



HAL
open science

Rôles et fonctions des récepteurs neurologiques dans la réponse immunitaire

Y. Lepelletier

► **To cite this version:**

Y. Lepelletier. Rôles et fonctions des récepteurs neurologiques dans la réponse immunitaire. Immunologie. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2006. Français. NNT : . tel-00086126

HAL Id: tel-00086126

<https://theses.hal.science/tel-00086126>

Submitted on 18 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.

UNIVERSITE PARIS VII-DENIS DIDEROT

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS VII

Spécialité : Biologie des cellules sanguines

Présentée par

Yves Leoelletier

**Rôles et fonctions des récepteurs neurologiques
dans le système immunitaire**

Soutenue publiquement le 17/05/2006 devant le jury composé de :

Pr. Christine Chomienne
Dr. Pascale Giraudon
Dr. Soohie Caillat-Zucman
Pr. Alain Fischer
Pr. Olivier Hermine

Président
Raoporteur
Raoporteur
Examineur
Directeur de Thèse

SOMMAIRE

Remerciements-----	6
Abréviations-----	13
Résumé-----	14
Avant-propos-----	15
INTRODUCTION-----	18
I. Les sémaphorines et leurs récepteurs-----	19
1. Classification des sémaphorines -----	19
1.1. Sémaphorines des organismes invertébrés -----	20
1.2. Sémaphorines des organismes vertébrés-----	20
1.3. Sémaphorines « virales » -----	21
2. Récepteurs et corécepteurs-----	22
2.1. Les récepteurs Neuropilines-----	22
2.1.1. La Neuropiline-1 (Np-1)-----	23
2.1.2. La Neuropiline-2 (Np-2)-----	23
2.1.3. Expression-----	24
2.2. Les corécepteurs associés aux neuropilines-----	25
2.2.1. Les plexines-----	25
2.2.2. L1-CAM-----	26
2.2.3. Les récepteurs aux VEGF-----	27
- Association de la Np-1 avec le KDR (VEGF-R2) -----	28
- Association de la Np-1 avec le Flt-1 (VEGF-R1)-----	29
3. Voies de transductions du signal-----	30
3.1. Protéine adaptatrice de la neuropiline (NIP) -----	30
3.2. Collapsin response mediator protein (CRMP)-----	30
3.3. Transduction de signal induit par les plexines-----	32
Rôle des protéines Rac-1 et RhoA-----	34
Rôle des GTPase-----	36

Phosphorylation des plexines-----	36
Modulation des effets de la sémaphorine-3A par l'AMPc et la GMPc--	38
4. Fonction des Nps et des sémaphorines dans le SNC et vasculaire-----	39
5. Les sémaphorines dans le cancer-----	40
6. Les sémaphorines et l'immunité-----	42
6.1. Les sémaphorines de classe IV dans la réponse immune-----	43
6.2. Les sémaphorines de classe III dans la réponse immune-----	44
II. De la sélection thymique à la synapse immunologique-----	46
1. Le Thymus-----	47
1.1. Les thymocytes et leurs partenaires-----	48
1.1.1. Fibroblastes mésenchymateux-----	48
1.1.2. Cellules épithéliales corticales et sélection positive-----	48
1.1.3. Cellules épithéliales médullaires, DC intrathymiques et sélection négative-----	49
1.2. Nature des contacts cellulaires en fonction de leur répartition-----	49
1.2.1. Dans le cortex-----	50
1.2.2. Dans la medulla-----	51
1.2.3. Migration des thymocytes dans le thymus-----	52
1.2.4. Molécules impliquées dans les mouvements intrathymiques-----	53
- Les chimiokines et leurs récepteurs-----	53
- Les intégrines-----	54
1.3. Différenciation intrathymique des thymocytes-----	55
1.3.1. Etapes du développement-----	56
1.3.2. La population triple négative (TN).-----	56
1.3.3. Analyse des marqueurs CD44 et CD25.-----	56
1.3.4. Les récepteurs IL-7R α / γ c et c-kit.-----	58
1.3.5. La population double positive (DP).-----	59
1.3.6. Les populations simples positives (SP).-----	60
1.3.7. Export thymique, migration et dynamique des populations-----	60
2. Réponse immunitaire : interactions LT/DC-----	62
2.1. Les cellules dendritiques.-----	62
2.1.1. Historique et différenciation.-----	62

2.1.2. Distinction entre les différentes sous populations de DC.	63
2.1.3. Caractérisation.	65
2.2. Description de la synapse immunologique	67
2.2.1. Les premiers contacts cellulaires	68
Adhésion initiale : rôle des intégrines	68
Importance des remodelages de l'actine	69
Elargissement de la surface de contact	69
Augmentation de l'adhésion par les intégrines	70
Signal stop et forme sphérique	70
2.2.2. Modulations du cytosquelette de microtubules	70
- Le MTOC/centrosome	71
- La réorientation du MTOC	71
3. Synapses immunologiques T/DC	72
3.1. Organisation des protéines dans le recrutement du TCR	72
3.1.1. Des signaux dépendants du TCR	72
3.1.2. Le cytosquelette d'actine	73
3.1.3. Raft	73
3.1.4. Recrutement du TCR dans les rafts	74
3.1.5. Recrutement des rafts dans la synapse	74
3.1.6. Rôle de l'agrine dans la synapse	75
3.1.7. Mécanismes impliqués dans l'assemblage des intégrines	75
3.2. Mécanismes et fonctions de la polarisation du MTOC.	76
3.2.1. Rôle de ZAP-70.	76
3.2.2. Rôle des CPA.	77

OBJECTIFS DE LA THESE-----78

ARTICLE N°1

A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response-----81

ARTICLE N°2

Neuropilin-1/Semaphorin-3A interaction participate to DC-T cell synapse formation-84

ARTICLE N°3

Control of thymocyte migration and differentiation by Neuropilin-1/Semaphorin-3A

mediated interactions-----	118
DISCUSSION-----	146
ANNEXE-----	155
ANNEXE N°1	
Neuropilin-1 is involved in HTLV-1 entry.-----	156
ANNEXE N°2	
Human dendritic cells upregulate two IgA receptors (CD89 and CD71) during maturation that differentially trigger IgA complex endocytosis-----	157
ANNEXE N°3	
Common variable immunodeficiency is associated with defective functions of dendritic cells-----	158
ANNEXE N°4	
Natural antibodies sustain differentiation and maturation of human dendritic cells---	159
ANNEXE N°5	
Retinoids Regulate Survival and Antigen Presentation by Immature Dendritic Cells-	160
ANNEXE N°6	
No Association Between Langerhans Cell Histiocytosis and Human Herpes Virus 8-	161
ANNEXE N°7	
DOR-1, a novel CD10 ⁺ stroma cell lines derived from progressive Langerhans cell Histiocytosis of bone-----	162
REFERENCES-----	163

REMERCIEMENTS

Je remercie les personnes Dr. C. Chomiienne, Dr. S. Caïllat-Zucman, Dr. P. Giraudon, Pr. A. Fischer, et Pr. O. Hermine qui ont accepté de participer au jury de cette thèse.

Dès L'EST'BA :

Présentation inoubliable par les Drs. Olivier Hermine et Frédéric Geissmann du projet de stage pour les étudiants en recherche biomédicale option immunologie où il nous a plus semblé que la compréhension humaine et la bonne humeur faisaient plus à elles deux avancer la recherche que la mauvaise humeur associée à la considération inhumaine. Il semblait donc faire bon vivre et travailler dans cette jeune équipe.

Arrivée au Laboratoire :

Je souhaite renouveler ici mes remerciements aux Professeurs Varet et Hermine pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire dès ma sortie de BTS. Ce stage a été obtenu non sans mal, après de longues journées de harcèlement auprès du Professeur Hermine (juste pour t'embêter un peu). Je me souviendrai toujours de ma panique à l'idée de songer aux réunions de recherche à huit clos dans le bureau du Professeur Varet, si intimidant quand on ne le connaît pas. Mais aussi à Mme M. Dardenne et Michel Dy qui m'ont accueilli au sein de l'unité avec la plus grande ouverture d'esprit et sollicitude.

Je tiens aussi à remercier les membres de l'équipe d'Olivier, Joëlle Kersual, Yaël Zermati, ainsi que celle d'Elizabeth M. avec qui nous avons partagé le laboratoire au début et notamment Eric Delabesse et Muriel Bernard.

Que le groupe d'étude français des Histiocytoses (Jean Donadiéu, Jean-François Emile, Nicole Brousse, etc) trouve ici l'expression de ma considération pour m'avoir soutenu aussi bien moralement que pécuniairement tout au long de ces premières années et des projets.

Je remercie également Frédéric Geissmann de m'avoir appris certaines ficelles de ce métier que ce soit techniquement ou humainement. Sa confiance mémorable dans mon travail toutes ces années durant m'a apporté une vision différente de l'enseignement et de la façon d'encadrer et de motiver les étudiants.

Au fil des ans :

Les années se sont rapidement écoulées mais, malgré des hauts et des bas, je continue à voguer sur la vague scientifique au sein d'une unité dont l'intitulé pourrait être « les folles aventures de l'espèce Humaine ». Nous avons tous passé de bons moments ensemble même si parfois nous ne savions plus où nous en étions : et oui, huit ans se sont passés et quatre fois nous avons changé de nom (de l'UPR 1461 à UMR 8147 où je vous quitte, via FRE 2444). De la formation post-BTS au doctorat via l'EPHE, bien des choses ont changé à l'étage. Les équipes se sont modifiées ou sont parties pour d'autres aventures : je pense fortement à celles de Françoise Homodelarche, Françoise Lepold, Olivier Lantz, Claude Carnot, Pierre Aucouturier, Sophie Koutousov mais également à la :

« dream team franco-brésilienne » de Renato et Agnès :

Je remercie Marc et Renato pour leur amitié presque décennale maintenant, et leur disponibilité ; notamment Marc que nous n'arrêtons pas de solliciter avec Ivan. A toi, Ivan mon fidèle ami pour qui je ferai toujours l'impossible, je serai toujours là pour toi, car malgré nos deux caractères forts, nous avons su en extraire une force inégalable cimentée par notre amitié profonde. Nos discours communs et mouvementés resteront dans les annales. Je n'oublie pas pour autant Daniëlla qui m'a toujours émerveillé par ses talents de cuisinières (ça, c'est juste pour l'embêter) mais surtout pour son art pictural et ses qualités profondément humaines. Tous mes remerciements également au petit Ben (Benoît) que j'ai vu grandir entre son stage de maîtrise et la fin de sa thèse, les idées de recherches que nous avons dû remettre à plus tard afin d'être plus autonome et moins sous pression, et que depuis je sollicite souvent pour des histoires d'anticorps. Je te souhaite à toi et à Charlotte une magnifique vie de bonheur car vous êtes tous les deux adorables et vous le méritez, gros bisous. Ma chère Michelle, tu es la personne la plus adorable que j'ai rencontré au cours de ces années, toujours aussi agréable (avec ton joli sourire) et gentille quoi qu'il arrive, je te souhaite également à toi et au petit Stephan, un très grand bonheur. Je n'oublierai jamais le magnifique couple de valseurs que j'ai vu hypnotiser la salle. Je n'oublie pas non plus nos amis Marc et Lucienne, qui pour ma part me manquent beaucoup depuis qu'ils ont rejoint le Brésil natal de Lucienne, et je suis toujours aussi content de pouvoir passer de longues heures de discussion avec Marc au cours de mes voyages au Brésil. Et petit coucou aussi à Nicolas avec qui j'ai passé d'agréables moments de discussions ponctués par un rythme effréné de l'orchestre mexicain qui ne nous a pas laissé sortir

de là indemnes. Mais je ne dois pas oublier mon mal de dos que je dois à Sébastien à force de faire les pitres sur la piste de danse du Zouni.

Membres du Labo de Sophie Caïllat-Zucman:

Je tiens à remercier Sophie pour m'avoir fourni une biblio synthétique sur le thymus, mais également de m'avoir permis de squatter souvent son laboratoire au cours de mes incursions au 8^{ème} étage. Je tiens également à remercier ici les filles du labo HLA et de l'Immunoclinique (Patricia, Mimouna, Marie-Christine...) qui m'ont toujours soutenu et accueilli avec plaisir, alors que mon passage signifiait plutôt une vampirisation quotidienne même si malheureusement je ne peux plus trouver autant de temps maintenant et je le regrette. Je tiens aussi à lui exprimer toute ma considération et mon affection à ma Momo power (Monique) toujours aussi agréable et d'une gentillesse immense à l'image des Libanais que je connais, et j'en profite également pour que tu transmettes à tes sœurs toute mon amitié et mes remerciements éternels pour leur accueil au cours de mon séjour. Qui dit Momo, dit Chouchou (Michel) que j'adore profondément ou dit Chouchou Argenté (dû à notre voyage en Allemagne). Mon cher Michel je suis vraiment impatient de passer ces quelques jours avec toute notre fine équipe dans ton pays natal et je te remercie pour ton amitié profonde qui me tient très à cœur. Je n'oublie pas non plus ma petite Sophie qui nous reviendra vite je l'espère de chez nos voisins Anglais. Et je ne peux pas oublier Marion, qui à force d'hurler son nom est devenue connu comme le loup blanc aussi bien à Necker qu'à St Vincent de Paul, grâce à ma discrétion légendaire.

Membres du Labo de Peeter M. Van Endert :

Je remercie Peeter de m'avoir laissé accéder à son laboratoire pour distraire ses étudiant(e)s. Youyou et JM, notre couple national ou international plein de gentillesse et d'amour, vous me manquez souvent, mais par bonheur nous nous voyons toujours et je vous en remercie. Enfin nous allons pouvoir comme je le souhaitais publier ensemble JM, et ainsi te remercier d'une certaine manière de notre travail (made in Beatles). Ma chère Poca, je n'ai pas de mot suffisamment fort pour te dire à quel point tu comptes pour moi, mais j'espère que tu le sais ou que tu le devines ; ton amitié, ta fraîcheur et ton côté sale gosse m'ont apporté beaucoup d'évasion salutaire. Je suis toujours aussi ravi quand nous nous revoyons de visu ou par MSN, car j'aime bien discuter avec toi et ton amitié est très importante pour moi, mais c'est probablement dû à mon côté fille. Ta gentillesse étant une marque de fabrique, j'en profite pour saluer ton frère et son esprit de critique culinaire, ainsi que les membres de ta famille.

Je tiens fortement aussi à remercier ma petite Loré qui se rend toujours disponible même submergée par le travail. Loré tu as toujours été là pour moi, je t'en remercie profondément, et j'espère pouvoir un jour t'en rendre autant. J'ai notamment toujours adoré nos discussions et notre travail malgré les incompréhensions des chefs locaux. Merci aussi pour ton accueil ainsi que celui de Cosmin et de votre gentillesse. Je souhaite aussi remercier Héléne qui partie du labo de Peeter se retrouve par bonheur maintenant dans celui de Renato, et avec qui j'ai toujours eu beaucoup de plaisir à discuter du fait de sa gentillesse. Mais nos discussions et salutations matinales me manquent un peu car depuis lors je ne fais plus grand cas de mes visites matinales. Je remercie aussi chaleureusement Roland, Anne, Slo, Oliver, Flo et maintenant Abdel, Roberto, Emmanuella, Ting-Ting pour leur gentillesse respective. Mais je ne veux pas oublier nos chers regrettés Monsieur Propre et Mercy qui nous ont montré bien des concepts novateurs allant du post-doc touriste flagorneur aux principes du courant d'air polaire du frigidaire. Je fais à part un remerciement à ma petite marmotte « Gigi » pour son immense gentillesse, tu es quelqu'un de très bien (comme je n'en rencontre que rarement) et je suis très fier de te compter parmi mes amies. Je suis certain que tu réussiras tes ambitions car tu le mérites ne serait-ce que pour t'apporter le bonheur que tu sèmes aux quatre vents.

Membres du Labo d'OLIVIER HERMINE :

Je tiens à remercier de nouveau Olivier, pour toute la considération qu'il me porte ainsi que pour toutes les charges de confiance qu'il m'a confié. Bien plus qu'un Chef, Olivier est quelqu'un d'admirable, que j'estime beaucoup pour son côté Humain et accessible. Et, après ces 8 ans 1/2 de travail en commun, je pense que nous sommes beaucoup plus que de simples collègues malgré, je le sais, mon sale caractère qu'il a subi pendant ces années. Un grand merci aussi à Luce. Merci aussi aux anciens du labo (présent dès mon arrivée), Joëlle et Yael pour leur esprit vif et conciliant. Merci aussi aux petites jeunes, Julie et Marion, faites nous de jolis bébés. Et en parlant de petit bébé, merci à bébé Auréré (Aurélié) que j'ai eu un réel plaisir à former, bonne chance pour la suite, Amédée (le top model) et Mickael (Pink), Séverine (Little Viking), JB (le Jazz Man), BJ (le Discrét), Angela (notre joie de vivre), Aude, BA (playscool), Bouchra (notre fou rire éternel), David (choubaca), JAR (JARJAR binz), Cédric (Kordhan, maître de l'obscur), Marc (le Bipé), et tout le service d'hémato (Richard, Félipé, Chantal, ...). Ainsi que nos visiteurs Julia, Emmanuelle, Marie-Alexandra (Tea Time), Lucienne, Sophie, Claudine, tous les membres du CNRS (Mme Dardenne, Elke, Maria, Jean-Marie, André, Flora, Odile) et de l'INSERM

(Flora, Lucienne, Peeter, Sophie) ainsi que chaque membre de leur dream team (Emilie, Vivi, Sophie, Hassen, Sascouatch, Sylvaine, Nicolas, Bertrand, Ren, Patricia, Séverine D., François...). Je tiens en point final et fort, remercier du fond du cœur, pour leur disponibilité, leur dévouement et leur gentillesse, Dominique, Léone, Geneviève, Mr. Camara, Gabriel, Jean-Michel.

Collaborat(rices)eurs et ami(e)s du bout du monde :

LIBAN : je remercie Ali, MARWAN, Raghida et toute l'équipe pour leur confiance, leur accueil et leur amitié.

BRÉSIL : SAVINO, DEA, ANA-CHRISTINA, LEANDRA, FLAVIA, INGO, DANIELLA, SUZE, PATRICIA et toute l'équipe, sans oublier LUIZA, ANNA-CLAUDIA et le petit ALEXANDRE, merci beaucoup pour votre gentillesse et votre joie de vivre, c'est un vrai bonheur pour moi de vous connaître et de vous compter parmi mes ami(e)s. Je n'oublierai jamais nos soirées festives à Rio, Muto obrigado, Beijos. La création du labo Franco-Brésilien est pour moi un événement sentimental que je souhaite être un symbole d'amitié fort entre nos deux pays.

COLOMBIE : SUSANA, Xavier et les filles, j'espère que vous allez bien, vous me manquez, c'est pourquoi je suis aussi ravi quand vous êtes de passage à Paris. Mais peut-être qu'un jour grâce à notre amitié et collaboration, c'est moi qui viendrai vous dire bonjour à Bogota. Je garde en mémoire notre amitié et nos soirées musicales et sentimentales chez vous ou à la place Vendôme. J'en profite donc pour adresser mes salutations aux membres de l'ambassade Colombienne. Muchas gracias, por haber una preciosa amiga como voce, por tudo la vida.

MARTINIQUE : AGNES c'est toujours pour moi un immense plaisir de te revoir que ce soit en Martinique ou en congrès à travers le monde. Je te remercie donc de ton amitié, ta confiance et de m'avoir accueilli aussi rapidement et chaleureusement au sein de cette île paradisiaque.

GABON : MIRDA et Richard c'est pour moi un vrai plaisir aussi bien en Congrès qu'à Paris de vous connaître et de pouvoir partager nos idées et nos concepts. Et avec beaucoup de hâte, j'aimerais dans un futur proche vous rendre visite et ainsi réaliser notre idée de reportage sur la savane grâce à l'équipe Américaine.

De l'autre côté de la rue (Institut Pasteur) :

Je dois un énorme remerciement et reconnaissance à mon premier laboratoire « l'Hybridolab » dirigé à l'époque par Jean-Claude Mazié. Malgré la volonté de ne plus prendre de stagiaire, Farida m'a donné ma chance en acceptant ma venue au

sein de son équipe. Je ne la remercierai jamais assez pour sa patience et son sens de la pédagogie et j'espère que nous aurons encore l'occasion de nous croiser à Pasteur plutôt qu'à l'autre bout du monde (Brésil) même si ce fut une douce et agréable surprise de s'y retrouver et de nous replonger dans le passé tant au niveau de nos souvenirs que dans les cours d'immunologie sur les anticorps monoclonaux. Je n'oublie pas non plus tous les membres de cette équipe où je fis mes premières armes (Odile, Pierre, Muriel, les deux Sylvie, Joseph et Hiro). Une pensée à part pour ma chère petite Véro (Véronique) qui m'a trouvé du jour au lendemain à son bureau et qui a dû m'encadrer pendant cette période même si très rapidement nous sommes devenus beaucoup plus que des collègues, des amis très proches qui ne cesseront jamais d'être là l'un pour l'autre malgré mes longs silences. Les mots ne peuvent traduire notre amitié, car elle est d'une profondeur que je ne peux décrire autrement. Prends bien soin de toi car tu es unique, d'une valeur immense et incontournable.

Version libre :

Je fixerai ici vos noms afin de ne pas vous oublier, ni ce que je vous dois, les mots étant trop faibles pour exprimer tous mes ressentiments : F. Geissmann, PH. Roméo/R. Tordjmann.

Mes fondations :

Je tiens à remercier ici toutes les personnes ou autres (dans le désordre) que j'ai croisé et qui ont fait de moi ce que je suis. St Marie (petit et grand séminaire), les disparus de St. Agil, père Bellamy (prof. Math, d'Art, Caté) et Evêque de Meaux, mère Michelle (prof. Caté), père Sung (prof. d'Anglais), Couvent des Augustines, Antonio V. (expatrié politique chilien, Prof. d'Espagnol), lieutenant Michaux, commandant Khern, capitaine Laurent, famille Emilian (sergent-chef, mon instructeur et ami), les commandos de parachutistes Allemand et Français, la base militaire de Fontainebleau, l'école nationale des sports (Vincennes), les FFT (Léone, mémoires et souvenirs), la FFT et les entraîneurs, Prof. Cabrol (sauvons le naturel), Prof. P. Changeux (anecdotes et simplicité), ambassade de France au Liban, ambassade de Colombie en France, la famille Hadj-Slimane (Réda l'unique et indissociable de Dubaï). Le maire, ministre et sportif Guy Drut, Florence Seman (Prof. Biologie), Pierre Ougen (Prof. Immuno, la passion), Anna Warnet (Prof. Bioch, la logique), la famille Chatelard (baptême de l'air et éducation), la famille Duris (éducation), la famille Gai (comme ma famille), les chanteuses des Antilles et cousin (elles, il (zouk) se reconnaîtront), la famille Colin (l'hôpital de Meaux, l'architecture, le pilotage), la

famille Dominici (les légionnaires et la Corse), la famille Antonioli (la SNCF), les Bacqué (la science, l'Art Pictural, le Théâtre et la Comédie Française), l'équitation et la voltige, la famille Merlet (Kiné, voiture de collection, course et galerie d'art) sans oublier Stéphane (la main sur le cœur) et Kryz (ma petite sœur) etc. Et surtout mon village d'irréductible Gaulois.

Dédicace

Cette thèse est dédiée à tous mes ami(e)s proches, passés (ou disparus trop tôt, je pense toujours à vous), présents et à venir, ainsi qu'à mes parents (Françoise et Daniel) qui m'ont toujours permis de faire mes propres choix, quels qu'ils soient. Mais également à Monique B. (la première scientifique que j'ai côtoyée dans ma vie) chez qui j'ai passé toute mon enfance. Pour finir, une dernière petite histoire, cette thèse a été rédigée en partie au cours de mes premières et seules vacances au sein des plages de la Martinique, puis poursuivie au cours de mes différentes missions scientifiques à Beyrouth et à Rio de Janeiro.

VIVE L'INTERNATIONAL.

Abréviations

AMPc : adénosine mono-phosphate cyclique
 CD : Cluster de Différenciation
 Cdk5 : cyclin-dependent kinase 5
 CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
 CPA : cellule présentatrice d'antigène
 CRAM : CRMP associated molecule
 CRMP : Collapsin Response Mediator Protein
 DC : Cellule Dendritique
 DN : Double Négatif
 DP : Double Positif
 DRG : Dorsal Root Ganglion
 Flt-1 : Fms like tyrosine kinase-1
 GAP : GTPase-Activating Proteins
 GC : Guanylate Cyclase
 GDP : Guanosine Di-Phosphate
 GEF : Guanine Exchange Factors
 GMPc : Guanine mono-phosphate cyclique
 GM-SCF : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
 GSK-3 : Glycogen Synthase Kinase 3
 GTP : Guanosine Tri-Phosphate
 GPI : Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
 HIV : Human Immunodeficiency Virus
 HTLV-1 : Human T cell Lymphotropic Virus-type 1
 ICAM : Intercellular Adhesion Molecule
 IL : Interleukine
 kDa : kilo Dalton
 LAP : acide lysophosphatidique
 LAT : Linker for Activation of T cells
 LFA : Leukocyte Function-Associated Antigen
 LB : Lymphocyte B
 LT : Lymphocyte T
 MAPKinase : Mitogen-Associated Protein Kinase
 MICAL : Molecule Associated with CasL
 MTOC : Microtubule-Organizing Center
 NIP : Neuropilin Interacting Protein
 NK : Natural Killer
 Np : Neuropiline
 PIGF : Placental Growth Factor
 PI-3K : Phosphatidyl Inositol-3 Kinase
 Plex : Plexine
 Sema : Sémaphorine
 SP : Simple Positif
 TCR : T cell antigen receptor
 TN : Triple Négatif
 VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
 VEGF-R : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
 VLA : Very late antigen
 ZAP-70 : Zeta-Associated Protein

Résumé

Au cours de la réponse immunitaire comme au cours de la sélection thymique, les interactions cellulaires sont dépendantes d'un mécanisme indispensable définie par la formation d'un contact étroit entre deux cellules caractérisé par le terme de synapse. Ce terme en employé dans différents domaines de la biologie que ce soit en immunologie ou en neurobiologie. Depuis ces dernières années, de nombreuses molécules associées aux synapses neurologiques ou neuro-musculaires se sont révélées être également exprimées au niveau des cellules immunitaires et impliquées dans la régulation des contacts cellulaires médiée au cours de la réponse immunitaire.

Nous avons donc recherché la présence d'autres récepteurs neurologiques au niveau des cellules immunitaires. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que l'un de ces récepteurs, la neuropilin-1 (Np-1), responsable de la régulation de l'orientation et des contacts des neurones, était également exprimée à la fois sur les cellules dendritiques (DC) et les lymphocytes T (LT). De même, nous avons recherché la présence de son principal ligand, la sémaphorin-3A (Sema-3A), cette dernière s'est avérée être également exprimée et sécrétée au niveau des cellules de l'immunité.

Nous avons ainsi pu déterminer les rôles et fonctions de ces molécules au cours de la réponse immunitaire. La Np-1 est impliquée dans la formation des contacts entre les LT-DC et Thymocytes-cellules épithéliales thymiques et est régulée au cours de l'activation T par le TcR et/ou par l'interleukine-7 en ce qui concerne les thymocytes. La production et la sécrétion de Sema-3A, quant à elle, est dépendante uniquement par stimulation par le TcR aussi bien au niveau des LT périphériques matures qu'au cours de la sélection des thymocytes par les cellules épithéliales thymiques.

Nous montrons également que la sécrétion de la Sema-3A interfère avec la prolifération des LT induite par les DC *via* un mécanisme inhibiteur de la polarisation du TcR au site du contact cellulaire suite à un blocage de la polymérisation de l'actine sans toutefois modifier le nombre de contact entre cellules. Le blocage de ce rétrocontrôle par des anticorps bloquant ou peptide provoque une augmentation de la prolifération T dépendante de la polarisation de l'actine.

Nous avons également mis en évidence, que la Sema-3A joue un rôle au niveau de l'adhésion des thymocytes aux cellules épithéliales thymiques en bloquant la capacité des thymocytes d'adhérer aux molécules de la matrice extracellulaire comme la laminine et la fibronectine. En supplément, nous avons observé que la Sema-3A provoquait non pas une chemoattraction mais une chemorépulsion des thymocytes Np-1 positifs. Ce qui pourrait expliquer pour la première fois comment les cellules peuvent se desadhérer les unes des autres par un mécanisme autocrine contrôlé par le complexe Np-1/Sema-3A.

Avant-propos

Le système immunitaire veille à l'intégrité de l'organisme en réponse à l'environnement. Les cellules du système immunitaire sont cruciales pour la défense de l'organisme contre les pathogènes. Dans certaines situations pathologiques, le système immunitaire peut être dérégulé comme au cours des phénomènes de reconnaissance du Soi (maladies auto-immunes) ou insuffisant comme au cours de la réponse à un antigène infectieux (HIV) ou à un antigène tumoral (cancer). Le développement de la réponse immunitaire dépend donc de la reconnaissance ou non d'un antigène (Ag). Ce mécanisme régulateur intervient à différents niveaux dans l'organisme : 1)- dans le thymus au cours de l'ontogénie T au cours de la sélection thymique et du développement de la tolérance aux Ags du Soi, 2)- en périphérie au cours d'une réponse immunitaire vis-à-vis de pathogènes.

Parmi les cellules immunes, les cellules dendritiques (DC) font parties des acteurs clefs et du fil conducteur de la réponse immune. Les DC sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dites " professionnelles " par leur grande capacité à présenter les antigènes du non Soi (microorganismes, antigènes tumoraux) et du Soi (auto-antigènes). Les DC régulent les réponses immunitaires innées (non spécifiques) et initient les réponses spécifiques (dépendant du système d'histocompatibilité). Elles capturent et phagocytent les antigènes dans les tissus périphériques, migrent vers les organismes lymphoïdes secondaires et apportent aux lymphocytes T naïfs l'information relative à la structure de l'antigène afin d'initier la réponse immune. Cette interaction entre DC et lymphocytes T (LT) est assurée par la " synapse immunologique ". Les DC sont ainsi directement impliquées dans les pathologies infectieuses, dans les maladies auto-immunes, dans le rejet de greffe et dans le cancer.

Depuis longtemps, il est considéré que le contact entre deux cellules de l'immunité résulte de l'engagement de nombreuses molécules d'adhésions, lesquelles sont impliquées à la fois dans la formation et la régulation des communications hétérocellulaires. Les molécules impliquées dans le contact entre les cellules dendritiques et les LT (LFA-3/CD2, LFA-1/ICAM-1/-2) sont essentielles pour la

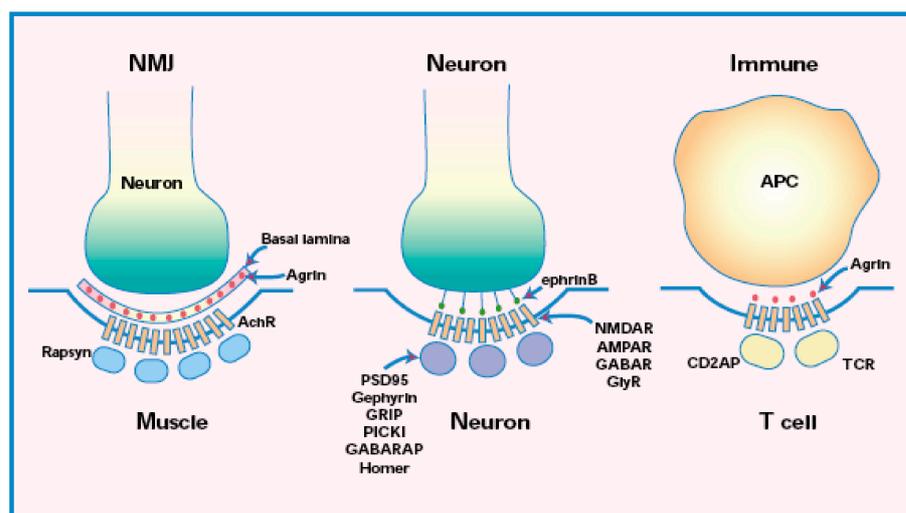
formation de la synapse immunologique et pour initier la réponse immune. L'interaction de DC-SIGN (lectine c de type II) exprimé par les DC et d'ICAM-3 exprimé par les LT joue un rôle important dans ce mécanisme d'adhésion et d'activation des LT (Geijtenbeek, 2000).

Les systèmes nerveux et immunitaire ont en commun de constituer dans l'organisme des réseaux complexes de cellules en interaction. Dans ces réseaux transigent en permanence d'énormes quantités d'informations, codées de manières très différentes dans les deux cas. Ces informations doivent en particulier circuler de cellules en cellules. Dans le système nerveux, ce transfert a lieu au niveau des synapses. Récemment, les immunologistes ont adopté le terme de synapse immunologique pour désigner l'interface entre deux cellules du système immunitaire. Mais est-il légitime d'appeler cette structure synapse ? Peut-on y mettre en évidence un mode d'organisation ou de fonctionnement en rapport avec ceux des synapses nerveuses ? La comparaison des synapses neuronales et des synapses immunologiques révèle des analogies de plus en plus nombreuses, comme une étape de formation initiale dépendentes de molécules d'adhésion, une stabilité et une durée importante pour la transmission de signaux d'activation entre cellules et une polarisation du cytosquelette et sécrétoire vers la synapse. En revanche, la synapse neuronale implique une discontinuité entre les deux cellules alors que la synapse immunologique est constituée de véritables ponts membranaires entre les lymphocytes et les cellules présentatrices d'antigènes. Mais on ne peut pas exclure la présence de médiateurs solubles sécrétés directement au niveau de la synapse immunologique comme les neurotransmetteurs pour la synapse neuronale. Cette notion de synapse a été également étendue au domaine de la virologie par la transmission virale d'une cellule infectée par un rétrovirus à une autre cellule (synapse virologique).

Des études récentes ont mis en évidence, au niveau de ces communications entre cellules de l'immunité (synapses immunologiques), la présence et l'implication de molécules dont les fonctions ont été décrites pour la première fois dans les jonctions neuronales (synapses neurologiques). Ce processus synaptique est dû à la formation d'une jonction structurée, orientée et stable indispensable à l'activation des LT et à la neurotransmission. Ce mécanisme, défini par la formation d'une synapse, a récemment éveillé l'intérêt du fait des similitudes entre les différentes synapses neuromusculaires

ou neuronales aux niveaux moléculaires. En effet, en plus de la terminologie du mot « synapse », des molécules impliquées dans la synapse neuromusculaire (comme l'Agrine, protéoglycane responsable de l'agrégation des récepteurs à l'acétylcholine) se sont révélées importantes au niveau du contact entre CPA et LT au cours de la réponse immunitaire (Khan, 2001). Dans les neurones et les cellules neuroendocrines, comme les cellules non-neuronales, l'étude des phénomènes d'exocytose a montré que les vésicules s'orientent et fusionnent dans des régions précises de la membrane plasmique correspondant aux régions formant des synapses. La synapse neuronale est aussi le siège d'une endocytose intense, permettant la capture des neuromédiateurs et de leur recyclage. Il est donc important de comparer à la fois les mécanismes d'exocytoses et d'endocytoses communs aux synapses neuronales et immunologiques. Un autre point commun étant que ces mécanismes sont dépendants de la plasticité cellulaire qui est à la fois importante pour la migration cellulaire ou la formation de connexions cellulaires.

Le but de mon travail de thèse a été donc basé sur la recherche de nouvelles molécules neurologiques impliquées dans la formation de la synapse immunologique aussi bien au cours de l'ontogénie T dans le thymus qu'au cours d'une réponse immunitaire entre cellules dendritiques et LT. Nous avons ainsi pu mettre en évidence la présence d'une nouvelle molécule neurologique (la neuropiline) sur les cellules de l'immunité mais également les fonctions de son ligand (Sémaphorine-3A) au cours de la réponse immunitaire, des adhésions cellulaires.



Comparaison entre les jonctions neuromusculaires, neuronales et immunologiques (Shaw, 2001).

INTRODUCTION

I. Les sémaphorines et leurs récepteurs.

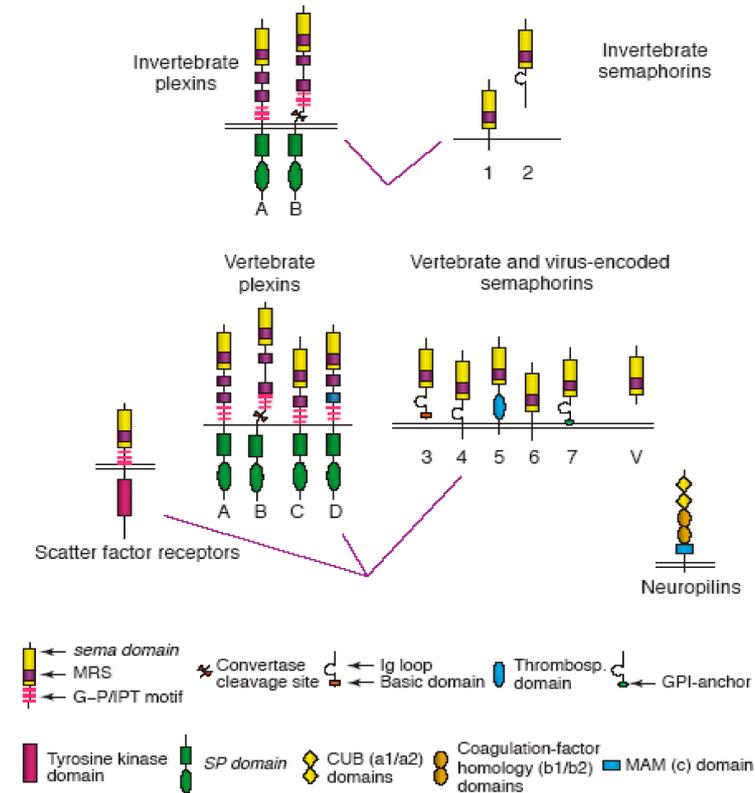
1. Classification des sémaphorines.

Les sémaphorines ou collapsines découvertes récemment (Luo, 1993) font partie d'une large famille de protéines comprenant des formes transmembranaires et sécrétées dont certains membres sont impliqués dans la régulation et la formation des jonctions neuronales au cours du développement embryonnaire (Mark, 1997). Toutes les sémaphorines sont composées d'une séquence extracellulaire conservée nommée « domaine SEMA » de 500 acides aminés environ, répertoriées et classifiées par une nomenclature récente (Semaphorin Nomenclature Committee, 1999).

Class	New Name	Old Name	Immediate Binding Protein	Functional Receptor Complex	
1	Sema-1a	G-semaI (FasciculinIV), D-semaI	Plexin-A	Plexin-A	
	Sema-1b	Sema-1b	Plexin-A		
2	Sema-2a	D-semaII	?		
3	Sema3A	H-SemaIII, M-SemD, Collapsin-1	Neuropilin-1	NP1/Plexin-A1	
	Sema3B	M-SemaA, H-SemaV	Neuropilin-1,2		
	Sema3C	M-SemaE, Collapsin-3	Neuropilin-1,2		
	Sema3D	Collapsin-2	Neuropilin-1#		
	Sema3E	Collapsin-5, M-SemaH	Neuropilin-1#		
	Sema3F	M-SemaIV	Neuropilin-1,2		
	Sema4A	M-SemaB	?		NP2/Plexin-A1
4	Sema4B	M-SemaC	?		
	Sema4C	M-SemaF	?		
	Sema4D	CD100, M-SemaG, Collapsin-4	Plexin-B1	Plexin-B1	
	Sema4E	Sema-Z7	?		
	Sema4F	M-SemaW	?		
5	Sema5A	M-SemaF	?		
	Sema5B	M-SemaB	?		
6	Sema6A	M-SemaVIa	?		
	Sema6B	M-SemaVIIb, R-SemaZ	?		
	Sema6C	M-SemaY	?		
7	Sema7A	M-SemaKI, SemaL	Plexin-C1	Plexin-C1	
V	SEMAVA	Vaccinia sema, Variola sema	Plexin-C1	Plexin-C1	
	SEMAVB	AHV sema	Plexin-C1	Plexin-C1	

Classification des sémaphorines (Nakamura, 2000)

Les sémaphorines divergent les unes des autres en fonction de leurs formes sécrétées ou transmembranaires, des domaines immunoglobulines et de la présence de glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI). Ces différences structurales additionnées aux différences phylogéniques permettent de diviser cette famille de protéines en trois genres différents et en huit classes distinctes : les sémaphorines de classe 1 et 2 exprimées par les organismes invertébrés, les sémaphorines de classe 3 à 7 spécifiques des organismes vertébrés et les sémaphorines de classe V synthétisées uniquement par les virus.



Classification des plexines et des sémaphorines (Tamagnone, 2000)

1.1. Sémaphorines des organismes invertébrés.

Les sémaphorines exprimées chez les invertébrés comprennent les sémaphorines de classe 1 (Sema-1a et -1b de forme transmembranaire) mises en évidence dans l'élongation axonale des neurones périphériques chez la sauterelle (Kolodkin, 1992) et les sémaphorines de classe 2 (Sema-2a de forme sécrétée composée d'un domaine immunoglobuline) dont la fonction répulsive a été démontrée sur les axones de la drosophile « *Drosophila Melanogaster* » (Matthes, 1995).

1.2. Sémaphorines des organismes vertébrés.

Les sémaphorines présentes chez les organismes vertébrés sont composées de cinq membres aux caractéristiques structurales différentes (formes transmembranaires et/ou sécrétées) correspondant aux sémaphorines de classe 3 à 7.

Les sémaphorines de classe 3 se composent de six membres (Sema-3A, -3B, -3C, -3D, -3E, -3F) codés par des gènes localisés respectivement sur les chromosomes et

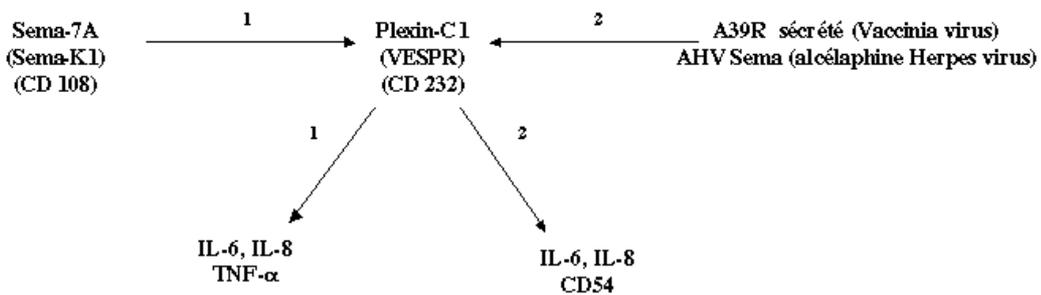
loci 7p12.1, 3p21.3, 7q21-q31, non déterminés, 7q21.11, 3p21.3. Elles possèdent un domaine « SEMA », un domaine immunoglobuline et un court domaine basique. Elles sont également les seules sémaphorines exclusivement sécrétées sous formes d'homodimères chez les vertébrés ce qui leur confère leurs activités biologiques (Klostermann, 1998).

Les sémaphorines de classe 4 se composent de sept membres (Sema-4A, -4B, -4C, -4D, -4E, -4F, -4G) possédant un domaine « SEMA », un domaine immunoglobuline, un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique. Ces sémaphorines de classe 4 sont des sémaphorines transmembranaires cependant la Sema-4D (CD100) peut être synthétisée sous une forme soluble. Les sémaphorines de classe 5 se composent de deux membres (Sema-5A, -5B) possédant un domaine « SEMA », un domaine thrombospondine, un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique. Les sémaphorines de classe 6 se composent de trois membres (Sema-6A, -6B, -6C) possédant un domaine « SEMA », un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique. Les sémaphorines de classe 7 se composent d'un seul membre (Sema-7A ou Sema-K1 ou CD108) dont le gène est localisé sur le *locus* 15q22.3-q23 possédant un domaine « SEMA », un domaine immunoglobuline et un domaine glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI).

1.3. Sémaphorines « virales ».

Les sémaphorines virales (sémaphorines de classe V) sont des sémaphorines sécrétées composées d'un domaine « SEMA » associé ou non à un domaine immunoglobuline (Ig) (SEMAVB, SEMAVA). La forme non associée (SEMAVA ou A39R) est principalement sécrétée par le virus de la vaccine et le virus de la variole tandis que la forme associée (SEMAVB) est sécrétée par le virus alcélaphine Herpès simplex de type 1 (responsable du coryza gangreneux du Gnou). Ces deux types de sémaphorines virales sont capables de se lier à un récepteur commun de 200kDa identifié à l'aide de la sémaphorine A39R recombinante et nommé VESPR (Virale Encoded Semaphorin Protein Receptor) ou plexine-C1 (CD232) localisé sur le *locus* 12q23.3 (Comeau, 1998). Ce récepteur est exprimé par de nombreuses cellules hématopoïétiques dont les monocytes, les lymphocytes B, les cellules dendritiques et les neutrophiles. En présence de l'A39R, les monocytes s'agrègent et synthétisent des

cytokines inflammatoires (IL-6, IL-8) tout en augmentant leur taux d'expression membranaire de CD54 (ICAM-1) (Comeau, 1998). L'A39R agit également sur l'organisation du cytosquelette d'actine ainsi que sur la capacité d'adhésion des cellules dendritiques et des neutrophiles (Walzer, 2005). Cette action induit un défaut de phagocytoses de ces deux types cellulaires et diminue la capacité de stimulation des LT CD8 par les cellules dendritiques (Walzer, 2005). Ces observations permettent de conclure à un rôle potentiel de l'A39R dans l'immunosuppression de la réponse immunitaire (Walzer, 2005).

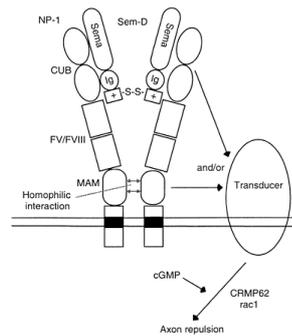


Action des sémaphorines de classe-7 (1) et viral (2) sur les monocytes (synthèse personnelle)

2. Récepteurs et corécepteurs.

2.1. Les récepteurs Neuropilines.

Les sémaphorines de classe 3 ont pour récepteurs la famille des Neuropilines composée de deux membres : la Np-1 et la Np-2. Ces récepteurs, bien que présentant de fortes homologies, sont localisés sur deux *locus* distincts 10p12 et 2q34 codant respectivement pour les Np-1 et -2. Les neuropilines possèdent des caractéristiques de fixation aux sémaphorines de classe 3 différentes. En effet, la Np-1 peut fixer toutes les sémaphorines de classe 3 (-3A, -3B, -3C, -3D, -3E, -3F) alors que la Np-2 ne peut lier que les sémaphorine-3B, -3C, -3D, -3E, -3F (Nakamura, 2000). Les différences de fixation des sémaphorines dépendent du taux d'expression des neuropilines, du type cellulaire et de la variation d'affinité des sémaphorines pour les différentes neuropilines (Takahashi, 1998). Par exemple, le dimère de sémaphorine-3F peut se fixer sur les Np-1 et -2 tandis que son domaine immunoglobuline est plus affiné pour la Np-2. De plus, l'affinité des sémaphorines pour les neuropilines dépend de corécepteurs associés (plexine).



Fixation du dimère de sémaphorine-3A sur la neuropiline-1 (Nakamura, 1998).

2.1.1. La Neuropiline-1 (Np-1).

Le récepteur de type I aux sémaphorines de classe 3 est une protéine transmembranaire qui a été pour la première fois observée sur certains axones au cours du développement embryonnaire du Xénope « *Xenopus* » à l'aide d'anticorps dirigés contre un antigène spécifique des neurones « A5 » (Takagi, 1991). Ce récepteur fut ensuite renommé Neuropilin-1 (Np-1) (Fujisawa, 1995). La Np-1 est une protéine conservée de 130kDa chez les vertébrés dont l'Homme, la souris, le poulet et le xénope. Cette protéine est composée d'un court domaine intracytoplasmique de 40 acides aminés, d'un domaine transmembranaire et de trois domaines extramembranaires impliqués dans les interactions cellulaires (a1/a2, b1/b2 et c). Les domaines « a1/a2 » (domaine « CUB » « complement-binding protein homology ») présentent des homologies avec les molécules du complément (C1r et C1s). Les domaines « b1/b2 » sont composés de motifs identiques aux facteurs de coagulation (V et VIII). Quant au domaine « c » aussi connu sous le nom de domaine « MAM », il est retrouvé dans la Méprine, la protéine A5 et la protéine tyrosine phosphatase μ . La Np-1 peut former des homodimères ou des hétérodimères avec la Np-2 (Np-2) par le domaine « MAM », transmembranaire ou intracytoplasmique (Giger, 1998). La Np-1 peut également être sécrétée sous une forme soluble de 90kDa contenant seulement les domaines « a1/a2 » et « b1/b2 » (Gagnon, 2000).

2.1.2. La Neuropiline-2 (Np-2).

La Np-2 a été clonée par homologie avec la Np-1 à l'aide d'amorces de séquences dégénérées à partir d'ARNm d'embryon de souris ou de cerveau de souris adulte (Chen, 1997). La Np-2 est structuralement très homologue à la Np-1 et possède

les mêmes domaines fonctionnels. Chez la souris, les deux Neuropilines sont identiques à 44% en acides aminés. Comme pour la Np-1, il existe deux formes de Np-2 (Np-2a et Np-2b) qui résultent d'un épissage alternatif et dont les séquences divergent entre les domaines MAM et transmembranaires. Pour ces deux isoformes, il existe plusieurs sous isoformes qui diffèrent de quelques acides aminés dans la séquence codant pour la partie intracytoplasmique.

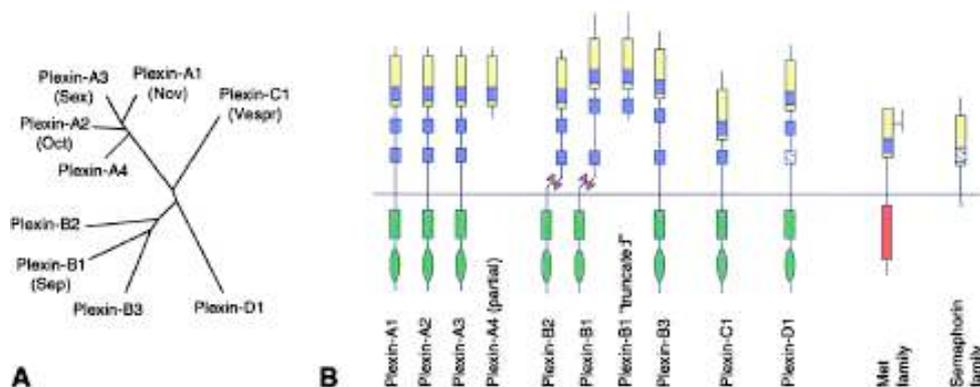
2.1.3. Expression.

Chez l'embryon, la Np-1 est exprimée dans le système nerveux, le cœur et les vaisseaux (Kitsukawa, 1995). Chez l'adulte, son expression a été retrouvée principalement dans le cœur, le placenta et les vaisseaux. Elle est exprimée également dans certaines tumeurs (Soker, 1998). Le profil d'expression chez l'adulte de la Np-1 soluble établi par hybridation in situ (Gagnon, 2000) diffère de celui de la Np-1 transmembranaire. Par exemple, la Np-1 soluble est présente dans les hépatocytes et dans les glomérules rénaux alors que la Np-1 est exprimée dans les vaisseaux de ces tissus. Les souris invalidées pour le gène de la Np-1 à l'état homozygote présentent des anomalies sévères dans l'organisation des fibres nerveuses et meurent d'anomalies du système cardiovasculaire entre 10,5 et 12,5 jours de gestation (Kitsukawa, 1997). Les souris transgéniques surexprimant la Np-1 de façon ectopique développent quant à elles des anomalies du système nerveux et meurent dès le stade embryonnaire d'anomalies vasculaires (Kitsukawa, 1995). La Np-2 est exprimée principalement dans le système nerveux au cours du développement. Certaines isoformes sont exprimées dans le tissu nerveux adulte. Contrairement à la Np-1, elle n'est pas exprimée dans le cœur et les vaisseaux sauf dans l'aorte dorsale (Chen, 1997). La Np-2 est un récepteur de haute affinité pour la sémaphorine-3F (Chen, 1997) et elle est capable de lier les sémaphorines-3B et -3C. Chez la souris, l'inactivation du gène qui code pour la Np-2 induit des anomalies du développement de certains axones du système nerveux (Giger, 2000) (Chen, 2000)

2.2. Les corécepteurs associés aux neuropilines.

2.2.1. Les plexines.

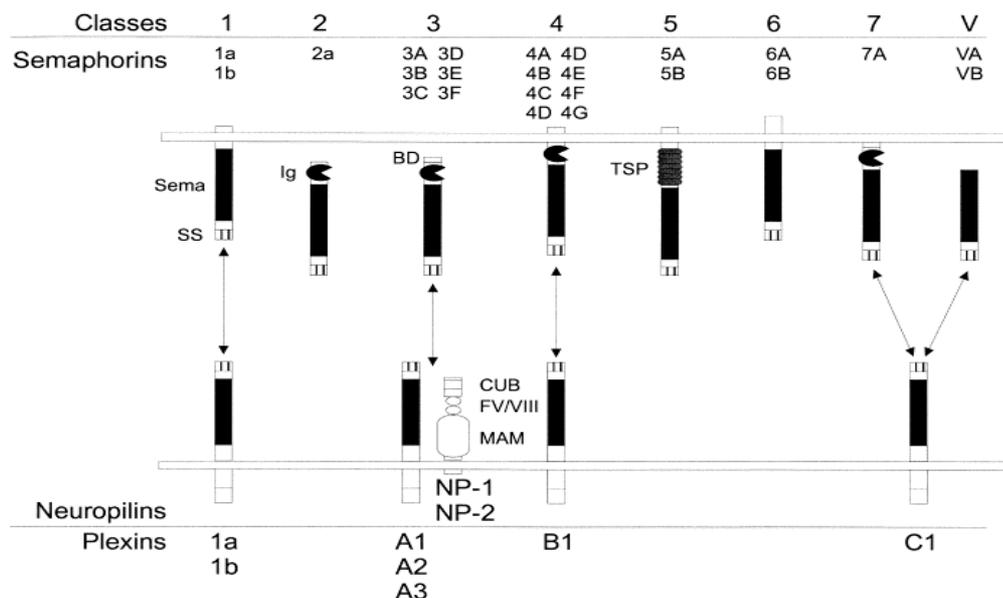
Le court domaine cytoplasmique de 40 acides aminés des neuropilines ne permet pas la transmission du signal, les corécepteurs sont donc indispensables pour médier les signaux. Une fois encore les corécepteurs et plus particulièrement les plexines sont exprimés aussi bien dans les organismes invertébrés que vertébrés. Deux gènes codant pour des plexines ont été mis en évidence dans le génome de la *Drosophila Melanogaster* et dans le génome de « *Caenorhabditis elegans* » (Winberg, 1998) (Tamagnone, 1999). Chez les mammifères, dix plexines classables en quatre sous groupes (Plexine A à D) ont été récemment identifiées (Tamagnone, 1999) (Cheng, 2001).



Représentation schématique des différentes formes de plexines. (Tamagnone, 1999)

Les plexines-B1 (*locus* 3p21.31) et plexines-C1 (*locus* 12q23.3) correspondent respectivement aux récepteurs aux sémaphorines transmembranaires sémaphorine-4D (CD100) et sémaphorine-7A (Tamagnone, 1999). Les plexines-A1 (chromosome 3) et -A2 (*locus* 1q32.3) quant à elles font parties du complexe neuropiline-plexine qui forme le récepteur fonctionnel aux sémaphorines de classe 3 (Takahashi, 1999) (Tamagnone, 1999) (Rhom, 2000). Ce complexe fonctionnel a été démontré en utilisant des tests de contraction cellulaire à l'aide de cellules COS-7 cotransfectées avec la Np-1 et une des plexines (-A1 ou -A2). Dans ces conditions, la sémaphorine-3A induit la contraction des cellules COS-7 (Takahashi, 1999), ce qui démontre l'importance de l'association des plexines à la neuropiline pour la transduction du signal.

De plus, la partie intracytoplasmique des plexines est importante pour cette transduction car, si cette partie est tronquée, la transduction du signal n'est plus possible. La plexine-A3, quant à elle, n'intervient pas dans la formation du complexe constituant le récepteur à la sémaphorine-3A (Takahashi, 1999). Chez la souris, l'inactivation du gène de la plexine-A3 induit un déficit mineur dans l'innervation périphérique. Cependant les axones de ces souris répondent moins bien à la sémaphorine-3A et plus du tout à la sémaphorine-3F (Cheng, 2001), ce qui conduit à penser que le système COS-7 est inadéquat à l'étude de la plexine-A3, probablement à cause d'un manque de protéines-relais dans la transduction du signal de cette plexine. Le complexe neuropiline-plexine augmente et modifie la spécificité de fixation des sémaphorines pour leurs récepteurs. En effet, un complexe neuropiline-1-plexine-A1 augmente l'affinité de la Np-1 pour la sémaphorine-3A par rapport aux sémaphorines-3C et -3F tandis que le complexe neuropiline-2-plexine-A2 fixe préférentiellement la sémaphorine-3F (Takahashi, 1999) (Rohm, 2000).



Classification schématique de la fixation des sémaphorines à leurs récepteurs (Pasterkamp, 2003)

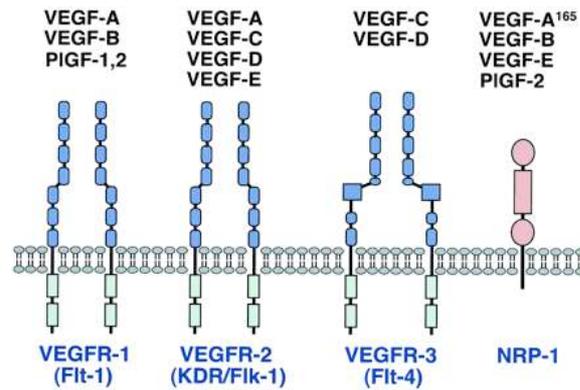
2.2.2. L1-CAM

L1, NrCAM, CHL1 et la neurofascine font partie de la famille des IgCAM dont les domaines sont très conservés. Ces domaines interagissent avec le cytosquelette d'actine mais aussi avec les MAPkinases (Kamiguchi, 2000) (Doherty, 2000). Il a été également démontré dans un système de transfection dans les cellules COS-7 que la

formation du complexe neuropiline/L1-CAM n'est possible qu'avec la Np-1. Ce qui suggère que L1-CAM pourrait influencer sur la transduction du signal des sémaphorines (notamment pour la sémaphorine-3A) se fixant sur la Np-1. En effet, il a été mis en évidence que la délétion du gène codant pour L1-CAM chez l'Homme conduit à des anomalies structurales du cerveau et des fibres nerveuses (Kenwrick S, 1998) (Kamiguchi H, 1998) (Kenwrick S, 2000). De plus, ces défauts architecturaux retrouvés chez les souris ko pour L1-CAM (Dahma M, 1997) Cohen NR, 1998) démontrent que le complexe Neuropiline/L1-CAM est impliqué dans la régulation de la guidance des axones corticospinaux (Castellani, 2000). Les axones dépourvus de la molécule L1-CAM perdent en effet leur sensibilité à la sémaphorine-3A, ce qui renforce l'implication du complexe Neuropiline/L1-CAM dans la transduction du signal de la sémaphorine-3A (Castellani, 2000). Cependant l'action de ce complexe (Neuropiline/L1-CAM/sémaphorine-3A) peut être neutralisée par la forme soluble de L1-CAM transformant ainsi l'effet répulsif en phénomène attractif.

2.2.3. Les récepteurs aux VEGF.

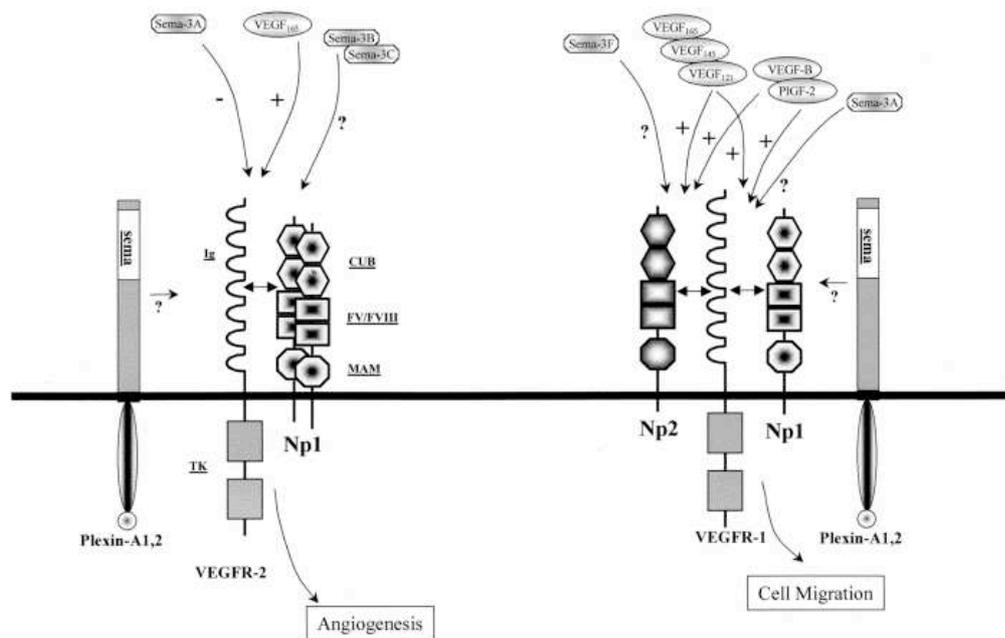
Le VEGF (vascular endothelial growth factor) est un facteur important pour le développement du système vasculaire au cours de l'embryogenèse (Klagsbrun, 1996) mais aussi pour la survie et la prolifération des cellules tumorales (Miao, 1999) (Brambilla, 2000). Il existe cinq différents homodimères du VEGF composés de 121, 145, 165, 189 et 206 acides aminés. Les VEGF-A165 et le VEGF-A121 sont les deux principales formes. Le VEGF sous forme d'homodimère se fixe et active les récepteurs à activité tyrosine kinase du VEGF (Flt-1/VEGF-R1 et KDR/flk-1/VEGF-R2) *via* un domaine de fixation codé par les exons 1 à 5. La Np-1 est aussi un récepteur pour le VEGF et plus particulièrement pour l'isoforme A165 du VEGF (VEGF-A165) (Soker, 1998). Le VEGF-A165 quant à lui a une séquence supplémentaire codée par l'exon 7 ce qui lui permet de se fixer sur la Np-1.



Les différentes classes de récepteurs aux VEGF (Dvorak, 2001)

- Association de la Np-1 avec le KDR (VEGF-R2)

La coexpression et l'association de la Np-1 avec le KDR augmentent la fixation du VEGF-A165 au KDR et accroît son effet chimiotactique. Le VEGF stimule la migration des cellules endothéliales exprimant le KDR, et cette migration est accentuée par la coexpression de la Np-1. Ce phénomène est spécifique de la coexpression des deux récepteurs car l'unique expression de la Np-1 n'induit pas la migration des cellules bien qu'elles soient capables de fixer le VEGF. De même, l'inhibition de la fixation du VEGF à la Np-1 diminue sa fixation sur le KDR et diminue son effet mitotique sur les cellules endothéliales. Le VEGF-A165 est capable de stimuler la mobilité des cellules endothéliales vasculaires exprimant la Np-1 alors que, dans le même temps, la semaphorine-3A a une action antagoniste sur ces cellules du fait de leurs codomains de fixation (FV/FVIII) sur la Np-1 (Miao, 1999). Ce phénomène est régulé par les diverses affinités de la sémaphorine et du VEGF pour le même domaine de fixation sur la Np-1. Les souris transgéniques exprimant de manière ubiquitaire de grandes quantités de Np-1 présentent des anomalies majeures du système cardiovasculaire associées à un excès du nombre de capillaires (Kitsukawa, 1995). Tous ces résultats démontrent que la Np-1 coopère avec le KDR en augmentant les fonctions biologiques des kinases sur les cellules endothéliales. La Np-1 possède une capacité de ligation similaire pour le PlGF (placental growth factor) et son récepteur le Flt-1 (Migdal, 1998).



Association des récepteurs au VEGF à la neuropiline-1 ou -2 (Neufeld, 2005)

- Association de la Np-1 avec le Flt-1 (VEGF-R1)

Le Flt-1 est capable de lier le VEGF, mais son activité biologique en tant que récepteur à activité tyrosine kinase demeure un mystère (Devries, 1992) (Shibuya, 1990). Ce récepteur dans sa forme entière est tout de même responsable de la formation du système cardiovasculaire (Fong, 1995). Il existe également une forme tronquée du Flt-1 (sans domaine tyrosine kinase) capable d'effectuer la même fonction que précédemment (Hiratsuka, 1998). Ces deux phénomènes suggèrent que le récepteur Flt-1 puisse transduire seul l'effet du VEGF mais également, pour la forme tronquée, s'associer à un autre récepteur capable de transduire à sa place les effets du VEGF. Les cellules endothéliales dérivées des veines ombilicales sont incapables de fixer le VEGF-A121 (Gitay-Goren, 1996) alors qu'elles expriment les Np-1 et -2 (Soker, 1998) (Gluzman-Poltorak, 2000). Cependant en présence du Flt-1, ces cellules sont de nouveau capables de fixer cette isoforme du VEGF, ce qui suggère que la coexpression des deux récepteurs favorise la fixation du VEGF-A121 sur la neuropiline (Gluzman-Poltorak, 2001). Le Flt-1 peut ainsi former deux types de complexes en s'associant soit à la Np-1 (Fuh, 2000) soit à la Np-2 (Gluzman-Poltorak, 2001). Les effets de l'association des récepteurs au VEGF avec les neuropilines demeurent inconnus, cependant les VEGF-A165 et -121 inhibent les effets répulsifs de la sémaphorine-3A (Gluzman-Poltorak, 2001) (Bagnard, 2001).

3. Voies de transductions du signal.

3.1. Protéine adaptatrice de la neuropiline (NIP).

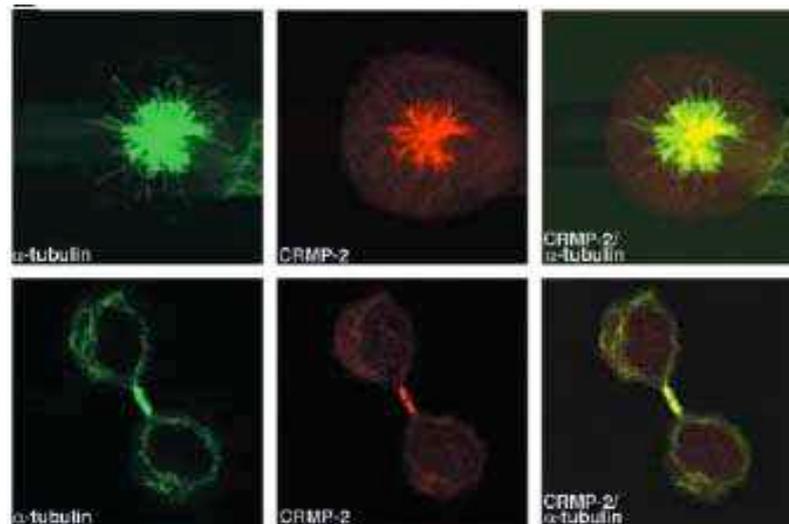
La recherche de partenaire de la Np-1 a été mise en œuvre à l'aide de la technique de double hybride. Cette technique a permis de démontrer l'existence d'une protéine NIP (Neuropilin-1 Interacting Protein) de 40kDa reconnaissant les quatre derniers acides aminés de la région C-terminal de la Np-1 (Tyr-Ser-Glu-Ala) (Cai, 1999). Cette protéine possède un domaine central très homologue à la protéine PSD-95/Dig/ZO-1 (PDZ). Il est également suggéré que NIP pourrait se fixer sur les quatre derniers acides aminés (Cys-Ser-Glu-Ala) de la Np-2A mais elle serait incapable de se lier à la Np-2B dont les derniers acides aminés ne sont pas conservés. De même, la délétion des trois derniers acides aminés (Ser-Glu-Ala) de la Np-1 diminue l'interaction de NIP avec la Np-1. NIP a été pour la première fois clonée sous les noms de RGIPC (RGS-GAIP-interacting protein) (De Vries, 1998) et de SEMCAP-1 (Wang, 1999). La RGIPC/SEMCAP-1/NIP est une protéine dont le domaine C-terminal est composé de la même séquence d'acides aminés (Ser-Glu-Ala) que la Np-1. De plus, cette protéine possède une activité GTPase pour la sous-unité $G\alpha_i$ localisée dans les vésicules clathrines positives.

3.2. Collapsin response mediator protein (CRMP).

La CRMP (collapsin response mediator protein) est une famille de molécules composée de protéines phosphorylées impliquées dans la transduction du signal des plexines (Goshima, 1995). Cette molécule fait partie d'une famille composée de cinq membres identifiés chez les vertébrés (Fukada, 2000). Les CRMP-1 à -4 sont exprimées au cours du développement du système nerveux (Wang and Strittmatter, 1996) mais également chez l'adulte (Goshima, 1995). La CRMP est très homologue à la molécule *unc33* exprimée chez « *Caenorhabditis elegans* ». La mutation d'*unc33* induit un développement anormal des cônes de croissance des axones ce qui suggère que les voies de transduction du signal sont médiées par cette protéine (Quinn, 1999). La CRMP-2 est la plus étudiée actuellement et très peu de données existent sur les fonctions différentielles des autres CRMP.

La CRMP-2 est impliquée dans la transduction du signal de la sémaphorine-3A par l'intermédiaire des plexines. L'utilisation d'anticorps bloquants anti-CRMP inhibe les effets de la sémaphorine-3A sur la croissance des cônes des axones (Goshima, 1995). La CRMP-2 ainsi que la molécule Cdk5 sont sous l'influence de la sémaphorine-3A (Brown, 2004). Une autre molécule, la GSK-3 β , semble modifier le statut de phosphorylation de CRMP-2, hors la sémaphorine-3A modifie elle l'état de phosphorylation de la GSK-3 et donc pourrait ainsi moduler elle-même son effet sur la CRMP-2 (Yoshimura, 2005). Structuellement les CRMP peuvent s'associer en hétérotétramère dans le cytosol (Wang, 1997) et ainsi avoir une activité spécifique qui reste à définir. Cependant certains membres de la famille des CRMP commencent à fournir de nouveaux éléments pour la compréhension des voies de transduction des plexines. La CRMP-2 semble être un substrat pour les Rho-kinases dans le cerveau (Arimura, 2000). La CRMP-2 est ainsi phosphorylée par les Rho-kinases en réponse à l'acide lysophosphatidique (LAP). Il est également suggéré que la CRMP-2 s'associerait à une CRMP-2-kinase de 45 à 50kDa (Gu, 2000), une molécule CRAM (CRMP associated molecule) ainsi qu'à une tyrosine kinase qui reste à définir (Inatome, 2000).

Une observation supplémentaire a mis en évidence que la CRMP-2 était associée aux microtubules du fuseau au cours de la métaphase et aux microtubules de division dans les phases tardives de la télophase au cours de la mitose (Gu, 2000). Ces résultats d'expression de la CRMP-2 suggèrent un rôle potentiel de cette protéine sur l'organisation des microtubules au cours de la croissance des cônes médiée par les plexines après fixation des sémaphorines. Il demeure également de nombreuses lacunes quant à la fonction des CRMP ainsi que les kinases responsables de leur phosphorylation (Byk, 1998). Cependant de nouveaux travaux démontrent l'importance de la CRMP-2 au cours de la polarisation et de la migration des lymphocytes T (Vincent, 2005). Ce qui met en valeur l'implication de ces molécules dans la réponse immunitaire.

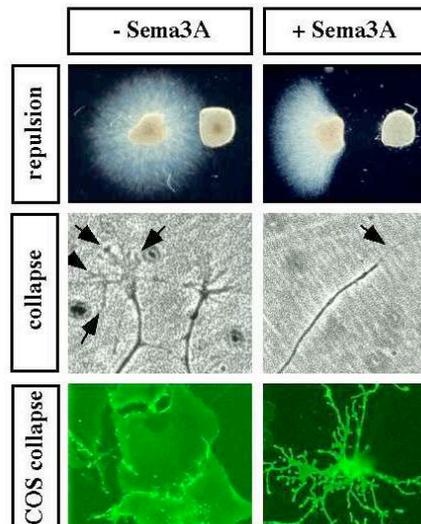


Co-expression de la tubuline et de CRMP-2 au cours de la division cellulaire (Gu, 2000)

3.3. Transduction de signal induit par les plexines.

La rétractation des cônes de croissance des axones médiée par la fixation de la sémaphorine-3A sur le complexe Np-1-plexine-A1 est principalement due au réarrangement localisé des filaments d'actine et des microtubules (Fan, 1995) (Zhou, 2002). Les sémaphorines peuvent ainsi induire une rétractation localisée des pseudopodes des cellules en cours de migration ce qui modifie leur mobilité. Ce mécanisme peut expliquer le rôle important des sémaphorines sur les cellules neuronales et les oligodendrocytes pendant le développement embryonnaire (Spassky, 2002), sur les cellules endothéliales au cours de l'angiogénèse (Miao, 1999) et sur les leukocytes au cours de la réponse immunitaire (Kikutani, 2003). Les mécanismes ainsi que les voies de transduction du signal des plexines sont très mal connus (Castellani, 2002) (Pasterkamp, 2003).

Le domaine cytoplasmique des plexines est composé de deux motifs très conservés séparés par un motif variable (Maestrini, 1996). Les domaines conservés ont des motifs apparentés aux protéines activatrices des GTPases comme les GAPs (Rohm, 2000). Aucun travail n'a mis en évidence d'activité des GAP associées aux plexines. Seule la famille des Rho protéines a été identifiée comme étant associée à la fonctionnalité des sémaphorines sur la dynamique du cytosquelette (Etienne-Manneville, 2002).

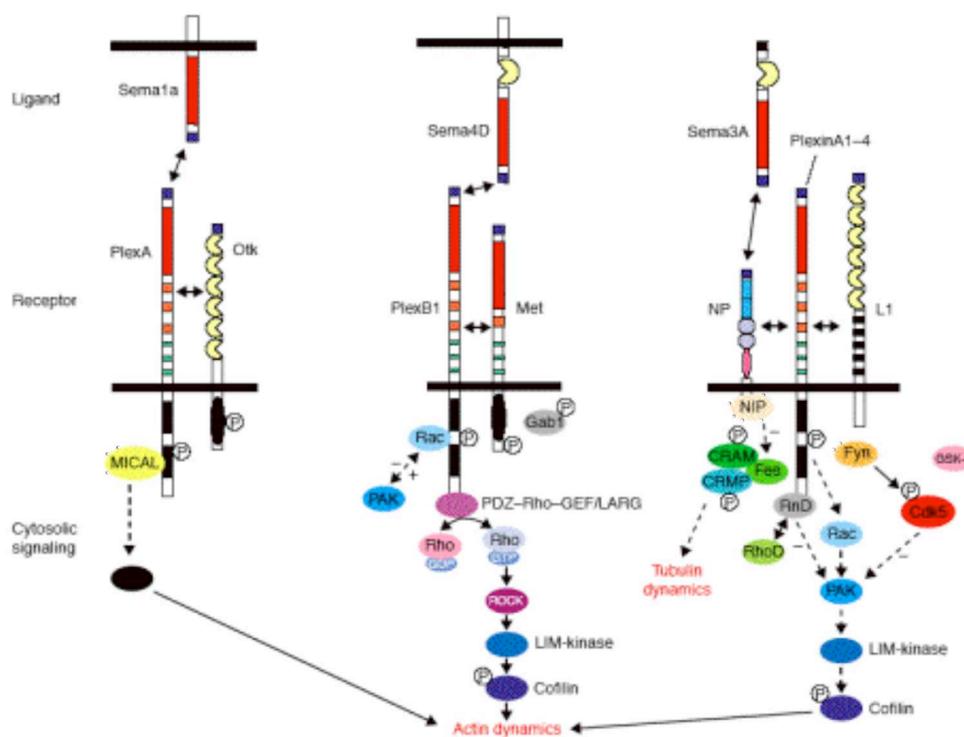


Action répulsive de la sémaphorine-3A médiée par les plexines-A (Fiore, 2003).

La voie de transduction du signal des sémaphorines-3A et -3F ne passe pas par les protéines Rho-A (Jin, 1997) (Kuhn, 1999) (Arimura, 2000) (Atwal, 2003). De plus, les plexines ont des effets antagonistes par rapport à Rac et activent les protéines Rho (Hu, 2001). La plexine-B1, quant à elle, se fixe et séquestre la forme activée de Rac-1 (Driessens, 2001) (Vikis, 2000), *via* l'association de son domaine en C-terminal aux RhoA GTP/GDP (Swiercz, 2002) (Driessens, 2002) (Aurandt, 2002) (Perrot, 2002). Ces associations nécessitent un domaine spécifique qui n'est présent que sur la plexine-B. Ce même domaine semble être également responsable de la régulation de l'expression et de la localisation de la plexine-B à la surface des cellules (Vikis, 2002) (Artigiani, 2003).

Les plexines-A, quant à elles, s'associent à la protéine MICAL (molecule associated with CasL) *via* le domaine localisé en C-terminal. Cette protéine MICAL fait partie d'une famille de protéines interagissant avec les molécules d'adhésion CAS-L (Terman, 2002) (Suzuki, 2002) (Siebold, 2005). MICAL sert de relais entre les plexines et le cytosquelette. En effet, MICAL est composée de plusieurs domaines pouvant interagir avec les molécules d'actines, les filaments intermédiaires ainsi qu'avec les protéines adaptatrices du cytosquelette. Un des domaines les plus importants de MICAL est le domaine « flavin-adeninedinucleotide-binding monooxygenase » responsable de la médiation du signal par les plexines (Terman, 2002). L'inhibition de l'activité enzymatique de ce domaine diminue les effets des sémaphorines sur la rétractation

(Terman, 2002). On ignore pour l'instant les substrats cibles de ce domaine, néanmoins la réduction des résidus des acides aminés impliqués dans la voie de transduction et la régulation du cytosquelette module leur fonction (Finkel, 1998) (Kim, 2002) (Meng, 2002) (Rhee, 2000) (Stamler, 2001) (Thannickal, 2000). En effet, l'oxydation des protéines d'actines induit leur propre dépolymérisation (Dalle-Donne, 2001). De plus, MICAL a été récemment démontré comme étant une molécule capable d'interagir avec une protéine « rab1 » (GTPase), qui joue un rôle crucial dans la migration des vésicules entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Fisher, 2005). Ces effets peuvent expliquer en partie le lien entre MICAL et la régulation du cytosquelette probablement indispensable et en tout cas existante en aval de la signalisation des plexines induite par les sémaphorines.



Voie de transduction des plexines (Pasterkamp, 2003)

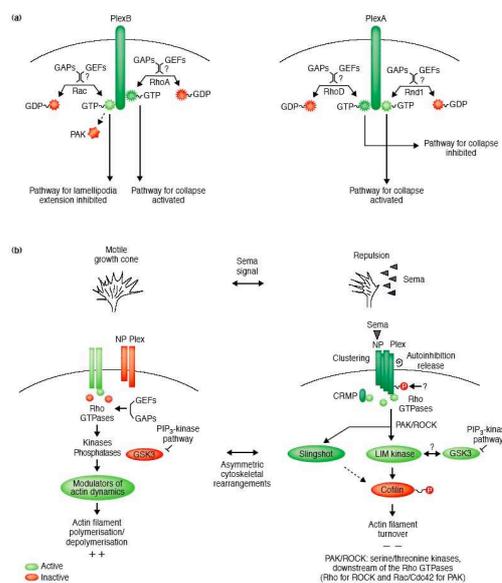
- Rôle des protéines Rac-1 et RhoA.

Plusieurs évidences montrent l'implication de Rac dans la voie de transduction des sémaphorines : la première évidence est que la transfection de la forme négative de la protéine Rac inhibe l'action de la sémaphorine-3A, la seconde est que la transfection de la forme active de la protéine Rac mime l'effet de la sémaphorine-3A dans les cellules. Ce qui suggère que la protéine Rac est responsable du réarrangement des

filaments d'actine (F-actine) induit par la sémaphorine-3A (Kikutani, 2003). De plus, le blocage de Rac-1 inhibe la voie de transduction induite par la sémaphorine-3A (Castellani, 2002) (Pasterkamp, 2003) (Hall, 2001).

Aucun résultat n'indique si l'activité de Rac-1 est médiée par les plexines, néanmoins on observe une colocalisation de la protéine Rac-1 avec le récepteur de la sémaphorine sur lequel s'est fixée la sémaphorine-3A (Maestrini, 1996). Il a été également montré que la forme activée de Rac-1 est associée dans les cellules d'origine non neuronale à la plexine-B1 (Rohm, 2000) (Etienne-Manneville, 2002) (Jin, 1997). Cette plexine est composée de deux domaines intracytoplasmiques très conservés séparés par un court domaine non conservé où se fixe la protéine Rac-1 (Rohm, 2000) (Etienne-Manneville, 2002). Le fait que ce domaine ne soit pas conservé dans les autres plexines indique qu'il existe un autre site de fixation de la protéine Rac-1 spécifique aux autres membres des plexines ou que ces plexines s'associent à d'autres membres des protéines G.

Le rôle de la protéine RhoA est encore moins clair que pour Rac-1. En effet, l'agrégation de la plexine-B1 exprimée sur les fibroblastes active la protéine Rho-A, mais ce phénomène peut être inhibé par l'ajout du dominant négatif de Rac-1 (Jin, 1997). Cette inactivation abolit l'effet inhibiteur de la sémaphorine-3A sur les neurones sensoriels, indiquant que la voie de signalisation des sémaphorines est plus médiée par les protéines Rac que par les protéines Rho.



Rôle des protéines Rho et Rac dans la voie de transduction des plexines (Castellani, 2002).

- Rôle des GTPases.

L'un des composants clés de la régulation de l'actine dans les neurones est la RhoGTPase sous sa forme monomérique (Dickson, 2001) (Luo, 2000). La protéine RhoGTPase est fonctionnelle lorsqu'elle s'associe à la GTP et s'inactive au contact de la GDP (Zheng, 2001) (Hall, 1998). L'activation de la RhoGTPase-RhoA augmente la contractibilité de l'actine et par conséquent induit le processus de rétractation du cytosquelette. Cependant l'activation d'une autre RhoGTPase-RAC induit la formation de lamellipodes tout en provoquant l'extension du cytosquelette. Trois classes de protéines régulent la fixation de la RhoGTPase aux nucléotides. Tout d'abord, des protéines GEF (guanine exchange factors) qui favorisent la transformation de la GDP en GTP, puis la protéine GAP (GTPase-activating proteins) qui stimule l'hydrolyse de la GTP en GDP, et enfin les inhibiteurs de la dissociation de la GDP qui diminuent le relargage de la GDP (Symons, 2000).

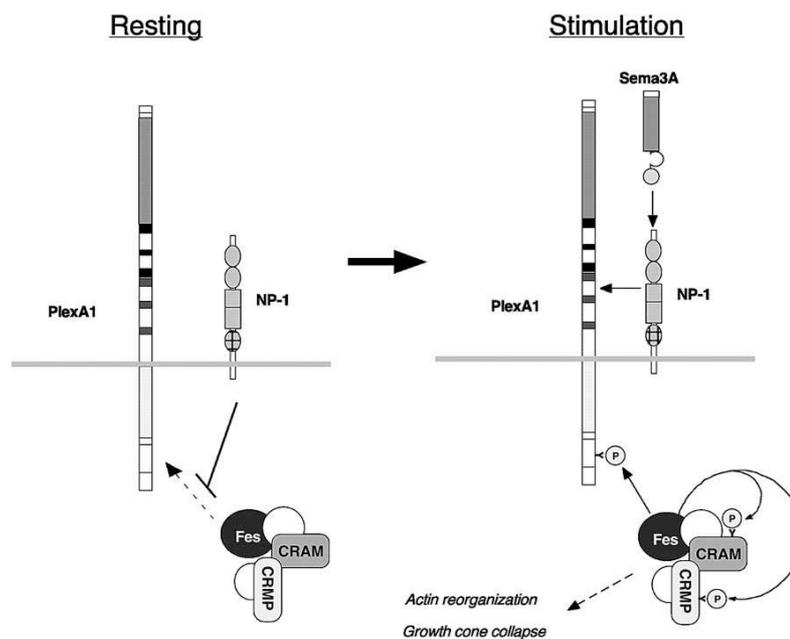
D'autres protéines ayant un effet antagoniste comme la RhoDGTP et la GTPase Rnd1 peuvent également se fixer à la plexine-A1. En effet, la RhoD s'oppose à l'effet répulsif médié par le complexe Plexine-A1/Rnd1 (Rohm, 2000) (Zanata, 2002).

La phosphorylation de la cofiline (protéine sur laquelle se fixe l'actine) par la kinase LIM est indispensable à la répulsion induite par la sémaphorine-3A (Aizawa, 2001). L'activation de cette kinase peut être régulée par les GTPases et les voies de transduction dépendantes de Rac-1 ou de RhoA (Edwards, 1999) (Maekawa, 1999).

- Phosphorylation des plexines.

De nombreux récepteurs sont phosphorylés après fixation de leur ligand, ce qui crée un site de liaison des complexes protéiques et induit une activité *via* la transduction de signaux passant dans la plupart des cas par une phosphorylation des molécules associées. Les plexines sont phosphorylées au niveau de leurs résidus tyrosines, de plus l'utilisation d'inhibiteurs des tyrosines kinases compromet l'action répulsive de la sémaphorine-3A (Tamagnone, 1999) (Maestrini, 1996) (Tuttle, 1998).

Les plexines n'ont pas d'activité kinase intrinsèque (Maestrini, 1996) cependant les plexines des organismes vertébrés peuvent s'associer à une protéine phosphorylée de 160kDa (Tamagnone, 1999) ce qui suggère que le récepteur aux sémaphorines puisse s'associer à une tyrosine kinase. Cette tyrosine kinase impliquée notamment dans la transduction du signal de la sémaphorine-3A est la tyrosine kinase Fes/Fsp (Mitsui, 2002). Elle est également capable de s'associer au complexe protéique CRMP-2/CRAM et au domaine intracytoplasmique de la plexine-A1 (Mitsui, 2002). L'activité de la plexine-A1, par Fes, est inhibée par la Np-1 en l'absence de ligand. C'est donc la présence de la sémaphorine-3A qui est responsable de l'activité de Fes et, de ce fait, de la phosphorylation de la plexine-A1, de la CRMP et de CRAM (Mitsui, 2002). Cependant la protéine CRMP peut également être régulée par les GTPases et diminuer la PLD2 (Lee, 2002) (Hall, 2001).



Rôle des molécules CRAM/CRMP/Fes dans la voie de transduction des plexines en présence ou non de sémaphorine-3A (Mitsui, 2002)

Il existe néanmoins deux autres kinases impliquées dans la voie de transduction du signal de la sémaphorine-3A : il s'agit de la kinase Src Fyn (qui s'associe aussi bien à la plexine-A1 que -A2) et de la kinase Thr/Ser cyclin-dépendent kinase 5 (Cdk5) (qui se lie au complexe Neuropiline/plexine) (Sasaki, 2002). L'association de la Cdk5 est dépendante de l'activation de Fyn qui va phosphoryler la tyrosine 15 de la Cdk5 (Sasaki, 2002). Il existe une autre molécule impliquée dans la voie de signalisation

induite par la sémaphorine-3A, la GSK-3 (glycogen synthase kinase 3) dont l'activation est la résultante de l'effet de la sémaphorine-3A (Eickholt, 2002).

-Modulation des effets de la sémaphorine-3A par l'AMPc et la GMPc.

De nombreux travaux suggèrent que l'AMPc et la GMPc ont toutes deux des fonctions régulatrices au cours de la croissance des cônes axonaux (Ming, 1997) (Song, 1998) (Song, 2001). La variation de la concentration intracytoplasmique de l'un des deux composants (AMPc ou GMPc) peut transformer un effet répulsif en un effet attractif (Song, 1998). La répartition asymétrique de la forme soluble de la guanylate cyclase (GC) dans les neurones modifie également l'effet des sémaphorines sur l'attraction et la répulsion des cônes de croissance mais également sur celles des dendrites (Polleux, 2000).

L'utilisation d'un inhibiteur de l'AMPc ou de la protéine kinase A modifie et transforme un effet attractif en un effet répulsif des neurones en réponse à la neutrine (Ming, 1997). Le cône de croissance des mêmes neurones, obtenus au stade embryonnaire du Xénope, est inhibé et rétracté sous l'effet de la sémaphorine-3A. Cependant, en présence d'analogue de la forme active de la GMPc (8-Br-cGMP), le cône de croissance est attiré par la source de sémaphorine-3A (Song, 1998). Cet analogue réduit également l'effet de la sémaphorine-3A sur d'autres modèles de croissance (DRG = « dorsal root ganglion »). La modification de l'activité fonctionnelle d'une autre kinase (PKG) modifie aussi l'effet de la sémaphorine-3A (Campbell, 2001).

Ces résultats démontrent donc que la GMPc est un élément important dans la transduction du signal induit par les sémaphorines. Cependant, il reste à déterminer les mécanismes d'action de la GMPc sur la voie de transduction du signal dans des conditions plus physiologiques et de mettre en évidence quels phénomènes peuvent réguler le taux endogène de GMPc. Plus récemment, une nouvelle régulation associée à l'activité de la protéine RhoD (RhoGTPase) au cours du signal induit par la sémaphorine-3A semble être dépendante d'une protéine GEF (guanine exchange factors) elle-même régulé par la GMPc (Zanata, 2002). De plus il a été mis en évidence que l'activité électrique et la protéine d'adhésion L1-CAM peuvent réduire le taux endogène de GMPc (Ming G, 2001) (Castellani, 2000).

4. Fonctions des Nps et des sémaphorines dans le SNC et vasculaire.

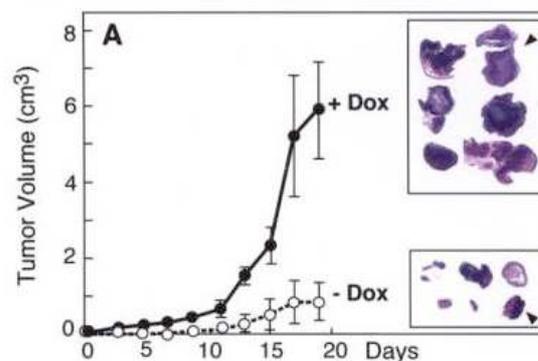
Les neuropilines et les sémaphorines sont impliquées dans les phénomènes de guidance axonal au cours de la mise en place du système nerveux central (SNC) chez l'embryon. Elles agissent sur la croissance axonale par contact ou à distance. Elles ont une fonction attractive ou répulsive selon la sémaphorine impliquée et selon le territoire neuronal. La sémaphorine la plus étudiée est la sémaphorine-3A. Un axone qui exprime la Np-1 se détourne d'une source de sémaphorine-3A et son cône de croissance axonale se rétracte. La rétractation du cône est associée à des modifications du réseau de filaments d'actine (Fournier, 2000). D'autre part, il a été montré récemment que la sémaphorine-3A et son récepteur la Np-1 auraient un rôle pro-apoptotique sur certains axones (Shirvan, 1999). Dans les cellules neuronales, l'activation de la Np-1 par la sémaphorine-3A nécessite la présence d'un autre récepteur, la plexine. La plexine est un récepteur présent à la surface des neurones (Kameyama, 1996) qui joue un rôle d'adhésion cellulaire de type homophylique dépendante du calcium (Fujisawa, 1997). D'autres protéines interagissent avec la Np-1 dans le système nerveux en développement comme la protéine NIP potentiellement impliquée dans le trafic intracellulaire (Cai and Reed, 1999). Cette interaction pourrait jouer un rôle dans les mouvements du cône axonal. Enfin les domaines extracellulaires de la Np-1 et de la protéine d'adhésion cellulaire L1-CAM interagissent à la surface des axones. Ce complexe interviendrait également dans la transduction du signal de la sémaphorine-3A (Castellani, 2000).

La sémaphorine-3A en se liant à la Np-1 joue également un rôle sur les cellules endothéliales. La sémaphorine-3A inhibe la motilité des cellules endothéliales et désorganise le cytosquelette en prévenant la formation de lamellipodes et la dépolymérisation d'actine (Miao, 1999). Elle entre alors en compétition avec un autre ligand de la Np-1, le VEGF-A165 pour la liaison à la Np-1 à la surface des cellules endothéliales. Cette compétition de liaison sur la Np-1 entre la sémaphorine-3A et le VEGF-A165 a été également décrite dans le cas des cellules neuronales. Dans ce cas, le VEGF-A165 n'induit pas de phénomène d'attraction des axones, mais inhibe l'effet de répulsion induit par la sémaphorine-3A (Miao, 1999). Cette capacité de fixation de ces deux protéines a également un effet sur le taux d'expression de la Np-1 puisque aussi bien le VEGF-A165 que la sémaphorine-3A induit l'internalisation de la Np-1

(Narazaki, 2006). La coexpression de la Np-1 et du VEGF-R2, par des cellules endothéliales, potentialise la capacité de fixation du VEGF-A165 au VEGF-R2 et majore ainsi la réponse chimiotactique et mitogène induite par le VEGF-A165. La Np-1 exprimée en l'absence de VEGF-R2 dans des cellules endothéliales n'est pas capable d'induire ces activités en réponse au VEGF (Soker, 1998).

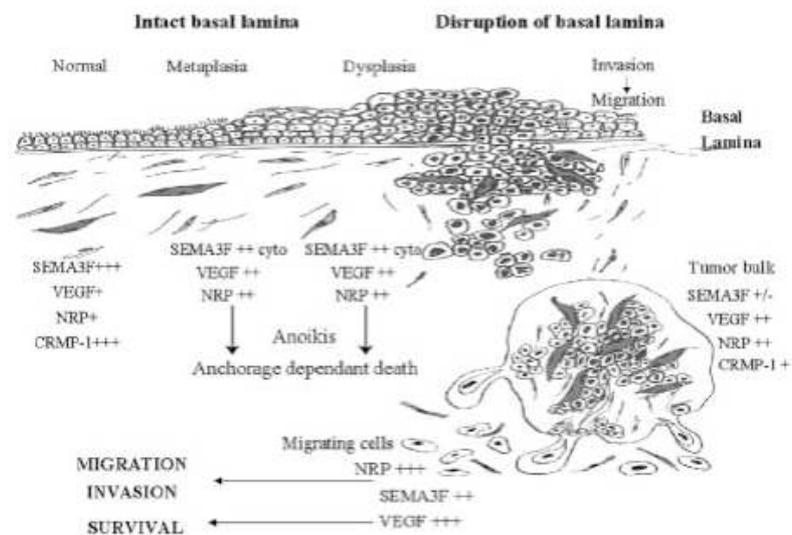
5. Les sémaphorines dans le cancer.

Le VEGF est un des composants clefs dans la formation et le développement des tumeurs et plus particulièrement dans l'angiogénèse tumorale (Siemeister, 1998). Le VEGF ainsi sécrété par les cellules tumorales va agir directement sur les cellules endothéliales *via* les récepteurs au VEGF et ainsi induire leur prolifération et migration vers la tumeur. Ce phénomène donne naissance à de nouveaux vaisseaux pour aboutir à la vascularisation des tumeurs. L'action du VEGF sur l'angiogénèse peut être inhibée par des agents bloquants comme des anticorps ou des récepteurs solubles (Kim, 1993). Deux autres récepteurs, la Np-1 et la Np-2, sont capables de fixer le VEGF (Kolodkin, 1997) (He, 1997). La Np-1 augmente ainsi la fixation du VEGF sur le KDR (Soker, 1998), l'angiogénèse et la progression de la tumeur (Miao, 2000) (Guttmann-Raviv, 2005). En plus des cellules endothéliales, la Np-1 est exprimée par les cellules tumorales du cancer du sein et de la prostate (Soker, 1998) ainsi que celui du pancréas (Wey, 2005), où il est associé à un mauvais pronostic clinique du fait de la corrélation entre son expression et la résistance aux chimiothérapies (Wey, 2005). Ces résultats remettent en cause les observations princeps de l'absence de récepteurs au VEGF sur les cellules tumorales. De plus, certains cancers comme le cancer du poumon expriment aussi bien le Flt-1 que le KDR (Decaussin, 1999) (Tian, 2001).



L'expression de la neuropiline-1 augmente la taille et l'angiogénèse des tumeurs (Klagsbrun, 2002)

La Np-2 quant à elle n'est pas exprimée par les cellules endothéliales, mais elle est exprimée dans les ostéocarcinomes et son expression est associée à un pronostic clinique défavorable (Handa, 2000). Dans certains cas de mélanome, les Np-1 et -2 ainsi que le KDR sont coexprimés et directement impliqués dans la prolifération des cellules tumorales (Lacal, 2000). Néanmoins l'administration de la forme soluble de la Np-1 au cours du développement tumoral chez la souris inhibe l'effet du VEGF-A165 et ainsi diminue le développement des métastases et la croissance des tumeurs (Gagnon, 2000) (Schuch, 2002).



Sémaphorines et développement tumoral (Bagnard, 2002)

Les sémaphorines, ligands spécifiques des neuropilines, ont également des fonctions autres que la régulation de la croissance et de l'orientation des neurones. Il a été montré récemment que les sémaphorines avaient un rôle important au cours de l'embryogenèse et notamment au cours du développement du poumon (Kagoshima, 2001) mais également dans le développement des tumeurs (Christensen, 1998) (Brambilla, 2000) (Neufeld, 2005).

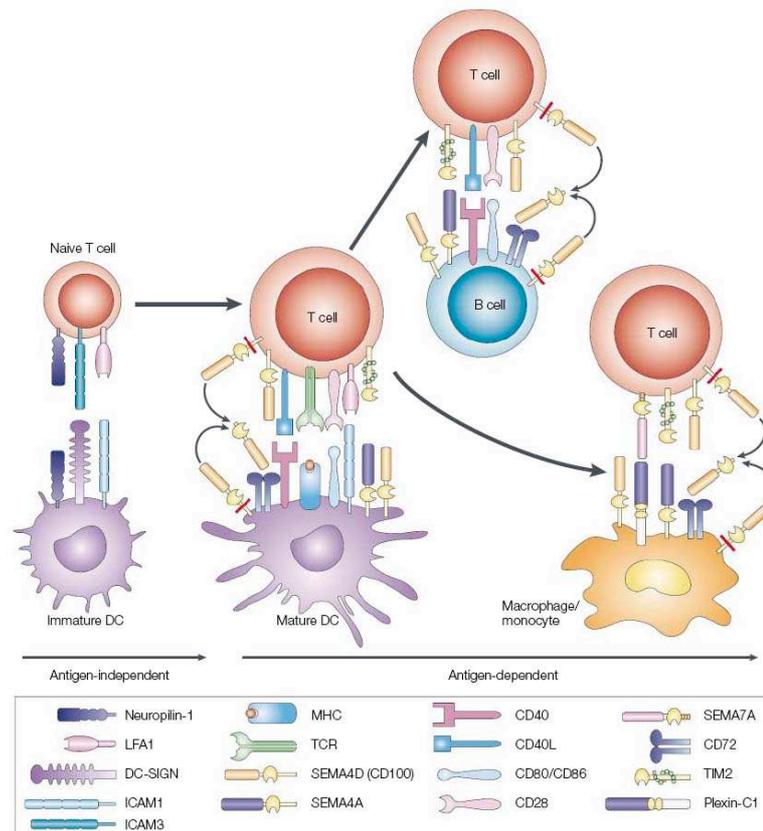
Le rôle anti-tumoral de certaines sémaphorines et plus particulièrement de la sémaphorine-3F semble être établi du fait de la délétion du gène 3p21.3 codant pour cette dernière (Sekido, 1998) (Roche, 1996). Alors que la sémaphorine-3A ne fixe que la Np-1, la sémaphorine-3F est capable de se lier aussi bien à la Np-1 qu'à la Np-2 bien qu'elle soit beaucoup plus affine pour la Np-2 (Chen, 1998) (Takahashi, 1999).

L'expression de sémaphorine-3F recombinante dans différents types de cellules tumorales diminue leur capacité à former des tumeurs dans les modèles de souris *nude*, ce qui lui confère un rôle anti-tumoral *in vivo* (Xiang, 2002) ainsi qu'un rôle anti-angiogénique tumoral *in vitro* (Kessler, 2004). De plus, l'addition de sémaphorine-3F sur des cellules tumorales exprimant la Np-2 conduit à l'altération des capacités prolifératives et migratoires de ces cellules (Nasarre, 2003) (Kusy, 2005) ainsi que leurs capacités d'adhésion (Nasarre, 2005). Les souris déficientes pour le gène de la sémaphorine-3F sont viables et ne présentent pas d'anomalie vasculaire (Sahay, 2003). A la différence de la sémaphorine-3A qui entre en compétition avec le VEGF-A165 pour la fixation sur la Np-1, la sémaphorine-3F et le VEGF-A165 peuvent se fixer sur la Np-2 sans interférence (Gluzman-Poltorak, 2001).

Cependant d'autres isoformes du VEGF comme le VEGF-A121 pourraient entrer en compétition avec la sémaphorine-3F pour la fixation sur la Np-2 et ainsi induire une croissance anormale des cellules sans que la sémaphorine-3F ne puisse réguler ces effets. Le complexe neuropiline-sémaphorine semble donc jouer un rôle important dans le développement du cancer et la formation des métastases. De plus, la sémaphorine-3C ainsi que la sémaphorine-3E sont impliquées dans la formation des métastases (Martín-Satué and Blanco, 1999) (Christensen, 1998). Les sémaphorines-3B au même titre que la sémaphorine-3F pourraient avoir également un rôle anti-tumoral (Tse, 2002) (Xiang, 2002).

6. Les sémaphorines et l'immunité.

Il a été récemment mis en évidence qu'une famille de sémaphorines (sémaphorines de classe IV) se présentant sous forme de protéines transmembranaires était exprimée sur les cellules de l'immunité et notamment sur les LT. Ces observations apportent les premières bases de l'étude de l'ensemble des sémaphorines (de classe IV et de classe III) et de leurs potentielles actions dans la réponse immunitaire.



Sémaphorines de classe IV, Neuropiline-1 dans la réponse immunitaire (Kikutani, 2003)

6.1. Les sémaphorines de classe IV dans la réponse immune.

La sémaphorine de classe IV ou Sema-4D (CD100) exprimée par les LT (Delaire, 1998) (Dorfman, 1998), peut interagir avec deux types de récepteurs transmembranaires : la plexine-B1 (exprimée dans les tissus non lymphoïdes) (Tamagnone, 1999) et le CD72 (exprimé dans les tissus lymphoïdes). Le CD72 connu sous le nom de Lyb-2 est une protéine transmembranaire de la famille des lectines de type II de 45kDa (Von Hoegen, 1990) (Nakayama, 1989). Il est présent sur les progéniteurs des lymphocytes B (LB) et demeure exprimé tout au long de leur stade de différenciation en LB matures et jusqu'au stade de transformation des LB en plasmocytes (Gordon, 1994) (Tutt Landolfi, 1997) (Kumanogoh, 2000). De plus le CD72 est également exprimé par les cellules dendritiques, les macrophages et par certaines sous-populations de LT (Gordon, 1994) (Tutt Landolfi, 1997).

L'agrégation du CD72 par des anticorps monoclonaux induit la transformation de certains LB en blastes ainsi que la prolifération des LB activés (Gordon, 1991)

(Subbarao, 1984) (Yakura, 1986). L'apoptose induite par le BcR est bloquée ce qui provoque la survie des LB et leur prolifération. Les études prospectives sur l'action des anticorps monoclonaux anti-CD72 montrent que ces anticorps induisent la phosphorylation de la tyrosine de la phospholipase C γ , du CD19 et activent les kinases Lyn, Blk et Btk impliquées dans l'activation des LB (Venkataraman, 1998) (Venkataraman, 1998). La formation du complexe CD100/CD72 favorise et amplifie l'activation des LB médiée par le CD40 (Kumanogoh, 2000).

Les LT des souris CD100 ko conservent leurs capacités à être stimulés par un anti-CD3 ou la concanavaleine-A *in vitro*, mais sont incapables d'être stimulés par un antigène *in vivo* (Shi, 2000). Ce défaut d'activation des LT par un antigène peut être contrecarré par l'injection *in vivo* de CD100 soluble dans les souris CD100 ko. Ces résultats indiquent que le défaut d'activation des LT des souris ko est dû à un défaut de stimulation des LT. En effet, les cellules présentatrices d'antigène exprimant le CD72 (ligand du CD100) ne pourront pas stimuler correctement les LT déficients en CD100. De plus l'ajout de CD100 soluble augmente l'activation des DC induite par le CD40 ainsi que la synthèse d'IL-12. Ce qui démontre l'importance du complexe CD100/CD72 dans la communication cellulaire entre les APC et les LT.

Il faut noter également que le CD100 soluble des LT activés et transformés par le virus HTLV-1 peut interagir avec les oligo-dendrocytes et induire leur mort, cet événement conduit à leur démyélinisation (Giraudon, 2004) ce qui apporte un concept nouveau dans la compréhension des atteintes neuronales de cette pathologie ainsi qu'un lien entre les cellules immunitaires et le cerveau. Cette conception donne donc une logique fondamentale pour l'étude des molécules neurologiques aussi bien au cours du développement que dans le système immunitaire.

6.2. Les sémaphorines de classe III dans la réponse immune.

Il existe peu d'éléments sur l'implication des sémaphorines de classe III dans l'immunité ; toutefois le développement d'études basées sur les sémaphorines de classe IV ont mis en évidence les effets d'une sémaphorine : la sémaphorine-3A. La sémaphorine-3A inhibe la migration spontanée des cellules de l'immunité et notamment

celle des monocytes qui pourtant n'expriment pas la Np-1. Cela conduit à penser que les sémaphorines de classe III peuvent agir sur les cellules de l'immunité même en l'absence de leur récepteur ou sur un autre récepteur encore inconnu (Delaire, 2001). Néanmoins, il semble peu probable que la sémaphorine-3A agisse sur un autre récepteur que la Np-1. En effet, dans ce papier les cellules considérées comme des monocytes, sont des monocytes mis en culture pendant plusieurs jours, avant de réaliser les migrations cellulaires sous sémaphorine-3A. Or après plusieurs jours de cultures, les monocytes acquièrent les caractéristiques des macrophages, et d'après notre expérience sur ces cellules et de nos données scientifiques, les macrophages expriment la Np-1.

L'émergence de nouvelles populations de DC (DC plasmacytoïdes) dans la circulation sanguine a permis le développement de nouveaux anticorps spécifiques de ces cellules comme l'anti-BDCA-2 et l'anti-BDCA-4. Ce dernier anticorps reconnaissant dans la circulation sanguine uniquement les cellules dendritiques plasmacytoïdes n'est autre qu'un anticorps anti-Np-1, ce qui met en évidence la présence de la Np-1 sur les cellules de l'immunité et notamment sur les DC plasmacytoïdes. De plus, il a été récemment démontré chez la souris que les LT régulateurs ($CD4^+/CD25^+$) expriment à leur surface la Np-1 ce qui permet d'avoir un antigène cible pour isoler ces cellules régulatrices des autres LT naïfs ou récemment activés (Bruder, 2004). De plus, la sécrétion de sémaphorine-3A par les tumeurs induit un défaut de prolifération et d'activation des LT (Catalano, 2006).

En conclusion, la Np-1 et la sémaphorine-3A contribuent très largement au développement embryonnaire à travers des régulations architecturales (vaisseaux) et neuronales (croissance des cônes des axones). Les fonctions de ces protéines très récemment observées dans le système immunitaire au niveau de la migration cellulaire nous ont orienté vers l'étude de la Np-1 et de la sémaphorine-3A dans le système immunitaire central et périphérique.

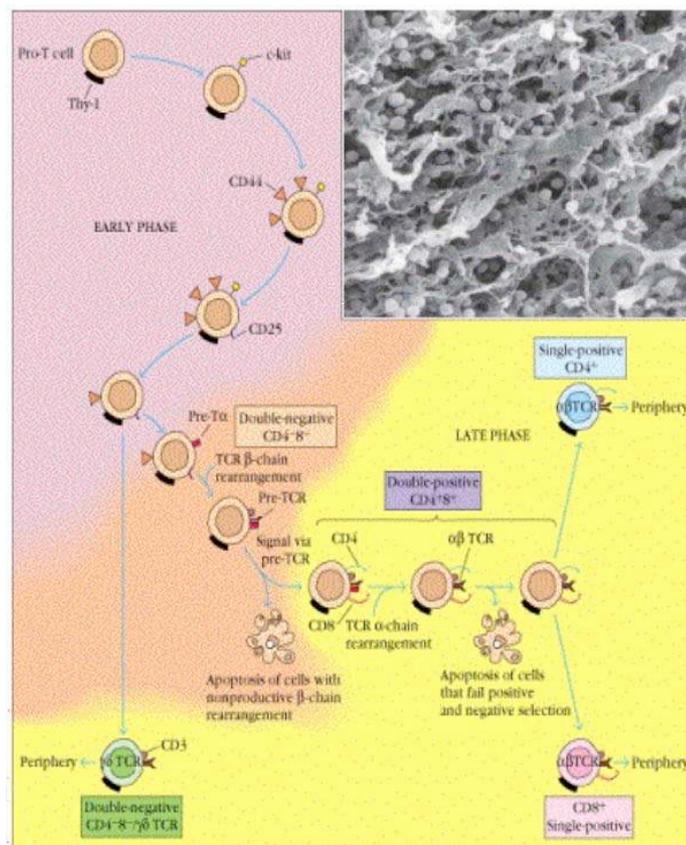
Au cours du développement thymique, les thymocytes qui vont maturer en lymphocytes vont subir diverses migrations à travers l'architecture thymique et sous la pression de nombreuses interactions cellulaires. Ces interactions vont former des contacts intimes (synapses) dépendantes de mécanismes d'adhésions et desadhésions,

où peuvent intervenir les mécanismes régulateurs du complexe Np-1/Sémaphorine-3A.

II. De la sélection thymique à la synapse immunologique.

1. Le Thymus.

Le thymus est le lieu majeur de la production des LT durant l'existence. En effet, le thymus est un organe lymphoïde central où les précurseurs de la moelle vont subir un long et complexe processus de différenciation et de maturation pour donner naissance à diverses populations de thymocytes avant la maturation finale en lymphocyte CD4 ou CD8 (Anderson G, 1996). Le développement des LT est permis par le microenvironnement cellulaire spécialisé qui fournit aux thymocytes les facteurs nécessaires et les conditions adéquates.

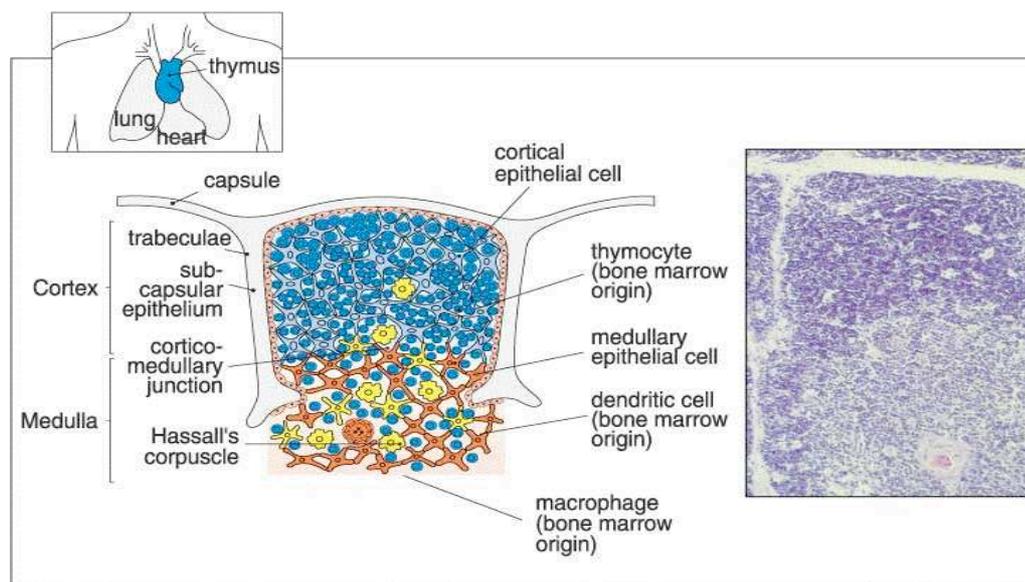


Modèle de différenciation des thymocytes (Garland, 2001)

Bien que la prolifération et la différenciation des thymocytes persistent tout au long de la vie, la quantité de cellules matures délivrées en périphérie diminue avec l'âge

(Ritter MA, 1999) (Poulin JF, 1999). Ce phénomène est principalement dû à l'atrophie du thymus des sujets âgés au regard des jeunes enfants.

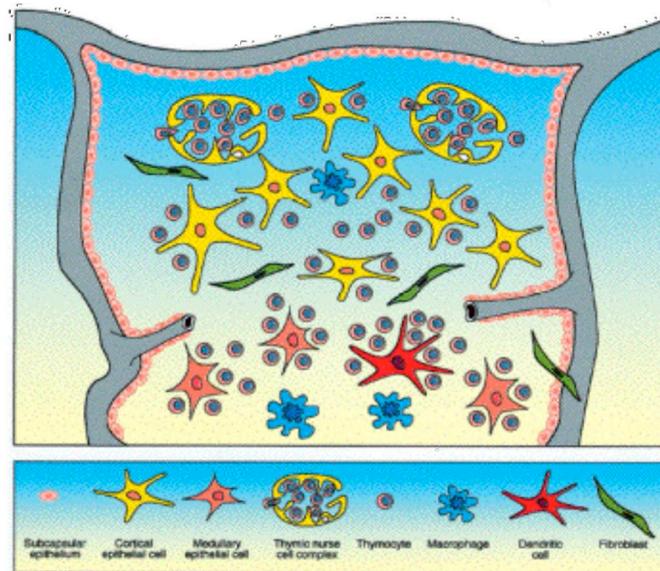
Historiquement, le rôle du thymus dans la lymphopoïèse a été démontré par des expériences de thymectomie néonatale chez la souris (Miller, 1961). Dans ces expériences, Miller a pu observer que la thymectomie induit une diminution du nombre de lymphocytes, une susceptibilité accrue des souris aux infections et l'absence de rejet immédiat d'une greffe allogénique.



Représentation schématique de l'architecture d'un thymus humain (Garland, 2002)

1.1. Les thymocytes et leurs partenaires.

Le programme de développement des thymocytes, du précurseur provenant du sang jusqu'au LT mature, n'est pas un processus autonome. Il dépend des interactions avec différents types de cellules stromales et de DC rencontrées au cours de leur migration dans le thymus (Anderson and Jenkinson, 2001). De même, le développement de l'organe en lui-même et le maintien de son architecture sont régulés par des signaux provenant des thymocytes eux-mêmes. La résultante de ces interactions, *via* les étapes de sélection positive et négative, est un répertoire T extrêmement vaste duquel ont été éliminées les cellules autoréactives potentiellement dangereuses pour l'organisme.



Populations cellulaires présentes dans le thymus (Savino, 2000)

1.1.1. Fibroblastes mésenchymateux.

Les fibroblastes mésenchymateux sont hétérogènes dans les marqueurs qu'ils expriment mais homogènes dans leur origine développementale. Ils s'avèrent nécessaires pour l'achèvement de la maturation (Anderson, 2001). Dans le cortex, ces fibroblastes interagissent avec les précurseurs T *via* la matrice extracellulaire associée. Ils leur présentent des facteurs de croissance et des cytokines et favorisent ainsi leur survie et leur différenciation (Anderson, 1997).

1.1.2. Cellules épithéliales corticales et sélection positive.

Après le réarrangement des gènes du TCR, celui-ci est exprimé à la surface des thymocytes. Les thymocytes ont alors une durée de vie limitée à 3-4 jours. Ils ne continueront leur différenciation que s'ils reconnaissent un complexe de CMH (du Soi)-peptide (CMHp) présenté par une cellule épithéliale. Cette étape, dite de « sélection positive », résulte des interactions du TCR avec des complexes CMHp d'affinité faible ou intermédiaire comparativement à celle mesurée lors de la sélection négative. Il est maintenant bien établi que les cellules épithéliales corticales ont un rôle privilégié dans la sélection positive (Anderson, 1996) et qu'elles sont mêmes spécialisées dans cette tâche.

1.1.3. Cellules épithéliales médullaires, DC intrathymiques et sélection négative.

Le thymocyte simple positif (SP) CD4 ou CD8 ne peut achever sa maturation que s'il ne se révèle pas autoréactif. En effet, la reconnaissance d'un peptide du Soi avec une trop forte affinité est un signal pour la sélection négative. En réalité la question de savoir si la sélection positive et la sélection négative sont localisées séparément dans le temps et l'espace n'est pas encore tranchée. En revanche, il est reconnu que les cellules impliquées dans la sélection négative sont les DC situées à la jonction cortico-médullaire ainsi que les cellules épithéliales médullaires. Ces dernières ont la particularité de présenter des antigènes a priori spécifiques de certains tissus ou organes (Anderson, 2002).

Cette expression ectopique d'antigènes est un moyen de sonder à distance la réactivité des thymocytes face à des antigènes de tissus périphériques et donc de limiter les risques ultérieurs d'auto-immunité. L'hypothèse retenue est que les DC et les cellules épithéliales médullaires jouent des rôles complémentaires en présentant des échantillons distincts et complémentaires d'antigènes du Soi (Klein and Kyewski, 2000). Des études relativement récentes ont montré le rôle du gène AIRE « AutoImmune regulator gene, gène régulateur de l'autoimmunité » dans le développement de maladies auto-immunes, et plus particulièrement dans le syndrome de type I autoimmun polyendocrine. L'expression de AIRE n'est pas requise au sein des cellules autoréactives, mais s'avère nécessaire pour l'expression ectopique de certains gènes, tel que le gène de l'insuline dans le stroma épithélial thymique (Anderson, 2002). Ainsi, en l'absence de AIRE, les cellules T spécifiques d'organe ne sont pas déléetées dans le thymus ce qui diminue de manière drastique la capacité tolérogénique du stroma thymique et favorise l'émergence de maladies autoimmunes (Liston, 2003). En plus de son rôle sur l'expression ectopique de certains gènes, AIRE serait capable de réguler l'apprêtage et la présentation de protéines du soi de manière suffisamment efficace pour stimuler les cellules T autoréactives (Kuroda, 2005).

1.2. Nature des contacts cellulaires en fonction de leur répartition.

On peut schématiquement considérer que les deux lobes thymiques sont constitués d'une multitude de lobules, formés eux-mêmes d'une région externe, le

cortex, et d'une région interne, la medulla. L'origine de ces deux régions est semble-t-il différente, même si cela reste controversé : ainsi, la région corticale pourrait être d'origine ectodermique et la région médullaire d'origine endodermique. Le thymus apparaît suite à de multiples invaginations de ces régions, qui viennent à se refermer sur elles-mêmes, aux environs du 11^e jour embryonnaire chez la souris.

Le microenvironnement thymique possède une importance cruciale dans le développement des cellules T. Ainsi, les souris *nude* (*nu/nu*) présentent un défaut dans la formation du thymus qui empêche l'apparition de cellules T $\alpha\beta$ fonctionnelles (Jenkinson, 1981) (Van Vliet, 1985). La base architecturale du thymus, appelée stroma thymique, est constituée par les cellules épithéliales du cortex et de la medulla, qui sont d'origine thymique, et par des cellules d'origine hématopoïétique. Ces cellules dérivées de la moelle osseuse – DC et macrophages – ne sont pas distribuées équitablement entre le cortex et la medulla. En effet, les DC et la plupart des macrophages sont concentrées au niveau de la medulla. La distribution de ces cellules met donc en évidence des compartiments jouant des rôles distincts dans la maturation des thymocytes (Anderson and Jenkinson, 2001) (van Ewijk, 1991).

1.2.1. Dans le cortex.

Pour la sélection positive, le modèle de « single-niche » a été proposé en 1994. Il postule que le thymocyte interagit préférentiellement et de façon prolongée, avec une seule cellule stromale. Ce modèle a émergé d'expériences *in vitro* de reconstitutions chimériques de thymus réalisées dans le groupe de D. Mathis. Il a ensuite été montré que les thymocytes placés dans un environnement thymique mosaïque H-2b et H-2k acquièrent préférentiellement (par transfert de matériel) un seul déterminant CMH (Merkenschlager, 1996). Pourtant ce modèle a été remis en cause par une étude récente de P. Bousso et E. Robey (Bousso, 2002). Grâce à un microscope équipé d'un laser biphotonique, ils ont suivi des thymocytes de souris transgéniques pour un TCR, réagréés avec des cellules stromales sélectionnant positivement (CMH⁺) ou non (CMH⁻). Les interactions des thymocytes se répartissent alors de façon équivalente dans deux catégories qui peuvent être détectées avec une même cellule présentatrice d'antigène : contacts stables (entre 6 et 12h) et contacts dynamiques (<40 min). Ces deux catégories sont-elles alors le reflet d'un stade de différenciation du thymocyte plus

ou moins avancée ? Des travaux récents, non publiés, de l'équipe de R. Lewis confirment en tout cas que les conjugués formés avec les cellules épithéliales sont très stables dans le cas où le thymocyte reçoit un signal calcique, nécessaire à sa survie (congrès de Keystone 2004). On peut cependant se demander si ces conjugués durent pendant tout le séjour des thymocytes dans le cortex ?

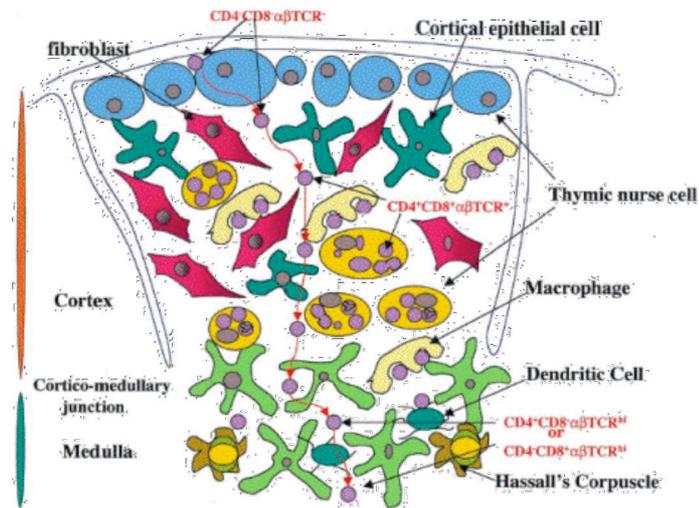
1.2.2. Dans la medulla.

Le temps de résidence d'un thymocyte dans la medulla est visiblement plus long que dans le cortex (temps de renouvellement : de 12 à 16 jours (Scollay and Godfrey, 1995). Cela fait émerger l'idée que la sélection négative résulte plutôt d'interactions multiples et séquentielles, par opposition à l'unicité des contacts proposée lors de la sélection positive. Cette hypothèse est soutenue par le « duration model » (Hogquist, 2001). Ce modèle postule que les signaux imprimés lors de la sélection négative sont de forte intensité mais de courte durée, contrairement à ceux associés à la sélection positive, de plus faible intensité mais soutenus dans le temps. En tout cas, ce modèle permet de mieux comprendre des expériences montrant que les événements de sélection positive corrélaient avec une activation soutenue (>60 min.) de Erk (extra-cellular signal regulated kinase) alors que cette activation est plus transitoire (<20 min.) pendant la sélection négative (Werlen, 2000). Du point de vue de l'évolution, il est raisonnable que la stratégie des contacts multiples ait été sélectionnée. En effet, la multiplicité des contacts du thymocyte dans la zone médullaire lui permet de « scanner » plus d'épitopes du SoI et donc d'augmenter la probabilité de détecter et de censurer l'autoréactivité.

Cependant, des résultats récents obtenus dans un système de réagrégation *in vitro*, contredisent cette idée de contacts courts et séquentiels (Richie, 2002). Dans cette étude, les conjugués demeurent stables pendant plus d'1 heure. En outre, il est toujours possible de détecter des conjugués 7 heures après l'ajout du peptide. Néanmoins cela ne signifie pas forcément que ces mêmes conjugués ont duré 7 heures. Ainsi, la corrélation entre durée des interactions et réponse fonctionnelle est controversée dans ce cas, comme elle l'est pour les interactions T/DC.

Il convient de ne pas opposer catégoriquement ces deux visions (contacts stables ou transitoires) sans avoir préalablement défini précisément les échelles de temps

envisagées dans les deux cas. En effet, à raison d'un contact toutes les 7 heures (Richie, 2002), un thymocyte résidant pendant 10 jours dans la région médullaire serait tout de même en mesure de sonder 34 cellules présentatrices d'antigènes.



Migration, différenciation et interaction des thymocytes avec les APC (Pezzano, 2001)

1.2.3. Migration des thymocytes dans le thymus.

La quasi-totalité de la maturation des thymocytes se déroule au niveau du cortex, ce qui explique que les thymocytes immatures y soient concentrés. Toutefois, ce processus de maturation n'est pas statique, les thymocytes sont amenés à se déplacer entre les différentes régions du thymus durant leur différenciation. Pour commencer, les précurseurs les plus précoces des cellules T sont principalement trouvés dans le thymus au niveau de la région sous-capsulaire, autrement dit la région la plus externe du cortex. C'est dans cette région qu'on peut d'ailleurs mettre en évidence les thymocytes CD4⁺CD8⁺ en prolifération. Au cours de leur différenciation, les thymocytes s'enfoncent plus profondément dans le cortex vers la médulla, et atteignent en général le stade de développement caractérisé par l'expression simultanée des deux molécules CD4 et CD8 à leur surface.

La jonction cortico-médullaire est propice aux étapes de sélection des LT. En effet, on trouve dans le stroma du cortex des cellules épithéliales, dont les caractéristiques leur permettent de jouer un rôle primordial dans la sélection des thymocytes. La médulla, notamment à proximité du cortex, contient de nombreux macrophages et cellules dendritiques, qui sont également des acteurs de cette sélection.

En progressant dans leurs étapes de différenciation, les thymocytes traversent la jonction cortico-médullaire et passent dans la medulla.

L'entrée des précurseurs les plus précoces dans le thymus et la sortie des thymocytes matures pourraient potentiellement avoir lieu au niveau de la jonction cortico-médullaire (Ceredig and Schreyer, 1984). Pour aller dans le sens de cette hypothèse, on peut également remarquer que cette zone est riche en vaisseaux. Il est donc envisagé que l'entrée des précurseurs et la sortie des LT matures utilisent des veinules ou des vaisseaux lymphatiques se trouvant au niveau de la jonction cortico-médullaire (Prockop and Petrie, 2000). Entre ces deux événements, les thymocytes se différencieraient tout en faisant un « aller-retour » entre la jonction cortico-médullaire et le cortex.

1.2.4. Molécules impliquées dans les mouvements intrathymiques.

- Les chimiokines et leurs récepteurs.

Les chimiokines semblent jouer un rôle important dans la migration et/ou la rétention des thymocytes au sein de chacun des compartiments thymiques. D'un côté, les chimiokines pourraient faciliter les interactions des thymocytes avec les cellules épithéliales ; d'un autre côté, les récepteurs des chémokines pourraient produire des signaux menant à l'activation des intégrines à la surface des thymocytes. Plusieurs mécanismes impliquant les chémokines et leurs récepteurs ont ainsi été mis en évidence lors de la migration des thymocytes dans le cortex, vers la jonction cortico-médullaire, puis dans la medulla (Ansel and Cyster, 2001) (Norment and Bevan, 2000).

A titre d'exemple, l'expression du récepteur CCR9 est fortement accrue chez la souris lors de la transition des thymocytes $CD4^-CD8^-$ au stade $CD4^+CD8^+$ (Norment, 2000), et les mouvements des cellules $CD4^+CD8^+$ à travers le cortex sont significativement régulés par ce récepteur CCR9 et son ligand CCL25/TECK (Thymus-Expressed ChemoKine) (Youn, 1999). Initialement, TECK a été détecté au niveau des cellules dendritiques de la medulla (Vicari, 1997), mais il est maintenant démontré que cette molécule est également exprimée par les cellules épithéliales du cortex thymique (Wurbel, 2000). En parallèle à ce mécanisme, on peut noter que l'expression de

CXCR4, qui est impliqué dans la colonisation du thymus, commence à diminuer lors de la transition des thymocytes vers le stade CD4⁺CD8⁺. Inversement, l'expression de CCR5, dont les ligands CCL4/MIP-1 β et CCL5/RANTES sont exprimés dans le thymus, augmente à la surface des thymocytes (Norment and Bevan, 2000).

On peut ainsi établir une liste de chémokines potentiellement impliquées dans la migration des thymocytes à la jonction cortico-médullaire (le récepteur CCR4 et ses ligands CCL22/MDC, CCR4 et CCL17/TARC, CCR3 et CCL11/éotaxine, etc.), puis enfin au sein de la medulla (CCR7 et CCL21/SLC, CCR7 et CCL19/ELC, CCR9 et CCL25/TECK pour les lymphocytes T CD8⁺, CCR4 et CCL22/MDC pour les lymphocytes T CD4⁺, etc.) (Ansel and Cyster, 2001) (Norment and Bevan, 2000). Les observations menées au niveau de la medulla font de CCR7 un bon candidat pour le mécanisme de migration des cellules T matures vers les organes lymphoïdes secondaires (Ueno, 2002). Du fait de la multiplicité des ligands et des zones d'ombre encore existantes (Zlotnik and Yoshie, 2000), il semble probable que cette liste de couples « chémokines/récepteurs » impliqués dans la migration intrathymique des thymocytes soit appelée à grandir dans les années à venir.

- Les intégrines.

D'autres molécules sont impliquées dans les processus de migration, notamment les intégrines. Ainsi, il a été montré chez l'homme que la migration des thymocytes matures vers la medulla nécessite une interaction entre les intégrines VLA-4 (Very Late Antigen) et VLA-5, exprimées par les thymocytes, et la fibronectine, exprimée par le stroma thymique. A l'inverse, l'interaction entre VLA-4 et la fibronectine pour les thymocytes immatures CD4⁺CD8⁺ induit plutôt une forte adhésion locale (Crisa, 1996). Ainsi, le rôle de VLA-4 évolue en fonction du stade de maturation des thymocytes. Pour donner un autre exemple d'intégrine, on peut citer α L β 2/LFA-1 (intégrine également répertoriée sous le nom CD11a/CD18) et un de ses ligands ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1 ou CD54), dont l'interaction a été impliquée dans la différenciation des thymocytes (Fine and Kruisbeek, 1991).

1.3. Différenciation intrathymique des thymocytes.

Le TCR est un hétérodimère composé des chaînes $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. Bien que les thymocytes $\gamma\delta$ soient les premiers à apparaître dans le thymus, ils ne représentent que 1% des thymocytes chez l'adulte, les autres thymocytes étant composés à 99% de TCR $\alpha\beta$. La chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25) s'associe aux chaînes β et γ pour acquérir une plus grande affinité pour l'IL-2, ce qui favorise la prolifération des thymocytes. Le CD44 (protéoglycane) est un récepteur à l'acide hyaluronique, à la fibronectine et au collagène. Ces deux molécules participent à la migration et à l'activation des thymocytes (Haynes, 1989).

Les thymocytes les plus immatures (doubles négatifs = DN) représentant 5% des thymocytes n'expriment ni le complexe TCR/CD3 ni les molécules accessoires CD4 et CD8. Cependant deux populations de thymocytes peuvent être identifiées parmi les thymocytes DN, les thymocytes TCR/CD3⁻CD4⁻CD8⁻CD44⁺CD25⁻ récemment entrés dans le thymus et les thymocytes TCR/CD3⁻CD4⁻CD8⁻CD44⁺CD25⁺. Les thymocytes DN se différencient en perdant l'expression du CD25 et du CD44 et acquièrent à la fois le CD4 et le CD8 pour devenir les thymocytes doubles positifs (DP) TCR/CD3⁻CD4⁺CD8⁺CD44⁻CD25⁻ représentant plus de 80% des thymocytes totaux.

Au stade de DP, les gènes du TCR sont réarrangés successivement en commençant par la chaîne β puis la chaîne α . Les thymocytes ne réarrangeant pas leur TCR meurent par apoptose tandis que les thymocytes aux TCR réarrangés sont capables d'interagir avec les peptides présentés par les CMH des cellules épithéliales. Cette interaction détermine la sélection positive et la sélection négative cruciales pour la différenciation normale des thymocytes.

La maturation des thymocytes est régulée par des programmes de différenciation intrinsèques aux cellules, par des interactions cellule-cellule, et par des facteurs solubles. Ce processus a été décortiqué avec soin depuis de nombreuses années, notamment au travers de l'expression ordonnée de multiples marqueurs cellulaires de surface (complexe TCR/CD3 ; co-récepteurs CD4 et CD8 ; molécules CD44, CD25, CD2, c-kit, etc.) et d'événements moléculaires précis (réarrangement des gènes codant

pour les gènes du TCR).

1.3.1. Etapes du développement.

On peut considérer le précurseur le plus précoce des cellules T comme n'exprimant pas de complexe moléculaire TCR-CD3, ni un des deux co-récepteurs définissant la lignée T CD4⁺ dite « auxiliaire » ou la lignée T CD8⁺ dite « cytotoxique ». Ces cellules triples négatives (TN) (TCR⁻CD3⁻CD4⁻CD8⁻) conduisent à la formation de thymocytes matures simples positifs (SP) soit CD4⁺ (SP4), soit CD8⁺ (SP8) (Benoist and Mathis, 1999) (Berg and Kang, 2001) (Di Santo and Rodewald, 1998) (Fehling and von Boehmer, 1997) (Kuo and Leiden, 1999).

1.3.2. La population triple négative (TN).

Le progéniteur thymique le plus précoce, dans l'état triple négatif comme défini précédemment, commence par subir une succession d'étapes (TN1/2/3/4) qui l'amèneront au stade DP, c'est-à-dire exprimant les deux corécepteurs CD4 et CD8. L'ensemble des cellules TN forme une population hétérogène et les cellules aux stades les plus précoces ne sont pas encore irréversiblement engagées dans la lignée T $\alpha\beta$. La population TN représente environ 5% des thymocytes d'une souris adulte, et la durée de la maturation au stade TN est estimée à environ 2 semaines (Shortman, 1990).

Les thymocytes TN sont également définis comme cellules doubles négatives (DN, CD4⁻CD8⁻) mais cette dénomination peut également se référer à des populations particulières de cellules T $\alpha\beta$ TCR⁻CD3⁺CD4⁻CD8⁻.

1.3.3. Analyse des marqueurs CD44 et CD25.

L'analyse de la population des thymocytes TN a été affinée par l'intermédiaire de deux récepteurs cellulaires de surface, CD44 et CD25/IL-2R α (Godfrey and Zlotnik, 1993). Le récepteur CD44 joue un rôle dans la colonisation du thymus, il est logiquement trouvé à la surface des précurseurs les plus précoces parmi les thymocytes de phénotype TN c-kit⁺CD44⁺CD25⁻ (stade TN1). Les cellules ne sont pas encore

totalemment engagées dans la lignée lymphoïde T, puisqu'elles sont capables de générer des cellules NK, des lymphocytes B et des cellules dendritiques si les conditions environnementales requises sont présentes (Ardavin, 1993) (Matsuzaki, 1993) (Wu, 1991).

L'étape suivante est marquée par l'expression de surface du récepteur CD25 (TN c-kit⁺CD44⁺CD25⁺, stade TN2) et représente une population de précurseurs possédant toujours les gènes codant pour le TCR en configuration germinale (Godfrey, 1994). Il n'est donc pas totalement surprenant que la population TN2 conserve un potentiel de différenciation en cellules dendritiques thymiques (Wu, 1996). La transition entre les stades TN1 et TN2 s'accompagne d'une augmentation nette (5 fois plus) du nombre de cellules en cycle, comme le montrent des expériences d'incorporation de BrdU (Penit, 1995). Ce phénomène serait conduit par l'action du ligand principal de c-kit, SCF, ou encore de l'IL-7 (Rodewald, 1997).

Ensuite, les cellules perdent l'expression des récepteurs c-kit et, en partie, CD44 (c-kit^{-/faible} CD44^{faible} CD25⁺, stade TN3), et acquièrent une expression forte du marqueur CD2, signe que l'engagement dans la lignée T est désormais définitif. C'est lors du passage vers ce stade TN3 que le processus génétique de mise en place du TCR se met en route, en commençant par le réarrangement des gènes codant pour les chaînes β , γ et δ du TCR. Si un réarrangement productif donne une chaîne β , un TCR temporaire (pré-TCR) est exprimé à la surface des thymocytes TN3, associant la chaîne β , spécifique du thymocyte concerné, et la chaîne α commune à toutes les cellules TN3.

L'étape TN3, *via* ce processus dit de « β -sélection », représente donc un point de contrôle important pour les thymocytes, et cela est confirmé par le blocage de la différenciation chez des animaux manipulés génétiquement pour empêcher l'expression des chaînes du TCR (Godfrey, 1994). Si aucun des deux allèles du locus β du TCR ne donne de réarrangement productif, et si le thymocyte ne peut s'engager dans la voie de différenciation des cellules T $\gamma\delta$ (Robey and Fowlkes, 1998), la cellule s'engage dans la voie de l'apoptose.

Au contraire, si le thymocyte traverse avec succès l'étape de β -sélection, et

exprime à sa surface le pré-TCR, il acquiert des caractéristiques cellulaires et moléculaires de cellules en division rapide (Hoffman, 1996) et passe à l'étape suivante (c-kit^{CD44^{-faible}CD25⁺}, stade TN4). Cette étape de prolifération aide également les cellules à effectuer l'exclusion allélique de la chaîne β (Uematsu, 1988), autrement dit à empêcher que le thymocyte ne possède plusieurs réarrangements productifs des gènes codant pour la chaîne β du TCR.

Globalement, on peut résumer les étapes du développement précoce en deux phénomènes : un processus de prolifération/survie non spécifique, et le processus de β -sélection, plus drastique puisqu'il nécessite que le thymocyte ait réarrangé les gènes de la chaîne β avec une phase ouverte de lecture productive et exprime alors un pré-TCR.

1.3.4. Les récepteurs IL-7R α/γ c et c-kit.

Il s'avère que certains des mécanismes que nous avons déjà abordés jusqu'ici pour le développement des progéniteurs précoces agissent également durant le développement des thymocytes. C'est le cas des voies de signalisation utilisant les récepteurs IL-7R α/γ c et c-kit. L'IL-7 et le SCF, ligand de c-kit, sont des inducteurs de prolifération pour les thymocytes immatures *in vivo* (Murray, 1989) (Rodewald, 1995).

De plus, l'IL-7 soutient la survie des thymocytes immatures en maintenant l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 (von Freeden-Jeffry, 1997), si bien que le développement normal des cellules T $\alpha\beta$ peut être partiellement restauré dans les souris IL-7R $\alpha^{-/-}$ et $\gamma c^{-/-}$ suite à l'introduction d'un transgène codant pour Bcl-2 (Akashi, 1997) (Kondo, 1997) (Maraskovsky, 1997).

Toutefois, les données obtenues chez ces animaux $\gamma c^{-/-}$ Bcl2-Tg⁺ sont contestées d'une part parce qu'ils n'ont pas toujours donné ce résultat positif (Di Santo and Rodewald, 1998), et d'autre part du fait d'une totale absence d'effet bénéfique sur le développement des cellules B, T $\gamma\delta$ et NK (Kondo, 1997).

Par conséquent, soit les cytokines γc dépendantes jouent pour ces lignées lymphocytaires un rôle supplémentaire à celui du maintien de la survie cellulaire, soit le

transgène codant pour Bcl-2 ne remplace pas totalement le vrai signal de survie induit par l'IL-7. Enfin, on peut signaler que le rôle de l'IL-7 dans le réarrangement des gènes α et β du TCR n'est pas clairement prouvé, mais il est difficile de bien séparer ces trois phénomènes de survie, prolifération et réarrangement des gènes du TCR, qui sont interdépendants.

En bref, un scénario satisfaisant envisage que l'IL-7 agisse sur les thymocytes comme agent prolifératif avant et après les réarrangements, et comme agent de survie pendant les réarrangements (Di Santo and Rodewald, 1998).

1.3.5. La population double positive (DP).

La population des thymocytes DP ($CD4^+CD8^+$) représente, numériquement parlant, environ 80% des cellules du thymus d'une souris adulte. La plupart des cellules DP sont des thymocytes de petite taille et au repos, même si des cellules en division peuvent également être observées. On estime que les thymocytes restent environ 3 à 4 jours au stade DP (Huesmann, 1991). Les thymocytes TN4, définitivement engagés dans la lignée T $\alpha\beta$, et exprimant un pré-TCR capable de transduire des signaux, évoluent vers le stade DP *via* une phase de transition, les thymocytes immatures simples positifs (ISP). Ces derniers expriment soit l'un, soit l'autre des deux co-récepteurs CD4 et CD8, mais pas encore de TCR $\alpha\beta$ complet. En effet, c'est durant la transition entre le stade TN4 et le stade DP que le réarrangement des gènes codant pour la chaîne α du TCR a lieu. Cette observation est confirmée chez les souris déficientes pour l'expression de la chaîne α du TCR, le développement T chez les animaux ne pouvant exprimer de chaîne β étant bloqué plus précocement (stade TN3) lors de la β -sélection (Mombaerts, 1992) (Philpott, 1992).

L'expression de surface, d'abord faible puis forte, d'un TCR $\alpha\beta$ complet est donc en général observée dans la population DP (Ohashi, 1990). Les thymocytes peuvent donc exprimer un TCR résultant d'un réarrangement productif des gènes codant pour la chaîne α du TCR, et que cette chaîne α s'associe correctement avec la chaîne β sélectionnée auparavant *via* le pré-TCR. A ce point, les thymocytes DP doivent alors traverser un « contrôle de qualité » qui doit répondre à deux contraintes : les TCR

testés doivent dans une certaine mesure reconnaître le soi, mais les thymocytes portant un TCR « dangereux » pour le soi doivent être éliminés. Il s'agit donc pour les thymocytes de traverser les étapes d'une sélection positive et d'une sélection négative, qui conduisent à l'élimination de la majorité d'entre eux (Shortman, 1990). Ces étapes de sélection, permettent également aux thymocytes de s'engager plus avant dans la différenciation vers la lignée soit des cellules T CD4⁺, soit des cellules T CD8⁺.

1.3.6. Les populations simples positives (SP).

Le stade simple positif (SP) est la phase finale de maturation des thymocytes qui prend place au niveau de la jonction cortico-médullaire et de la médulla. Dans ce microenvironnement, les thymocytes SP sont mis au contact de cellules particulières de l'épithélium médullaire. Ces contacts pourraient permettre d'effectuer une étape supplémentaire de sélection négative, en plus de celle ayant lieu au stade DP à la jonction cortico-médullaire. Cependant, l'impact exact de cette dernière étape de sélection sur les thymocytes SP pourrait s'avérer mineur en ne touchant que les moins matures des thymocytes SP, comme cela a été suggéré dans le cas des cellules TCR⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁻ (SP4) (Kishimoto and Sprent, 1997).

En fin de parcours, les cellules T matures obtenues sont prêtes à sortir du thymus et à rejoindre les organes lymphoïdes périphériques. Les deux populations SP matures, soit TCR⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁻ (SP4), soit TCR⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁺ (SP8), représentent à elles deux environ 15% des thymocytes d'une souris adulte. Chez les souris de la lignée C57Bl/6, on note un ratio SP4/SP8 proche de 2, mais il s'avère que ce ratio varie selon les lignées (Kraal, 1983) ou encore selon les individus chez l'homme (Amadori, 1995). Enfin, il est estimé que la différenciation prend à ce stade au maximum deux semaines supplémentaires (Scollay and Godfrey, 1995). Au final, entre la colonisation du thymus par le progéniteur T le plus précoce et la sortie de LT matures, il aura fallu attendre environ 3 à 4 semaines.

1.3.7. Export thymique, migration et dynamique des populations.

La plupart des thymocytes sont éliminés pendant les étapes de la sélection

thymique, et peu d'entre eux sont finalement exportés vers la périphérie. Chez la souris, il est ainsi estimé que l'export thymique maximal se situe aux environs de $1-2 \cdot 10^6$ cellules par jour (Shortman, 1990). Certains résultats obtenus chez le rat indiquent que les cellules T quittant le thymus ne sont pas véritablement de vrais lymphocytes matures, et que des étapes de maturation post-thymique sont envisageables (Sprent, 1993). Après avoir quitté le thymus, les LT colonisent les organes lymphoïdes périphériques, et circulent de manière constante entre ces organes : rate, ganglions lymphatiques, circuits sanguin et lymphatique.

Cette circulation peut toutefois être stoppée, lorsque les cellules sont séquestrées dans les zones T des organes lymphoïdes par des CPA (Sprent and Tough, 2001). Elle peut également être réorientée lorsque les cellules T activées acquièrent la capacité de migrer au travers de l'endothélium, ce que les cellules naïves ne peuvent normalement pas faire (Benoist and Mathis, 1999). Les cellules T activées peuvent donc accéder aux sites extra-lymphoïdes comme la peau, les intestins, les poumons, et ce de manière relativement tissu-spécifique grâce à l'expression spécifique d'intégrines (Butcher and Picker, 1996) (Mackay, 1993), ou bien de récepteurs aux chémokines (Campbell and Butcher, 2000). Ainsi, il apparaît que l'adressage des cellules T vers les organes lymphoïdes secondaires (médié par le couple CCR7/SLC) n'utilise pas les mêmes molécules que l'adressage vers la peau (CCR4/TARC) ou les intestins (CCR9/TECK).

Le schéma de migration hétérogène des cellules mémoires/effectrices, contrairement au schéma homogène des cellules naïves, est en général corrélé avec le site d'activation. Par exemple, des cellules T activées au niveau des plaques de Peyer auront tendance à exprimer les molécules nécessaires à une migration vers les intestins (Benoist and Mathis, 1999). Ces observations ont été récemment affinées chez l'homme, les cellules T mémoires ayant été sub-divisées suivant l'expression du récepteur aux chémokines CCR7 (Sallusto, 1999). Ainsi, il a été montré que les lymphocytes T mémoires humains CCR7⁺, dits TEM (T Effector Memory), expriment des récepteurs leur permettant de migrer, comme nous l'avons précédemment vu, vers les sites d'inflammation. Les lymphocytes TEM peuvent alors activer leurs fonctions effectrices de manière immédiate. A l'inverse, une seconde population de cellules mémoires T CCR7⁺, dites TCM (T Central Memory), reste dans le circuit lymphatique. Ces cellules TCM ne possèdent pas de fonctions effectrices immédiates, mais peuvent

stimuler efficacement les DC et se différencier en cellules TEM (Sallusto, 1999).

2. Réponse immunitaire : interactions LT/DC.

Plusieurs types de cellules présentant l'antigène (CPA) peuvent stimuler une réponse secondaire des lymphocytes T mémoire (LT) ayant déjà rencontré l'antigène. Ce sont les macrophages, les lymphocytes B (LB), les cellules dendritiques (DC) (Banchereau, 1998) et aussi les mastocytes (Villa, 2001). En revanche, seules les DC sont capables d'initier une réponse immunitaire primaire des LT naïfs, ce sont des CPA « professionnelles » (Hart, 1997).

2.1. Les cellules dendritiques.

2.1.1. Historique et différenciation.

Un nouveau type cellulaire appelé « dendritique », en raison de leurs nombreuses, variables et très dynamiques expansions cytoplasmiques a été caractérisé et mis en évidence au sein de la rate chez la souris (Steinman, 1973) (Steinman, 1974a) (Steinman, 1974b) (Steinman, 1975) (Steinman, 1979). La principale observation était que les DC avaient une capacité de stimulation des LT cent fois plus importante que les autres CPA (Steinman, 1978). Ce phénomène est dû au nombre important de molécules du CMH exprimées par ces cellules (Steinman, 1981). Par la suite, il a été démontré que ces cellules étaient capables, après captation de l'antigène, de migrer de la périphérie vers les organes lymphoïdes secondaires (Knight, 1984) (Knight, 1985) (Macatonia, 1986). Enfin, la possibilité de changement de phénotype par les DC et notamment l'augmentation de l'expression du CMH lors de greffe, a fait apparaître la notion d'activation et de maturation de ces cellules (Larsen, 1990).

La difficulté d'étudier la biologie des DC *in vivo* a engendré une multitude de modèles de différenciation cellulaire des DC *in vitro*. Deux principaux protocoles d'obtention des DC ont été décrits à partir des monocytes sanguins CD14⁺ et des précurseurs multipotents hématopoïétiques CD34⁺ (Ardavin, 2001). Le modèle le plus courant d'obtention de DC interstitielles (localisées *in vivo* au niveau des muqueuses et du derme) est obtenu à partir des monocytes cultivés en présence de GM-CSF et d'IL-4

(Salusto, 1994). Cependant les DC interstitielles peuvent également être obtenues à partir des progéniteurs CD34⁺ (isolés de la moelle ou du sang de cordon) en présence de GM-CSF et de TNF- α (Caux, 1996).

2.1.2. Distinction entre les différentes sous-populations de DC.

Les origines et les étapes de différenciation des sous-populations de DC retrouvées chez la souris et chez l'homme ne sont pas complètement élucidées. Plusieurs éléments ajoutent à la complexité : 1/ chez l'homme, il existe peu d'études portant sur des DC fraîchement isolées de tissus, 2/ le CD8 α n'est pas exprimé par les DC humaines, alors qu'il s'agit chez la souris d'un marqueur essentiel permettant de distinguer les DC lymphoïdes et myéloïdes. Deux modèles coexistent pour expliquer la génération des différents sous-types de DC (Shortman and Liu, 2002) : le modèle de « lignée spécialisée » et le modèle de « plasticité fonctionnelle ».

In vivo, il existe de nombreuses populations cellulaires possédant des dendrites et ne jouant pas un rôle dans la présentation de l'antigène. On peut ainsi citer les neurones, les mélanocytes, les cellules étoilées de Ito (qui stockent la vitamine A dans le foie). Il existe aussi plusieurs populations de cellules impliquées dans l'initiation de la réponse immunitaire qui possèdent des dendrites.

Dans les centres germinatifs sont retrouvées principalement deux types de DC, distinctes phénotypiquement et fonctionnellement : les cellules dendritiques folliculaires (CFD) et les cellules du centre germinatif.

Les CFD sont situées dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires. En retenant les antigènes sous forme native complexés à des anticorps et au complément, elles permettent d'induire l'expansion clonale, la diversification et la sélection du répertoire des LB (Kosco-Vilbois, 1997). Leur origine ne semble pas être hématopoïétique (Banchereau, 1998). Dans les zones T du cortex profond, on retrouve un grand nombre de DC. Certaines sont dites « interdigitées » car elles étendent de très longs et dynamiques dendrites. Ces DC interdigitées expriment fortement les molécules du CMH-II et les molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86 (Inaba, 1994). Elles

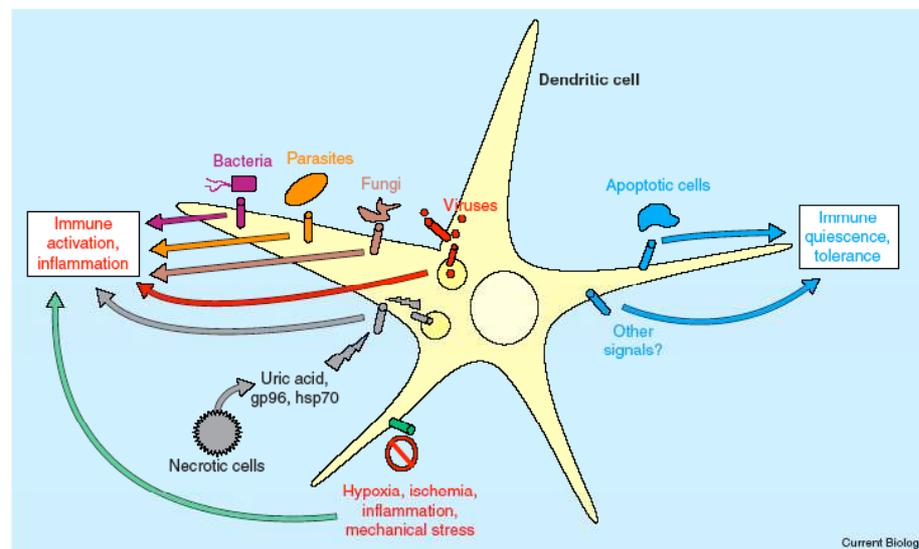
sont ainsi considérées comme étant à l'origine de l'initiation d'une réponse immunitaire. En outre, elles sont fortement positives pour le CD83, un marqueur spécifique de DC humaines activées dont la fonction est toujours inconnue (Zhou and Tedder, 1995), le CD208/DC-LAMP, un marqueur des lysosomes et compartiments riches en CMH-II (de Saint-Vis, 1998) et la fascine, une protéine régulant le remodelage de l'actine, potentiellement impliquée dans la projection et la plasticité des dendrites (Mosialos, 1996).

Les DC constituent une population hétérogène de par leur localisation tissulaire et leurs fonctions. Chez l'homme, on distingue deux populations de DC, les cellules dendritiques de Langerhans (LC) localisées dans les épithéliums malpighiens et les DC interstitielles ou dermiques situées dans le chorion des épithéliums (Banchereau, 1998) (Banchereau, 2000a). Dans le sang, deux autres sous-populations de DC ont aussi été identifiées : les DC CD11c⁺ (DC1) dérivées des monocytes et les DC CD11c⁻ (DC plasmacytoïdes/pDC/DC2) (Pulendran, 2001) (Liu, 2001). Les pDC/DC2 constituent un type de leucocytes sécrétant de grandes quantités d'interféron de type I (IFN- α et - β) en réponse à certains virus (HSV, Sendai) et autres stimuli (*Staphylococcus aureus*, CPG) (Siegal, 1999) (Cella, 1999). Elles constituent une population cellulaire circulante minoritaire représentant de 0,01% à 0,05% des PBMC (Cella, 1999) et auraient une origine lymphoïde (Banchereau, 2000b). Leur rôle est très mal connu, mais il semblerait qu'elles soient capables d'induire une réponse Th2 au contraire des DC1 qui induisent une réponse Th1 (Rissoan, 1999).

Les cellules dendritiques thymiques chez l'homme sont d'une grande hétérogénéité au niveau des marqueurs exprimés (Shortman and Liu, 2002). Il est néanmoins possible d'identifier trois sous-types majoritaires : 1/ des DC CD11b⁻ CD11c⁺CD83⁺DC-LAMP⁺ de morphologie typiquement dendritique s'apparentant aux cellules dendritiques interdigitées retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires, 2/ des DC CD11b⁺CD11c⁺ immatures de lignage plutôt myéloïde, 3/ des DC CD11c⁻IL-3R⁺CD45RA⁺ sécrétrices d'IFN- α s'apparentant aux DC plasmacytoïdes : les plus abondantes (Bendriss-Vermare, 2001) (Vandenabeele, 2001).

2.1.3. Caractérisation.

Les DC ont la propriété remarquable de capturer les antigènes dans les tissus non lymphoïdes puis de migrer dans les organes lymphoïdes secondaires pour présenter l'antigène à des LT naïfs (Banchereau, 1998). Pour cette raison, les DC sont appelées sentinelles de l'immunité. On distingue le stade dit « immature », où les DC sont capables d'endocytose et de phagocytose dans les tissus périphériques, et le stade dit « mature » où elles peuvent présenter l'antigène aux LT et déclencher une réponse immunitaire (Banchereau, 1998). Ces propriétés sont la conséquence d'une régulation fine de l'activité de la cellule, du trafic des protéines intracellulaires vers la surface et de la biogenèse des compartiments.



Captation des antigènes et présentation par les DC (Pulendran, 2004).

A l'état immature, les DC expriment de nombreux récepteurs permettant la capture de l'antigène, comme les récepteurs aux immunoglobulines (RFc), les récepteurs aux protéines de choc thermique (HSP) et très peu de molécules impliquées dans l'activation des LT (Guermontprez, 2002). De plus, la micropinocytose est constitutive ce qui permet à la cellule de tester rapidement le milieu environnant et ce de façon non spécifique de l'antigène. Le volume internalisé est extrêmement important grâce à l'expression des aquaporines 3 et 7 qui permettent l'efflux des grandes quantités de liquide absorbées (deBaey, 2000). Cependant, à ce stade, l'apprêtement de l'antigène est inefficace et les antigènes demeurent intacts dans les compartiments lysosomiaux pendant plusieurs jours (Inaba, 2000) (Turley, 2000). Le système lysosomal des DC est

tout à fait unique car il servirait de réservoir en molécules de CMH-II. Ce phénomène est dû à une faible activité protéolytique. La cathépsine S, responsable de la dégradation de la chaîne invariante Ii est inhibée dans les DC immatures (Pierre, 1998). Une faible dégradation de la chaîne Ii dans les DC immatures favorise la rétention des molécules de CMH de classe II dans les compartiments lysosomiaux (Gatti, 2003). De plus, les molécules de CMH de classe II sont séparées de leur protéine chaperonne H2-DM. Enfin, la demi-vie des complexes CMH-peptides exportés à la surface des DC immatures est très courte et ils ne semblent pas être suffisamment longtemps exposés pour activer les LT (Guermonprez, 2002).

Au stade mature, les DC perdent l'expression des récepteurs de capture de l'antigène et l'activité d'endocytose, mais acquièrent une importante capacité d'activation des LT. Cette principale fonction est due à un ensemble de modifications cellulaires coordonnées à la redistribution des molécules de CMH de classe II et des compartiments intracellulaires à la surface des cellules et à la sécrétion de cytokines (IL-10, IL-12...). En effet, les molécules de CMH de classe II sortent des compartiments lysosomiaux et s'accumulent à la surface en même temps que les molécules de costimulation (CD80, CD83, CD86), les molécules d'adhésion (CD48, CD58) et les molécules de CMH de classe I (Pierre, 1997) (Turley, 2000). Cette redistribution est complètement différente de l'exocytose des lysosomes sécrétoires observée chez les LT cytotoxiques, ou la libération d'exosomes contenant les molécules du CMH chez les LB (Gatti, 2003). La maturation augmente aussi les capacités d'apprêtement de l'antigène sur les molécules de CMH de classe II du fait de l'augmentation de l'activité protéolytique des cathépsines (Fiebiger, 2001) et de l'activation des pompes à proton qui acidifient le pH des compartiments lysosomiaux (Trombetta, 2003). Enfin, les cellules changent de morphologie en étendant leurs dendrites de façon à augmenter la surface d'interaction avec les LT (Guermonprez, 2002).

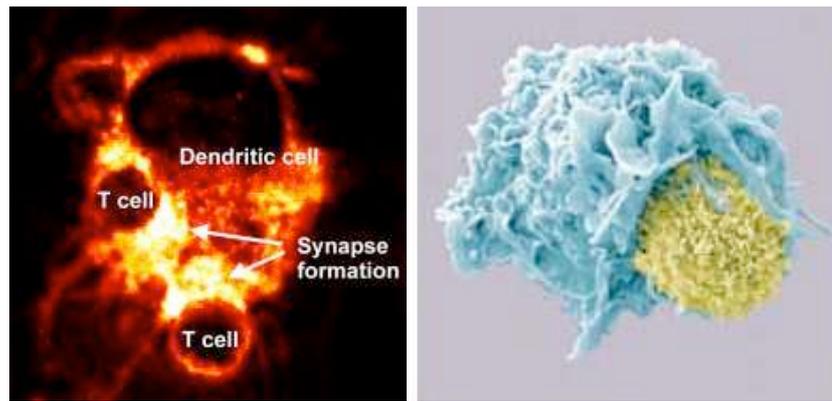
La plupart des DC dans les organes lymphoïdes secondaires sont à l'état immature (Mellman, 2001), il faut donc distinguer la migration des DC de la maturation. Les DC mûrissent en réponse à différents types de stimuli : la reconnaissance directe des pathogènes bactériens comme le LPS passe par les TLR (Toll-like receptor), la reconnaissance indirecte *via* les médiateurs inflammatoires

comme le TNF- α , l'IL-1 β , les RFc et enfin les signaux provenant des LT comme le CD40L et l'OX-40L (Guermonprez, 2002).

Enfin, il faut noter que les DC sont particulièrement efficaces dans l'initiation de la réponse immune de par une série de propriétés spécifiques. Les DC sont capables de présentation croisée, c'est-à-dire de présentation d'un peptide issu d'un antigène exogène sur les molécules du CMH de classe I (Rodriguez, 1999) (Jung, 2002). Le mécanisme n'est pas encore bien décrypté, mais il semble que les antigènes exogènes pourraient être transloqués des phagolysosomes vers le cytosol pour y être dégradés par le protéasome, puis de nouveau transloqués dans les compartiments mixtes (phagolysosome/réticulum endoplasmique) grâce aux molécules TAP (Gagnon, 2002) (Guermonprez, 2003) (Houde, 2003). Les DC sont également capables d'interagir directement avec les LB et les NK (Natural Killer cells) (Banchereau, 2000a) (Moretta, 2002) (Cooper, 2004). Enfin, les DC auraient un rôle dans l'induction de la tolérance périphérique en présentant des antigènes du Soi et en rendant anergique les LT autoréactifs (Steinman 2000) (Steinman, 2002). Le rôle central des DC dans le système immunitaire en fait actuellement une cible privilégiée pour la mise au point de stratégies thérapeutiques anti-tumorales.

2.2. Description de la synapse immunologique.

Le terme synapse, créé par Sherrington en 1897, à partir du mot grec « $\sigma\nu\nu\alpha\psi\iota\varsigma$ » qui signifie liaison, action de joindre ou jonction, a été utilisé exclusivement en neurobiologie pendant plus d'un siècle pour décrire les zones d'interactions entre les neurones ou entre neurones et cellules musculaires. Ce terme a été utilisé en immunologie pour la première fois en 1984 pour décrire les interactions entre les jonctions cellulaires entre les LT et les CPA (Norcross, 1984). Après son introduction en 1984, le terme synapse est repris en 1994 dans une revue pour décrire cette fois l'interface cellulaire entre les LT et les LB (Paul and Seder, 1994).



Formation d'une synapse entre une DC et un Lymphocyte T (West, Dalhousie University, 2005).

Il n'existe pas « une » synapse mais « des » synapses compte tenu des caractéristiques moléculaires et des acteurs cellulaires. Le parallèle le plus frappant entre les synapses immunes et neuronales est leur capacité à faire circuler l'information de cellules à cellules (Trautmann, 2003). La synapse immunologique la plus étudiée est celle formée par un LT et une APC (Delon, 2002) (Dustin, 2000) (Van der Merwe, 2000).

2.2.1. Les premiers contacts cellulaires.

- Adhésion initiale : rôle des intégrines.

Les étapes d'adhésion initiale du LT sur des DC, par exemple, ne sont pas dépendantes de l'antigène (Delon, 1998). Ces processus sont assurés par les intégrines et d'autres molécules d'adhésions (DC-SIGN/ICAM-3) et non par des interactions TCR/CMHp. En effet, la taille de la portion extra-cellulaire du TCR (~7nm) est petite par rapport à celle des intégrines (~20nm). Les premières associations des intégrines rapprochent les membranes des deux cellules qui peuvent alors franchir la barrière stérique imposée par les larges glycoprotéines du glycocalix (CD43 ~45nm) et autoriser les liaisons de CD2 avec ses ligands (CD58/CD48) (~15nm) (Anton van der Merwe, 2000). CD2, une molécule très abondante à la surface du LT, forme ensuite des milliers d'interactions transitoires et de faible affinité avec son ligand ($K_d > 10 \mu M$), stabilisant l'apposition des membranes et favorisant la liaison du TCR avec les molécules du CMH (Davis and van der Merwe, 1996). De profonds changements morphologiques dans la cellule T suivent alors ces événements très précoces (<1min.).

- Importance des remodelages de l'actine.

Le remodelage de l'actine dans le LT se traduit par la formation de lamellipodes (Larges protusions membranaires générées préférentiellement par l'activation de Rac) et filopodes (spicules plutôt dépendants de l'activation de Cdc42) (Nobes and Hall, 1995). Cela est illustré dans un conjugué T/B, par le fort enrichissement de l'actine filamenteuse et de l'eitrine en périphérie du contact, traduisant la proportion de lamellipodes englobant la cellule présentatrice d'antigène (Roumier, 2001) (Tskvitaria-Fuller, 2003).

Des voies indépendantes du TCR sont très certainement impliquées. En effet, d'une part la simple signalisation par LFA-1 peut conduire au remodelage de l'actine filamenteuse et à l'augmentation de l'adhésion (Porter, 2002) et d'autre part l'engagement du CD28, *via* l'activation de Cdc42 indépendamment de celle de ZAP-70, suffit à promouvoir la formation de filopodes (Salazar-Fontana, 2003). Parallèlement, des voies dépendantes du TCR jouent également un rôle. Selon le groupe de C. Wülfing, l'accumulation soutenue (>5 min.) d'actine requiert des quantités optimales de peptide agoniste (Tskvitaria-Fuller, 2003). De même, dans des contacts T/B, les déformations membranaires majeures qui traduisent un intense et dynamique remodelage de l'actine sont strictement dépendantes de la présence de l'antigène (Delon, 1998). Enfin le rôle de Itk, une kinase de la famille Tec, a été récemment mis en évidence dans ces remodelages dépendant de la présence de l'antigène (Labno, 2003).

- Elargissement de la surface de contact.

L'intense dynamique du cytosquelette d'actine contribue très probablement à l'augmentation de la surface de contact entre LT et CPA. Après 5 min de contact, le diamètre moyen de la zone de contact T/B formée en présence d'un peptide agoniste est de 21 μ m, contre 12 μ m seulement avec un agoniste faible (Moss, 2002). Toutefois peu d'études ont réellement estimé la surface de contact entre deux véritables cellules. Pour mesurer plus simplement ce paramètre, L. Samelson et ses collaborateurs se sont placés dans un contexte bi-dimensionnel. Ils ont utilisé des LT de la lignée Jurkat déposés sur des lamelles de verre recouvertes d'anticorps anti-CD3 ou de poly-L-lysine. Ils ont alors montré que l'étalement des cellules sur la lamelle dépend de l'engagement du TCR, de

l'élévation du calcium et de LAT (Bunnell, 2001).

- Augmentation de l'adhésion par les intégrines.

Parallèlement et suite aux phénomènes de réorganisation de l'actine, des mécanismes de signalisation « inside-out » contribuent à l'augmentation de « l'adhésivité » des intégrines. Dans les lymphocytes au repos, LFA-1 est inhibée par des interactions fortes avec l'actine corticale : elle se retrouve dans un état inactif. L'activation des cellules T par le TCR délivre LFA-1 de ces interactions et facilite son mouvement dans la membrane, ce qui augmente son avidité potentielle pour son ligand (Dustin and Springer, 1989). D'autres mécanismes, comme des réarrangements conformationnels peuvent aussi contribuer à l'augmentation de l'affinité des intégrines (Takagi, 2002).

Cette signalisation « inside-out » semble nécessiter la présence de Lck mais pas celle de ZAP-70 (Morgan, 2001). Vav joue aussi un rôle majeur dans ce phénomène dans la mesure où la capacité d'adhésion et l'accumulation des intégrines en réponse à un anticorps anti-CD3 sont affectées dans des cellules issues de souris $Vav^{-/-}$ (Krawczyk, 2002).

- Signal stop et forme sphérique.

Il semble que la coopération entre remodelage de l'actine et augmentation de l'adhésion envoie un « signal stop » à la cellule T. Celle-ci modifie alors son phénotype migratoire et se stabilise sur la CPA. Selon le groupe de M. Dustin (Dustin, 1997) qui a étudié le « signal stop » sur une bicouche lipidique, ce phénomène est dépendant d'une signalisation par le TCR. L'arrêt du « crawling » des lymphocytes peut aussi être induit par l'augmentation de l'affinité de LFA-1 par un anticorps. De manière simultanée ou légèrement postérieure à l'arrêt sur la CPA, l'activité membranaire diminue et le LT adopte une forme plus sphérique (Krummel and Davis, 2002).

2.2.2. Modifications du cytosquelette de microtubules.

Parallèlement à la réorganisation de l'actine, le cytosquelette de microtubules du

LT subit de profondes modifications qui aboutissent *in fine* à la réorientation du centre organisateur des microtubules (MTOC) dans une région proche de la zone de contact avec la CPA.

- Le MTOC/centrosome.

Le centrosome est une organelle complexe composée de deux centrioles, eux-mêmes constitués de tubuline, de centrine et de nombreuses autres protéines. Le centriole mère représente le site de nucléation des microtubules qui s'assemblent et rayonnent vers la périphérie cellulaire. Le nom de « centre organisateur des microtubules » attribué au centrosome se trouve ainsi justifié. Les microtubules sont polarisés : leurs extrémités négatives sont localisées du côté du MTOC et leurs extrémités positives (site de croissance du microtubule) se situent à la périphérie. En conditions normales dans les LT, l'appareil de Golgi et les endosomes de recyclage sont localisés autour du centrosome. Ils le suivent dans ces mouvements. Cette distribution résulte en réalité de l'équilibre entre une force de traction vers les extrémités négatives, exercée par des moteurs de type dynéine, et une autre vers les extrémités positives, exercée par les moteurs de type kinésine.

- La réorientation du MTOC.

Les premières descriptions de la réorientation du MTOC face à la CPA proviennent d'études réalisées sur des LT CD8 ou des cellules NK en contact avec leurs cibles (Geiger, 1982). La présence de l'antigène sur les cellules cibles entraîne alors la polarisation conjointe du centrosome et de l'appareil de Golgi dans le CTL, mais pas dans la cellule cible, fut-elle un CTL. De plus, cette réorientation est requise pour une lyse efficace. Ce mouvement de centrosome se produit aussi dans les LT CD4 en contact avec des cellules B (Kupfer, 1987).

Les modèles d'études suivant : 1/ Hybridomes T de souris activés par une lignée de cellules B chargée avec un antigène (Stowers, 1995), 2/ Cellules T Jurkat exprimant des chimères CD25- ζ et CD25-CD3 ϵ , activées par billes ou anticorps (Lowin-Kropf, 1998), 3/ Clones T CD4 de souris activés par des fibroblastes transfectés avec des

molécules de CMH-II, ICAM-1 et B7 (Sedwick, 1999) ont mis en évidence que la présence d'antigène sur les CPA est nécessaire à la réorientation du MTOC. La signalisation par le TCR (Sedwick, 1999), ou la présence d'un motif ITAM (Lowinkropf, 1998) semble suffisant pour induire une réorientation du MTOC.

3. Synapses immunologiques T/DC.

Les contacts T-DC présentent la particularité de pouvoir se mettre en place en l'absence d'antigène et de CMH à la surface des DC, entraînant des réponses calciques dans les cellules T, avec augmentation locale des phosphotyrosines (Revy, 2001) (Delon, 1998) (Montes, 1999). Ces résultats sont cohérents avec l'observation selon laquelle les DC sont « scannées » par les lymphocytes T de façon indépendante de l'antigène (Delon, 1998) (Inaba, 1989), et provoquent une mobilité accrue des cellules T qui pourrait faciliter la reconnaissance d'antigènes exogènes faiblement présentés. Récemment, l'observation *in vivo* d'interactions T-DC dans des organes lymphoïdes a confirmé ces résultats (Bouso, 2002) (Miller, 2002). Ces interactions ont sans doute aussi un rôle déterminant dans la survie des LT naïfs (Revy, 2001).

3.1. Organisation des protéines dans le recrutement du TCR.

3.1.1. Des signaux dépendants du TCR.

Plusieurs études ont montré que des signaux directement en aval du TCR président à sa propre accumulation dans le cSMAC « central supramolecular activation cluster »: 1/ le cSMAC n'est pas observé en absence de peptide ou avec des agonistes partiels (Krummel, 2000) (Monks, 1998), 2/ la densité de CMHp dans le cSMAC formé avec une bicouche lipidique corrèle avec le temps de demi-vie du complexe TCR/CMHp (Grakoui, 1999), 3/ des anticorps anti-TCR inhibent l'accumulation de CMHp dans le cSMAC (Wulfing, 2002). Cette interaction induit également la formation d'un anneau périphérique ou pSMAC « peripheral supramolecular activation cluster » où s'accumule les intégrines LFA-1 et la taline.

3.1.2. Le cytosquelette d'actine.

L'accumulation dense et centrale du TCR à la synapse dépend aussi de l'intégrité du cytosquelette d'actine et de son remodelage. Ainsi 1/ la cytochalasine D, une drogue perturbant la polymérisation de l'actine, empêche la stabilisation et la coalescence des petits agrégats de ζ -GFP au centre de la synapse (Krummel, 2000), 2/ l'accumulation de CMHp est plus diffuse à l'interface entre cellules T et B provenant de souris $Vav^{-/-}$, en comparaison aux souris $Vav^{+/+}$ (Wulfing, 2000), 3/ des myosines, moteurs moléculaires se déplaçant sur les filaments d'actine, sont impliquées dans le déplacement de billes liées aux molécules de surface du lymphocyte T en direction de la CPA (Wulfing and Davis, 1998).

Ces données démontrent l'influence évidente du cytosquelette d'actine sur le mouvement des récepteurs, en particulier du TCR. Parmi toutes les sous-unités du complexe TCR/CD3 ζ , la chaîne ζ est soupçonnée de jouer un rôle important. En effet, 30 à 40% de la quantité totale de ζ est associée constitutivement au cytosquelette d'actine. De plus, l'association de ζ au cytosquelette augmente après activation (Caplan and Baniyash, 1996). De façon curieuse, l'association au cytosquelette est abolie par une simple mutation ponctuelle de la tyrosine C-proximale (Rozdzial, 1995). Les liens moléculaires insolubles de ζ présents dans les rafts restent néanmoins mal définis.

3.1.3. Raft.

Les rafts sont des microdomaines lipidiques membranaires, enrichis en cholestérol, glycosphingolipides (tel que le ganglioside M1 (GM1)) et protéines à ancre GPI (glycosyl-phosphatidyl-inositol) (Simmons and Ikomen, 1997).

Expérimentalement, les rafts sont caractérisés par leur insolubilité à basse température dans des détergents non-ioniques. Ils peuvent être isolés par flottaison sur gradient de sucrose ou visualisés directement par microscopie à fluorescence, grâce à la liaison de la toxine cholérique couplée à un fluorochrome au GM1. Des molécules essentielles pour le lymphocyte T, comme Lck, Fyn et LAT, sont retrouvées constitutivement dans les rafts. D'autres comme le CD45 en seraient exclues (Janes,

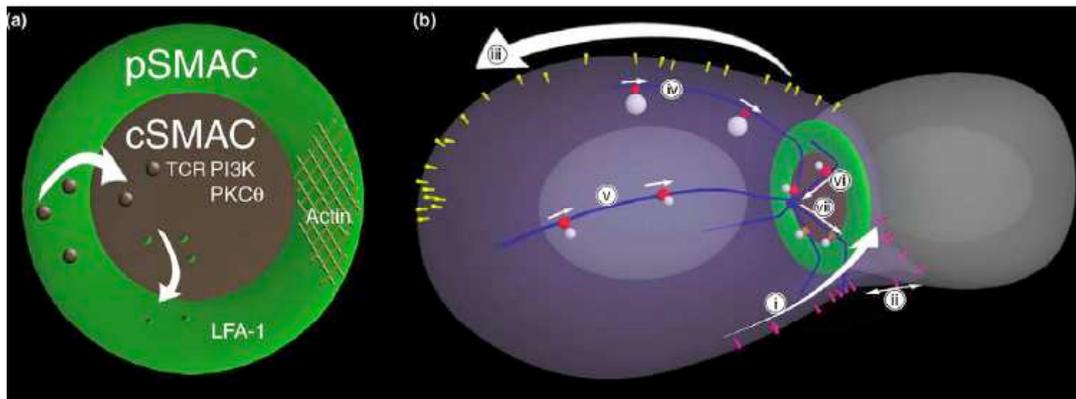
1999). Depuis quelques années, de nombreux travaux ont analysé leur localisation et leur contenu en protéines, avant ou après stimulation par le TCR.

3.1.4. Recrutement du TCR dans les rafts.

Par une approche biochimique, il a été démontré que l'activation du TCR par des anticorps anti-CD3 entraîne le recrutement du TCR/CD3 et de la forme hyperphosphorylée de ζ (p23) dans les rafts (Montixi, 1998). Bien que certaines données ultérieures n'aient pas toujours, pour des raisons de sensibilité du TCR à l'extraction, confirmé le recrutement de formes phosphorylées du TCR (Zhang, 1998), il semble que l'intégrité des rafts soit un élément déterminant dans la transduction du signal par le TCR (Xavier, 1998). Par la mobilisation de Lck, ZAP-70 (Janes, 1999) et LAT et par l'exclusion du CD45, les rafts offriraient un environnement favorable à la signalisation.

3.1.5. Recrutement des rafts dans la synapse.

Une première étude du laboratoire d'A. Lanzavecchia a suggéré que la redistribution et l'accumulation des rafts à la synapse sont orchestrées par le CD28. En effet, le recrutement de GM1 à l'interface entre les lymphocytes T et les billes n'est observé que si ces dernières sont recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Viola, 1999). Etudiant la localisation des rafts dans le système de la bicouche artificielle, l'équipe d'A. Shaw a cependant fait l'observation contradictoire que la présence de CD28 n'est pas nécessaire à l'accumulation des rafts (Burack, 2002). Ils ont en outre constaté que l'enrichissement des rafts dans le cSMAC est modéré et qu'il est plus une conséquence de leur disparition du pSMAC que celle du réarrangement global des microdomaines dans toute la membrane. En tout cas, si les rafts se retrouvent concentrés à la synapse, leur coalescence et leur recrutement ne signifient pas nécessairement une agrégation des protéines résidentes dans ces domaines. Malgré une activation localisée du TCR à la zone de contact avec des billes anti-CD3/anti-CD28, les protéines à ancre GPI semblent conserver une distribution aléatoire et non oligomérisée (Glebov and Nichols, 2004).



Représentation schématique du SMAC (Poeni, 2004)

3.1.6. Rôle de l'agrine dans la synapse.

La découverte que les lymphocytes T expriment une des isoformes de l'agrine (Khan, 2001) a fait naître une hypothèse supplémentaire pour expliquer l'agrégation des récepteurs dans la synapse immunologique. L'agrine est une glycoprotéine sécrétée par les neurones pré-synaptiques dans la jonction neuro-musculaire. Dans ce contexte, cette protéine induit indirectement l'agrégation des récepteurs à l'acétylcholine situés sur la cellule musculaire post-synaptique (Trautmann and Vivier, 2001). De manière intrigante, l'agrine purifiée à partir de lymphocytes T activés par une multi-lectine, promeut l'agrégation du TCR, du CD28 et du GM1. Il a donc été proposé que l'agrine, par des mécanismes communs aux systèmes nerveux et immunitaires, contribue à la genèse de microdomaines particuliers, riches en molécules de signalisation. Ce concept rejoindrait celui de l'agrégation des rafts induite par la stimulation par le TCR. Néanmoins, le mode de fonctionnement de cette molécule et son importance physiologique dans le système immunitaire restent à démontrer.

3.1.7. Mécanismes impliqués dans l'assemblage des intégrines.

Les mécanismes régulant l'accumulation des intégrines à la synapse, et plus schématiquement dans l'anneau du pSMAC, sont probablement encore moins clairs que pour le TCR. Une signalisation par le TCR semble nécessaire dans la mesure où des anticorps anti-CMH-II désorganisent la répartition périphérique de ICAM-I dans des conjugués T/B (Huppa, 2003). Il est très probable que l'association de LFA-1 aux filaments d'actine joue un rôle. La taline, soupçonnée d'intervenir dans

l'immobilisation latérale des complexes d'intégrines (Sampath, 1998) est localisée sous LFA-1 dans la synapse mature, est un bon candidat pour faire le lien entre LFA-1 et l'actine. Pourtant contrairement à l'accumulation du TCR qui requiert l'activité de Vav et de Wasp, la voie contrôlant l'accumulation des intégrines ne dépendrait que de Vav et pas de Wasp (Krawczyk, 2002).

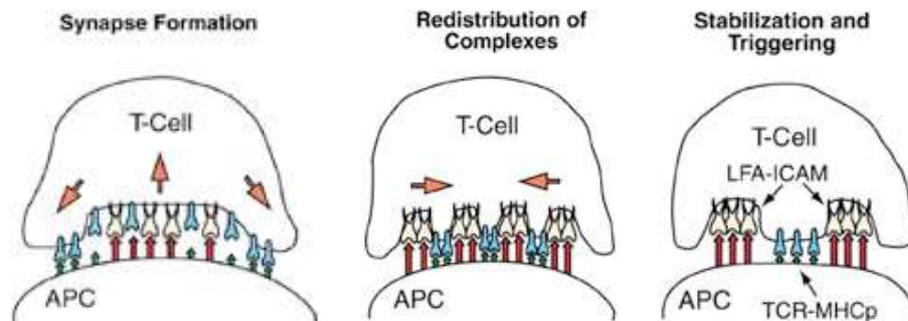


Illustration schématique de la formation d'une synapse immunologique. (Qi, 2001).

3.2. Mécanismes et fonctions de la polarisation du MTOC.

3.2.1. Rôle de ZAP-70.

L'implication de ZAP-70 dans la polarisation du MTOC a été démontrée dans un système entièrement cellulaire. En effet, l'activation des LT par les CPA (dans environ 80% des cas) est la résultante de l'activité kinase de ZAP-70 ainsi stimulé (Kuhne, 2003) (Blanchard, 2002).

Plusieurs arguments appuient l'hypothèse d'une action directe de ZAP-70 sur les microtubules, laquelle contribuerait à la réorientation du MTOC, 1) l'association de l' α -tubuline (Huby, 1995), 2) la phosphorylation de l' α -tubuline (Isakov, 1996), 3) la phosphorylation des tyrosines de l' α -tubuline induite par l'activation du TCR (Ley, 1994). En outre il semble que la phosphorylation de l' α -tubuline affecte son incorporation dans les polymères de microtubules et inhibe leur assemblage (Ley, 1994). Nous pouvons donc envisager que la phosphorylation des microtubules par ZAP-70 à proximité de la zone de contact, destabilise les microtubules et favorise la repolarisation du MTOC.

Néanmoins, il existe des évènements indépendants de ZAP-70 pour l'orientation du MTOC ce qui implique les molécules de LAT (Kuhne, 2003) et la protéine Cdc42 activée par Vav (Stowers, 1995) (Wong, 1998).

3.2.2. Rôle des CPA.

S'il est certain que la réorganisation des molécules dans la synapse dépend partiellement des signaux intrinsèques au LT CD4, il est aussi indéniable qu'elle dépend de la nature de la CPA. En effet, en fonction du stade d'activation des CPA, immatures ou matures, le taux membranaire de molécules de CMH de classe I et II varie ainsi que le taux de molécules de costimulation. La fluidité et la composition lipidique de la membrane qui, avec le cytosquelette, régulent la diffusion de ces molécules, sont des candidats potentiels.

Une expression différentielle de molécules d'adhésion pourrait aussi être à l'origine de ces différences. Ainsi la maturation accroît l'expression des intégrines et ceci est très certainement responsable des différences d'adhésion et de la nature des contacts (Benvenuti, 2004) (Blanchard, 2004). Une meilleure adhésion des LT aux DC matures pourrait, en retour, favoriser l'organisation de la synapse.

Enfin, même si la proportion de TCR stimulés est semblable avec les DC immatures et matures, la forte densité des molécules du CMH à la surface des DC matures est susceptible d'induire un pontage des TCR.

OBJECTIFS

DE LA THESE

Du fait de l'implication de nouvelles molécules d'origine neuronale et/ou neuromusculaire dans la régulation de la réponse immunitaire et notamment dans la formation des différentes synapses, nous avons recherché si d'autres molécules d'origines similaires étaient présentes dans l'immunité.

Nous nous sommes axés sur la recherche de molécules neurologiques fonctionnant comme dans le domaine de l'immunologie : c'est-à-dire des molécules formant des complexes entre les molécules transmembranaires (récepteurs) et des ligands solubles. Cet axe est fondé sur les similitudes et l'importance de ce genre de molécules en regard des cytokines, des chimiokines et de leurs récepteurs ainsi que sur les modes d'action de proximité et/ou à distance. C'est pour ces raisons que notre choix s'est fixé sur les molécules neuronales de la famille des sémaphorines de classe III.

De plus ces molécules neurologiques ont une importante action régulatrice sur le cytosquelette au niveau des neurones. Dans les années soixante, les docteurs Jacob et Monod avaient émis l'hypothèse que le cytosquelette des cellules de l'immunité était indispensable au bon déroulement de chaque étape de la réponse immunitaire et que, de ce fait, la recherche des molécules pouvant réguler ce mécanisme était une des bases fondamentales pour une meilleure compréhension de la réponse immunitaire et/ou cancéreuse.

Nous avons donc évalué la présence et le rôle des molécules neuronales solubles ou membranaires dans les cellules de l'immunité (article n°1) et au cours de la réponse immunitaire (article n°1 et 2). Nous nous sommes axés plus particulièrement sur un récepteur (neuropiline-1) ainsi que sur la famille des Sémaphorines solubles de classe III. Au niveau du développement neuronal, les interactions entre les Sémaphorines et la neuropiline-1 sont impliquées dans l'orientation des axones, la réorganisation du cytosquelette par la modulation de l'activité des protéines G (*Rac*, *Rho*), et dans l'induction de l'apoptose des neurones.

Nous avons donc également étudié les effets des Sémaphorines sur la fonctionnalité des cellules dendritiques et des lymphocytes T lors de l'induction d'une réponse immunitaire (article n°2). Nous avons aussi recherché les facteurs pouvant influencer la sécrétion des Sémaphorines et l'expression de leurs récepteurs (article n°2

et 3) mais également le rôle de ces molécules dans le développement de cellules de l'immunité et notamment au niveau de l'ontogénie T dans le thymus (article n°3).

ARTICLE N°1

A neuronal receptor, Neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. R. Tordjman, Y. Lepelletier, V. Lemarchandelle, Golard, A. Chedotal, O. Hermine, P.H. Roméo. Nat. Immunol. 2002 May; 3(5):477-82.

Au cours de la réponse immunitaire les cellules dendritiques (DC) et les lymphocytes T (LT) communiquent entre eux *via* la formation de synapse au niveau des zones de contacts entre le TCR et les antigènes présentés par les CMH de classe II. Dans ce contexte et au vu de l'apparition de nouvelles molécules neurologiques, comme l'agrine et les sémaphorines de classe 4, dans le domaine de l'immunologie nous avons recherché la présence d'une autre famille de protéine neurologique que sont les neuropilines.

Nous avons dans un premier temps détecté la présence de la neuropiline-1 (Np-1) sur les DC et suivi son expression au cours de la différenciation des DC à partir des monocytes. Au fur et à mesure que les monocytes acquièrent les caractéristiques des DC, c'est-à-dire le CD1a et DC-SIGN, ils commencent à exprimer la Np-1 à leur surface. Dans un deuxième temps, nous avons recherché les fonctions de ce récepteur au cours de la réponse immunitaire et plus particulièrement au cours du contact entre les LT et les DC. En utilisant un anticorps bloquant anti-Np-1, nous avons observé un blocage de la prolifération des LT médiée par les DC. Cette inhibition s'accompagne également d'une diminution de la formation de conjugués DC/LT.

Ces résultats mettent en évidence 1) la présence et l'expression d'une molécule neuronale au niveau des cellules immunitaires et notamment au niveau des cellules les plus spécialisées dans la présentation antigénique que sont les DC, 2) l'implication d'une nouvelle molécule au niveau de la formation de la synapse immunologique apporte de nouvelles possibilités dans la modulation et la compréhension de l'engagement ou de l'arrêt de la communication cellulaire entre les deux plus importants types cellulaires impliqués dans les réponses immunitaires.

Ces données ouvrent également une nouvelle voix d'étude pour une meilleure compréhension du système immunitaire du fait de l'importance du réseau d'actine et des différentes molécules impliquées dans la mobilité du cytosquelette au cours de l'immunité, puisque ces molécules de la famille des neuropilines et plus

particulièrement de leurs ligands peuvent moduler la mobilité du cytosquelette dans les neurones.

Afin de mieux appréhender les effets des sémaphorines sur les cellules de l'immunité nous avons par la suite recherché la présence d'un des principaux ligands de la NP-1 qu'est la sémaphorine-3A dans les DC et les LT. Puis nous avons recherché les mécanismes d'action de cette protéine soluble sur l'induction d'une réponse immune et plus particulièrement au cours de la formation de la synapse immunologique (article n°2).

ARTICLE N°2

Immunosuppressive role of Semaphorin 3A on T cell proliferation is mediated by inhibition of actin cytoskeleton reorganization

Yves Lepelletier^{1*}, Ivan Cruz Moura^{1*}, Réda Hadj-Slimane², Amédée Renand¹, Susana Fiorentino⁴, Cédric Baude¹, Anat Shirvan⁵, Ari Barzilai⁶, Olivier Hermine¹. (accepté, Eur. J. Immunol.)

Comme nous l'avons montré dans l'article précédent les lymphocytes T (LT) expriment très peu de neuropiline-1 (NP-1) à leur surface contrairement aux cellules dendritiques (DC). Nous nous sommes donc demandé si son taux d'expression était augmenté au cours de l'activation T induite par les DC et *via* les stimulations CD3/CD28. Dans un deuxième temps, nous avons recherché si le ligand naturel de la NP-1 qu'est la sémaphorine-3A (Sema-3A) était exprimé dans les cellules de l'immunité et sous quelles formes. En effet il existe différentes formes de Sema-3A, la forme répulsive d'un poids de 95kDa et son produit de clivage d'un poids de 65kDa dont l'activité répulsive est moindre et qui par conséquent entre en compétition avec la forme répulsive pour la fixation à la NP-1. Dans un ultime test, nous avons recherché quels étaient les mécanismes de la Sema-3A sur le contrôle de la réponse immune et plus particulièrement ses effets sur le cytosquelette d'actine des cellules de l'immunité comme les lymphocytes T et les DC.

Nous avons donc pu mettre en évidence que l'activation des LT induit l'augmentation de la NP-1 à la surface des LT CD4 et CD8. De ce fait, on peut émettre les hypothèses suivantes : 1) la NP-1 pourrait jouer un rôle important dans la réponse immune, 2) son rôle pourrait être modulé du fait notamment des différentes formes de sémaphorine-3A sécrétées au cours de la réponse immune. En effet, ce ligand naturel de la NP-1 a été détecté à la fois dans les surnageants de culture au cours d'une réponse immunitaire mais également dans ceux des LT activés et des différents types de DC (immatures et activées). Différentes formes de sémaphorines ont ainsi pu être détectées. De ce fait, nous avons recherché quelles pouvaient être les fonctions des sémaphorines de classe III au cours de la réponse immune. Nous avons alors observé que l'addition de sémaphorine-3A recombinante au cours de la réponse immune entraîne une diminution

de la prolifération des LT induite par les DC activées. De plus, si les formes endogènes sont inhibées par l'utilisation de peptide ou d'anticorps bloquant, la réaction immunitaire est amplifiée et se traduit par une surprolifération des LT. Afin de mieux comprendre les mécanismes liés à ce phénomène nous avons recherché si des modifications structurales pouvaient être induites dans la synapse immunologique.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence un lien entre la zone de fixation effectrice entre les LT et les DC pour l'activation du TCR et la concentration en sémaphorine-3A. En effet, la polarisation du TCR dans la synapse est dépendante de la localisation de la sémaphorine-3A dans la zone de contact. Cependant ce mécanisme est un effet secondaire de l'action de la sémaphorine-3A sur la réorganisation du cytosquelette d'actine des LT. En effet, le sémaphorine-3A inhibe la réorganisation des filaments d'actine au niveau de la zone de contact des cellules. De plus, du fait de ce blocage, le recrutement d'autres molécules associées aux filaments d'actine indispensable à la formation d'une synapse immune comme les sphingolipides GM1 est également abrogé.

Nous avons donc ainsi mis en évidence l'implication de molécules solubles d'origine neuronale dans la régulation du cytosquelette au cours de la réponse immune sans oublier que la labilité de ces protéines apporte de nouveaux concepts dans la régulation transitoire des contacts cellulaires et donc introduit la notion de temps de contact entre les LT et les DC.

Cette notion de contact, entre LT et CPA ainsi que l'action de la sémaphorine-3A sur les LT, nous ont orientés par la suite à étudier l'expression et les fonctions du complexe NP-1/sémaphorine-3A au cours de l'ontogénie T dans le thymus et plus particulièrement au cours de l'adhésion des thymocytes aux cellules épithéliales thymiques ainsi que sur la mobilité des thymocytes (article n°3).

Immunosuppressive role of Semaphorin-3A on T cell proliferation is mediated by inhibition of actin cytoskeleton reorganization

Yves Lepelletier^{1*}, Ivan Cruz Moura^{1*}, Réda Hadj-Slimane², Amédée Renand¹, Susana Fiorentino⁴, Cédric Baude¹, Anat Shirvan⁵, Ari Barzilai⁶, Olivier Hermine¹.

¹ *CNRS UMR 8147, Faculté de médecine, Université René Descartes, Paris V, Hôpital Necker, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 161 rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.*

² *TRAGEX Pharma, Tour Reflets, Paris, France.*

⁴ *Grupo de Inmunobiología and Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia*

⁵ *Departement of Neurology and the Felsenstein Medical Research Center, Rabin Medical Center, Beilinson Campus, and the Sackler School of Medecine, Petach Tiqva 49100, Israel.*

⁶ *Departement of Neurobiochemistry, George S. Wise Faculty of Life Sciences, Tel Aviv University, Tel Aviv 69978, Israel.*

* Both authors contributed equally to this work

Corresponding author:

Olivier Hermine

CNRS UMR-8147; Université René Descartes Paris V,
Hôpital Necker, 161 rue de Sèvres,
75743 Paris cedex 15, France.

Tel: 00 33 1 44 49 53 86 - Fax: 00 33 1 44 49 06 76

e-mail: hermine@necker.fr

SUMMARY

Timely negative regulation of the immune system is critical to allow it to perform its duty while maintaining it under tight control to avoid overactivation. We previously reported that the neuronal receptor Neuropilin-1 (NP-1) is expressed on both dendritic cells (DC) and T cells in human lymph nodes. However, the role of NP-1 interaction with its physiological ligand Semaphorin-3A (Sema-3A) on immune cells remains elusive. Here we show that Sema-3A is expressed by activated DC and T cells and that its secretion in DC/T cell cocultures is delayed, reaching a plateau after 96h. Sema-3A/NP-1 interaction down-modulated T cell activation since addition of Sema-3A in DC/T cell cocultures dramatically inhibited allogeneic T cell proliferation in a dose-dependent manner. More importantly, neutralization by blocking antibodies or by antagonist peptide of endogenous Sema-3A produced by DC/T cell cocultures resulted in a 130% increase in T cell proliferation. Sema-3A acted directly on T cells, since it could also block anti-CD3/CD28 stimulated proliferation of T cells. Finally, immunomodulatory functions of Sema-3A relied on the blockage of actin cytoskeleton reorganization, affecting TCR polarization and interfering with early TCR signal transduction events such as ZAP-70 or focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation. Therefore, we propose that Sema-3A secretion and the resulting NP-1/Sema-3A interaction on activated T cells are involved in a negative feedback loop controlling DC-induced T cell proliferation. These data uncover novel mechanisms involved in late regulatory steps of the immune response.

INTRODUCTION

Dendritic cells (DC), the most efficient antigen-presenting cells, are of the utmost importance for the initiation of immune response since they are the only cells capable to stimulate naive T cells [1, 2]. Following exposure to antigen, DC acquires the unique capacity to migrate from the periphery into the T cells areas of secondary lymphoid organs. Recent studies in mice using two-photon microscopy showed that, in lymph nodes, the interaction between antigen-loaded DC and naive T cells is a dynamic process presenting three distinct phases. In the initial phase (during the first 8 h) T cells interact transiently with antigen-bearing DC. The second phase (between 15 and 20 h) is characterized by the formation of DC/T cells stable contacts. During phase 3, on the second day, T cells recover their dynamic movements and proliferate [3, 4]. The outcome of antigen presentation is either priming or tolerization of T cells depending on the maturation status of DC [4-6].

DC express antigen as MHC-peptide complexes that are recognized by the T cell receptor (TCR). Stimulation of T cells is triggered by the engagement of multiple receptors and their cognate ligands TCR triggering confers the antigen-specificity of T cell activation, and costimulatory signals provided by antigen presenting cells (APCs) determine the outcome of T cell response. While CD28 synergizes with TCR signaling, CTLA-4 can inhibit T cell proliferation [7]. CTLA-4 has been proposed as a master switch for peripheral T cell tolerance acting directly by inhibiting CD28 signaling [7, 8]. CTLA-4 cell surface expression is dependent on the activation status of T cells and controlled at both transcriptional and lysosomal targeting levels [9, 10]. In addition, soluble CTLA4-Ig can efficiently block costimulatory signal and inhibit T-cell clonal expansion *in vivo* [11, 12]. The presence of CTLA-4 at the cell surface can explain how activated T cells can inhibit the activation of resting T cells. However, little is known about the soluble factors that are secreted during a DC/T cell interaction and that could participate in the feedback control of T cell proliferation.

Semaphorins are members of a large, highly conserved family initially characterized by their role in axon guidance [13, 14] that are classified according to their structural features into seven subclasses. Subclass 3 members (Sema-3) are the only ones that are secreted and capable to form steep tissue gradients. These secreted proteins contain an immunoglobulin-(Ig-) like domain C-terminal to their characteristic Semaphorin (Sema) domain. The other members of Semaphorin family are cell-associated and need cell-cell contacts to mediate their function. Neuropilin-1 (NP-1), a

member of the axonal glycoprotein neuropilin family, is a cell surface protein that acts as a receptor for Semaphorin-3A (Sema-3A) [15, 16]. Its associated protein Plexin-A (PlexA1-3) [17-19] transduces the Sema-3A activated signal whereas NP-1 is the ligand-binding structure. The binding of Sema-3A to NP-1 induces neuronal growth cone collapse through actin cytoskeleton reorganization [20] that plays a critical role in the development of the nervous system [21]. Sema-3A is secreted as homodimers composed of 95kDa monomers. This homodimer can undergo proteolytic cleavage through the removal of the 33kDa carboxy-terminal domain resulting in the dissociation of Sema-3A homodimers into 65kDa monomeric forms [22]. These lower m.w. forms exhibit reduced repulsive activity on neuronal dendrites [23] and compete with the 95kDa form for receptor binding. Semaphorins display tissue specific and highly dynamic expression patterns in the developing nervous system as well as in non-neural tissues [13, 24-32], but their pattern of expression and role in the immune system remain to be determined.

We have recently reported that NP-1 is expressed by both DC and T cells and that NP-1 plays a critical role in the DC-T cell synapse formation [33]. DC-T cell contact induces NP-1 polarization and NP-1-transfected COS-7 can promote T cells clustering. However, no data exist on the mechanisms implicated in the modulation of the immune response by NP-1 and its natural ligand, Sema-3A. Given the accumulating evidence of the involvement of semaphorins in the immune system [33-37], we decided to investigate the role of Sema-3A during an immune response. We observed that Sema-3A is secreted by activated T cells, but not by resting T cells. Sema-3A secretion reached maximum levels after 96h of DC/T cells cocultures and played an immunomodulatory role by inhibiting T cell proliferation. Sema-3A did not act by altering the formation of DC/T cell clusters but through modulation of actin polymerization, abrogating TCR polarization and early signal transduction events including ZAP-70 and focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation. These data shed light on the role of Sema-3A/NP-1 interaction in the immune system as a late negative regulator of the immune response. These findings could provide the basis for new alternatives in immunosuppressive therapies.

RESULTS

Sema-3A is expressed in both activated DC and T cells.

Secreted and transmembrane semaphorins are widely expressed throughout development and into adulthood in neuronal and non-neuronal tissues [38]. Since there is no previous study for NP-1 ligand expression by immune cells, we looked for Sema-3A expression in different human DC and T cell subsets. For this purpose, purified mRNA from different cell types was reverse-transcribed and cDNA was analyzed by semi-quantitative PCR. Whereas no Sema-3A mRNA was detected in resting human PBMCs, T cell activation by PHA and IL-2 induced Sema-3A expression (Fig. 1A and 1C). In another set of experiments CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets purified by negative selection were examined for Sema-3A expression before and after stimulation by anti-CD3/CD28 antibodies. Sema-3A mRNA was detected in both activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells but not in resting cells (Fig. 1A and 1C). Activated CD4⁺ T cells expressed significantly higher amounts of Sema-3A than activated CD8⁺ T cells (Fig. 1A and 1C). Sema-3A expression was also examined in purified monocytes and in GM-CSF/IL-4-derived DC. Sema-3A mRNA was not detected in monocytes and at only low levels in immature DC (Fig. 1B and 1D). However, DC maturation induced by both TNF- α and IL-1 β or by CD40-L significantly increased mRNA for Sema-3A (Fig. 1B and 1D). Of note, no expression of Sema-3A mRNA was detected in CD40-L transfected fibroblasts alone (Fig. 1B). CD40-L was the strongest stimulus for Sema-3A expression in DC. Thus, Sema-3A expression by both DC and T cells correlated with cell activation status.

Delayed secretion of Sema-3A from activated cells

Since Sema-3A mRNA expression correlates with cell activation status, we decided to examine Sema-3A secretion during T cell activation. Sema-3A exists as a repulsive 95kDa protein that can be cleaved into a less active 65kDa form [23]. We next looked to the expression of these isoforms during immune response.

As a first step, we evaluated the production of these distinct Sema-3A isoforms in activated T cells. In culture medium from CD3/CD28 activated T cells, the 95kDa Sema-3A form was immunoprecipitated from 72h of cell activation reaching maximum levels at 96h. By contrast, the 65kDa Sema-3A form was constitutively, but poorly, detected at all the time points (Fig. 2A). In the second step, we looked for Sema-3A

expression on activated DC. As expected from mRNA expression data, immature DC produced low levels of Sema-3A (Fig. 2B). However, upon activation with inflammatory cytokines, DC produced Sema-3A preferentially in its 95kDa isoform (Fig. 2B). By contrast, maturation of DC upon CD40-L stimulation after 48 h resulted only in the secretion of the 65kDa Sema-3A isoform (Fig. 2B). No Sema-3A was detected in supernatants of CD40-L transfected fibroblasts. Thus, the 95kDa chemorepulsive form of Sema-3A is secreted by both activated T cells and DC activated by inflammatory cytokines, but not by DC that are activated by CD40-L.

We next investigated which isoform was produced in a situation where T cells are activated by DC, i.e., during a Mixed Leukocyte Reaction (MLR). Supernatants corresponding to different time points of MLR were collected from which Sema-3A was captured by immunoprecipitation and detected by immunoblotting with anti-Sema-3A antibodies. As shown in Fig. 2C, secretion of the 95kDa isoform of Sema-3A was delayed in MLR reaching its maximal level after 96 hours of coculture. By comparison with a Sema-3A-Fc (95kDa form) standard curve, we also quantified the amount of Sema-3A secreted in these supernatants. From 96h of MLR Sema-3A secretion reached a plateau (at around 60 ng.ml⁻¹) remaining stable up to 144h, the longer time point studied (Fig. 2C middle and lower panels).

Sema-3A regulates DC-induced T cell proliferation

We next investigated the potential role of Sema-3A secretion during the immune response. For this purpose, HLA mismatched activated DC (generated in the presence of the inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β) were mixed with purified T cells in the absence or in the presence of recombinant homodimeric Sema-3A active form (95kDa). As we found previously that secretion of Sema-3A in MLR supernatants was around 60 ng.ml⁻¹ we decided to use this range of recombinant protein concentration in further experiments. Addition of Sema-3A significantly decreased allogeneic T-cell proliferation (54% inhibition) (Fig. 3A). The effect of homodimeric Sema-3A-Fc was dose-dependent reaching a maximal effect between 20 to 40 ng.ml⁻¹ (Fig 3B). By contrast, Sema-6A-Fc (Fig. 3C) had no effect on T-cell proliferation. In time-course experiments, the immunosuppressive action of Sema-3A-Fc was detected from 2 to 3 days of coculture (Fig. 3D)

We have previously shown that NP-1 is expressed on T cells [33]. However, the binding of Sema-3A to its receptor on T cells has not been demonstrated. We used therefore a recombinant construct of Sema-3A with a Fc tag (Sema-3A-Fc) to examine its binding to T cells. Monoclonal antibodies (mAb-Sema-3A) and antagonist peptide (pSema-3A) were used to inhibit Sema-3A/NP-1 interaction. Indeed, mAb-Sema-3A competes with NP-1 through its binding to the NP-1 binding site on Sema-3A and the antagonist peptide competes with Sema-3A through its binding to NP-1 [39]. As assessed by FACS analysis, Sema-3A binding to T cells was inhibited both by mAb-Sema-3A blocking antibody and by pSema-3A (Fig. 3E) reinforcing that NP-1 is the receptor for Sema-3A expressed by T cells.

We further examined the activity of Sema-3A endogenously secreted in DC/T cell cocultures. pSema-3A, mAb-Sema-3A or recombinant NP-1 (NP-1-Fc) were used to neutralize endogenous Sema-3A secreted during MLR. These reagents increased allogeneic T cell proliferation in a dose-dependent manner reaching 96% to 134%, at the respective maximal dose tested (Fig. 4A, 4B and 4C). The effect of these reagents was significant from 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for mAb-Sema-3A, 0.01 μM for pSema-3A or 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for NP-1-Fc (Fig. 4A, 4B and 4C). As shown in Figure 4D, this immunosuppression was observed from the first day of MLR using NP-1-Fc. Similar kinetics were obtained with pSema-3A and mAb-Sema-3A (data not shown).

We previously observed that NP-1 blocking antibodies inhibit the formation of the DC-T cell clusters [33]. To test whether Sema-3A inhibition of T cell proliferation is dependent on DC-T cell cluster formation, we quantified by flow cytometry cluster formation in the presence or in the absence of an excess of Sema-3A-Fc (100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$). As shown in Figure 4E, Sema-3A had no effect on cluster formation. Moreover, Sema-3A had no significant effect on the expression of MHC class I and II and co-stimulatory molecules expressed by DC (data not shown). Thus, the inhibition of DC-induced T cell proliferation occurred downstream of DC-T cell interactions.

To examine whether Sema-3A binding to T cells was sufficient for inhibition, we next analyzed the proliferation of T cells induced by anti-CD3/anti-CD28 or PHA/IL-2. Both stimuli promote T cell proliferation but only CD3/CD28 stimulation induces TCR polarization and actin skeleton rearrangement [40]. PHA/IL-2-activated T cell proliferation was not affected by the addition of Sema-3A-Fc or Sema-6A-Fc (Fig.

5A left and right panel, respectively). However, as previously observed during MLR, Sema-3A but not Sema-6A blocked CD3/CD28-activated T cell proliferation (Fig. 5B left and right panel, respectively). Conversely, mAb-Sema-3A increased T cell proliferation induced by anti-CD3/anti-CD28 (Fig. 5C). Taken together, these data demonstrate that Sema-3A secreted during MLR affects a particular signaling pathway critical during CD3/CD28 or DC induced T cell proliferation (i.e., that dependent on TCR).

Sema-3A affects actin skeleton polymerization and early events of T cell activation

The above-mentioned observation suggested that Sema-3A might target cytoskeleton components. The actomyosin cytoskeleton is crucial for T lymphocyte activation. For example, the TCR-CD3 complex is associated with the cytoskeleton via the ζ -chain [41]. In addition, the actin, talin and myosin network was proposed to be a scaffold for the spatial and temporal distribution of signaling components [42, 43].

In order to better characterize the effect of Sema-3A on T cell activation we analyzed the reorganization of actin cytoskeleton at the DC-T cell contact in the presence or in the absence of exogenous Sema-3A. After incubation with Sema-3A-Fc, DC/T cell clusters in MLR were fixed and stained with various antibodies. As we previously reported [33], NP-1 was recruited to DC/T cell contacts in controls. Interestingly, exogenous Sema-3A prevented this recruitment (Fig. 6A). Next, labeling with anti-CD3 ϵ or phalloidin, to reveal TCR and F-actin, respectively were performed. As expected, TCR aggregates (stained in red) co-localized with the actin cytoskeleton (stained in green) at the site of DC-T cells contact in control cells (Fig. 6B, upper panels). However, in the presence of exogenous Sema-3A there was no actin filament cytoskeleton at the DC-T cell contact zone (Fig. 6B, lower panels). Quantification of these results showed that Sema-3A inhibited dramatically the redistribution of TCR at the DC-T cell contact (Fig. 6C, 62% inhibition, *** P<0.001). In agreement with this result, polarization of talin, a major component of the synapse, was significantly disrupted in the presence of Sema-3A-Fc (Fig. 6D). Therefore, NP-1/Sema-3A interaction inhibits cytoskeleton reorganization, thereby altering TCR polarization.

Peptide-MHC complexes on APCs are recognized by T cells via the TCR. This association leads to the stimulation of multiple intracellular signaling pathways that implies multiple tyrosine kinases and the phosphorylation of numerous effectors and

adaptor proteins. One of the first signaling event that occurs upon the interaction of the TCR with the peptide-MHC complex is the stimulation of two members of the Src family of tyrosine kinases, Lck and Fyn, resulting in the binding of ZAP-70, a member of the Syk family of tyrosine kinases, to dually phosphorylated ITAM motifs in the ζ -chain. This tyrosine kinase plays a pivotal role in TCR signaling, and is activated subsequently to its binding to phospho- ζ by phosphorylation of several tyrosine residues allowing recruitment of signaling effector molecules [44]. Another tyrosine kinase, the focal adhesion kinase (FAK), plays a critical role in synapse formation and cell-cell adhesion [45]. Given the importance of these kinases in synapse formation and in T cell activation through TCR engagement, we next assessed the consequences of cell incubation with Sema-3A on the tyrosine phosphorylation of these kinases. As shown in Figures 6E and 6F, addition of Sema-3A-Fc to DC/T cell cocultures inhibited the induced phosphorylation of ZAP-70 by about 70 % (***) ($P < 0.001$) (Fig. 6E and 6F). Likewise, tyrosine phosphorylation of FAK was dramatically impaired upon Sema-3A stimulation (Fig. 6F)

Thus, Sema-3A inhibits actin cytoskeleton rearrangements, TCR polarization and TCR-mediated T cell activation signals.

Discussion

Signaling pathways comprise multiple co-evolutionally selected biochemical reactions that control homeostasis. Accumulated evidences exist that signaling pathways may converge between the nervous and the immune system [36]. We have recently shown that NP-1, a member of the axonal glycoprotein family involved in axonal guidance, participates in cell contact formation between T cells and DC [33]. Here we report that the NP-1 ligand Sema-3A is produced during the immune response. Upon cell activation Sema-3A expression is induced in both DC and T cells but not in their resting counterparts. Maturation of DC with various stimuli such as bacterial wall components (LPS), pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) or CD40 engagement results in Sema-3A expression. Sema-3A gene expression and protein synthesis are observed also in T cells that are activated by anti-CD3 ϵ antibodies.

Subclass 3 semaphorins (Sema-3) are secreted proteins that, together with ephrins, constitute the major source of repulsive guidance signals for axons. We show here that activation of T cells by DC bearing alloantigens induces Sema-3A secretion in cell cocultures. Sema-3A secretion is delayed reaching significant levels at late time points of the immune response. At this time, the chemorepulsive 95kDa dimeric form of Sema-3A accumulates in DC/T cell cocultures, as well as in cultures of anti-CD3/anti-CD28 activated T cells. Since Sema-3A gene expression and synthesis was induced and the 95kDa chemorepulsive form was preferentially secreted upon DC/T cell activation, we hypothesized that it could play a role in the regulation of the immune response by modulating DC/T cell crosstalk.

Immune responses require antigen/major histocompatibility complex (MHC) engagement by the T-cell receptor complex in concert with a plethora of adhesion and costimulatory events. The outcome of T cell activation by DC is specifically regulated at the cell surface level by the induction of costimulatory molecules from the CD28 family of receptors (e.g., CD28, cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 [CTLA-4], inducible costimulator [ICOS], program death-1 [PD-1], and B- and T-lymphocyte attenuator [BTLA]) that participates in the DC-T cell contact and that plays a critical role in controlling the adaptive arm of the immune response [7]. Less is known about the soluble factors that control DC-dependent T cell activation. The role of Sema-3A secreted after DC/T cell cluster formation was therefore explored. In a first approach, exogenously added Sema-3A significantly inhibited T cell proliferation induced by

alloantigens. Sema-3A could directly target T cells since it blocked T cell activation by anti-CD3/anti-CD28 antibodies that mimic MHC and co-stimulation delivered signals. In a second approach, the relevance of Sema-3A secretion in DC/T cell cocultures was demonstrated by the enhanced T cell activation observed when endogenously produced Sema-3A is blocked with antibodies or antagonist peptides. Interestingly, DC activated by CD40/CD40-L pathway induces preferential and strong production of the signaling-incompetent 65kDa isoform of Sema-3A that can act as an antagonist for the 95kDa dimeric form. This may explain, at least in part, why CD40/CD40-L engagement on mature DC allows high avidity stable cell conjugates that fully promote T cell activation. Altogether these data demonstrate that the delayed secretion of Sema-3A 95kDa chemorepulsive form could play a pivotal role in a novel mechanism that regulates negatively antigen-dependent T-cell activation.

We have proposed that NP-1 dependent interactions could control the immune response since addition of NP-1 blocking antibodies in MLR blocks allogeneic T cell proliferation [33]. The present results extend these data by showing that there is a physiological relevance for NP-1 expression and for the secretion of Sema-3A in an immunological context. Sema-3A, like NP-1 blocking antibodies, inhibited T cell proliferation demonstrating that NP-1 dependent interactions have an important role in immune reaction. Our data also outline the complexity of NP-1 involvement in the regulation of the immune response. Indeed, whereas Sema-3A did not interfere in formation of DC/T cell conjugates, we previously reported that NP-1 participates in heterotypic interactions between DC and T cells since it is found polarized in DC/T cell contact zone and since addition of NP-1 blocking antibodies inhibits cluster formation [33]. Therefore, NP-1 could play different roles at different steps: whereas it is involved in the establishment of DC/T cell contacts through interaction with a putative and so far unidentified ligand thus favoring initiation of the immune response, it is also implicated in the restraint of the response through interaction with late secreted Sema-3A.

Actin skeleton polarization is a central feature of the DC-T cell contact establishment. The formation of a cleft in the DC/T cell contact zone is required for the efficient delivery of the signal. In neurons, exposure to Sema-3A causes rapid growth cone collapse associated to the depolymerization of F-actin and the reduced plus end growth of the filaments [20, 46, 47]. Binding of Sema-3A to NP-1 also mediates localized rearrangement of the actin cytoskeleton resulting in the retraction of filopodia and lamellipodia [46]. These alterations in cytoskeletal dynamics are mediated by the

small G protein Rac1 [48], PAK kinase [49], LIM kinase and its substrate cofilin, which act to depolymerize actin. Here, Sema-3A blocked actin skeleton rearrangement and talin redistribution in DC/T cell contact zone leading to an impairment of TCR polarization. Cortical actin reorganization accompanies TCR clustering and the recruitment of signaling molecules. For example, a number of cell surface proteins involved in T cell functions are associated with cytoskeletal complexes, such as the ζ -chain of the TCR-CD3 complex [43, 50]. In addition, the cytoskeleton may act as a scaffold for the temporal and spatial distribution of T cell signaling components. Here, in agreement with these observations, the phosphorylation of the early signaling effector ZAP-70 and of the kinase FAK was impaired in Sema-3A treated cells. Therefore signaling and cytoskeleton rearrangement are both affected by Sema-3A leading to inhibition of cell activation.

In summary, we describe a novel role of Sema-3A in the regulation of the immune response, as a modulator of the DC-T cell cross-talk. As reported in the nervous system, Sema-3A affects cytoskeletal rearrangement impairing TCR polarization and favoring inhibition of T cell activation by activated, but not immature, DC. This is achieved by Sema-3A binding to NP-1 expressed on the surface of T cells, affecting TCR signaling and thus T cell responsiveness. Since Sema-3A secretion is delayed we propose that Sema-3A/NP-1 interaction participates in the termination of the immune response, thus preventing its overactivation. However, NP-1 has no signaling capacity in neurons and must be associated to a signaling competent co-receptor, notably PlexA1, to exert its function [17-19]. It remains to be determined whether or not NP-1 used the same signaling pathway in T cells.

Taken together these results shed light on the immune system homeostasis and could open new perspectives in the comprehension of autoimmune disorders.

Materials and Methods.

Antibodies and reagents

Polyclonal rabbit anti-Sema-3A (H300) was from Tebu (France). Monoclonal mouse anti-Sema-3A (mAb-Sema-3A) has been previously described [39]. Human recombinant Sema-3A-Fc, Sema-6A-Fc and NP-1-Fc, IL-2, anti-CD3 ϵ antibody (clone UCHT-1) and anti-CD28 were purchased from R&D systems (UK). Polyclonal rabbit anti-phospho-ZAP-70 was from Cell Signaling (France). PHA and anti-phospho-FAK were obtained from Sigma (France).

Cell isolation and culture

Monocytes and resting T cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells of healthy donors using monocyte and pan-T cell isolation kits according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Germany). DC were generated from monocytes as previously described [51] and activated with TNF- α plus IL-1 β (10 ng.ml⁻¹), or by irradiated fibroblasts (L-cell transfectants) expressing CD40-L, during 48h before use (ratio 1:10) [51]. Purified T cells were activated in the presence of coated anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (1 μ g.ml⁻¹) or PHA/IL-2.

Semaphorin-3A binding assay.

One hundred ng.ml⁻¹ Sema-3A-Fc (R&D, France) were pre-incubated or not with 40 μ g.ml⁻¹ mAb-Sema-3A and subsequently incubated with T cells (1x10⁶ cells /ml) for 30 minutes. After several washes cells were incubated with FITC-labeled goat anti-human Fc antibodies (Jackson ImmunoResearch, France) for 15 minutes. After another round of washes, the cells were analyzed by flow cytometry. In another set of experiments, T cells were pre-incubated with a peptide derived from Sema-3A that encompasses the binding site to NP-1 (0.1 μ M) for 30 minutes, and further incubated with Sema-3A-Fc. Sema-3A binding was then analyzed as described above.

Intracellular detection of ZAP-70 phosphorylation.

CFSE-stained T cells were cocultured with APC during 6 days in the presence or absence of Sema-3A-Fc (100 ng.ml⁻¹). At the end of experiment, cells were harvested and fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with 1% saponin. Cells were then

stained using polyclonal antibody against phospho-ZAP-70 and revealed by goat anti-rabbit IgG-Cy5 (Jackson ImmunoResearch, France). Phosphorylation of ZAP-70 in activated T cells was determined by measuring the median of fluorescence of ZAP-70 in CFSE-positive gated T cells in flow cytometry.

Immunoprecipitation and Immunoblot analysis

Culture supernatants from immature and activated DC, resting and activated T cells and MLR were harvested, centrifuged and stored at -80°C before use. Sema-3A immunoprecipitation was carried out using $5\ \mu\text{g}$ of rabbit polyclonal anti-Sema-3A antibody (H300) and detected by western blot using an anti-Sema-3A monoclonal antibody ($2\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) followed by an anti-mouse HRP-conjugated antibody (Amersham, France) and revealed with the ECL kit (Pierce, France) and exposure to X-OMAT Kodak films. Western blot was performed as previously described [52] and PVDF membranes were stained using polyclonal anti-phospho-ZAP70 (Cell Signaling, France), anti-phospho-FAK (Sigma, France) or anti-actin (Tebu, France) and followed by an appropriate secondary HRP-conjugated antibody (Amersham, France). Sema-3A amount in the different immunoprecipitations was evaluated by immunoblotting using recombinant protein as a standard. Quantification of secreted protein was evaluated by Image-J software (NIH-Bethesda).

Semiquantitative RT-PCR analysis

Total RNA from 1×10^7 immature and activated immune cells was prepared as described [52]. $5\ \mu\text{g}$ of total RNA was reverse transcribed using a first-strand cDNA synthesis kit (Amersham Pharmacia, France) according to the manufacturer's instructions. PCR were performed using equivalent amounts of cDNA in each sample. The PCR conditions were the following: 1 min at 95°C , 1 min at 54.5°C for Sema-3A or 53.5°C for actin, and 1 min at 72°C for 25 cycles. Sense and anti-sense primers were, respectively: 5'-ACT CAC TGT TCA GAC TTA-3' and 5'-AGA GAC TTC ATG CAG CTC-3' for Sema-3A; 5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG-3' and 5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA-3' for actin. Twenty μl amplified PCR products were resolved in 1.5 % agarose gel. Semiquantitative determination was done using the Gel Doc 2000 System (Bio-Rad laboratories, Richmond, CA). Sema-3A PCR products were normalized with those of actin.

Mixed Leukocyte Reaction

Mixed leukocyte reactions (MLR) were performed as described [53] and were evaluated as previously described [51]. In these assays, 96-well tissue culture plates (Falcon, CA) were used for cocultures of DC and resting T cells (ratio 5:100). Cultures were incubated with the Sema-3A-Fc (10 to 120 ng.ml⁻¹) or Sema-6A-Fc (10 to 120 ng.ml⁻¹). Cells were also cocultured in the presence of Sema-3A antagonist peptide (pSema-3A; 363-380 NYQWVPYQGRVPYPRPGTC at 0.01 to 1 μ M) or with control peptide (B1.96) or monoclonal blocking antibody (0.5 to 40 μ g.ml⁻¹) with an appropriate isotype-matched control (40 μ g.ml⁻¹) or with NP-1-Fc (0.5 to 5 μ g.ml⁻¹). After 1 to 5 days, allogeneic T lymphocyte proliferation was measured by thymidine incorporation after 18-h pulses with 1 μ Ci/well (0.037 MBq/well) [³H]-thymidine (Amersham, France). Cells were then harvested with a 96-well Harvester (Pharmacia, France), collected on filters (Pharmacia) and the incorporation of [³H]-thymidine was measured with a β -plate microscintillation counter (Pharmacia).

Cluster formation

Cluster formation was evaluated as previously described [33]. Briefly, T cells were labeled with hydroethidine (40 μ g.ml⁻¹) (Molecular Probes, Eugene, USA) for 1h at 37°C before mixing with DC (at a ratio 100:4). Clustering was determined by measuring the percentage of fluorescent T cells-bound DC (labeled using anti-CD1a antibody) using flow cytometry.

Confocal microscopy.

DC were mixed with T cells (at a ratio of 5:100) in the presence or absence of human Sema-3A-Fc (100 ng.ml⁻¹) during 30 minutes and plated on poly-L-lysine (Sigma, MO)-coated slides. Clusters were then fixed in 4% paraformaldehyde, quenched with 0.1M glycine, and permeabilized with 1% saponin. After incubation with the monoclonal antibody anti-CD3 ϵ (Clone UCHT-1, R&D systems, France) revealed by a goat anti-mouse IgG-Cy3 (Jackson ImmunoResearch, France), or with phalloidine-alexa-488 (Molecular Probes, USA), cells in mounted slides were examined with a confocal laser microscope system (LSM 510 Carl Zeiss, Germany).

Statistic analysis.

The results were analyzed by independent sample two-tailed and unpaired Student's t-test, and were presented as means \pm standard deviation.

Acknowledgements

We are grateful to Drs. Claire Hivroz, Elke Schneider, Sebastian Amigorena, and Marwan El-Sabban for discussion and critical reading of the manuscript. We wish to thank Dr J.A. Ribeil (Department of Biotherapy, Hospital Necker-Enfants Malades) for providing us with blood samples. Y.L. is the recipient of a grant from La Ligue Nationale contre le Cancer and I.C.M. of a grant from ARC and from Paris-V René Descartes University. This work was supported by a grant from Fondation de France, La Ligue Nationale contre le Cancer, Association pour la Recherche contre le Cancer (n°3123), ARECA, Canceropole Ile de France and GIS maladies rares.

References

- 1 **Banchereau, J. and Steinman, R. M.**, Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998. **392**: 245-252.
- 2 **Hart, D. N.**, Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997. **90**: 3245-3287.
- 3 **Mempel, T. R., Henrickson, S. E. and Von Andrian, U. H.**, T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 2004. **427**: 154-159.
- 4 **Hugues, S., Fetler, L., Bonifaz, L., Helft, J., Amblard, F. and Amigorena, S.**, Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol* 2004. **5**: 1235-1242.
- 5 **Mellman, I. and Steinman, R. M.**, Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001. **106**: 255-258.
- 6 **Lanzavecchia, A. and Sallusto, F.**, Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 2001. **106**: 263-266.
- 7 **Greenwald, R. J., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H.**, The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005. **23**: 515-548.
- 8 **Perez, V. L., Van Parijs, L., Biuckians, A., Zheng, X. X., Strom, T. B. and Abbas, A. K.**, Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 1997. **6**: 411-417.
- 9 **Egen, J. G., Kuhns, M. S. and Allison, J. P.**, CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol* 2002. **3**: 611-618.
- 10 **Iida, T., Ohno, H., Nakaseko, C., Sakuma, M., Takeda-Ezaki, M., Arase, H., Kominami, E., Fujisawa, T. and Saito, T.**, Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4+ T cells. *J Immunol* 2000. **165**: 5062-5068.
- 11 **Grohmann, U. and Puccetti, P.**, CTLA-4, T helper lymphocytes and dendritic cells: an internal perspective of T-cell homeostasis. *Trends Mol Med* 2003. **9**: 133-135.
- 12 **Linsley, P. S. and Ledbetter, J. A.**, The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 1993. **11**: 191-212.
- 13 **Luo, Y., Raible, D. and Raper, J. A.**, Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 1993. **75**: 217-227.
- 14 **Kolodkin, A. L., Matthes, D. J. and Goodman, C. S.**, The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 1993. **75**: 1389-1399.
- 15 **He, Z. and Tessier-Lavigne, M.**, Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 1997. **90**: 739-751.
- 16 **Kolodkin, A. L., Levengood, D. V., Rowe, E. G., Tai, Y. T., Giger, R. J. and Ginty, D. D.**, Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 1997. **90**: 753-762.
- 17 **Takahashi, T., Fournier, A., Nakamura, F., Wang, L. H., Murakami, Y., Kalb, R. G., Fujisawa, H. and Strittmatter, S. M.**, Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 1999. **99**: 59-69.
- 18 **Tamagnone, L., Artigiani, S., Chen, H., He, Z., Ming, G. I., Song, H., Chedotal, A., Winberg, M. L., Goodman, C. S., Poo, M., Tessier-Lavigne, M. and Comoglio, P. M.**, Plexins are a large family of receptors for

- transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 1999. **99**: 71-80.
- 19 **Cheng, H. J., Bagri, A., Yaron, A., Stein, E., Pleasure, S. J. and Tessier-Lavigne, M.**, Plexin-A3 mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal projections. *Neuron* 2001. **32**: 249-263.
- 20 **Fan, J., Mansfield, S. G., Redmond, T., Gordon-Weeks, P. R. and Raper, J. A.**, The organization of F-actin and microtubules in growth cones exposed to a brain-derived collapsing factor. *J Cell Biol* 1993. **121**: 867-878.
- 21 **Kitsukawa, T., Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, M., Bekku, Y., Yagi, T. and Fujisawa, H.**, Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 1997. **19**: 995-1005.
- 22 **Klostermann, A., Lohrum, M., Adams, R. H. and Puschel, A. W.**, The chemorepulsive activity of the axonal guidance signal semaphorin D requires dimerization. *J Biol Chem* 1998. **273**: 7326-7331.
- 23 **Adams, R. H., Lohrum, M., Klostermann, A., Betz, H. and Puschel, A. W.**, The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *Embo J* 1997. **16**: 6077-6086.
- 24 **Adams, R. H., Betz, H. and Puschel, A. W.**, A novel class of murine semaphorins with homology to thrombospondin is differentially expressed during early embryogenesis. *Mech Dev* 1996. **57**: 33-45.
- 25 **Luo, Y., Shepherd, I., Li, J., Renzi, M. J., Chang, S. and Raper, J. A.**, A family of molecules related to collapsin in the embryonic chick nervous system. *Neuron* 1995. **14**: 1131-1140.
- 26 **Messersmith, E. K., Leonardo, E. D., Shatz, C. J., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. and Kolodkin, A. L.**, Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron* 1995. **14**: 949-959.
- 27 **Puschel, A. W., Adams, R. H. and Betz, H.**, Murine semaphorin D/collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains inhibitory for axonal extension. *Neuron* 1995. **14**: 941-948.
- 28 **Inagaki, S., Furuyama, T. and Iwahashi, Y.**, Identification of a member of mouse semaphorin family. *FEBS Lett* 1995. **370**: 269-272.
- 29 **Puschel, A. W., Adams, R. H. and Betz, H.**, The sensory innervation of the mouse spinal cord may be patterned by differential expression of and differential responsiveness to semaphorins. *Mol Cell Neurosci* 1996. **7**: 419-431.
- 30 **Giger, R. J., Wolfer, D. P., De Wit, G. M. and Verhaagen, J.**, Anatomy of rat semaphorin III/collapsin-1 mRNA expression and relationship to developing nerve tracts during neuroembryogenesis. *J Comp Neurol* 1996. **375**: 378-392.
- 31 **Shepherd, I., Luo, Y., Raper, J. A. and Chang, S.**, The distribution of collapsin-1 mRNA in the developing chick nervous system. *Dev Biol* 1996. **173**: 185-199.
- 32 **Wright, D. E., White, F. A., Gerfen, R. W., Silos-Santiago, I. and Snider, W. D.**, The guidance molecule semaphorin III is expressed in regions of spinal cord and periphery avoided by growing sensory axons 1995. **361**: 321-333.
- 33 **Tordjman, R., Lepelletier, Y., Lemarchandel, V., Cambot, M., Gaulard, P., Hermine, O. and Romeo, P. H.**, A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol* 2002. **3**: 477-482.

- 34 **Bruder, D., Probst-Kepper, M., Westendorf, A. M., Geffers, R., Beisert, S., Loser, K., von Boehmer, H., Buer, J. and Hansen, W.,** Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2004. **34**: 623-630.
- 35 **Wong, A. W., Brickey, W. J., Taxman, D. J., van Deventer, H. W., Reed, W., Gao, J. X., Zheng, P., Liu, Y., Li, P., Blum, J. S., McKinnon, K. P. and Ting, J. P.,** CIITA-regulated plexin-A1 affects T-cell-dendritic cell interactions. *Nat Immunol* 2003. **4**: 891-898.
- 36 **Kikutani, H. and Kumanogoh, A.,** Semaphorins in interactions between T cells and antigen-presenting cells. *Nat Rev Immunol* 2003. **3**: 159-167.
- 37 **Delaire, S., Billard, C., Tordjman, R., Chedotal, A., Elhabazi, A., Bensussan, A. and Bomsell, L.,** Biological activity of soluble CD100. II. Soluble CD100, similarly to H-SemaIII, inhibits immune cell migration. *J Immunol* 2001. **166**: 4348-4354.
- 38 **Masuda, T. and Shiga, T.,** Chemorepulsion and cell adhesion molecules in patterning initial trajectories of sensory axons. *Neurosci Res* 2005. **51**: 337-347.
- 39 **Shirvan, A., Kimron, M., Holdengreber, V., Ziv, I., Ben-Shaul, Y., Melamed, S., Melamed, E., Barzilai, A. and Solomon, A. S.,** Anti-semaphorin 3A antibodies rescue retinal ganglion cells from cell death following optic nerve axotomy. *J Biol Chem* 2002. **277**: 49799-49807.
- 40 **Dustin, M. L. and Cooper, J. A.,** The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol* 2000. **1**: 23-29.
- 41 **Rozdzial, M. M., Malissen, B. and Finkel, T. H.,** Tyrosine-phosphorylated T cell receptor zeta chain associates with the actin cytoskeleton upon activation of mature T lymphocytes. *Immunity* 1995. **3**: 623-633.
- 42 **Lowin-Kropf, B., Shapiro, V. S. and Weiss, A.,** Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J Cell Biol* 1998. **140**: 861-871.
- 43 **Caplan, S. and Baniyash, M.,** Searching for significance in TCR-cytoskeleton interactions. *Immunol Today* 2000. **21**: 223-228.
- 44 **Chan, A. C., Desai, D. M. and Weiss, A.,** The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu Rev Immunol* 1994. **12**: 555-592.
- 45 **Giannoni, E., Chiarugi, P., Cozzi, G., Magnelli, L., Taddei, M. L., Fiaschi, T., Buricchi, F., Raugei, G. and Ramponi, G.,** Lymphocyte function-associated antigen-1-mediated T cell adhesion is impaired by low molecular weight phosphotyrosine phosphatase-dependent inhibition of FAK activity. *J Biol Chem* 2003. **278**: 36763-36776.
- 46 **Fournier, A. E., Nakamura, F., Kawamoto, S., Goshima, Y., Kalb, R. G. and Strittmatter, S. M.,** Semaphorin3A enhances endocytosis at sites of receptor-F-actin colocalization during growth cone collapse. *J Cell Biol* 2000. **149**: 411-422.
- 47 **Fritsche, J., Reber, B. F., Schindelholz, B. and Bandtlow, C. E.,** Differential cytoskeletal changes during growth cone collapse in response to hSema III and thrombin. *Mol Cell Neurosci* 1999. **14**: 398-418.
- 48 **Jin, Z. and Strittmatter, S. M.,** Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *J Neurosci* 1997. **17**: 6256-6263.
- 49 **Aizawa, H., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y., Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y. and**

- Yahara, I.**, Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nat Neurosci* 2001. **4**: 367-373.
- 50 **Fuller, C. L., Braciale, V. L. and Samelson, L. E.**, All roads lead to actin: the intimate relationship between TCR signaling and the cytoskeleton. *Immunol Rev* 2003. **191**: 220-236.
- 51 **Geissmann, F., Revy, P., Regnault, A., Lepelletier, Y., Dy, M., Brousse, N., Amigorena, S., Hermine, O. and Durandy, A.**, TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol* 1999. **162**: 4567-4575.
- 52 **Chomczynski, P. and Sacchi, N.**, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987. **162**: 156-159.
- 53 **Moura, I. C., Lepelletier, Y., Arnulf, B., England, P., Baude, C., Beaumont, C., Bazarbachi, A., Benhamou, M., Monteiro, R. C. and Hermine, O.**, A neutralizing monoclonal antibody (mAb A24) directed against the transferrin receptor induces apoptosis of tumor T lymphocytes from ATL patients. *Blood* 2004. **103**: 1838-1845.

Legends of figures

Figure 1: Sema-3A is expressed by activated T cells and by DC activated by inflammatory cytokines- or CD40-L.

(A) Sema-3A mRNA is expressed by mitogen-activated PBMC and by activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Purified PBMC were activated by PHA/IL-2, and CD4⁺ and CD8⁺ T cells were activated by anti-CD3/anti-CD28 antibodies for 24 hours. Extracted RNA from resting cells (R) and from activated cells (A) were subjected to RT-PCR using Sema-3A and actin primers. Products were separated on a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. (B) Sema-3A is expressed by inflammatory cytokines- and CD40-L-activated-DC. Sema-3A RT-PCR for monocytes, immature and activated DC (with IL-1 β +TNF α or CD40L). (C and D) Histograms representing the ratio of intensity of Sema-3A/actin bands from A and B, respectively. One representative experiment out of three is shown.

Figure 2: Secretion of Sema-3A by activated T cells and DC

(A) Activated T cells mainly secrete the Sema-3A repulsive (95kDa) form. Cell supernatants from different time points of anti-CD3/anti-CD28 activated PBMC were collected and immunoprecipitated. Sema-3A repulsive isoform (95kDa) and proteolytic fragment (65kDa) were detected by immunoblotting using anti-Sema-3A antibodies. (B) Secretion of 95kDa and 65kDa Sema-3A isoforms by DC is dependent on DC maturation. DC were matured in the presence of LPS, TNF- α and IL1- β or CD40-L and Sema-3A was immunoprecipitated from culture supernatants. Sema-3A repulsive form (95kDa) and proteolytic fragment (65kDa) were detected by immunoblotting using anti-Sema-3A antibodies. Arrows indicate molecular weight. (C) Delayed secretion of Sema-3A during MLR. Supernatants from DC/T cell cocultures at different time points were immunoprecipitated and further immunoblotted with anti-Sema-3A antibodies (upper panel). Quantification of Sema-3A secretion in MLR supernatants (middle and lower panels). A standard curve of recombinant Sema-3A was established by immunoblotting (middle panel) and was used to quantify immunoprecipitated Sema-3A from different time points of MLR (lower panel). The different band intensities were compared using NIH image-J software. Data are means \pm SD of triplicates from one representative of at least three independent experiments.

Figure 3 : Sema-3A inhibits DC-induced T cell proliferation.

(A) Sema-3A-Fc repulsive form blocks DC-induced T cell proliferation. Inflammatory cytokine-activated DC were mixed with allogeneic T cells in the absence or in the presence of Sema-3A-Fc (50 ng.ml⁻¹). T cell proliferation was evaluated by [³H]-thymidine incorporation. Percentages of X axis indicate DC:T cell ratios. (B and C) Sema-3A-Fc effect on allogeneic T cell proliferation is dose-dependent. Cocultures at 4% DC/T cell ratio were incubated with increasing concentrations (10 to 120 ng.ml⁻¹) of Sema-3A-Fc (B) or Sema-6A-Fc (C) as a negative control. (D) Time course of the effect of Sema-3A-Fc on allogeneic T cell proliferation. DC/T cell cocultures were incubated in the presence or in the absence of Sema-3A-Fc, and T cell proliferation at different time points was evaluated by [³H]-thymidine incorporation. (E) Sema-3A binds to T cells. Sema-3A-Fc (pre-incubated or not in the presence of mAb-Sema-3A) was incubated with T cells and binding was evaluated by flow cytometry. T cells were also pre-incubated with Sema-3A/NP-1 binding antagonist peptide before analysis of Sema-3A-Fc binding. Data are means \pm SD of triplicates from one representative of at least three independent experiments. P values from Student's unpaired t test are indicated (not significant; NS, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001).

Figure 4: Blockage of NP-1/Sema-3A interaction enhances DC-induced T cell proliferation.

(A, B and C) Addition of pSema-3A, mAb-Sema-3A or NP-1-Fc during MLR increases T cell proliferation in a dose dependent manner. MLR at 4% DC:T cell ratio were incubated in the presence of (A) pSema-3A (0.01 to 1 μ M) or an irrelevant peptide (B1.96 at 1 μ M), (B) mAb-Sema-3A (0.5 to 40 μ g.ml⁻¹) or an isotype-matched control (40 μ g.ml⁻¹) or (C) NP-1-Fc (0.5 to 5 μ g.ml⁻¹). Allogeneic T cell proliferation was evaluated five days later by the incorporation of [³H]-thymidine. (D) Time course of the effect of NP-1-Fc on allogeneic T cell proliferation. DC/T cell cocultures were incubated in the presence or in the absence of NP-1-Fc, and T cell proliferation at different time points was evaluated by [³H]-thymidine incorporation. (E) Addition of Sema-3A-Fc in DC/T cell cocultures does not alter cluster formation. Curves represent MLR cluster formation for different lengths of time in the absence or in the presence of Sema-3A-Fc (100 ng.ml⁻¹). Data are means \pm SD of triplicate from one representative of

at least 4 independent experiments. P values from Student's unpaired t test are indicated (not significant; NS, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001).

Figure 5: Sema-3A can directly inhibit T cell activation dependent on TCR clustering.

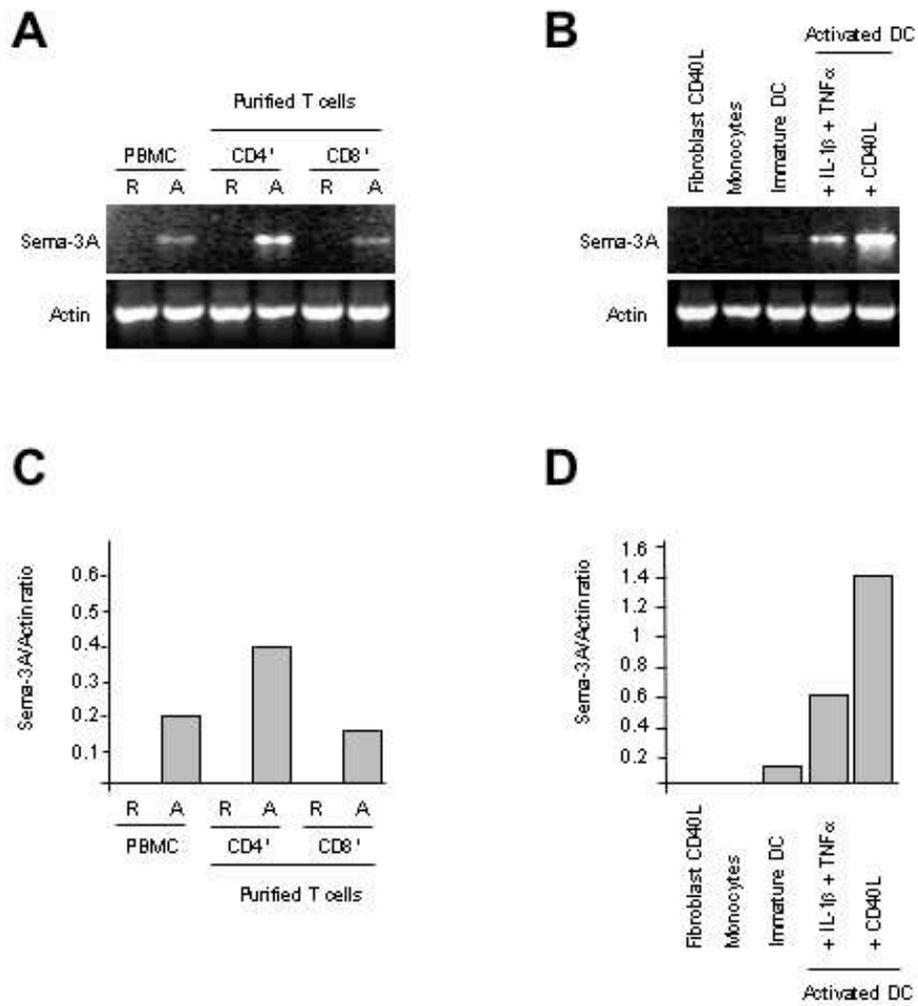
Sema-3A blocks TCR but not mitogen mediated T cell activation. T cells were activated by PHA/IL-2 (**A**) or by anti-CD3/anti-CD28 antibodies (**B**) in the absence or in the presence of Sema-3A-Fc or of Sema-6A-Fc as a negative control (100 ng.ml⁻¹). T cell proliferation was then measured by [³H]-thymidine incorporation. (**C**) mAb-Sema-3A enhances CD3/CD28-dependent T cell proliferation. PBMC were activated by anti-CD3/anti-CD28 in the presence of mAb-Sema-3A (10 to 40 µg.ml⁻¹) or control isotype (40 µg.ml⁻¹). T cell proliferation was then measured by [³H]-thymidine incorporation. Results are representative of triplicate values of one representative experiment out of four. Data are means ±SD of triplicates from one representative of at least three independent experiments. P values from Student's unpaired t test are indicated (not significant; NS, *** P<0.001).

Figure 6: Sema-3A blocks actin and TCR polarization in DC/T cell contact zone and ZAP-70 and FAK phosphorylation

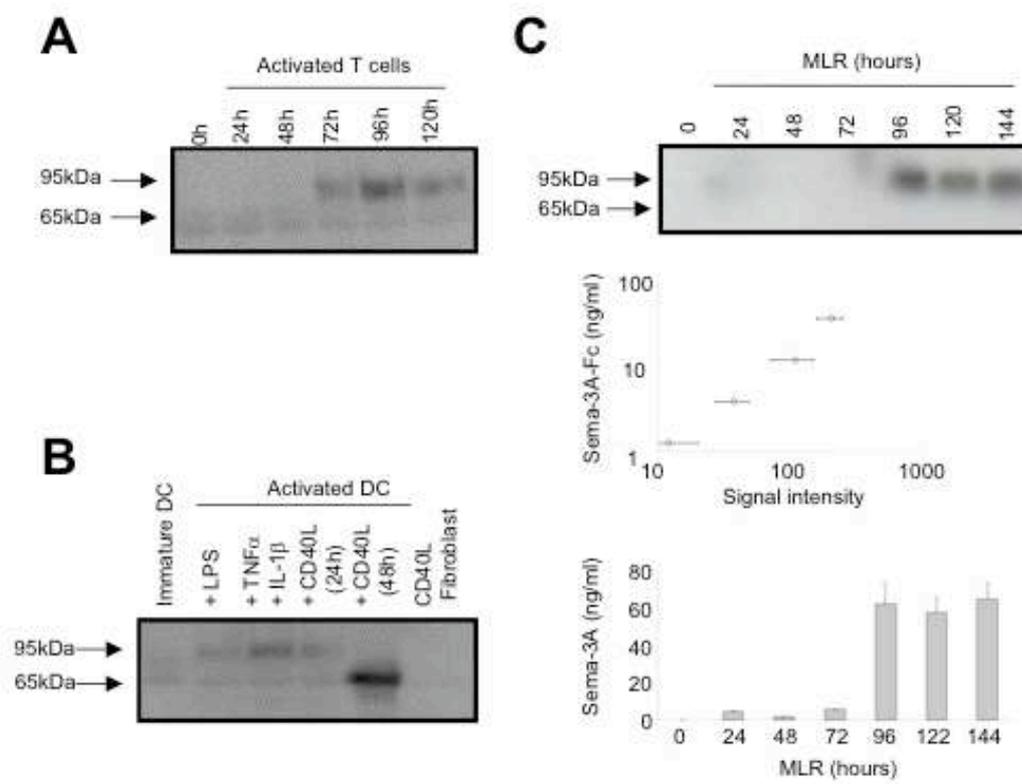
(**A**) Sema-3A abrogates NP-1 re-orientation towards DC/T cell contacts. DC/T cell clusters, formed in the presence or in the absence of Sema-3A-Fc were stained with anti-NP-1 antibody (blue). (**B**) In clusters, TCR aggregates (labeled with anti-CD3ε antibodies, red) co-localize with the actin cytoskeleton (labeled with phalloidin, green) at DC/T cell contact after 30 minutes coculture (upper-panel). In the presence of Sema-3A-Fc, actin polarization is abolished in T cells, impairing TCR capping (lower panel). (**C**) The histogram shows the quantification (mean +/- SD) of F-actin and TCR polarization of DC-T cell clusters in (**B**) from four independent experiments. The difference between the percentages of TCR, and F-actin polarized clusters with or without Sema-3A-Fc. (**D**) Sema-3A abrogates talin re-orientation towards DC/T cell contacts. DC/T cell clusters, formed in the presence or in the absence of Sema-3A-Fc were stained with anti-talin antibody (blue). Arrows indicate DC-T cell contact zone. (**E**) Impaired induction of ZAP-70 phosphorylation in Sema-3A treated cells. PBMCs were activated by anti-CD3ε/anti-CD28 antibodies in the absence or in the presence of

Sema-3A-Fc. ZAP-70 phosphorylation was then quantified by flow cytometry using anti-Phospho-ZAP-70 antibodies. Histogram shows the means \pm SD of ZAP-70 phosphorylation (fold increase relative to resting T cells) in 3 experiments. The difference between ZAP-70 phosphorylation in activated T cells with or without Sema-3A was statistically significant. **(F)** Analysis of ZAP-70 and FAK tyrosine phosphorylation. Purified T cells were stimulated with anti-CD3 ϵ for 30 minutes in the presence or in the absence of Sema-3A-Fc. Cells were lysed and the presence of tyrosine-phosphorylated ZAP-70 or FAK was examined by immunoblotting using anti-phospho-ZAP-70 and anti-phospho-FAK, respectively. Data are means \pm SD of triplicate from one representative of at least three independent experiments. P values from Student's unpaired t test are indicated (***) $P < 0.001$).

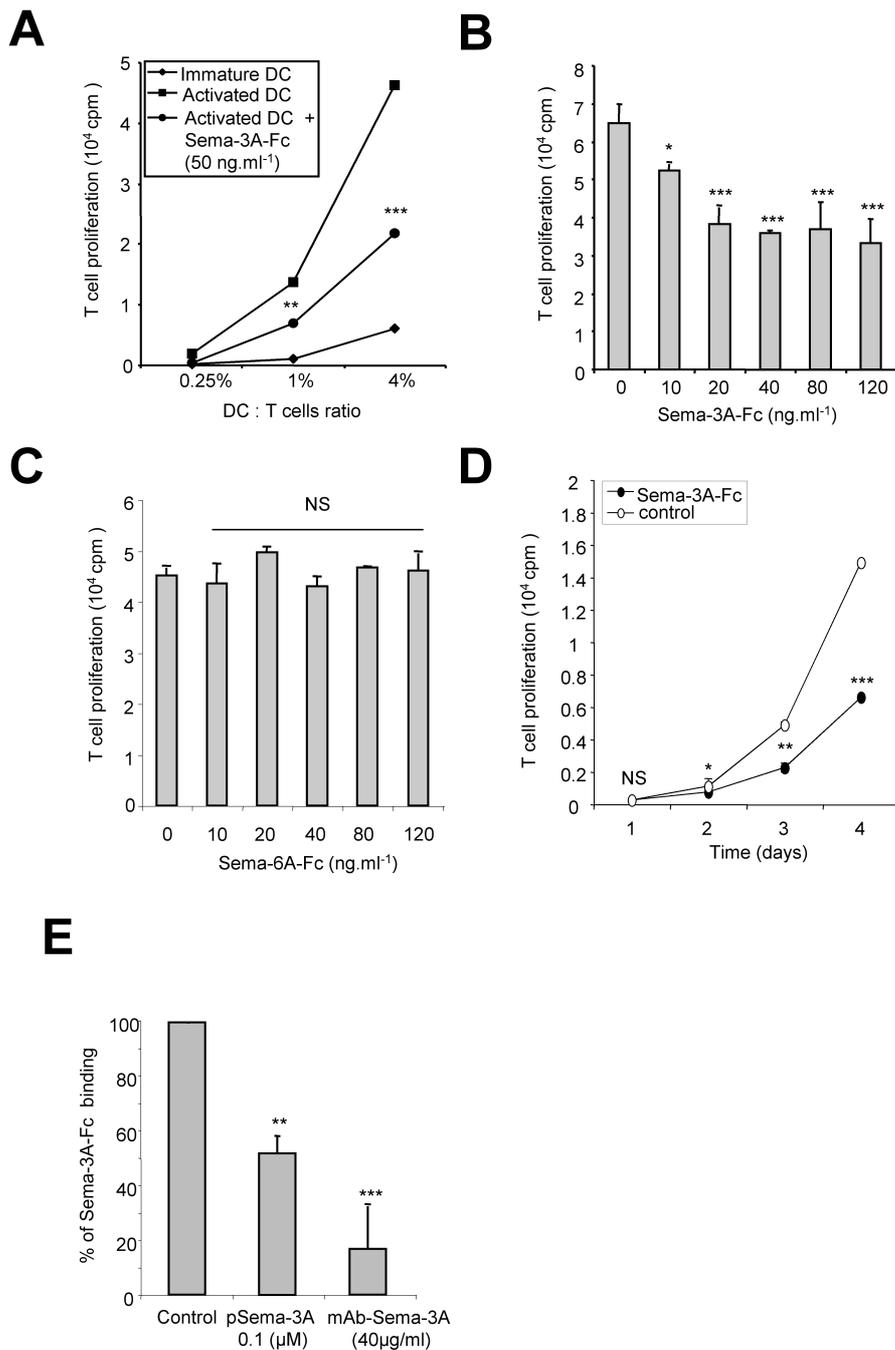
Lepelletier and al. Figure 1



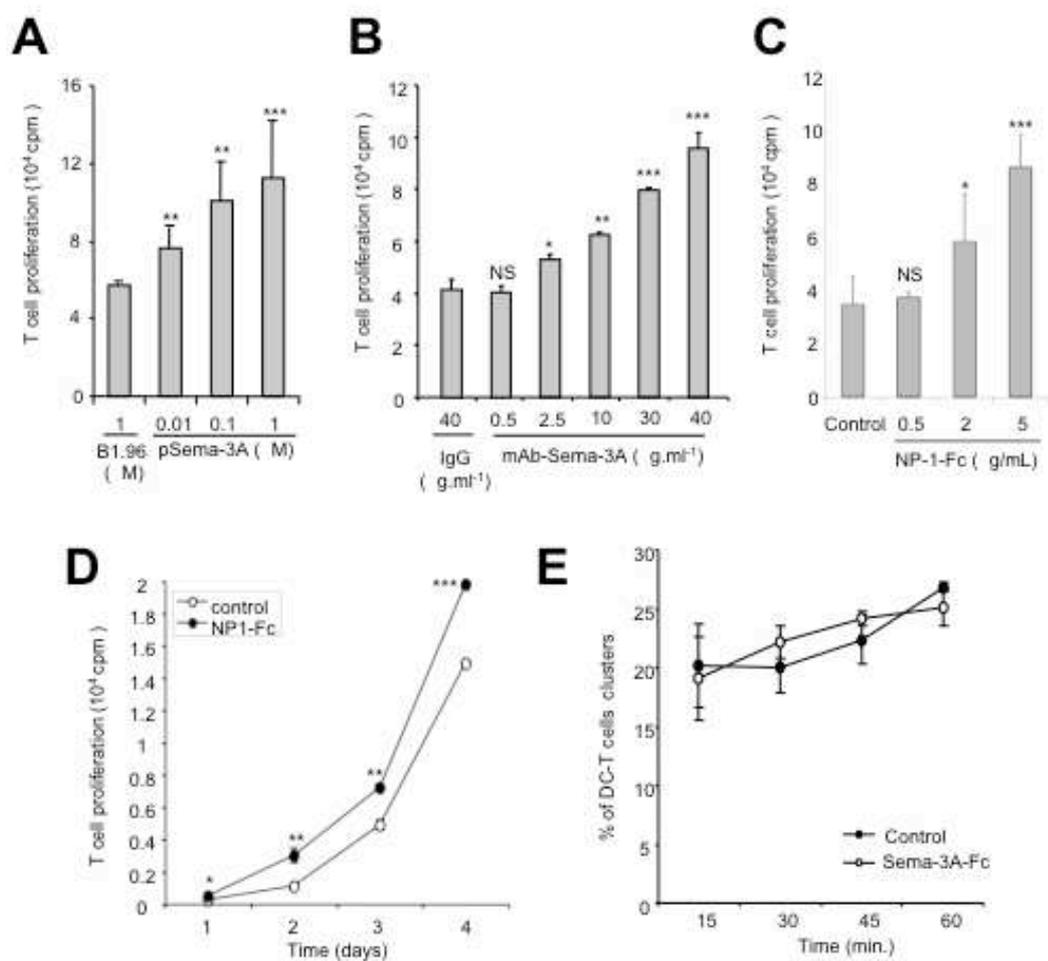
Lepelletier et al. Figure 2



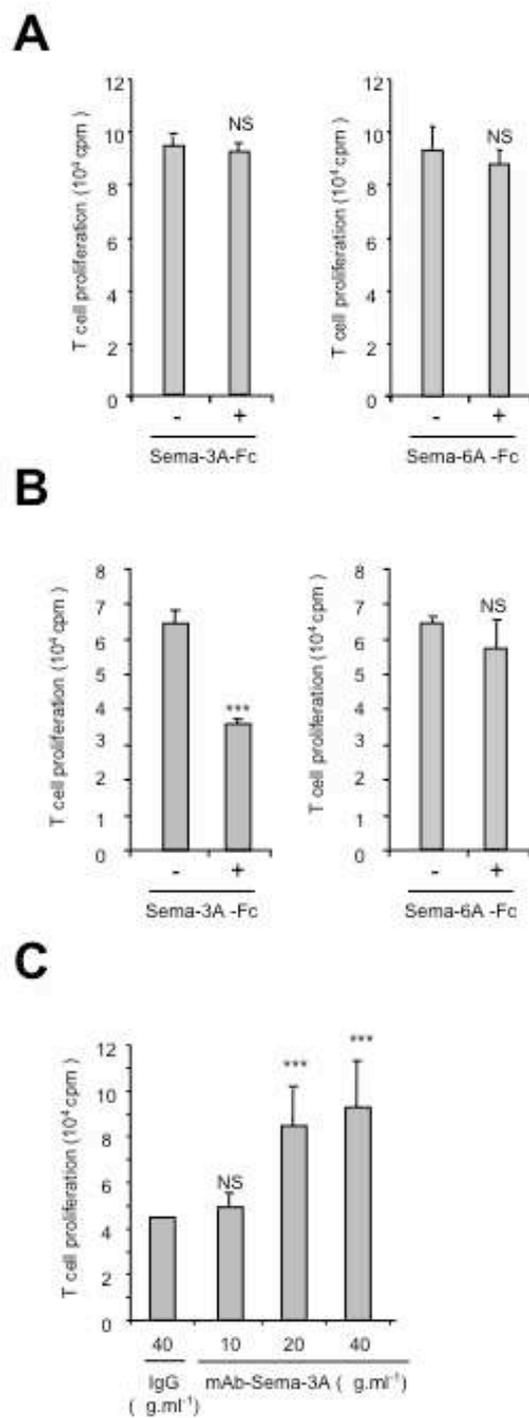
Lepelletier and al. Figure 3



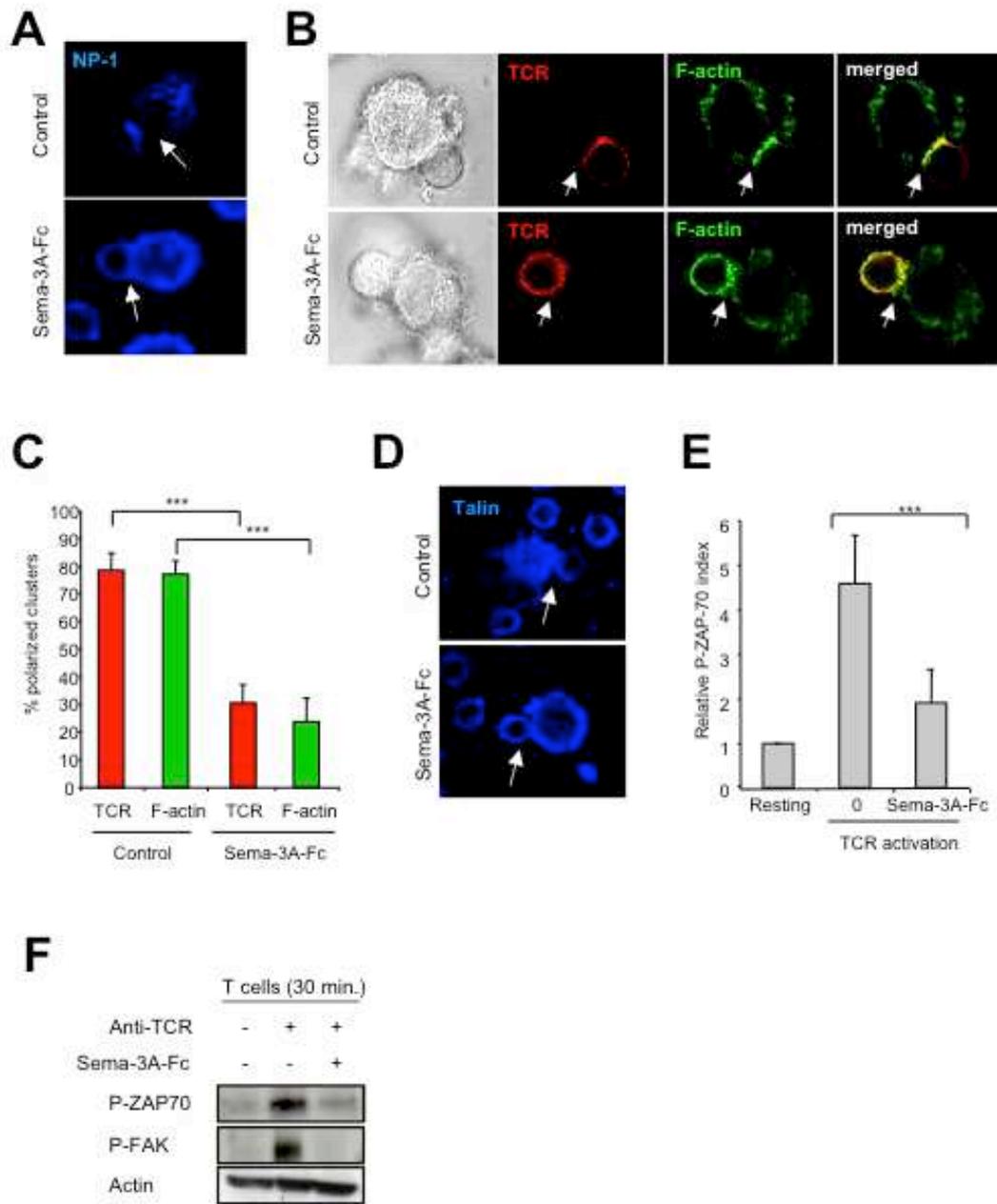
Lepelletier et al. Figure 4



Lepelletier et al. Figure 5



Lepelletier et al. Figure 6



ARTICLE N°3

**Control of human thymocyte migration by
Neuropilin-1/Semaphorin-3A mediated interactions.**

Yves Lepelletier, Salette Smaniotto, Réda Hadj-Slimane, Déa Maria Serra Villa-Verde, Ana Cristina Nogueira, Mireille Dardenne, Olivier Hermine and Wilson Savino. (Révision, PNAS).

La migration des thymocytes est un évènement crucial dans leur processus de différenciation. Les molécules impliquées dans ce phénomène aussi bien chez l'Homme que chez la souris, font partie de la famille des protéines de la matrice extracellulaire (ECM) et des chémokines. Cependant les molécules responsables de l'induction de la migration et du détachement des thymocytes des protéines de la matrice extracellulaire sont inconnues.

Une revue récente souligne l'importance de molécules du système nerveux central dans la réponse immune. La chémokine CXCL-12 est ainsi capable d'induire la migration des cellules de l'immunité que celle des neurones.

Nous avons donc supposé que ce concept pouvait être applicable au système immunitaire et étudié dans le thymus. Nous nous sommes tout naturellement orientés vers la neuropiline-1 (Np-1) du fait de sa présence sur les lymphocytes T matures. De plus, au regard des résultats obtenus sur la sécrétion de la sémaphorine-3A au cours de la réponse immunitaire, nous avons également suivi les effets de ce ligand naturel de la Np-1 sur la sélection thymique, et plus particulièrement sur l'adhésion des thymocytes aux cellules épithéliales thymiques. En effet, il a été montré que la sémaphorine-3A pouvait inhiber l'adhésion des cellules endothéliales.

Nous mettons ici en évidence la présence de la Np-1 et de la sémaphorine-3A dans le thymus et plus particulièrement au sein des cellules épithéliales thymiques, des cellules nurses, des cellules dendritiques thymiques et des différents sous-types de thymocytes. De plus, l'adhésion des thymocytes aux cellules épithéliales thymiques induit l'expression de la Np-1 sur les thymocytes adhérents. Cette augmentation est principalement due aux effets de l'interleukine-7 sécrétée par les cellules épithéliales thymiques mais également à l'engagement du TCR des thymocytes au cours de la

sélection. La semaphorine-3A quant à elle n'est augmentée qu'après stimulation par le TCR, ce qui met en évidence deux mécanismes distincts de l'augmentation de ces deux protéines. Les thymocytes exprimant ainsi la Np-1 sont les premiers à subir les effets de la sémaphorine-3A. En effet, l'ajout de sémaphorine-3A au cours de l'adhésion des thymocytes aux cellules épithéliales thymiques inhibe la capacité d'adhésion des thymocytes Np-1⁺. De plus cet effet s'accompagne d'un effet répulsif (appelé ici « fugetaxie ») provoquant préférentiellement la migration des thymocytes Np-1⁺ vers le microenvironnement dépourvu de sémaphorine-3A.

Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A mediated interactions.

Running Title: Neuropilin-1/Semaphorin-3A functions in thymus.

Yves Lepelletier^{*}, Salete Smaniotto^{†,‡}, Réda Hadj-Slimane[§], Déa Maria Serra Villa-Verde[†], Ana Cristina Nogueira[†], Mireille Dardenne^{*}, Olivier Hermine^{*} and Wilson Savino[†]

^{*}*CNRS UMR-8147; Université René Descartes Paris V, Hôpital Necker, Paris, France.*

[†]*Laboratory on Thymus Research, Department of Immunology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.*

[‡]*Department of Morphology, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil.*

[§]*TRAGEX Pharma, Tour Reflets, Paris, France.*

Corresponding author:

Wilson Savino

Laboratory on Thymus Research, Department of Immunology,
Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation,
Ave. Brasil 4365, Manguinhos - 21045-900 - Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Tel/Fax: 55 21 38658101 - e-mail: savino@fiocruz.br

Manuscript Information: 25 pages, 6 Figures, 1 Table.

Word and Character counts: 5195; 35941.

Abbreviations: **DC: Dendritic cells; ECM: Extracellular matrix; NP-1:**

Neuropilin-1;

Sema-3A: Semaphorin-3A; TCR: T cell receptor; TEC: Thymic Epithelial Cell; TNC: Thymic nurse cells

Key words: Neuropilin-1; Semaphorin-3A; Thymocyte adhesion and migration; Extracellular matrix; Integrins.

Abstract.

It is largely established that molecules first discovered in the nervous system are also found in the immune system. Neuropilin-1 (NP-1) was initially identified to mediate semaphorin-induced chemorepulsion during brain development and is also involved in peripheral T cells/DC interactions. Herein, we studied NP-1 during T cell development in the human thymus. NP-1 is expressed in both cortex and medulla of thymic lobules, being found in distinct CD4/CD8-defined thymocyte subsets. NP-1 is also found in thymic epithelial cells (TEC) *in situ* and *in vitro*, and is polarized at the TEC-thymocyte contact. Moreover, NP-1 was rapidly upregulated during thymocytes stimulation by TCR and IL-7 or after adhesion to TEC. Semaphorin-3A (Sema-3A), a natural ligand of NP-1 is also present in human thymus, both in TEC and thymocytes, being upregulated in thymocyte following TCR engagement. Functionally, Sema-3A decreases the adhesion capacity of NP-1⁺ thymocytes and induces their migration by a repulsive effect. In conclusion, we show here for the first time that NP-1/Sema-3A-mediated interactions participate in the control of human thymocyte development.

INTRODUCTION.

Migration of thymocytes is a crucial event in intrathymic T cell differentiation. At least two large families of molecules have been incriminated as playing a role in thymocyte migration: extracellular matrix (ECM) proteins and chemokines (1-3). Moreover, recent data point to a combined effect of ECM and chemokines upon thymocyte migration (3, 4). Nevertheless, one can expect that such migration is under a broader control, that comprises yet unknown molecular interactions.

It is established that molecules typically discovered in the nervous system are also found in the immune system and vice-versa (5). For example, the chemokine CXCL12 is able to drive neuron migration (6), whereas stem cell factor controls neuron migration through CD117/c-kit activation (7). Accordingly, we might expect that interactions involved in cell migration within the nervous tissues also exist in the immune system, more particularly in the thymus. The candidate approached herein is neuropilin-1 (NP-1), a 130 kDa transmembrane protein receptor, initially identified to mediate the chemorepulsive activity of semaphorins during embryonic brain development (8, 9). Semaphorins correspond to a large family of transmembrane and secreted glycoproteins that function in repulsive growth cone and axon guidance. NP-1 interacts directly with one member of the semaphorin family, semaphorin-3A (Sema-3A) (9), and induces cytoskeleton changes ultimately driving repulsion of axons (10). Additionally, it is expressed in endothelial cells, playing a role in angiogenesis (11). We have shown that NP-1 is expressed on dendritic cells (DC) and peripheral T cells (12). At this level, NP-1 seems to be involved in the immunological synapse formation and colocalized with the TCR (T cell receptor) on T cells, during DC-T cell contact (12). In angiogenesis, Sema-3A was shown to inhibit adhesion of endothelial cells, indicating a role in the migratory activity of this cell type (13). All these data prompted us to study the putative role of NP-1/Sema-3A interaction upon human thymocyte adhesion and migration.

We show here that NP-1 and Sema-3A are constitutively expressed in the human thymus in both thymic epithelial cells (TEC) and CD4/CD8-defined thymocytes. TEC-thymocyte adhesion enhances NP-1 expression on thymocytes. This effect may be partially attributed to IL-7 secreted by TEC and to TCR engagement, since both stimuli enhance NP-1 surface expression on thymocytes. Moreover, NP-1-mediated thymocyte adhesion is inhibited by

Sema-3A and this activity is mainly due to the decrease in the integrin-mediated adhesion capacity of thymocytes on ECM substrata. Lastly, Sema-3A induces a chemorepulsive activity on thymocytes and on thymic DC.

Materials and methods.

Antibodies and chemicals.

Monoclonal antibodies (mAb) used in flow cytometry were BDCA-4-PE or -APC (anti-NP-1) (Miltenyi Biotec, Germany), anti-VLA-3 to -6-FITC (Cymbus, UK), anti- $\alpha\beta$ 3-FITC (Chemicon, USA), anti-CD8-FITC, -PE or -APC, anti-CD4-FITC or -PE-Cy5, anti-CD11b-PE, anti-CD11c-PE, anti-CD13-PE-Cy5 and appropriate Ig isotype controls (Immunotech, France) and anti-CD123w-PE (Beckton Dickinson, CA, USA). Recombinant human Fc-Sema-3A, IL-7, as well as anti-TCR (UCH-T1) were purchased from R&D Systems (France). Anti-Sema-3A mAb was kindly provided by Dr. A. Shirvan (14) and was revealed using a goat anti-mouse-Ig-PE (Beckman Coulter, France). The Antibodies used in immunohistochemistry were anti-cytokeratin mAb KL-1 (Immunotech, France) and anti-NP-1 polyclonal antibody (12) revealed by FITC-labelled goat anti-mouse IgG and Cy5-labelled goat anti-rabbit IgG second antibody, respectively (Jackson ImmunoResearch, USA).

Thymus samples and TEC cultures.

Human thymic tissue was obtained from children undergoing cardiac surgery (n=19), aged from 1 day to 9 years. Experimental procedures with human thymic fragments have been approved by the Oswaldo Cruz Foundation and the Necker Hospital Ethical Committees for human research, and were done according to the European Union guidelines and the declaration of Helsinki.

Some fragments were snap frozen in liquid nitrogen and used for *in situ* immunohistochemistry. Other fragments were processed for isolation of thymic nurse cells (TNCs). In culture, TNCs spontaneously release thymocytes, so that after 3-5 days in culture, we come up with a TNC-derived epithelial monolayer (15). TNCs were isolated from human thymic fragments as currently done in our laboratory (16), and cytofluorometric detection of NP-1 was done on lymphoepithelial complexes or after obtention of highly purified TNC-derived

epithelial cultures. Since in TNC isolation non-epithelial contaminants may be present, the cytofluorometric analysis was done after double-staining with an anti-cytokeratin antibody (Dako, CA USA), so that we first gated cytokeratin-positive cells, and then ascertained NP-1 in this gate.

Two human TEC lines, were obtained by an explant technique and limiting dilution cloning, being kindly provided by Dr. M.L. Toribio (Universidad Autonoma de Madrid, Spain). One TEC line was derived from a foetal thymus whereas the other was obtained from an infant thymus (17).

Immunofluorescence and cytofluorometry.

Thymus frozen sections and TEC cultures were double labelled according to routine procedures. Specimens were subjected to anti-NP-1 antibody followed by rhodamine-labelled goat anti-rabbit IgG. Secondly, anti-cytokeratin mAb was revealed by FITC-labelled goat anti-mouse IgG. Analysis was done by confocal microscopy. TEC and thymocyte plated on poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, France) -coated slides were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA), quenched with 0.1 M glycine, and permeabilized with 1% saponin. Cells were incubated with the anti-Sema-3A, anti-NP-1 or anti-cytokeratin mAb. Primary antibody was revealed by a goat anti-mouse or rabbit IgG conjugated to Cy-5, respectively. Specimens were examined with a confocal laser microscope (LSM 510 Carl Zeiss, Germany).

For flow cytometry, cells were fixed in 4% PFA and incubated for 15 minutes at 4°C in phosphate-buffered saline (PBS), 2% BSA, containing 0.05% saponin, with anti-Sema-3A or control isotype-matched irrelevant antibodies. Specific labelling was revealed using a goat anti-mouse-Ig-PE. Membrane staining was performed using FITC- and APC-conjugated anti-CD4, anti-CD8 antibodies. Specimens were analyzed with a FACS-Calibur (Becton Dickinson, Germany). In some experiments four-color labelling was done, so that to detect NP-1 in dendritic cells (DC). In this case, we performed simultaneous labelling for NP-1, CD4, CD8 and a given DC marker, CD11c or CD13.

RNA isolation and semiquantitative RT-PCR.

Total RNA was extracted from 10⁷ total thymus, total stroma, TEC, unstimulated and IL-7 or TCR stimulated thymocytes, at different stages, and reverse

transcribed using the first-strand cDNA synthesis kit according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences, France). The PCR reaction was carried out with cDNA as template, 50 pmol of both primers in the reaction mixture (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% TritonX-100, 0.4 mM each dNTP (Promega, USA), 2.5 U AmpliTaq polymerase (Applied Biosystems, USA)). After denaturation at 94°C for 5 min., samples underwent 25 amplification cycles. Sense and antisense primers were, respectively: 5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG-3' and 5'-TGACGGGGTCAACCACACTGTGCCCATCTA-3' for β -Actin and 5'-ACTCACTGTTTCAGACTTA-3'; 5'-AGAGACTTCATGCAGCTC-3' for Sema-3A and 5'-CTGGTGAGCCCTGTGGTTTATTCC-3' and 5'-ACTATTGTCATCCACAGCAATCCC-3' for NP-1. PCR products were analyzed on 1.5% agarose gel. Semi-quantitative analysis was performed by the Gel Doc 2000 System (Bio-Rad, USA). Sema-3A or NP-1 cDNA was normalized to β -Actin cDNA concentration and Sema-3A/ β -Actin or NP-1/ β -Actin cDNA ratios were calculated.

Thymocyte stimulation.

Freshly isolated-thymocytes were cultured in presence of IL-7 (10 ng.mL⁻¹) during 6-12 hours. Then cells were harvested and cytofluorometry analysis of NP-1 expression or mRNA extractions were performed to follow both NP-1 and Sema-3A protein and mRNA regulation, respectively. To induce TCR engagement, thymocytes were plated in the presence of coated anti-TCR antibody (UCHT-1, 5 μ g.mL⁻¹) or uncoated wells during 3-24 hours at 37°C. Thymocytes were harvested at different times and stained with mAbs to follow NP-1 expression, or used to extract mRNA to detect NP-1 and Sema-3A mRNA by semi quantitative RT-PCR.

Cell adhesion.

Human TEC cultures were harvested and 4x10⁵ cells replated in 75 cm² flasks (Nunc, Denmark). After 24 hours, thymocytes were co-cultured (50 thymocytes per TEC) for 2 hours at 37°C. Adherent cells were counted and phenotyped by cytofluorometry. We tested the inhibitory effect of Sema-3A on thymocyte

adhesion by pre-incubating thymocytes with various concentrations of the protein (5 to 500 ng.mL⁻¹), or the medium alone, for 2 hours at 37°C. Non-adherent cells were gently washed out, and adhered thymocytes were counted and phenotyped.

Chemotaxis assay.

Thymocyte migratory activity was assessed *ex-vivo* in 5- μ m pore size transwell plates (Corning Costar, USA), as previously reported (18). Membrane inserts were coated with BSA, laminin or fibronectin for 1 hour at 37° C, followed by 1 hour of blocking with BSA 1%. Thymocytes (2.5x10⁶) with Sema-3A (25 to 100 ng.mL⁻¹) were plated in the upper chamber in 100 μ l of BSA 0.5%/RPMI, and 600 μ l of BSA 0.5%/RPMI were added to the lower chamber. After 3 hours, cells that migrated into lower chambers were removed, counted and phenotyped for the detection of NP-1, CD4 and CD8. In some experiments, Sema-3A was placed in the bottom well of the transwell chamber, so that to test a possible chemoattractant effect of the molecule.

In the horizontal migration assay (Biovalley, France), cells were plated in the first chamber side in presence of BSA or Sema-3A (100 ng.mL⁻¹). After 30-60 min., we counted those cells migrating towards the opposite chamber through a capillary ridge.

Purification of NP-1⁺ thymocytes.

Total thymocytes (10⁹ cells) were incubated during 30 min. at 4°C in presence of APC-coupled anti-NP-1 mAb, washed in 2% FCS/PBS solution, and incubated with anti-APC magnetic beads during 30 min at 4°C before being plated in a magnetic sorter (Miltenyi Biotec, Germany). NP-1⁻ thymocytes were directly eluted whereas NP-1⁺ cells were retained in the column. Then total, NP-1⁻ and NP-1⁺ thymocytes were used in culture to test the effect of Sema-3A (100 ng.mL⁻¹) upon thymocyte adhesion to TEC monolayers.

Statistic analysis.

The results were analyzed by independent sample two-tailed and unpaired Student's t-test, and were presented as means \pm standard error.

RESULTS.

Human thymic cells constitutively express NP-1.

We first defined the constitutive expression of NP-1 in the human thymus. *In situ* immunohistochemistry revealed that epithelial (cytokeratin-containing) cells express NP-1 (Fig. 1A). High membrane levels of NP-1 were also found in cultures of foetal and post-natal human TEC lines (Fig. 1B), freshly-isolated thymic nurse cells (TNCs) and primary cultures of TNC-derived epithelium (Fig. 1C). NP-1 gene expression by TEC was confirmed by RT-PCR (Fig. 1D). In contrast, only a minority of thymocytes express NP-1 constitutively, although NP-1⁺ cells were detected in all CD4/CD8-defined subsets (Fig. 1E). Percentage of NP-1⁺ cells within each subset varied among the thymuses evaluated (n=19), without any correlation with age or sex of the infant (Table 1). NP-1⁺ thymocytes ranged from 1.32 to 12.68% with an average of 5.11%. Finally, CD13⁺/CD11c⁺ afferent myeloid thymic DCs (19, 20) also express NP-1, bearing a higher membrane density than thymocytes (data not shown).

IL-7 and TCR engagement upregulate NP-1.

TEC constitutively secrete interleukin-7, which is crucial for progression of very immature thymocytes (21). When we pre-incubated thymocytes with IL-7, we observed an upregulation of NP-1 expression in thymocytes, as ascertained by cytofluorometry and RT-PCR (Fig. 2A-B), as early as 6 hours of IL-7 exposure. Such an increase was seen, not only in immature thymocytes, and in mature CD4⁺ and CD8⁺ single-positive subsets (Fig. 2A).

In addition, NP-1 expression increased on thymocytes during TEC-thymocyte contact, suggesting that cell-cell interaction participates in NP-1 regulation (Fig. 3A). Moreover, IL-7 positively contributed to the increase in NP-1 expression (Fig. 3A). To better define the involvement of this contact upon NP-1 upregulation, we performed TCR stimulation to mimic cell-cell interaction, by subjecting thymocytes to the activator anti-TCR antibody (22). TCR-engagement enhanced NP-1 expression, as rapidly as 3 hours, as seen at the mRNA and protein levels (Fig. 3B-C). These results suggest an involvement of NP-1 in thymocyte-TEC adhesion. Accordingly, thymocytes that adhered to TEC cultures were higher NP-1 expressors (Fig. 3A), as seen by confocal microscopy (Fig. 3D) and flow cytometry evaluation of adherent *versus* non-

adherent thymocytes (Fig. 3A). Interestingly, confocal analysis of thymocyte-TEC co-cultures showed that NP-1 is concentrated at the thymocyte pole that is in close contact with TEC (Fig. 3E). Taken together, these findings indicate that NP-1 is involved in thymocyte-TEC interactions.

Human thymic cells express sema-3A.

To better understand the effect of NP-1 on thymocyte-TEC adhesion, it was necessary to determine whether its natural ligand, Sema-3A, is also expressed in the thymus. We found Sema-3A mRNA and protein expressed by human TEC *in situ*, both in cortex and medulla, as well as TEC cultures (Fig. 4A-C). Interestingly, we found 80-95% of total thymocytes bearing cytoplasmic Sema-3A, comprising immature and mature subsets (Fig. 4D).

We then evaluated if Sema-3A production by thymocytes could be also modulated by IL-7 or TCR engagement, as it was the case for NP-1. Semi-quantitative analysis of Sema-3A gene expression by thymocytes revealed only a minor upregulation of mRNA upon IL-7 stimulation (data not shown). By contrast, antibody-induced TCR engagement rapidly increased Sema-3A mRNA; a progressive effect that lasted for at least 24 hours (Fig. 4E).

Sema-3A regulates thymocyte-TEC contact.

In order to further determine whether NP-1 participates in thymocyte-TEC adhesion, we pre-incubated thymocytes with Sema-3A. This procedure resulted in 50% inhibition of thymocyte adhesion, in a dose-dependent manner (Fig. 5A). Nonetheless, the CD4/CD8-defined phenotype of the adhered thymocytes was similar in the presence or absence of Sema-3A. This finding suggests that at all stages of human thymocyte differentiation, adhesion to the thymic epithelium is under influence of NP-1/Sema-3A-mediated interactions.

Given the results showing that NP-1 is involved in TEC-thymocyte adhesion, and that such an adhesion is partially abrogated by Sema-3A, we determined the NP-1 phenotype of adherent and non-adherent CD4/CD8-defined thymocyte subsets. Sema-3A decreased adhesion of NP-1⁺ thymocytes and enriched the non-adherent fraction on NP-1⁺ thymocytes in a dose dependent manner (Fig. 5B). In addition, adhesion of enriched NP-1⁺ thymocytes was partially inhibited by Sema-3A when compared with total or NP-1⁻ thymocytes

(Fig. 5C). These results represent the first evidence of a negative effect of Sema-3A on the NP-1⁺ thymocyte adhesion on TEC, and the involvement of NP-1/Sema-3A complex on heterocellular interactions in the human thymus.

Chemorepulsive effect of sema-3A upon thymocytes.

Since adhesion and de-adhesion are crucial for cell migration, and considering that Sema-3A exhibited a de-adhesive role upon thymocyte-TEC adhesion, we searched whether this molecule could exert a chemorepulsive effect upon thymocyte migration. Pre-incubation of thymocytes with Sema-3A in the upper chamber of transwell plates did induce a dose-dependent enhancement of migration as compared to BSA alone (Fig. 6A). By contrast when Sema-3A was applied in the bottom well of the transwell chambers (so that to mimic a typical chemoattraction), no effect was seen upon thymocyte migration (Fig. 6B). A putative cooperation between chemoattraction of ECM (laminin or fibronectin) and chemorepulsion of Sema-3A was tested in similar conditions. As expected, laminin or fibronectin induced thymocyte attraction. However, when one of these stimuli was applied in combination with Sema-3A, resulting migration values were inferior to the sum of each stimulus alone (Fig. 6C). Lastly, we performed experiments on slides bearing a horizontal migration chamber. Sema-3A addition to thymocytes on a given side of the slide largely increased the migration towards the opposite side (Fig. 6D).

Sema-3A inhibits thymocyte migration through ECM substrata.

In accordance to the chemorepulsive and de-adhesion effects of Sema-3A on thymocytes, we investigated if Sema-3A could modulate ECM-driven cell migration. As previously defined in thymus, VLA-4, -5 and -6 are able to bind fibronectin and laminin respectively, and participate in thymocyte-TEC adhesion (3). We incubated thymocytes or TEC with Sema-3A and checked for VLA expression. As ascertained by cytofluorometry, variations of VLAs (VLA-3 to VLA-6) and $\alpha v\beta 3$ membrane expression were not observed, either on thymocytes or TEC (data not shown). Nevertheless, laminin-driven migration diminished in Sema-3A-treated thymocytes (Fig. 6E), suggesting that the de-adhesion effect of Sema-3A on thymocytes was partially due to the inhibition of VLA binding to laminin.

DISCUSSION.

During T cell development, bone marrow derived precursors migrate towards the thymus. Developing thymocytes travel within the cortex and medulla through mechanisms of chemoattraction (23) and chemorepulsion (24). Appropriate migration is achieved at each thymic compartment where cells undergo positive or negative selection. During this process, there is a requirement of several time-dependent adhesion events of thymocytes to TEC and DC. The cell-cell contact is clearly time-dependent but also varies as a function of the integrin receptor that binds ECM and contributes to the stability of thymocyte-APC contact (25).

Acquisition of specific membrane proteins in interacting cells represents a means by which thymocytes regulate the strength and time of contact with TEC and DC. In this process it is conceivable that interactions between receptors and their corresponding ligands may result in impairment and/or termination of adhesion, associated to a migratory effect, secondary to chemoattraction or chemorepulsion. In this respect, the molecules involved in the de-adhesion of thymocytes to TEC, as well as in the transmigration of thymocytes towards specific thymic niches are not well defined.

The similarities of interactions formed between interacting APCs and peripheral T cells and the contacts existing between pre-and post-synaptic neurons may provide some clues to the understanding of immune regulation within the thymus. We recently demonstrated that NP-1 is expressed by peripheral T cells and DCs, being involved in the interaction between these two cell types (12). Herein, we extend the concept to the T cell development within the human thymus. We found that NP-1 is expressed in both cortex and medulla of thymus, and particularly on all thymocyte CD4/CD8-defined subsets, as well as in TEC (including TNC) and DC. As we have reported during DC-T cell contact (12), NP-1 is localized and polarized at the site of thymocyte-TEC contact. In addition, upregulation of NP-1 during this contact prompted us to investigate the putative regulatory role of key intrathymic stimuli, IL-7 secretion and TCR engagement. Both increased NP-1 expression on thymocytes, suggesting an important role of NP-1 during thymocyte-TEC adhesion.

Semaphorins are proteins involved in neuronal axonal guidance, and are

structurally defined by a 500-aminoacid conserved Sema domain at their N-terminal ending. In axon guidance, the repulsive nature of semaphorin signaling is due to the modification of the growth cone cytoskeleton: the NP-1/Sema-3A signaling mediates the retraction of filopodia and lamellipodia and a localized rearrangement of the actin cytoskeleton (26). It can be hypothesized that this cytoskeleton modification and rearrangement modulates the adhesion capacity of thymocytes, in addition to the repulsive effect of Sema-3A on thymocyte migration. Even though Sema-3A is able to modify thymocyte adhesion and migration, the presence of the NP-1 co-receptor plexin-A is a functional key for this complex.

In particular, plexin-A1 is known to increase the sensitivity and activity of Sema-3A on the actin microfilaments. We have actually detected plexin-A1 on TEC and all thymocyte subsets, indicating a relevant function for the NP-1/Sema-3A complex (data not show). Interestingly, plexin-A1/Sema-3A signaling induces the association of plexin-A1 to MICAL (27, 28), a CAS-L adhesive molecule constitutively expressed in thymus (28). Even though NP-1/Sema-3A complex is functional, being able to influence thymocyte behavior, its remains to be determined the signaling pathway(s) involved in this process and mediated by plexin-A1.

In summary, we show that NP-1 and Sema-3A are constitutively expressed in the human thymus, in both microenvironmental and lymphoid compartments. In thymocytes, NP-1 is upregulated by IL-7 and TCR engagement, as well as following adhesion to TEC monolayers. Taken together, these data strongly indicate that NP-1 expression on thymocyte subsets is tightly regulated through interactions with the thymic epithelium. Also, we show that heterocellular interactions between thymocytes and TEC are partially dependent on NP-1/Sema-3A mediated interactions, and that Sema-3A exerts a de-adhesive action upon this contact. Moreover, Sema-3A/NP-1 ligation modulates thymocyte migration acting as a chemorepulsive stimulus.

Lastly, our data reinforces the notion that human thymocyte migration is a complex event, comprising multiple molecular interactions, leading to chemoattraction and chemorepulsion, and that are driven by a variety of secreted moieties, including at least ECM proteins, chemokines, and (as shown in this report) semaphorins. These results lead us to propose the following

hypothetical model. During maturation, thymocytes interact with various cell types (such as TEC) through an adhesion → de-adhesion mechanism that plays a crucial role in thymocyte differentiation. In this respect, our findings favour the implication of NP-1 and Sema-3A in the regulation of events contributing to thymocyte migration and adhesion. The first contact between TEC and thymocyte is dependent of NP-1 upregulation mediated by TEC-derived IL-7 and this event enhances focal adhesion of thymocytes. In a second vein, TCR engagement will induce expression of both NP-1 and Sema-3A. Increased NP-1 expression will increase sensitivity of thymocytes to Sema-3A. Secreted Sema-3A will in turn form a complex with NP-1, triggering signalling through the NP-1 co-receptor, plexin-A1. This multiple complex will then induce de-adhesion and chemorepulsion of thymocytes thus being involved in their normal guidance. These events highlight the importance of NP-1/Sema-3A complex in the regulation of migration and adhesion of human thymocytes.

Acknowledgments:

This work was developed in the Inserm/Fiocruz Associated Laboratory of Immunology. Y.L. is a recipient of grant from the Ligue National contre le Cancer. This work was supported by grants from Inserm/Fiocruz and Capes/Cofecub conjoint French-Brazilian programs, CNPq (Brazil), PICS CNRS (France), Ligue National contre le cancer (France). We thank the cardiac surgical pediatric offices, from Necker Hospital in Paris, and Laranjeiras Hospital in Rio de Janeiro.

References

1. Ansel, K.M., and Cyster J.G. (2001). *Curr Opin Immunol* **13**:172-179.
2. Annunziato, F., Romagnani P., Cosmi L., Lazzeri E., and Romagnani S. (2001). *Trends Immunol* **22**:277-281.
3. Savino, W., Mendes-da-Cruz D.A., Silva J.S., Dardenne M., and Cotta-de-Almeida V. (2002). *Trends Immunol* **23**:305-313.

4. Savino, W., Mendes-Da-Cruz D.A., Smaniotto S., Silva-Monteiro E., and Villa-Verde D.M. (2004). *J Leukoc Biol* **75**:951-961.
5. Steinman, L. (2004). *Nat Immunol* **5**:575-581.
6. Limatola, C., Di Bartolomeo S., Trettel F., Lauro C., Ciotti M.T., Mercanti D., Castellani L., and Eusebi F. (2003). *J Neuroimmunol* **134**:61-71.
7. Sun, L., Lee J., and Fine H.A. (2004). *J Clin Invest* **113**:1364-1374.
8. He, Z., and Tessier-Lavigne M. (1997). *Cell* **90**:739-751.
9. Kolodkin, A.L., Levengood D.V., Rowe E.G., Tai Y.T., Giger R.J., and Ginty D.D. (1997). *Cell* **90**:753-762.
10. Fan, J., Mansfield S.G., Redmond T., Gordon-Weeks P.R., and Raper J.A. (1993). *J Cell Biol* **121**:867-878.
11. Miao, H.Q., Soker S., Feiner L., Alonso J.L., Raper J.A., and Klagsbrun M. (1999). *J Cell Biol* **146**:233-242.
12. Tordjman, R., Lepelletier Y., Lemarchandel V., Cambot M., Gaulard P., Hermine O., and Romeo P.H. (2002). *Nat Immunol* **3**:477-482.
13. Serini, G., Valdembri D., Zanivan S., Morterra G., Burkhardt C., Caccavari F., Zammataro L., Primo L., Tamagnone L., Logan M., Tessier-Lavigne M., Taniguchi M., Puschel A.W., and Bussolino F. (2003). *Nature* **424**:391-397.
14. Shirvan, A., Ziv I., Fleminger G., Shina R., He Z., Brudo I., Melamed E., and Barzilai A. (1999). *J Neurochem* **73**:961-971.
15. Guyden, J.C., and Pezzano M. (2003). *Int Rev Cytol* **223**:1-37.

16. Ribeiro-Carvalho, M.M., Farias-de-Oliveira D.A., Villa-Verde D.M., and Savino W. (2002). *Neuroimmunomodulation* **10**:142-152.
17. Fernandez, E., Vicente A., Zapata A., Brera B., Lozano J.J., Martinez C., and Toribio M.L. (1994). *Blood* **83**:3245-3254.
18. Cotta-de-Almeida, V., Villa-Verde D.M., Lepault F., Pleau J.M., Dardenne M., and Savino W. (2004).. *Eur J Immunol* **34**:1578-1587.
19. Vandenabeele, S., H. Hochrein, N. Mavaddat, K. Winkel, and K. Shortman. (2001). *Blood* **97**:1733-1741.
20. Bendriss-Vermare, N., Barthelemy C., Durand I., Bruand C., Dezutter-Dambuyant C., Moulian N., Berrih-Aknin S., Caux C., Trinchieri G., and Briere F. (2001). *J Clin Invest* **107**:835-844.
21. Offner, F., and Plum J. (1998). *Leuk Lymphoma* **30**:87-99.
22. Schwinzer, R., Sommermeyer H., Schlitt H.J., Schmidt R.E., and Wonigeit K. (1991). *Cell Immunol* **136**:318-328.
23. Kim, C.H., Pelus L.M., White J.R., and Broxmeyer H.E. (1998). *Blood* **91**:4434-4443.
24. Cyster, J.G. (2002). *J Clin Invest* **109**:1011-1012.
25. Ayres-Martins S, Lannes-Vieira J, Farias-De-Oliveira DA, Brito JM, Villa-Verde DM, Savino W. (2004). *Cell Immunol.* **229**(1):21-30.
26. Fournier, A.E., Nakamura F., Kawamoto S., Goshima Y., Kalb R.G., and Strittmatter S.M. (2000). *J Cell Biol* **149**:411-422.
27. Terman, J.R., Mao T., Pasterkamp R.J., Yu H.H., and Kolodkin A.L. (2002). *Cell* **109**:887-900.

28. Suzuki, T., Nakamoto T., Ogawa S., Seo S., Matsumura T., Tachibana K., Morimoto C., and Hirai H. (2002). *J Biol Chem* **277**:14933-14941.

Figure legends.

Figure 1: NP-1 expression in the human thymus and thymic cell types.

(A) *In situ* expression of NP-1 on thymus in both cortex and medulla. Note that most of NP-1⁺ cells showed in this microscopic field correspond to thymic epithelial cells selectively revealed herein with an anti-cytokeratin antibody. Original magnification, x250. (B, C) Flow cytometry profiles showing that both foetal TEC lines and thymic nurse cells (TNCs) express NP-1. (D) Semi-quantitative PCR showing NP-1 expression on thymus, total stroma, TEC and thymocytes. Histograms represent the NP-1/Actin ratio and shows the pattern expression of NP-1 mRNA. (E) Thymocyte subsets, defined by CD4, CD8 staining into double negative (CD4⁻/CD8⁻), double positive (CD4⁺/CD8⁺), CD4 and CD8 single positive cells (CD4⁺/CD8⁻, CD4⁻/CD8⁺), show similar pattern of NP-1 expression. Percentages illustrate the relative number of NP-1⁺ thymocytes in each CD4/CD8-defined subset.

Figure 2: IL-7 upregulates NP-1 expression on thymocytes.

(A) Flow cytometry analysis of NP-1 expression on IL-7-treated (red histograms) or untreated thymocyte subsets (blue histograms). The green curve corresponds to the labelling generated by an irrelevant fluorochrome-matched IgG. Upregulation of NP-1 by IL-7 is seen in total thymocyte profile, as well as in each CD4/CD8-defined thymocyte subsets. (B) Semi-quantitative PCR showing NP-1 expression by IL-7-treated (during 6 and 12 hours) or untreated (T0) total thymocytes. Histograms represent the NP-1/Actin ratio and show the pattern of NP-1 mRNA expression. Data shown in each panel are representative of three independent experiments.

Figure 3: NP-1 is involved in TEC-thymocyte adhesion.

(A) TEC-Thymocyte adhesion increases NP-1 expression on adherent thymocytes (2 hours). IL-7 addition in this co-culture context further enhances NP-1 expression on adherent thymocytes (2 hours). Moreover, adherent

thymocytes, co-cultured for additional 4 hours continue to increase NP-1 expression. This effect is even more prominent when the second co-culture period is preceded by wash. **(B)** Semi-quantitative PCR showing increase in NP-1 gene expression in thymocytes following TCR engagement. Histograms represent the NP-1/Actin ratio. **(C)** Flow cytometry analysis of NP-1 expression on TCR stimulated (blue histograms) and untreated thymocyte subsets (red histograms) compared to irrelevant antibody (black histograms). **(D)** TEC-thymocyte co-culture was stained by the anti-NP-1 antibody and analysed by confocal microscopy. Original magnification, x250. **(E)** NP-1 polarisation at the TEC-thymocyte contact was observed using Z-stack analysis by confocal microscopy. Original magnification, x1000. Data shown in each panel are representative of at least three independent experiments. (***) $P < 0.001$.

Figure 4: Sema-3A expression in the human thymus and thymic cell types.

(A) *In situ* expression of Sema-3A in both cortex and medulla of the thymic lobules. In these double-labelled figures it is clear that Sema-3A staining comprises the thymic epithelial (cytokeratin-positive) network, but is also seen throughout the tissue, thus including thymocytes. Original magnification, x250. **(B)** The foetal TEC line also expresses Sema-3A as revealed by immunocytochemistry (left panel) and flow cytometry (right panel). Original magnification, x250. **(C)** Semi-quantitative PCR showing Sema-3A gene expression in the whole thymus, total stroma, TEC and total thymocytes. Histograms represent the Sema-3A/Actin ratio. **(D)** Total and CD4/CD8-defined thymocyte subsets that expressed the Sema-3A (red histograms) as compared to irrelevant antibody (black histograms). **(E)** Semi-quantitative PCR showing an increase in Sema-3A gene expression on thymocytes following TCR engagement. Histograms represent the Sema-3A/Actin ratio. Data shown in each panel are representative of at least three independent experiments.

Figure 5: Semaphorin-3A downregulates TEC-thymocyte adhesion.

(A) The recombinant Sema-3A repulsive isoform decreases thymocyte adhesion in a dose dependent manner (5 to 500 ng.mL⁻¹). Control values of untreated co-cultures were normalized as 100% of adhesion and the various Sema-3A values correspond to the means +/- SEM of six wells, recovered in

three independent experiments. **(B)** Sema-3A (50 to 100 ng.mL⁻¹) decreases the relative number of NP-1⁺-adhered thymocytes (white histograms) and increases NP-1⁺-non-adherent thymocytes (grey histograms). **(C)** Sema-3A (100 ng.mL⁻¹) mainly inhibits adhesion of NP-1⁺ thymocytes, as compared to the NP-1-depleted thymocyte fraction. Control values of untreated co-cultures in this panel were normalized to 100% of adhesion. (* P<0.05, *** P<0.001).

Figure 6: Chemorepulsive effect of Sema-3A on thymocyte migration.

(A) Thymocytes were incubated with BSA or Sema-3A (25, 50 or 100 ng.mL⁻¹) and plated in the upper chamber of transwell. Histograms represent the number of migrating thymocytes recovered in the lower chamber. **(B)** Sema-3A and laminin (LN) were plated in the lower chamber and insert, respectively, to test the chemoattractant property of these proteins upon thymocytes. Histograms represent the number of migrating thymocytes in the lower chamber. **(C)** In presence of BSA or Sema-3A (100 ng.mL⁻¹), thymocytes were plated in the upper chamber of transwell under chemoattraction driven by laminin (LN) or fibronectin (FN). Histograms represent the number of migrating thymocytes in the lower chamber. **(D)** Thymocytes, were incubated in presence of BSA or Sema-3A (100 ng.mL⁻¹) and plated in the first well of horizontal migration slide. Histograms show the number of migrating thymocytes towards the opposite side of two independent experiments. **(E)** Thymocytes were incubated with BSA or Sema-3A (50 or 200 ng.mL⁻¹) and plated in the upper chamber of transwell coated with laminin or fibronectin. Histograms represent the number of migrating thymocytes in the lower chamber. Histograms represent the mean \pm standard error of at least 4 wells, evaluated in at least two independent experiments. (not significant; NS, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001).

Table 1: Relative numbers of NP-1 cells in CD4/CD8-defined thymocyte subsets.

Thymus	Age	Total	CD4 ⁻ /CD8 ⁻	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁻	CD8 ⁺ /CD4 ⁻
1	1 day	8.01	4.63	9.07	2.68	9.21
2	6 days	3.76	15.26	3.95	19.79	24.01
3	9 days	1.61	13.83	8.40	6.92	9.27
4	10 days	2.31	11.41	1.46	11.42	8.42
5	17 days	12.68	13.25	13.26	12.24	7.51
6	3 months	3.55	3.14	3.60	3.67	2.56
7	3 months	1.32	23.21	1.56	17.05	7.93
8	4 months	6.80	1.70	7.71	3.80	2.24
9	4 months	2.61	16.19	3.17	5.25	14.52
10	4 months	2.95	4.08	2.63	4.32	4.57
11	8 months	8.80	4.87	9.86	5.55	11.09
12	2 years	12.22	16.81	14.40	7.46	9.09
13	3 years	4.17	22.35	3.91	12.57	5.48
14	3 years	6.86	2.80	7.27	1.53	14.88
15	3 years	2.63	9.92	1.63	21.30	5.85
16	5 years	4.09	0.87	4.47	0.62	4.27
17	6 years	1.57	14.72	1.91	14.82	19.26
18	8 years	6.69	14.90	7.47	4.01	6.26
19	9 years	4.38	6.14	4.68	3.81	1.85
	MEAN	5.11	10.53	5.81	8.36	8.86
	SEM	1.17	2.42	1.33	1.92	2.04

This table represents the percentage of total NP-1⁺ and NP-1⁺ CD4/CD8-defined thymocyte subsets obtained in fresh thymus samples from 19 young children (ages are comprised between 1 day to 9 years). Mean and standard error (SEM) of NP-1 expression on total and CD4/CD8-defined thymocyte subsets are indicated at the bottom of the table.

Figure 1 :

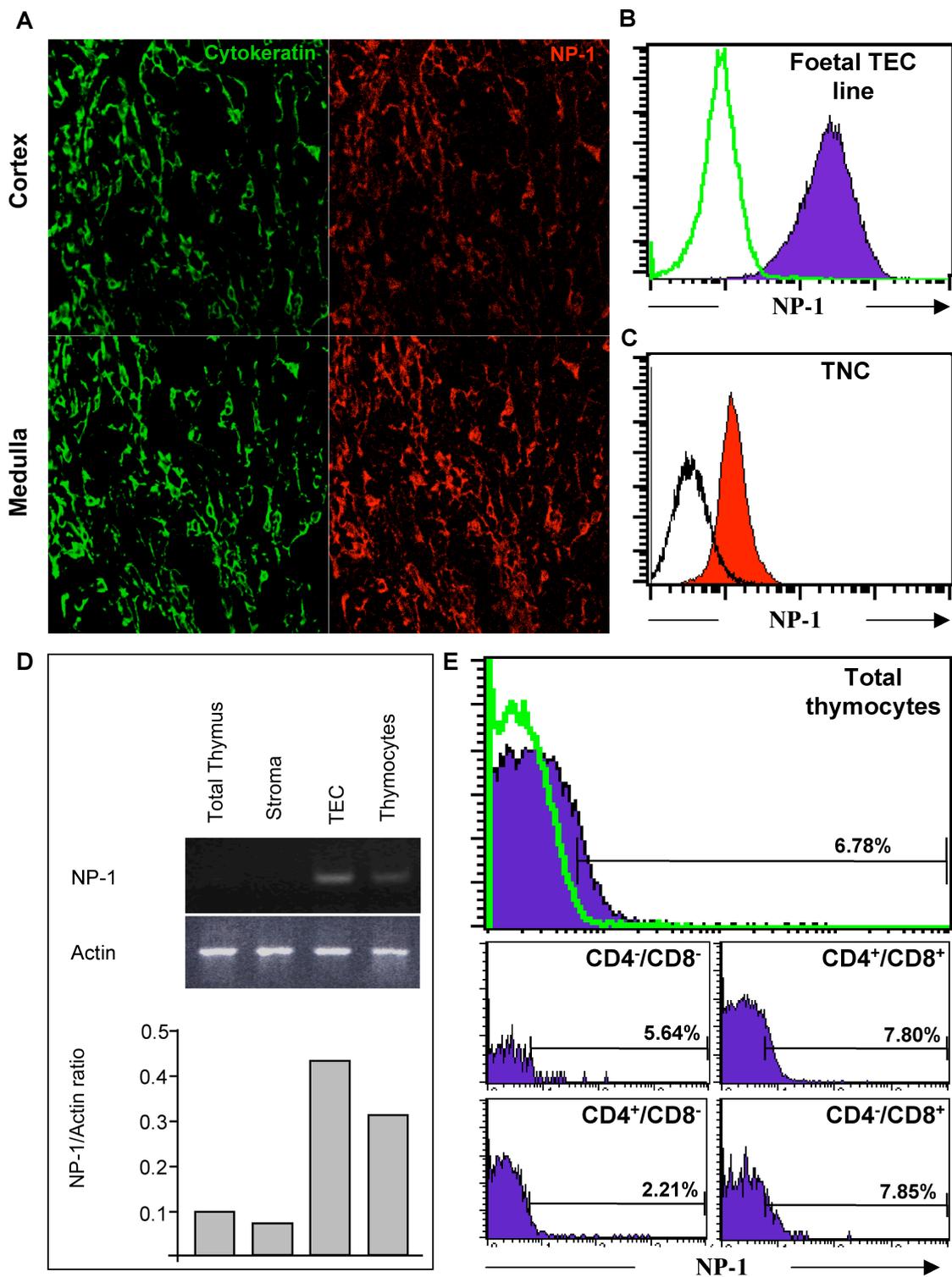


Figure 2 :

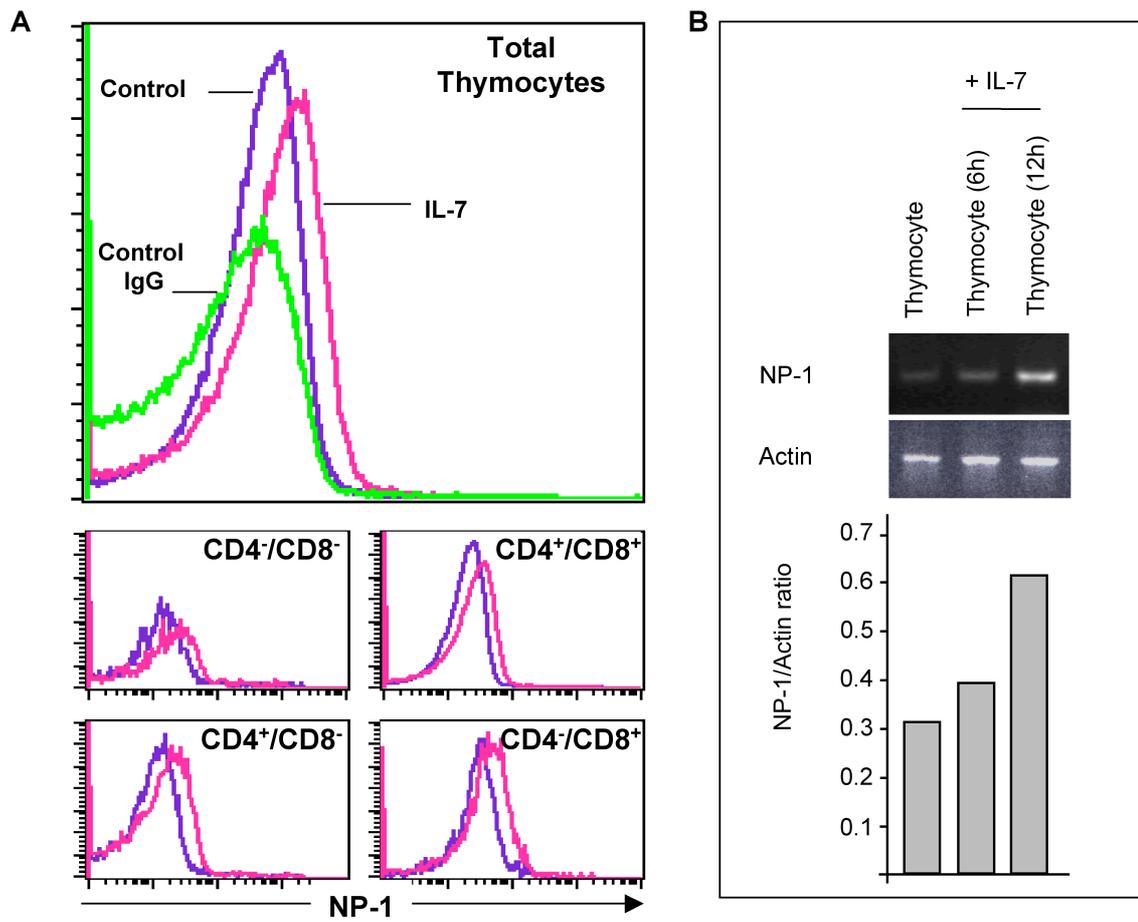


Figure 3 :

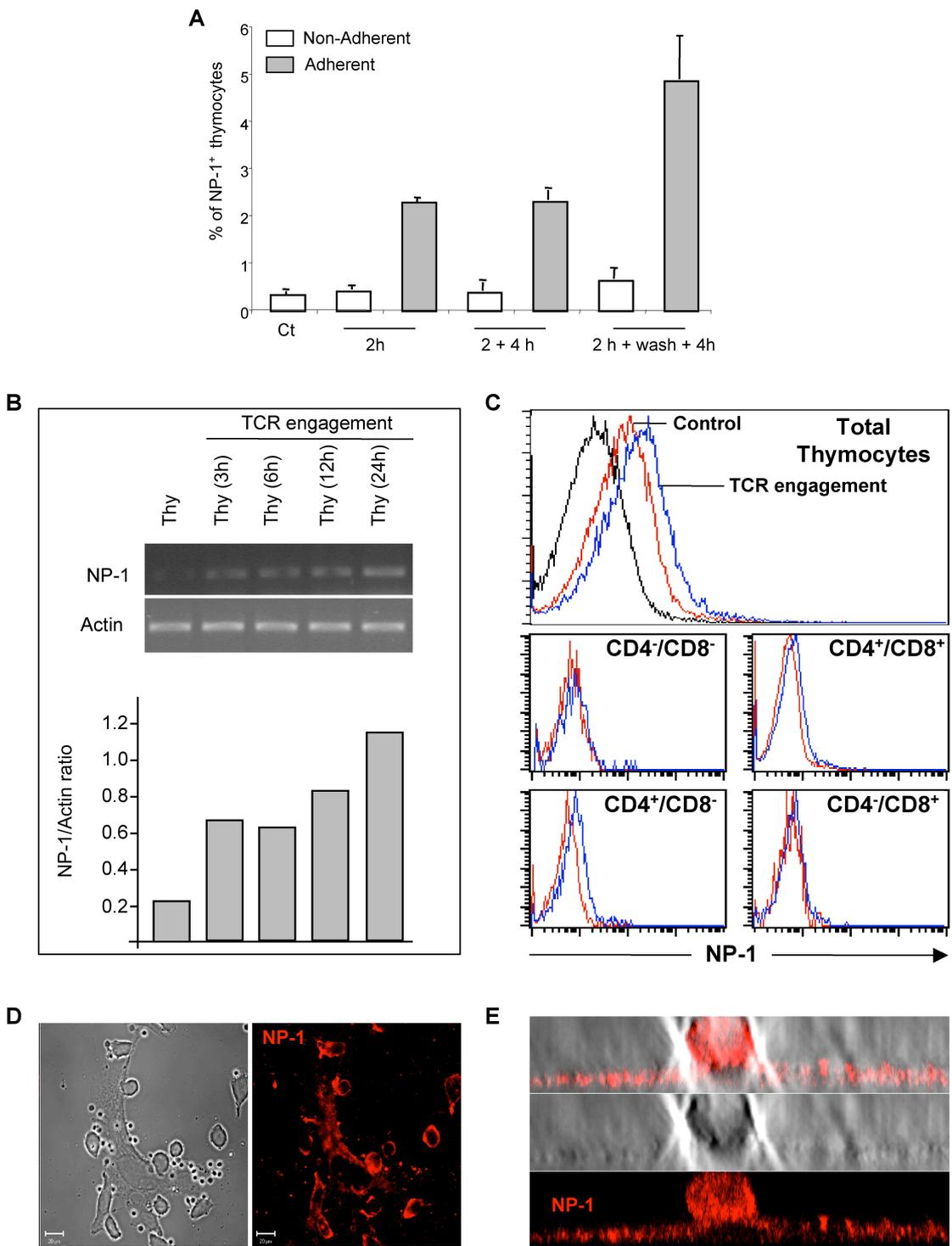


Figure 4 :

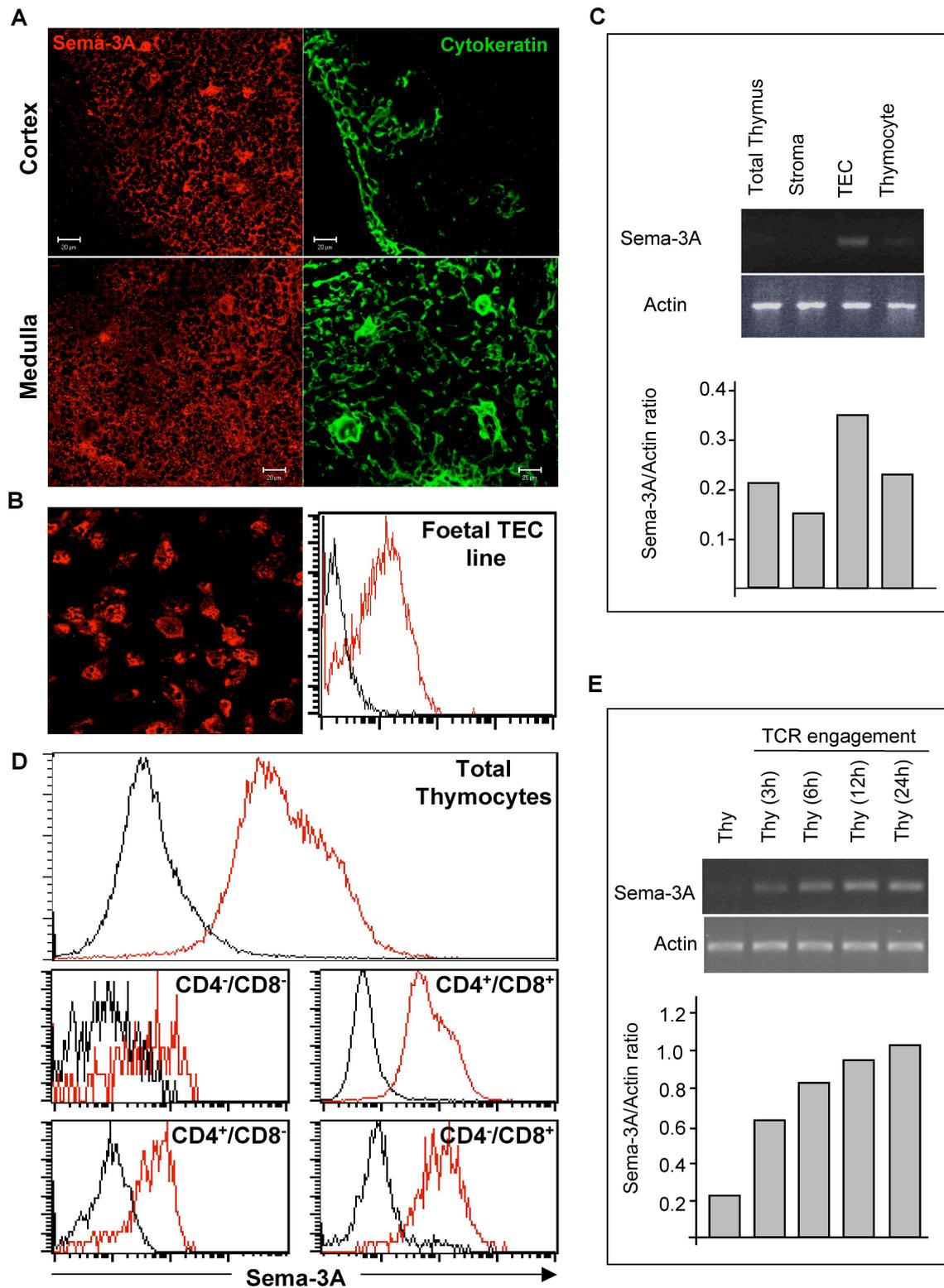


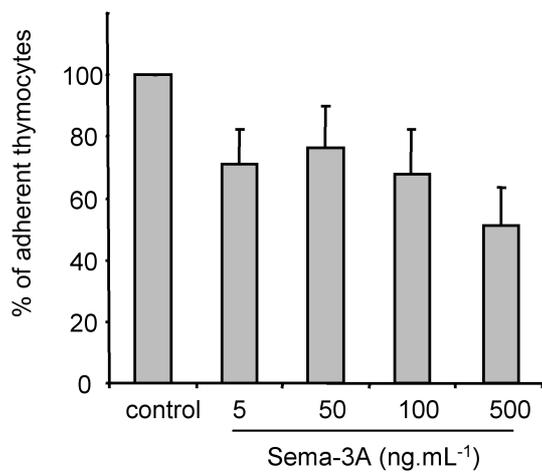
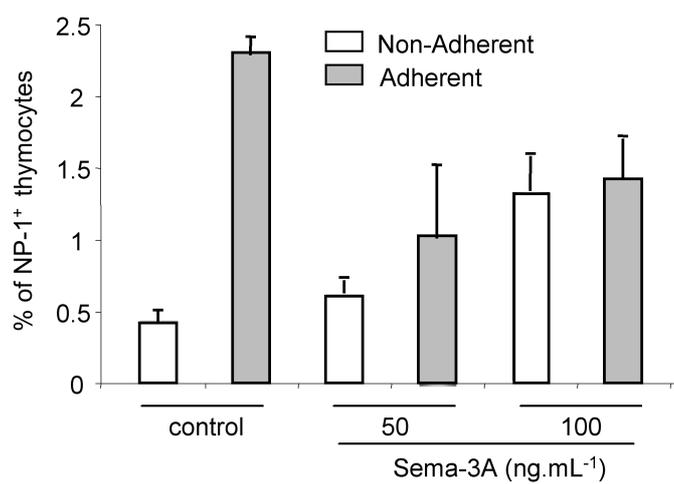
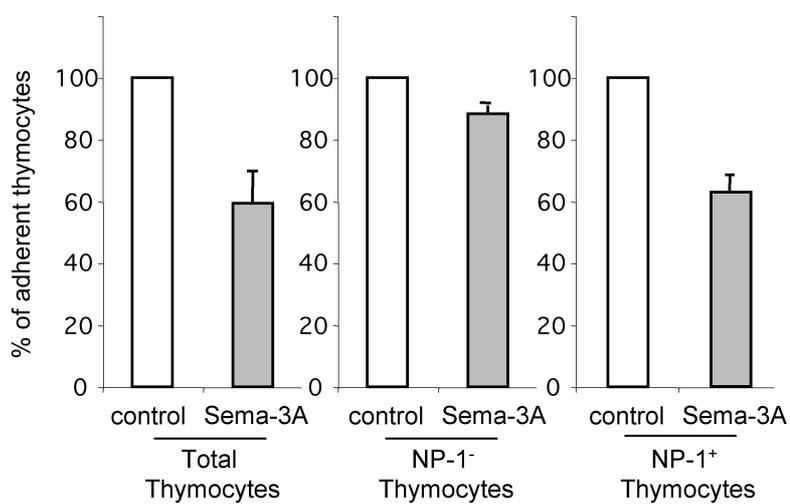
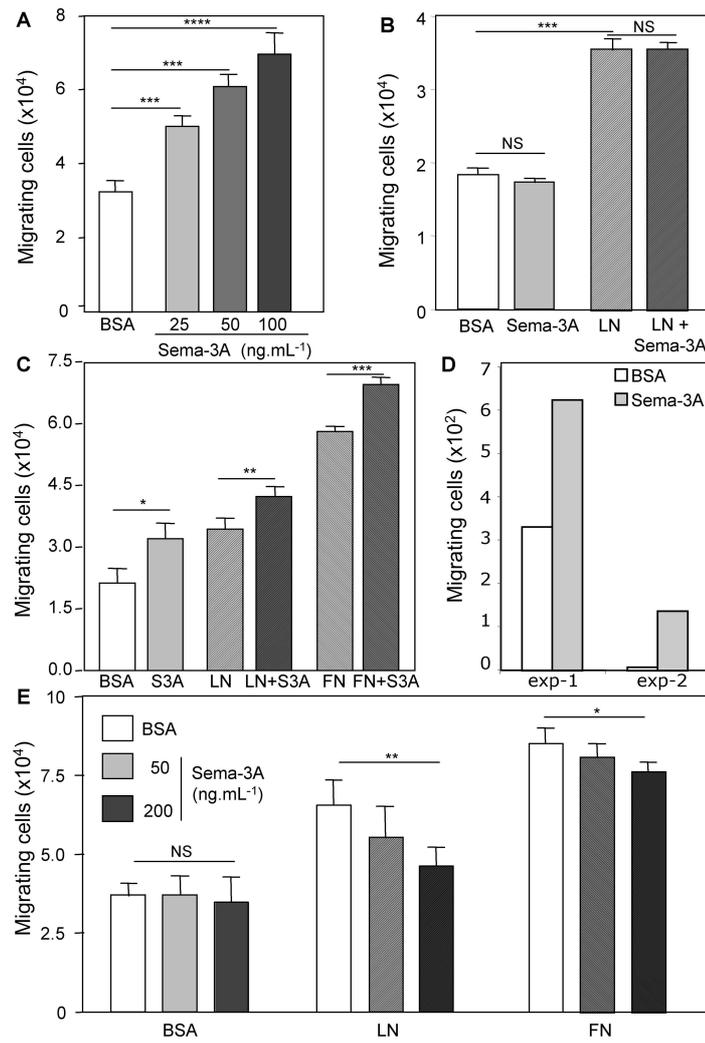
Figure 5 :**A****B****C**

Figure 6 :



DISCUSSION

De la synapse neuronale à la synapse immunologique, un pas à franchir.

L'apparition récente de molécules communes aux deux systèmes de synapses, neurologique et immunitaire ou au cours de jonction neuro-musculaire, nous fait largement penser que les concepts fondés sur une classification indépendante entre les différents domaines de la biologie conduisent à créer des séparations beaucoup trop importantes entre les différentes spécialités.

Pourtant la présence de nombreux récepteurs, comme les récepteurs aux neuropeptides et β -adrénergique par exemple, est une des notions qui ont largement été introduites et démontrées à la fois en neurobiologie et en immunologie. Néanmoins, des mécanismes régulateurs pourtant évoqués par nos pères ont également été oubliés ou non étudiés : c'est le cas de la plasticité des cellules immunitaires en réponse aux mécanismes de coopération cellulaire et de médiation dans l'échange de micromolécules inférieures à 1kDa.

Dans ce travail, nous proposons des faits supplémentaires impliquant des molécules neurobiologiques, pour la première fois, mises en évidence en immunologie, et dont les mécanismes d'action ouvrent des perspectives additionnelles pour la compréhension des phénomènes associés au cytosquelette, aux intégrines de type matrice extracellulaire etc. Nous avons récemment mis en évidence le fait qu'un récepteur neurologique de la famille de la Neuropiline, la Neuropiline-1 (Np-1), est exprimé à la fois sur les cellules dendritiques (DC) et sur les lymphocytes T (LT) naïfs *in vivo* et *in vitro* (Tordjman, 2002). La Np-1 est un récepteur impliqué dans l'orientation axonale des neurones pendant le développement embryonnaire (Gavazzi, 2001). Ce récepteur possède deux familles de ligands : les sémaphorines impliquées dans l'orientation axonale (les sémaphorines sécrétées de classe III) et les facteurs angiogéniques de la famille du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Neufeld, 2002). Nous avons montré que les DC acquièrent la Np-1 au cours de leur différenciation et sont alors capables de former des synapses immunologiques avec les LT. Cette interaction est dépendante de la Neuropiline. En effet, les cellules COS-7, transfectées avec la Np-1, augmentent leur capacité d'interaction avec les cellules dendritiques. Ces événements suggèrent que les cellules dendritiques interagissent avec les LT *via* un mécanisme pouvant être régulé par la Np-1. Cette interaction est

indispensable à la formation et à la fonction de la synapse immunologique DC/LT nécessaire à l'initiation de la réponse immune, puisqu'elle peut être inhibée par des anticorps bloquant la Np-1.

Molécule d'adhésion.

Il a été récemment démontré que l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) fait intégralement partie du contact cellulaire entre les DC et les LT au cours de la formation de la synapse immunologique du fait de son agrégation au niveau du site de contact (Mittelbrunn M, 2004). Ce mécanisme d'adhésion est présent également au cours de l'adhésion entre les thymocytes et les cellules épithéliales thymiques régulant ainsi les adhésions cellulaires tout au long de la sélection positive et négative. Enfin ce concept d'adhésion entre cellules dépendant des intégrines de type VLA est régulé par le cytosquelette des cellules du fait de l'association intracytoplasmique des VLA à la cofiline, cette association permet de réguler la fonctionnalité des VLA vis-à-vis de leur ligand. Ces mécanismes d'adhésion et desadhésion sont associés, en plus des interactions cellules-cellules, aux mécanismes de migration cellulaire dépendante des molécules de la matrice extracellulaire comme le fibronectine et la lamine.

Un point fort par rapport au complexe protéique étudié ici (Np-1/Sema-3A) est que le signal induit par la Sema-3A modifie la capacité d'adhésion des VLA à leur ligand en modulant la phosphorylation de la cofilin et donc son activité (Serini, 2003). Ces effets pourraient donc réguler la capacité d'adhésion des LT ou des thymocytes aux DC ou aux cellules épithéliales thymiques et donc moduler l'efficacité des contacts cellulaires au cours de la réponse immunitaire ou de la sélection thymique.

Cytosquelette, mobilité, deux phénomènes indispensables pour les cellules.

Les cellules présentatrices d'antigène sont les premières à même d'avoir besoin d'une large capacité de migration et de mobilité du cytosquelette afin de phagocytter les pathogènes. En effet, les récepteurs à la surface des phagocytes sont essentiels pour l'élimination des pathogènes soit par reconnaissance directe (Stahl and Ezekowitz, 1998) ou indirecte nécessitant alors une opsonisation par des anticorps (Daeron M., 1997). Ces deux types de reconnaissance vont conduire à l'internalisation des

complexes anticorps-antigène et la phagocytose des pathogènes. Ces mécanismes sont respectivement dépendants des clathrines et du cytosquelette d'actine. Dans tous les cas, la captation des antigènes nécessite le remodelage du cytosquelette.

Une fois cette captation réalisée, les cellules doivent impérativement migrer du site de l'infection vers les organes lymphoïdes secondaires. Pour ce faire, les cellules ont besoin de développer une fois encore une large plasticité afin de se frayer un chemin au sein du réseau tissulaire. Il en est de même pour les LT au cours de la réponse immunitaire induite par les DC activées. Dans ces conditions, la captation et la migration cellulaire sont des événements indispensables pour médier une bonne réponse immunitaire. Cependant, comme pour tous modèles, les cellules doivent développer des rétro-contrôles afin d'éviter tout dérapage au cours de l'immunité. C'est pour cela, que nous pensons que les neuropilines et les sémaphorines sont de bons candidats pour ce genre de régulation du fait des variations d'expression au cours de l'activation des DC et des LT et du fait des régulations directes de ces molécules sur le cytosquelette d'actine.

Nous avons pu mettre en évidence que les DC pouvaient sécréter la Sema-3A sous différentes formes : tout d'abord la forme répulsive de 95kDa au cours de leur activation par des cytokines inflammatoires puis sous la forme de 65kDa (dominant négatif) pendant la costimulation DC/LT induite par la voie CD40-CD40L suite à la reconnaissance de l'antigène par le TcR des LT mémoires. Nos hypothèses sont les suivantes : 1- Comme les cellules LT activés expriment transitoirement la Np-1, la sécrétion de la Sema-3A (95kDa) par les DC activées permettrait d'éviter le recrutement et l'adhésion des LT déjà activés par contre la reconnaissance de l'antigène par le TcR des LT mémoires et la costimulation *via* la voie CD40-CD40L permettrait une meilleure adhésion et une formation synaptique plus importante du fait de la sécrétion de l'isoforme inactive. 2- Dans un deuxième temps, du fait de l'apparition de la Np-1 et de la sécrétion de la Sema-3A de 95kDa après l'activation des LT par le TcR, les LT peuvent se séparer des DC matures et ainsi arrêter la synapse immunologique. 3- De plus du fait des différentes formes de la Sema-3A, nous pouvons envisager également un rôle régulateur dans la formation de synapse de faible ou de haute interaction. Cette variation pourrait également modifier l'orientation des LT effecteurs.

En ce qui concerne les organes lymphoïdes primaires, il a été récemment démontré que la Np-1 était exprimée par des lignées de cellules stromales de la moelle osseuse de souris (Dormady, 2001). Cependant, l'expression de cette molécule dans le thymus n'a pas été étudiée jusqu'à présent.

Thymus foyer de la plasticité, de la sélection : un domaine neurobiologique ?

Compte tenu des données montrant d'une part, le rôle de la Np-1 dans l'orientation axonale des neurones et d'autre part, son rôle dans la formation de la synapse immunologique entre DC et LT périphériques, nous avons émis les hypothèses suivantes en ce qui concerne la physiologie du thymus : 1) la Np-1 pourrait être impliquée dans la migration des thymocytes, 2) elle pourrait aussi contribuer à la formation de la synapse immunologique à l'intérieur du thymus, par exemple, entre les thymocytes et les cellules épithéliales thymiques mais aussi avec les DC à la fois pour la sélection négative et positive.

L'existence d'une communication bidirectionnelle entre les systèmes immunitaire et neuroendocrinien est, de nos jours, bien établie : les deux systèmes utilisent des ligands solubles communs, et expriment les récepteurs correspondants, permettant l'établissement et le maintien des circuits de communication, qui jouent un rôle important dans l'homéostasie. Ainsi, non seulement des cellules du système immunitaire produisent des hormones classiques, mais aussi les glandes endocrines et les tissus nerveux sont capables de synthétiser et de sécréter une série de cytokines. De plus, des récepteurs spécifiques pour ces différentes familles de molécules peuvent être détectées à la fois dans les systèmes immunitaire et neuroendocrinien. Dans ce contexte, le thymus exprime des récepteurs pour différentes hormones, neuropeptides et neurotransmetteurs classiques. Enfin, plusieurs laboratoires dont celui du Dr W. Savino ont démontré l'expression intrathymique d'une série d'hormones et de neuropeptides (voir revue Savino & Dardenne, 2000).

Nous avons pu mettre en évidence que la Np-1 ainsi que la Sema-3A sont exprimées à la fois dans le cortex et la medulla, et ce plus particulièrement sur les cellules épithéliales thymiques et les thymocytes. Les régulations de la Np-1 et de la Sema-3A par l'IL-7 et/ou par l'engagement du TCR indiquent que ces molécules sont

importantes au cours de l'ontogénie T dans le thymus et pourraient réguler tous les stades de la sélection thymique. Cependant il reste à démontrer la présence de ces molécules aux niveaux des cellules dendritiques thymiques afférentes et résidentes ainsi que sur les cellules nurses. Ces observations pourront ainsi permettre une meilleure compréhension de l'implication des neuropilines et des sémaphorines dans toutes les phases de sélections thymiques. L'étude des souris Ko pour les neuropilines et/ou pour les sémaphorines pourrait apporter des données supplémentaires qui nous permettront de mieux comprendre les mécanismes et fonctions de ces nouvelles protéines dans le thymus humain.

Confrontation

Des données récentes mettent également en évidence la présence et les fonctions de la Np-1 et de la sémaphorine-3A sur les cellules de l'immunité. Le laboratoire de D. Bruder a mis en évidence la présence de la Np-1 sur les T-reg chez la souris (Bruder, 2004), cependant nos résultats personnels non pas révélés d'expression de la Np-1 sur les T-reg humains. Il semble donc qu'il y ait des divergences d'expression entre les espèces même si ces protéines sont fortement conservées. Nous avons également recherché la présence de la Np-1 sur les DC murines, et une fois encore et ce bien quelle y soit présentes ne semble pas être régulée de la même manière entre les DC humaines et les DC de souris. Nous continuons malgré tout nos expériences chez la souris afin de vérifier les fonctionnalités détectées chez les cellules humaines. A. Wong a également étudié l'expression et la fonction des plexines dans les lymphocytes T murins. Son étude que la plexine-A1 est exprimée dans les DC et qu'elle est importante au cours de la stimulation DC-LT. Un autre point est abordé dans ce papier, il constate que la plexine-A1 n'est pas exprimée dans les lymphocytes T murins (Wong, 2003). A ce stade, nous de nouveau en désaccord, en effet nous avons détecté la présence de la plexine-A1 à la fois dans les thymocytes et les lymphocytes T humains. Nous tenons à souligner que les études génétiques publiées dans la littérature mettent en évidence la présence des plexine-A1 à A4 chez la souris, hors jusqu'à présent aucun élément n'est en faveur de l'expression de la plexine-A4 chez l'homme. Nos résultats sur l'expression de la plexine-A1, ont été validés dans des cellules Huvec qui de base n'expriment pas les plexines-A1 et -A2. Ce résultat a été vérifié à la fois par PCR qu'en protéine, de plus sous stimulation avec du VEGF-A165, les mRNA codant pour les plexines sont

présentes et la protéine est exprimée. Ce qui prouve que nos résultats sur les lymphocytes et les thymovytes humains sont valables. D'autres équipes (Laboratoire de P. Giraudon et Laboratoire de Catalano), confirment l'implication de la sémaphorine-3A ou de CRMP-2 sur la modulation de l'activation et/ou migration des lymphocytes T humains (Catalano, 2006) (Vincent, 2005).

Tous ces résultats réunis montrent qu'une nouvelle molécule d'origine neuronale est entrée dans les mécanismes de régulation de la réponse immunitaire. Certes nous pourrions échafauder de nombreuses hypothèses sur les fonctions de cette protéine dans la réponse immunitaire, mais il me semble que tous ensemble nous avons ouvert une nouvelle porte et point de vue sur l'immunologie, et nos perspectives sont très larges.

Perspectives.

Tous ces éléments de la réponse immunitaire et de l'ontogénie lymphocytaire font appel à trois principaux mécanismes : 1) la capacité d'adhésion, 2) la migration cellulaire et surtout 3) un cytosquelette dynamique. Ce dernier est indispensable à la fois pour la captation des pathogènes, la sécrétion de différents facteurs et médiateurs, la mobilité cellulaire qui s'effectue à la fois au cours de l'adhésion entre deux cellules et pendant la migration cellulaire. Nous apportons ici de nouvelles perspectives dans la compréhension de tous ces mécanismes du fait de l'expression à la surface des cellules de récepteurs pouvant directement agir sur la plasticité des cellules. De plus ces ligands sont sécrétés à différents moments au cours de la réponse immunitaire et au cours de l'ontogénie T.

Du fait de la régulation négative de la prolifération T induite par la Sema-3A et de sa sécrétion autocrine au cours de l'activation des LT, nous avons recherché si cette protéine pouvait être présente dans les populations T régulatrices. Nos résultats montrent que les T régulateurs expriment constitutivement de la Sema-3A. La sécrétion de cette Sema-3A par les T régulateurs est provoqué après stimulation du TcR et son stock intracytoplasmique est régulièrement reconstitué au cours du temps. Nous sommes en train d'évaluer le rôle de la Sema-3A contenue dans les T régulateurs au cours de la réponse immunitaire ainsi que son rôle dans l'inhibition de prolifération des LT mémoire par rapport aux autres facteurs solubles sécrétés par les T régulateurs

comme le TGF- β et l'IL-10 ainsi que vis-à-vis du contact cellulaire médié par le CTLA-4 exprimé à la surface des T régulateurs. Nous espérons ainsi mettre en évidence le rôle de la Sema-3A dans l'immuno-suppression des LT par les T régulateurs au niveau de la signalisation du TCR et de la sécrétion de cytokines à la fois dans un contexte CD4 que CD8.

Un fait supplémentaire, du fait de nos investigations, montre que certaines tumeurs sont capables de sécréter la Sema-3A, et pourraient ainsi moduler la réponse immunitaire par interférence avec la plasticité des cellules de l'immunité en cours d'activation ou en cours de progression vers la tumeur. Pour valider cette hypothèse, nous sommes en train de développer un modèle d'étude basé sur la réponse anti-virale à partir de lymphocytes T CD8 anti-CMV (cyto-mégalo-virus). Nos premiers résultats montrent qu'après stimulation par le TcR induit par le CMV, les CD8 se mettent à exprimer la Np-1, et donc potentiellement à devenir sensible à la Sema-3A. Les cellules cibles infectées par le CMV quant à elles sont capables de synthétiser et de sécréter de la Sema-3A. Dans un contexte de sécrétion de la Sema-3A par les tumeurs, nous avons suivi les effets sur la sécrétion d'INF γ et de la perforine des LT CD8 stimulés par le CMV. Cette sensibilité à la Sema-3A n'induit pas de variation de la sécrétion d'INF γ , mais diminue très fortement la capacité d'exportation et de sécrétion de la perforine. Cette inhibition différentielle est explicable du fait du mécanisme de sécrétion de l'INF γ versus perforine. En effet, la sécrétion de l'INF γ n'est pas dépendante de l' α -tubuline contrairement à la perforine. La perforine est sécrétée par des vésicules exprimant la protéine Rab27 qui se fixe sur le réseau de tubuline pour être sécrétée. Du fait de son effet inhibiteur direct sur la plasticité de l' α -tubuline, la Sema-3A semble donc jouer un rôle différentiel en fonctions des mécanismes d'exportation des vésicules. Nous pouvons donc envisager que, dans un contexte tumoral viro-induit ou non, les CD8 cytotoxiques recrutés au niveau des tumeurs soient capables certes de sécréter de l'INF γ mais incapables de lyser les cellules tumorales. Ce phénomène est d'ailleurs observable dans certains types de tumeurs comme la maladie d'Hodgkin et les lymphomes B-EBV, modèles que nous sommes en train d'étudier à l'heure actuelle.

Ces mécanismes pourraient donc apporter de nouvelles informations et compréhensions dans l'échappement tumoral à la lyse cellulaire induite par les CD8

cytotoxiques. Du fait de ce type de blocage de la lyse cellulaire, nous avons également orienté nos recherches vers l'étude des cellules NKT (douées également de la capacité de lyse cellulaire).

ANNEXES

ANNEXE N°1

ANNEXE N°2

ANNEXE N°3

ANNEXE N°4

ANNEXE N°5

ANNEXE N°6

ANNEXE N°7

REFERENCES

Aizawa, H. et al. Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nat Neurosci* 4, 367-73 (2001).

Akashi, K., Kondo, M., von Freeden-Jeffry, U., Murray, R. & Weissman, I.L. Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell* 89, 1033-41 (1997).

Allenspach, E.J. et al. ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity* 15, 739-50 (2001).

Amadori, A. et al. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat Med* 1, 1279-83 (1995).

Anderson, G. & Jenkinson, E.J. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol* 1, 31-40 (2001).

Anderson, G., Anderson, K.L., Tchilian, E.Z., Owen, J.J. & Jenkinson, E.J. Fibroblast dependency during early thymocyte development maps to the CD25⁺ CD44⁺ stage and involves interactions with fibroblast matrix molecules. *Eur J Immunol* 27, 1200-6 (1997).

Anderson, G., Moore, N.C., Owen, J.J. & Jenkinson, E.J. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol* 14, 73-99 (1996).

Anderson, M.S. et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298, 1395-401 (2002).

Ansel, K.M. & Cyster, J.G. Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development. *Curr Opin Immunol* 13, 172-9 (2001).

Anton van der Merwe, P., Davis, S.J., Shaw, A.S. & Dustin, M.L. Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition. *Semin Immunol* 12, 5-21 (2000).

Ardavin, C. et al. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol* 22, 691-700 (2001).

Ardavin, C., Wu, L., Li, C.L. & Shortman, K. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362, 761-3 (1993).

Arimura, N. et al. Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. *J Biol Chem* 275, 23973-80 (2000).

Artigiani, S. et al. Functional regulation of semaphorin receptors by proprotein convertases. *J Biol Chem* 278, 10094-101 (2003).

Atwal, J.K., Singh, K.K., Tessier-Lavigne, M., Miller, F.D. & Kaplan, D.R. Semaphorin 3F antagonizes neurotrophin-induced phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase signaling: a mechanism for growth cone collapse. *J Neurosci* 23, 7602-9 (2003).

Aurandt, J., Vikis, H.G., Gutkind, J.S., Ahn, N. & Guan, K.L. The semaphorin receptor plexin-B1 signals through a direct interaction with the Rho-specific nucleotide exchange factor, LARG. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12085-90 (2002).

Bagnard, D. et al. Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. *J Neurosci* 21, 3332-41 (2001).

Banchereau, J. & Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-52 (1998).

Banchereau, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811 (2000).

Banchereau, J., Pulendran, B., Steinman, R. & Palucka, K. Will the making of plasmacytoid dendritic cells in vitro help unravel their mysteries? *J Exp Med* 192, F39-44 (2000).

Benoist, C. & Mathis, D. T-cell development: a new marker of differentiation state. *Curr Biol* 9, R59-61 (1999).

Benvenuti, F. et al. Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J Immunol* 172, 292-301 (2004).

Berg, L.J. & Kang, J. Molecular determinants of TCR expression and selection. *Curr Opin Immunol* 13, 232-41 (2001).

Blanchard, N., Di Bartolo, V. & Hivroz, C. In the immune synapse, ZAP-70 controls T cell polarization and recruitment of signaling proteins but not formation of the synaptic pattern. *Immunity* 17, 389-99 (2002).

Bousso, P., Bhakta, N.R., Lewis, R.S. & Robey, E. Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* 296, 1876-80 (2002).

Brambilla, E., Constantin, B., Drabkin, H. & Roche, J. Semaphorin SEMA3F localization in malignant human lung and cell lines: A suggested role in cell adhesion and cell migration. *Am J Pathol* 156, 939-50 (2000).

Bruder, D. et al. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 34, 623-30 (2004).

Bunnell, S.C., Kapoor, V., Triple, R.P., Zhang, W. & Samelson, L.E. Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT. *Immunity* 14, 315-29 (2001).

Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 1996 Apr 5;272(5258):60-6. Review.

Byk, T., Ozon, S. & Sobel, A. The Ulip family phosphoproteins--common and specific properties. *Eur J Biochem* 254, 14-24 (1998).

Cai, H. & Reed, R.R. Cloning and characterization of neuropilin-1-interacting protein: a PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1. *J Neurosci* 19, 6519-27 (1999).

Campbell JJ, Butcher EC. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol.* 2000 Jun;12(3):336-41. Review.

Campbell, D.S. et al. Semaphorin 3A elicits stage-dependent collapse, turning, and branching in *Xenopus* retinal growth cones. *J Neurosci* 21, 8538-47 (2001).

Castellani, V. & Rougon, G. Control of semaphorin signaling. *Curr Opin Neurobiol* 12, 532-41 (2002).

Castellani, V. The function of neuropilin/L1 complex. *Adv Exp Med Biol* 515, 91-102 (2002).

Castellani, V., Chedotal, A., Schachner, M., Faivre-Sarrailh, C. & Rougon, G. Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27, 237-49 (2000).

Castellani, V., De Angelis, E., Kenwrick, S. & Rougon, G. Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *Embo J* 21, 6348-57 (2002).

Catalano A, Caprari P, Moretti S, Faronato M, Tamagnone L, Procopio A. Semaphorin-3A is expressed by tumor cells and alters T cell signal transduction and function. *Blood.* 2006.

Caux, C. et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* 184, 695-706 (1996).

Cella, M. et al. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med* 189, 821-9 (1999).

Cella, M. et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5, 919-23 (1999).

Ceredig, R. & Schreyer, M. Immunohistochemical localization of host and donor-derived cells in the regenerating thymus of radiation bone marrow chimeras. *Thymus* 6, 15-26 (1984).

Chen, H. et al. Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron* 25, 43-56 (2000).

Chen, H., Chedotal, A., He, Z., Goodman, C.S. & Tessier-Lavigne, M. Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* 19, 547-59 (1997).

Chen, H., He, Z., Bagri, A. & Tessier-Lavigne, M. Semaphorin-neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorins. *Neuron* 21, 1283-90 (1998).

Cheng, H.J. et al. Plexin-A3 mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal projections. *Neuron* 32, 249-63 (2001).

Christensen, C.R. et al. Transcription of a novel mouse semaphorin gene, M-semaH, correlates with the metastatic ability of mouse tumor cell lines. *Cancer Res* 58, 1238-44 (1998).

Comeau, M.R. et al. A poxvirus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor, VESPR. *Immunity* 8, 473-82 (1998).

Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Fuchs, A., Colonna, M. & Caligiuri, M.A. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol* 25, 47-52 (2004).

Costello, P.S., Gallagher, M. & Cantrell, D.A. Sustained and dynamic inositol lipid metabolism inside and outside the immunological synapse. *Nat Immunol* 3, 1082-9 (2002).

Crisa, L. et al. Cell adhesion and migration are regulated at distinct stages of thymic T cell development: the roles of fibronectin, VLA4, and VLA5. *J Exp Med* 184, 215-28 (1996).

Daeron M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:203-34. Review.

Dalle-Donne, I. et al. Actin carbonylation: from a simple marker of protein oxidation to relevant signs of severe functional impairment. *Free Radic Biol Med* 31, 1075-83 (2001).

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Milzani, A., Di Simplicio, P. & Colombo, R. The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radic Biol Med* 31, 1624-32 (2001).

Davis, S.J. & van der Merwe, P.A. The structure and ligand interactions of CD2: implications for T-cell function. *Immunol Today* 17, 177-87 (1996).

de Baey, A. & Lanzavecchia, A. The role of aquaporins in dendritic cell macropinocytosis. *J Exp Med* 191, 743-8 (2000).

de Saint-Vis, B. et al. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* 9, 325-36 (1998).

de Vries, C. et al. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255, 989-91 (1992).

de Vries, L. et al. RGS-GAIP, a GTPase-activating protein for G α heterotrimeric G proteins, is located on clathrin-coated vesicles. *Mol Biol Cell* 9, 1123-34 (1998).

de Vries, L., Lou, X., Zhao, G., Zheng, B. & Farquhar, M.G. GIPC, a PDZ domain containing protein, interacts specifically with the C terminus of RGS-GAIP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12340-5 (1998).

Decaussin, M. et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. *J Pathol* 188, 369-77 (1999).

Delaire, S. et al. Biological activity of soluble CD100. II. Soluble CD100, similarly to H-SemaIII, inhibits immune cell migration. *J Immunol* 166, 4348-54 (2001).

Delaire, S., Elhabazi, A., Bensussan, A. & Boumsell, L. CD100 is a leukocyte semaphorin. *Cell Mol Life Sci* 54, 1265-76 (1998).

Delon, J., Bercovici, N., Raposo, G., Liblau, R. & Trautmann, A. Antigen-dependent and -independent Ca²⁺ responses triggered in T cells by dendritic cells compared with B cells. *J Exp Med* 188, 1473-84 (1998).

Delon, J., Stoll, S. & Germain, R.N. Imaging of T-cell interactions with antigen presenting cells in culture and in intact lymphoid tissue. *Immunol Rev* 189, 51-63 (2002).

Di Santo, J.P. & Rodewald, H.R. *In vivo* roles of receptor tyrosine kinases and cytokine receptors in early thymocyte development. *Curr Opin Immunol* 10, 196-207 (1998).

Dickson, B.J. Rho GTPases in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol* 11, 103-10 (2001).

Dorfman, D.M., Shahsafaei, A., Nadler, L.M. & Freeman, G.J. The leukocyte semaphorin CD100 is expressed in most T-cell, but few B-cell, non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol* 153, 255-62 (1998).

Dormady SP, Bashayan O, Dougherty R, Zhang XM, Basch RS. Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment. *J Hematother Stem Cell Res.* 2001 Feb;10(1):125-40.

Driessens, M.H. et al. Plexin-B semaphorin receptors interact directly with active Rac and regulate the actin cytoskeleton by activating Rho. *Curr Biol* 11, 339-44 (2001).

Driessens, M.H., Olivo, C., Nagata, K., Inagaki, M. & Collard, J.G. B plexins activate Rho through PDZ-RhoGEF. *FEBS Lett* 529, 168-72 (2002).

Dustin, M.L. & Cooper, J.A. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol* 1, 23-9 (2000).

Dustin, M.L. & Springer, T.A. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341, 619-24 (1989).

Dustin, M.L. et al. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* 94, 667-77 (1998).

Dustin, M.L., Bromley, S.K., Kan, Z., Peterson, D.A. & Unanue, E.R. Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3909-13 (1997).

Edwards, D.C. & Gill, G.N. Structural features of LIM kinase that control effects on the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 274, 11352-61 (1999).

Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M. & Gill, G.N. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* 1, 253-9 (1999).

Eickholt, B.J., Walsh, F.S. & Doherty, P. An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signaling. *J Cell Biol* 157, 211-7 (2002).

Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-35 (2002).

Fan, J. & Raper, J.A. Localized collapsing cues can steer growth cones without inducing their full collapse. *Neuron* 14, 263-74 (1995).

Fiebiger, E. et al. Cytokines regulate proteolysis in major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by dendritic cells. *J Exp Med* 193, 881-92 (2001).

Fine, J.S. & Kruisbeek, A.M. The role of LFA-1/ICAM-1 interactions during murine T lymphocyte development. *J Immunol* 147, 2852-9 (1991).

Fischer J, Weide T, Barnekow A. The MICAL proteins and rab1: a possible link to the cytoskeleton? *Biochem Biophys Res Commun.* (2005) Mar 11;328(2):415-23.

Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M. & Breitman, M.L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66-70 (1995).

Fournier AE, Nakamura F, Kawamoto S, Goshima Y, Kalb RG, Strittmatter SM. Semaphorin3A enhances endocytosis at sites of receptor-F-actin colocalization during growth cone collapse. *J Cell Biol.* 2000 Apr 17;149(2):411-22.

Freiberg, B.A. et al. Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nat Immunol* 3, 911-7 (2002).

Fuh, G., Garcia, K.C. & de Vos, A.M. The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J Biol Chem* 275, 26690-5 (2000).

Fujisawa, H., Takagi, S. & Hirata, T. Growth-associated expression of a membrane protein, neuropilin, in *Xenopus* optic nerve fibers. *Dev Neurosci* 17, 343-9 (1995).

Fujisawa H, Ohta K, Kameyama T, Murakami Y. Function of a cell adhesion molecule, plexin, in neuron network formation. *Dev Neurosci*. 1997;19(1):101-5. Review.

Fukada, M. et al. Molecular characterization of CRMP5, a novel member of the collapsin response mediator protein family. *J Biol Chem* 275, 37957-65 (2000).

Gagnon, M.L. et al. Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: *In vivo* expression and antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2573-8 (2000).

Gatti, E. & Pierre, P. Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution. *Curr Opin Cell Biol* 15, 468-73 (2003).

Geiger, B., Rosen, D. & Berke, G. Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells. *J Cell Biol* 95, 137-43 (1982).

Geijtenbeek, T.B. et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100, 575-85 (2000).

Giger, R.J. et al. Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron* 21, 1079-92 (1998).

Giger, R.J. et al. Neuropilin-2 is required *in vivo* for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron* 25, 29-41 (2000).

Gitay-Goren, H. et al. Selective binding of VEGF₁₂₁ to one of the three vascular endothelial growth factor receptors of vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 271, 5519-23 (1996).

Gluzman-Poltorak, Z., Cohen, T., Herzog, Y. & Neufeld, G. Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165. *J Biol Chem* 275, 29922 (2000).

Gluzman-Poltorak, Z., Cohen, T., Shibuya, M. & Neufeld, G. Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes. *J Biol Chem* 276, 18688-94 (2001).

Godfrey, D.I. & Zlotnik, A. Control points in early T-cell development. *Immunol Today* 14, 547-53 (1993).

Godfrey, D.I. et al. IL-12 influences intrathymic T cell development. *J Immunol* 152, 2729-35 (1994).

Gordon, J. B-cell signalling via the C-type lectins CD23 and CD72. *Immunol Today* 15, 411-7 (1994).

Gordon, J., Katira, A., Strain, A.J. & Gillis, S. Inhibition of interleukin 4-promoted CD23 production in human B lymphocytes by transforming growth factor-beta, interferons or anti-CD19 antibody is overridden on engaging CD40. *Eur J Immunol* 21, 1917-22 (1991).

Goshima, Y., Nakamura, F., Strittmatter, P. & Strittmatter, S.M. Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature* 376, 509-14 (1995).

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

Griffiths, E.K. et al. Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap. *Science* 293, 2260-3 (2001).

Gu, Y. & Ihara, Y. Evidence that collapsin response mediator protein-2 is involved in the dynamics of microtubules. *J Biol Chem* 275, 17917-20 (2000).

Gu, Y., Hamajima, N. & Ihara, Y. Neurofibrillary tangle-associated collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) is highly phosphorylated on Thr-509, Ser-518, and Ser-522. *Biochemistry* 39, 4267-75 (2000).

Guermonprez, P. et al. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397-402 (2003).

Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. & Amigorena, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20, 621-67 (2002).

Guttmann-Raviv N, Kessler O, Shraga-Heled N, Lange T, Herzog Y, Neufeld G. The neuropilins and their role in tumorigenesis and tumor progression. *Cancer Lett.* (2006) Jan 8;231(1):1-11.

Hall, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-14 (1998).

Hall, C. et al. Collapsin response mediator protein switches RhoA and Rac1 morphology in N1E-115 neuroblastoma cells and is regulated by Rho kinase. *J Biol Chem* 276, 43482-6 (2001).

Handa, A. et al. Neuropilin-2 expression affects the increased vascularization and is a prognostic factor in osteosarcoma. *Int J Oncol* 17, 291-5 (2000).

Harriague, J. & Bismuth, G. Imaging antigen-induced PI3K activation in T cells. *Nat Immunol* 3, 1090-6 (2002).

Hart, D.N. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90, 3245-87 (1997).

Haynes, B.F., Denning, S.M., Singer, K.H. & Kurtzberg, J. Ontogeny of T-cell precursors: a model for the initial stages of human T-cell development. *Immunol Today* 10, 87-91 (1989).

He, Z. & Tessier-Lavigne, M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90, 739-51 (1997).

Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T. & Shibuya, M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9349-54 (1998).

Hoffman, E.S. et al. Productive T-cell receptor beta-chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development *in vivo*. *Genes Dev* 10, 948-62 (1996).

Hogquist, K. Getting TCR transgenics to work on time. *Trends Immunol* 22, 240-1 (2001).

Houde, M. et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402-6 (2003).

Hu, H., Marton, T.F. & Goodman, C.S. Plexin B mediates axon guidance in *Drosophila* by simultaneously inhibiting active Rac and enhancing RhoA signaling. *Neuron* 32, 39-51 (2001).

Huby, R.D., Carlile, G.W. & Ley, S.C. Interactions between the protein-tyrosine kinase ZAP-70, the proto-oncoprotein Vav, and tubulin in Jurkat T cells. *J Biol Chem* 270, 30241-4 (1995).

Huesmann, M., Scott, B., Kisielow, P. & von Boehmer, H. Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice. *Cell* 66, 533-40 (1991).

Inaba, K. et al. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* 191, 927-36 (2000).

Inaba, K. et al. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* 180, 1849-60 (1994).

Inaba, K., Romani, N. & Steinman, R.M. An antigen-independent contact mechanism as an early step in T cell-proliferative responses to dendritic cells. *J Exp Med* 170, 527-42 (1989).

Inatome, R. et al. Identification of CRAM, a novel unc-33 gene family protein that associates with CRMP3 and protein-tyrosine kinase(s) in the developing rat brain. *J Biol Chem* 275, 27291-302 (2000).

Isakov, N., Wange, R.L., Watts, J.D., Aebersold, R. & Samelson, L.E. Purification and characterization of human ZAP-70 protein-tyrosine kinase from a baculovirus expression system. *J Biol Chem* 271, 15753-61 (1996).

Janes PW, Ley SC, Magee AI. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol.* 1999 Oct 18;147(2):447-61.

Jenkinson, E.J. Expression and function of major histocompatibility complex antigens in the developing thymus: studies on normal and *nude* mice. *Ciba Found Symp* 84, 178-92 (1981).

Jin, Z. & Strittmatter, S.M. Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *J Neurosci* 17, 6256-63 (1997).

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

Kagoshima, M. & Ito, T. Diverse gene expression and function of semaphorins in developing lung: positive and negative regulatory roles of semaphorins in lung branching morphogenesis. *Genes Cells* 6, 559-71 (2001).

Kameyama T, Murakami Y, Suto F, Kawakami A, Takagi S, Hirata T, Fujisawa H. Identification of a neuronal cell surface molecule, plexin, in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Sep 13;226(2):524-9.

Kessler, O. et al. Semaphorin-3F is an inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 64, 1008-15 (2004).

Khan, A.A., Bose, C., Yam, L.S., Soloski, M.J. & Rupp, F. Physiological regulation of the immunological synapse by agrin. *Science* 292, 1681-6 (2001).

Kikutani, H. & Kumanogoh, A. Semaphorins in interactions between T cells and antigen-presenting cells. *Nat Rev Immunol* 3, 159-67 (2003).

Kim, E., Kim, J.H., Kim, H.S., Ryu, S.H. & Suh, P.G. Thimerosal stimulates focal adhesion kinase and cytoskeletal changes by redox modulation. *Biochim Biophys Acta* 1593, 9-15 (2002).

Kim, K.J. et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*. *Nature* 362, 841-4 (1993).

Kishimoto, H. & Sprent, J. Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J Exp Med* 185, 263-71 (1997).

Kitsukawa, T. et al. Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19, 995-1005 (1997).

Kitsukawa, T., Shimono, A., Kawakami, A., Kondoh, H. & Fujisawa, H. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* 121, 4309-18 (1995).

Klagsbrun, M. & D'Amore, P.A. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 259-70 (1996).

Klein, L. & Kyewski, B. "Promiscuous" expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity? *J Mol Med* 78, 483-94 (2000).

Klein, L. & Kyewski, B. Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. *Curr Opin Immunol* 12, 179-86 (2000).

Klostermann, A., Lohrum, M., Adams, R.H. & Puschel, A.W. The chemorepulsive activity of the axonal guidance signal semaphorin D requires dimerization. *J Biol Chem* 273, 7326-31 (1998).

Knight, S.C. et al. The role of dendritic cells in the initiation of immune responses to contact sensitizers. I. In vivo exposure to antigen. *Cell Immunol* 94, 427-34 (1985).

Knight, S.C. Veiled cells--"dendritic cells" of the peripheral lymph. *Immunobiology* 168, 349-61 (1984).

Knight, S.C., Bedford, P. & Hunt, R. The role of dendritic cells in the initiation of immune responses to contact sensitizers. II. Studies in *nude* mice. *Cell Immunol* 94, 435-9 (1985).

Kolodkin, A.L. et al. Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron* 9, 831-45 (1992).

Kolodkin, A.L. et al. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90, 753-62 (1997).

Kondo, M., Akashi, K., Domen, J., Sugamura, K. & Weissman, I.L. Bcl-2 rescues T lymphopoiesis, but not B or NK cell development, in common gamma chain-deficient mice. *Immunity* 7, 155-62 (1997).

Kosco-Vilbois, M.H., Bonnefoy, J.Y. & Chvatchko, Y. The physiology of murine germinal center reactions. *Immunol Rev* 156, 127-36 (1997).

Kosco-Vilbois, M.H., Zentgraf, H., Gerdes, J. & Bonnefoy, J.Y. To 'B' or not to 'B' a germinal center? *Immunol Today* 18, 225-30 (1997).

Kraal, G., Weissman, I.L. & Butcher, E.C. Genetic control of T-cell subset representation in inbred mice. *Immunogenetics* 18, 585-92 (1983).

Krawczyk, C. et al. Vav1 controls integrin clustering and MHC/peptide-specific cell adhesion to antigen-presenting cells. *Immunity* 16, 331-43 (2002).

Krummel, M.F. & Davis, M.M. Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Curr Opin Immunol* 14, 66-74 (2002).

Kuhn, T.B., Brown, M.D., Wilcox, C.L., Raper, J.A. & Bamberg, J.R. Myelin and collapsin-1 induce motor neuron growth cone collapse through different pathways: inhibition of collapse by opposing mutants of rac1. *J Neurosci* 19, 1965-75 (1999).

Kuhne MR, Lin J, Yablonski D, Mollenauer MN, Ehrlich LI, Huppa J, Davis MM, Weiss A. Linker for activation of T cells, zeta-associated protein-70, and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein-76 are required for TCR-induced microtubule-organizing center polarization. *J Immunol*. 2003 Jul 15;171(2):860-6.

Kuhne, M.R. et al. Linker for activation of T cells, zeta-associated protein-70, and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein-76 are required for TCR-induced microtubule-organizing center polarization. *J Immunol* 171, 860-6 (2003).

Kumanogoh, A. et al. Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity* 13, 621-31 (2000).

Kupfer, A., Swain, S.L. & Singer, S.J. The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. *J Exp Med* 165, 1565-80 (1987).

Kupfer, H., Monks, C.R. & Kupfer, A. Small splenic B cells that bind to antigen-specific T helper (Th) cells and face the site of cytokine production in the Th cells selectively proliferate: immunofluorescence microscopic studies of Th-B antigen-presenting cell interactions. *J Exp Med* 179, 1507-15 (1994).

Kuroda, N., T. Mitani, N. Takeda, N. Ishimaru, R. Arakaki, Y. Hayashi, Y. Bando, K. Izumi, T. Takahashi, T. Nomura, S. Sakaguchi, T. Ueno, Y. Takahama, D. Uchida, S. Sun, F. Kajiura, Y. Mouri, H. Han, A. Matsushima, G. Yamada and M. Matsumoto. "Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice." *J Immunol* 174(4): 1862-70. (2005)

Kusy S, Nasarre P, Chan D, Potiron V, Meyronet D, Gemmill RM, Constantin B, Drabkin HA, Roche J. Selective suppression of in vivo tumorigenicity by semaphorin SEMA3F in lung cancer cells. *Neoplasia*. (2005) May;7(5):457-65.

Labno, C.M. et al. Itk functions to control actin polymerization at the immune synapse through localized activation of Cdc42 and WASP. *Curr Biol* 13, 1619-24 (2003).

Lacal, P.M. et al. Human melanoma cells secrete and respond to placenta growth factor and vascular endothelial growth factor. *J Invest Dermatol* 115, 1000-7 (2000).

Larsen, C.P. et al. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med* 172, 1483-93 (1990).

Lee, S. et al. Collapsin response mediator protein-2 inhibits neuronal phospholipase D(2) activity by direct interaction. *J Biol Chem* 277, 6542-9 (2002).

Ley, S.C. et al. Tyrosine phosphorylation of alpha tubulin in human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 24, 99-106 (1994).

Liston, A., S. Lesage, J. Wilson, L. Peltonen and C. C. Goodnow. "Aire regulates negative selection of organ-specific T cells." *Nat Immunol* 4(4): 350-4. (2003)

Lowin-Kropf, B., Shapiro, V.S. & Weiss, A. Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J Cell Biol* 140, 861-71 (1998).

Luo, L. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* 1, 173-80 (2000).

Luo, Y., Raible, D. & Raper, J.A. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75, 217-27 (1993).

Macatonia, S.E., Edwards, A.J. & Knight, S.C. Dendritic cells and the initiation of contact sensitivity to fluorescein isothiocyanate. *Immunology* 59, 509-14 (1986).

Mackay F, Loetscher H, Stueber D, Gehr G, Lesslauer W. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med.* 1993 May 1;177(5):1277-86.

Maekawa, M. et al. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285, 895-8 (1999).

Maestrini, E. et al. A family of transmembrane proteins with homology to the MET-hepatocyte growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 674-8 (1996).

Maraskovsky, E. et al. Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor-deficient mice but not in mutant rag-1^{-/-} mice. *Cell* 89, 1011-9 (1997).

Mark, M.D., Lohrum, M. & Puschel, A.W. Patterning neuronal connections by chemorepulsion: the semaphorins. *Cell Tissue Res* 290, 299-306 (1997).

Martin-Satue, M. & Blanco, J. Identification of semaphorin E gene expression in metastatic human lung adenocarcinoma cells by mRNA differential display. *J Surg Oncol* 72, 18-23 (1999).

Matsuzaki, Y. et al. Characterization of c-kit positive intrathymic stem cells that are restricted to lymphoid differentiation. *J Exp Med* 178, 1283-92 (1993).

Matthes, D.J., Sink, H., Kolodkin, A.L. & Goodman, C.S. Semaphorin II can function as a selective inhibitor of specific synaptic arborizations. *Cell* 81, 631-9 (1995).

Mellman, I. & Steinman, R.M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106, 255-8 (2001).

Meng, J. & Stephenson, E.C. Oocyte and embryonic cytoskeletal defects caused by mutations in the *Drosophila* swallow gene. *Dev Genes Evol* 212, 239-47 (2002).

Meng, Y. et al. Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron* 35, 121-33 (2002).

Merkenschlager, M. Tracing interactions of thymocytes with individual stromal cell partners. *Eur J Immunol* 26, 892-6 (1996).

Miao, H.Q. & Klagsbrun, M. Neuropilin is a mediator of angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 19, 29-37 (2000).

Miao, H.Q. et al. Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165. *J Cell Biol* 146, 233-42 (1999).

Miao, H.Q., Lee, P., Lin, H., Soker, S. & Klagsbrun, M. Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *Faseb J* 14, 2532-9 (2000).

Migdal, M. et al. Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem* 273, 22272-8 (1998).

Miller, J.F. Analysis of the thymus influence in leukaemogenesis. *Naturwissenschaften* 191, 248-9 (1961).

Miller, M.J., Wei, S.H., Parker, I. & Cahalan, M.D. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* 296, 1869-73 (2002).

Ming, G., Henley, J., Tessier-Lavigne, M., Song, H. & Poo, M. Electrical activity modulates growth cone guidance by diffusible factors. *Neuron* 29, 441-52 (2001).

Ming, G.L. et al. cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* 19, 1225-35 (1997).

Mitsui, N. et al. Involvement of Fes/Fps tyrosine kinase in semaphorin3A signaling. *Embo J* 21, 3274-85 (2002).

Mittelbrunn M, Molina A, Escribese MM, Yanez-Mo M, Escudero E, Ursa A, Tejedor R, Mampaso F, Sanchez-Madrid F. VLA-4 integrin concentrates at the peripheral supramolecular activation complex of the immune synapse and drives T helper 1 responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 27;101(30):11058-63.

Mombaerts, P. et al. Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature* 360, 225-31 (1992).

Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N. & Kupfer, A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-6 (1998).

Monks, C.R., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A. & Kupfer, A. Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. *Nature* 385, 83-6 (1997).

Montes, M., McIlroy, D., Hosmalin, A. & Trautmann, A. Calcium responses elicited in human T cells and dendritic cells by cell-cell interaction and soluble ligands. *Int Immunol* 11, 561-8 (1999).

Moretta, A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol* 2, 957-64 (2002).

Morgan, M.M. et al. Superantigen-induced T cell:B cell conjugation is mediated by LFA-1 and requires signaling through Lck, but not ZAP-70. *J Immunol* 167, 5708-18 (2001).

Mosialos, G. et al. Circulating human dendritic cells differentially express high levels of a 55-kd actin-bundling protein. *Am J Pathol* 148, 593-600 (1996).

Moss, W.C., Irvine, D.J., Davis, M.M. & Krummel, M.F. Quantifying signaling-induced reorientation of T cell receptors during immunological synapse formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15024-9 (2002).

Murray, R., Suda, T., Wrighton, N., Lee, F. & Zlotnik, A. IL-7 is a growth and maintenance factor for mature and immature thymocyte subsets. *Int Immunol* 1, 526-31 (1989).

Nakamura, F., Kalb, R.G. & Strittmatter, S.M. Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance. *J Neurobiol* 44, 219-29 (2000).

Nakayama, E., von Hoegen, I. & Parnes, J.R. Sequence of the Lyb-2 B-cell differentiation antigen defines a gene superfamily of receptors with inverted membrane orientation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1352-6 (1989).

Narazaki M, Tosato G. Ligand-induced internalization selects usage of common receptor Neuropilin-1 by VEGF165 and Semaphorin3A. *Blood*. (2006).

Nasarre, P. et al. Semaphorin SEMA3F and VEGF have opposing effects on cell attachment and spreading. *Neoplasia* 5, 83-92 (2003).

Nasarre P, Kusy S, Constantin B, Castellani V, Drabkin HA, Bagnard D, Roche J. Semaphorin SEMA3F has a repulsing activity on breast cancer cells and inhibits E-cadherin-mediated cell adhesion. *Neoplasia*. (2005) Feb;7(2):180-9.

Neufeld G, Shraga-Heled N, Lange T, Guttmann-Raviv N, Herzog Y, Kessler O. Semaphorins in cancer. *Front Biosci*. (2005) Jan 1;10:751-60.

Nobes, C.D. & Hall, A. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* 23, 456-9 (1995).

Nobes, C.D. & Hall, A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62 (1995).

Norcross, M.A. A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann Immunol (Paris)* 135D, 113-34 (1984).

Norment, A.M. & Bevan, M.J. Role of chemokines in thymocyte development. *Semin Immunol* 12, 445-55 (2000).

Norment, A.M., Bogatzki, L.Y., Gantner, B.N. & Bevan, M.J. Murine CCR9, a chemokine receptor for thymus-expressed chemokine that is up-regulated following pre-TCR signaling. *J Immunol* 164, 639-48 (2000).

Ohashi, P.S. et al. Specific deletion of the J-C delta locus in murine alpha/beta T cell clones and studies using transgenic mice. *Eur J Immunol* 20, 517-22 (1990).

Pasterkamp, R.J. & Kolodkin, A.L. Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity. *Curr Opin Neurobiol* 13, 79-89 (2003).

Pasterkamp, R.J., Peschon, J.J., Spriggs, M.K. & Kolodkin, A.L. Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. *Nature* 424, 398-405 (2003).

Paul, W.E. & Seder, R.A. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76, 241-51 (1994).

Penit, C., Lucas, B. & Vasseur, F. Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4-8-) to immature (CD4+8+) thymocytes in normal and genetically modified mice. *J Immunol* 154, 5103-13 (1995).

Perrot, V., Vazquez-Prado, J. & Gutkind, J.S. Plexin B regulates Rho through the guanine nucleotide exchange factors leukemia-associated Rho GEF (LARG) and PDZ-RhoGEF. *J Biol Chem* 277, 43115-20 (2002).

Peterson, E.J. et al. Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb. *Science* 293, 2263-5 (2001).

Philpott, K.L. et al. Lymphoid development in mice congenitally lacking T cell receptor alpha beta-expressing cells. *Science* 256, 1448-52 (1992).

Pierre, P. & Mellman, I. Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell* 93, 1135-45 (1998).

Pierre, P. et al. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388, 787-92 (1997).

Pierre, P. et al. Localization and intracellular transport of MHC class II molecules in bone marrow-derived dendritic cells. *Adv Exp Med Biol* 417, 179-82 (1997).

Poenie M., Kuhn J. and Combs J. Real-time visualization of the cytoskeleton and effector functions in T cells. *Current Opinion in Immunology* 2004, 16:428-438

Polleux, F., Morrow, T. & Ghosh, A. Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404, 567-73 (2000).

Porter, J.C., Bracke, M., Smith, A., Davies, D. & Hogg, N. Signaling through integrin LFA-1 leads to filamentous actin polymerization and remodeling, resulting in enhanced T cell adhesion. *J Immunol* 168, 6330-5 (2002).

Poulin, J.F. et al. Direct evidence for thymic function in adult humans. *J Exp Med* 190, 479-86 (1999).

Prockop, S. & Petrie, H.T. Cell migration and the anatomic control of thymocyte precursor differentiation. *Semin Immunol* 12, 435-44 (2000).

Quinn, C.C., Gray, G.E. & Hockfield, S. A family of proteins implicated in axon guidance and outgrowth. *J Neurobiol* 41, 158-64 (1999).

Regnault, A. et al. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 189, 371-80 (1999).

Revy, P., Sospedra, M., Barbour, B. & Trautmann, A. Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 2, 925-31 (2001).

Rhee, S. et al. Sustained formation of focal adhesions with paxillin in morphological differentiation of PC12 cells. *Mol Cells* 10, 169-79 (2000).

Richie, L.I. et al. Imaging synapse formation during thymocyte selection: inability of CD3zeta to form a stable central accumulation during negative selection. *Immunity* 16, 595-606 (2002).

Rissoan, M.C. et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283, 1183-6 (1999).

Ritter, M.A. & Palmer, D.B. The human thymic microenvironment: new approaches to functional analysis. *Semin Immunol* 11, 13-21 (1999).

Robey, E. & Fowlkes, B.J. The alpha beta versus gamma delta T-cell lineage choice. *Curr Opin Immunol* 10, 181-7 (1998).

Roche, J. et al. Distinct 3p21.3 deletions in lung cancer and identification of a new human semaphorin. *Oncogene* 12, 1289-97 (1996).

Rodewald, H.R., Kretzschmar, K., Swat, W. & Takeda, S. Intrathymically expressed c-kit ligand (stem cell factor) is a major factor driving expansion of very immature thymocytes *in vivo*. *Immunity* 3, 313-9 (1995).

Rodewald, H.R., Ogawa, M., Haller, C., Waskow, C. & DiSanto, J.P. Pro-thymocyte expansion by c-kit and the common cytokine receptor gamma chain is essential for repertoire formation. *Immunity* 6, 265-72 (1997).

Rohm, B., Ottemeyer, A., Lohrum, M. & Puschel, A.W. Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mech Dev* 93, 95-104 (2000).

Rohm, B., Rahim, B., Kleiber, B., Hovatta, I. & Puschel, A.W. The semaphorin 3A receptor may directly regulate the activity of small GTPases. *FEBS Lett* 486, 68-72 (2000).

Roumier, A. et al. The membrane-microfilament linker ezrin is involved in the formation of the immunological synapse and in T cell activation. *Immunity* 15, 715-28 (2001).

Sahay, A., Molliver, M.E., Ginty, D.D. & Kolodkin, A.L. Semaphorin 3F is critical for development of limbic system circuitry and is required in neurons for selective CNS axon guidance events. *J Neurosci* 23, 6671-80 (2003).

Salazar-Fontana, L.I., Barr, V., Samelson, L.E. & Bierer, B.E. CD28 engagement promotes actin polymerization through the activation of the small Rho GTPase Cdc42 in human T cells. *J Immunol* 171, 2225-32 (2003).

Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-18 (1994).

Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999 Oct 14;401(6754):708-12.

Sasaki, Y. et al. Fyn and Cdk5 mediate semaphorin-3A signaling, which is involved in regulation of dendrite orientation in cerebral cortex. *Neuron* 35, 907-20 (2002).

Schuch, G. et al. *In vivo* administration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its antagonist, soluble neuropilin-1, predicts a role of VEGF in the progression of acute myeloid leukemia in vivo. *Blood* 100, 4622-8 (2002).

Scollay, R. & Godfrey, D.I. Thymic emigration: conveyor belts or lucky dips? *Immunol Today* 16, 268-73; discussion 273-4 (1995).

Sedwick, C.E. et al. TCR, LFA-1, and CD28 play unique and complementary roles in signaling T cell cytoskeletal reorganization. *J Immunol* 162, 1367-75 (1999).

Sekido, Y. et al. Cloning of a breast cancer homozygous deletion junction narrows the region of search for a 3p21.3 tumor suppressor gene. *Oncogene* 16, 3151-7 (1998).

Sekido, Y. et al. Human semaphorins A(V) and IV reside in the 3p21.3 small cell lung cancer deletion region and demonstrate distinct expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4120-5 (1996).

Serini G, Valdembrì D, Zanivan S, Morterra G, Burkhardt C, Caccavari F, Zammataro L, Primo L, Tamagnone L, Logan M, Tessier-Lavigne M, Taniguchi M, Puschel AW, Bussolino F. Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. *Nature*. 2003 Jul 24;424(6947):391-7.

Shi, W. et al. The class IV semaphorin CD100 plays nonredundant roles in the immune system: defective B and T cell activation in CD100-deficient mice. *Immunity* 13, 633-42 (2000).

Shibuya, M. et al. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (*flt*) closely related to the *fms* family. *Oncogene* 5, 519-24 (1990).

Shirvan A, Ziv I, Fleminger G, Shina R, He Z, Brudo I, Melamed E, Barzilai A. Semaphorins as mediators of neuronal apoptosis. *J Neurochem.* 1999 Sep;73(3):961-71.

Shortman, K. & Liu, Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2, 151-61 (2002).

Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G.J. & Scollay, R. The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol* 2, 3-12 (1990).

Siebold C, Berrow N, Walter TS, Harlos K, Owens RJ, Stuart DI, Terman JR, Kolodkin AL, Pasterkamp RJ, Jones EY. High-resolution structure of the catalytic region of MICAL (molecule interacting with CasL), a multidomain flavoenzyme-signaling molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 15;102(46):16836-41.

Siegal, F.P. et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-7 (1999).

Siemeister, G. et al. An antagonistic vascular endothelial growth factor (VEGF) variant inhibits VEGF-stimulated receptor autophosphorylation and proliferation of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4625-9 (1998).

Siemeister, G., Martiny-Baron, G. & Marme, D. The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities. *Cancer Metastasis Rev* 17, 241-8 (1998).

Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G. & Klagsbrun, M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735-45 (1998).

Song, H. & Poo, M. The cell biology of neuronal navigation. *Nat Cell Biol* 3, E81-8 (2001).

Song, H. et al. Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science* 281, 1515-8 (1998).

Song, H.J., Ming, G.L. & Poo, M.M. cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* 388, 275-9 (1997).

Song, Z., Sidorowicz, H.E. & Sladek, C.D. cAMP stimulation of vasopressin and oxytocin release and regulation of vasopressin mRNA stability: role of auto-facilitation. *J Neuroendocrinol* 13, 158-65 (2001).

Spassky, N. et al. Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1. *J Neurosci* 22, 5992-6004 (2002).

Sprent J, Kosaka H. T cell tolerance and self/nonself discrimination. *Autoimmunity*. 1993;15(2):155-61.

Sprent J, Tough DF. T cell death and memory. *Science*. 2001 Jul 13;293(5528):245-8. Review.

Stahl PD, Ezekowitz RA. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol*. 1998 Feb;10(1):50-5. Review.

Stamler, J.S. & Meissner, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev* 81, 209-237 (2001).

Stamler, J.S., Lamas, S. & Fang, F.C. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106, 675-83 (2001).

Steinman, R.M. & Cohn, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-62 (1973).

Steinman, R.M. & Cohn, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med* 139, 380-97 (1974).

Steinman, R.M. & Nussenzweig, M.C. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 351-8 (2002).

Steinman, R.M. & Witmer, M.D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 5132-6 (1978).

Steinman, R.M. Dendritic cells. *Transplantation* 31, 151-5 (1981).

Steinman, R.M., Adams, J.C. & Cohn, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med* 141, 804-20 (1975).

Steinman, R.M., Kaplan, G., Witmer, M.D. & Cohn, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med* 149, 1-16 (1979).

Steinman, R.M., Lustig, D.S. & Cohn, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J Exp Med* 139, 1431-45 (1974).

Steinman, R.M., Turley, S., Mellman, I. & Inaba, K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 191, 411-6 (2000).

Stinchcombe, J.C., Bossi, G., Booth, S. & Griffiths, G.M. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15, 751-61 (2001).

Stowers, L., Yelon, D., Berg, L.J. & Chant, J. Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5027-31 (1995).

Subbarao, B. & Melchers, F. The action of an Lyb2.1-specific monoclonal antibody in soluble or immobilized form on resting and activated B cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 113, 72-6 (1984).

Sun, Z. et al. PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 404, 402-7 (2000).

Suzuki, T. et al. MICAL, a novel CasL interacting molecule, associates with vimentin. *J Biol Chem* 277, 14933-41 (2002).

Swiercz, J.M., Kuner, R., Behrens, J. & Offermanns, S. Plexin-B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology. *Neuron* 35, 51-63 (2002).

Symons, M. & Settleman, J. Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends Cell Biol* 10, 415-9 (2000).

Takagi, J. & Springer, T.A. Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol Rev* 186, 141-63 (2002).

Takagi, S. et al. The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors. *Neuron* 7, 295-307 (1991).

Takahashi, T. et al. Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 99, 59-69 (1999).

Takahashi, T., Nakamura, F., Jin, Z., Kalb, R.G. & Strittmatter, S.M. Semaphorins A and E act as antagonists of neuropilin-1 and agonists of neuropilin-2 receptors. *Nat Neurosci* 1, 487-93 (1998).

Tamagnone, L. et al. Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99, 71-80 (1999).

Terman, J.R., Mao, T., Pasterkamp, R.J., Yu, H.H. & Kolodkin, A.L. MICALs, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion. *Cell* 109, 887-900 (2002).

Thannickal, V.J. & Fanburg, B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L1005-28 (2000).

Tian, X. et al. Vascular endothelial growth factor: acting as an autocrine growth factor for human gastric adenocarcinoma cell MGC803. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 505-12 (2001).

Trautmann, A., Revy, P., Donnadieu, E. & Bismuth, G. [Immunological synapses and neuronal synapses]. *Med Sci (Paris)* 19, 429-36 (2003).

Trombetta, E.S., Ebersold, M., Garrett, W., Pypaert, M. & Mellman, I. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 299, 1400-3 (2003).

Tse, C., Xiang, R.H., Bracht, T. & Naylor, S.L. Human Semaphorin 3B (SEMA3B) located at chromosome 3p21.3 suppresses tumor formation in an adenocarcinoma cell line. *Cancer Res* 62, 542-6 (2002).

Tskvitaria-Fuller, I., Rozelle, A.L., Yin, H.L. & Wulfig, C. Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization. *J Immunol* 171, 2287-95 (2003).

Turley, S.J. et al. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* 288, 522-7 (2000).

Tutt Landolfi, M.M., Scollay, R. & Parnes, J.R. Specific demethylation of the CD4 gene during CD4 T lymphocyte differentiation. *Mol Immunol* 34, 53-61 (1997).

Tuttle, R. & O'Leary, D.D. Neurotrophins rapidly modulate growth cone response to the axon guidance molecule, collapsin-1. *Mol Cell Neurosci* 11, 1-8 (1998).

Uematsu, Y. et al. In transgenic mice the introduced functional T cell receptor beta gene prevents expression of endogenous beta genes. *Cell* 52, 831-41 (1988).

Ueno, T. et al. Role for CCR7 ligands in the emigration of newly generated T lymphocytes from the neonatal thymus. *Immunity* 16, 205-18 (2002).

Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. Semaphorin Nomenclature Committee. *Cell* 97, 551-2 (1999).

Van der Merwe, P.A. Modeling costimulation. *Nat Immunol* 1, 194-5 (2000).

van Ewijk, W. T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu Rev Immunol* 9, 591-615 (1991).

Van Vliet, E., Jenkinson, E.J., Kingston, R., Owen, J.J. & Van Ewijk, W. Stromal cell types in the developing thymus of the normal and *nude* mouse embryo. *Eur J Immunol* 15, 675-81 (1985).

Vandenabeele, S., Hochrein, H., Mavaddat, N., Winkel, K. & Shortman, K. Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations. *Blood* 97, 1733-41 (2001).

Venkataraman, C. et al. CD72-mediated B cell activation involves recruitment of CD19 and activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Eur J Immunol* 28, 3003-16 (1998).

Venkataraman, C., Muthusamy, N., Muthukkumar, S. & Bondada, S. Activation of lyn, blk, and btk but not syk in CD72-stimulated B lymphocytes. *J Immunol* 160, 3322-9 (1998).

Vicari, A.P. et al. TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity* 7, 291-301 (1997).

Vikis, H.G., Li, W. & Guan, K.L. The plexin-B1/Rac interaction inhibits PAK activation and enhances Sema4D ligand binding. *Genes Dev* 16, 836-45 (2002).

Vikis, H.G., Li, W., He, Z. & Guan, K.L. The semaphorin receptor plexin-B1 specifically interacts with active Rac in a ligand-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12457-62 (2000).

Villa, I. et al. Capacity of mouse mast cells to prime T cells and to induce specific antibody responses *in vivo*. *Immunology* 102, 165-72 (2001).

von Freeden-Jeffry, U., Solvason, N., Howard, M. & Murray, R. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* 7, 147-54 (1997).

Von Hoegen, I., Nakayama, E. & Parnes, J.R. Identification of a human protein homologous to the mouse Lyb-2 B cell differentiation antigen and sequence of the corresponding cDNA. *J Immunol* 144, 4870-7 (1990).

Walzer T, Galibert L, De Smedt T. Poxvirus semaphorin A39R inhibits phagocytosis by dendritic cells and neutrophils. *Eur J Immunol.* (2005) Feb;35(2):391-8.

Walzer T, Galibert L, Comeau MR, De Smedt T. Plexin C1 engagement on mouse dendritic cells by viral semaphorin A39R induces actin cytoskeleton rearrangement and inhibits integrin-mediated adhesion and chemokine-induced migration. *J Immunol.* (2005) Jan 1;174(1):51-9.

Wang, L.H. & Strittmatter, S.M. A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous system. *J Neurosci* 16, 6197-207 (1996).

Wang, L.H. & Strittmatter, S.M. Brain CRMP forms heterotetramers similar to liver dihydropyrimidinase. *J Neurochem* 69, 2261-9 (1997).

Wang, L.H., Kalb, R.G. & Strittmatter, S.M. A PDZ protein regulates the distribution of the transmembrane semaphorin, M-SemF. *J Biol Chem* 274, 14137-46 (1999).

Werlen, G., Hausmann, B. & Palmer, E. A motif in the alphabeta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature* 406, 422-6 (2000).

Wey JS, Gray MJ, Fan F, Belcheva A, McCarty MF, Stoeltzing O, Somcio R, Liu W, Evans DB, Klagsbrun M, Gallick GE, Ellis LM. Overexpression of neuropilin-1 promotes constitutive MAPK signalling and chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Br J Cancer*. 2005 Jul 25;93(2):233-41.

Winberg, M.L. et al. Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* 95, 903-16 (1998).

Wong, J., Straus, D. & Chan, A.C. Genetic evidence of a role for Lck in T-cell receptor function independent or downstream of ZAP-70/Syk protein tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 18, 2855-66 (1998).

Wu, L., Antica, M., Johnson, G.R., Scollay, R. & Shortman, K. Developmental potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus. *J Exp Med* 174, 1617-27 (1991).

Wu, L., Li, C.L. & Shortman, K. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J Exp Med* 184, 903-11 (1996).

Wulfing, C., Bauch, A., Crabtree, G.R. & Davis, M.M. The vav exchange factor is an essential regulator in actin-dependent receptor translocation to the lymphocyte-antigen-presenting cell interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10150-5 (2000).

Wurbel, M.A. et al. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur J Immunol* 30, 262-71 (2000).

Xiang, R. et al. Semaphorin 3F gene from human 3p21.3 suppresses tumor formation in *nude* mice. *Cancer Res* 62, 2637-43 (2002).

Yakura, H., Kawabata, I., Ashida, T., Shen, F.W. & Katagiri, M. A role for Lyb-2 in B cell activation mediated by a B cell stimulatory factor. *J Immunol* 137, 1475-81 (1986).

Youn, B.S., Kim, C.H., Smith, F.O. & Broxmeyer, H.E. TECK, an efficacious chemoattractant for human thymocytes, uses GPR-9-6/CCR9 as a specific receptor. *Blood* 94, 2533-6 (1999).

Zanata, S.M., Hovatta, I., Rohm, B. & Puschel, A.W. Antagonistic effects of Rnd1 and RhoD GTPases regulate receptor activity in Semaphorin 3A-induced cytoskeletal collapse. *J Neurosci* 22, 471-7 (2002).

Zheng, Y. Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem Sci* 26, 724-32 (2001).

Zhou, F.Q., Waterman-Storer, C.M. & Cohan, C.S. Focal loss of actin bundles causes microtubule redistribution and growth cone turning. *J Cell Biol* 157, 839-49 (2002).

Zhou, L.J. & Tedder, T.F. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 154, 3821-35 (1995).

Zlotnik, A. & Yoshie, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-7 (2000).