exp. Med.* 191, 661-668.
- Smyth,M.J., Thia,K.Y.T., Street,S.E.A., MacGregor,D., Godfrey,D.I., and Trapani,J.A. (2000b). Perforin-mediated Cytotoxicity Is Critical for Surveillance of Spontaneous Lymphoma. *J. Exp. Med.* 192, 755-760.
- Sonoda,K.H., Exley,M., Snapper,S., Balk,S.P., and Stein-Streilein,J. (1999). CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. *J Exp. Med.* 190, 1215-1226.
- Sonoda,K.H., Faunce,D.E., Taniguchi,M., Exley,M., Balk,S., and Stein-Streilein,J. (2001). NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. *J Immunol* 166, 42-50.
- Sonoda,K.H., Taniguchi,M., and Stein-Streilein,J. (2002). Long-Term Survival of Corneal Allografts Is Dependent on Intact CD1d-Reactive NKT Cells. *J Immunol* 168, 2028-2034.
- Steinman,R.M., Hawiger,D., and Nussenzweig,M.C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu.*

Rev Immunol 21, 685-711.

Stetson,D.B., Mohrs,M., Reinhardt,R.L., Baron,J.L., Wang,Z.E., Gapin,L., Kronenberg,M., and Locksley,R.M. (2003). Constitutive Cytokine mRNAs Mark Natural Killer (NK) and NK T Cells Poised for Rapid Effector Function. *J. Exp. Med.* 198, 1069-1076.

Sugawara,I., Yamada,H., Mizuno,S., Li,C.Y., Nakayama,T., and Taniguchi,M. (2002). Mycobacterial infection in natural killer T cell knockout mice. *Tuberculosis. (Edinb.)* 82, 97-104.

Tahara,H. and Lotze,M.T. (1995). Antitumor effects of interleukin-12 (IL-12): applications for the immunotherapy and gene therapy of cancer. *Gene Ther.* 2, 96-106.

Takeda,K., Hayakawa,Y., Van Kaer,L., Matsuda,H., Yagita,H., and Okumura,K. (2000a). Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 5498-5503.

Takeda,K., Hayakawa,Y., Atsuta,M., Hong,S., Van Kaer,L., Kobayashi,K., Ito,M., Yagita,H., and Okumura,K. (2000b). Relative contribution of NK and NKT cells to the anti-metastatic activities of IL-12. *Int. Immunol.* 12, 909-914.

Tang,Q., Adams,J.Y., Tooley,A.J., Bi,M., Fife,B.T., Serra,P., Santamaria,P., Locksley,R.M., Krummel,M.F., and Bluestone,J.A. (2006). Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol* 7, 83-92.

Terabe,M., Matsui,S., Noben-Trauth,N., Chen,H., Watson,C., Donaldson,D.D., Carbone,D.P., Paul,W.E., and Berzofsky,J.A. (2000). NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* 1, 515-520.

Tian,J., Lehmann,P.V., and Kaufman,D.L. (1997). Determinant Spreading of 燭 Helper Cell 2?Th2 Responses to Pancreatic Islet Autoantigens. *J. Exp. Med.* 186, 2039-2043.

Tian,J., Olcott,A.P., and Kaufman,D.L. (2002). Antigen-Based Immunotherapy Drives the Precocious Development of Autoimmunity. *J Immunol* 169, 6564-6569.

Tiegs,G., Hentschel,J., and Wendel,A. (1992). A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin. Invest* 90, 196-203.

Todd,J.A. and Wicker,L.S. (2001). Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models. *Immunity* 15, 387-395.

Townsend,M.J., Weinmann,A.S., Matsuda,J.L., Salomon,R., Farnham,P.J., Biron,C.A., Gapin,L., and Glimcher,L.H. (2004). T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity* 20, 477-494.

Trembleau,S., Penna,G., Bosi,E., Mortara,A., Gately,M.K., and Adorini,L. (1995). Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. *J Exp. Med.* 181, 817-821.

Ueda,H., Howson,J.M., Esposito,L., Heward,J., Snook,H., Chamberlain,G., Rainbow,D.B., Hunter,K.M., Smith,A.N., Di Genova,G., Herr,M.H., Dahlman,I., Payne,F., Smyth,D., Lowe,C.,

- Twells,R.C., Howlett,S., Healy,B., Nutland,S., Rance,H.E., Everett,V., Smink,L.J., Lam,A.C., Cordell,H.J., Walker,N.M., Bordin,C., Hulme,J., Motzo,C., Cucca,F., Hess,J.F., Metzker,M.L., Rogers,J., Gregory,S., Allahabadia,A., Nithiyanthan,R., Tuomilehto-Wolf,E., Tuomilehto,J., Bingley,P., Gillespie,K.M., Undlien,D.E., Ronningen,K.S., Guja,C., Ionescu-Tirgoviste,C., Savage,D.A., Maxwell,A.P., Carson,D.J., Patterson,C.C., Franklyn,J.A., Clayton,D.G., Peterson,L.B., Wicker,L.S., Todd,J.A., and Gough,S.C. (2003). Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423, 506-511.
- Vicari,A., de Moraes,M.d., Gombert,J.M., Dy,M., Penit,C., Papiernik,M., and Herbelin,A. (1994). Interleukin 7 induces preferential expansion of V beta 8.2+CD4-8- and V beta 8.2+CD4+8- murine thymocytes positively selected by class I molecules. *J. Exp. Med.* 180, 653-661.
- Vicari,A.P., Herbelin,A., Leite-de-Moraes,M.C., Freedden-Jeffry,U., Murray,R., and Zlotnik,A. (1996a). NK1.1+ T cells from IL-7-deficient mice have a normal distribution and selection but exhibit impaired cytokine production. *Int. Immunol* 8, 1759-1766.
- Vicari,A.P., Mocci,S., Openshaw,P., O'Garra,A., and Zlotnik,A. (1996b). Mouse gamma delta TCR+NK1.1+ thymocytes specifically produce interleukin-4, are major histocompatibility complex class I independent, and are developmentally related to alpha beta TCR+NK1.1+ thymocytes. *Eur. J Immunol* 26, 1424-1429.
- Vincent,M.S., Leslie,D.S., Gumperz,J.E., Xiong,X., Grant,E.P., and Brenner,M.B. (2002). CD1-dependent dendritic cell instruction. *Nat Immunol* 3, 1163-1168.
- Wang,B., Geng,Y.B., and Wang,C.R. (2001). CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes. *J Exp. Med.* 194, 313-320.
- Wang,B., Gonzalez,A., Benoist,C., and Mathis,D. (1996). The role of CD8+ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J Immunol* 26, 1762-1769.
- Wang,B., Gonzalez,A., Hoglund,P., Katz,J.D., Benoist,C., and Mathis,D. (1998). Interleukin-4 deficiency does not exacerbate disease in NOD mice. *Diabetes* 47, 1207-1211.
- Wei,D.G., Lee,H., Park,S.H., Beaudoin,L., Teyton,L., Lehuen,A., and Bendelac,A. (2005). Expansion and long-range differentiation of the NKT cell lineage in mice expressing CD1d exclusively on cortical thymocytes. *J. Exp. Med.* 202, 239-248.
- Wicker,L.S., Clark,J., Fraser,H.I., Garner,V.E., Gonzalez-Munoz,A., Healy,B., Howlett,S., Hunter,K., Rainbow,D., Rosa,R.L., Smink,L.J., Todd,J.A., and Peterson,L.B. (2005). Type 1 diabetes genes and pathways shared by humans and NOD mice. *J Autoimmun.* 25 *Suppl*, 29-33.
- Wicker,L.S., Miller,B.J., and Mullen,Y. (1986). Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes* 35, 855-860.
- Wicker,L.S., Todd,J.A., and Peterson,L.B. (1995). Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu. Rev Immunol* 13, 179-200.
- Wilson,M.T., Johansson,C., Olivares-Villagomez,D., Singh,A.K., Stanic,A.K., Wang,C.R.,

- Joyce,S., Wick,M.J., and Van Kaer,L. (2003). The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. *Proc. Natl. Acad Sci U. S. A* 100, 10913-10918.
- Wilson,S.B., Kent,S.C., Patton,K.T., Orban,T., Jackson,R.A., Exley,M., Porcelli,S., Schatz,D.A., Atkinson,M.A., Balk,S.P., Strominger,J.L., and Hafler,D.A. (1998). Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 391, 177-181.
- Yamamura,T., Miyamoto,K., Illes,Z., Pal,E., Araki,M., and Miyake,S. (2004). NKT cell-stimulating synthetic glycolipids as potential therapeutics for autoimmune disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 4, 561-567.
- Yang,J.Q., Singh,A.K., Wilson,M.T., Satoh,M., Stanic,A.K., Park,J.J., Hong,S., Gadola,S.D., Mizutani,A., Kakumanu,S.R., Reeves,W.H., Cerundolo,V., Joyce,S., Van Kaer,L., and Singh,R.R. (2003). Immunoregulatory Role of CD1d in the Hydrocarbon Oil-Induced Model of Lupus Nephritis. *J Immunol* 171, 2142-2153.
- Yang,Y., Bao,M., and Yoon,J.W. (2001). Intrinsic Defects in the T-Cell Lineage Results in Natural Killer T-Cell Deficiency and the Development of Diabetes in the Nonobese Diabetic Mouse. *Diabetes* 50, 2691-2699.
- Yang,Z., Chen,M., Ellett,J.D., Fialkow,L.B., Carter,J.D., McDuffie,M., and Nadler,J.L. (2004). Autoimmune diabetes is blocked in Stat4-deficient mice. *J Autoimmun.* 22, 191-200.
- Yasunami,Y., Kojo,S., Kitamura,H., Toyofuku,A., Satoh,M., Nakano,M., Nabeyama,K., Nakamura,Y., Matsuoka,N., Ikeda,S., Tanaka,M., Ono,J., Nagata,N., Ohara,O., and Taniguchi,M. (2005). Valpha14 NK T cell-triggered IFN-gamma production by Gr-1+CD11b+ cells mediates early graft loss of syngeneic transplanted islets. *J Exp. Med.* 202, 913-918.
- Yoshimoto,T., Bendelac,A., Hu-Li,J., and Paul,W.E. (1995). Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4+, NK1.1+ T cells that promptly produce interleukin 4. *Proc. Natl. Acad Sci U. S. A* 92, 11931-11934.
- Yoshimoto,T. and Paul,W.E. (1994). CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp. Med.* 179, 1285-1295.
- Yu,K.O.A., Im,J.S., Molano,A., Dutronc,Y., Illarionov,P.A., Forestier,C., Fujiwara,N., Arias,I., Miyake,S., Yamamura,T., Chang,Y.T., Besra,G.S., and Porcelli,S.A. (2005). Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of {alpha}-galactosylceramides. *PNAS* 102, 3383-3388.
- Zeng,D., Liu,Y., Sidobre,S., Kronenberg,M., and Strober,S. (2003). Activation of natural killer T cells in NZB/W mice induces Th1-type immune responses exacerbating lupus. *J. Clin. Invest.* 112, 1211-1222.
- Zeng,Z., Castano,A.R., Segelke,B.W., Stura,E.A., Peterson,P.A., and Wilson,I.A. (1997). Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* 277, 339-345.

Zhou,D., Mattner,J., Cantu,C., III, Schrantz,N., Yin,N., Gao,Y., Sagiv,Y., Hudspeth,K., Wu,Y.P., Yamashita,T., Teneberg,S., Wang,D., Proia,R.L., Lavery,S.B., Savage,P.B., Teyton,L., and Bendelac,A. (2004). Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 306, 1786-1789.

Dissection des fonctions régulatrices des cellules iNKT en situation auto-immune dans le modèle de la souris NOD.

Les cellules iNKT ont des propriétés régulatrices qui suscitent un intérêt particulier en immunopathologie. Mon travail de thèse a eu pour objectif de mesurer l'impact du défaut des cellules iNKT de la souris NOD dans deux situations auto-immunes : **1) le diabète de type 1**, une maladie développée spontanément par la souris NOD dans laquelle nous avons montré que les cellules iNKT, tout en constituant des cibles thérapeutiques sous l'impulsion de leur ligand α -GalCer n'ont pas d'activité protectrice spontanée; **2) l'hépatite induite par la ConA**, dont la moindre susceptibilité chez la souris NOD a révélé le caractère dominant du rôle délétère de la production d'IL-4 assurée surtout par les cellules iNKT spléniques et non hépatiques et qui est directement potentialisée par l'IL-12, une cytokine qui exacerbe la maladie. En conclusion, notre travail ouvre une nouvelle voie thérapeutique tout en illustrant le caractère ambivalent « mi ange, mi démon » des cellules iNKT en situation auto-immune.

Dissection of the regulatory functions of iNKT cells in autoimmune settings using the iNKT cell-deficient NOD mouse model

NKT cells are endowed with potent regulatory functions during the immune response, rendering their investigation in immunopathological situations particularly relevant. During my PhD studies I have examined the impact of iNKT cell deficiencies in NOD mice, using two autoimmune settings, namely type 1 diabetes and ConA-induced hepatitis. NOD mice develop insulin-dependent diabetes spontaneously. Their iNKT cell population is reduced, and even though it does not ensure protection against diabetes as such, it constitutes a sensitive therapeutic target of α -GalCer, which prevents the onset of the disease. On the other hand, we found that NOD mice were less prone to ConA-induced hepatitis than wild-type mice and provide evidence for a deleterious role of spleen- rather than liver-derived IL-4 in this pathology. Finally, we demonstrate that IL-12, acknowledged for its capacity to exacerbate the disease, can directly enhance IL-4 production by spleen iNKT cells. Taken together, our study reveals new therapeutic targets for immuno-intervention and highlights once again the contrasting biological effects of iNKT cells, both beneficial and detrimental.