



HAL
open science

**EXPRESSION DE LA NEUROPILINE-1 DANS LES
LYMPHOCYTES T CONVENTIONNELS ET “
INVARIANT NATURAL KILLER T ” (iNKT)
MURINS**

Pierre Milpied

► **To cite this version:**

Pierre Milpied. EXPRESSION DE LA NEUROPILINE-1 DANS LES LYMPHOCYTES T CONVENTIONNELS ET “ INVARIANT NATURAL KILLER T ” (iNKT) MURINS. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris XI, 2010. Français. NNT: . tel-00547066

HAL Id: tel-00547066

<https://theses.hal.science/tel-00547066v1>

Submitted on 15 Dec 2010

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.

À Alice et Paola,

L'investigation, tantôt simple, tantôt armée et perfectionnée, est donc destinée à nous faire découvrir et constater les phénomènes plus ou moins cachés qui nous entourent.

Claude Bernard *in* Introduction à l'étude de la médecine expérimentale (1865)

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à Paola, qui m'a aimé, soutenu, réconforté, aidé et motivé pendant ces dernières années. Je ne serai probablement pas allé bien loin dans cette thèse sans ton soutien inconditionnel et tes encouragements quotidiens. Tu as contribué à faire de cette période de notre vie un véritable moment de bonheur, qui culmine aujourd'hui avec la naissance de notre petite Alice.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement mes parents, frères et amis, qui m'ont soutenu dès le premier jour de ma thèse et continuent de m'encourager dans cette voie qui ne paraissait pas évidente au départ. Votre soutien moral et scientifique m'a beaucoup aidé ces dernières années et continue de me motiver.

Je remercie Olivier Hermine de m'avoir guidé dans le monde de la recherche dès mes premiers pas dans cet univers inconnu. Plus qu'un directeur de thèse, tu as été pour moi un mentor humain, professionnel et scientifique sans faille. Merci de m'avoir laissé autant de liberté dans la conduite de ma thèse et de m'avoir donné les moyens d'être heureux dans mon travail. Je sais que je n'ai pas été à la hauteur en tant que judoka, j'espère au moins l'avoir été en tant que thésard. Tu m'as donné envie de poursuivre le chemin de la recherche fondamentale en immunologie ; j'espère mettre à profit tous tes enseignements dans une longue carrière.

Je remercie Marie-Thérèse Rubio de m'avoir soutenu, corrigé, relu, conseillé pendant ces quatre dernières années. Merci à toi aussi de m'avoir laissé autant de liberté dans les choix des pistes scientifiques que j'ai poursuivies. Merci aussi de m'avoir donné l'opportunité de m'intéresser à des problématiques plus proches de la recherche clinique.

Je remercie Michel Dy de m'avoir accueilli dans son unité et de m'avoir soutenu et recommandé dans mes demandes de financements.

Je remercie Maria Leite-de-Moraes de m'avoir guidé dans l'étude des lymphocytes iNKT, de l'IL-17, de l'asthme allergique. Merci aussi de m'avoir soutenu et aidé dans l'écriture des manuscrits, et dans mes demandes de bourses de post-doc.

Je remercie André Herbelin de m'avoir lui aussi fait partager, toujours dans la bonne humeur, son expérience et son savoir sur les lymphocytes iNKT. Merci de tous tes conseils professionnels et personnels, de ton soutien amical, et de ta vision avisée du monde de la recherche.

Je remercie Jean Kanellopoulos d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

Je remercie Marc Bonneville d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.

Je remercie Sebastian Amigorena d'avoir accepté de participer au jury de ma thèse.

Je remercie Agnès Lehuen d'avoir accepté d'être rapportrice de ma thèse. Je vous suis aussi très reconnaissant de m'avoir aidé et recommandé dans mon travail sur les lymphocytes iNKT exprimant Nrp-1.

Je remercie Philippe Bousso d'avoir accepté de participer au jury de ma thèse. Je te remercie aussi de m'avoir soutenu et beaucoup conseillé dans mon travail sur les lymphocytes T. Merci de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer des manip d'imagerie dynamique dans ton laboratoire. J'espère que nous finirons par trouver le procédé expérimental pour mettre en évidence un rôle de Nrp-1 dans la dynamique des réponses immunes. Je remercie toutes les personnes de ton laboratoire pour leur accueil, et en particulier mon camarade Jacques Deguine pour son expertise précieuse dans la préparation et le déroulement de nos expériences.

Je remercie tous mes amis du groupe OH Daniella, Julie, Séverine, Céline, Anne, Amédée, Sébastien et Michaël pour leur bonne humeur, les pauses cafés, les réunions « informelles », les fêtes de Noël, etc... Vous avez tous contribué à faire de mon passage dans ce groupe un moment très agréable. Merci aussi pour vos compétences techniques et scientifiques qui m'ont beaucoup aidé à avancer. J'en profite aussi pour remercier les « équipes techniques » du Cristal puis du Bréguet pour leur soutien mousseux et amer.

Je remercie aussi chaleureusement toutes les personnes de l'unité qui m'ont aidé et soutenu durant ces quatre années passées parmi vous : Séverine, Lucia, Lucie, Bérangère, Christophe, Emilie, Rachel, Aurélie, Elvire, Jean-Benoît, François, Pascaline, Ruddy, Maud, Marie, Mélanie, Linh, Marie-Laure, Moisés, Alexandre, Flora, Odile, Elisa, Francine, Anne-Sophie, Esther, Sarah, Pascal, Geneviève, Catherine, Fabienne, Mireille et les autres. Merci à tous pour votre accueil et pour avoir contribué à une vie de labo très agréable durant ces longues années.

Je remercie aussi mes voisins de l'unité INSERM U1013 (ex U580), en particulier Sylvaine You et Jean Davoust. Merci pour vos précieux conseils scientifiques, professionnels et personnels.

Enfin, je souhaite remercier Christian Auclair et Gérard Peyroche, ainsi que tous les personnels enseignants et administratifs du Département Biochimie et Génie Biologique de l'ENS de Cachan. L'expérience du monitorat dans cet environnement exceptionnel m'a été très bénéfique et m'a apporté le recul et le questionnement appropriés tout au long de ma thèse. Merci aussi aux élèves motivés et motivants que j'ai eu la chance d'avoir en TP et en TD.

Résumé

La neuropiline-1 (Nrp-1) est une protéine transmembranaire agissant comme récepteur des sémaphorines de classe 3 (Sema3) et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). En plus de son rôle crucial dans le développement des systèmes nerveux et cardiovasculaires, Nrp-1 est impliquée dans des processus physiopathologiques impliquant certains de ses ligands classiques (Sema3 et VEGF) ou récemment caractérisés (TGF- β 1 et PDGF) dans les tissus adultes. Dans le système immunitaire, Nrp-1 participe aux interactions entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques, transmet les effets immunorégulateurs de Sema3A sur les lymphocytes T, et est impliqué dans le mécanisme suppresseur des lymphocytes T régulateurs (Treg) Foxp3⁺. Cependant, l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T non-Treg humains et murins n'a été que peu étudiée.

L'objectif de ce projet était de caractériser les populations de lymphocytes T Nrp-1⁺ non-Treg chez la souris, d'analyser leurs fonctions, d'identifier les mécanismes conduisant à l'expression de Nrp-1 dans ces cellules, et de comprendre le rôle joué par Nrp-1 dans les réponses immunitaires T.

Mon travail s'est d'une part intéressé à une population de lymphocytes T non-conventionnels appelés lymphocytes « invariant natural killer T » (iNKT). Les lymphocytes iNKT sont des lymphocytes T $\alpha\beta$ dérivés du thymus aux propriétés immunomodulatrices reposant sur la sécrétion rapide de cytokines T_H1 et T_H2 après engagement de leur TCR semi-invariant par des complexes CD1d/glycolipide. Un sous-type distinct de cellules iNKT, dont l'origine et l'homéostasie sont encore mal connues, produit la cytokine pro-inflammatoire IL-17. Dans ce travail, j'ai montré que les lymphocytes iNKT émigrés thymiques récents sont identifiés spécifiquement par l'expression de Nrp-1. Les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 expriment Nrp-1 et dépendent de l'export thymique.

D'autre part, Nrp-1 est exprimé par les thymocytes immatures en division et certains lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels mémoires en prolifération homéostatique rapide. *In vitro*, l'activation des lymphocytes T par le TCR induit l'expression de Nrp-1 de manière dépendante de la voie de signalisation Ca²⁺/calcineurine/NFAT. L'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T activés les sensibilise aux effets régulateurs de Sema3A et TGF- β 1.

En conclusion, ces résultats apportent de nouvelles données concernant l'expression et la fonction de Nrp-1 dans le système immunitaire. Plus généralement, cette étude permet d'envisager des stratégies thérapeutiques ciblant les processus dépendants de Nrp-1 dans les pathologies du système immunitaire et du système nerveux ou les cancers.

Mots-clés : neuropiline – lymphocyte iNKT – export thymique – IL-17 – lymphocyte T – TCR – immunorégulation.

Abstract “Neuropilin-1 expression in murine conventional T and invariant natural killer T (iNKT) cells”

Neuropilin-1 (Nrp-1) is a one way transmembrane protein originally identified as a receptor for both axonal guidance cues (class 3 semaphorins, Sema3) and angiogenic factors (vascular endothelial growth factor, VEGF). In addition to its role in the development of the nervous and cardiovascular systems, Nrp-1 has been attributed critical functions in numerous adult physiological and pathological processes following the binding of old (Sema3 and VEGF) and new (TGF- β and PDGF) ligands. In the immune system, Nrp-1 participates in the immune synapse between T cells and dendritic cells, acts as a coreceptor for the immunoregulatory Sema3A on T cells, and is involved in the suppressive functions of murine Foxp3⁺ regulatory T (Treg) cells. However, little is known about Nrp-1 expression in human and murine non-Treg T cells.

The aim of this project was to characterize non-Treg Nrp-1⁺ T cell populations in mice, analyze their functions, identify the mechanisms leading to Nrp-1 expression in these cells, and understand the role of Nrp-1 in T cell responses.

On the one hand, I have studied a population of unconventional innate-like T cells named invariant natural killer T (iNKT) cells. iNKT cells are thymus-derived CD1d-reactive $\alpha\beta$ T cells with potent immunomodulatory properties based on their quick release of both T_H1 and T_H2 cytokines after TCR triggering. A distinct subset of iNKT cells, whose origin and homeostasis are still poorly understood, produces the pro-inflammatory cytokine IL-17. In the present study, I have found that IL-17-producing iNKT cells are part of the recent thymic emigrant iNKT cell pool, which can be unequivocally identified as Nrp-1⁺ iNKT cells in peripheral lymphoid organs of naive mice.

On the other hand, I have analyzed Nrp-1 expression in conventional non-Treg $\alpha\beta$ T cells. In naive mice, Nrp-1 is expressed on proliferating immature thymocytes and memory phenotype mature T cells with an increased homeostatic proliferation rate. *In vitro* experiments have shown that Nrp-1 expression is induced in T cells by TCR activation in a Ca²⁺/calcineurin/NFAT signaling pathway-dependent manner. Nrp-1 expression in activated T cells sensitizes them to the regulatory effects of its ligands Sema3A and TGF- β 1.

In conclusion, the results presented here provide original data on Nrp-1 expression and function in the immune system. More generally, this study paves the way for further basic and translational research on Nrp-1-mediated processes in immune-related diseases, cancer, and neurological disorders.

Key words: neuropilin – iNKT cell – thymic export – IL-17 – T cell – TCR – immune regulation.

Table des matières

Résumé	8
Abstract	9
Table des matières	11
Liste des figures	15
Liste des tableaux	19
Liste des abréviations	21
1. Introduction	23
1.1. Développement, activation et homéostasie des lymphocytes $T\alpha\beta$ conventionnels	23
1.1.1. <i>Développement thymique des lymphocytes $T\alpha\beta$ conventionnels</i>	23
1.1.2. <i>Activation des lymphocytes $T\alpha\beta$ conventionnels</i>	26
1.1.3. <i>Mécanismes de régulation des lymphocytes $T\alpha\beta$ activés</i>	29
1.1.4. <i>Homéostasie des lymphocytes $T\alpha\beta$ conventionnels</i>	31
1.2. Les lymphocytes « invariant natural killer T » (iNKT)	33
1.2.1. <i>Nomenclature, définitions</i>	33
1.2.2. <i>Développement thymique et maturation des lymphocytes iNKT</i>	36
1.2.3. <i>Activation des lymphocytes iNKT</i>	39
1.2.4. <i>Diversité fonctionnelle des lymphocytes iNKT</i>	42
1.2.5. <i>Rôle des lymphocytes iNKT en physiopathologie</i>	43
1.2.6. <i>Lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17</i>	45
1.3. La neuropiline-1 et ses ligands	47
1.3.1. <i>Neuropiline-1 : gène, protéine, isoformes, homologue</i>	47
1.3.2. <i>Ligands principaux de Nrp-1 : Sema3A et VEGF₁₆₅</i>	48
1.3.3. <i>Fonctions dépendantes de Nrp-1 dans le développement embryonnaire</i>	53
1.3.4. <i>Fonctions dépendantes de Nrp-1 dans les tissus adultes</i>	57

1.3.5. Nouveaux ligands de Nrp-1.....	58
1.4. La neuropiline-1 et ses ligands dans le système immunitaire.....	61
1.4.1. Expression de Nrp-1 dans les organes lymphoïdes primaires.....	62
1.4.2. Nrp-1 : un marqueur des lymphocytes Treg murins.....	63
1.4.3. Nrp-1 et ses ligands dans les lymphocytes T et les cellules dendritiques.....	64
2. Problématique	67
3. Matériels et méthodes.....	69
3.1. Expérimentations animales.....	69
3.1.1. Souris	69
3.1.2. Préparation de suspensions cellulaires, enrichissement et tri de populations cellulaires.....	69
3.1.3. Injection intra-thymique de FITC	71
3.1.4. Thymectomie	71
3.1.5. Activation des lymphocytes iNKT in vivo	72
3.1.6. Incorporation de BrdU.....	72
3.2. Culture cellulaire.....	73
3.2.1. Milieu de culture, drogues, protéines recombinantes.....	73
3.2.2. Activation des lymphocytes iNKT in vitro.....	73
3.2.3. Activation des lymphocytes T conventionnels	74
3.3. Analyses et tri cellulaire par cytométrie de flux	75
3.3.1. Anticorps utilisés, tétramère.....	75
3.3.2. Marquage de surface	75
3.3.3. Marquage intracellulaire des cytokines.....	76
3.3.4. Marquage intranucléaire	76
3.3.5. Tri, acquisition, analyse.....	76
3.4. Analyse de la prolifération	78
3.4.1. Incorporation de [³ H]-thymidine.....	78

3.4.2. Dilution du CFSE	78
3.5. Analyse de la sécrétion d'IFN-γ et d'IL-4 par les lymphocytes iNKT	79
3.6. Analyse par western blot.....	80
3.7. Analyses statistiques	81
4. Résultats	83
4.1. Origine et fonctions des lymphocytes iNKT exprimant la neuropiline-1	83
4.1.1. Caractérisation d'une sous-population de lymphocytes iNKT exprimant Nrp-1.....	83
4.1.2. L'activation des lymphocytes iNKT par le TCR induit l'expression de Nrp-1.....	87
4.1.3. Les lymphocytes iNKT Nrp-1 ⁺ périphériques correspondent aux émigrés thymiques récents (ETR)	89
4.1.4. Etude fonctionnelle comparée des lymphocytes iNKT Nrp-1 ⁺ et iNKT Nrp-1 ⁻	95
4.1.5. Les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 dans les organes lymphoïdes expriment Nrp-1 et sont maintenus par l'export thymique	99
4.1.6. Modèle de l'expression de Nrp-1 au cours du développement et de l'homéostasie des lymphocytes iNKT	102
4.2. La neuropiline-1 est exprimée par les lymphocytes T conventionnels activés et est impliquée dans différents mécanismes de régulation	103
4.2.1. Expression de Nrp-1 dans les précurseurs thymiques et les lymphocytes T conventionnels matures.....	103
4.2.2. Nrp-1 est un marqueur d'activation des lymphocytes T conventionnels.....	107
4.2.3. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T activés.....	110
4.2.4. Nrp-1 intègre différents signaux régulateurs autocrines et paracrines dans les lymphocytes T activés.....	115
4.2.5. Conclusion : modèles moléculaire et fonctionnel de l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T activés.....	118
5. Discussion et perspectives	121
5.1. Caractérisation et maturation des lymphocytes iNKT ETR.....	121
5.2. Fonctionnalité des lymphocytes iNKT ETR	125

5.3. Régulation homéostatique des lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17	129
5.4. Rôle de Nrp-1 dans le développement et la fonction des lymphocytes iNKT ...	132
5.5. Mécanismes de régulation positive et négative de l'expression de Nrp-1.....	135
5.6. Nrp-1 : une plateforme intégrative de mécanismes régulateurs.....	139
5.7. Expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T humains	142
5.8. Perspectives de recherche et applications proposées	143
Bibliographie	147
Annexes	165
Annexe 1 : “Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3⁺ Treg”	166
Annexe 2 : “Neuropilins, semaphorins, and their roles in thymocyte development” 	174
Annexe 3 : “IL-17-producing invariant NKT cells in lymphoid organs are recent thymic emigrants identified by neuropilin-1 expression”	184

Liste des figures

Figure 1. Schémas de la différenciation thymique des lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels

Figure 2. Méthode d'analyse des lymphocytes iNKT par cytométrie de flux

Figure 3. Structure de l'alpha-galactosylceramide (α -GalCer)

Figure 4. Schéma du développement thymique des lymphocytes iNKT murins

Figure 5. Modes d'activation direct et indirect des lymphocytes iNKT

Figure 6. Schéma des différents domaines structuraux et fonctionnels de la protéine Nrp-1

Figure 7. Complexe récepteur de Sema3A : holorécepteur Sema3A/Nrp-1/PlexinA

Figure 8. Complexe VEGF₁₆₅/Nrp-1/VEGFR2 et signalisation

Figure 9. Effets dépendants du couple Sema3A/Nrp-1 dans le développement du système nerveux

Figure 10. Défaut de l'angiogénèse dans les membres antérieurs des embryons de souris *NRP1*^{-/-}

Figure 11. Principaux rôles décrits de Nrp-1 dans les réponses immunitaires impliquant les lymphocytes T

Figure 12. Expression de Nrp-1 par une sous-population de lymphocytes iNKT

Figure 13. Répartition des lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ dans les principaux organes lymphoïdes

Figure 14. Les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ ont un phénotype immature

Figure 15. Expression de Nrp-1 par une sous-population de lymphocytes iNKT au phénotype immature dans les souches de souris Balb/c et NOD

Figure 16. Une grande part des lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ spléniques est en prolifération *in vivo*

Figure 17. Les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ prolifèrent plus que les lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ après activation *in vitro*

Figure 18. Expression différentielle de Nrp-1 par les lymphocytes iNKT activés après expansion par les cytokines homéostatiques IL-7 et IL-15 ou le ligand α -GalCer

Figure 19. L'activation des lymphocytes iNKT par le TCR induit l'expression de Nrp-1

Figure 20. L'activation *in vivo* des lymphocytes iNKT par le ligand α -GalCer induit l'expression massive et durable de Nrp-1

Figure 21. Nrp-1 est exprimé par les lymphocytes iNKT thymiques aux stades immatures

Figure 22. Les lymphocytes iNKT émigrés thymiques récents (ETR) expriment Nrp-1

Figure 23. Hormis les lymphocytes Treg CD4⁺ CD25⁺, les lymphocytes T conventionnels ETR n'expriment pas Nrp-1

Figure 24. Effet d'une thymectomie à l'âge adulte sur les lymphocytes T conventionnels

Figure 25. La thymectomie à l'âge adulte induit la diminution spécifique du nombre de lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ dans les organes lymphoïdes périphériques

Figure 26. Sécrétion des cytokines IFN- γ et IL-4 par les lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ et Nrp-1⁺ spléniques activés par α -GalCer *in vitro*

Figure 27. Profil de production simultanée des cytokines IFN- γ , IL-4 et IL-13 par les lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ et Nrp-1⁺ spléniques activés par α -GalCer *in vivo*

Figure 28. Activation rapide des lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ et Nrp-1⁺ spléniques après injection d' α -GalCer

Figure 29. Les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 après stimulation non-spécifique *in vitro* expriment Nrp-1

Figure 30. Les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 après injection d' α -GalCer *in vivo* expriment Nrp-1

Figure 31. La thymectomie de souris à l'âge adulte induit la diminution massive du nombre de lymphocytes iNKT capables de produire l'IL-17 dans les organes lymphoïdes

Figure 32. Schéma récapitulatif de l'évolution du phénotype et du profil de production de cytokines des lymphocytes iNKT, des premières étapes du développement thymique à leur résidence dans les tissus et les organes lymphoïdes périphériques

Figure 33. Expression de Nrp-1 au cours du développement thymique

Figure 34. Nrp-1 est exprimé fortement sur les thymocytes en prolifération *in vivo*

Figure 35. Expression de Nrp-1 sur les lymphocytes T matures en périphérie

Figure 36. Expression de Nrp-1 et du marqueur de prolifération Ki67 sur les lymphocytes T matures en périphérie

Figure 37. L'activation des lymphocytes T induit l'expression de Nrp-1 indépendamment de Foxp3

Figure 38. L'induction de Nrp-1 sur les lymphocytes T activés est modulée par l'intensité de la stimulation du TCR et la présence de co-stimulation

Figure 39. L'induction de Nrp-1 sur les lymphocytes T activés dépend de la quantité d'antigène présentée et est modulée par la présence d'IL-2

Figure 40. Modèle expérimental pour l'étude mécanistique de l'induction de Nrp-1 après activation des lymphocytes T par le TCR

Figure 41. La voie de signalisation Ca^{2+} /calcineurine/NFAT est requise pour l'induction de Nrp-1 après activation des lymphocytes T par le TCR

Figure 42. L'influx intracellulaire massif de Ca^{2+} est suffisant pour induire Nrp-1 sur les lymphocytes T

Figure 43. L'activation de la kinase p38 est peu impliquée dans l'induction de Nrp-1 sur les lymphocytes T activés par le TCR

Figure 44. Effets antagonistes de la ciclosporine A et du lithium sur l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T $CD8^+$ activés par le TCR

Figure 45. L'induction de Nrp-1 sur les lymphocytes T activés est impliquée dans une boucle de régulation négative endogène

Figure 46. Le ligand de Nrp-1, Sema3A, est produit par les lymphocytes T activés

Figure 47. Le ligand de Nrp-1, Sema3A, régule négativement la prolifération des lymphocytes T activés

Figure 48. L'induction de Nrp-1 sensibilise les lymphocytes T activés à l'action régulatrice et différenciante du TGF- β 1

Figure 49. Schéma du mécanisme moléculaire d'induction de l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T activés par le TCR

Figure 50. Schéma des mécanismes autocrines et paracrines de régulation de la prolifération des lymphocytes T dépendant de l'expression de Nrp-1

Figure 51. Expression de PD-1 dans les lymphocytes iNKT Nrp-1 $^-$ et Nrp-1 $^+$ de la rate

Figure 52. Expression de Nrp-1 par les lymphocytes iNKT des poumons.

Figure 53. Expression de CD1d dans les lymphocytes iNKT Nrp-1 $^-$ et Nrp-1 $^+$ de la rate

Figure 54. Modèle d'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes iNKT murins en fonction du contexte de la stimulation du TCR

Figure 55. Modèle décrivant le rôle du couple Nrp-1/Sema3A dans la dynamique des contacts cellulaires pendant l'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques fondamentales des lymphocytes NKT de type 1 et de type 2

Tableau 2. Phénotype des souris génétiquement modifiées pour *NRP1*

Tableau 3. Analogies fonctionnelles et structurelles des systèmes nerveux et immunitaire

Tableau 4. Combinaisons d'anticorps fluorescents utilisés pour le tri électronique

Tableau 5. Proportions des lymphocytes iNKT totaux, Nrp-1⁻ et Nrp-1⁺ utilisant la chaîne β du TCR possédant le réarrangement V β 8, V β 7 ou V β 2

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique	EBV : "Epstein-Barr virus"
AICD : "activation-induced cell death"	EDTA : éthylène diamine tétraacétate
α-GalCer : alpha-galctosylcéramide	ETR : émigrés thymiques récents
ALPS : "autoimmune lymphoproliferative syndrome"	FACS : "fluorescence activated cell sorting"
AP-1 : "activator protein 1"	FITC : fluorescéine isothiocyanate
APC : allophycocyanine	FIt3L : "FMS-like tyrosine kinase 3 ligand"
ARNm : acide ribonucléique messenger	Foxp3 : "Forkhead box P3"
Bcl-2 : "B cell lymphoma 2"	FSC : "forward light scatter"
BrdU : bromodéoxyuridine	FTOC : "fetal thymic organ culture"
BSA : "bovine serum albumin"	G-CSF : "granulocyte colony stimulating factor"
CCL : "CC chemokine ligand"	GFP : "green fluorescent protein"
CCR : "CC chemokine receptor"	GITR : "glucocorticoid-induced TNFR-related protein"
CD : "cluster of differentiation"	GM-CSF : "granulocyte monocyte colony stimulating factor"
CD1d Tet : tétramère de CD1d chargé	GMPc : guanosine monophosphate cyclique
CD40L : CD40 ligand	GSK3 : "glycogen synthase kinase 3"
CD44^{hi} : expression forte de CD44	GVHD : "graft-versus-host-disease"
CD44^{lo} : expression faible de CD44	HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonique
CFDA-SE : carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl ester	HIV-1 : "human immunodeficiency virus type 1"
CFSE : carboxyfluorescéine succinimidyl ester	HRP : "horseradish peroxidase"
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	HTLV-1 : "human T cell lymphotropic virus type 1"
cpm : coups par minute	ICOS : "inducible T-cell costimulator"
CsA : ciclosporine A	IFN : interféron
CTLA-4 : "cytotoxic T lymphocyte antigen 4"	Ig : immunoglobuline
CXCL : "CXC chemokine ligand"	iGb3 : isoglobo-trihexosylcéramide
CXCR : "CXC chemokine receptor"	IL : interleukine
Cy : cyanine	IMF : intensité moyenne de fluorescence
DAG : diacyl glycérol	iNKT : "invariant natural killer T"
DLL1 : "delta like 1"	InsP3 : inositol-1,4,5-triphosphate
DN : double négatif	
DP : double positif	

IPEX : “immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome”

ISP : immature simple positif

ITAM : “immuno-receptor tyrosine-based activating motif”

ITK : “IL-2-inducible T-cell kinase”

LAP : “latency associated peptide”

LAT : “linker of activated T-cell”

Lck : “lymphocyte-specific protein tyrosine kinase”

Lti : “lymphoid tissue inducing”

MAPK : “mitogen-activated protein kinase”

Mcl-1 : “Induced myeloid leukemia cell differentiation protein”

MEF2 : “myocyte enhancing factor 2”

NFAT : “nuclear factor of activated T cells”

NFκB : “nuclear factor κB”

NK : “natural killer”

NKT : “natural killer T”

NOD : “non-obese diabetic”

Nrp : neuropiline

OX40L : OX40 ligand

PBS : “phosphate buffered saline”

PD-1 : “programmed death 1”

PDGF : “platelet-derived growth factor”

PD-L : “programmed death ligand”

PE : phycoérythrine

PerCP : “peridinin chlorophyll protein”

PFA : paraformaldéhyde

PI3K : phosphatidylinositol 3 kinase

PLCγ : phospholipase Cγ

PIGF : “placental growth factor”

PLZF : “promyelocytic leukemia-associated zinc finger protein”

PMA : phorbol 12-myristate 13-acétate

PVDF : “polyvinylidene fluoride”

Rag : “recombination activating gene”

Ras : “rat sarcoma”

RE : réticulum endoplasmique

ROR-γt : “retinoic acid receptor-related orphan receptor γt”

S1P : sphingosine- 1-phosphate

S1P1 : sphingosine-1-phosphate récepteur 1

SAP : “Slam-associated protein”

Sema : sémaphorine

Slam : “signaling lymphocyte activating molecule”

SSC : “side light scatter”

sTCRβ : TCRβ de surface

SVF : serum de veau foetal

TCR : “T-cell receptor”

TGF-β1 : “transforming growth factor β1”

T_H : “T helper”

TLR : “toll-like receptor”

TNF : “tumor necrosis factor”

tpm : tours par minute

TPO : thrombopoïétine

Treg : T régulateur

u.a. : unités arbitraires

VEGF : “vascular endothelium growth factor”

XIAP : “X-linked inhibitor of apoptosis protein”

ZAP-70 : “ζ chain-associated protein kinase 70 kDa”

1. Introduction

1.1. Développement, activation et homéostasie des lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels

Ce chapitre d'introduction concerne principalement les lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels murins. Toute allusion spécifique aux lymphocytes T $\alpha\beta$ humains sera nommément précisée dans le texte. Par opposition aux lymphocytes T $\alpha\beta$ dits « non-conventionnels » (comme par exemple les lymphocytes NKT), les lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels (que je nommerai parfois simplement lymphocytes T) représentent la population polyclonale des lymphocytes exprimant des récepteurs TCR $\alpha\beta$ spécifiques d'antigènes peptidiques. Cette définition, certes assez vague, permet d'exclure de cette population des lymphocytes T aux propriétés de développement, d'activation et d'homéostasie particulières comme les lymphocytes iNKT, auxquels un chapitre indépendant de l'introduction est consacré.

1.1.1. Développement thymique des lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels

Le développement des lymphocytes T a lieu dans le thymus. Ce processus a pour but de faire naître, à partir de progéniteurs lymphoïdes communs issus de la moelle osseuse, les lymphocytes T matures exprimant des TCR variés potentiellement dirigés contre des antigènes étrangers et non contre des antigènes du soi. Deux processus fondamentaux sont donc assurés en parallèle pour répondre à ce « cahier des charges » : le réarrangement stochastique des gènes du TCR, et la sélection des thymocytes portant des TCR appropriés.

Au cours de ces étapes de mutation/sélection, le phénotype des thymocytes change et passe par des intermédiaires bien déterminés (**Figure 1A**) [1]. Ainsi, les précurseurs thymiques les plus précoces n'expriment ni CD4 ni CD8 et sont dits « double négatifs » (DN). De manière plus précise, on distingue 4 stades séquentiels de développement parmi les thymocytes DN : DN1 (CD44⁺ CD25⁻), DN2 (CD44⁺ CD25⁺), DN3 (CD44⁻ CD25⁺) et DN4 (CD44⁻ CD25⁻). La transition du stade DN1 (stade le plus précoce du développement thymique des lymphocytes T) au stade DN2 marque l'engagement des précurseurs thymiques vers la lignée T. A partir du stade DN3, le réarrangement du gène de la chaîne β du TCR initie le processus appelé β -sélection : si le réarrangement produit une chaîne TCR β fonctionnelle, celle-ci forme, avec la molécule pré-T α et les chaînes CD3, un pré-TCR qui fournit un signal de survie, de prolifération et de différenciation aux thymocytes. Les thymocytes qui ne parviennent pas à effectuer un réarrangement de la chaîne TCR β fonctionnel meurent en l'absence de ce signal. Le réarrangement des gènes des chaînes TCR γ et TCR δ ayant aussi lieu dans les thymocytes du stade DN3, le développement de la

lignée $T\gamma\delta$ diverge de la lignée $T\alpha\beta$ à partir de ce stade. La prolifération induite par le signal du pré-TCR au cours de la β -sélection s'accompagne de modifications phénotypiques des thymocytes qui passent par les stades DN4, puis ISP ($CD8^+ sTCR\beta^-$: immature simple positif) pour devenir des thymocytes exprimant à la fois CD4 et CD8, dits « double positif » (DP). Les thymocytes DP représentent environ 85-90% des thymocytes d'une souris adulte jeune. La prolifération des thymocytes DP les plus précoces, qui ont de ce fait un phénotype blastique, est requise pour le réarrangement du locus de la chaîne TCR α . Si ce réarrangement est fonctionnel, c'est-à-dire s'il conduit à l'association des chaînes TCR α et TCR β en un TCR $\alpha\beta$ capable de reconnaître un antigène dans le contexte de molécules CMH-I ou CMH-II, le processus de sélection peut commencer. Sinon, les thymocytes DP finissent par mourir en l'absence de signaux de survie délivrés par l'activation du TCR de surface. La lignée des lymphocytes iNKT diverge des lymphocytes $T\alpha\beta$ conventionnels au stade DP^{blast}, et les conditions spécifiques de son développement seront abordées ultérieurement. La sélection positive des thymocytes DP (qui expriment alors à leur surface un TCR $\alpha\beta$) s'accompagne d'un arrêt de la prolifération et de l'expression du marqueur d'activation CD69. Suivant que le TCR interagit avec un antigène dans le contexte de CMH-I ou CMH-II, les thymocytes DP vont alors perdre l'expression de CD4 ou de CD8, respectivement, et devenir des thymocytes « simple positif » (SP). La sélection négative, qui élimine les thymocytes portant un TCR reconnaissant avec une haute affinité des antigènes du soi, affecte les thymocytes DP^{mature} et les thymocytes SP. Les lymphocytes T régulateurs (Treg) Foxp3⁺ émergent eux-aussi comme des thymocytes SP CD4⁺.

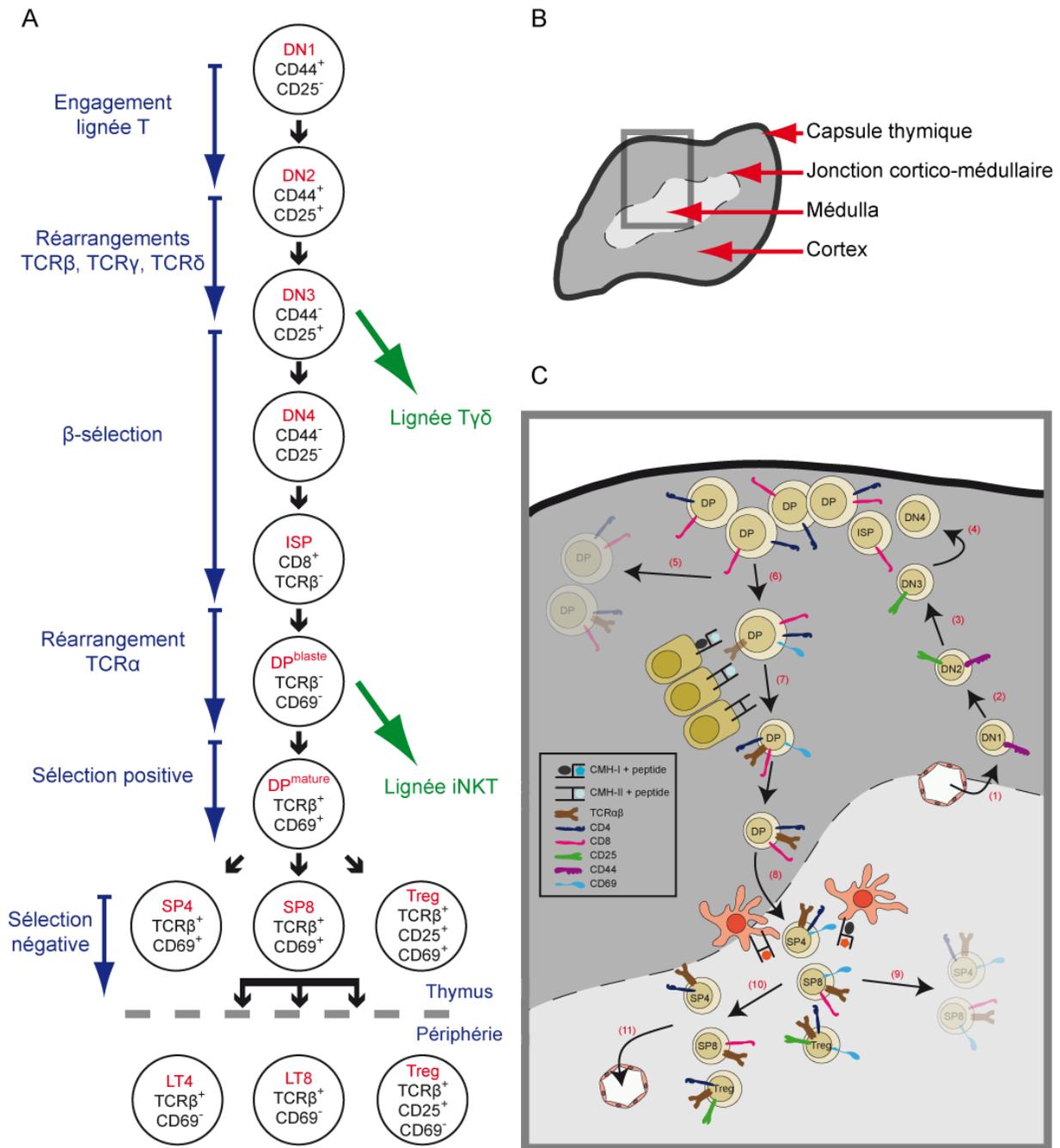


Figure 1. Schémas de la différenciation thymique des lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels
 (A) Stades de différenciation des thymocytes (en rouge), leur phénotype de surface caractéristique (en noir), et les grandes étapes du développement thymique qui correspondent à ces stades (en bleu). (B) Architecture du thymus légendée. (C) Régulation spatio-temporelle du développement thymique des lymphocytes T.

Ces différents processus de mutation, prolifération, sélection sont soumis à une stricte régulation spatio-temporelle et font intervenir de nombreuses interactions cellulaires et moléculaires [2, 3]. Le thymus est un organe à l'architecture caractéristique divisée en une zone périphérique dense et sombre, le cortex, et une zone centrale moins dense et plus

claire, la medulla (**Figure 1B**). La colonisation du thymus par des cellules d'origine hématopoïétiques commence à 11,5 jours *post coïtum* chez la souris et à 8-9 semaines gestationnelles chez l'homme. Le thymus va alors grossir jusqu'à l'adolescence, puis il va s'involuer au cours du temps et sa structure va s'altérer au fur et à mesure que la graisse envahit cet organe. En période de fonctionnement normal du thymus, les précurseurs T DN1 entrent dans le thymus par des vénules situées au niveau de la jonction cortico-médullaire (**Figure 1C**). L'engagement vers la lignée T et le processus de β -sélection vont alors s'opérer alors que les thymocytes migrent vers la périphérie du cortex. Cette migration centrifuge est dépendante de l'expression de plusieurs récepteurs de chimiokines sur les thymocytes DN1-3 : CXCR4, CCR7 et CCR9. Les thymocytes ayant passé avec succès la β -sélection sont localisés dans la région sous-capsulaire du cortex thymique, où ils prolifèrent intensément, réarrangent le locus du TCR α et acquièrent l'expression des corécepteurs CD4 et CD8. La sélection positive (et négative) des thymocytes DP par des cellules épithéliales thymiques corticales nécessite la migration centripète de ces cellules. L'expression de CCR7 induite par l'activation du TCR $\alpha\beta$ sur les thymocytes DP est en partie responsable de la relocalisation des thymocytes sélectionnés vers la medulla, où sont exprimées les chimiokines CCL19 et CCL21. Ainsi, la transition de cellule DP à cellule SP s'accompagne d'un franchissement de la jonction cortico-médullaire. Les thymocytes SP résident plusieurs jours dans la medulla où ils subissent la sélection négative médiée par des cellules dendritiques et des cellules épithéliales exprimant des autoantigènes. La sortie des thymocytes matures vers les organes périphériques par la circulation sanguine, appelée export ou émigration thymique, nécessite l'expression du récepteur S1P1 à la surface de ces cellules. La sécrétion du ligand chimioattractant S1P par des péricytes entourant les cellules endothéliales de vénules situées au niveau de la jonction cortico-médullaire attire les thymocytes S1P1⁺ vers ces vaisseaux et favorise leur transmigration puis leur export [4]. En plus des chimiokines et de leurs récepteurs couplés aux protéines G, les protéines de la matrice extracellulaire (laminine, fibronectine) jouent un rôle fondamental dans la migration dirigée des thymocytes durant les différentes étapes de leur développement. L'expression des récepteurs de chimiokines et de matrice extracellulaire est régulée par les différents signaux intracellulaire que reçoivent les thymocytes lors de l'engagement vers la lignée T, la β -sélection et la sélection positive.

1.1.2. Activation des lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels

Les lymphocytes T qui sortent du thymus vers la circulation sanguine sont dits « naïfs ». Ils expriment un unique TCR $\alpha\beta$ et l'un ou l'autre des corécepteurs CD4 ou CD8. Le phénotype caractéristique des lymphocytes T naïfs murins est CD44^{lo} CD25⁻ CD62L^{hi}.

L'expression de CD62L est requise pour l'entrée des lymphocytes T naïfs dans les ganglions lymphatiques, organes lymphoïdes secondaires où sont initiées la majorité des réponses immunitaires dépendantes des lymphocytes T. Les lymphocytes T naïfs expriment aussi le récepteur CCR7, qui leur permet de se localiser dans les ganglions lymphatiques au sein de zones riches en CCL19 et CCL21, appelées « zones T ».

L'activation des lymphocytes T naïfs nécessite la mise en place d'une zone d'interaction, appelée « synapse immunologique » entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice d'antigène mature exprimant le complexe CMH/peptide agoniste du TCR. La synapse immunologique, en regroupant au sein d'une même région membranaire et sous-membranaire des molécules d'adhésion, des protéines de signalisation, des seconds messagers et un cytosquelette dynamique, favorise l'activation rapide des lymphocytes T par leur antigène. L'engagement du TCR et d'un corécepteur CD4 ou CD8 par un complexe CMH/peptide induit la phosphorylation des domaines ITAM des molécules CD3 et de la chaîne ζ du complexe TCR par la kinase Lck associée au corécepteur. Les domaines ITAM phosphorylés servent ensuite de plateforme d'activation pour ZAP-70 qui, une fois activée, phosphoryle à son tour des enzymes comme LAT, ITK et PLC γ . Ces cascades de phosphorylation ont lieu localement, au niveau de la synapse immunologique, de manière très rapide (quelques minutes après l'engagement du TCR), et aboutissent à l'activation de voies de signalisation cruciales pour l'activation des lymphocytes T : la voie Ca²⁺/calcineurine/NFAT et la voie Ras/MAPK [5].

L'activation de PLC γ sous la membrane plasmique au niveau de la synapse immunologique permet la transformation du phosphatidylinositol-4,5-diphosphate membranaire en diacyl glycerol (DAG) et en inositol-1,4,5-triphosphate (InsP₃). Alors que DAG est responsable de l'activation de la voie Ras/MAPK, InsP₃ se fixe sur son récepteur à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et induit le relargage d'ions Ca²⁺ libres de la lumière du RE vers le cytosol. Ce relargage de Ca²⁺ intracellulaire active des canaux calciques à la membrane plasmique qui permettent une entrée massive de nouveaux ions Ca²⁺ dans le cytosol. La concentration en Ca²⁺ élevée active la calmoduline, qui à son tour active la phosphatase calcineurine. La déphosphorylation des facteurs de transcription de la famille NFAT par la calcineurine induit leur entrée dans le noyau où ils régulent positivement la transcription de gènes cibles impliqués dans l'activation des lymphocytes T (notamment les gènes codant pour l'IL-2 et son récepteur CD25). La transcription optimale de ces gènes cibles de NFAT requiert la coopération intranucléaire des facteurs NFAT avec l'hétérodimère AP-1, dont l'activation résulte de la voie Ras/MAPK dans les lymphocytes T. Deux drogues immunosuppressives couramment utilisées après transplantation d'organes pour éviter le

rejet, la ciclosporine A (CsA) et le FK506 (Tacrolimus), inhibent l'activation des lymphocytes T en bloquant l'activité de la calcineurine [6].

L'activation optimale des lymphocytes T nécessite un signal de costimulation émanant de la ligation du récepteur CD28 par ses ligands B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) exprimés par les cellules présentatrices d'antigène activées. La signalisation en aval de l'activation de CD28 implique les voies dépendantes de la PI3K et du facteur nucléaire NFκB, qui sont nécessaires à la production optimale d'IL-2 et à la prolifération des lymphocytes T activés. On peut modéliser *in vitro* l'activation de lymphocytes T naïfs en incubant ces cellules dans des plaques de plastique recouvertes d'anticorps dirigés contre le complexe TCR (anti-CD3ε, clone 145-2C11 pour les lymphocytes T de souris) et le récepteur de co-stimulation CD28 (anti-CD28, clone 37.51 pour les lymphocytes T de souris). L'activation des lymphocytes T naïfs, *in vitro* ou *in vivo*, s'accompagne de modifications phénotypiques caractéristiques : expression rapide et transitoire de CD69, expression augmentée de CD44 et perte d'expression progressive de CD62L et CCR7, expression progressive de CD25 et acquisition d'une taille blastique concomitante à l'initiation de la prolifération. Ces différents marqueurs sont utilisés pour quantifier et comparer les réponses des lymphocytes T en différentes circonstances (modulation pharmacologique, mutation génétique, modèle pathologique).

In vivo, l'activation des lymphocytes T naïfs par des cellules dendritiques matures au sein des ganglions lymphatiques est un processus dynamique dont les différentes étapes ont pu être récemment caractérisées grâce à la technique d'imagerie intravitale par microscopie biphotonique [7]. On distingue grossièrement trois phases d'interactions entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques portant leur antigène spécifique [8]. Dans la première phase, les lymphocytes T migrent rapidement dans les zones T du ganglion et établissent de brefs contacts transitoires avec des cellules dendritiques pour « scanner » leur surface. La reconnaissance du complexe peptide/CMH par le TCR induit un signal calcique fort qui induit l'arrêt de la migration du lymphocyte T et la stabilisation de l'interaction avec la cellule dendritique : c'est la deuxième phase au cours de laquelle les interactions prolongées entre lymphocytes T et cellules dendritiques instruisent l'activation et polarisent la différenciation des premiers. Alors que la première phase ne dure que quelques heures après l'entrée des cellules dendritiques matures dans le ganglion, la deuxième phase dure entre 24^h et 48^h. A l'issue de cette phase d'interactions prolongées, les lymphocytes T reprennent une activité migratoire rapide et ne forment que des contacts transitoires de courtes durées avec les cellules dendritiques persistant dans les zones T. C'est au cours de cette troisième phase que les lymphocytes T initient leur prolifération et acquièrent les

propriétés effectrices et migratoires propres à leur sous-type. Bien que la succession et la durée de ces trois phases d'activation soit principalement instruite par la qualité des interactions TCR – peptide/CMH (affinité, avidité, compétition interclonale), des interactions moléculaires secondaires impliquant par exemple l'expression de CTLA-4 ou de PD-1 jouent un rôle dans la modulation de ces différentes phases [9, 10].

1.1.3. Mécanismes de régulation des lymphocytes T $\alpha\beta$ activés

Afin d'éviter un emballement des réponses immunitaires dépendantes des lymphocytes T et de limiter la possibilité de réactions auto-immunes, plusieurs mécanismes de régulation des lymphocytes T $\alpha\beta$ activés existent. Trois mécanismes majeurs sont décrits ci-après.

Premièrement, la phase de prolifération des lymphocytes T activés, nécessaire à l'expansion d'un faible nombre de lymphocytes T clonaux ou oligoclonaux en réponse à un agent infectieux, est suivie d'une phase de contraction. Cette contraction, au cours de laquelle une très grande partie des lymphocytes T activés meurent par apoptose, est dépendante d'un mécanisme appelé AICD (« activation-induced cell death »). L'AICD dépend de l'expression du récepteur de mort Fas (CD95) et de son ligand FasL (CD95L) à la surface des lymphocytes T activés en réponse à de fortes concentrations d'IL-2. L'interaction paracrine de Fas avec FasL induit alors l'apoptose des cellules Fas⁺. Des mutations génétiques comme celles du gène codant pour le récepteur Fas sont associées à un échec de l'AICD responsable de la maladie appelée « syndrome lymphoprolifératif auto-immun » (ALPS) [11].

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) Foxp3⁺ représentent une population de cellules matures capables de réguler l'activation des lymphocytes T $\alpha\beta$ [12]. Les lymphocytes Treg Foxp3⁺ jouent ainsi un rôle primordial dans la prévention de l'auto-immunité ou de l'allergie. L'absence congénitale de lymphocytes Treg, due par exemple à une mutation génétique conduisant à une perte de fonction dans le gène *FOXP3*, conduit à un syndrome auto-immun sévère nommé IPEX (« immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome »). Les lymphocytes Treg Foxp3⁺ dits « naturels » sont originaires du thymus, où ils émergent au stade DP tardif ou SP CD4⁺ après engagement du TCR par des complexes autoantigène/CMH présentés par des cellules stromales et des cellules dendritiques de la médulla. Ces interactions déclenchent l'expression du facteur de transcription Foxp3, qui initie le programme de différenciation en lymphocytes Treg Foxp3⁺. Quelques traits phénotypiques et fonctionnels caractérisent les lymphocytes Treg : l'expression forte et constitutive de CD25, CTLA-4 et GITR, l'anergie (les lymphocytes Treg ne prolifèrent pas et

ne sécrètent pas d'IL-2 en réponse à l'engagement de leur TCR), et la capacité de réguler négativement l'activation des lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels *in vitro* et *in vivo* (propriétés suppressives). Toutes ces caractéristiques dépendent de l'expression du facteur de transcription Foxp3. L'expression de Foxp3 peut aussi être induite dans les lymphocytes T naïfs périphériques après activation dans des conditions cytokiniques particulières : ils deviennent alors des lymphocytes Treg induits (iTreg). L'émergence de lymphocytes iTreg à partir de lymphocytes T naïfs Foxp3⁻ nécessite : (i) l'engagement du TCR, (ii) la présence d'IL-2, et (iii) la présence de TGF- β 1. Les lymphocytes Treg, qu'ils soient naturels ou induits, peuvent exercer leur pouvoir suppressif de plusieurs manières lors des réponses immunitaires. Ils peuvent d'une part entrer en compétition avec les lymphocytes T effecteurs autoréactifs pour les ligands présentés par les cellules dendritiques, et ainsi promouvoir une réponse anergique plutôt qu'une réponse effectrice et/ou inflammatoire. D'autre part, l'interaction des lymphocytes Treg avec les cellules dendritiques peut inhiber les capacités de stimulation de ces dernières, notamment par l'effet de CTLA-4 sur ses ligand B7-1 et B7-2 à la surface des cellules dendritiques. Enfin, les lymphocytes Treg peuvent directement tuer ou inhiber les lymphocytes T effecteurs par la sécrétion de granules cytotoxiques ou la sécrétion de cytokines immunorégulatrices comme l'IL-10 ou le TGF- β 1.

En plus de ses effets dans la différenciation des lymphocytes iTreg, le TGF- β 1 est plus largement impliqué dans la régulation des lymphocytes T [13]. Le TGF- β 1 est une cytokine aux effets pléiotropes qui, dans le système immunitaire, agit sur de nombreux types cellulaires en inhibant ou promouvant leur différenciation, leur survie et leur prolifération. Le TGF- β 1 est produit sous une forme inactive appelée LAP (« latency associated peptide ») et ne devient actif qu'après dégradation de LAP ou changement conformationnel de celui-ci. L'activation de TGF- β 1 requiert donc l'activité de protéines activatrices qui peuvent agir au niveau de la matrice extracellulaire ou des membranes externes des cellules productrices de TGF- β 1 [14]. La molécule de TGF- β 1 active est un homodimère qui, se fixant sur le récepteur TGF- β RII, induit la formation d'un complexe formé de TGF- β 1, TGF- β RII et TGF- β RI. Ce complexe autophosphoryle les parties intracellulaires des deux TGF- β R et induit l'activation de Smad2/3, puis Smad4 qui agit, avec des cofacteurs, comme facteur de transcription dans le noyau de la cellule cible. De nombreux types cellulaires peuvent sécréter le TGF- β 1, parmi lesquelles les cellules dendritiques et les lymphocytes T activés. Lors de l'activation des lymphocytes T, le TGF- β 1 inhibe la prolifération et la différenciation des lymphocytes T effecteurs cytotoxiques, T_H1 et T_H2. A l'inverse, cette cytokine est impliquée dans la survie et la prolifération des lymphocytes Treg naturels, ainsi que dans la différenciation des lymphocytes iTreg. Du fait de ces propriétés duales, le TGF- β 1 est une

cytokine critique pour le maintien de la tolérance immunitaire périphérique. Les souris déficientes pour le récepteur du TGF- β 1 spécifiquement dans les lymphocytes T développent une maladie autoimmune précoce, rapide et mortelle [15, 16]. De manière intéressante, il a été récemment montré que le TGF- β 1 est une cytokine indispensable pour la différenciation des lymphocytes proinflammatoires T_H17 et T_H9, en combinaison avec l'IL-6 et l'IL-4 respectivement [17, 18]. Bien que les effets dominants du TGF- β 1 sur les lymphocytes T activés soient régulateurs, ces données récentes soulignent aussi le rôle ambivalent du TGF- β 1 dans le contrôle des réponses immunitaires des lymphocytes T.

1.1.4. Homéostasie des lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels

Après les effets combinés de la sélection positive et de la sélection négative dans le thymus, les lymphocytes T matures qui sortent du thymus et constituent la majeure partie des lymphocytes T à longue durée de vie qui peuplent les organes lymphoïdes secondaires ont une faible affinité pour des complexes autoantigène/CMH. Cette faible affinité n'est pas suffisante pour déclencher des maladies autoimmunes, mais est nécessaire à la survie des lymphocytes T naïfs. La signalisation de l'IL-7 via son récepteur IL-7R (CD127) synergise avec les signaux résultant de l'engagement du TCR par des complexes autoantigéniques de faible affinité pour promouvoir l'expression de molécules anti-apoptotiques (Bcl-2, Mcl-1) nécessaires à la survie à long terme de ces cellules [19].

L'activation des lymphocytes T naïfs par des antigènes d'origine étrangère conduit à leur expansion massive en quelques jours. Puis la contraction du nombre de cellules effectrices aboutit à la mort de la majorité des lymphocytes T spécifiques de ces antigènes. Après plusieurs semaines ne persistent dans les organes lymphoïdes qu'un faible nombre de lymphocytes T mémoires spécifiques de l'antigène. Contrairement aux lymphocytes T naïfs, la majorité des lymphocytes T mémoires, qui portent le phénotype CD44^{hi} CD25⁻, dépendent exclusivement de signaux issus des cytokines IL-7 et IL-15 pour leur survie à long terme et leur prolifération homéostatique [19]. Ainsi l'engagement de leur TCR par des complexes antigène/CMH qui auraient persisté longtemps après la phase aiguë d'infection n'est pas requis pour l'établissement d'une mémoire immunitaire des lymphocytes T. Cependant, certains lymphocytes T arborant un phénotype mémoire (CD44^{hi} CD25⁻), présents dans les organes lymphoïdes de souris n'ayant pas reçu de stimulation antigénique particulière, ont un renouvellement homéostatique rapide dépendant de l'engagement de leur TCR. Ces lymphocytes T émergent vraisemblablement lors d'épisodes de lymphoprolifération induites par des lymphopénies, durant lesquelles les lymphocytes T naïfs « occupent la place »

laissée libre en proliférant en réponse à des antigènes du soi ou des antigènes commensaux [19].

Ainsi, les lymphocytes T matures des organes lymphoïdes secondaires de souris adultes naïves sont une population hétérogène de cellules naïves (CD44^{lo} CD25⁻), mémoires ou de phénotype mémoire (CD44^{hi} CD25⁻) et régulatrices (Foxp3⁺ CD25⁺) dont le nombre et les proportions relatives sont régulés par l'action combinée de cytokines (IL-7, IL-15, TGF- β 1) et de complexes antigène/CMH.

1.2. Les lymphocytes « invariant natural killer T » (iNKT)

1.2.1. Nomenclature, définitions

Le terme « natural killer T » désigne historiquement des lymphocytes T $\alpha\beta$ exprimant le marqueur des cellules NK NK1.1 (CD161) [20]. Depuis les quinze à vingt dernières années, les cellules NKT ont suscité un vif intérêt chez les immunologistes. On distingue aujourd'hui deux types de lymphocytes NKT. Les caractéristiques fondamentales des lymphocytes NKT de type 1 et des lymphocytes NKT de type 2 sont résumées dans le **Tableau 1**. Les lymphocytes NKT de type 1 sont aussi couramment appelés lymphocytes iNKT (« invariant »), ou lymphocytes V α 14 iNKT chez la souris (V α 24 iNKT chez l'homme) [20]. Les lymphocytes iNKT sont des lymphocytes T possédant un récepteur TCR $\alpha\beta$ invariant ou semi-invariant (V α 24J α 18 associé à V β 11 chez l'homme, V α 14J α 18 associé à V β 8, V β 7 ou V β 2 chez la souris). Ce TCR invariant reconnaît spécifiquement des glycolipides (tel que l' α -galactosylcéramide, ou α -GalCer) présentés sur la molécule CD1d, un analogue non-polymorphique du CMH-I. On oppose aux lymphocytes iNKT les cellules NKT de type 2, qui reconnaissent aussi des glycolipides présentés par CD1d mais ne possèdent pas le TCR invariant caractéristique des lymphocytes iNKT et ne sont pas activés par α -GalCer. Bien que les cellules iNKT aient été longtemps caractérisées et analysées comme des lymphocytes TCR $\alpha\beta^+$ NK1.1 $^+$, il est désormais connu que tous les lymphocytes iNKT n'expriment pas NK1.1, et qu'inversement certains lymphocytes T exprimant NK1.1 ne sont pas des lymphocytes iNKT. Les lymphocytes iNKT sont donc strictement définis par l'expression de leur TCR invariant, capable de reconnaître spécifiquement le complexe CD1d – α -GalCer. De ce fait, il est possible d'analyser spécifiquement les lymphocytes iNKT murins ou humains à l'aide d'un tétramère de molécules CD1d chargées avec l' α -GalCer ou un de ses analogues (PBS57) (**Figure 2**) [21]. L'utilisation de ce réactif a permis de nombreuses avancées dans la recherche sur les lymphocytes iNKT, notamment en permettant de suivre et d'analyser les lymphocytes iNKT n'exprimant pas NK1.1. Il n'existe pas de réactif similaire pour détecter les lymphocytes NKT de type 2. Ce sous-type de lymphocytes immunorégulateurs est donc beaucoup moins étudié. Cependant, l'analyse comparée des souches de souris J α 18 $^{-/-}$ (déficientes en lymphocytes NKT de type 1 mais pas de type 2) et CD1d $^{-/-}$ (déficientes en lymphocytes NKT de type 1 et de type 2) a permis de mettre en évidence des rôles distincts de ces deux populations dans des modèles physiopathologiques murins [20, 22, 23]. Dans ce travail, je me suis uniquement intéressé aux lymphocytes NKT de type 1 murins, que je nomme iNKT dans la suite de ce manuscrit.

	NKT de type 1 (iNKT)	NKT de type 2
Restreint par CD1d	Oui	Oui
Reconnaît α-GalCer	Oui	Non
TCRα	V α 14J α 18 (souris) V α 24J α 18 (homme)	Divers
TCRβ	V β 8, V β 7 et V β 2 (souris) V β 11 (homme)	Divers
Expression de NK1.1	+/-	+/-
Expression de CD4 et CD8	CD4 ⁺ et DN (souris) CD4 ⁺ , CD8 ⁺ et DN (homme)	CD4 ⁺ et DN (souris)

Tableau 1. Caractéristiques fondamentales des lymphocytes NKT de type 1 et de type 2
Adapté de Godfrey *et al.* [20]

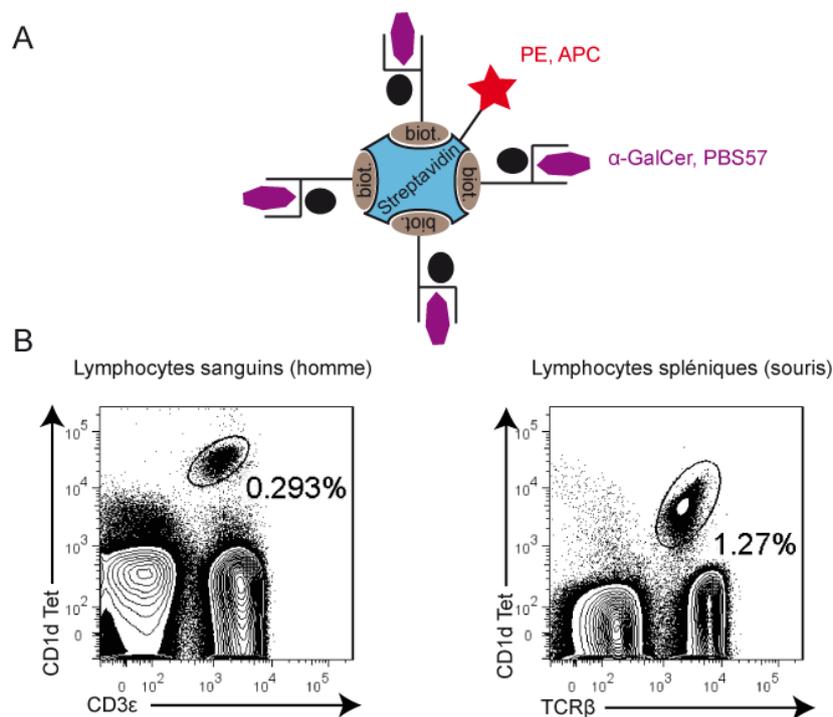


Figure 2. Méthode d'analyse des lymphocytes iNKT par cytométrie de flux

(A) Schéma du tétramère utilisé pour l'analyse et le tri des lymphocytes iNKT par cytométrie de flux. Des molécules CD1d recombinantes biotinylées sont agglutinées sur une streptavidine couplée à un fluorophore, puis chargées avec le ligand spécifique α -GalCer ou un de ses analogues. Le réactif utilisé pour les expériences présentées dans cette thèse a été fabriqué et fourni par le NIH Tetramer Core Facility. (B) Analyses représentatives des lymphocytes iNKT humains (CD3 ϵ ⁺ CD1d Tet⁺) et murins (TCR β ⁺ CD1d Tet⁺) par cytométrie de flux. Les cellules entourées sont les lymphocytes iNKT.

En plus du TCR semi-invariant, les lymphocytes iNKT présentent des marqueurs phénotypiques caractéristiques. La majorité des lymphocytes iNKT expriment des récepteurs caractéristiques des lymphocytes NK : NK1.1 (dans la souche C57BL/6), CD122 (IL-2R β , spécifique de l'IL-15), ou DX5 (CD49b ou intégrine α 2) entre autres [24]. De plus, les lymphocytes iNKT portent, dans leur grande majorité, des marqueurs associés aux lymphocytes T mémoires activés (CD44^{hi} CD69⁺). Chez la souris, les lymphocytes iNKT n'expriment pas le corécepteur CD8 et sont CD4⁺ ou DN. Par contre, chez l'homme, les lymphocytes iNKT peuvent être CD4⁺, CD8⁺, ou DN [24]. On définit les lymphocytes iNKT comme appartenant à la famille des lymphocytes T innés, au même titre que les lymphocytes T $\gamma\delta$ [24, 25]. La classification en cellules de l'immunité innée des lymphocytes iNKT est due à plusieurs propriétés. Premièrement, le même récepteur TCR des lymphocytes iNKT peut reconnaître plusieurs glycolipides de structures différentes issus de divers pathogènes ou des cellules de l'organisme. Deuxièmement, la réponse effectrice des lymphocytes iNKT à l'activation (que ce soit par l'engagement de leur TCR ou par des cytokines inflammatoires) est extrêmement rapide (de l'ordre de l'heure). Enfin, cette réponse est puissante et met en jeu la sécrétion massive de nombreuses cytokines immunorégulatrices (dont notamment IFN- γ et IL-4) capables d'activer à leur tour les cellules dendritiques, les lymphocytes NK et les macrophages, d'influencer la différenciation des lymphocytes T naïfs activés, ou de moduler l'activation des lymphocytes B [24, 25].

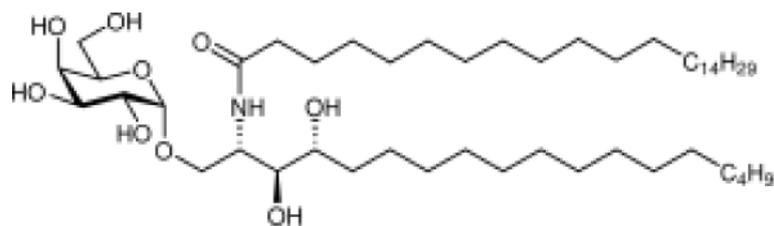


Figure 3. Structure de l'alpha-galactosylceramide (α -GalCer)

Le TCR semi-invariant des lymphocytes iNKT leur permet de reconnaître plusieurs ligands glycolipidiques présentés dans le contexte de la molécule CD1d. Le premier glycolipide capable d'activer les lymphocytes iNKT à avoir été identifié est alpha-galactosylcéramide, un lipide dérivé de l'éponge marine *Agelas mauritianus* (**Figure 3**) [24]. C'est le ligand prototypique des lymphocytes iNKT. Plusieurs dérivés synthétiques de ce ligand ont été produits depuis qui sont également capables d'activer spécifiquement les lymphocytes iNKT. Certains glycolipides des membranes de bactéries pathogènes

(*Sphingomonas* [26], *Borrelia* [27]) sont aussi des agonistes du TCR semi-invariant des lymphocytes iNKT lorsqu'ils sont présentés dans le contexte de CD1d. On connaît aussi un ligand endogène des lymphocytes iNKT humains et murins, l'isoglybo-trihexosylcéramide (iGb3), impliqué dans le développement thymique et l'activation des lymphocytes iNKT [28, 29]. Le mode de reconnaissance de ces ligands par le TCR semi-invariant des lymphocytes iNKT a été caractérisé ces dernières années grâce à des études structurales par cristallographie. Le TCR semi-invariant utilise un mode commun de fixation au complexe glycolipide/CD1d pour tous les ligands connus des lymphocytes iNKT [30-32]. Ce procédé conservé au cours de l'évolution permet aux lymphocytes iNKT de repérer grâce à un unique récepteur, plusieurs types d'agents infectieux et d'initier rapidement les réponses immunitaires en réponse à ces agents.

1.2.2. Développement thymique et maturation des lymphocytes iNKT

Les lymphocytes iNKT se développent dans le thymus à partir de thymocytes DP ayant effectué le réarrangement $V\alpha 14J\alpha 18$ ($V\alpha 14^+$ DP) [33-35]. La sélection positive de ces précurseurs thymiques des lymphocytes iNKT est en de nombreux points différente de celle des thymocytes $\alpha\beta$ conventionnels. D'une part, les cellules $V\alpha 14^+$ DP sont sélectionnées par des thymocytes DP corticaux exprimant CD1d conjugué à un ligand glycolipidique endogène, et non par les cellules épithéliales thymiques [36]. Le ligand endogène responsable de la sélection positive des précurseurs iNKT reste non-identifié, même si iGb3 est un bon candidat [29]. La sélection des précurseurs iNKT est dépendante du signal d'activation du TCR reçu lors de ce contact, ainsi que d'interactions homotypiques Slam/Slam entre les cellules $CD1d^+$ DP et $V\alpha 14^+$ DP induisant l'activation de la voie de signalisation de SAP dans les cellules $V\alpha 14^+$ DP [37-39]. D'autre part, la sélection positive des précurseurs iNKT thymiques induit une vague de prolifération intense au cours de laquelle le phénotype des lymphocytes iNKT évolue en 3 stades caractéristiques : le stade 0 ($CD24^+$ $NK1.1^-$), le stade 1 ($CD24^-$ $NK1.1^-$ $CD44^{lo}$) et le stade 2 ($CD24^-$ $NK1.1^-$ $CD44^{hi}$) [34, 40, 41]. Cette vague de prolifération, dépendante de l'activité du facteur de transcription c-Myc [42-44], amplifie la population clonale de thymocytes $V\alpha 14^+$ pour donner un nombre suffisant de lymphocytes iNKT en périphérie. La majorité des lymphocytes iNKT du thymus de souris adulte ont un phénotype de stade 3 ($CD24^-$ $NK1.1^+$ $CD44^{hi}$), représentent le stade ultime de maturation des thymocytes $V\alpha 14^+$, et ne prolifèrent que très peu. Bien que ces cellules soient à un stade de différenciation terminale, elles ne sont pas ou peu exportées vers la périphérie, mais persistent comme une population résidente du thymus pendant des périodes très longues (allant jusqu'à un an) [45].

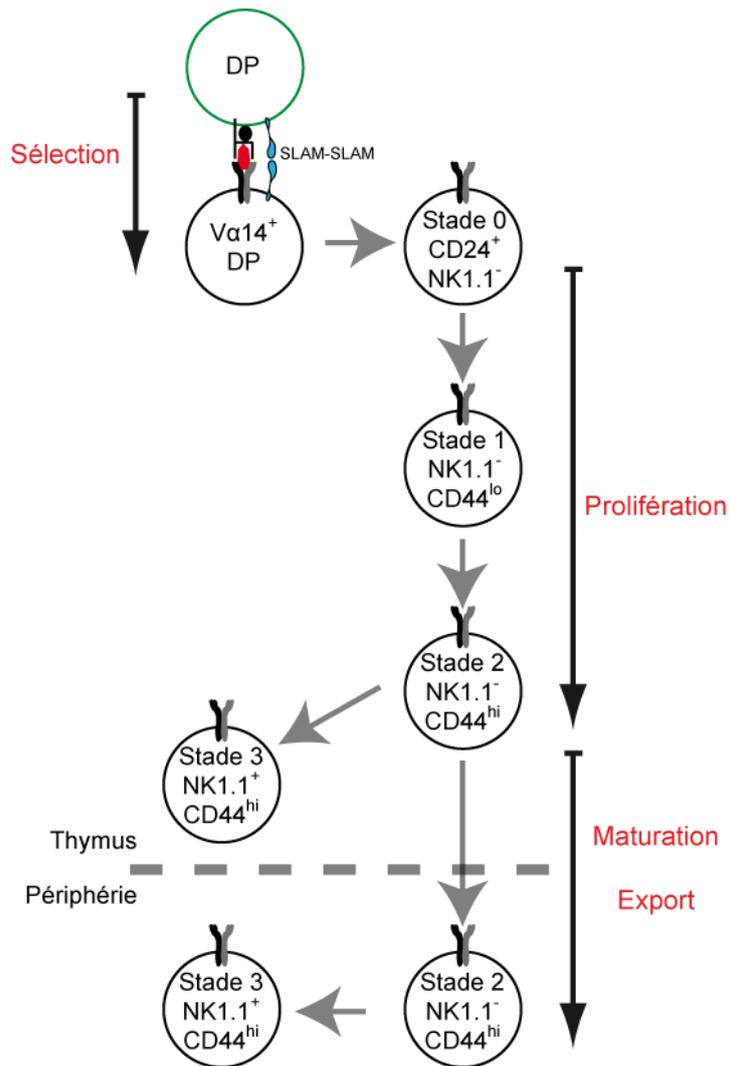


Figure 4. Schéma du développement thymique des lymphocytes iNKT murins

L'export des lymphocytes iNKT du thymus vers la périphérie a donc lieu au stade 2 (NK1.1⁻ CD44^{hi}) [40, 41]. Le mécanisme d'export des lymphocytes iNKT n'est pas complètement élucidé. L'expression du récepteur S1P1 semble être requise, comme pour l'export des lymphocytes T conventionnels [46]. Un rôle plus spécifique des récepteurs aux lymphotoxines α et β dans l'émigration des lymphocytes iNKT du thymus a aussi été mis en évidence [47]. Les lymphocytes iNKT émigrés thymiques récents (ETR) acquièrent rapidement (24-48 heures) l'expression de NK1.1 dans un processus de maturation similaire à celui ayant lieu dans le thymus [40]. De ce fait, la majorité des lymphocytes iNKT matures en périphérie expriment NK1.1. La **Figure 4** schématise les différentes étapes du développement des lymphocytes iNKT chez la souris.

Les différentes étapes du développement thymique des lymphocytes iNKT sont contrôlées par plusieurs processus indépendants. Ces points de contrôle ont été identifiés

par l'étude, dans des souris déficientes en différents gènes, des différents stades thymiques de développement des précurseurs iNKT. Le premier point de contrôle est opéré par la survie des thymocytes DP. En effet, le réarrangement entre les segments V α 14 et J α 18 nécessite que les thymocytes DP survivent suffisamment longtemps pour effectuer plusieurs séries de réarrangements du TCR α , de proche en proche jusqu'à joindre ces deux loci distaux [48]. Ainsi, les mutations affectant des facteurs de transcription (HEB, ROR- γ t) ou des molécules anti-apoptotiques (Bcl-x_L) nécessaires à la survie des thymocytes DP ont un impact négatif majeur sur le développement de lymphocytes iNKT [49, 50].

Le second point de contrôle du développement des lymphocytes iNKT repose sur l'interaction fonctionnelle du thymocyte V α 14⁺ DP avec le thymocyte CD1d⁺ DP qui le sélectionne. Deux voies de signalisation, partiellement convergentes, ont une importance cruciale à ce niveau : (i) la signalisation induite par l'activation du TCR et conduisant à l'activation de la calcineurine et des facteurs de transcription calcium-dépendants, et (ii) la signalisation Slam/SAP/Fyn induite par l'interaction homotypique Slam/Slam décrite plus haut [49]. Ainsi, les mutations affectant la qualité du signal du TCR [51], la voie dépendante du calcium [52, 53], les récepteurs de surface de la famille Slam et les protéines de la voie de signalisation en aval de ces dernières [37-39, 54], empêchent le développement des lymphocytes iNKT à partir de précurseurs V α 14⁺ DP.

L'activité de plusieurs facteurs de transcription est requise entre les stades 0 et 3 pour mettre en place le programme effecteur des lymphocytes iNKT. Gata-3 est requis précocement (stades 0 et 1) pour le développement des lymphocytes iNKT et son expression est associée à la forte production d'IL-4 par les précurseurs iNKT aux stades précoces [55, 56]. Par contre, T-bet est requis pour la différenciation terminale (transition du stade 2 au stade 3) et la capacité à produire l'IFN- γ après activation [57]. Par ailleurs, le facteur de transcription PLZF semble être un régulateur important et assez spécifique de l'acquisition des capacités immunomodulatrices des lymphocytes iNKT : en l'absence de PLZF, les précurseurs iNKT ne dépassent pas le stade 1 (n'augmentent pas l'expression de CD44 caractéristique de lymphocytes T effecteurs) et leur capacité à produire IFN- γ et IL-4 est fortement diminuée [49, 58].

Le dernier point de contrôle du développement des lymphocytes iNKT murins est la transition qui a lieu entre les stades 2 et 3. Cette transition peut avoir lieu dans le thymus ou dans les organes lymphoïdes périphériques. Un facteur crucial pour cette dernière étape de maturation des lymphocytes iNKT est l'IL-15. En effet, la signalisation de l'IL-15, *via* la fixation à son récepteur spécifique CD122, est responsable de l'activation de T-bet et de l'acquisition du marqueur NK1.1 et de la capacité à produire l'IFN- γ [59, 60]. De plus, bien

que l'IL-7 puisse favoriser la survie des lymphocytes iNKT thymiques *in vitro* et *in vivo*, c'est encore l'IL-15 qui est nécessaire à la prolifération homéostatique des lymphocytes iNKT matures dans les organes lymphoïdes périphériques [61]. La reconnaissance, en périphérie, d'un ligand glycolipidique endogène présenté à la surface de cellules CD1d⁺, est aussi un élément déterminant dans la transition du stade 2 au stade 3. En effet, l'absence d'expression de CD1d en périphérie est associée à une accumulation de lymphocytes iNKT NK1.1⁻ dans les organes lymphoïdes périphériques [62]. Cependant, l'interaction des lymphocytes iNKT matures avec des cellules périphériques CD1d⁺ n'est absolument pas requise pour leur prolifération homéostatique et leur survie [61, 63]. Enfin, bien que la grande majorité des lymphocytes iNKT récemment exportés du thymus passe du stade 2 au stade 3, une partie des lymphocytes iNKT NK1.1⁻ des organes lymphoïdes périphériques représente des cellules matures, au phénotype stable [64]. Ces lymphocytes iNKT NK1.1⁻ sont notamment retrouvés abondamment dans les ganglions lymphatiques, où ils représentent jusqu'à 80% des lymphocytes iNKT totaux de ces organes [65].

1.2.3. Activation des lymphocytes iNKT

Les lymphocytes iNKT, comme tout lymphocyte T, sont susceptibles d'être activés quand leur TCR reconnaît un antigène agoniste présenté dans le contexte d'une molécule présentatrice d'antigène, ici un glycolipide présenté par CD1d. On distingue deux modes d'activation des lymphocytes iNKT selon la provenance des glycolipides reconnus par le TCR [58, 66] (**Figure 5**). Dans le mode direct, les glycolipides agonistes du TCR semi-invariant sont exogènes, et proviennent donc de la dégradation des membranes de pathogènes dans les phagolysosomes des cellules présentatrices d'antigène. C'est ainsi le mode d'activation principal des lymphocytes iNKT en réponse à l'infection par les bactéries *Sphingomonas* ou *Borrelia*, dont les membranes contiennent des glycolipides agonistes des lymphocytes iNKT. Mais de nombreuses bactéries et autres pathogènes ne possèdent pas de glycolipides agonistes du TCR des lymphocytes iNKT, mais sont capables de déclencher l'activation de ces cellules par un mécanisme dépendant de l'expression de CD1d dans les cellules présentatrices d'antigène. Dans ce mode d'activation, dit indirect, l'activation des cellules présentatrices d'antigènes par les récepteurs TLR spécifiques des pathogènes induit leur activation. Ces cellules activées présentent à leur surface des glycolipides endogènes dans le contexte de CD1d et produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 et l'IL-18 [67]. Les lymphocytes iNKT sont alors activés par la combinaison des lipides endogènes et du milieu cytokinique pro-inflammatoire. La nature des glycolipides endogènes présentés par les cellules présentatrices d'antigènes pour le mode d'activation indirect est encore imprécise. Comme pour la sélection positive dans le thymus, iGb3 est un bon

candidat mais n'est sans doute pas le seul lipide impliqué [28]. Une étude récente a apporté des détails cruciaux concernant les mécanismes précis de ce mode d'activation des lymphocytes iNKT : l'activation des cellules dendritiques par des microbes, *via* les récepteurs TLR2 et TLR4, induit l'inhibition de l'enzyme alpha-galactosidase A, normalement chargée de dégrader les glycosphingolipides dans ces cellules ; l'accumulation lysosomale de glycosphingolipides endogènes qui résulte de cette inhibition induit une surprésentation de ces molécules par CD1d à la membrane cellulaire et active les lymphocytes iNKT [68].

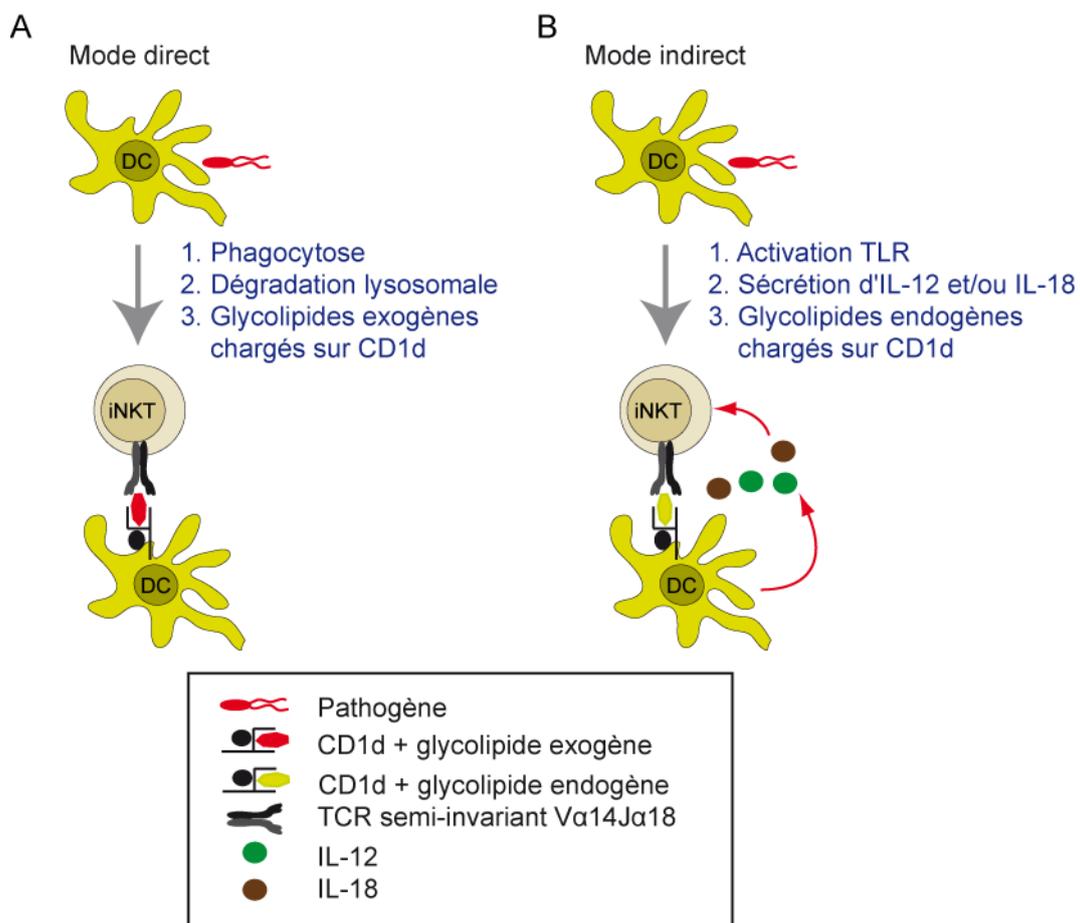


Figure 5. Modes d'activation direct et indirect des lymphocytes iNKT

Récemment, des études d'imagerie intravivante par microscopie bi-photonique ont permis de mettre en évidence les processus dynamiques qui ont lieu à l'échelle cellulaire lors de l'activation des lymphocytes iNKT. Dans le foie, organe particulièrement riche en lymphocytes iNKT (plus de 30% des lymphocytes Tαβ hépatiques murins sont des lymphocytes iNKT), les lymphocytes iNKT patrouillent le long des sinusoides vasculaires à une vitesse de l'ordre de 10-20 $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ [69]. L'activation par le TCR, après injection d' α -

GalCer ou de bactéries *Borrelia* vivantes, induit rapidement l'arrêt des lymphocytes iNKT nécessaire à, et déclenchée par, leur activation optimale [69, 70]. Dans le cas de la réponse au pathogène *Borrelia*, ce sont les cellules de Kuppfer qui ingèrent la bactérie et activent les lymphocytes iNKT via l'expression surfacique de complexes CD1d/glycolipides bactériens [70]. Un rôle clé de cellules macrophagiques dans la présentation des glycolipides aux lymphocytes iNKT *in vivo* a aussi été observé dans les ganglions lymphatiques. Ainsi, l'injection sous-cutanée de microbilles de latex recouvertes d' α -GalCer induit, dans le ganglion drainant, l'activation des lymphocytes iNKT par des macrophages sous-capsulaires ayant phagocyté les particules. Les lymphocytes iNKT, qui patrouillaient dans la zone T du ganglion avec le même comportement que les lymphocytes T conventionnels, reçoivent là aussi un signal « stop » et s'activent en engageant des interactions longues avec les macrophages CD1d⁺ présentant l'antigène [71]. Ces études *in vivo* montrent que le comportement dynamique des lymphocytes iNKT avant et pendant l'activation est semblable à celui des lymphocytes T conventionnels. Une différence majeure semble pourtant être le type de cellules leur présentant l'antigène : les lymphocytes iNKT sont facilement activés par des cellules de type macrophagiques (cellules de Kuppfer, macrophages sous-capsulaires). Cette observation est en accord avec le fait que, de part leur phénotype de lymphocytes T mémoire activé, les lymphocytes iNKT ne dépendent pas ou peu d'un signal de costimulation (engagement du CD28 par exemple) pour leur activation initiale [24, 72].

Après l'activation par le TCR, les lymphocytes iNKT réagissent systématiquement en produisant rapidement des quantités importantes de cytokines. La plupart des lymphocytes iNKT sont capables de produire à la fois des cytokines de type T_H1 (IFN- γ , TNF- α) et T_H2 (IL-4, IL-5, IL-13) ainsi que d'autres cytokines bien caractérisées comme l'IL-2 et le GM-CSF [58]. A la suite de cette phase de production de cytokines, les lymphocytes iNKT activés perdent l'expression surfacique du marqueur NK1.1 et du TCR semi-invariant et deviennent ainsi indétectables par les méthodes classiques de cytométrie (environ 12-24^h post-activation) [72, 73]. Une phase d'expansion proliférative des lymphocytes iNKT débute alors au cours de laquelle les lymphocytes iNKT recouvrent l'expression membranaire du TCR semi-invariant, mais pas de NK1.1, et deviennent ainsi à nouveau détectables par cytométrie. Cette prolifération atteint son maximum environ 3 jours après activation, où les lymphocytes iNKT peuvent représenter jusqu'à 10% des lymphocytes T de la rate, puis décroît progressivement jusqu'à ce que la population de lymphocytes iNKT retrouve son nombre initial environ 7-10 jours après activation [72, 73]. Suit alors une longue période réfractaire pendant laquelle les lymphocytes iNKT ne répondent pas ou peu à une nouvelle activation par le TCR [72]. Cette phase d'anergie est dépendante de l'expression de PD-1 à

la surface des lymphocytes iNKT activés (qui persiste à leur surface plus de 30 jours après l'activation initiale) et de ses ligands PD-L1 et PD-L2 à la surface des cellules présentatrices d'antigènes [74-76].

1.2.4. Diversité fonctionnelle des lymphocytes iNKT

Les lymphocytes iNKT sont, dans leur ensemble, capables de sécréter une très grande variété de cytokines après activation. Le découpage des lymphocytes iNKT en sous-populations selon leur expression du corécepteur CD4 ou du récepteur NK1.1 a permis de mettre en évidence une grande diversité fonctionnelle des lymphocytes iNKT associée à leur phénotype de surface [77]. On connaissait déjà chez l'homme la dichotomie entre lymphocytes iNKT CD4⁺, capables de produire à la fois des cytokines T_H1 et T_H2, et les lymphocytes iNKT DN au profil strictement T_H1 [78, 79]. Bien que cette séparation ne soit pas applicable aux lymphocytes iNKT murins, l'intégration du marqueur NK1.1 pour discriminer les sous-types de lymphocytes iNKT apporte une précision supplémentaire : de manière générale, les lymphocytes iNKT NK1.1⁻ produisent moins de cytokines T_H1 et plus de cytokines T_H2 que les lymphocytes iNKT NK1.1⁺ [40, 77]. De plus, des ligands synthétiques dérivés de l' α -GalCer sont capables d'induire des réponses biaisées vers la production de cytokines T_H1 (C-glycoside) ou T_H2 (OCH) [24, 80]. La production de cytokines, si importante pour l'activité immunomodulatrice des lymphocytes iNKT, est donc sujette à de multiples régulations impliquant le sous-type de lymphocytes iNKT activé, le ligand activant ces cellules, mais aussi la cellule présentatrice d'antigène et l'environnement cytokinique.

Les lymphocytes iNKT possèdent également des propriétés de cytotoxicité, en particulier quand ils sont activés par l'IL-12 et/ou l' α -GalCer [81, 82]. Les modalités fonctionnelles de cette cytotoxicité naturelle des lymphocytes iNKT, tout comme sa spécificité antigénique, sont assez mal caractérisées. Cependant une étude récente a montré que la cytotoxicité dépendante de l'engagement du TCR des lymphocytes iNKT par leur cible présentant un complexe glycolipide/CD1d est dépendante de l'expression du ligand de mort FasL sur les lymphocytes iNKT activés [83]. De plus, l'activation des lymphocytes iNKT humains par le ligand α -GalCer ou la cytokine pro-inflammatoire IL-12 induisent une expression accrue de perforine et leur cytotoxicité non-spécifique envers les cellules tumorales *in vitro* [79].

En outre, les lymphocytes iNKT sont capables d'influencer les réponses immunitaires par leur expression de molécules de costimulation après activation. Ainsi, l'activation des lymphocytes iNKT par le ligand α -GalCer induit leur expression rapide de CD40L qui à son

tour est responsable de la maturation et l'activation des cellules dendritiques et des lymphocytes B respectivement [25]. Ainsi, les lymphocytes iNKT participent à l'activation optimale des lymphocytes B lors des réponses primaire et mémoire [84] et les ligands agonistes de ces cellules représentent des candidats intéressants pour le développement de nouveaux adjuvants. De plus, l'expression d'OX40 par les lymphocytes iNKT activés induit l'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes exprimant OX40L et leur production massive d'IFN- α pendant les réponses antivirales [85].

Les lymphocytes iNKT exhibent donc un large panel de fonctions immunomodulatrices dépendantes de leur production de cytokines et de leur expression de molécules cytotoxiques et costimulatrices. Ces fonctions sont la base de l'action des lymphocytes iNKT à l'interface entre immunité innée et immunité adaptative et de leur rôle dans la physiopathologie de plusieurs maladies.

1.2.5. Rôle des lymphocytes iNKT en physiopathologie

Les lymphocytes iNKT jouent un rôle crucial dans le contrôle de la progression tumorale et de la formation de métastase dans plusieurs modèles de tumeurs murins [23]. L'effet anti-tumoral des lymphocytes iNKT repose sur leur capacité à produire de grandes quantités d'IFN- γ pour activer les lymphocytes NK, les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ ainsi que les cellules dendritiques productrices d'IL-12. Ainsi, l' α -GalCer a un effet drastique sur la formation de métastases hépatiques et pulmonaires dans le modèle de mélanome B16 chez la souris [81, 82]. Les lymphocytes iNKT peuvent aussi directement tuer les cellules tumorales par leurs propriétés de cytotoxicité naturelle. Les lymphocytes NKT de type 2 jouent par contre un rôle tolérogène favorisant la progression tumorale [23]. Des essais cliniques ont été entrepris chez les patients atteints de cancer solides à stade avancé testant l'injection d' α -GalCer ou de cellules dendritiques pulsées par α -GalCer pour promouvoir l'immunité anti-tumorale [86-88]. Même si une réponse biologique a pu être mesurée dans plusieurs de ces essais, le bénéfice clinique pour les patients n'a pas encore été clairement montré. Les lymphocytes iNKT restent une cible privilégiée des stratégies d'immunothérapie des cancers.

De part leur capacité à reconnaître des glycolipides bactériens ou à être activés indirectement par les cellules dendritiques et les macrophages lors d'infections bactériennes ou virales, les lymphocytes iNKT sont des sentinelles de première ligne dans la défense contre de nombreux microbes. Les lymphocytes iNKT sont impliqués dans l'élimination naturelle de bactéries comme *Sphingomonas* [26, 28], *Borrelia* [27, 70], ou *Mycobacterium* [67], et le traitement de souris infectées par α -GalCer accélère et renforce la réponse

immunitaire contre ces bactéries et d'autres comme *Listeria* [89, 90]. De plus, les lymphocytes iNKT jouent un rôle important dans la réponse aux infections virales dans des modèles murins d'infection par LCMV ou Influenza [85, 91]. Chez l'homme, des mutations génétiques responsables de déficiences sévères en lymphocytes iNKT (mutations de SAP, XIAP ou ITK) sont associées à des infections persistantes par le virus EBV [38, 39, 92, 93]. Enfin, les individus subissant des infections chroniques par des rétrovirus comme HIV-1 et HTLV-1 présentent quant à eux un déficit fonctionnel des lymphocytes iNKT [94, 95]. Ces éléments montrent bien le rôle crucial des lymphocytes iNKT dans les réponses antivirales.

Si le versant T_H1 des lymphocytes iNKT est important pour lutter contre les cancers et les infections microbiennes décrites ci-avant, leur versant T_H2 joue un rôle délétère dans les maladies allergiques, notamment l'asthme. Dans les modèles murins de cette maladie, la production d'IL-4 et d'IL-13 par les lymphocytes iNKT activés dans les poumons contribue grandement à l'infiltration des éosinophiles et des lymphocytes T_H2, ainsi qu'à l'épaississement du mucus des voies respiratoires, caractéristiques fondamentales de la physiopathologie de l'asthme [96, 97]. Bien que ces observations soient encore controversées, plusieurs études ont rapporté chez l'homme une corrélation entre la sévérité de l'asthme dont souffrent les patients et le nombre de lymphocytes iNKT infiltrant leurs voies respiratoires (recueillis dans les crachats ou dans les lavages bronchoalvéolaires) [98-100]. Dans les modèles murins, l'activation des lymphocytes iNKT par α -GalCer pendant le protocole de sensibilisation à l'allergène atténue la réponse asthmatique [101], alors que l'instillation nasale de cet agoniste des lymphocytes iNKT dans des animaux naïfs déclenche, en 24^h, des symptômes biologiques caractéristiques de l'asthme [102]. Ces observations démontrent combien la dualité T_H1/T_H2 des lymphocytes iNKT peut être exploitée différenciellement pour promouvoir ou atténuer des réponses immunitaires inflammatoires associées à des cytokines T_H2.

Les lymphocytes iNKT jouent un rôle immunorégulateur dans plusieurs modèles d'auto-immunité. La souche de souris NOD (« non-obese diabetic ») développe spontanément un diabète de type 1 avec l'âge. Or, ces souris ont un déficit numérique et fonctionnel en lymphocytes iNKT d'origine génétique [103, 104]. Mais l'activation chronique des lymphocytes iNKT par l'injection répétée d' α -GalCer permet d'inhiber le développement de la pathologie diabétique auto-immune dans ces souris [105, 106]. Dans d'autres modèles de cette pathologie, les lymphocytes iNKT, sans traitement par des ligands exogènes, sont capables d'inhiber la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ autoréactifs [107, 108]. Dans les modèles murins de la maladie du greffon contre l'hôte (« graft-versus-host disease », ou GVHD), principale complication mortelle de la greffe de cellules souches hématopoïétiques

allogéniques, les lymphocytes iNKT du receveur et de l'hôte jouent un rôle immuno-régulateur bénéfique [109]. Ce rôle immuno-régulateur est d'autant plus intéressant qu'il semble spécifique de la GVHD et ne s'accompagne pas d'une diminution de l'efficacité anti-tumorale du traitement [109, 110]. Toutefois, l'activation exogène des lymphocytes iNKT par α -GalCer [111], ou endogène par les cellules dendritiques de l'hôte activées par un traitement au G-CSF après irradiation [112], induisent une exacerbation de la GVHD. Ces résultats contrastés soulignent encore que la puissance immunorégulatrice des lymphocytes iNKT est difficile à manipuler de part la dualité de leur profil de sécrétion de cytokines (T_H1 vs T_H2).

1.2.6. Lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17

L'IL-17 (autrement appelée IL-17A) est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans l'inflammation auto-immune, les réponses immunitaires protectrices contre les pathogènes extracellulaires et l'étanchéité des barrières épithéliales. Cette cytokine, clonée pour la première fois en 1993, a suscité un vif intérêt chez les immunologistes puisque sa production par les lymphocytes T $CD4^+$ définit un nouveau lignage fonctionnel distinct des traditionnels T_H1 et T_H2 , les lymphocytes T_H17 . Si les lymphocytes T_H17 sont une source importante d'IL-17 lors des réponses immunitaires, la différenciation de lymphocytes T naïfs en lymphocyte T_H17 prend plusieurs jours, et des sources innées de cette cytokine doivent exister pour produire l'IL-17 dans les premières heures d'une réponse immunitaire. Parmi ces cellules de l'immunité innée capables de produire rapidement l'IL-17 après stimulation, on distingue les lymphocytes $T\gamma\delta$, les lymphocytes NK, les cellules « LTI-like » (pour « lymphoid tissue inducing »), les cellules de Paneth, les neutrophiles, et les lymphocytes iNKT [113].

La découverte d'une population de lymphocytes iNKT spécialisée dans la production d'IL-17 est récente (2007), bien qu'un travail effectué en 1996 avait montré que les thymocytes $TCR\alpha\beta^+ CD4^- CD8^-$ (fraction fortement enrichie en lymphocytes iNKT) étaient les principales cellules exprimant l'IL-17 après activation chez la souris [114]. Plusieurs études ont convergé dans la description d'un sous-type de lymphocytes iNKT portant le phénotype $CD4^- NK1.1^-$, exprimant le récepteur de l'IL-23 et le facteur de transcription ROR- γt (deux traits caractéristiques des lymphocytes T_H17) et produisant l'IL-17 mais pas l'IFN- γ après activation [65, 77, 115-119]. La sécrétion d'IL-17 peut-être déclenchée après engagement du TCR semi-invariant par des complexes CD1d/glycolipide ou après stimulation par l'IL-23 [115, 116, 119]. Le développement des lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 semble suivre une voie distincte des lymphocytes iNKT classiques divergeant à partir du stade 0 ou du

stade 1 : les précurseurs iNKT de stade 1 qui expriment ROR- γ t se différencient en lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 exclusivement, alors que les précurseurs iNKT du stade 1 ROR- γ t⁻ ne donnent que des lymphocytes iNKT classiques [117].

Le rôle physiologique spécifique des lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 est encore peu connu. Ces cellules sont impliquées dans le recrutement de neutrophiles dans les poumons et participent ainsi à l'hyperréactivité bronchique induite par certains produits bactériens ou l'ozone [118-120]. Dans la peau et les ganglions lymphatiques drainant, les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 sont activés dans des conditions inflammatoires et pourraient jouer un rôle important dans le maintien de cette inflammation locale [65]. Enfin, on retrouve des lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 dans les articulations de souris soumises à un modèle d'arthrite auto-immune, où ces cellules sont en partie responsables de l'inflammation locale [121].

Outre les fonctions de ces cellules, plusieurs questions fondamentales restent ouvertes à propos des lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 : (i) Si la production d'IL-17 et d'IFN- γ par les lymphocytes iNKT sont mutuellement exclusives, les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 sont-ils capables de produire aussi l'IL-4 ? (ii) Le phénotype NK1.1⁻ des lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 en périphérie traduit-il leur origine thymique récente ?

1.3. La neuropiline-1 et ses ligands

1.3.1. Neuropiline-1 : gène, protéine, isoformes, homologue

La neuropiline-1 (Nrp-1) est une protéine à un domaine transmembranaire présente chez les vertébrés. Chez l'homme, le gène *NRP1* se situe sur le chromosome 10 (position 10p12), alors que chez la souris, il est localisé sur le chromosome 8. Le gène *NRP1* contient 17 exons et englobe une région d'environ 150 kb. Le produit de traduction de l'ARNm le plus long de *NRP1* est une protéine de 923 a.a. (poids moléculaire apparent de 130 kDa), mais des épissages alternatifs peuvent générer des isoformes plus courtes de Nrp-1 de taille allant de 551 à 704 a.a [122-124]. Par défaut, le terme Nrp-1 désignera l'isoforme complète de Nrp-1 dans le reste de ce manuscrit.

Un schéma de la protéine Nrp-1 et ses différents domaines structurels est donné en **Figure 6**. La protéine Nrp-1 est divisée en un domaine extracellulaire de 840 a.a. environ, un court domaine transmembranaire d'une longueur d'environ 25 a.a., et d'une courte queue intracytoplasmique d'environ 40 a.a. en position C-terminale [125]. Par homologie avec d'autres protéines, on distingue plusieurs domaines structurels dans la partie extracellulaire de Nrp-1. En partant de l'extrémité N-terminale, deux domaines d'homologie avec les protéines du complément C1r et C1s (domaines a1 et a2), puis deux domaines d'homologie avec les facteurs de coagulation V et VII (domaines b1 et b2), précèdent un domaine « MAM » (méprine, A5, μ -phosphatase) (domaine c) [126]. Hormis les trois acides aminés SEA en position C-terminale, la partie intracytoplasmique de Nrp-1 n'a pas d'homologie particulière avec d'autres protéines connues. Ces différents domaines d'homologie ont des fonctions variées dans la signalisation dépendante de Nrp-1. Les régions a1 et a2 sont les principales zones d'interaction avec les ligands de la famille des sémaphorines de classe 3 (Sema3) et en particulier de Sema3A. La fixation de Sema3A sur Nrp-1 met aussi en jeu une partie du domaine b1. Les régions b1 et b2 servent à la fixation des ligands de la famille du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et en particulier de VEGF₁₆₅ [127]. Le domaine c est impliqué dans la dimérisation de Nrp-1 à la surface des cellules, tout comme la séquence peptidique **GXXXGXXXG (GVLLGAVCG)** du domaine transmembranaire [128]. La majeure partie du domaine intracytoplasmique de Nrp-1 n'a pas d'activité de signalisation ou d'interaction connue. Seuls les trois derniers acides aminés SEA peuvent servir de plateforme pour la fixation de protéines intracellulaires à domaine PDZ (PSD-95, DlgA, oz-1) [129]. Les isoformes courtes de Nrp-1 sont tronquées de la partie C-terminale sur une longueur plus ou moins grande et ne possèdent donc ni le domaine c, ni les domaines intracytoplasmique et transmembranaire. Ces isoformes sont donc solubles et

peuvent ainsi jouer le rôle de « dominant négatif » en piégeant les ligands de Nrp-1 dans le milieu extracellulaire [124].

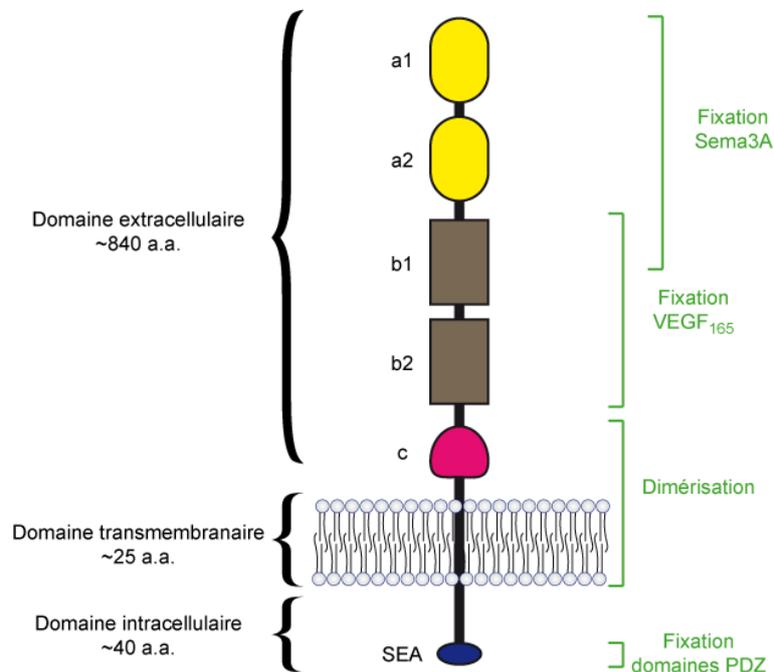


Figure 6. Schéma des différents domaines structuraux et fonctionnels de la protéine Nrp-1

Il existe une protéine analogue à Nrp-1, nommée neuropiline-2 (Nrp-2), qui partage 44% d'homologie de séquence au niveau protéique. Nrp-2 est organisée de la même façon que Nrp-1 en domaines a1, a2, b1, b2, c, transmembranaire et intracellulaire [125]. Nrp-2 peut aussi interagir avec des ligands des familles Sema3 et VEGF, mais n'est souvent pas exprimé sur les mêmes types cellulaires et ne participe donc pas aux mêmes fonctions. Tout comme le gène *NRP1*, le gène *NRP2* contient 17 exons et l'ARNm peut être épissé de manière alternative et donner naissance à des isoformes plus courtes de Nrp-2 [123]. Les fonctions biologiques dépendantes de Nrp-2 sont en général différentes de celles dépendantes de Nrp-1. En particulier, ces deux protéines ont des affinités différentes pour les ligands des familles Sema3 et VEGF et ne sont souvent pas exprimées sur les mêmes types cellulaires.

1.3.2. Ligands principaux de Nrp-1 : Sema3A et VEGF₁₆₅

Nrp-1 a d'abord été identifiée comme la cible d'un anticorps monoclonal, A5, exprimée en particulier dans les neuropiles (zones du cerveau riches en connexions

synaptiques, axones et dendrites) de certaines régions spécifiques du système nerveux central du xénope [126, 130]. Une dizaine d'années plus tard, en 1997, deux études ont montré que Nrp-1 était le récepteur spécifique de la protéine *Sema3A*, un facteur chimiorépulsif impliqué dans le guidage axonal pendant le développement du système nerveux [131, 132]. Un an plus tard, une étude a montré que Nrp-1 était exprimé sur les cellules endothéliales et les cellules tumorales et jouait le rôle de récepteur spécifique du facteur angiogénique $VEGF_{165}$ [133]. Bien que d'autres ligands de Nrp-1, appartenant ou non aux mêmes familles, ont ensuite été découverts, *Sema3A* et $VEGF_{165}$ sont de loin les protéines dont les effets sur les cellules exprimant Nrp-1 ont été les plus étudiés.

Les sémaphorines sont une famille de protéines solubles et transmembranaires retrouvées chez les invertébrés, les virus et les vertébrés, mais absentes chez les plantes. On distingue 8 classes de sémaphorines : la classe V (sémaphorines virales), les classes 1 et 2 (chez les invertébrés), et les classes 3 à 7 (chez les vertébrés). Les sémaphorines de classe 3 (*Sema3*) sont des protéines solubles d'environ 90 kD contenant un domaine structurel commun à toutes les sémaphorines (domaine *Sema*) en position N-terminale, ainsi qu'un domaine de type immunoglobuline, et une région basique en position C-terminale. On compte 7 membres dans cette famille de sémaphorines (*Sema3A-G*). Parmi ces membres, *Sema3A*, *Sema3B*, *Sema3C*, *Sema3E* et *Sema3F* se fixent à Nrp-1, alors que *Sema3B*, *Sema3C*, *Sema3F* et *Sema3G* se fixent à Nrp-2. Les affinités avec lesquelles ces différentes *Sema3* se fixent à Nrp-1 et Nrp-2 sont variables. Les couples ligand/récepteur les plus étudiés dans ce système sont *Sema3A/Nrp-1* et *Sema3F/Nrp-2* [125]. Le domaine *Sema* de *Sema3A* se fixe aux domaines a1 et a2 de Nrp-1, alors que la queue C-terminale basique de *Sema3A* interagit avec le domaine b1 [134]. Le domaine immunoglobuline et la queue basique de *Sema3A* sont aussi impliqués dans la formation d'homodimères de *Sema3A*, forme sous laquelle ce ligand est efficace pour induire ses effets sur les cellules Nrp-1⁺ [135].

Comme indiqué précédemment, Nrp-1 ne possède pas, dans sa partie intracytoplasmique, de domaine fonctionnel capable de transduction d'un signal. Les effets des ligands de Nrp-1 dépendent donc de la formation de complexes avec des corécepteurs capables, eux, de transmettre un signal intracellulaire. Dans le cas des *Sema3*, les corécepteurs impliqués dans la signalisation appartiennent à la famille des plexines. On compte 9 plexines distribuées en 4 familles (PlexinA-D). Les plexines impliquées dans la signalisation des *Sema3* sont principalement les PlexinA, dont on compte 4 membres (PlexinA1-4) [136]. Les plexines sont de grandes protéines transmembranaires dont la partie extracellulaire contient un domaine *Sema*, 2 ou 3 motifs riche en cystéines (motifs MRS « Met related sequence ») et 3 ou 4 motifs de type immunoglobuline (motifs IPT). La partie

intracellulaire des plexines contient deux domaines fonctionnels conservés, homologues à des protéines à activité Ras GAP (« GTPase-activating protein ») [125, 135]. L'holorécepteur responsable de la signalisation de Sema3A est formé de 2 molécules Sema3A, 2 molécules Nrp-1 et 2 molécules PlexinA (**Figure 7**) [125, 134, 135]. La signalisation induite par la formation de ce complexe résulte en l'activation de petites protéines des familles Rho, Ras et Rac, en l'activation de GSK3 α/β , puis en des modifications du cytosquelette d'actine et de tubuline [135]. Dans la majorité des cas, cette signalisation a pour effet de diminuer localement la polymérisation d'actine et des microtubules et par conséquent d'induire le « collapsus » cellulaire ou le changement de direction de cellules ou prolongements cellulaires motiles (chimiorépulsion). Cependant, en cas de concentration intracellulaire en second messenger GMPc élevée, l'effet de Sema3A sur les cellules Nrp-1⁺ est pro-migratoire et attractif [137, 138].

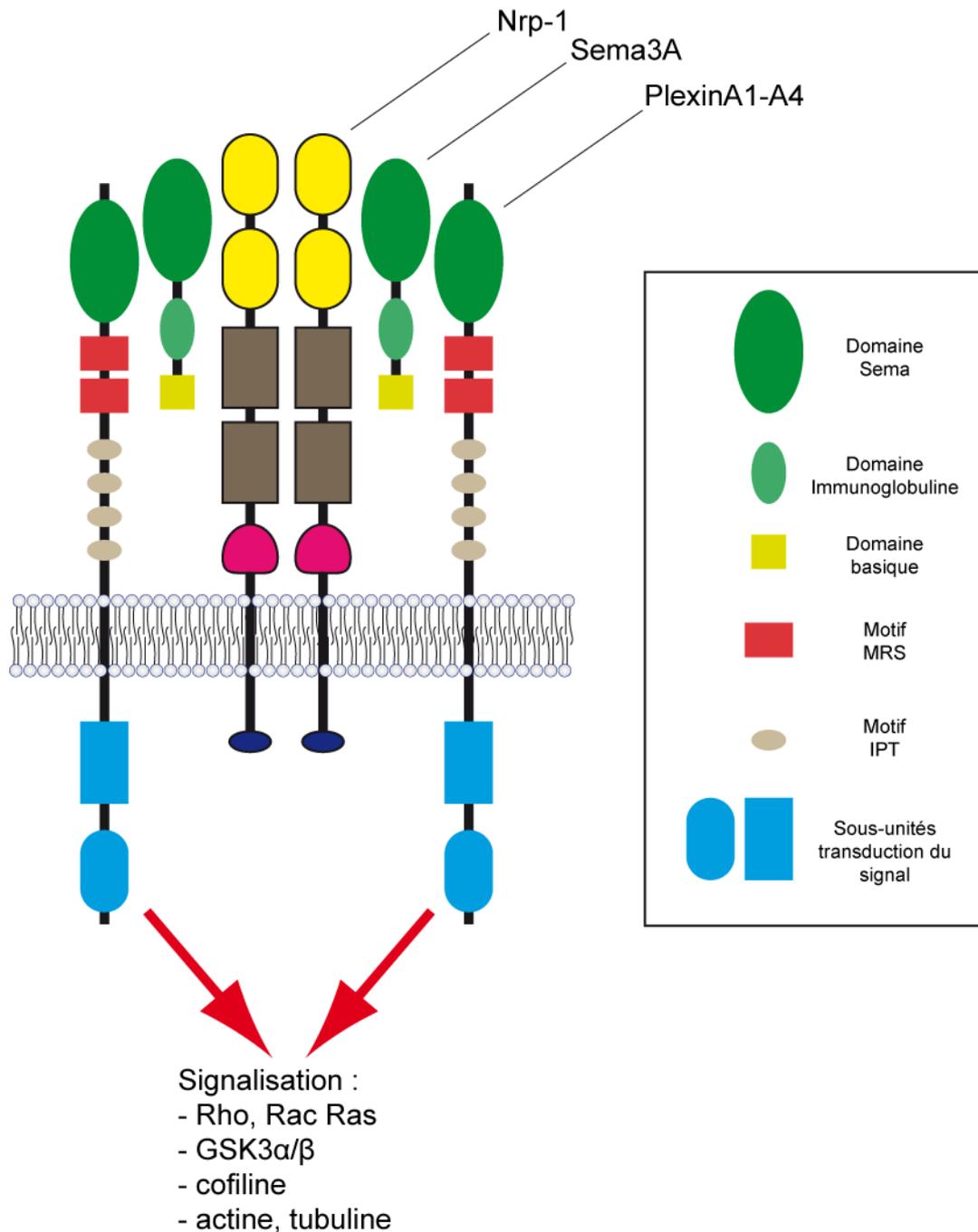


Figure 7. Complexe récepteur de Sema3A : holorécepteur Sema3A/Nrp-1/PlexinA

Les protéines de la famille du VEGF (« vascular endothelial growth factor ») comptent 5 membres : VEGF-A-D et PlGF (« placental growth factor »). Ces protéines sont toutes impliquées dans la vasculogénèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de cellules souches hématopoïétiques) et dans l'angiogénèse (bourgeonnement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants) pendant le développement embryonnaire et à l'âge adulte. Le membre le plus abondamment retrouvé, et étudié, est le

VEGF-A, souvent appelé simplement VEGF. L'épissage alternatif du gène du VEGF donne naissance à différentes isoformes de tailles différentes : VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆. Les VEGF sont des homodimères anti-parallèles reliés par deux ponts disulfures. L'isoforme la plus abondante et la plus active du VEGF est le VEGF₁₆₅, qui se fixe à Nrp-1 *via* les segments codés par les exons 7 et 8 [133]. Bien qu'il ait longtemps été considéré que seul l'exon 7 pouvait conférer au VEGF la capacité de lier Nrp-1, plusieurs études récentes ont montré que l'exon 8 conférait aussi cette propriété aux VEGF. En effet, le VEGF₁₂₁, qui ne contient pas l'exon 7, peut se lier à Nrp-1 *via* l'exon 8 [139]. De même, un petit peptide naturel homologue à la séquence codée par l'exon 8, la tuftsine, se fixe à Nrp-1 [140]. Les domaines b1 et b2 sont impliqués dans la fixation des différentes isoformes de VEGF sur Nrp-1 (**Figure 8**) [127].

La signalisation du VEGF sur les cellules Nrp-1⁺ (notamment les cellules endothéliales) nécessite, dans la plupart des cas, la présence du récepteur à activité tyrosine kinase VEGFR2 (aussi appelé KDR). Les récepteurs de cette famille (VEGFR1-3) sont des protéines transmembranaires contenant, dans leur partie extracellulaire, des motifs de type immunoglobuline, et dans la partie intracellulaire deux sous-unités à activité tyrosine kinase [125]. Le VEGFR2 est capable de fixer VEGF en l'absence de Nrp-1. Cependant, de nombreuses réponses des cellules endothéliales au VEGF nécessitent l'association de VEGFR2 avec Nrp-1. L'association de ces deux récepteurs renforce la signalisation (phosphorylation de tyrosines, activation des voies PI3K et de certaines voies MAPK) du VEGFR2. En particulier, l'expression de Nrp-1 est nécessaire à la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF [133, 141]. De plus, la fixation de VEGF sur Nrp-1, même en l'absence de VEGFR2, induit le recrutement d'une protéine à domaine PDZ, la synectine (aussi appelée GIPC ou NIP), sur la queue C-terminale intracytoplasmique de Nrp-1 (séquence SEA) [129, 142]. Cette signalisation participe aux effets de VEGF sur les cellules endothéliales.

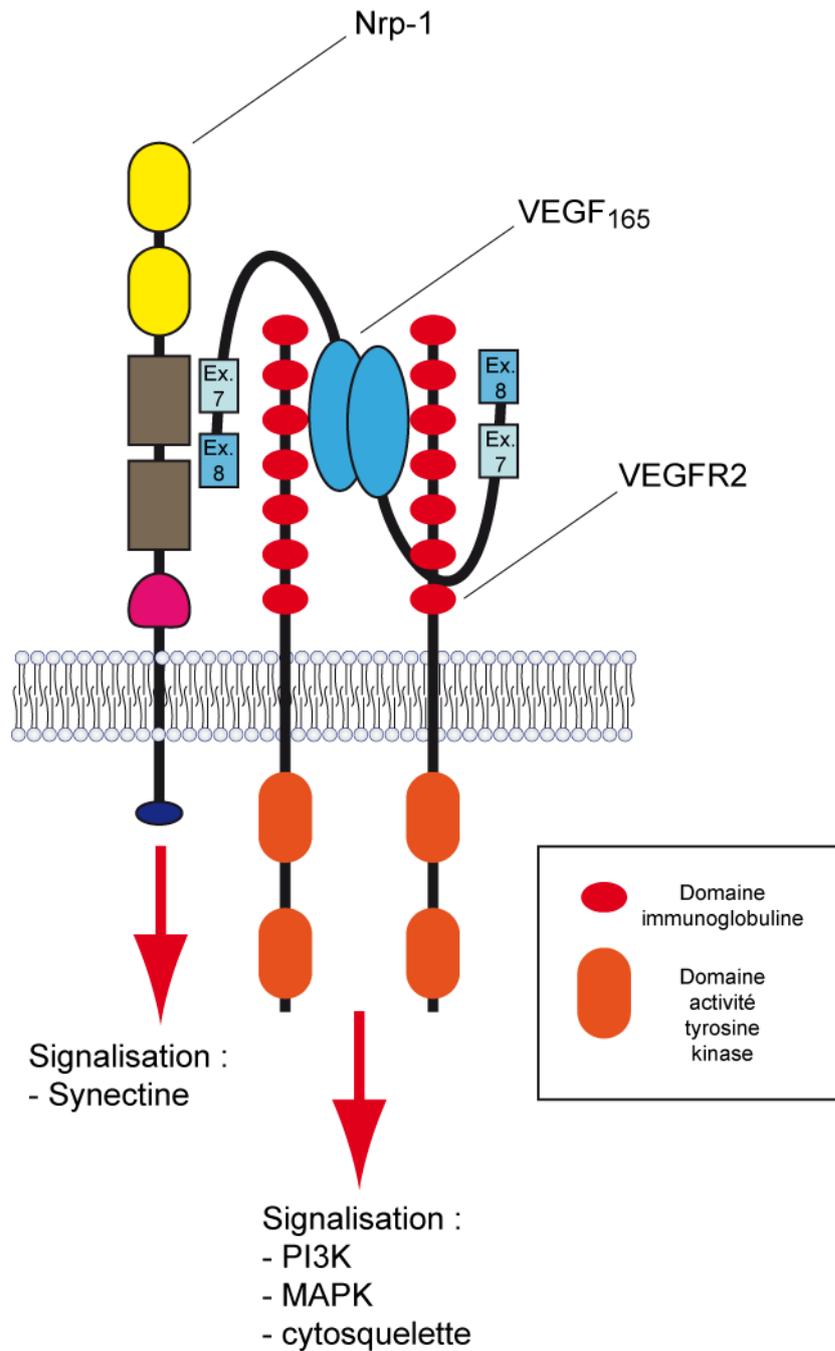


Figure 8. Complexe VEGF₁₆₅/Nrp-1/VEGFR2 et signalisation

1.3.3. Fonctions dépendantes de Nrp-1 dans le développement embryonnaire

L'étude du rôle de Nrp-1 dans le développement embryonnaire a été faite dans plusieurs modèles animaux de vertébrés : le poulet, le poisson zèbre, le xénope, la souris, le rat. Le rôle majeur de Nrp-1 dans le développement a notamment été caractérisé grâce à l'utilisation de souris transgéniques. Le **Tableau 2** résume les différents modèles de souris

transgéniques pour le gène NRP1. Ces modèles montrent un rôle prépondérant de Nrp-1 dans le développement des systèmes nerveux et cardiovasculaire.

Génotype	Phénotype	Références
<i>NRP1</i>^{-/-}	Absence de Nrp-1 dans toutes les cellules. Meurent entre 10.5 et 13.5 jours <i>post coïtum</i> . Défauts majeurs cardiovasculaires et neuronaux.	[143, 144]
<i>NRP1</i>^{Tg}	Surexpression de Nrp-1 dans toutes les cellules. Meurent au stade embryonnaire. Excès de capillaires sanguins, hémorragies. Défasciculation de fibres nerveuses.	[145]
<i>NRP1</i>^{Endo-/-}	Absence de Nrp-1 spécifiquement dans les cellules endothéliales. Meurent au stade embryonnaire tardif. Vasculature anormale peu ramifiée. Défauts cardiaques.	[141]
<i>NRP1</i>^{Sema-/-}	« Knock-in » dans le domaine a1 rendant impossible la fixation de Sema3A, mais pas de VEGF sur Nrp-1. Survivent à la naissance mais beaucoup de mortalité post-natale. Défasciculation des nerfs craniaux et spinaux. Connexions nerveuses sensorielles aberrantes. Pas de défaut cardiovasculaire.	[141]

Tableau 2. Phénotype des souris génétiquement modifiées pour *NRP1*

L'expression de Nrp-1 par différents types de neurones permet l'organisation du système nerveux central et périphérique grâce aux activités chimiorépulsives ou chemoattractives de Sema3A sur les prolongements cellulaires des neurones. De manière générale, les dendrites, au niveau desquelles la concentration cytosolique en GMPc est élevée, sont attirées par des gradients de Sema3A, alors que les axones sont repoussés par les sources de Sema3A. L'expression de Nrp-1 au niveau des axones est aussi nécessaire à la fasciculation (propriétés des axones à se regrouper en faisceaux pour former des nerfs) (**Figure 9**). Notons que le couple Sema3F/Nrp-2 joue un rôle non-redondant de celui du couple Sema3A/Nrp-1 dans l'organisation du système nerveux en développement. Ainsi, les neurones exprimant Nrp-2 et pas Nrp-1 ne sont pas sensibles à Sema3A et peuvent donc « coloniser » des zones où Sema3A est exprimée. Cette spécificité permet une plus grande complexité dans le plan d'organisation du système nerveux régulé par les interactions Sema3/Nrp.

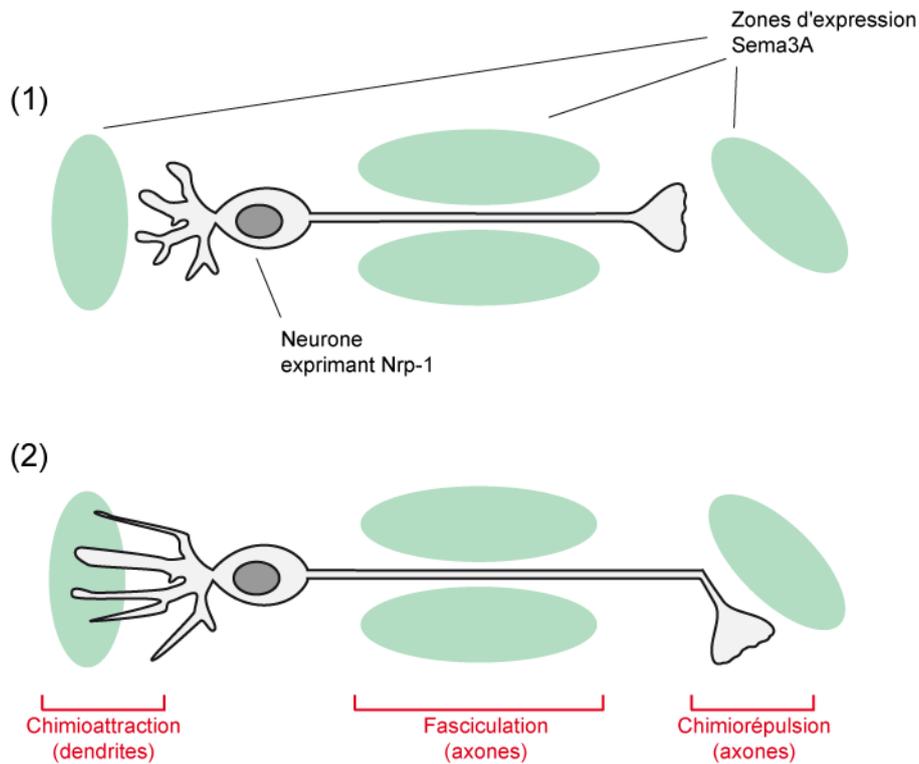
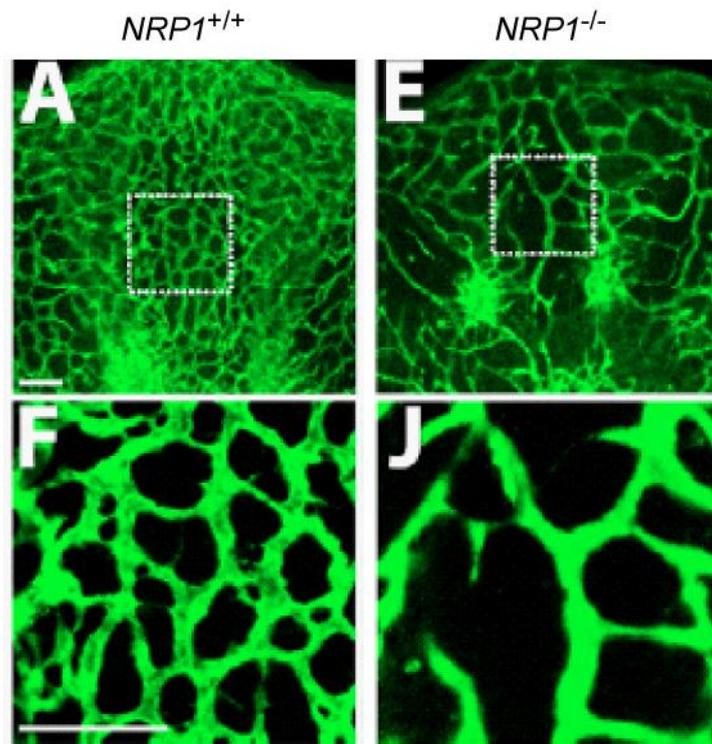


Figure 9. Effets dépendants du couple Sema3A/Nrp-1 dans le développement du système nerveux

Evolution temporelle de la croissance des prolongements cellulaires d'un neurone en réponse à des sources locales de Sema3A.

Bien que les défauts de développement du système nerveux soient majeurs en l'absence de Nrp-1, ce sont les défauts de développement cardiovasculaire qui entraînent la mort au stade embryonnaire précoce des souris *NRP1*^{-/-}. L'analyse de l'expression de Nrp-1 et Nrp-2 dans les premiers stades de développement de l'embryon de poulet suggère que l'expression de Nrp-1 est spécifique des artères, alors que Nrp-2 est plutôt exprimé sur les veines [146]. A un stade plus tardif, cette dichotomie entre les expressions de Nrp-1 et Nrp-2 ne distingue plus les artères et les veines, dont les cellules endothéliales n'expriment plus que Nrp-1. Par contre, l'expression de Nrp-2 semble être spécifique des cellules endothéliales lymphatiques. D'ailleurs, les souris *NRP2*^{-/-}, qui sont viables, ne présentent pas de défauts cardiovasculaires mais ont un nombre de capillaires et de vaisseaux lymphatiques diminué [147]. L'analyse des embryons de souris *NRP1*^{-/-} suggère un rôle crucial de Nrp-1 dans la migration des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, propriété nécessaire à l'angiogénèse embryonnaire et dépendante de l'action du VEGF (**Figure 10**). La comparaison des souris invalidées pour le gène *NRP1* spécifiquement dans les cellules endothéliales (souche *NRP1*^{Endo}^{-/-}) avec les souris dont la protéine Nrp-1 est spécifiquement déficiente dans son domaine de fixation de Sema3A (souche *NRP1*^{Sema}^{-/-}) a

permis d'établir que les fonctions de Nrp-1 dans le développement embryonnaire dépendent (i) du type cellulaire exprimant Nrp-1 (neurones vs cellules endothéliales) et (ii) du ligand agissant sur ces cellules (Sema3A vs VEGF) [141, 148].



D'après Vieira *et al.* Development (134) 2007.

Figure 10. Défaut de l'angiogénèse dans les membres antérieurs des embryons de souris *NRP1*^{-/-}

Marquages immunofluorescents des cellules endothéliales vasculaires (marqueur PECAM-1) des membres antérieurs de souris *NRP1*^{+/+} et *NRP1*^{-/-} à 12.5 jours *post coitum*. Il faut noter le faible nombre de ramifications des vaisseaux sanguins dans la souris *NRP1*^{-/-} dénotant un défaut de l'angiogénèse [148].

Nrp-1 et son ligand Sema3A jouent aussi un rôle important dans la régulation de la migration des cellules issues des crêtes neurales. Ces cellules délaminent de la partie dorsale du tube neural (la crête neurale) lors de la formation des somites et migrent dorso-ventralement pour se différencier en plusieurs tissus distincts (neurones du système nerveux périphérique, cellules de Schwann, mélanocytes). La migration des cellules issues des crêtes neurales, qui expriment Nrp-1, est régulée par la présence de Sema3A dans certaines zones des somites. Cette régulation est nécessaire notamment pour la segmentation des ganglions racinaires dorsaux d'où sortent les axones des nerfs sensoriels périphériques [149-151].

1.3.4. Fonctions dépendantes de Nrp-1 dans les tissus adultes

L'expression de Nrp-1 n'est pas restreinte aux tissus embryonnaires. Dans les tissus adultes, Nrp-1 et ses ligands peuvent aussi jouer des rôles importants, notamment dans le cas de plusieurs pathologies.

De nombreuses cellules tumorales expriment Nrp-1 [152-157]. L'expression de Nrp-1 dans les cancers est le plus souvent associée à un mauvais pronostic. Les cellules tumorales exprimant Nrp-1 répondent au VEGF ou à d'autres facteurs de croissance similaires, qui activent des voies de signalisation (PI3K, MAPK) favorisant la survie, la prolifération et la migration des cellules tumorales. De plus, Nrp-1 est aussi exprimé dans le microenvironnement tumoral et favorise la néoangiogénèse tumorale. Ces propriétés font de Nrp-1 une cible de choix pour les stratégies thérapeutiques antitumorales. Ainsi des anticorps bloquant spécifiquement la fixation de VEGF à Nrp-1 ont un effet additif majeur aux thérapies antiangiogéniques classiques (anti-VEGF) dans plusieurs modèles murins [158, 159]. Au contraire, plusieurs Sema3 ont un rôle anti-tumoral et anti-angiogénique sur les tumeurs exprimant Nrp-1 [160]. Deux études ont montré que Sema3B et Sema3F peuvent être exprimées sous le contrôle du suppresseur de tumeur p53, et que les gènes *SEMA3B* et *SEMA3F*, positionnés sur des régions génomiques souvent délétées dans certains cancers, peuvent donc être considérés comme des gènes suppresseurs de tumeurs [161, 162]. Les protéines Sema3A et Sema3F sont de puissants inhibiteurs de l'angiogénèse tumorale [160, 163, 164]. On peut donc considérer que dans les tumeurs, l'expression simultanée de Nrp-1 et Sema3A est de bon pronostic, alors que l'expression simultanée de Nrp-1 et VEGF favorise l'angiogénèse et est de mauvais pronostic.

Nrp-1 n'est presque pas exprimé sur les neurones à l'âge adulte dans les conditions normales. Cependant, en cas de dommages cellulaires (lésion de la moelle épinière par exemple), les neurones lésés expriment Nrp-1 au niveau de la lésion et il y a formation d'une cicatrice contenant des inhibiteurs de la croissance axonale comme Sema3A. Cette cicatrice empêche la régénération et la « soudure » des nerfs lésés, par un mécanisme dépendant de l'action chimioréulsive de Sema3A. Les cellules de Schwann en périphérie de la cicatrice expriment aussi Nrp-1 et subissent aussi la répulsion due à Sema3A. Dans ces conditions, un inhibiteur spécifique de la fixation de Sema3A sur Nrp-1, la xanthofulvine (ou SM-216289), permet la repousse et la myélinisation des axones au niveau de la lésion [165, 166]. Cette stratégie représente un espoir thérapeutique majeur pour les patients accidentés ayant subi une lésion de la moelle épinière.

Une autre pathologie semble impliquer une dérégulation de l'effet chimiorépulsif de Sema3A sur les cellules nerveuses Nrp-1⁺ : la dermatite atopique. Cette maladie se caractérise par des lésions érythémateuses prurigineuses cutanées avec infiltrats inflammatoires. Plusieurs études ont montré que les lésions de patients atteints de cette maladie présentent un défaut de Sema3A dans l'épiderme, alors que dans la peau saine, les kératinocytes de l'épiderme expriment Sema3A. Cette absence de Sema3A lèverait une barrière chimiorépulsive dans l'épiderme et résulterait en la migration anormale de fibres nerveuses sensorielles et de cellules inflammatoires dans la peau, responsables des symptômes de la maladie [167]. Dans le modèle murin de cette maladie, l'injection de Sema3A recombinante dans l'épiderme diminue les symptômes [168]. Chez les patients, la photothérapie rétablit l'expression de Sema3A dans les kératinocytes et diminue les symptômes [169]. Ces études montrent donc un rôle important de l'expression de Sema3A dans l'homéostasie de la peau chez l'adulte par son effet répulsif sur les fibres nerveuses sensorielles et les cellules inflammatoires. L'effet chimiorépulsif de Sema3A sur les cellules inflammatoires présage aussi de la fonction que peut avoir le couple Sema3A/Nrp-1 sur les cellules du système immunitaire. Cette dernière fonction sera décrite plus en détails ultérieurement.

1.3.5. Nouveaux ligands de Nrp-1

En plus des ligands classiques de Nrp-1 que sont les Sema3 et le VEGF, d'autres protéines interagissent avec Nrp-1. Ces nouveaux ligands de Nrp-1 ont été découverts plus récemment et n'ont pas fait l'objet d'études aussi approfondies que Sema3A et VEGF, mais les premiers résultats de ces études montrent que la diversité des ligands de Nrp-1 se traduit par une diversité des fonctions dépendantes de Nrp-1.

Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF, « platelet-derived growth factor ») est un des ligands alternatifs de Nrp-1. Trois études ont récemment montré que la fixation de PDGF sur Nrp-1 augmentait la signalisation de ce facteur de croissance par son récepteur PDGF-R et était impliquée dans la migration et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en péricytes (cellules stromales entourant les vaisseaux sanguins) et autres cellules stromales [170-172]. Dans ce cas, Nrp-1 semble opérer de manière analogue à son rôle dans la signalisation du VEGF par le VEGFR2.

Un autre facteur de croissance aux fonctions pléiotropes, le TGF-β1, est aussi capable de se fixer à Nrp-1. La fixation de la forme latente de TGF-β1 (LAP) à Nrp-1 induit un changement de conformation qui permet de libérer la forme active de cette molécule et promouvoir ainsi son activité [173]. De plus, la forme active de TGF-β1 peut aussi se lier à

Nrp-1 et induit alors préférentiellement la signalisation par la voie des protéines Smad2/3 et Smad4 [174]. Le rôle majeur du TGF- β 1 dans la régulation du système immunitaire présage aussi de l'intérêt d'étudier l'expression de Nrp-1 dans les cellules immunitaires.

1.4. La neuropiline-1 et ses ligands dans le système immunitaire

Les systèmes nerveux et immunitaire présentent des similitudes fonctionnelles et architecturales (voir **Tableau 3**). Plusieurs familles de protéines ayant une activité dans le développement et le fonctionnement du système nerveux se sont par la suite avérées nécessaires à l'organisation des réponses immunitaires. Une chimiokine comme CXCL12 joue par exemple un rôle important dans la migration des thymocytes immatures et l'organisation des centres germinatifs [2, 175], et est aussi impliquée dans la migration dirigée de certains axones exprimant son récepteur CXCR4 [176]. Ainsi, certaines sémaphorines sont exprimées par les cellules du système immunitaire et jouent des rôles spécifiques au cours des réponses immunes. Les sémaphorines immunitaires les plus étudiées et les mieux caractérisées sont les sémaphorines des classes 4, 6 et 7 [177, 178]. Ces sémaphorines, n'utilisant pas Nrp-1 comme corécepteur, sont impliquées dans l'activation des lymphocytes T, l'activation des lymphocytes B, l'activation des cellules dendritiques et des macrophages pro-inflammatoires. Bien que les fonctions des Sema3 dans les cellules immunitaires n'aient été que récemment étudiées, plusieurs de ces sémaphorines, dont Sema3A, semblent impliquées dans des processus immunitaires. Cependant, l'expression de son récepteur Nrp-1 n'a été que peu étudiée dans les cellules du système immunitaire. Le chapitre suivant résume les implications de Nrp-1 dans le système immunitaire connues à ce jour.

	Système nerveux	Système immunitaire
Dynamique	Migration et contacts cellulaires entre neurones pendant le développement.	Cellules immunitaires circulantes. Communication par contacts cellulaires et cytokines.
Plasticité	Formation/déformation/renforcement des contacts synaptiques en fonction de l'activité. Génération de nouveaux neurones à l'âge adulte.	Renouvellement des cellules du système immunitaire. Le contexte moléculaire (cytokines, costimulation) dicte le destin des cellules activées.
Mémoire	Mémorisation des pensées, actes, sensations. Mémoire codée dans l'architecture du réseau neuronal.	Mémorisation des infections rencontrées. Mémoire codée dans le répertoire des lymphocytes persistants après l'infection.

Tableau 3. Analogies fonctionnelles et structurelles des systèmes nerveux et immunitaire

1.4.1. Expression de Nrp-1 dans les organes lymphoïdes primaires

Le premier tissu lymphoïde où l'expression de Nrp-1 a été détectée est la moelle osseuse. Dans cet organe, Nrp-1 est exprimée principalement par les cellules stromales (fibroblastes, adipocytes) [179-181] et par les précurseurs hématopoïétiques de cellules endothéliales [182]. Les blastes de leucémie aigue myéloblastique peuvent aussi exprimer Nrp-1, ce qui représente un facteur de mauvais pronostic associé à une angiogénèse tumorale accrue dans la moelle osseuse [157]. La fonction de Nrp-1 dans la moelle osseuse est mal connue. Un des rôles décrits est celui de récepteur du VEGF important pour le développement des cellules endothéliales et la vascularisation de la moelle osseuse [182]. Cependant, son expression sur les cellules stromales de la moelle semble aussi être importante pour la régulation de la différenciation des différentes lignées hématopoïétiques. Ainsi, les adipocytes de la moelle inhibent, *in vitro*, la différenciation des cellules CD34⁺ en granulocytes par un mécanisme dépendant du contact cellulaire et bloqué par des anticorps anti-Nrp-1 [179]. De plus, le traitement de cellules stromales avec du VEGF augmente la production de facteurs de croissance hématopoïétiques (Flt3L, TPO) par un mécanisme dépendant de l'expression de Nrp-1 [181]. Ainsi, bien que les mécanismes soient encore obscures, l'expression de Nrp-1 dans la moelle osseuse participe à l'homéostasie de ce tissu hématopoïétique primaire.

Plusieurs études montrent aussi que Nrp-1, ainsi que ses ligands Sema3 et son homologue Nrp-2, sont exprimés dans le thymus humain [183, 184] et murin [183, 185-188]. Dans le thymus humain, Nrp-1 et Sema3A sont exprimés à la fois par les thymocytes et les cellules épithéliales thymiques ; l'expression de Nrp-1 est notamment retrouvée *in vitro* au niveau des synapses entre thymocytes et cellules épithéliales thymiques, ce qui suggère un rôle de molécule d'adhésion de Nrp-1 dans ces cellules [184]. De plus, Sema3A inhibe la migration des thymocytes spontanée ou en réponse à un gradient de CXCL12 [184]. Ces expériences *in vitro* suggèrent donc que le couple Nrp-1/Sema3A est un régulateur important de la migration et de l'adhésion lors du développement des lymphocytes T humains. Sema3E joue aussi un rôle important dans le développement des lymphocytes T en inhibant l'entrée dans la medulla des thymocytes DP exprimant son récepteur PlexinD1 [187]. Bien que l'expression de Nrp-1 ne soit pas nécessaire pour la fixation de Sema3E sur PlexinD1, cette étude suggère un rôle primordial et conservé des Sema3 dans le développement des lymphocytes T. Corbel *et al.* ont analysé l'expression de Nrp-1 dans les différents stades de développement des thymocytes murins [188] : Nrp-1 est principalement exprimée aux stades DN3, DN4, ISP et DP. Par marquage en immunohistochimie, ils ont montré que Nrp-1 était surtout exprimée sur les thymocytes corticaux et pas au niveau de la medulla, ce qui est

cohérent avec les analyses d'expression de Nrp-1 sur les différents sous-types de thymocytes. Par ailleurs, les thymocytes en phase S du cycle cellulaire expriment fortement Nrp-1, alors que les thymocytes dans d'autres phases du cycle l'expriment beaucoup moins [185]. Ces analyses suggèrent donc que dans le thymus murin, Nrp-1 est principalement exprimé sur les thymocytes corticaux en phase de prolifération. Le rôle de Nrp-1 dans le développement des lymphocytes T murins est inconnu : l'analyse de souris déficientes pour *NRP1* spécifiquement dans les thymocytes (croisement *NRP1*^{flox/flox} x Lck-Cre) n'ont pas de défaut apparent de la fonction thymique et ont des nombres normaux de lymphocytes T matures en périphérie [188]. La seule altération mineure observée dans le thymus de ces souris est une dérégulation de l'expression de CD25 aux stades DN3 et DN4 dans les souris mutantes, ce qui suggère un rôle de Nrp-1 dans la modulation de l'expression du récepteur CD25. Il est cependant probable que des rôles plus complexes de Nrp-1 dans la migration, l'adhésion, la prolifération, et l'export des thymocytes soient passés inaperçus dans cette étude peu approfondie.

1.4.2. *Nrp-1* : un marqueur des lymphocytes Treg murins

Nrp-1 a suscité un regain d'intérêt chez les immunologistes quand Bruder *et al.* ont montré que les lymphocytes Treg Foxp3⁺ murins expriment Nrp-1, à la différence des lymphocytes T conventionnels (CD25⁻ Foxp3⁻) [189]. L'expression différentielle de Nrp-1 est directement dépendante de l'expression de Foxp3 puisque la transduction rétrovirale du gène *FOXP3* dans des lymphocytes T conventionnels suffit à induire l'expression de Nrp-1 dans ces cellules [189]. *NRP1* fait donc partie, au même titre que *CD25*, *CTLA4* ou *GITR*, de la signature transcriptionnelle des lymphocytes Treg Foxp3⁺ murins [190]. Il reste cependant à déterminer si Foxp3 induit l'expression de Nrp-1 en se fixant directement dans des régions promotrices du gène *NRP1*, ou si l'induction de Nrp-1 nécessite d'autres facteurs de transcription dont l'activité est dépendante de Foxp3.

Deux études ont montré que Nrp-1 peut jouer des rôles dans l'effet immunosuppresseur des lymphocytes Treg Foxp3⁺. D'une part, Nrp-1 est nécessaire à l'établissement de contacts de longue durée entre les cellules dendritiques et les lymphocytes Treg spécifiques de l'antigène [191]. Ces interactions longues sont dépendantes de l'expression de Nrp-1 sur les cellules dendritiques et les lymphocytes Treg, au niveau de synapses immunologiques. Ainsi, l'expression spécifique de Nrp-1 sur les lymphocytes Treg murins favorise leur interaction avec les cellules dendritiques immatures présentant des auto-antigènes, aux dépens des lymphocytes T conventionnels spécifiques des mêmes antigènes mais n'exprimant pas Nrp-1 [191, 192]. D'autre part, comme je l'ai

décrit précédemment, Nrp-1 est potentiellement un récepteur activateur du TGF- β 1 latent [173]. A la surface des lymphocytes Treg murins, Nrp-1 permet donc la fixation du TGF- β 1 latent, son activation et sa présentation aux lymphocytes T conventionnels en cours d'activation. Nrp-1 participe ainsi de l'effet immunosuppresseur des lymphocytes Treg.

Si l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes Treg murins est bien décrite et fonctionnellement pertinente, il n'en est pas de même en ce qui concerne les lymphocytes Treg Foxp3⁺ humains. Plusieurs études du même groupe ont montré qu'une sous-population de lymphocytes Treg CD25⁺ Foxp3⁺ humains exprimant Nrp-1 est présente dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur de patientes atteintes de cancers du col de l'utérus [193]. Ces lymphocytes Treg Nrp-1⁺ sont supprimeurs *in vitro* et semblent émerger grâce aux conditions cytokiniques tolérogènes dans ces tissus [193, 194]. Cette observation semble être restreinte aux ganglions drainant la tumeur. En effet, une étude précédente [195], ainsi qu'un travail réalisé au début de ma thèse [196], montrent que les lymphocytes T Nrp-1⁺ présents dans les amygdales et les ganglions lymphatiques de patients sains n'expriment ni CD25, ni Foxp3. Ainsi, contrairement à ce qui est observé chez la souris, *NRP1* ne fait pas partie de la signature transcriptionnelle de Foxp3 et son expression chez l'homme semble plutôt concerner des populations de cellules régulatrices induites après activation de lymphocytes T en présence de cytokines tolérogènes comme le TGF- β 1.

1.4.3. *Nrp-1 et ses ligands dans les lymphocytes T et les cellules dendritiques*

Nrp-1 est exprimé sur les cellules dendritiques humaines et murines. Chez l'homme, Nrp-1 est exprimé fortement sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes et est mieux connu comme le marqueur d'identification BDCA-4 [195]. Nrp-1 est induit à la surface des monocytes après activation [197] et est aussi présent sur les cellules dendritiques dérivées de monocytes *in vitro* [198]. L'expression de Nrp-1 sur les cellules dendritiques joue certains rôles indépendants de leur activité de cellule présentatrice d'antigène pour les lymphocytes T. Ainsi, le ligand Sema3A inhibe la migration des monocytes activés humains *in vitro* [199], mais l'expression de Nrp-1 et de PlexinA1 par les cellules dendritiques activées murines est nécessaire à la transmigration des tissus vers la circulation lymphatique en réponse à Sema3A sécrétée par les cellules endothéliales lymphatiques [200]. L'expression de PlexinA1 sur les cellules dendritiques humaines et murines est aussi impliquée dans la réorganisation du cytosquelette et l'activation de ces cellules lors de l'établissement de synapses immunologiques avec les lymphocytes T [201-203]. Enfin, il a été montré que Nrp-1 était, avec le transporteur du glucose Glut1, un des récepteurs du virus HTLV-1 [204]. Ainsi, l'expression de Nrp-1 par les cellules dendritiques plasmacytoïdes leur permet de

répondre rapidement, par la production massive d'interférons de type 1, à une infection par le virus HTLV-1 *in vitro* [205].

En plus de ses rôles intrinsèques sur l'activité des cellules dendritiques, l'expression de Nrp-1 est impliquée dans les interactions avec les lymphocytes T et les réponses immunitaires initiées par les lymphocytes T en général. D'une part, Nrp-1 est exprimé au niveau de la synapse immunologique entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T humains, où elle semble impliquée dans des interactions homotypiques en *trans* nécessaires à l'initiation des réponses immunitaires [198]. L'expression de Nrp-1 au niveau de la synapse pourrait aussi permettre de transférer rapidement, par trogocytose, des molécules Nrp-1 de la membrane des cellules dendritiques à celle des lymphocytes T, et de permettre ainsi aux lymphocytes T activés de transporter le VEGF associé à Nrp-1 et d'augmenter la perméabilité vasculaire nécessaire à la transmigration vers les tissus infectés [206]. Par ailleurs, Sema3A, qui peut être sécrétée par les lymphocytes T activés et les cellules dendritiques, inhibe l'activation des lymphocytes T humains par ses effets de désorganisation du cytosquelette [207, 208], et sensibilise les lignées de lymphocytes T tumoraux à la mort induite par FasL [209]. Dans des modèles murins d'autoimmunité, les lymphocytes T *PlexinA4*^{-/-}, *Sema3A*^{-/-}, ou issus de souris « knock-in » dont la protéine Nrp-1 est mutée et ne peut fixer Sema3A (souche *NRP1*^{Sema3A^{-/-}}), une sur-prolifération des lymphocytes T est observée en réponse à une activation antigénique [210]. D'après ces résultats, l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes T est nécessaire à (i) l'établissement d'interactions longues entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques au sein d'une synapse immunologique [191, 192, 198], et à (ii) l'effet d'une boucle de régulation négative autocrine ou paracrine de Sema3A [207, 208, 210, 211] (**Figure 11**).

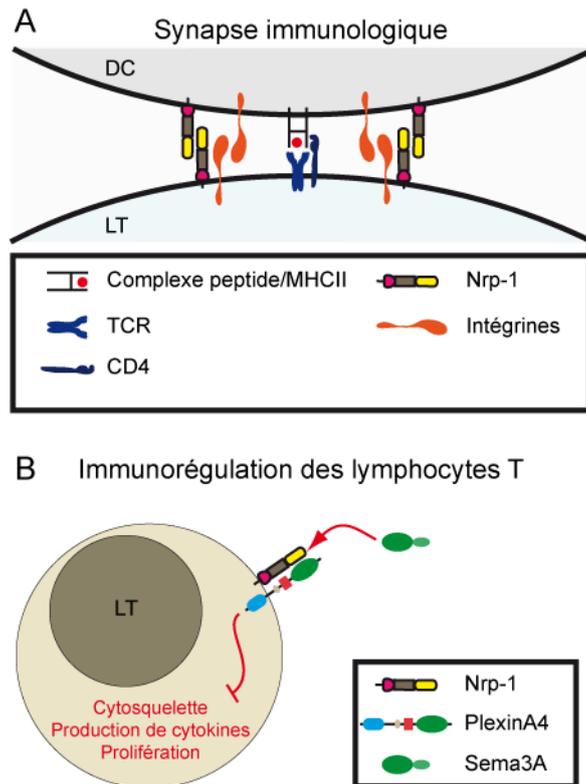


Figure 11. Principaux rôles décrits de Nrp-1 dans les réponses immunitaires impliquant les lymphocytes T

Les différentes études réalisées à ce jour sur le rôle de Nrp-1 dans les lymphocytes T montrent un rôle de Nrp-1 comme molécule d'adhésion homotypique au niveau des synapses immunologiques (A), et la fonction inhibitrice de l'holorécepteur composé de Sema3A, Nrp-1 et PlexinA4 sur l'activation des lymphocytes T (B).

Les éléments permettant l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes T matures sont assez peu connus. En dehors du phénomène de trogocytose décrit ci-dessus, il a été décrit que l'activation forte et non-spécifique des lymphocytes T humains induit l'expression de Nrp-1 [195, 198]. De plus, l'activation de lymphocytes T humains par le TCR induit, *in vitro*, l'expression de Nrp-1 indépendamment de la présence de cellules dendritiques [196, 212]. Chez la souris, la majorité des études de Nrp-1 dans les lymphocytes T s'est focalisée sur les lymphocytes Treg Foxp3⁺, et les conditions d'expression de Nrp-1 ainsi que les sous-types de lymphocytes T exprimant Nrp-1 n'ont pas été étudiés à ce jour.

2. Problématique

Au tout début de ce travail de thèse, j'ai participé à une étude comparée de l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes Treg humains et murins. Nous avons mis en évidence dans ce papier que l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes Treg n'est pas conservée entre la souris et l'homme [196]. Par contre, les nombreuses expériences de phénotypage et d'activation *in vitro* de lymphocytes T humains et murins nous ont permis de remarquer que l'expression de Nrp-1 sur des lymphocytes T Foxp3⁻ *in vivo* et après activation *in vitro* était une caractéristique partagée par les lymphocytes T humains et murins. Nous avons donc décidé d'approfondir nos connaissances sur l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T Foxp3⁻.

La problématique que je me suis posée pour répondre à cet objectif a été (i) d'identifier et de caractériser chez la souris les lymphocytes T Foxp3⁻ exprimant Nrp-1, et (ii) de comprendre l'origine de l'expression de Nrp-1 sur ces cellules et la fonction qu'elle leur confère. Rapidement, mes travaux ont porté sur deux sous-types de lymphocytes T différents : les lymphocytes iNKT et les lymphocytes Tαβ conventionnels.

Bien que les résultats obtenus sur ces deux sous-types soient traités séparément dans ce manuscrit, les expériences permettant d'aboutir à ces résultats ont été menées parallèlement. De ce fait, les résultats obtenus et les méthodes développées pour un projet ont contribué à l'avancée de l'autre, et *vice versa*. Ce cercle vertueux m'a permis de ne pas m'éparpiller entre ces deux sujets et de rester focalisé sur l'objectif et la problématique de ma thèse.

3. Matériels et méthodes

3.1. Expérimentations animales

3.1.1. Souris

Le modèle d'étude principalement utilisé dans ce travail est la souris femelle de souche C57BL/6. Pour certaines expériences de phénotypage, j'ai aussi utilisé des souris de souche Balb/c et NOD (« non-obese diabetic »). Les souris C57BL/6 et Balb/c provenaient de l'élevage JANVIER (Le-Genest-Saint-Isle, France). Les souris NOD ont été généreusement fournies par Agnès Lehen (INSERM U986, Hôpital Saint-Vincent-de-Paul, Paris). Les lymphocytes T CD8⁺ OT-1, dont le TCR est spécifique du peptide dérivé de l'ovalbumine SIINFEKL présenté dans le contexte CMH-I H-2K^b, ont été purifiés à partir des ganglions lymphatiques de souris OT-1 Rag^{-/-} sur fond C57BL/6, généreusement données par Philippe Bousso (INSERM U668, Institut Pasteur, Paris) et élevées dans notre animalerie. Les animaux étaient gardés dans notre animalerie dans les conditions de propreté et d'asepsie requises. Toutes les expériences sur l'animal ont été faites en accord avec le Comité Régional d'Ethique d'Ile de France.

3.1.2. Préparation de suspensions cellulaires, enrichissement et tri de populations cellulaires

Les suspensions cellulaires de thymus, rate et ganglions lymphatiques sont obtenues après broyat des organes dans du PBS + 2% SVF avec le piston d'une seringue de 2 ml, et filtration sur tamis de 40 ou 70 µm. Les érythrocytes sont éliminés des suspensions de splénocytes par choc hypotonique dans une solution tamponnée de chlorure d'ammonium (144 mM NH₄Cl + 17 mM Tris dans H₂O, pH = 7,2) pendant 5 minutes à température ambiante.

Pour préparer les lymphocytes hépatiques, les foies sont perfusés *via* la veine porte avec 10 ml de PBS froid, puis disséqués et broyés dans un tamis de 100 µm. Le filtrat est centrifugé 5 minutes à 600 tpm, le surnageant récupéré puis centrifugé 5 minutes à 1200 tpm. Le culot ainsi obtenu est remis en suspension dans une solution de Percoll (Sigma-Aldrich) à 35% (v/v) dans du RPMI1640, et centrifugé 20 minutes à 2600 tpm. Le culot est récupéré et les érythrocytes éliminés de la même manière que pour les splénocytes.

Pour préparer les lymphocytes pulmonaires, les poumons sont perfusés *via* le ventricule droit avec 10 ml de PBS froid, puis disséqués, finement ciselés, et incubés pendant 45 minutes à 37°C dans une solution de collagénase (1 mg/ml, Sigma-Aldrich) et de DNase (50 µg/ml, Roche) dans du RPMI1640. Les morceaux de poumons digérés sont alors

dissociés par aspiration/refoulement à l'aide d'une pipette, filtrés sur tamis de 100 µm et centrifugés 5 minutes à 1200 tpm. Le culot ainsi obtenu est remis en suspension dans une solution de Percoll à 35% (v/v) dans du RPMI1640, et centrifugé 20 minutes à 2600 tpm. Le culot est récupéré et les érythrocytes éliminés de la même manière que pour les splénocytes.

Pour certaines analyses ou le tri par FACS de lymphocytes iNKT, j'ai procédé à l'enrichissement préalable de suspensions cellulaires issues du thymus, de la rate ou des ganglions lymphatiques en lymphocytes iNKT. Pour ce faire, les suspensions cellulaires (30-50.10⁶ cellules/ml dans du PBS + 2% SVF) sont incubées avec des anticorps monoclonaux de rat anti-CD8α (1 µg/ml, clone 53-6.7), anti-CD62L (1 µg/ml, clone MEL-14), et anti-CD19 (1 µg/ml, clone 6D5) pendant 30 minutes à 4°C sous agitation. Les cellules sont alors lavées, et remises en suspension à la même concentration en présence de billes magnétiques recouvertes d'anticorps de chèvre anti-rat pendant 30 minutes à 4°C sous agitation. Deux marques de billes ont été utilisées. Les billes provenant de chez Invitrogen (Dynabeads) sont utilisées à une concentration de 100 µl/ml de suspension cellulaire, alors que les billes de chez Ademtech (Bio-Adembeads) sont utilisées à une concentration de 30 µl/ml de suspension cellulaire. Les tubes contenant les suspensions mixtes de cellules et de billes magnétiques sont alors disposés dans des aimants qui retiennent les billes magnétiques et les cellules qui leurs sont associées. Le surnageant récupéré ne contient plus les cellules CD8⁺ (lymphocytes T CD8⁺), CD62L⁺ (lymphocytes naïfs), et CD19⁺ (lymphocytes B) et est donc enrichi en lymphocytes iNKT. L'enrichissement de suspensions de thymocytes n'utilise que l'anticorps anti-CD8α.

Les lymphocytes T CD8⁺ ou CD4⁺ polyclonaux ont été triés magnétiquement à partir de suspensions cellulaires de rate et de ganglions lymphatiques de souris C57BL/6 femelles avec l'aide de kits de la marque Invitrogen, selon le protocole conseillé. Le principe de ces kits repose sur l'élimination des cellules B220⁺, CD11b⁺, Ter-119⁺, CD16/32⁺, et CD4⁺ ou CD8⁺, respectivement, par l'utilisation d'anticorps monoclonaux et de billes magnétiques comme décrit précédemment. Pour certaines expériences, les lymphocytes T totaux ont été triés magnétiquement à partir de suspensions cellulaires de rate et de ganglions lymphatiques avec l'aide d'un kit de la marque Miltenyi Biotec, selon le protocole conseillé. Le principe de ce kit repose sur l'élimination des cellules CD11b⁺, CD11c⁺, CD19⁺, B220⁺, CD49b⁺, CD105⁺, CMH-II⁺, et Ter-119⁺ par l'utilisation d'anticorps monoclonaux et de billes magnétiques comme décrit précédemment.

Pour obtenir les cellules dendritiques, la rate est perfusée par une solution de collagénase (1 mg/ml, Sigma-Aldrich) et de DNase (50 µg/ml, Roche) dans du RPMI1640,

découpée en morceaux et incubée pendant 30 minutes à 37°C. Les splénocytes sont alors préparés comme décrit précédemment dans un tampon PBS + 2% SVF + 2 mM EDTA, puis les cellules dendritiques sont triées positivement à l'aide de billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-CD11c, selon le protocole conseillé par le fabricant (CD11c Microbeads, Miltenyi Biotec).

3.1.3. Injection intra-thymique de FITC

Pour l'analyse des lymphocytes T émigrés thymiques récents (ETR), j'ai procédé au marquage *in situ* des thymocytes avec la molécule fluorescente FITC. Les souris C57BL/6 âgées de 5 semaines étaient anesthésiées par l'injection i.p. d'un mélange de kétamine (10 mg/kg) et de xylazine (1 mg/kg) dans 200 µl de PBS. La souris à opérer était disposée et maintenue sur le dos. La peau recouvrant la cage thoracique était tondu, épilée, puis incisée avec des ciseaux de manière à découvrir le haut du thorax. La cage thoracique était alors ouverte par une incision du sternum d'environ 5 mm vers le bas, et écartée à l'aide de pinces afin de visualiser le dessus des deux lobes thymiques. La solution de FITC (2 mg/ml en PBS) était injectée à l'aide d'une seringue Hamilton de 50 µl dans les deux lobes thymiques, à raison de 10 µl par lobe. La blessure était alors rapidement fermée par 2 ou 3 points de suture, et la souris mise à récupérer sur le flanc dans une cage chauffée jusqu'à son réveil complet. Dans ces expériences, les animaux du groupe contrôle ne subissaient aucune manipulation. Dans ces conditions, environ 30% des thymocytes étaient marqués FITC⁺ 24 heures après l'injection.

3.1.4. Thymectomie

Les souris C57BL/6 âgées de 8 semaines étaient anesthésiées, puis leur cage thoracique était ouverte, comme décrit précédemment. Pour procéder à l'ablation des deux lobes thymiques, chaque lobe était aspiré à l'aide d'un cône en plastique coupé au diamètre désiré (environ 1,5 mm) relié à une pompe à vide. La blessure était alors rapidement fermée et la souris mise à récupérer comme décrit précédemment. Dans ces expériences, les animaux du groupe contrôle étaient opérés de la même façon, mais le thymus n'était pas aspiré. Les effets de la thymectomie sur la distribution des sous-types de lymphocytes dans les organes lymphoïdes ont été analysés après 4 semaines. Au moment du sacrifice, je vérifiais que les animaux ayant subi une thymectomie n'avaient aucun reliquat de tissu thymique ; si je trouvais des restes, l'animal n'était pas analysé.

3.1.5. Activation des lymphocytes iNKT *in vivo*

L'analyse du phénotype des lymphocytes iNKT activés *in vivo* (expression de Nrp-1 et CD69 en surface) était réalisée après injection i.p. de 2 µg de l'agoniste α-GalCer dans 200 µl de PBS.

L'analyse de la production rapide de cytokines par les lymphocytes iNKT activés *in vivo* était réalisée après injection i.p. de 250 µg de l'inhibiteur du transport des protéines brefeldine A dans 200 µl de PBS, puis 30 minutes après de 2 µg d'α-GalCer dans 200 µl de PBS. Les souris étaient sacrifiées 2^h après la deuxième injection.

3.1.6. Incorporation de BrdU

L'analyse des thymocytes en prolifération était réalisée après injection i.p. de 2 mg de BrdU dans 200 µl de PBS. Les souris étaient sacrifiées une heure après l'injection pour analyser l'incorporation de BrdU dans l'ADN des thymocytes par cytométrie de flux.

Pour l'analyse de la prolifération homéostatique des lymphocytes iNKT, les souris recevaient une injection i.p. de 2 mg de BrdU dans 200 µl de PBS, puis durant 5 jours, leur eau de boisson était supplémentée avec du BrdU à 0,8 mg/ml. Les souris étaient alors sacrifiées pour analyser l'incorporation de BrdU dans l'ADN des lymphocytes iNKT par cytométrie de flux.

3.2. Culture cellulaire

3.2.1. Milieu de culture, drogues, protéines recombinantes

Le milieu de culture utilisé pour les lymphocytes T et iNKT murins était du RPMI1640 supplémenté avec 10% (v/v) SVF, 10 mM HEPES, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml pénicilline et 100 μ g/ml streptomycine. Afin d'éviter les contaminations, le milieu était filtré (0,45 μ m) et les suspensions cellulaires préparées sous une hotte à flux horizontal. Toutes les cultures *in vitro* étaient incubées dans une atmosphère humide, maintenue à 37°C avec 5% de CO₂.

Les protéines recombinantes suivantes ont été utilisées *in vitro* aux concentrations indiquées : IL-2 recombinante humaine (5-10 U/ml, Roche), IL-7 recombinante humaine (20 ng/ml, R&D Systems), IL-15 recombinante humaine (20 ng/ml, R&D Systems), TGF- β 1 recombinant humain (5 ng/ml, R&D Systems), Sema3A-Fc recombinante humaine (200 ng/ml, R&D Systems), anticorps polyclonal anti-Nrp-1 bloquant (10 μ g/ml, R&D Systems).

Les drogues activatrices et inhibitrices suivantes ont été utilisées *in vitro* aux concentrations indiquées : ciclosporine A (CsA, 10-100 ng/ml, Novartis Pharma), ionomycine (1 μ M, Sigma-Aldrich), α -GalCer (100 ng/ml, Alexis Biochemicals), phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA, 10 nM, Sigma-Aldrich), SB-203580 (1-10 μ M, Merck Chemicals), LiCl (10 mM, Sigma-Aldrich).

3.2.2. Activation des lymphocytes iNKT *in vitro*

Pour l'analyse de la prolifération et de la sécrétion de cytokines des lymphocytes iNKT, 20000 lymphocytes iNKT triés électroniquement étaient incubés en présence de 100000 splénocytes irradiés (30 Gy, générateur de rayons X) et d' α -GalCer 100 ng/ml dans 200 μ l de milieu de culture dans une plaque à 96 puits à fonds ronds pendant 72^h.

Pour l'analyse de l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes iNKT en prolifération, 2.10⁶ splénocytes, préalablement marqués avec 5 μ M de CFSE, étaient incubés dans 1 ml de milieu de culture en présence d'IL-7 recombinante, d'IL-15 recombinante, ou d' α -GalCer dans une plaque à 24 puits pendant 72^h.

Pour l'analyse de l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes iNKT stimulés par le TCR, une plaque à 96 puits à fonds ronds était préalablement recouverte avec des anticorps anti-CD3 ϵ (clone 145-2C11, fourni par Julien Diana, INSERM U986, Hôpital Saint-Vincent-de-Paul, Paris) et anti-CD28 (clone 37.51, Biolegend) à 5 μ g/ml dans 50 μ l de PBS pendant 2^h à 37°C. Après trois lavages de la plaque avec du PBS, 20000 lymphocytes iNKT Nrp-1

triés électriquement y étaient incubés dans 200 µl de milieu de culture pendant 24^h ou 48^h.

Pour stimuler *ex vivo* les lymphocytes iNKT afin de visualiser par cytométrie de flux leur production de cytokines, 500000 cellules de suspensions enrichies en lymphocytes iNKT étaient incubées dans 200 µl de milieu de culture supplémenté avec PMA, ionomycine, et brefeldine A pendant 3^h dans une plaque à 96 puits à fonds ronds.

3.2.3. Activation des lymphocytes T conventionnels

Pour l'activation des lymphocytes T polyclonaux, des plaques à 96 puits à fonds ronds étaient préalablement recouvertes avec des anticorps anti-CD3ε et anti-CD28 comme décrit précédemment. Les concentrations d'anticorps utilisées pour chaque expérience sont indiquées dans les légendes des figures. Les lymphocytes T triés (de 50000 à 100000 par puits selon les expériences) étaient alors incubés dans ces plaques dans 200 µl de milieu de culture.

Les lymphocytes T CD8⁺ OT-1 étaient activés de deux manières différentes selon les expériences. Dans certains cas, 100000 lymphocytes OT-1 étaient incubés avec 20000 cellules dendritiques dans 200 µl de milieu de culture en présence continue de doses variables du peptide agoniste SIINFEKL. Dans d'autres cas, les cellules dendritiques étaient d'abord incubées 30 minutes à température ambiante avec le peptide SIINFEKL dans du milieu RPMI1640 pur à une concentration de 10⁶ cellules/ml, puis lavées deux fois avant d'être mises en culture avec les lymphocytes OT-1 dans les mêmes proportions que décrit précédemment.

3.3. Analyses et tri cellulaire par cytométrie de flux

3.3.1. Anticorps utilisés, tétramère

Les anticorps suivants ont été utilisés pour le phénotypage des lymphocytes : anti-CD16/32 purifié (clone 2.4G2), FITC ou APC-AlexaFluor750 anti-TCR β (clone 57-597), PacificBlue ou PerCP-Cy5.5 anti-CD4 (clone RM4-5), PE-Cy7 ou APC anti-CD8 (clone 53-6.7), FITC anti-CD69 (clone H1.2F3), PE anti-NK1.1 (clone PK136), PE anti-CD122 (clone TM- β 1), AlexaFluor488 anti-Ki67 (clone B56), FITC anti-BrdU (clone 3D4), PE anti-CD24 (clone M1/69), PE-Cy7 anti-CD44 (clone IM7), PE ou PerCP-Cy5.5 anti-CD25 (clone PC61), PE anti-TCRV β 8 (clone F23.1), PE anti-TCRV β 7 (clone TR310), PE anti-TCRV β 2 (clone B20.6), PerCP-Cy5.5 anti-CD19 (clone 6D5), PacificBlue anti-IFN- γ (clone XMG1.2), PE-Cy7 anti-IL-4 (clone BVD6-24G2), PE anti-IL-13 (clone eBio 13A), PE anti-IL-17 (clone eBio 17B7), PacificBlue anti-CD3 ϵ (clone 500A2), APC anti-Foxp3 (clone FJK16S), anti-Nrp-1 purifié (polyclonal de chèvre, référence AF566), FITC ou PE ou AlexaFluor647 ou PE-Cy7 anti-IgG de chèvre. Quand cela est précisé dans la figure ou sa légende, des isotypes contrôles appropriés ont été utilisés pour les marquages. Tous ces anticorps ont été achetés chez BD Biosciences, eBioscience, Biolegend, R&D Systems, Santa Cruz Biotechnology et Invitrogen.

Le marquage spécifique des lymphocytes iNKT a été réalisé grâce aux tétramères de CD1d murins, chargés avec l'analogue d' α -GalCer PBS-57, conjugués aux fluorochromes PE ou APC, obtenus auprès du NIH Tetramer Core Facility.

3.3.2. Marquage de surface

Le marquage de surface des lymphocytes est effectué dans du PBS + 2% (v/v) SVF + 0,01% (m/v) NaN₃ (tampon FACS). Les différentes étapes de marquage se font sur la glace, à l'abri de la lumière. Les cellules à marquer (moins de $1-2 \cdot 10^6$ cellules par puits) sont disposées dans une plaque à 96 puits à fonds ronds, lavées dans 200 μ l de tampon FACS, puis incubées 10 minutes avec 10 μ l d'une solution d'anticorps anti-CD16/32 pour saturer les récepteurs aux fragments constants des immunoglobulines. Sans lavage, la première couche d'anticorps (20 μ l par puits de marquage) est ajoutée pendant 20-30 minutes. Les cellules sont lavées dans 200 μ l de tampon FACS et incubées avec une deuxième couche d'anticorps dans les mêmes conditions, si nécessaire. Après un dernier lavage dans le tampon FACS, les cellules marquées sont remises en suspension dans 200 μ l de tampon de fixation (tampon FACS + 1% (v/v) formol) et distribuées dans des tubes de 5 ml en

polypropylène. Dans ces conditions, les cellules peuvent être gardées à 4°C jusqu'à l'analyse au cytomètre jusqu'au lendemain si nécessaire.

Pour le marquage spécifique des lymphocytes iNKT, la première couche contenait le tétramère de CD1d, et la deuxième couche l'anti-TCR β ou l'anti-CD3 ϵ . Pour le marquage de Nrp-1, la première couche contenait l'anti-Nrp-1, et la deuxième couche l'anticorps secondaire anti-IgG de chèvre fluorescent.

3.3.3. Marquage intracellulaire des cytokines

Après marquage de surface, les cellules sont fixées dans 200 μ l de paraformaldéhyde (PFA) 4% (m/v) en PBS 5 minutes à température ambiante. Après centrifugation, les cellules sont lavées dans 200 μ l de tampon de perméabilisation (tampon FACS + 0,5% saponine (m/v)), puis incubées avec 20 μ l d'anticorps anti-cytokines fluorescents dilués dans le tampon de perméabilisation, pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les cellules sont alors lavées dans 200 μ l de tampon de perméabilisation, puis dans 200 μ l de tampon FACS avant d'être reprises dans 200 μ l de tampon de fixation et transférée dans des tubes de 5 ml en polypropylène.

3.3.4. Marquage intranucléaire

Les marquages intranucléaires de Foxp3 et Ki67 ont été effectués avec les réactifs d'un kit commercial de marquage de Foxp3 (Mouse/Rat Foxp3 Staining Kit, eBioscience), en adaptant les recommandations du fabricant concernant les volumes de réactifs et les concentrations des anticorps.

Le marquage du BrdU incorporé dans l'ADN a été effectué à l'aide d'un kit commercial (FITC BrdU Flow Kit, BD Biosciences) en suivant les recommandations du fabricant.

3.3.5. Tri, acquisition, analyse

Les marquages des cellules pour le tri électronique ont été effectués dans du PBS + 2% SVF sans NaN₃ à une concentration de 50-100.10⁶ cellules/ml. Les cellules marquées sont ensuite reprises dans le même tampon à une concentration de 40.10⁶ cellules/ml dans des tubes de 5 ml en polypropylène. Les tris cellulaires ont été effectués sur un FACS Aria II (BD Biosciences) de la plateforme de tri cellulaire de l'Institut de Recherche Necker Enfants Malades grâce à l'expertise de Jérôme Mégret et Corinne Garcia. Les populations cellulaires triées étaient immédiatement recueillies dans du milieu de culture froid. Les combinaisons d'anticorps utilisées pour les différents tris sont indiquées dans le **Tableau 4** ci-après.

Lymphocytes iNKT	FITC anti-TCR β	PE CD1d Tet	AlexaFluor647 anti- Nrp-1	-
Lymphocytes T	APC-AlexaFluor750 anti-TCR β	PerCP-Cy5.5 anti- CD25	PE-Cy7 anti-CD44	PacificBlue anti- CD4

Tableau 4. Combinaisons d'anticorps fluorescents utilisés pour le tri électronique

Pour l'analyse phénotypique et fonctionnelle par cytométrie de flux, un FACS Canto II (BD Biosciences) équipé de trois lasers (405, 488 et 633 nm) et de 10 détecteurs (FSC, SSC et 8 canaux de fluorescence) a été utilisé. L'acquisition des données a été effectuée grâce au logiciel FACS Diva (BD Biosciences), et l'analyse numérique et graphique des résultats grâce au logiciel FlowJo 7.6.1 (Treestar).

3.4. Analyse de la prolifération

3.4.1. Incorporation de [³H]-thymidine

Pour mesurer la prolifération des lymphocytes iNKT triés activés par α -GalCer pendant 72 heures, 1 μ Ci/puits de [³H]-thymidine (Amersham) ont été rajoutés pendant les 8 dernières heures de culture. La plaque de culture a alors été congelée à -20°C en attendant que la quantité de [³H]-thymidine incorporée dans l'ADN des cellules (mesurée en cpm) ne soit quantifiée grâce à un compteur bêta à microscintillation (Wallac).

3.4.2. Dilution du CFSE

Pour le marquage des cellules au carboxyfluorescein diacétate succinimidyl ester (CFDA-SE, couramment appelé CFSE), les cellules à marquer (10^5 - $50 \cdot 10^6$ cellules/ml en PBS) ont été incubées 10 minutes à 37°C en présence de 5 μ M de CFSE (Sigma-Aldrich), puis lavées trois fois dans un grand volume de PBS + 2% SVF froid. La prolifération (dilution du marquage CFSE à chaque division cellulaire) et le phénotype des cellules marquées au CFSE sont alors suivis par cytométrie de flux.

3.5. Analyse de la sécrétion d'IFN- γ et d'IL-4 par les lymphocytes iNKT

L'analyse des surnageants de culture de lymphocytes iNKT triés activés par α -GalCer a été effectuée grâce à un kit de détection de cytokines par cytométrie de flux (BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2 Cytokine Kit, BD Biosciences) en suivant les instructions du fabricant. La concentration en IFN- γ et IL-4 des surnageants de culture a été déterminée par rapport à une gamme de cytokines recombinantes fournies dans le kit.

3.6. Analyse par western blot

L'expression de Sema3A par les lymphocytes T activés a été déterminée par western blot. Deux millions de lymphocytes T CD4⁺ activés pendant différents temps ont été lavés, et les lysats cellulaires totaux ont été préparés dans 50 µl de tampon de lyse (50 mM Tris (HCl) pH=7,2 + 50 mM NaCl + 50 mM NaF + 1 mM Na₃VO₄ + 0,1% SDS + 1% Triton X-100) supplémenté en inhibiteurs de protéases (cocktail de chez Roche) pendant 10 minutes dans la glace. Après centrifugation 10 minutes à 14000 tpm à 4°C, le surnageant a été récupéré et la concentration en protéines totales des lysats a été déterminée par dosage colorimétrique (méthode BCA, Pierce).

Environ 20 µg de protéines issues de chaque condition ont été déposés dans un gel d'acrylamide (7,5% (v/v)) dénaturant et séparés par migration, puis les protéines ont été transférées sur membrane de PVDF. La membrane a été saturée par de la BSA, puis la Sema3A et l'actine ont été détectées par des anticorps primaires anti-Sema3A (ECM Biosciences) et anti-actine (Santa Cruz Biotechnology) suivis d'anticorps secondaires couplés à HRP (Santa Cruz Biotechnology). Les protéines détectées ont alors été révélées par chimioluminescence grâce à un kit commercial (Pierce). Les protéines détectées ainsi ont le poids moléculaire attendu (95 kDa pour Sema3A et 43 kDa pour l'actine).

3.7. Analyses statistiques

Les données sont exprimées en moyenne \pm erreur type, sauf mention contraire dans la légende de la figure. Le calcul des moyennes et erreurs types, les représentations graphiques des résultats, et les comparaisons des données entre différents groupes expérimentaux ont été effectués à l'aide du logiciel Prism 5.0 (GraphPad Software). Les tests statistiques appropriés indiqués dans les légendes des figures ont été utilisés. Une valeur p (« p-value ») inférieure à 0,05 a été considérée comme indicative d'une différence significative.

4. Résultats

4.1. Origine et fonctions des lymphocytes iNKT exprimant la neuropiline-1

L'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T régulateurs Foxp3⁺ a été largement démontrée et il est couramment admis que Nrp-1 est un marqueur spécifique des lymphocytes Treg murins [189-191, 196]. Cependant, lors des expériences de cytométrie de flux sur les organes lymphoïdes murins réalisées au laboratoire, il apparaissait clairement qu'une population de lymphocytes T Foxp3⁻ exprimait Nrp-1 à des niveaux au moins aussi fort que les lymphocytes Treg Foxp3⁺. Nous avons donc cherché à mettre en évidence si Nrp-1 était exprimé sur un autre type de lymphocytes T aux propriétés immunomodulatrices, les lymphocytes iNKT.

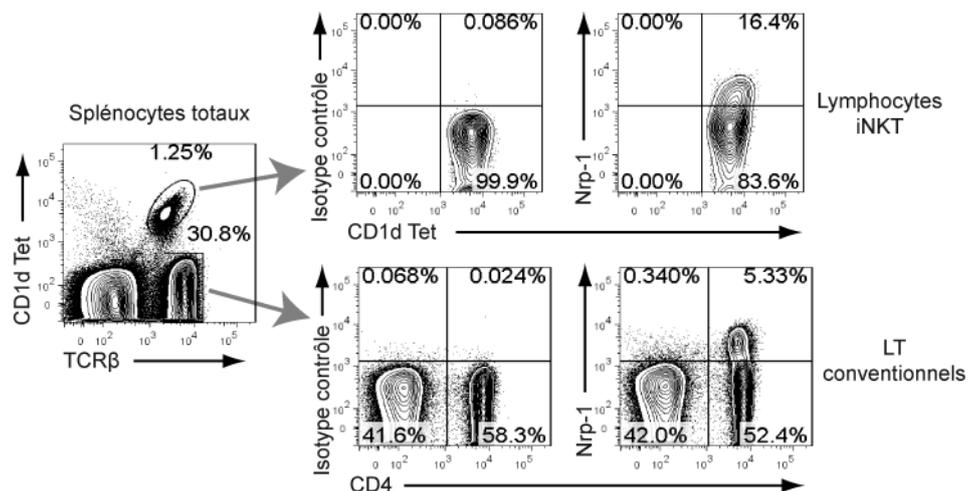


Figure 12. Expression de Nrp-1 par une sous-population de lymphocytes iNKT

Les splénocytes de souris C57BL/6 âgée de 8 semaines ont été préparés pour l'analyse de l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes iNKT (TCR β^+ CD1d Tet $^+$) et dans les lymphocytes T conventionnels (TCR β^+ CD1d Tet $^-$) par cytométrie de flux. La comparaison du marquage obtenu avec l'isotype contrôle permet de bien distinguer une population de lymphocytes iNKT Nrp-1 $^+$ ainsi qu'une population de lymphocytes T conventionnels Nrp-1 $^+$ (les Treg). Ces résultats sont représentatifs de plus de dix expériences indépendantes.

4.1.1. Caractérisation d'une sous-population de lymphocytes iNKT exprimant Nrp-1

J'ai utilisé un tétramère de la molécule CD1d chargé avec un analogue de l' α -GalCer (PBS57) pour identifier les lymphocytes iNKT murins (TCR β^+ CD1d Tet $^+$). Dans la rate, une sous-population de lymphocytes iNKT exprime Nrp-1 à un niveau similaire à celui observé sur les lymphocytes T conventionnels CD4 $^+$ Nrp-1 $^+$ (lymphocytes Treg principalement) (**Figure 12**). L'analyse de plusieurs organes lymphoïdes de souris C57BL/6 adultes (8

semaines) a montré que les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ étaient présents dans ces organes en des proportions variées, allant de 5% des lymphocytes iNKT du foie, à 10-15% des lymphocytes iNKT de la rate et du thymus et environ 45% des lymphocytes iNKT des ganglions lymphatiques (**Figure 13**).

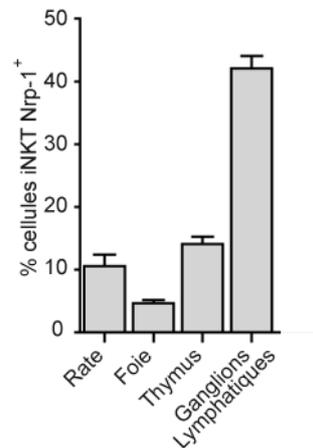


Figure 13. Répartition des lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ dans les principaux organes lymphoïdes

Abondance relative des lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ parmi les lymphocytes iNKT totaux de la rate, du foie, du thymus et des ganglions lymphatiques de souris C57BL/6 de 8 semaines (n=4), déterminée par cytométrie de flux.

L'analyse des marqueurs de maturité en surface des lymphocytes iNKT de la rate a établi que, contrairement aux lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ majoritaires qui ont un phénotype mature (CD69⁺ NK1.1⁺ CD122⁺), les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ ont un phénotype immature (CD69⁻ NK1.1⁻ CD122^{lo}) (**Figure 14**).

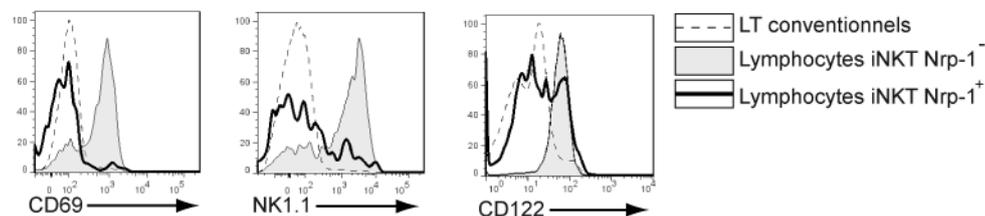


Figure 14. Les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ ont un phénotype immature

Expression de CD69, NK1.1 et CD122 à la surface des lymphocytes T conventionnels (trait interrompu), iNKT Nrp-1⁻ (gris), et iNKT Nrp-1⁺ (noir) de la rate d'une souris C57BL/6 âgée de 8 semaines. Ces résultats sont représentatifs de plus de cinq expériences indépendantes.

Afin de déterminer si ce sous-type de lymphocytes iNKT était aussi retrouvé dans d'autres souches de souris couramment utilisées dans des modèles d'étude des

lymphocytes iNKT, j'ai analysé la rate de souris de souche Balb/c et NOD. J'ai également pu mettre en évidence dans ces souches de souris une sous-population de lymphocytes iNKT spléniques exprimant fortement Nrp-1 et ayant un phénotype immature ($CD69^-$) (**Figure 15**). La suite de cette étude a été entièrement réalisée sur des souris de souche C57BL/6.

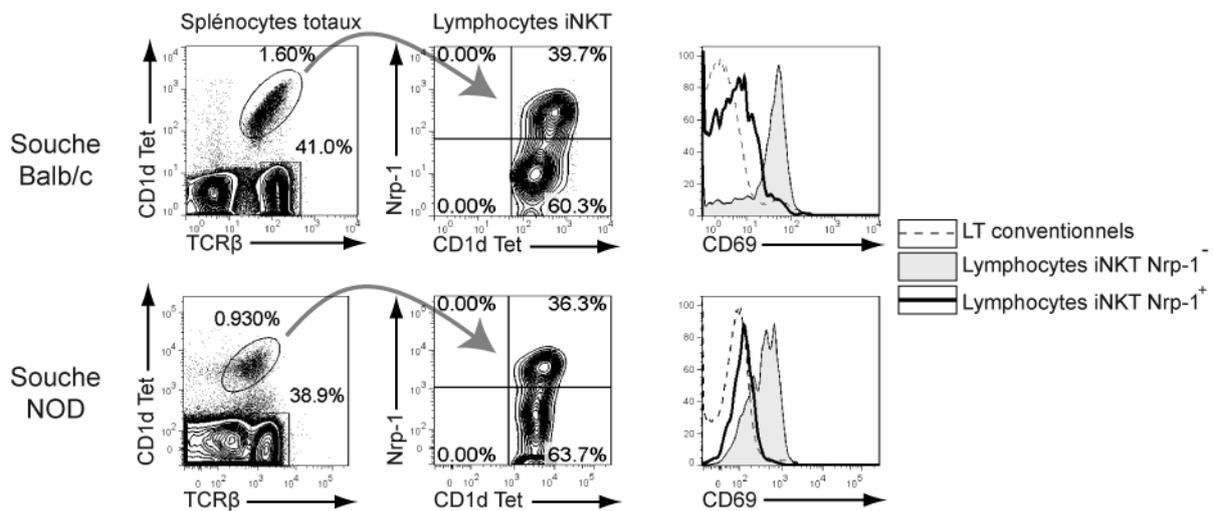


Figure 15. Expression de Nrp-1 par une sous-population de lymphocytes iNKT au phénotype immature dans les souches de souris Balb/c et NOD

Des splénocytes issus de souris Balb/c (en haut) et NOD (en bas) âgées de 8 semaines ont été préparés pour l'analyse de l'expression de Nrp-1 et de CD69 dans les lymphocytes iNKT ($TCR\beta^+ CD1d Tet^+$). On distingue aisément chez ces deux souches de souris une sous-population abondante de lymphocytes iNKT $Nrp-1^+$. L'analyse de l'expression de CD69 dans les lymphocytes T conventionnels (trait interrompu), iNKT $Nrp-1^-$ (gris) et iNKT $Nrp-1^+$ (noir) révèle que les lymphocytes iNKT $Nrp-1^+$ sont très majoritairement $CD69^-$ dans ces deux souches de souris. Ces résultats sont représentatifs de quatre souris de chaque souche analysées lors de deux expériences indépendantes.

Au cours de mes expériences de cytométrie de flux, j'ai remarqué que les lymphocytes iNKT $Nrp-1^+$ avaient une taille augmentée (fluorescence FSC plus élevée) par rapport aux lymphocytes iNKT $Nrp-1^-$. L'augmentation de taille est souvent associée, pour les lymphocytes, à une phase de prolifération, dite « blastique ». Afin d'établir le statut prolifératif des lymphocytes iNKT $Nrp-1^+$ *in vivo*, j'ai d'abord étudié l'expression intranucléaire du marqueur associé à la prolifération Ki67. Dans la rate, 25-30% des lymphocytes iNKT $Nrp-1^+$ expriment Ki67, contre seulement 7% des lymphocytes iNKT $Nrp-1^-$ (**Figure 16A**). Pour confirmer le fait qu'une grande partie des lymphocytes iNKT $Nrp-1^+$ est en prolifération *in vivo*, j'ai analysé l'incorporation de BrdU dans l'ADN des lymphocytes iNKT spléniques de souris ayant été traitées avec cet analogue de thymidine pendant 5 jours consécutifs. Là encore, 30-35% des lymphocytes iNKT $Nrp-1^+$ avaient incorporé le BrdU, contre seulement 5-10% des lymphocytes iNKT $Nrp-1^-$ (**Figure 16B**). Ces deux expériences établissent que les

lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ spléniques sont en prolifération *in vivo* dans des souris adultes naïves.

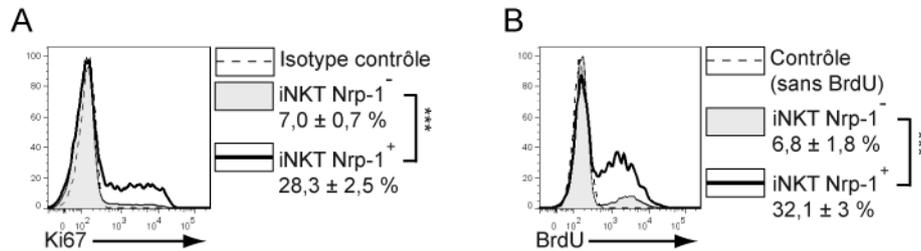


Figure 16. Une grande part des lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ spléniques est en prolifération *in vivo*

(A) Analyse par cytométrie de flux de l'expression du marqueur de prolifération Ki67 (marquage intra-nucléaire) dans les lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ (gris) et iNKT Nrp-1⁺ (noir). Le pourcentage de cellules Ki67⁺, déterminé par comparaison avec le marquage obtenu avec un isotype contrôle, est indiqué pour chaque sous-population (moyenne ± erreur type, n = 5 souris, *** : p<0,001, test t de Student). (B) Des souris C57BL/6 âgée de 8 semaines ont été injectées i.p. avec 2 mg de BrdU dans 200 µl de PBS ou uniquement 200 µl de PBS (contrôle). Les souris ayant reçu du BrdU ont ensuite bu pendant 5 jours consécutifs de l'eau contenant 0,8 mg/ml de BrdU. Les animaux ont ensuite été sacrifiés et la quantité de BrdU incorporée dans l'ADN des lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ (gris) et iNKT Nrp-1⁺ (noir) a été analysée par cytométrie de flux. Le pourcentage de cellules BrdU⁺, déterminé par comparaison avec le marquage obtenu pour les lymphocytes iNKT de souris n'ayant pas reçu de BrdU, est indiqué pour chaque sous-population (moyenne ± erreur type, n = 5 souris, *** : p<0,001, test t de Student).

Cet avantage prolifératif est aussi retrouvé après activation spécifique par l'α-GalCer *in vitro*. Dans ces conditions, les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ prolifèrent environ 3 fois plus que les lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ (Figure 17).

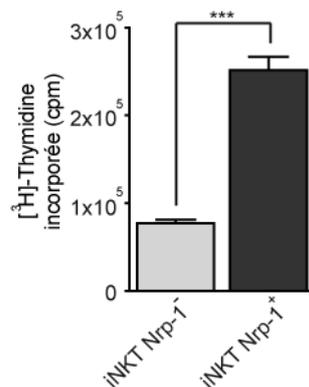


Figure 17. Les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ prolifèrent plus que les lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ après activation *in vitro*

Des lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ et iNKT Nrp-1⁺ ont été triés par cytométrie de flux à partir de rates de souris C57BL/6 âgées de 8 semaines. Ces cellules (2.10⁴) ont ensuite été activées pendant 72 heures en présence de splénocytes irradiés (1.10⁵, 30 Gy) et du ligand spécifique α-GalCer (100 ng/ml). Pendant les huit dernières heures de culture a été rajouté 1 µCi [³H]-thymidine. La prolifération des deux sous-types cellulaires a ensuite été déterminée en mesurant la quantité de radioactivité incorporée (en cpm) dans les cellules à l'aide d'un compteur bêta à micro-scintillation (***) : p<0,001, test T de Student).

En résumé, il existe dans les organes lymphoïdes de souris adultes naïves une sous-population de lymphocytes iNKT exprimant Nrp-1. Ces lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ ont un phénotype immature, et une partie importante d'entre eux sont en phase de prolifération dans la rate.

4.1.2. L'activation des lymphocytes iNKT par le TCR induit l'expression de Nrp-1

L'activation des lymphocytes iNKT par des glycolipides agonistes comme l' α -GalCer induit leur prolifération *in vitro* et *in vivo* [73]. Cependant, la prolifération homéostatique des lymphocytes iNKT *in vivo* repose sur l'activité des cytokines IL-7 et surtout IL-15 [61], et l'engagement du TCR par des glycolipides endogènes n'est pas nécessaire [62, 63].

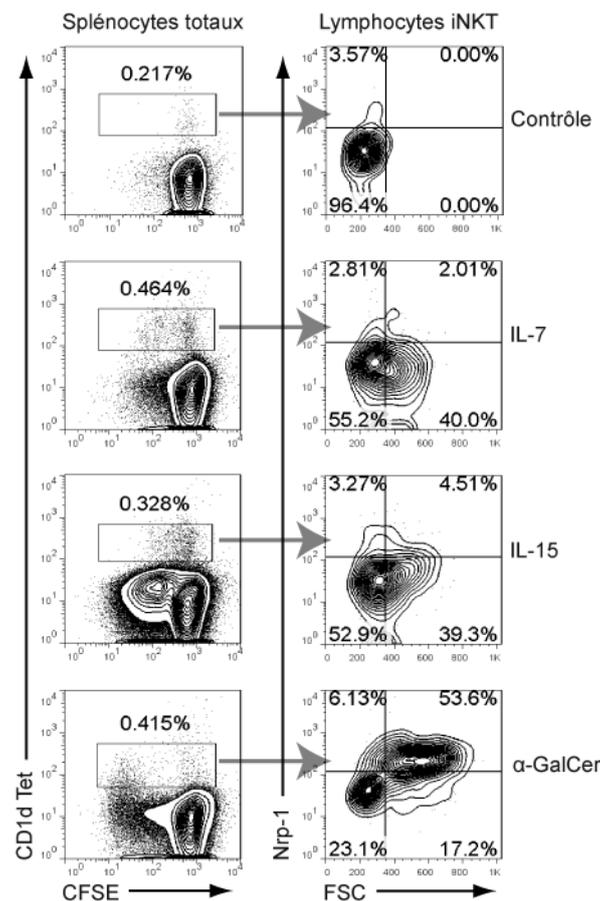


Figure 18. Expression différentielle de Nrp-1 par les lymphocytes iNKT activés après expansion par les cytokines homéostatiques IL-7 et IL-15 ou le ligand α -GalCer

Des splénocytes ($2 \cdot 10^6$) issus de souris C57BL/6 âgée de 8 semaines ont été marqués au CFSE puis cultivés pendant 72 heures en absence (contrôle) ou en présence d'IL-7 recombinante (20 ng/ml), d'IL-15 recombinante (20 ng/ml), ou d' α -GalCer (100 ng/ml). La dilution du CFSE dans les lymphocytes iNKT et l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes iNKT blastiques a alors été déterminée par cytométrie de flux. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences réalisées indépendamment.

Pour mieux comprendre quels mécanismes peuvent aboutir à l'expression de Nrp-1 sur la sous-population de lymphocytes iNKT décrite ci-avant, j'ai utilisé divers stimuli pour induire la prolifération et l'activation des lymphocytes iNKT *in vitro* et analysé l'expression de Nrp-1 sur les cellules activées. L'IL-7, l'IL-15 et α -GalCer étaient capables d'induire la prolifération (dilution du marquage CFSE) des lymphocytes iNKT (CD1d Tet⁺) en 3 jours (**Figure 18**, colonne de gauche), mais seuls les lymphocytes iNKT cultivés en présence d' α -GalCer présentaient une expression forte de Nrp-1 sur les cellules blastiques (FSC^{hi}) (**Figure 18**, colonne de droite). De plus, l'activation de lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ par des anticorps anti-CD3 ϵ et anti-CD28 était capable d'induire l'expression de Nrp-1 (**Figure 19**). L'ensemble de ces résultats montrent que l'engagement du TCR est capable d'induire l'expression de Nrp-1 à la surface des lymphocytes iNKT *in vitro*.

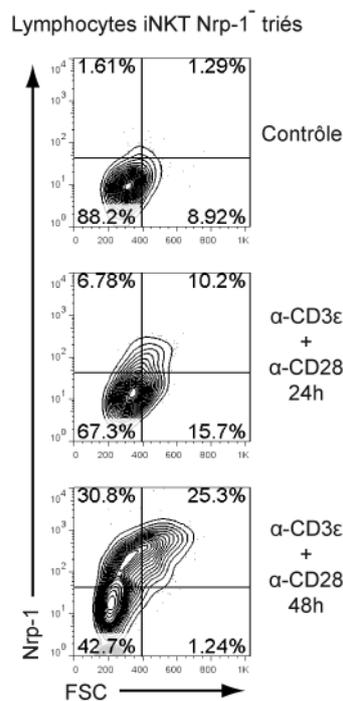


Figure 19. L'activation des lymphocytes iNKT par le TCR induit l'expression de Nrp-1

Des lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ ont été triés par cytométrie de flux à partir de rates de souris C57BL/6 âgées de 8 semaines. Ces cellules ($2 \cdot 10^4$) ont ensuite été activées en présence de 5 μ g/ml d'anticorps anti-CD3 ϵ et anti-CD28. Après 24 heures et 48 heures d'activation, l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes iNKT blastiques a été déterminée par cytométrie de flux. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences réalisées indépendamment.

L'injection de l'agoniste α -GalCer dans la cavité péritonéale de souris induit une activation massive des lymphocytes iNKT du foie et de la rate qui se caractérise notamment

par une expansion des lymphocytes iNKT dans ces organes, maximale à jour 3 après injection et qui décroît ensuite progressivement jusqu'à retrouver les proportions normales de lymphocytes iNKT 7 à 10 jours après l'injection [73]. Alors que dans les souris naïves seule la sous-population de lymphocytes iNKT immatures décrite plus haut exprime Nrp-1 (**Figure 20**, à gauche), 3 jours après l'injection i.p. d' α -GalCer plus de 90% des lymphocytes iNKT spléniques expriment fortement Nrp-1 (**Figure 20**, au milieu). Cette expression de Nrp-1 est accompagnée d'une diminution marquée de l'expression du marqueur précoce d'activation CD69, constitutivement exprimé sur les lymphocytes iNKT matures. Après 7 jours, l'expression de Nrp-1 est encore forte sur les lymphocytes iNKT et l'expression de CD69 commence à se rétablir (**Figure 20**, à droite).

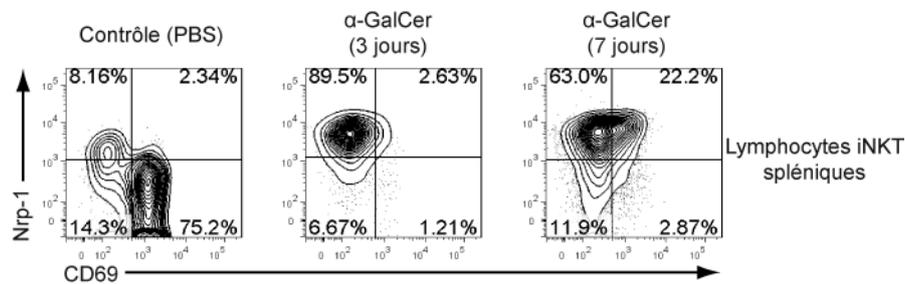


Figure 20. L'activation *in vivo* des lymphocytes iNKT par le ligand α -GalCer induit l'expression massive et durable de Nrp-1

Analyse, après 3 et 7 jours, de la co-expression de Nrp-1 et CD69 par les lymphocytes iNKT (TCR β^+ CD1d Tet $^+$) issus de la rate de souris ayant reçu une injection de 2 μ g α -GalCer dans 200 μ l de PBS, ou 200 μ l de PBS seul (contrôle), par voie i.p. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences réalisées indépendamment.

Ces résultats montrent que l'engagement du TCR induit l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes iNKT blastiques *in vitro* et *in vivo*. Cela suggère que l'expression de Nrp-1 observée sur la sous-population de lymphocytes iNKT immatures en division dans la rate de souris naïves est due à l'activation préalable de leur TCR.

4.1.3. Les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ périphériques correspondent aux émigrés thymiques récents (ETR)

Les thymocytes DP immatures (CD24⁺) porteurs du réarrangement canonique V α 14J α 18 des lymphocytes iNKT sont sélectionnés positivement par des thymocytes corticaux DP exprimant CD1d [34-36]. Cette interaction basée sur l'activation du TCR des précurseurs iNKT par un glycolipide endogène marque le début d'une phase d'expansion au cours de laquelle les lymphocytes iNKT thymiques acquièrent différents marqueurs de maturation. La prolifération des lymphocytes iNKT thymiques a lieu aux stades 1 (CD44^{lo}

NK1.1⁻) et 2 (CD44^{hi} NK1.1⁻), mais la maturation terminale intra-thymique en lymphocytes iNKT de stade 3 (CD44^{hi} NK1.1⁺) s'accompagne d'un arrêt de la prolifération [40]. L'analyse des différents stades de développement thymique des lymphocytes iNKT a révélé que les stades les plus immatures (CD24⁺, stades 1 et 2) expriment fortement Nrp-1 alors que les cellules iNKT au stade 3 l'expriment plus faiblement Nrp-1 (**Figure 21**). Donc, dans le thymus, la prolifération des lymphocytes iNKT déclenchée par l'activation du TCR est associée à une forte expression de Nrp-1.

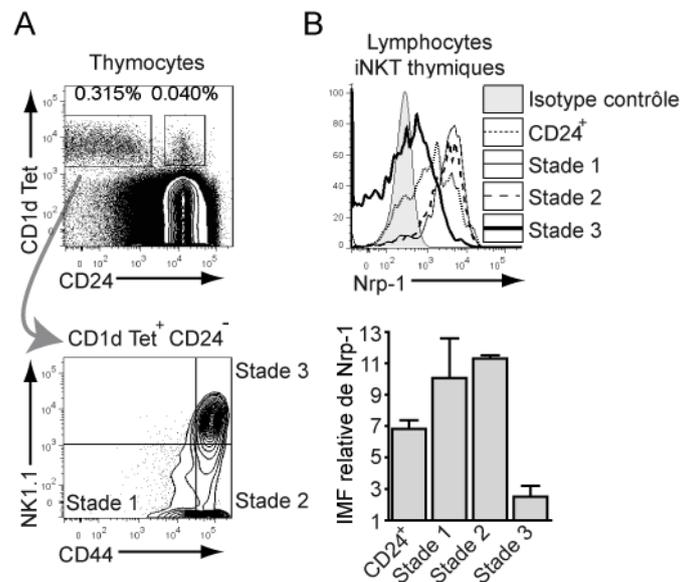


Figure 21. Nrp-1 est exprimé par les lymphocytes iNKT thymiques aux stades immatures

Les thymocytes de souris C57BL/6 âgées de 5 semaines ont été préparés pour l'analyse par cytométrie de flux de l'expression de Nrp-1 sur les différents stades de développement des lymphocytes iNKT. (A) Définition des différents stades de différenciation des lymphocytes iNKT, du plus immature CD24⁺ CD1d Tet⁺, en passant par le stade 1 (CD24⁻ CD1d Tet⁺ NK1.1⁻ CD44^{lo}) et le stade 2 (CD24⁻ CD1d Tet⁺ NK1.1⁻ CD44^{hi}), jusqu'au stade 3 (CD24⁻ CD1d Tet⁺ NK1.1⁺ CD44^{hi}) de lymphocytes iNKT matures résidents thymiques. (B) Analyse de l'expression de Nrp-1 sur les différents stades définis en (A) et quantification relative par rapport au marquage obtenu avec l'isotype contrôle de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) de Nrp-1 pour chaque sous-population (IMF relative de Nrp-1 = IMF_{Nrp-1} / IMF_{Isotype}, n = 4 souris dans deux expériences indépendantes).

La grande majorité des lymphocytes iNKT exportés du thymus vers les organes lymphoïdes périphériques portent le phénotype du stade 2 (CD44^{hi} NK1.1⁻) et achèvent leur maturation complète (le plus souvent associée à l'expression du marqueur NK1.1) dans les organes lymphoïdes périphériques [40, 41]. J'ai donc postulé que les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ observés dans les organes lymphoïdes périphériques pouvaient être des émigrés thymiques récents (ETR) dont l'activité proliférative était rémanente du processus de sélection positive intra-thymique. Afin d'étudier les lymphocytes ETR, j'ai procédé à une

injection de la molécule fluorescente FITC dans les deux lobes thymiques de souris âgées de 5 semaines. Cette molécule marque non-spécifiquement environ 30% des thymocytes et permet de détecter, après quelques heures, les lymphocytes ETR (FITC⁺) dans les organes périphériques. Par cette méthode, j'ai observé que 36 heures après injection de FITC intra-thymique, la grande majorité (85%) des lymphocytes iNKT ETR (CD1d Tet⁺ FITC⁺) expriment Nrp-1 (**Figure 22**). Etant donné que (i) les lymphocytes iNKT FITC⁺ ne représentent en réalité que 30% de la totalité des lymphocytes iNKT ETR sortis pendant les 36 heures écoulées avant le sacrifice de la souris, (ii) environ 10% de la population de lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ sont FITC⁺ (**Figure 22B**, en haut), et (iii) la proportion de lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ parmi les lymphocytes iNKT spléniques est assez stable sur de courtes échelles de temps, j'ai pu calculer qu'une période d'environ 5 jours était nécessaire pour assurer le renouvellement complet de la population de lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ par des ETR. Ces données montrent ainsi que Nrp-1 est exprimé sur la grande majorité des lymphocytes iNKT ETR, et suggèrent que l'expression de Nrp-1 n'est que transitoire après la sortie du thymus et que la population de lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ périphériques est maintenue constamment par l'export thymique.

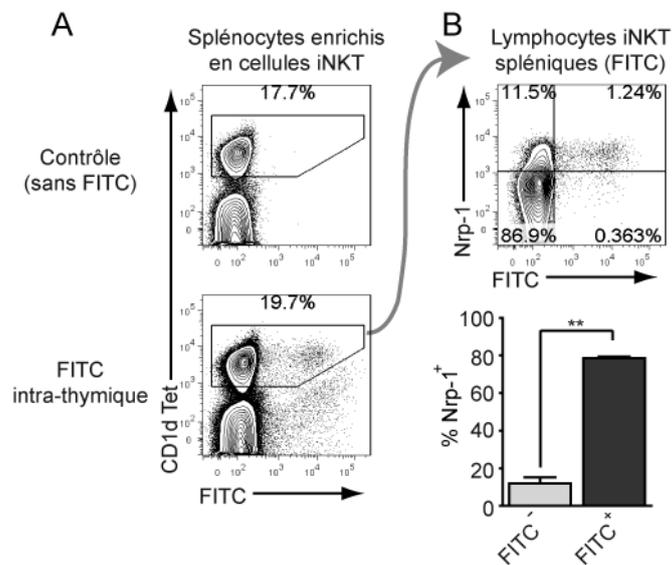


Figure 22. Les lymphocytes iNKT émigrés thymiques récents (ETR) expriment Nrp-1

Les splénocytes de souris C57BL/6 de 5 semaines ont été préparés et enrichis en lymphocytes iNKT par déplétion magnétique 36 heures après l'injection, ou non, de FITC intra-thymique. (A) Identification des lymphocytes iNKT CD1d Tet⁺ dans les animaux contrôle (sans FITC) et les animaux ayant reçu l'injection de FITC. (B) Co-marquage Nrp-1 et FITC sur les lymphocytes iNKT spléniques de souris ayant reçu l'injection de FITC, et quantification du pourcentage de lymphocytes iNKT FITC⁻ et FITC⁺ exprimant Nrp-1 (** : p<0,01, n = 4 souris dans deux expériences indépendantes).

De manière intéressante, les lymphocytes T conventionnels ETR n'expriment pas Nrp-1 (**Figure 23A**), à l'exception des lymphocytes Treg CD4⁺ CD25⁺ (**Figure 23B**). Ceci suggère que l'expression de Nrp-1 n'est pas nécessaire à l'export thymique de lymphocytes, et que l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes iNKT et Treg ETR reflète respectivement un mode de sélection particulier et l'expression du facteur de transcription Foxp3.

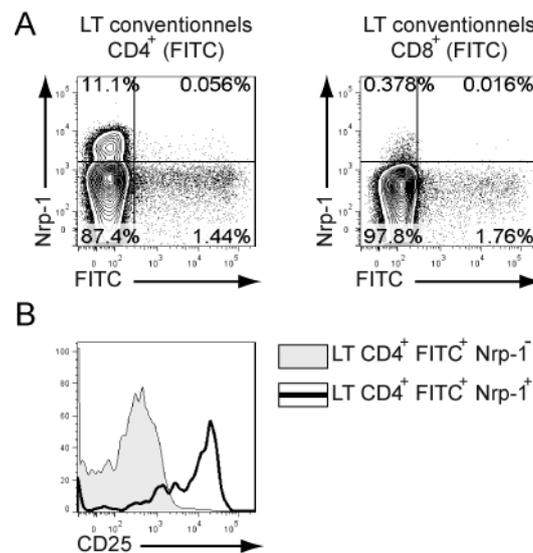


Figure 23. Hormis les lymphocytes Treg CD4⁺ CD25⁺, les lymphocytes T conventionnels ETR n'expriment pas Nrp-1

Les lymphocytes des ganglions lymphatiques périphériques de souris C57BL/6 de 5 semaines ont été préparés 36 heures après l'injection de FITC intra-thymique. (A) Analyse de la co-expression de Nrp-1 et FITC dans les lymphocytes T conventionnels (TCRβ⁺) CD4⁺ et CD8⁺. (B) Expression du marqueur des lymphocytes Treg CD25 dans les lymphocytes T CD4⁺ ETR Nrp-1⁻ (gris) et Nrp-1⁺ (noir). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

Afin d'approfondir le rôle du thymus dans l'homéostasie des lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ périphériques des souris adultes, j'ai procédé à la thymectomie complète de souris à l'âge de 8 semaines. Après 4 semaines, l'analyse de la rate et des ganglions lymphatiques périphériques (inguinaux, axillaires et brachiaux) révèle que les animaux ayant subi une thymectomie ont un nombre total de lymphocytes T réduit, mais que le nombre de lymphocytes T de phénotype mémoire (CD44^{hi}) n'est pas affecté (**Figure 24**). Ces résultats montrent l'efficacité de la thymectomie à diminuer le nombre de lymphocytes T naïfs en périphérie.

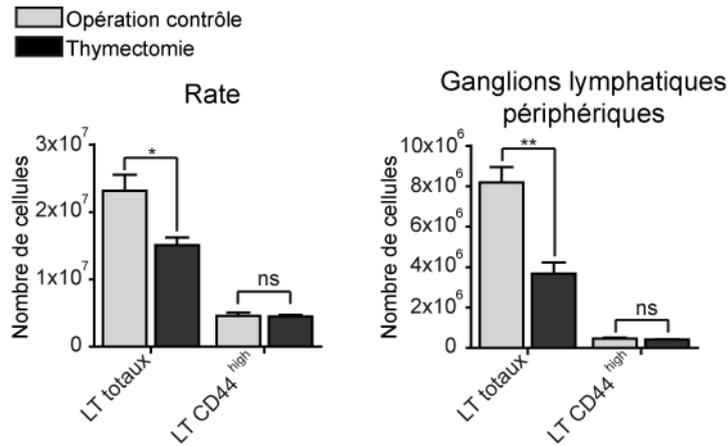


Figure 24. Effet d'une thymectomie à l'âge adulte sur les lymphocytes T conventionnels
 Analyse du nombre de lymphocytes T conventionnels totaux (TCRβ⁺) et des lymphocytes T conventionnels de phénotype mémoire (TCRβ⁺ CD44^{hi}) dans la rate et les ganglions lymphatiques périphériques de souris C57BL/6 âgées de 12 semaines, 4 semaines après une thymectomie (noir) ou une opération contrôle (gris) (ns : non significatif, * : p < 0,05, ** : p < 0,01, test t de Student, n = 5 souris ou plus dans chaque groupe). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

L'analyse du compartiment des lymphocytes iNKT dans la rate de souris thymectomisées montre une quasi-disparition des lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ alors que les lymphocytes iNKT totaux ne sont pas affectés en nombre et en fréquence (**Figure 25A** et **25B**, à gauche). Dans les ganglions lymphatiques périphériques, où les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ sont relativement beaucoup plus abondants (**Figure 13**), la thymectomie diminue significativement le nombre de lymphocytes iNKT totaux et iNKT Nrp-1⁺, mais les lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ sont moins affectés (de manière non significative) (**Figure 25B**, à droite). Cette expérience montre clairement le rôle déterminant de l'export thymique dans le maintien de la population de lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ dans les organes lymphoïdes périphériques. Ainsi, il semble que le sous-groupe de cellules Nrp-1⁺ soit, au sein des lymphocytes iNKT, l'équivalent des lymphocytes T naïfs au sein des lymphocytes T conventionnels.

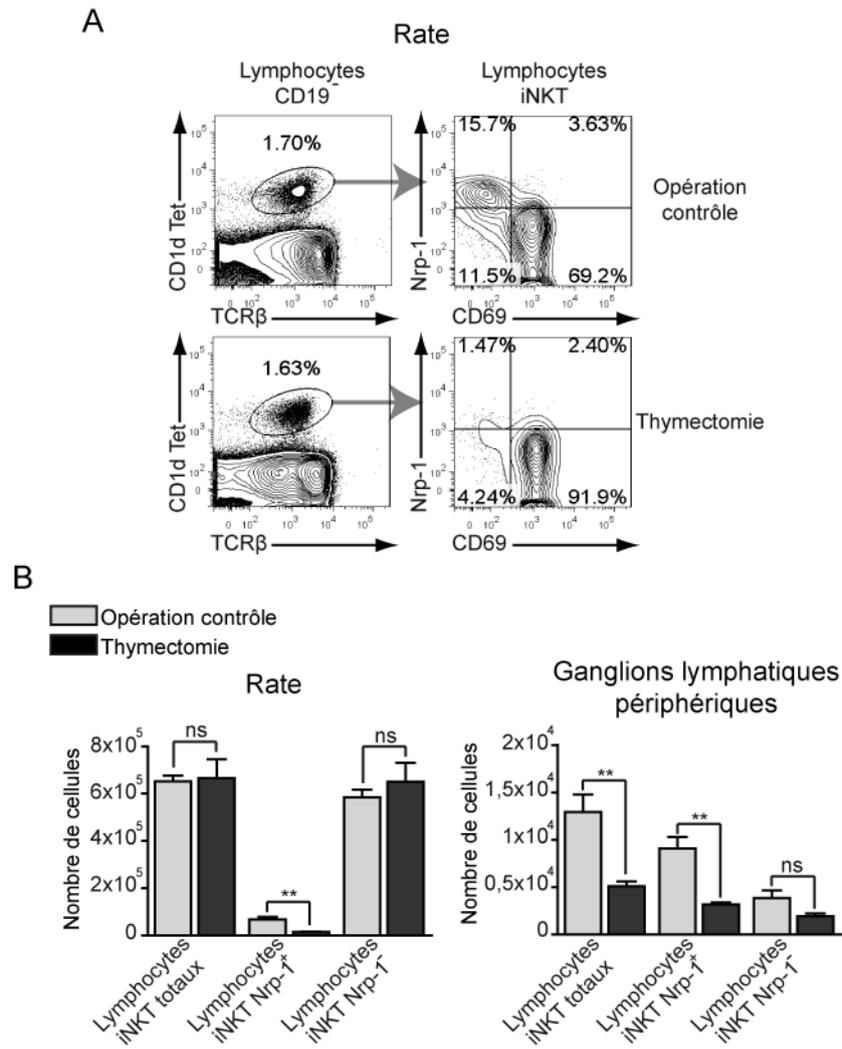


Figure 25. La thymectomie à l'âge adulte induit la diminution spécifique du nombre de lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ dans les organes lymphoïdes périphériques

Des souris C57BL/6 ont subi une thymectomie ou une opération contrôle à l'âge de 8 semaines, et leurs organes lymphoïdes périphériques ont été prélevés et préparés pour analyse par cytométrie de flux après 4 semaines. (A) Analyse de la co-expression de Nrp-1 et CD69 dans les lymphocytes iNKT (CD19⁻ TCRβ⁺ CD1d Tet⁺) issus de la rate de souris ayant subi une thymectomie ou une opération contrôle. (B) Analyse du nombre de lymphocytes iNKT totaux, iNKT Nrp-1⁺ et iNKT Nrp-1⁻ dans la rate et les ganglions lymphatiques périphériques de souris ayant subi une thymectomie (noir) ou une opération contrôle (gris) (ns : non significatif, * : p < 0,05, ** : p < 0,01, test t de Student, n = 5 souris ou plus dans chaque groupe). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

La reconnaissance d'un ou plusieurs ligands glycolipidiques endogènes présentés par des cellules CD1d⁺ (cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes B) est impliquée dans la maturation des lymphocytes iNKT dans les organes lymphoïdes périphériques [62, 63]. Il est donc attendu que la maturation des lymphocytes iNKT dont le TCR a une plus haute affinité pour des complexes CD1d/glycolipide soit plus rapide et donc que les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ périphériques soient enrichis en cellules présentant un TCR de plus faible affinité pour de tels complexes. L'analyse du répertoire Vβ utilisé par les

lymphocytes iNKT spléniques a révélé un biais de représentation de lymphocytes iNKT V β 7⁺ et V β 2⁺ parmi la population de cellules Nrp-1⁺ en comparaison avec les cellules Nrp-1⁻ (**Tableau 5**). Cette hypothèse est confortée par les résultats récents de la littérature qui montrent que l'utilisation des différentes chaînes V β par les lymphocytes iNKT murins confère des affinités différentes pour le complexe CD1d/ α -GalCer : V β 2 < V β 7 < V β 8 (dans l'ordre croissant d'affinité) [31, 213].

	Lymphocytes iNKT totaux	Lymphocytes iNKT Nrp-1 ⁻	Lymphocytes iNKT Nrp-1 ⁺	p-value (Nrp-1 ⁻ vs Nrp-1 ⁺)
Vβ8	55,2 \pm 1,1 %	54,8 \pm 1,2 %	57,6 \pm 1,4 %	0,175
Vβ7	13,8 \pm 0,8 %	12,6 \pm 1,0 %	20,9 \pm 0,9 %	<0,001
Vβ2	1,7 \pm 0,4 %	1,1 \pm 0,4 %	6,4 \pm 1,4 %	0,006

Tableau 5. Proportions des lymphocytes iNKT totaux, Nrp-1⁻ et Nrp-1⁺ utilisant la chaîne β du TCR possédant le réarrangement V β 8, V β 7 ou V β 2

Analyse par cytométrie de flux du répertoire V β des lymphocytes iNKT totaux, iNKT Nrp-1⁻ et iNKT Nrp-1⁺ issus de la rate de souris C57BL/6 âgées de 8 semaines. Les résultats, exprimés en pourcentage de la sous-population de lymphocytes iNKT exprimant le réarrangement V β donné (moyenne \pm erreur type, n = 4 souris dans deux expériences indépendantes), ont été comparés par le test t de Student et la p-value correspondante est donnée dans la dernière colonne.

4.1.4. Etude fonctionnelle comparée des lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ et iNKT Nrp-1⁻

Les propriétés effectrices des lymphocytes iNKT reposent sur leur capacité à sécréter rapidement de grandes quantités de cytokines immuno-modulatrices après activation. Alors que les lymphocytes iNKT thymiques immatures (stades 1 et 2) produisent principalement IL-4 et pas d'IFN- γ après activation, les lymphocytes iNKT matures (périphériques et thymiques de stade 3) sont capables de relarguer à la fois de grandes quantités d'IFN- γ et d'IL-4 après activation par α -GalCer [40]. En accord avec ces données, les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ activés *in vitro* par α -GalCer pendant 72 heures sécrètent 10 fois moins d'IFN- γ et 3 fois plus d'IL-4 que les lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ (**Figure 26**).

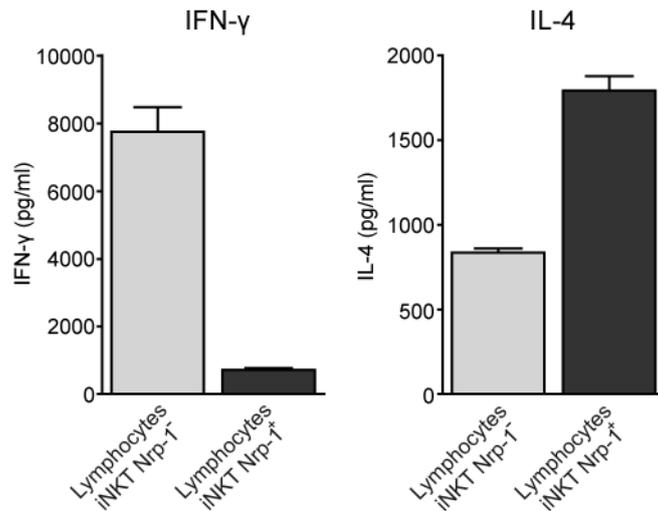


Figure 26. Sécrétion des cytokines IFN- γ et IL-4 par les lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ et Nrp-1⁺ spléniques activés par α -GalCer *in vitro*

Des lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ et iNKT Nrp-1⁺ ont été triés par cytométrie de flux à partir de rates de souris C57BL/6 âgées de 8 semaines. Ces cellules ($2 \cdot 10^4$) ont ensuite été activées pendant 72 heures en présence de splénocytes irradiés ($1 \cdot 10^5$, 30 Gy) et du ligand spécifique α -GalCer (100 ng/ml). Les surnageants de culture ont alors été récupérés et les concentrations en IFN- γ et en IL-4 dans ces surnageants ont été déterminées par cytométrie de flux grâce à l'utilisation d'un kit « Cytokine Bead Array » (CBA). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

Bien que les lymphocytes iNKT soient reconnus pour leur capacité à produire simultanément l'IFN- γ et l'IL-4, il a été décrit, au sein de cette population de lymphocytes effecteurs, une grande diversité de sous-types aux profils de sécrétion de cytokines très variés [77]. Pour mieux appréhender la diversité des lymphocytes iNKT spléniques et des lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ en particulier, j'ai analysé, par cytométrie de flux, la production simultanée d'IFN- γ , d'IL-4 et d'IL-13 par les lymphocytes iNKT spléniques 2^H après une injection d' α -GalCer *in vivo*. Dans ces conditions, l'analyse indépendante de l'expression des trois cytokines révèle que la population de lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ contient beaucoup moins de producteurs d'IFN- γ , d'IL-4 et d'IL-13 que les lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ (**Figure 27A**). Le défaut le plus marqué est observé pour la production d'IFN- γ par les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺.

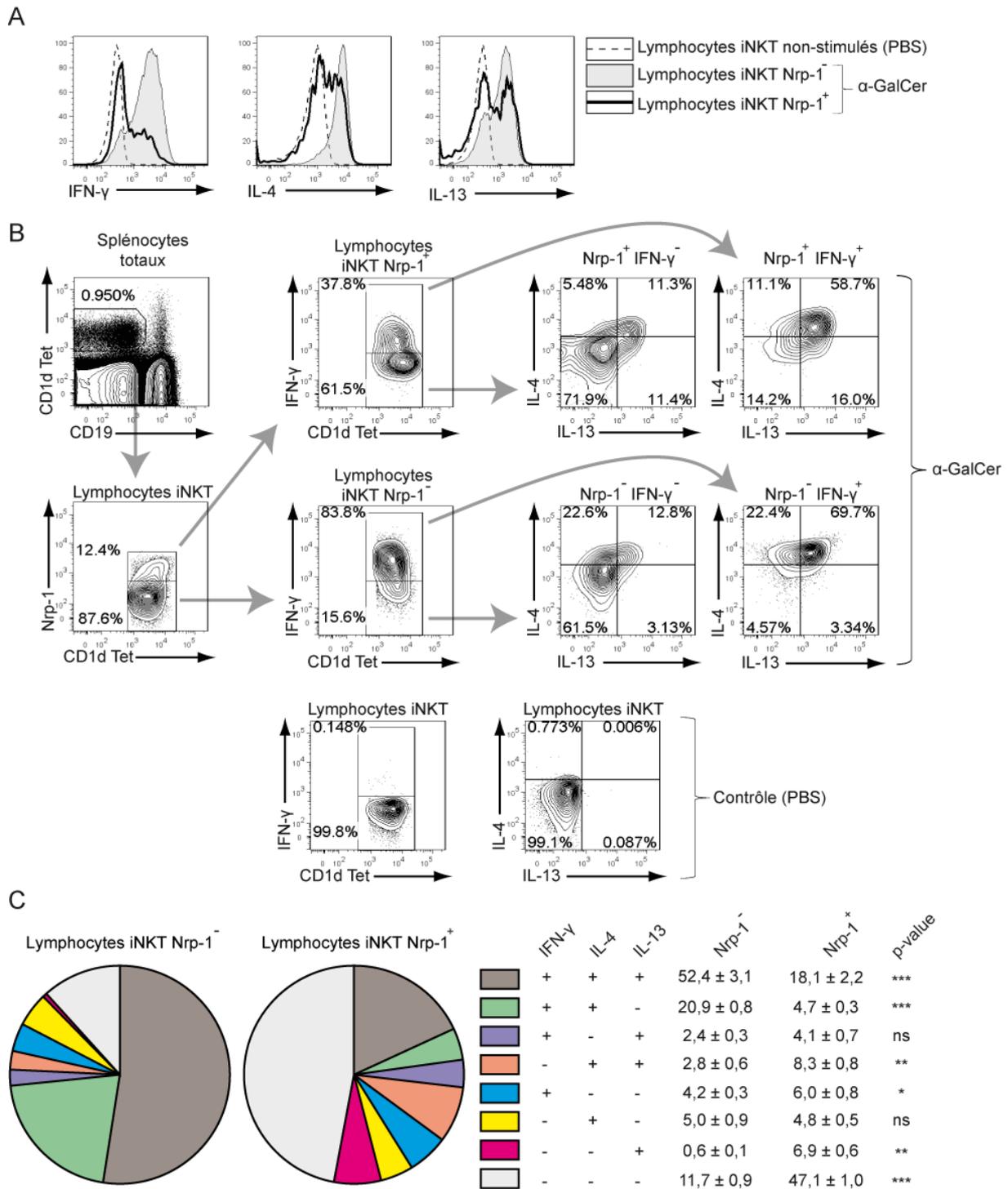


Figure 27. Profil de production simultanée des cytokines IFN-γ, IL-4 et IL-13 par les lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ et Nrp-1⁺ spléniques activés par α-GalCer *in vivo*

Trente minutes après une injection de brefeldine A, des souris C57BL/6 de 8 semaines ont été injectées avec 2 µg α-GalCer dans 200 µl PBS, ou 200 µl de PBS seul. Les animaux ont été sacrifiés deux heures après l'injection d'α-GalCer et leurs splénocytes ont été préparés pour l'analyse du contenu intracellulaire en IFN-γ, IL-4 et IL-13 dans les lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ et iNKT Nrp-1⁺. (A) Production d'IFN-γ (gauche), d'IL-4 (milieu), et d'IL-13 (droite) dans les lymphocytes iNKT non-stimulés (trait interrompu) et les lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ (gris) et iNKT Nrp-1⁺ (noir) activés. (B) Stratégie d'analyse de la production simultanée d'IFN-γ, IL-4 et IL-13 dans les sous-populations de lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ et iNKT Nrp-1⁺. Les lymphocytes iNKT spléniques (CD19⁺ CD1d Tet⁺) sont divisés en iNKT Nrp-1⁻ et iNKT Nrp-1⁺. Chaque sous-type est alors divisé

en producteurs ($\text{IFN-}\gamma^+$) et non-producteurs ($\text{IFN-}\gamma^-$) d' $\text{IFN-}\gamma$, puis chaque sous-population résultante est analysée pour la co-expression d' IL-4 et d' IL-13 . Les limites de détection des cellules positives pour l'expression des cytokines sont placées en fonction du marquage sur les lymphocytes iNKT de souris contrôles. Cette stratégie établit pour chaque sous-type de lymphocytes iNKT 8 sous-populations distinctes selon leur expression simultanée d'aucune, une, deux, ou trois des cytokines analysées. (C) Représentation en camembert de ces 8 sous-populations de producteurs de cytokines parmi les lymphocytes iNKT Nrp-1^- (gauche) et iNKT Nrp-1^+ (droite). Les pourcentages de chaque sous-population (moyenne \pm erreur type, $n = 5$ souris dans trois expériences indépendantes) ont été comparés entre les deux sous-types de lymphocytes iNKT grâce au test t de Student et la p-value résultante est indiquée (ns : non significatif, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$).

L'intérêt de cette technique réside dans l'analyse de la production de plusieurs cytokines simultanément. J'ai donc utilisé une stratégie d'analyse qui permet de diviser les lymphocytes iNKT Nrp-1^- et iNKT Nrp-1^+ en 8 sous-populations effectrices selon leur expression combinée d' $\text{IFN-}\gamma$, d' IL-4 et d' IL-13 (**Figure 27B**). Conformément à ce qui est attendu de lymphocytes iNKT matures, cette méthode d'analyse a révélé que plus de 50% des lymphocytes iNKT Nrp-1^- produisent à la fois $\text{IFN-}\gamma$, IL-4 et IL-13 , et environ 20% produisent $\text{IFN-}\gamma$ et IL-4 , mais pas IL-13 (**Figure 27C**). Par contre, les lymphocytes iNKT Nrp-1^+ ont un profil radicalement différent : moins de 20% d'entre eux produisent les trois cytokines simultanément, et presque 50% ne produisent ni $\text{IFN-}\gamma$, ni IL-4 , ni IL-13 (**Figure 27C**). Le défaut de production de ces cytokines par les lymphocytes iNKT Nrp-1^+ ne semble pas dû à un défaut général d'activation, puisque l'augmentation de l'expression de CD69 après activation par $\alpha\text{-GalCer}$ est rapidement observée aussi bien dans les lymphocytes iNKT Nrp-1^- (**Figure 28**, rouge) que dans les lymphocytes iNKT Nrp-1^+ (**Figure 28**, bleu).

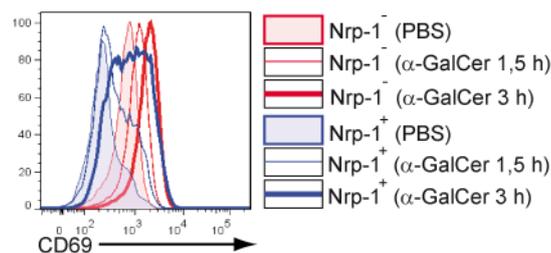


Figure 28. Activation rapide des lymphocytes iNKT Nrp-1^- et Nrp-1^+ spléniques après injection d' $\alpha\text{-GalCer}$

Des souris C57BL/6 de 8 semaines ont été injectées avec $2 \mu\text{g}$ $\alpha\text{-GalCer}$ dans $200 \mu\text{l}$ PBS, ou $200 \mu\text{l}$ de PBS seul. Les animaux ont été sacrifiés 1^{h} 30 et 3^{h} après l'injection d' $\alpha\text{-GalCer}$ et leurs splénocytes ont été préparés pour l'analyse de l'expression de CD69 en surface des lymphocytes iNKT Nrp-1^- (rouge) et iNKT Nrp-1^+ (bleu). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences réalisées indépendamment.

En résumé, les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺, qui correspondent aux cellules récemment sorties du thymus, ont un défaut marqué de production d'IFN- γ après stimulation *in vitro* et *in vivo*, et, à la différence des lymphocytes iNKT matures Nrp-1⁻, sont majoritairement incapables de sécréter rapidement et simultanément les cytokines IFN- γ , IL-4 et IL-13 après une activation *in vivo*.

4.1.5. Les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 dans les organes lymphoïdes expriment Nrp-1 et sont maintenus par l'export thymique

L'équipe du Dr Leite-de-Moraes, dans notre laboratoire, a récemment mis en évidence l'existence d'une population singulière de lymphocytes iNKT ayant la capacité de produire la cytokine pro-inflammatoire IL-17 après activation [119]. Cette observation a été confirmée par de nombreuses autres études qui ont contribué à la caractérisation plus complète de cette sous-population chez la souris [65, 77, 115-118, 120, 214]. Plusieurs des caractéristiques des lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 sont communes à celles des lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ : phénotype immature NK1.1⁻, abondance relative élevée dans les ganglions lymphatiques périphériques, production absente ou faible d'IFN- γ et d'IL-4 après stimulation. J'ai donc cherché à déterminer si les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 exprimaient Nrp-1.

Après activation *in vitro* de lymphocytes iNKT thymiques par une combinaison de PMA et ionomycine en présence de brefeldine A pendant 3 heures, les cellules produisant l'IL-17 présentent une forte expression de Nrp-1 à leur surface, contrairement aux cellules produisant l'IFN- γ (**Figure 29A**). La même observation est faite pour les lymphocytes iNKT issus des ganglions lymphatiques périphériques, où les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ et producteurs d'IL-17 sont relativement abondants (**Figure 29B**).

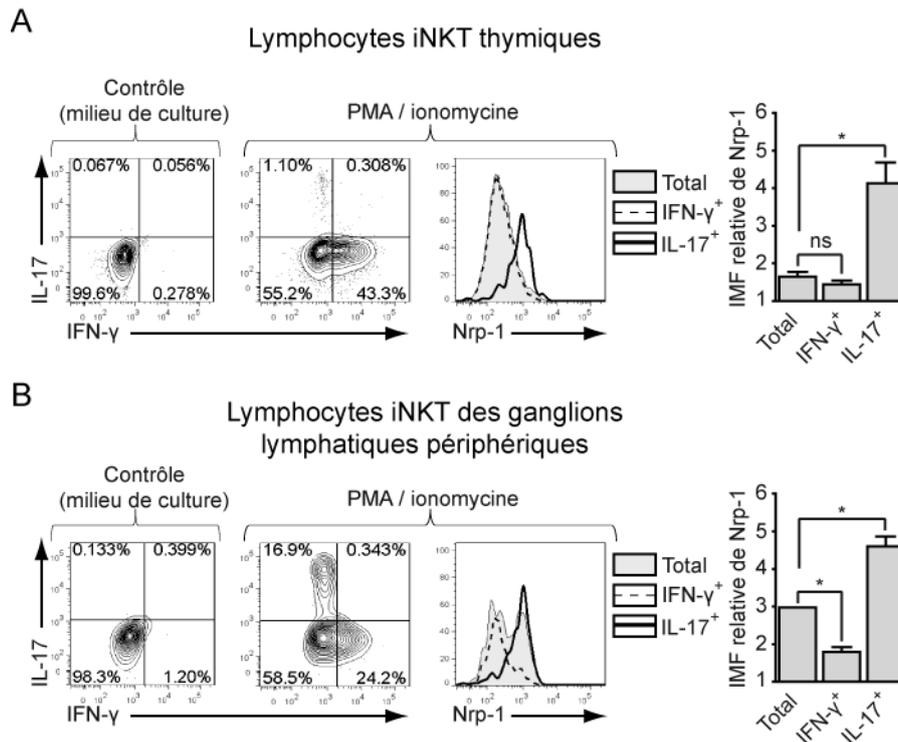


Figure 29. Les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 après stimulation non-spécifique *in vitro* expriment Nrp-1

Analyse comparée de l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 et d'IFN- γ issus du thymus et des ganglions lymphatiques périphériques. Les thymocytes totaux (A) et les lymphocytes issus des ganglions lymphatiques périphériques (B) de trois souris C57BL/6 âgées de 8 semaines ont été enrichis magnétiquement en lymphocytes iNKT. Les suspensions cellulaires obtenues ont alors été stimulées, ou non, pendant 3 heures en présence de PMA et de ionomycine. Les lymphocytes iNKT (TCR β ⁺ CD1d Tet⁺) ont alors été divisés en producteurs d'IFN- γ et en producteurs d'IL-17 (sous-populations mutuellement exclusives) et l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes iNKT totaux (gris), iNKT IFN- γ ⁺ (trait interrompu) et iNKT IL-17⁺ (noir) a été déterminée. La quantification de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) relative de Nrp-1 dans ces trois sous-populations est montrée pour chaque organe analysé (IMF relative = IMF_{Nrp-1} / IMF_{isotype}, ns : non significatif, * : p<0,05, test t de Student sur les résultats regroupés de trois expériences indépendantes).

Après injection d' α -GalCer *in vivo*, les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17, mais pas ceux producteurs d'IFN- γ , expriment fortement Nrp-1 (**Figure 30**). Il est important de noter ici que si la grande majorité des lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 sont Nrp-1⁺, cette sous-population de cellules ne représente qu'environ 5, 10 et 40% de tous les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ trouvés dans la rate, le thymus et les ganglions lymphatiques périphériques, respectivement.

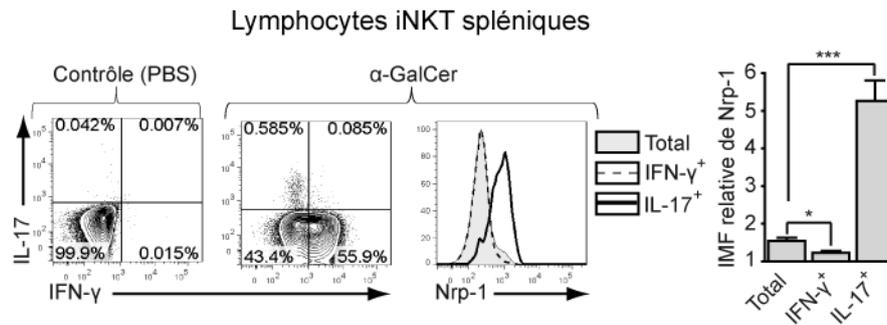


Figure 30. Les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 après injection d' α -GalCer *in vivo* expriment Nrp-1

Trente minutes après une injection de brefeldine A, des souris C57BL/6 de 8 semaines ont été injectées avec 2 μ g α -GalCer dans 200 μ l PBS, ou 200 μ l PBS seul. Les animaux ont été sacrifiés deux heures après l'injection d' α -GalCer et leurs splénocytes ont été préparés pour l'analyse du contenu intracellulaire en IFN- γ et IL-17 dans les lymphocytes iNKT (TCR β ⁺ CD1d Tet⁺). Les lymphocytes iNKT ont alors été divisés en producteurs d'IFN- γ et en producteurs d'IL-17 (sous-populations mutuellement exclusives) et l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes iNKT totaux (gris), iNKT IFN- γ ⁺ (trait interrompu) et iNKT IL-17⁺ (noir) a été déterminée. La quantification de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) relative de Nrp-1 dans ces trois sous-populations est montrée (IMF relative = IMF_{Nrp-1} / IMF_{IsoType}, n = 4 souris dans deux expériences indépendantes, * : p<0,05, *** : p<0,001, test t de Student).

L'expression de Nrp-1 par les lymphocytes iNKT murins des organes lymphoïdes périphériques est caractéristique de cellules récemment émigrées du thymus. J'ai donc analysé le rôle de la fonction d'export thymique dans le maintient de la sous-population de lymphocytes iNKT capables de produire l'IL-17 dans les organes lymphoïdes périphériques. La thymectomie de souris à l'âge adulte divise par 4 le nombre de lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 dans la rate et les ganglions lymphatiques périphériques (**Figure 31**). Ce résultat souligne le rôle crucial du thymus dans le maintient de la population de lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 dans les organes lymphoïdes secondaires.

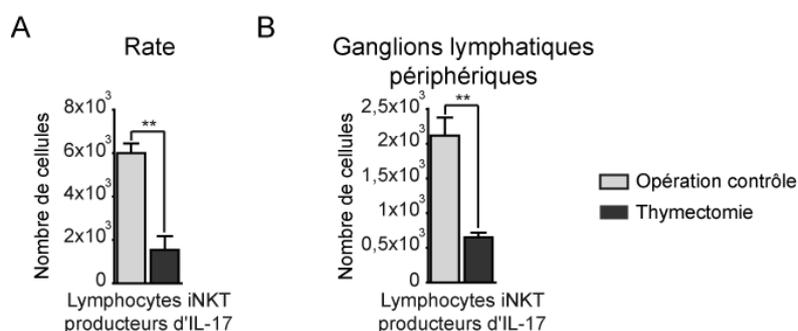


Figure 31. La thymectomie de souris à l'âge adulte induit la diminution massive du nombre de lymphocytes iNKT capables de produire l'IL-17 dans les organes lymphoïdes

Des souris C57BL/6 ont subi une thymectomie ou une opération contrôlée à l'âge de 8 semaines, et, après 4 semaines, des suspensions cellulaires issues de la rate (A) et des ganglions lymphatiques périphériques (B) ont été enrichies magnétiquement en lymphocytes iNKT. Les suspensions cellulaires obtenues ont alors été stimulées pendant 3 heures en présence de PMA et de ionomycine et le nombre absolu de lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 (TCR β ⁺ CD1d Tet⁺ IL-17⁺) a été déterminé pour les animaux de chaque groupe après analyse par cytométrie de flux (** : p<0,01, test t de Student, n = 5 souris ou plus dans chaque groupe, données regroupées de deux expériences indépendantes).

4.1.6. Modèle de l'expression de Nrp-1 au cours du développement et de l'homéostasie des lymphocytes iNKT

Les résultats décrits ci-dessus permettent de placer l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes iNKT dans le contexte de leur développement et de leur homéostasie (**Figure 32**). Les précurseurs thymiques des lymphocytes iNKT expriment Nrp-1 jusqu'au stade 2, stade auquel ils sortent du thymus et colonisent les organes lymphoïdes périphériques. Les lymphocytes iNKT ETR représentent un ensemble hétérogène contenant des cellules encore en prolifération, des cellules productrices d'IL-17, des cellules productrices d'IL-4 et d'IL-13, très peu de cellules produisant IFN- γ . La maturation des lymphocytes iNKT s'accompagne d'une perte d'expression de Nrp-1 et de l'acquisition de la capacité à produire l'IFN- γ . Les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 ne circulent que transitoirement dans les organes lymphoïdes à leur sortie du thymus et nichent sans doute préférentiellement dans les tissus. L'activation des lymphocytes iNKT par un glycolipide est capable d'induire à nouveau l'expression de Nrp-1 pendant plusieurs jours.

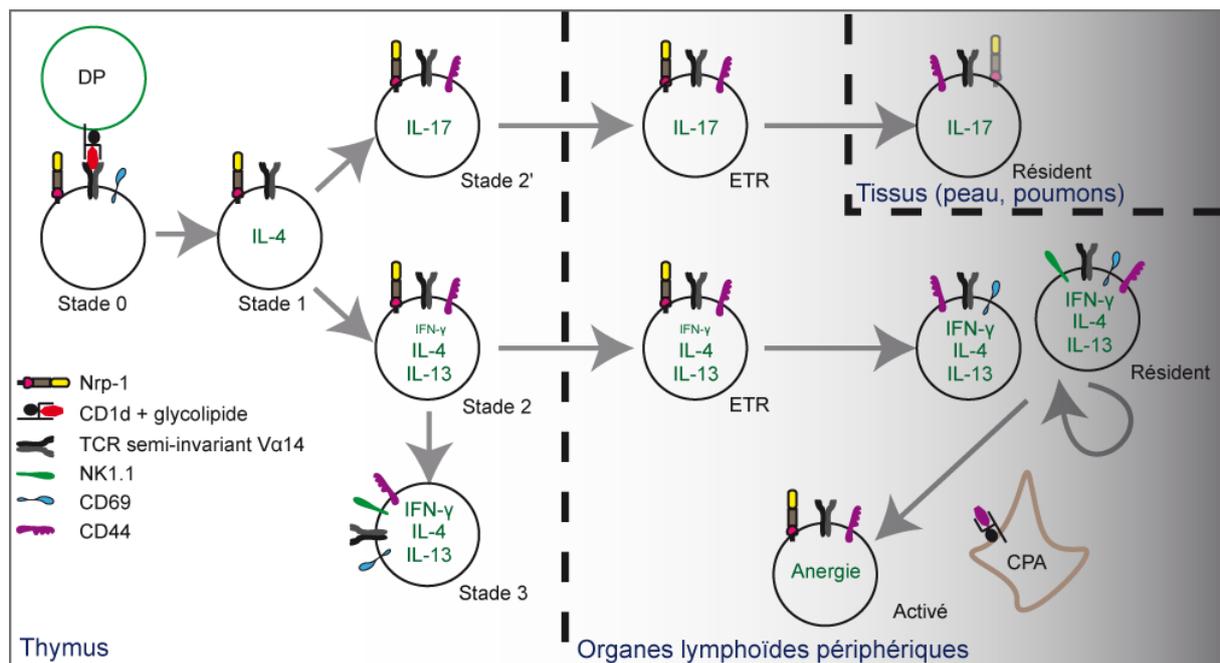


Figure 32. Schéma récapitulatif de l'évolution du phénotype et du profil de production de cytokines des lymphocytes iNKT, des premières étapes du développement thymique à leur résidence dans les tissus et les organes lymphoïdes périphériques

4.2. La neuropiline-1 est exprimée par les lymphocytes T conventionnels activés et est impliquée dans différents mécanismes de régulation

Les résultats obtenus sur les lymphocytes iNKT murins montrent que Nrp-1 est exprimé sur ces cellules après engagement du TCR. De plus, si Nrp-1 n'est pas exprimé sur les lymphocytes Treg Foxp3⁺ humains [196], il existe bien dans les organes lymphoïdes humains une population de lymphocytes T Nrp-1⁺ portant certains marqueurs de lymphocytes T activés (CD45RO⁺, CD69⁺) (données obtenues au laboratoire par Amédée Renand, doctorant). *In vitro*, l'activation de lymphocytes T humains par le TCR induit l'expression de Nrp-1 [196]. L'induction de Nrp-1 après engagement du TCR semble donc être une propriété conservée entre les lymphocytes iNKT murins et les lymphocytes T humains. Nous avons donc cherché à comprendre si les lymphocytes T conventionnels activés murins exprimaient aussi Nrp-1, quels facteurs moléculaires régulaient cette expression, et quel pouvait être le rôle de Nrp-1 sur les lymphocytes T activés.

4.2.1. Expression de Nrp-1 dans les précurseurs thymiques et les lymphocytes T conventionnels matures

Après réarrangement de la chaîne β du TCR, la signalisation du pré-TCR dans les précurseurs thymiques immatures au stade de développement DN3 est nécessaire à la survie et à la prolifération des thymocytes au cours du processus appelé β -sélection [1]. La prolifération des thymocytes est requise pour effectuer le réarrangement de la chaîne α du TCR et exprimer un TCR de surface complet et fonctionnel. La prolifération des thymocytes cesse donc au stade DP tardif, avant le processus de sélection positive.

J'ai voulu savoir si l'activation et la prolifération des thymocytes induite par la signalisation du pré-TCR s'accompagnait de l'expression de Nrp-1. L'étude des thymocytes de souris par cytométrie de flux a permis de définir les grandes étapes du développement des lymphocytes T $\alpha\beta$ et d'analyser l'expression de Nrp-1 dans chacun de ces intermédiaires (**Figure 33**). L'expression de Nrp-1 est nulle ou faible aux stades DN1 et DN2, puis elle augmente progressivement aux stades DN3, DN4 et ISP. Les thymocytes DP les moins avancés dans la sélection thymique (DP1) expriment encore fortement Nrp-1, mais les thymocytes DP en cours de sélection positive (DP2 et DP3) et les thymocytes matures SP CD4⁺ et CD8⁺ n'expriment pas ou peu Nrp-1. Conformément aux données de la littérature, les lymphocytes Treg thymiques (SP TCR β ⁺ CD4⁺ CD25⁺) expriment fortement Nrp-1, probablement suite à leur expression constitutive du facteur de transcription Foxp3. Ces

résultats montrent donc une corrélation forte entre l'expression de Nrp-1 et la prolifération des thymocytes induite par la signalisation du pré-TCR.

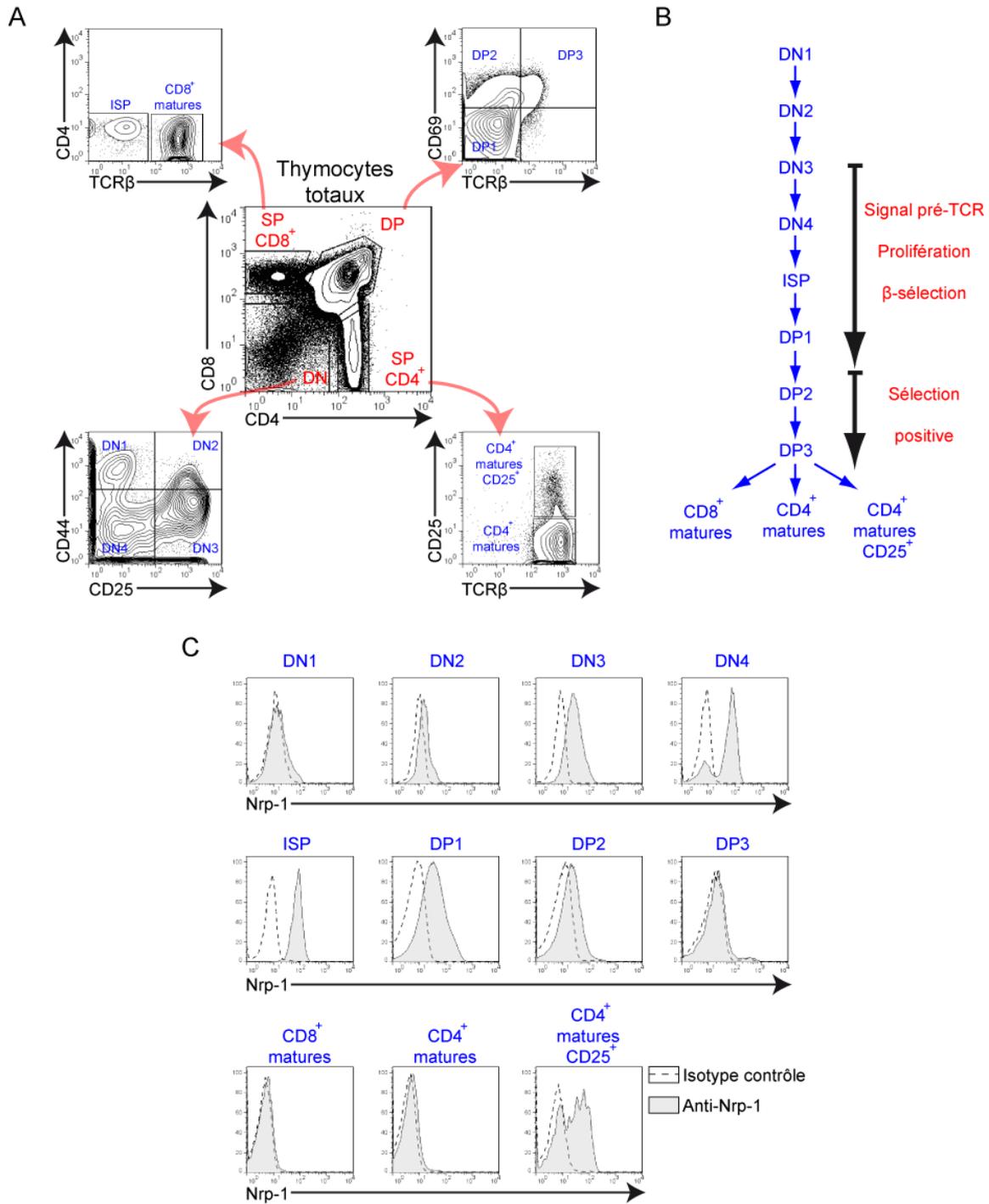


Figure 33. Expression de Nrp-1 au cours du développement thymique

Les thymocytes de souris C57BL/6 âgée de 6 semaines ont été préparés et marqués simultanément avec des anticorps dirigés contre CD4, CD8, CD25, CD44, TCRβ, CD69 et Nrp-1 (ou son isotype contrôle) afin d'analyser l'expression de Nrp-1 dans les différents stades de développement des thymocytes. (A) Stratégie de caractérisation des différents stades de développement des thymocytes murins par leur phénotype de surface. (B) Schéma rappelant la séquence de différenciation des thymocytes, du premier stade DN1 aux stades les plus matures. (C) Expression de Nrp-1 dans chaque stade défini en (A). Cette analyse est représentative de trois expériences réalisées indépendamment.

Pour associer plus clairement l'expression de Nrp-1 à la prolifération des thymocytes, j'ai analysé l'expression de Nrp-1 dans les thymocytes en prolifération, repérés grâce à l'incorporation rapide de BrdU. Ces expériences ont révélé que les thymocytes en prolifération (BrdU⁺ FSC^{hi}) expriment en très grande majorité des niveaux élevés de Nrp-1 (**Figure 34**). Ces expériences suggèrent donc que l'expression de Nrp-1 dans les thymocytes murins est associée à la prolifération induite par la signalisation du pré-TCR.

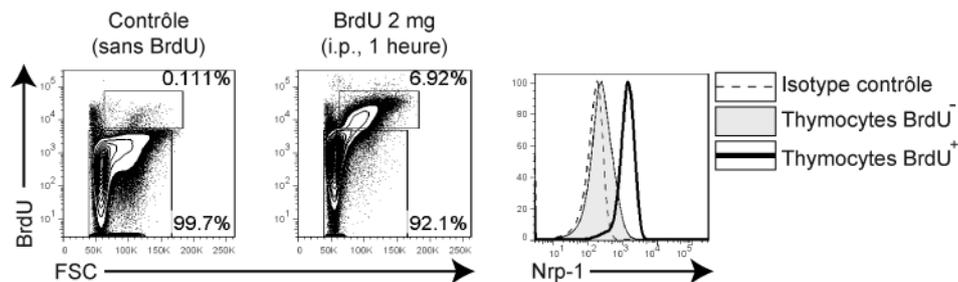


Figure 34. Nrp-1 est exprimé fortement sur les thymocytes en prolifération *in vivo*

Des souris C57BL/6 âgées de 6 semaines ont été injectées avec 2 mg de BrdU dans 200 μ l de PBS en i.p., ou uniquement 200 μ l de PBS (contrôle). Une heure après, les animaux ont été sacrifiés et leurs thymocytes préparés pour l'analyse de l'expression de Nrp-1 en surface et de l'incorporation de BrdU dans l'ADN. On voit dans les deux diagrammes de gauche que les thymocytes ayant incorporé le BrdU dans leur ADN dans l'heure précédant le sacrifice sont blastiques (FSC^{hi}). La superposition d'histogrammes à droite compare l'expression de Nrp-1 dans les thymocytes BrdU⁻ (gris clair) et dans les thymocytes BrdU⁺ (trait noir). Cette expérience a été réalisée deux fois sur plusieurs animaux avec des observations similaires.

Hormis les lymphocytes Treg CD25⁺, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ matures naïfs n'expriment pas Nrp-1 à leur sortie du thymus (**Figure 23**). Dans les organes lymphoïdes périphériques, la population de lymphocytes T (TCR β ⁺) est hétérogène et contient des lymphocytes Treg (CD4⁺ Foxp3⁺), des lymphocytes T naïfs (CD4⁺ CD44^{lo} et CD8⁺ CD44^{lo}), et des lymphocytes T mémoire (CD4⁺ CD44^{hi} et CD8⁺ CD44^{hi}). J'ai analysé l'expression de Nrp-1 dans ces différentes sous-catégories de lymphocytes T définies par leur phénotype de surface et leur expression de Foxp3 (**Figure 35**). Les lymphocytes Treg Foxp3⁺ expriment fortement et en grande majorité Nrp-1, alors que les lymphocytes T naïfs n'expriment pas Nrp-1. Une proportion non-négligeable de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ mémoire exprime Nrp-1 de manière indépendante de l'expression des marqueurs des lymphocytes Treg Foxp3 et CD25.

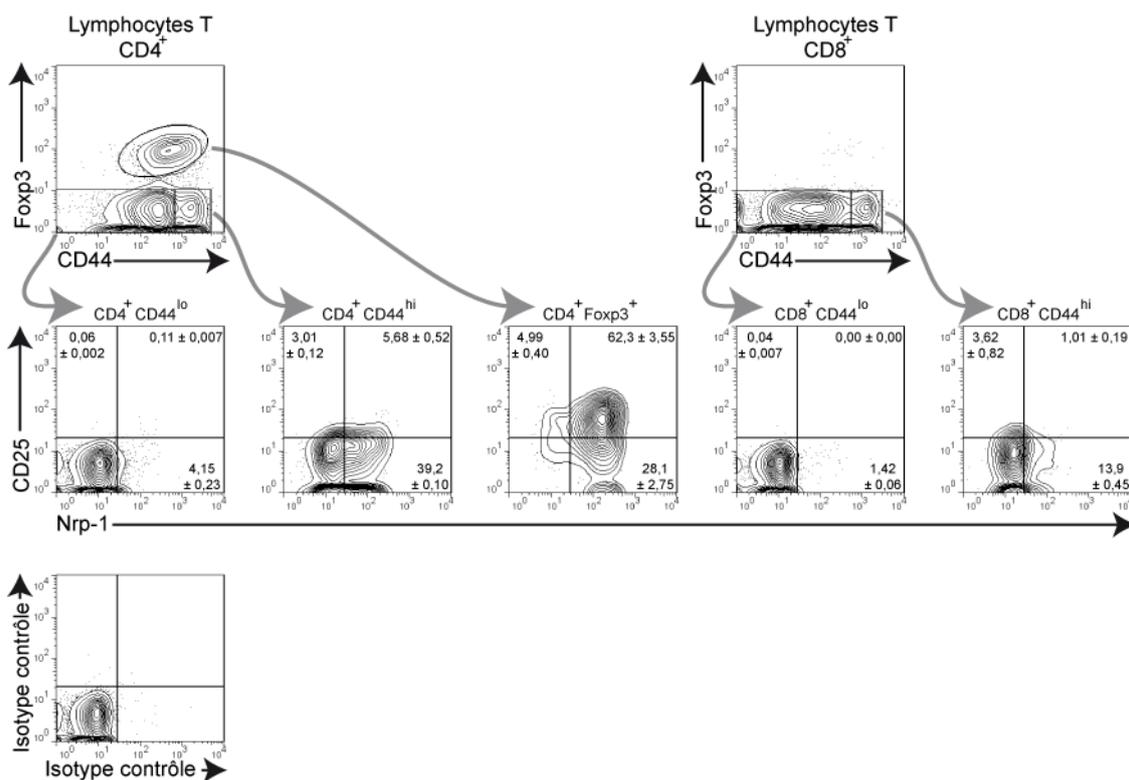


Figure 35. Expression de Nrp-1 sur les lymphocytes T matures en périphérie

Les splénocytes de souris C57BL/6 âgées de 8 semaines ont été préparés et marqués par des anticorps dirigés contre TCR β , CD4, CD8, CD44, CD25, Nrp-1 (ou son isotype contrôle) et Fxp3 (marquage intranucléaire). Les lymphocytes T (TCR β ⁺) CD4⁺ et CD8⁺ ont alors été sous-divisés selon leur expression de CD44 et Fxp3 en CD4 naïfs (CD4⁺ CD44^{lo}), CD4 mémoire (CD4⁺ CD44^{hi}), Treg (Fxp3⁺), CD8 naïfs (CD8⁺ CD44^{lo}) et CD8 mémoire (CD8⁺ CD44^{hi}). La co-expression de CD25 et Nrp-1 dans chacune de ces sous-populations de lymphocytes T est montrée dans la deuxième rangée de diagrammes. Les seuils de positivité pour l'expression de CD25 et Nrp-1 ont été placés en fonction du marquage avec les isotopes contrôles respectifs (dernière rangée), et le pourcentage de cellules dans chaque cadran est indiqué pour chaque sous-population (moyenne \pm erreur type, n = 3 souris). Cette expérience a été répétée deux fois avec des résultats similaires.

Il existe une grande diversité dans les sous-types de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ mémoires, qui diffèrent notamment par les signaux nécessaires à leur homéostasie et par leur fréquence de renouvellement [19]. Il existe en particulier des sous-types de lymphocytes T mémoire dont la prolifération homéostatique est rapide et maintenue par l'activation de leur TCR par des complexes peptide/CMH [215-217]. L'analyse de l'expression du marqueur nucléaire associé à la prolifération Ki67 dans les lymphocytes T murins a révélé qu'environ 50% des lymphocytes T CD8⁺ Nrp-1⁺ et CD4⁺ CD25⁻ Nrp-1⁺ sont Ki67⁺ (**Figure 36**). Ces données suggèrent donc que les lymphocytes T mémoires exprimant Nrp-1 sont en prolifération et pourraient correspondre aux sous-types de lymphocytes dépendant de contacts TCR – peptide/CMH pour leur homéostasie.

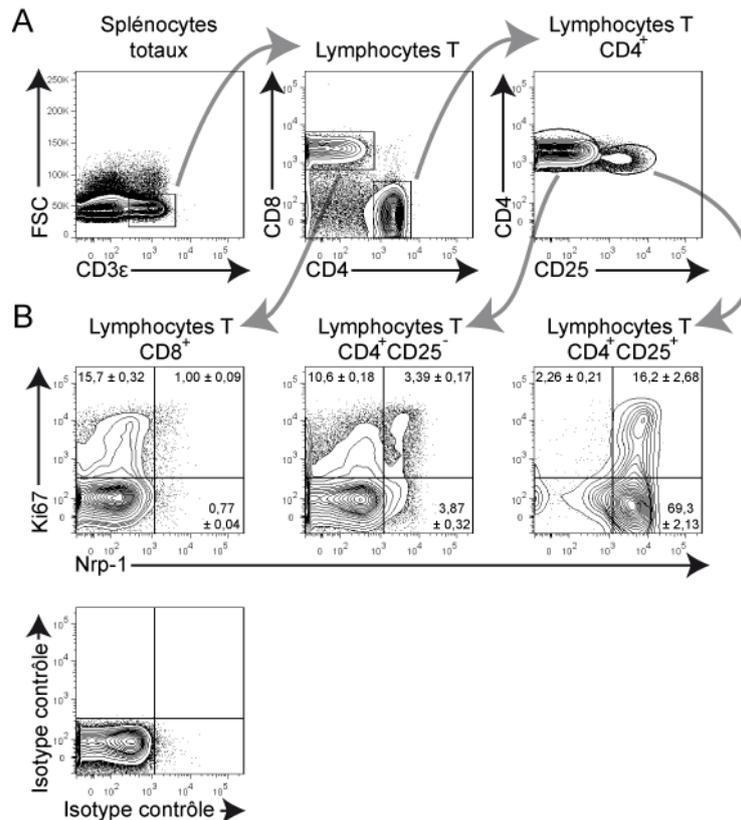


Figure 36. Expression de Nrp-1 et du marqueur de prolifération Ki67 sur les lymphocytes T matures en périphérie

Les splénocytes de souris C57BL/6 âgées de 8 semaines ont été préparés et marqués par des anticorps dirigés contre CD3ε, CD4, CD8, CD25, Nrp-1 (ou son isotype contrôle) et le marqueur de prolifération Ki67 (marquage intranucléaire). (A) Les lymphocytes T (FSC^{lo} CD3ε⁺) ont été sous-divisés en CD8⁺, CD4⁺ CD25⁻ et CD4⁺ CD25⁺, et (B) la co-expression de Ki67 et Nrp-1 a été analysée dans ces trois sous-populations de lymphocytes T. Les seuils de positivité pour l'expression de Ki67 et Nrp-1 ont été placés en fonction du marquage avec les isotopes contrôles respectifs (dernière rangée), et le pourcentage de cellules dans chaque quadrat est indiqué pour chaque sous-population (moyenne ± erreur type, n = 3 souris). Cette expérience a été répétée deux fois avec des résultats similaires.

L'ensemble de ces résultats obtenus sur les thymocytes et les lymphocytes T murins montre une corrélation nette entre la prolifération induite par l'activation du TCR et l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T murins.

4.2.2. Nrp-1 est un marqueur d'activation des lymphocytes T conventionnels

Afin de vérifier plus directement que l'expression de Nrp-1 était induite par l'activation du TCR, j'ai activé *in vitro* des lymphocytes T CD4⁺ naïfs par des anticorps anti-CD3ε et anti-CD28. Après 48 heures d'activation, environ 40% des lymphocytes T activés expriment Nrp-1 indépendamment de l'expression du facteur de transcription Foxp3 (**Figure 37**).

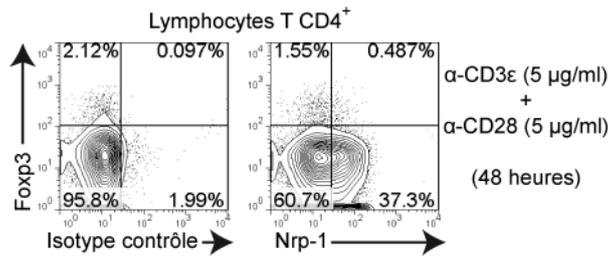


Figure 37. L'activation des lymphocytes T induit l'expression de Nrp-1 indépendamment de Foxp3

Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs (CD4⁺ CD25⁻ CD44^{lo}) issus de rates et de ganglions lymphatiques de souris C57BL/6 ont été triés par cytométrie de flux et activés *in vitro* pendant 48 heures par stimulation du TCR en présence de co-stimulation. La co-expression de Foxp3 et de Nrp-1 (ou son isotype contrôle) a alors été analysée.

L'intensité du signal d'activation et la présence de costimulation modulent l'expression de nombreux marqueurs d'activation des lymphocytes T (CD25 ou CD44 par exemple). Afin de mieux comprendre comment l'induction de Nrp-1 était modulée, j'ai suivi au cours du temps l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes T CD8⁺ activés par différentes doses d'anticorps anti-CD3ε en présence ou non d'anti-CD28 (**Figure 38**). L'expression de Nrp-1 apparaît entre 12 et 24 heures d'activation, est maximale autour de 48 heures puis diminue légèrement. L'expression de Nrp-1 est corrélée à l'intensité de stimulation du TCR. La présence de costimulation n'est pas nécessaire à cette expression, mais est responsable d'une augmentation de l'expression de Nrp-1.

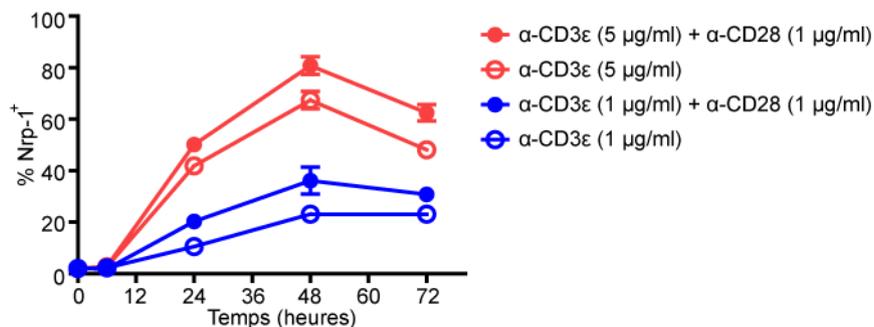


Figure 38. L'induction de Nrp-1 sur les lymphocytes T activés est modulée par l'intensité de la stimulation du TCR et la présence de co-stimulation

Des lymphocytes T CD8⁺ triés magnétiquement à partir de rates et de ganglions lymphatiques de souris C57BL/6 ont été stimulés par activation plus ou moins forte de leur TCR en présence ou non de co-stimulation. L'expression de Nrp-1 (exprimée en pourcentage de cellules positives par rapport au marquage isotypique) sur les cellules activées pendant 0, 6, 24, 48 et 72 heures a été mesurée par cytométrie de flux.

Les lymphocytes T CD8⁺ transgéniques de la lignée OT-1 portent un TCR reconnaissant le peptide dérivé de l'ovalbumine SIINFEKL présenté dans le contexte de la

molécule H-2K^b du TCR. J'ai utilisé ce modèle pour analyser comment la quantité d'antigène présenté par les cellules dendritiques et l'ajout d'IL-2 recombinante modulent l'expression de Nrp-1 induite par l'activation antigène-spécifique de lymphocytes T (**Figure 39**). Nous pouvons observer qu'en l'absence d'IL-2 recombinante exogène, une concentration de peptide de 10⁻¹¹M induit la prolifération des lymphocytes T, mais pas l'expression de Nrp-1, alors que des concentrations plus élevées induisent une forte expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T en division. La présence d'IL-2 exogène permet une expression plus forte et plus longue de Nrp-1 dans les lymphocytes T activés, même avec une faible dose de peptide. Pour des doses élevées de peptide (10⁻¹⁰M et 10⁻⁹M), le pic d'expression de Nrp-1 est atteint après 36 heures d'activation.

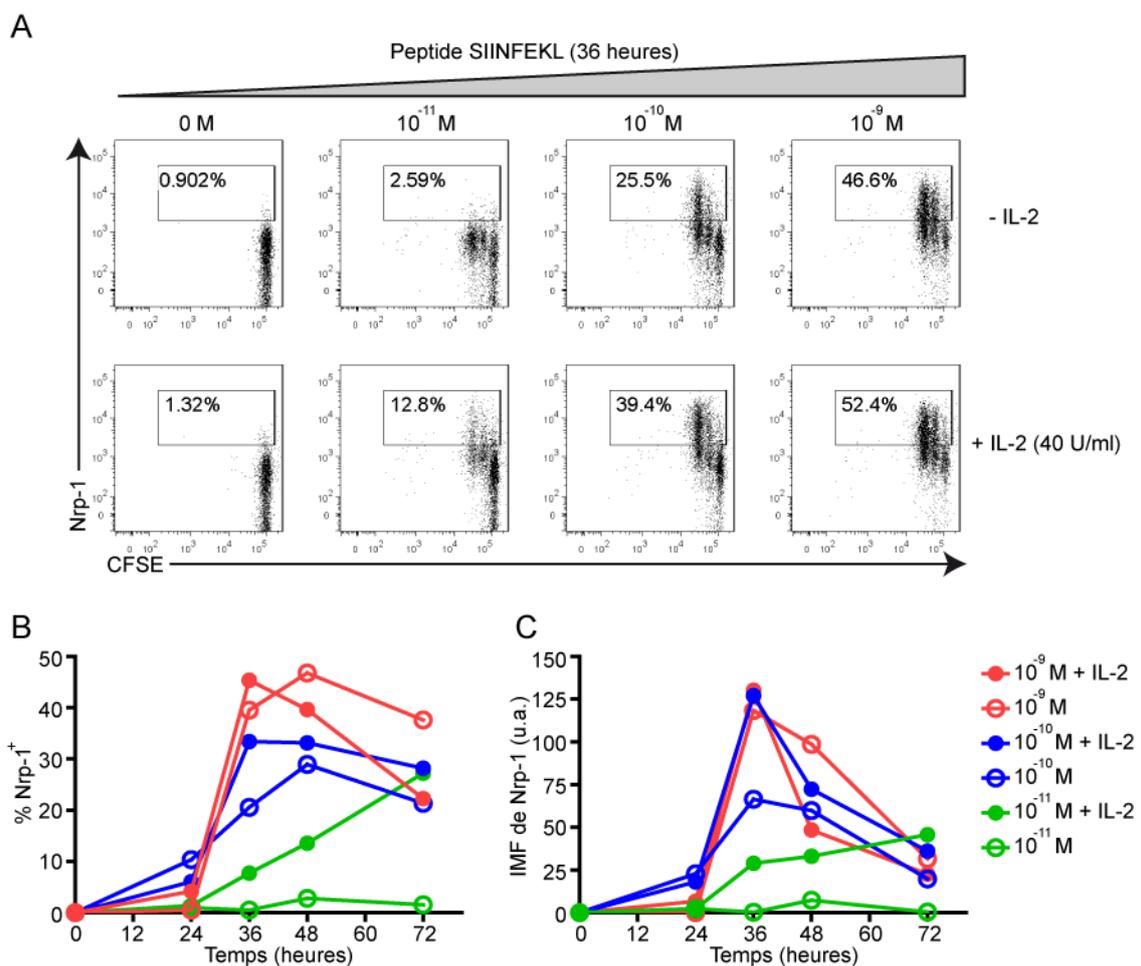


Figure 39. L'induction de Nrp-1 sur les lymphocytes T activés dépend de la quantité d'antigène présentée et est modulée par la présence d'IL-2

Des lymphocytes T CD8⁺ transgéniques pour le TCR spécifique du complexe peptide/CMH-I SIINFEKL/H-2K^b isolés des ganglions lymphatiques de souris OT-I Rag^{-/-} (fond génétique C57BL/6) ont été marqués au CFSE et cultivés en présence de cellules dendritiques isolées magnétiquement de rates de souris C57BL/6 sauvages et de différentes doses du peptide agoniste SIINFEKL en présence ou non d'IL-2. (A) Expression de Nrp-1 en fonction de la dilution de CFSE dans les cellules activées pendant 36 heures par ces différentes conditions. (B et C) Evolution temporelle de l'expression de Nrp-1 sur les cellules activées dans ces différentes conditions exprimée en pourcentage de cellules positives (B) ou en intensité moyenne de fluorescence (IMF) (C).

En résumé, ces résultats obtenus dans différents modèles d'activation *in vitro* révèlent que Nrp-1 possède les qualités d'un marqueur d'activation des lymphocytes T : l'expression de Nrp-1 est induite sur les lymphocytes T en division après stimulation du TCR de manière régulée par l'intensité de stimulation, la présence d'un signal de costimulation et l'ajout d'IL-2 exogène.

4.2.3. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T activés

Les lymphocytes T activés répondent beaucoup plus rapidement à une seconde activation. Cette propriété est à la base de l'efficacité des lymphocytes T mémoires dans l'élimination des agents infectieux déjà rencontrés. J'ai mis au point un modèle de réactivation des lymphocytes T murins pour analyser l'expression de Nrp-1 dans cette configuration (**Figure 40A**). Dans ce modèle, les lymphocytes T totaux d'une souris sont activés pendant 48 heures, puis mis au repos pendant 72 heures sans stimulation du TCR. L'expression de Nrp-1, qui était maximale après 48 heures d'activation (IMF d'environ 100 u.a.), redevient faible après 3 jours de repos (IMF d'environ 20 u.a.). La réactivation des lymphocytes T induit une réexpression de Nrp-1 dépendante de la dose d'anticorps anti-CD3 ϵ utilisée (**Figure 40B**) et du temps de restimulation (**Figure 40C**). Il est important de noter ici que l'ajout de brefeldine A pendant la phase de restimulation des lymphocytes T inhibe totalement la réexpression de Nrp-1. Ceci implique que la réexpression de Nrp-1 nécessite un transport de protéines du RE vers l'appareil de Golgi [218] et suggère que les protéines Nrp-1 exportées à la membrane pendant ces quelques heures sont synthétisées en réponse à l'activation du TCR.

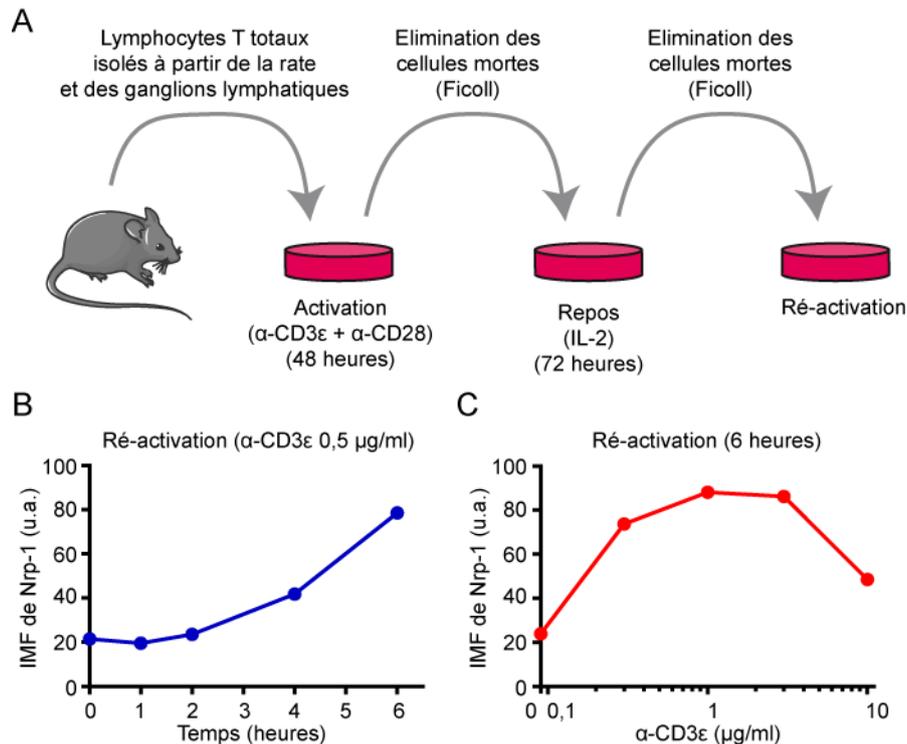


Figure 40. Modèle expérimental pour l'étude mécanistique de l'induction de Nrp-1 après activation des lymphocytes T par le TCR

Ce modèle repose sur la capacité des lymphocytes T activés de répondre plus rapidement lors d'une seconde activation de leur TCR. Cette deuxième activation plus courte permet d'analyser l'effet de drogues inhibitrices de voies de signalisation sur l'induction de Nrp-1 après activation du TCR de manière plus spécifique. (A) Schéma de principe du modèle. La totalité des lymphocytes T sont isolés magnétiquement à partir de rates et ganglions lymphatiques de souris C57BL/6 de âgées de 8 à 12 semaines. Les lymphocytes T sont activés une première fois par 5 μ g/ml d'anticorps anti-CD3 ϵ et anti-CD28 pendant 48 heures. Les lymphocytes T activés vivants sont alors isolés par centrifugation sur gradient de Ficoll et remis en culture de repos pendant 72 heures uniquement en présence d'IL-2 (5-10 U/ml). Les lymphocytes T vivants sont encore isolés par centrifugation sur gradient de Ficoll et réactivés pendant quelques heures par anti-CD3 ϵ en présence d'IL-2 (5-10 U/ml). Dans ces conditions, l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes T réactivés dépend du temps (B) et de la quantité d'anti-CD3 ϵ (C). Pour les expériences suivantes, les conditions de réactivation choisies étaient 6 heures avec 0,5 μ g/ml d'anti-CD3 ϵ .

Les conditions optimales pour une réexpression maximale de Nrp-1 (0,5 μ g/ml anti-CD3 ϵ pendant 6 heures) ont ensuite été choisies pour tester l'effet de drogues inhibitrices de la signalisation en aval de l'activation du TCR. La ciclosporine A (CsA) bloque l'activité phosphatase de la calcineurine sur son substrat NFAT et inhibe donc la voie de signalisation Ca²⁺/calcineurine/NFAT [6]. Dans le système expérimental décrit plus haut, l'utilisation d'une faible dose de CsA (10 ng/ml) bloque presque intégralement la réexpression de Nrp-1 alors que son effet sur l'induction du marqueur d'activation CD69 est minime (et non significatif) (**Figure 41, en bleu**). Une dose élevée de CsA (100 ng/ml, concentration plasmatique recommandée chez les patients pour maintenir l'effet immunosuppresseur) bloque totalement la réexpression de Nrp-1 et affecte aussi significativement l'induction de CD69 (**Figure 41, en rouge**). Il semble donc que la signalisation par la voie

Ca²⁺/calcineurine/NFAT soit particulièrement impliquée dans l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T réactivés. En accord avec cette hypothèse, l'influx intracellulaire massif de Ca²⁺ déclenché par la molécule ionophore ionomycine suffit à induire une expression forte de Nrp-1 sur des lymphocytes T préalablement activés puis laissés au repos (**Figure 42**).

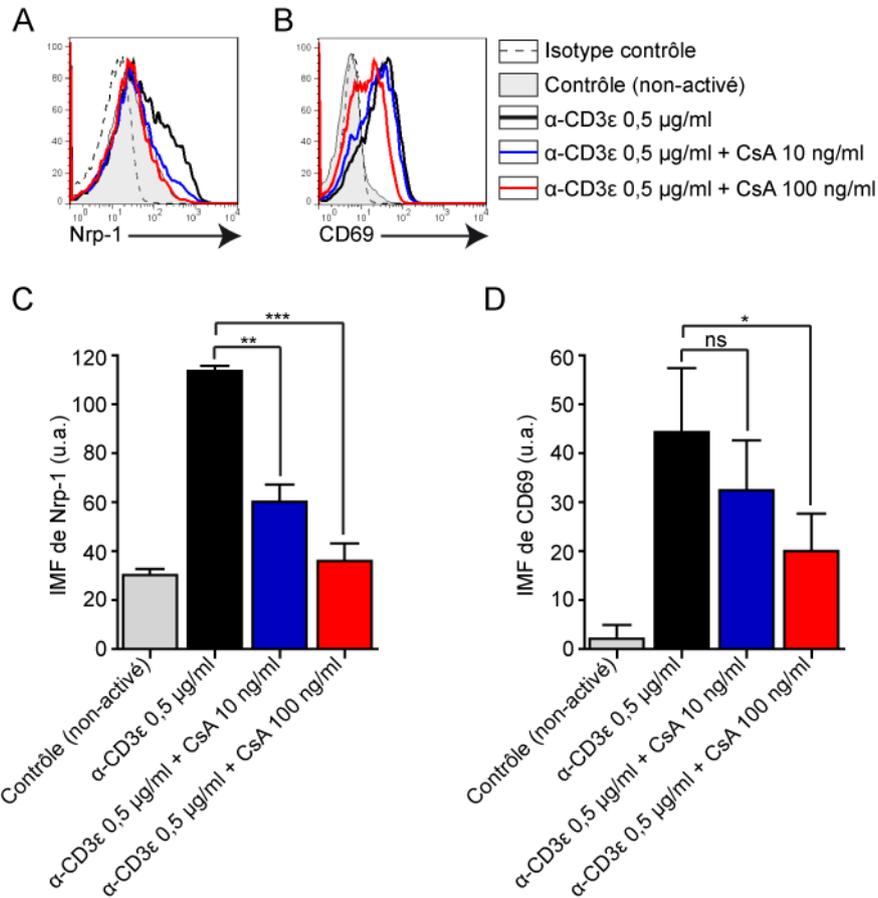


Figure 41. La voie de signalisation Ca²⁺/calcineurine/NFAT est requise pour l'induction de Nrp-1 après activation des lymphocytes T par le TCR

Dans le modèle précédent, l'inhibiteur de la voie de signalisation Ca²⁺/calcineurine/NFAT cyclosporine A (CsA) a été ajouté pendant la phase de réactivation et l'expression de Nrp-1 (A et C) et du marqueur d'activation précoce CD69 (B et D) ont été analysées par cytométrie de flux. Les résultats de trois expériences indépendantes ont été rassemblés pour établir les analyses statistiques montrées en (C) et en (D) (ns : non significatif ; * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001, test t de Student).

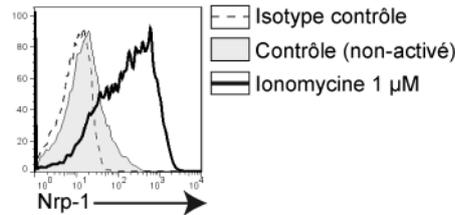


Figure 42. L'influx intracellulaire massif de Ca^{2+} est suffisant pour induire Nrp-1 sur les lymphocytes T

Dans le modèle précédent, les lymphocytes T ont été réactivés uniquement en présence du ionophore de Ca^{2+} ionomycine et sans stimulation du TCR, et l'expression de Nrp-1 a été analysée après 6 heures.

L'activation de p38 est impliquée dans la prolifération des lymphocytes et la production de cytokines comme l'IL-2, l'IL-4 et l'IFN- γ après stimulation des lymphocytes T [219]. L'activation de p38 est responsable de l'expression de Nrp-1 dans certaines cellules tumorales [154, 155]. Cependant, dans le système expérimental décrit plus haut, l'utilisation d'un inhibiteur de p38 n'a pas eu d'effet sur la réexpression de Nrp-1 et de CD69 à la dose couramment utilisée (1 μM) (**Figure 43, en bleu**). Seule une dose dix fois plus importante a eu un effet détectable (**Figure 43, en rouge**). Il semble donc que, contrairement à la voie de signalisation Ca^{2+} /calcineurine/NFAT, l'activation de la kinase p38 ne soit pas primordiale pour l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T réactivés.

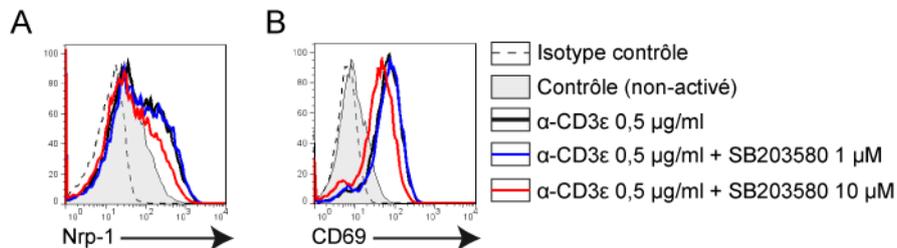


Figure 43. L'activation de la kinase p38 est peu impliquée dans l'induction de Nrp-1 sur les lymphocytes T activés par le TCR

Dans le modèle précédent, l'inhibiteur de la kinase p38 SB203580 a été ajouté pendant la phase de ré-activation et l'expression de Nrp-1 (A) et du marqueur d'activation précoce CD69 (B) ont été analysées par cytométrie de flux.

J'ai ensuite cherché à savoir si l'activité du facteur de transcription NFAT était aussi nécessaire à l'expression de Nrp-1 lors de la première activation des lymphocytes T. L'activation de la calcineurine par un mécanisme dépendant de la concentration intracytoplasmique en Ca^{2+} induit la déphosphorylation de NFAT et son entrée dans le noyau où il active la transcription de ses gènes cibles [6]. La phosphorylation de NFAT par la kinase GSK3 entraîne la sortie de NFAT du noyau et inhibe donc son activité [220]. Il est possible

de moduler négativement l'activité de NFAT en utilisant la ciclosporine A, et la moduler positivement en utilisant un inhibiteur de GSK3 comme le chlorure de lithium (LiCl) [220, 221]. J'ai utilisé le modèle des lymphocytes T CD8⁺ OT-1 activés par des cellules dendritiques « pulsées » avec deux doses de peptide agoniste (10⁻⁹M et 10⁻⁸M) pour étudier l'effet de ces drogues sur l'expression de Nrp-1 induite par l'activation primaire des lymphocytes T.

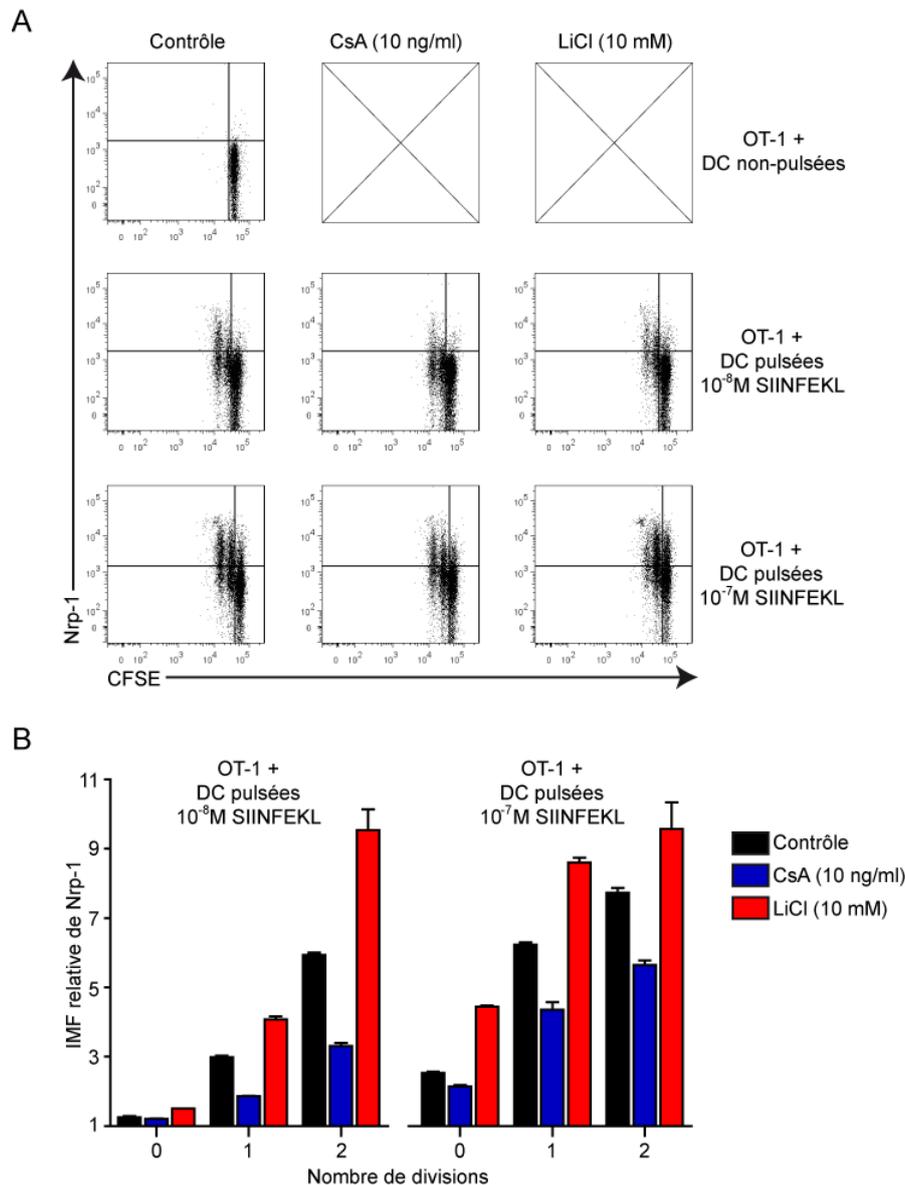


Figure 44. Effets antagonistes de la ciclosporine A et du lithium sur l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T CD8⁺ activés par le TCR

Des lymphocytes T CD8⁺ issus de souris OT-1 Rag^{-/-} ont été marqués au CFSE et cultivés en présence de cellules dendritiques (DC) pulsées avec différentes doses du peptide agoniste SIINFEKL. L'effet de l'inhibiteur de la voie Ca²⁺/calcineurine/NFAT CsA (10 ng/ml) et de l'inhibiteur de GSK3 LiCl (10 mM) sur l'expression de Nrp-1 induite par l'activation des lymphocytes T. (A) Expression de Nrp-1 en fonction de la dilution de CFSE dans les cellules activées pendant 36 heures par ces différentes conditions. (B) Quantification de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) relative de Nrp-1 sur les lymphocytes T CD8⁺ selon le nombre de divisions effectuées et les conditions de culture. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

Dans ces conditions, l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T après 36 heures dépend de la concentration en peptide à la surface des DC et du nombre de divisions (**Figure 44A**, colonne de gauche et **Figure 44B**, en noir). La modulation de l'activité de NFAT a des effets marqués sur l'expression de Nrp-1 : une faible dose de CsA (10 ng/ml) réduit l'expression de Nrp-1 (**Figure 44A**, colonne du milieu et **Figure 44B**, en bleu), alors que l'ajout de LiCl (10 mM) augmente l'expression de Nrp-1 (**Figure 44A**, colonne de droite et **Figure 44B**, en rouge). L'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T activés est donc dépendante de l'activité du facteur de transcription NFAT.

En résumé, ces résultats soulignent l'importance de la voie de signalisation Ca^{2+} /calcineurine/NFAT dans l'induction de Nrp-1 après activation des lymphocytes T par le TCR.

4.2.4. *Nrp-1 intègre différents signaux régulateurs autocrines et paracrines dans les lymphocytes T activés*

Les récepteurs exprimés à la surface des lymphocytes T en division après activation du TCR peuvent servir des fonctions opposées : favoriser la prolifération comme c'est le cas pour le CD25 par exemple, ou au contraire inhiber la prolifération et l'activation comme c'est le cas pour les récepteurs CTLA-4 ou PD-1. Afin de comprendre si Nrp-1 sert des fonctions activatrices ou inhibitrices dans l'activation et la prolifération des lymphocytes T murins conventionnels, j'ai utilisé un anticorps bloquant anti-Nrp-1 dans des expériences d'activation de lymphocytes T *in vitro*. Le blocage de la fixation de ligands sur Nrp-1 pendant l'activation de lymphocytes T $CD4^+ CD25^-$ triés induit une prolifération plus intense des lymphocytes (**Figure 45**). Cette expérience a été reproduite sur des activations de lymphocytes T $CD8^+$ polyclonaux avec des résultats semblables. Il semble donc que Nrp-1 transmette un signal inhibiteur sur la prolifération des lymphocytes T activés. Puisque dans ces expériences les lymphocytes T étaient cultivés seuls, le ligand de Nrp-1 responsable de l'inhibition de la prolifération doit être sécrété par les lymphocytes T activés eux-mêmes.

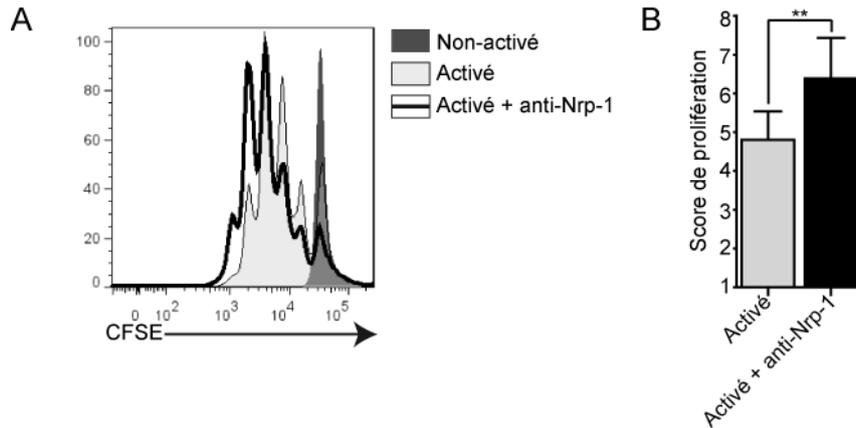


Figure 45. L'induction de Nrp-1 sur les lymphocytes T activés est impliquée dans une boucle de régulation négative endogène

Des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻ triés magnétiquement à partir de rates et de ganglions lymphatiques de souris C57BL/6 ont été marqués au CFSE et activés par 5 µg/ml d'anti-CD3ε et d'anti-CD28, en présence ou non d'anticorps bloquant anti-Nrp-1 (10 µg/ml) pendant 72 heures. (A) Analyse de la prolifération par dilution du CFSE. (B) Quantification de la prolifération en présence ou non d'anti-Nrp-1 par le score de prolifération (IMF(CFSE)_{Non-activé} / IMF(CFSE)_{condition}) (** : p < 0,01, test t de Student).

La sémaphorine-3A (Sema3A), ligand majeur de Nrp-1 dans le système nerveux, inhibe l'activation des lymphocytes T humains [207, 208]. De plus, les lymphocytes T de souris Sema3A^{-/-} montrent une prolifération exacerbée en réponse à l'activation par le TCR [210]. Sema3A est donc un bon candidat pour être le ligand de Nrp-1 impliqué dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T activés. Alors que les lymphocytes T naïfs n'expriment pas Sema3A au repos, l'activation par le TCR induit une expression de Sema3A qui est maximale entre 24 et 48 heures après activation (**Figure 46**).

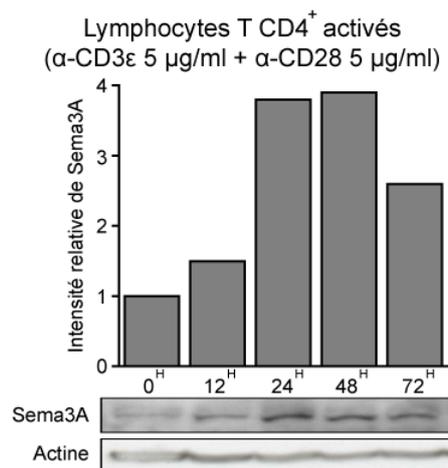


Figure 46. Le ligand de Nrp-1, Sema3A, est produit par les lymphocytes T activés

Deux millions de lymphocytes T CD4⁺ naïfs (CD4⁺ CD25⁻ CD44^{lo}) triés par cytométrie de flux à partir de rates et de ganglions lymphatiques de souris C57BL/6 ont activés par 5 µg/ml d'anti-CD3ε et d'anti-CD28 pendant 0, 12, 24, 48 ou 72 heures. Des lysats cellulaires totaux ont été préparés pour chaque condition et le contenu intracellulaire total en Sema3A a été analysé par western blot, et quantifié par densitométrie optique relativement au contenu en actine.

En outre, l'ajout de Sema3A exogène diminue la prolifération des lymphocytes T activés par anti-CD3 ϵ et anti-CD28 (**Figure 47**). Ces résultats suggèrent donc que la production du ligand Sema3A et l'expression de son récepteur Nrp-1 après activation du TCR régulent de concert la prolifération des lymphocytes T.

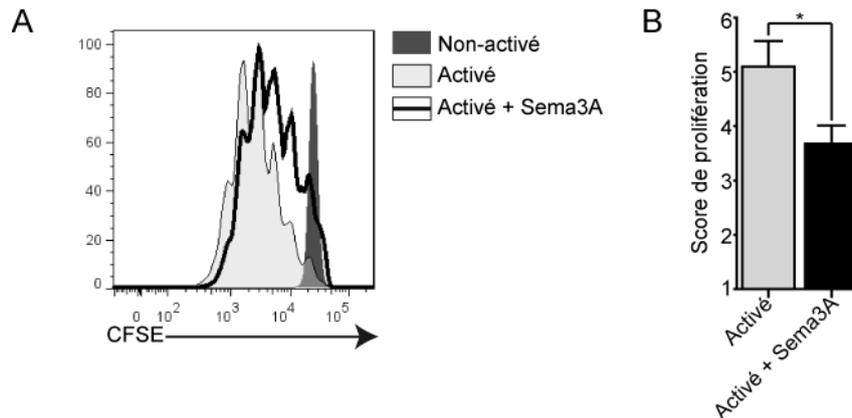


Figure 47. Le ligand de Nrp-1, Sema3A, régule négativement la prolifération des lymphocytes T activés

Des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻ triés magnétiquement à partir de rates et de ganglions lymphatiques de souris C57BL/6 ont été marqués au CFSE et activés par 5 μ g/ml d'anti-CD3 ϵ et d'anti-CD28, en présence ou non de Sema3A recombinante (200 ng/ml) pendant 72 heures. (A) Analyse de la prolifération par dilution du CFSE. (B) Quantification de la prolifération en présence ou non de Sema3A par le score de prolifération (** : $p < 0,01$, test t de Student).

Récemment, plusieurs études ont montré que Nrp-1 pouvait aussi servir de récepteur au facteur de croissance TGF- β 1 [171, 173, 174]. Cette molécule pléiotrope est notamment connue pour être à la fois un suppresseur de la prolifération des lymphocytes T et un agent différenciant des lymphocytes Treg Foxp3⁺ [13]. Les lymphocytes T activés sont une source active de TGF- β 1 [17], ce qui fait de cette cytokine un autre ligand de Nrp-1 possiblement impliqué dans la régulation négative de la prolifération des lymphocytes T activés. *In vitro*, l'ajout de TGF- β 1 exogène lors de l'activation de lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻ diminue la prolifération et induit l'expression de Foxp3 dans les lymphocytes T activés. L'ajout de l'anticorps bloquant anti-Nrp-1 rétablit la prolifération des lymphocytes T et réduit partiellement l'induction de Foxp3 (**Figure 48**). Par conséquent, Nrp-1 exprimé sur les lymphocytes T activés sensibilise ces cellules à l'action inhibitrice et différenciante du TGF- β 1.

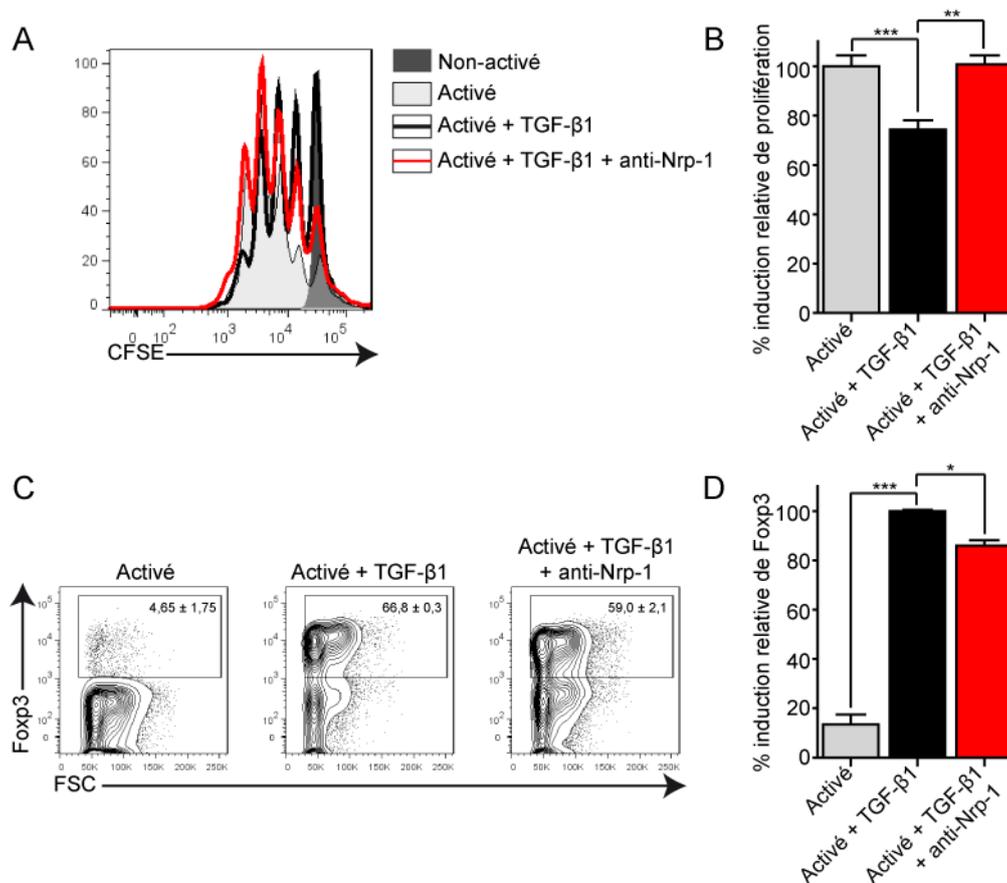


Figure 48. L'induction de Nrp-1 sensibilise les lymphocytes T activés à l'action régulatrice et différenciante du TGF-β1

Des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻ triés magnétiquement à partir de rates et de ganglions lymphatiques de souris C57BL/6 ont été marqués au CFSE et activés par 5 µg/ml d'anti-CD3ε et d'anti-CD28, en présence ou non de TGF-β1 (5 ng/ml) et d'anticorps bloquant anti-Nrp-1 (10 µg/ml) pendant 72 heures. (A) Analyse de la prolifération par dilution du CFSE. (B) Afin de regrouper les résultats de plusieurs expériences indépendantes nous avons calculé, à partir du score de prolifération dans chaque condition, un pourcentage d'induction relative de prolifération : $(\text{score}_{\text{condition}} / \text{score}_{\text{Activé}}) \times 100$. Le graphique montre les résultats issus de trois expériences indépendantes (** : p<0,01 ; *** : p<0,001, test t de Student). (C) Analyse de l'induction de Foxp3 dans les lymphocytes T CD4⁺ activés. Le pourcentage de cellules Foxp3⁺ dans chaque condition est indiqué dans le cadrant (moyenne ± erreur type). (D) Afin de regrouper les résultats de plusieurs expériences indépendantes nous avons calculé, à partir du pourcentage de cellules Foxp3⁺ dans chaque condition, un pourcentage d'induction relative de Foxp3 : $(\%(\text{Foxp3}^+)_{\text{condition}} / \%(\text{Foxp3}^+)_{\text{Activé + TGF-}\beta 1}) \times 100$. Le graphique montre les résultats issus de trois expériences indépendantes (* : p<0,05 ; *** : p<0,001, test t de Student).

Collectivement, ces résultats indiquent que Nrp-1 transmet les signaux inhibiteurs autocrines et/ou paracrines de Sema3A et de TGF-β1 dans les lymphocytes T activés.

4.2.5. Conclusion : modèles moléculaire et fonctionnel de l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T activés

Les résultats obtenus sur les lymphocytes T activés me permettent d'établir un modèle du mécanisme moléculaire de l'induction de l'expression de Nrp-1 dans les

lymphocytes T activés par le TCR (**Figure 49**). Après ligation du TCR, la signalisation du complexe CD3/TCR aboutit à l'élévation de la concentration intracytoplasmique en Ca^{2+} , ce qui induit, *via* l'activation de la calcineurine, la déphosphorylation et la translocation nucléaire du facteur de transcription NFAT. NFAT active la transcription du gène *NRP1* et permet l'expression de la protéine Nrp-1 à la membrane des lymphocytes T activés. L'effet de NFAT est inhibé par l'activité de GSK3 qui, en phosphorylant NFAT, entraîne son export vers le cytosol. L'ajout de drogues pendant l'activation des lymphocytes T permet de moduler l'expression de Nrp-1 : la ciclosporine A inhibe l'activation de NFAT et régule négativement l'expression de Nrp-1, mais le chlorure de lithium inhibe l'activité de GSK3 et maintient NFAT actif dans le noyau ce qui augmente l'expression de Nrp-1.

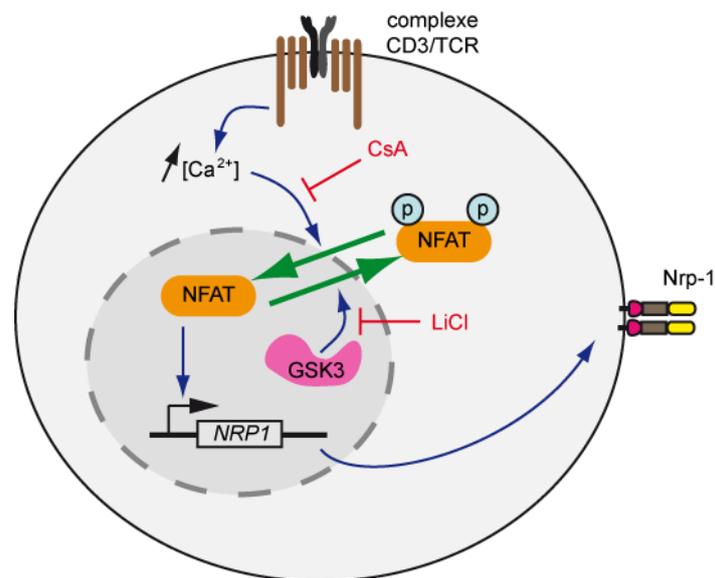


Figure 49. Schéma du mécanisme moléculaire d'induction de l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T activés par le TCR

Les expériences utilisant l'anticorps bloquant anti-Nrp-1 *in vitro* me permettent aussi d'établir un modèle des mécanismes de régulation de la prolifération des lymphocytes T dépendant de l'expression de Nrp-1 (**Figure 50**). L'activation des lymphocytes T par le TCR induit l'expression de Nrp-1 à la surface des cellules en division, mais induit aussi la sécrétion de Sema3A et de TGF- β 1. Ces deux dernières molécules se fixent sur Nrp-1 et ont des effets inhibiteurs sur la prolifération des lymphocytes T. Outre son effet sur la prolifération, le TGF- β 1 induit, en partie *via* Nrp-1, la différenciation en lymphocytes Treg Foxp3⁺, eux-mêmes capables de réguler négativement la prolifération des lymphocytes T.

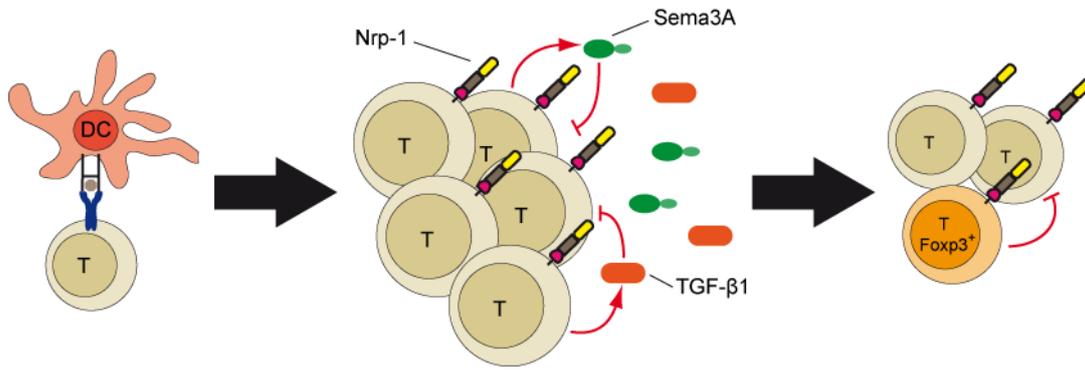


Figure 50. Schéma des mécanismes autocrines et paracrines de régulation de la prolifération des lymphocytes T dépendant de l'expression de Nrp-1

5. Discussion et perspectives

5.1. Caractérisation et maturation des lymphocytes iNKT ETR

Deux expériences complémentaires m'ont permis de conclure que les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ représentaient, dans la rate des souris adultes, les lymphocytes iNKT RTE. D'une part, le marquage *in situ* des thymocytes avec le fluorochrome FITC a permis de suivre, en périphérie, le phénotype des lymphocytes iNKT récemment exporté du thymus. Par cette méthode, j'ai mis en évidence que la très grande majorité (80-90%) des lymphocytes iNKT ETR exprime fortement Nrp-1. Cependant, la population de lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ spléniques pourraient représenter un mélange hétérogènes de lymphocytes ETR et de cellules iNKT NK1.1⁻ matures ou de cellules iNKT récemment activées. Pour répondre à cette question, j'ai procédé à l'expérience réciproque : après l'ablation du thymus, les souris adultes ne devraient plus présenter dans leurs organes périphériques de lymphocytes iNKT ETR. J'ai choisi de pratiquer la thymectomie sur des souris âgées de 8 semaines car à cet âge, le nombre et la proportion de lymphocytes iNKT en périphérie est stable et la thymectomie n'a que peu d'influence sur les lymphocytes iNKT matures [64]. De manière spectaculaire, la population de lymphocytes iNKT immatures Nrp-1⁺ CD69⁻ avait presque totalement disparu de la rate des souris ayant subi une thymectomie. Le nombre et la proportion de lymphocytes iNKT matures spléniques n'ont par contre pas été affectés significativement par l'ablation du thymus. Cette expérience implique donc que la population de lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ spléniques est entièrement dépendante de l'export thymique, ce qui conforte l'idée que cette population représente les lymphocytes iNKT ETR.

L'analyse des différents stades de maturation thymique des lymphocytes iNKT murins avait permis, dans deux études distinctes parues en 2002, de caractériser le phénotype des lymphocytes iNKT qui sortaient du thymus [40, 41]. Ces deux études concluaient que les lymphocytes iNKT ETR portaient le phénotype NK1.1⁻ CD44^{hi}. De plus, l'analyse de l'expression du marqueur précoce d'activation CD69 sur les lymphocytes iNKT de souris nouveaux-nées a révélé que les premiers lymphocytes iNKT qui sortent du thymus pour coloniser la rate sont CD69⁻ et qu'ils n'acquièrent l'expression de CD69 qu'après plusieurs jours [56]. Bien que dans cette dernière étude l'export des lymphocytes iNKT n'ait pas été analysé directement par une expérience d'injection de FITC intra-thymique, ces résultats suggèrent que CD69 n'est pas exprimé sur les lymphocytes iNKT ETR et que son expression n'intervient qu'après maturation en périphérie. Mes résultats montrent que les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ ont le phénotype CD44^{hi} NK1.1⁻ CD69⁻ analogue aux lymphocytes iNKT thymiques du stade 2. Mes résultats sont donc concordants avec les données de la

littérature et permettent d'établir que le phénotype CD44^{hi} NK1.1⁻ CD69⁻ Nrp-1⁺ est caractéristique des lymphocytes iNKT ETR.

L'état de lymphocyte ETR n'est que transitoire et aboutit à la maturation périphérique des lymphocytes iNKT en cellules matures. L'état de maturité des lymphocytes iNKT peut être vérifié par leur expression du marqueur NK1.1 ou de CD69, ainsi que de l'expression du récepteur de l'IL-15 CD122. De fait, il a été montré que les lymphocytes iNKT ETR, majoritairement NK1.1⁻, acquièrent rapidement l'expression de NK1.1 après leur sortie du thymus [40]. Cette maturation peut aussi avoir lieu dans le thymus et donne les lymphocytes iNKT thymiques de stade 3 qui persistent dans le thymus pour de très longues périodes [45]. Cependant, en périphérie, certains lymphocytes iNKT persistent avec le phénotype NK1.1⁻ même après ablation du thymus, ce qui suggère qu'il existe un sous-type de lymphocytes iNKT NK1.1⁻ matures [64]. Il a été montré que la maturation des lymphocytes iNKT et l'acquisition du marqueur NK1.1 est dépendante de l'action de l'IL-15 via son récepteur CD122 [59, 60]. Or, si l'expression de CD122 sur les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ est généralement faible, une proportion non-négligeable de ces cellules exprime CD122. Ceci suggère que les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ CD122⁺ représentent un intermédiaire de maturation plus avancé vers le stade NK1.1⁺ que les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ CD122⁻. Ces derniers pourraient être les précurseurs des lymphocytes iNKT NK1.1⁻ matures décrits par McNab *et al.* [64].

L'expression de CD1d par les cellules présentatrices d'antigènes, et donc la présentation de ligands glycolipidiques endogènes, n'est pas requise en périphérie pour la survie et la prolifération homéostatique des lymphocytes iNKT [61, 63]. Cependant, l'expression de CD1d en périphérie joue un rôle important dans la maturation des lymphocytes iNKT et l'acquisition de NK1.1 [62, 63]. Ces résultats suggèrent que la maturation des lymphocytes iNKT ETR dépend, au moins en partie, de la reconnaissance d'un ou plusieurs ligands endogènes présentés par des cellules CD1d⁺ en périphérie. En accord avec cette hypothèse, l'analyse du répertoire V β du TCR semi-invariant des lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ spléniques a révélé un biais de représentation des réarrangements mettant en jeu les segments V β 2 et V β 7, qui confèrent une plus faible affinité du TCR semi-invariant pour des complexes CD1d/glycolipide que le segment dominant V β 8.2 [31, 213]. Cependant, les travaux de McNab *et al.* montraient que l'expression de CD1d en périphérie n'était pas nécessaire à l'expression de CD69 par les lymphocytes iNKT après leur sortie du thymus [62]. Il s'avère donc que la reconnaissance de ligands endogènes présentés en périphérie par des cellules CD1d⁺ participe à l'acquisition du phénotype mature, mais n'est pas à elle seule responsable de l'acquisition de tous les marqueurs phénotypiques de

maturation. Il y a donc sans doute un rôle concerté de l'IL-15 et de ligands endogènes dans la maturation des lymphocytes iNKT après leur sortie du thymus.

L'intérêt du marqueur Nrp-1 réside donc en partie dans son utilité pour discriminer, dans les organes périphériques de souris C57BL/6, les lymphocytes iNKT ETR des lymphocytes iNKT NK1.1⁻ matures. En effet, alors que tous les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ sont NK1.1⁻, conformément au phénotype déjà observé sur les lymphocytes iNKT ETR, les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ ne représentent qu'une partie des lymphocytes iNKT NK1.1⁻ spléniques (environ 30%). On peut donc conclure que la population de lymphocytes iNKT NK1.1⁻ spléniques est constituée au 1/3 de lymphocytes iNKT ETR, et aux 2/3 de lymphocytes matures. Ce chiffre est plutôt en accord avec les résultats de l'étude de McNab *et al.* qui montre que la proportion et le nombre de lymphocytes iNKT NK1.1⁻ spléniques diminuent d'environ 25% et 50% respectivement après une ablation du thymus dans les souris adultes [64]. D'autre part, plusieurs souches de souris couramment utilisées dans des études en immunologie et en pathologie ne portent pas le locus génétique contenant le gène de NK1.1. C'est notamment le cas des souris Balb/c et NOD. Il est donc délicat d'établir l'immaturité des lymphocytes iNKT thymiques et périphériques dans ces souches sans l'utilisation du marqueur NK1.1. L'utilisation du marqueur Nrp-1, qui est exprimé sur les lymphocytes iNKT dans ces souris, permet de distinguer les stades du développement et de la maturation des lymphocytes iNKT les plus immatures. Ainsi, on pourrait dans ces souris distinguer les lymphocytes iNKT thymiques du stade 1 (CD44^{lo} Nrp-1⁺), du stade 2 (CD44^{hi} Nrp-1⁺) et du stade 3 (CD44^{hi} Nrp-1⁻), ainsi que les lymphocytes iNKT périphériques les plus immatures. J'ai d'ailleurs trouvé que la proportion de lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ dans la rate de souris Balb/c était plus importante que dans des souris C57BL/6 de même âge (35-40% contre 10-15%). Ce résultat est en accord avec la plus grande proportion de lymphocytes iNKT NK1.1⁻ retrouvés dans la rate de souris Balb/c congéniques portant le locus génétique de NK1.1 [222].

L'analyse de l'expression de Nrp-1 sur les différents stades de développement des thymocytes et sur les lymphocytes T conventionnels ETR a montré que seuls les lymphocytes Treg Foxp3⁺ CD25⁺ et les lymphocytes iNKT portent Nrp-1 à leur sortie du thymus. Il s'agit donc d'un trait phénotypique qui distingue ces deux populations de lymphocytes T αβ particulières des lymphocytes T conventionnels naïfs. Il semble pourtant que les raisons de l'expression de Nrp-1 dans ces deux sous-types soient différentes. En effet, l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes Treg Foxp3⁺ est placée sous le contrôle direct du facteur de transcription Foxp3 et est indépendante de l'activation par le TCR [189]. Par contre, l'expression de Nrp-1 dans les thymocytes immatures et les lymphocytes iNKT

des stades 1 et 2 est corrélée à la prolifération induite par le signal du pré-TCR et du TCR respectivement. Je pense donc que l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes iNKT ETR est un marqueur phénotypique rémanent de leur sélection positive par les thymocytes corticaux [33, 34].

L'abondance relative élevée des lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ dans les ganglions lymphatiques est un résultat intéressant. Notons tout d'abord que le phénotype des lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ des ganglions lymphatiques est semblable à celui de ces cellules dans la rate : NK1.1⁻ CD69⁻ CD122^{lo} CD4^{+/-}. Dans une étude préalable, l'analyse des lymphocytes iNKT colonisant les ganglions lymphatiques périphériques avait montré que ces lymphocytes iNKT étaient en majorité NK1.1⁻ et CD122⁻ [65]. Nos résultats sont donc en accord avec cette étude. Une question demeure : les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ des ganglions lymphatiques sont-ils des cellules récemment sorties du thymus ? Le faible nombre de lymphocytes iNKT présents dans les ganglions rend l'étude directe des lymphocytes iNKT ETR après injection intra-thymique de FITC difficile dans ces organes. Les résultats de mes expériences de thymectomie suggèrent que les lymphocytes iNKT des ganglions dépendent beaucoup de l'export thymique. Cependant, la thymectomie de souris à l'âge adulte abroge l'export de lymphocytes T conventionnels naïfs vers les ganglions et induit ainsi une diminution nette de la taille de ces organes. Il est donc aussi probable que l'effet de la thymectomie sur les nombres de lymphocytes iNKT dans les ganglions soit dû à cette diminution de la taille des ganglions. Dans tous les cas, les ganglions lymphatiques semblent être un environnement où la maturation des lymphocytes iNKT n'est pas aussi rapide que dans la rate ou le foie, puisque les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ NK1.1⁻ CD122^{lo} y sont présents abondamment, même dans des souris d'âge plus avancé [65].

5.2. Fonctionnalité des lymphocytes iNKT ETR

Grâce au nouveau marqueur Nrp-1 qui semble exclusivement exprimé sur les lymphocytes iNKT ETR dans les souris naïves, j'ai pu analyser un certain nombre de caractéristiques de ces cellules. Puisque Nrp-1 est à ce jour et à ma connaissance le seul marqueur permettant de décrire spécifiquement les lymphocytes iNKT ETR, je n'ai pu, pour confronter mes données à celles de la littérature, que faire référence à des études portant sur les lymphocytes iNKT thymiques du stade 2 ou aux lymphocytes iNKT NK1.1⁻ périphériques. J'ai ainsi pu remarquer qu'une grande partie des lymphocytes iNKT ETR (environ 30%) expriment Ki67 ou incorporent le BrdU, ce qui est le signe d'une prolifération active. Il est cependant difficile de dire si les lymphocytes iNKT ETR prolifèrent encore longtemps après leur sortie du thymus ou si l'expression de Ki67 et le BrdU incorporé ne sont que des caractères rémanents de la vague de prolifération intrathymique subie par les lymphocytes iNKT au cours de leur développement. En l'absence de stimulus antigénique, les lymphocytes iNKT ETR triés ne sont pas capables de proliférer *in vitro*. Par contre, les lymphocytes iNKT ETR ont une plus grande capacité à proliférer en réponse à une activation spécifique par α -GalCer. La prolifération *in vivo* des lymphocytes iNKT thymiques NK1.1⁻ et en particulier de ceux du stade 2 est déjà bien connue [24, 40, 44, 58]. De même, il a été observé que l'incorporation de BrdU est plus importante dans les lymphocytes iNKT NK1.1⁻ que dans les lymphocytes iNKT NK1.1⁺ spléniques quand cet analogue de thymidine est donné en continu aux souris pendant 5 jours [63, 64]. Mes données sont donc concordantes avec ces observations préalables et suggèrent même que les lymphocytes iNKT RTE sont les principaux responsables de l'incorporation accrue de BrdU par l'ensemble des lymphocytes iNKT NK1.1⁻.

D'autre part, j'ai pu analyser la production de cytokines par les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ et Nrp-1⁻ après activation par α -GalCer *in vitro* et *in vivo*. J'ai pu observer des différences majeures de production de cytokines entre les lymphocytes iNKT ETR (Nrp-1⁺) et les lymphocytes iNKT matures (Nrp-1⁻). *In vitro*, les lymphocytes iNKT ETR produisent, pendant 72 heures d'activation, 10 fois moins d'IFN- γ et 3-4 fois plus d'IL-4 que les lymphocytes iNKT matures. Ce résultat est en accord avec le biais de production de cytokines T_H2 des lymphocytes iNKT thymiques du stade 2 [40, 41], ce qui suggère donc que la sortie du thymus n'est pas responsable en soi d'un changement des propriétés effectrices des lymphocytes iNKT. Il apparaît cependant que divers sous-types de lymphocytes iNKT ont, dès leur développement dans le thymus, des propriétés de production de cytokines très diverses [77]. Il est donc intéressant de comprendre si le biais de production de cytokines T_H2 par les lymphocytes iNKT ETR est dû à un biais de production de l'ensemble de ces

cellules, ou plutôt à la présence parmi cette population d'un sous-groupe de cellules capables de produire plus de cytokines T_H2 plus longtemps. Pour ce faire, j'ai analysé la diversité des profils de production de cytokines au sein des lymphocytes iNKT ETR et matures après injection d' α -GalCer *in vivo*. Ces analyses m'ont permis de conclure que la grande majorité des lymphocytes iNKT matures produisent à la fois des cytokines T_H1 (IFN- γ) et T_H2 (IL-4 et/ou IL-13). Ce résultat suggère que la diversité des profils effecteurs des lymphocytes iNKT n'est pas si grande au sein des lymphocytes iNKT matures, en tous cas dans le système d'activation *in vivo* que j'ai utilisé. En revanche, parmi les lymphocytes iNKT ETR, j'ai pu observer que près de la moitié de ces cellules ne produisait ni IFN- γ , ni IL-4, ni IL-13. Et parmi les cellules iNKT Nrp-1⁺ qui produisaient au moins une de ces trois cytokines 2^H après l'injection d' α -GalCer, au moins 40% ne produisaient que des cytokines T_H2 et pas d'IFN- γ . Ces données *in vivo* suggèrent que le biais de production de cytokines T_H2 par les lymphocytes iNKT ETR n'est pas le fait de l'ensemble de ces cellules, mais plutôt d'un sous-groupe de lymphocytes iNKT ETR. La capacité supérieure des lymphocytes iNKT ETR à proliférer en réponse à α -GalCer *in vitro* n'est sans doute pas étrangère à la plus forte production d'IL-4 mesurée dans les surnageants de ces cellules. On peut légitimement se demander si les cellules iNKT ETR non-productrices d'IFN- γ , d'IL-4 et d'IL-13 sont capables de produire d'autres cytokines. En effet, la diversité des sous-types de lymphocytes iNKT thymiques, en termes de production de cytokines différentes, semble être contenue plutôt dans le compartiment NK1.1⁻ [77]. Il est probable que les lymphocytes iNKT ETR aient encore une plasticité fonctionnelle et soient capables de produire des cytokines très variées, à l'image des lymphocytes T naïfs. Ce ne serait qu'au moment de leur maturation que l'expression de T-bet, forcée par la signalisation de l'IL-15 *via* CD122 [57, 59], scellerait leur destin de producteurs d'IFN- γ .

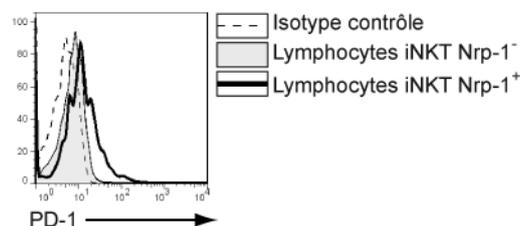


Figure 51. Expression de PD-1 dans les lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ et Nrp-1⁺ de la rate

Les lymphocytes de la rate de souris C57BL/6 âgée de 8 semaines ont été préparés pour l'analyse par cytométrie de flux de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes iNKT (TCR β ⁺ CD1d Tet⁺) Nrp-1⁻ et Nrp-1⁺. Ce résultat est représentatif de trois expériences indépendantes.

Une autre hypothèse pouvant expliquer l'absence de sécrétion de cytokines par une grande partie des lymphocytes iNKT ETR activés *in vivo* est que ces cellules sont anergiques du fait de leur activation préalable dans le thymus. En effet, on sait que l'activation des lymphocytes iNKT par leur TCR induit un état d'anergie qui les rend inefficaces à répondre à une deuxième activation [72]. Cette période d'anergie peut durer plus de trente jours et est dépendante de l'expression du récepteur inhibiteur PD-1 à la surface des lymphocytes iNKT après activation [75, 76]. Or l'analyse de l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes iNKT a montré que les lymphocytes iNKT ETR Nrp-1⁺ expriment faiblement PD-1 alors que les lymphocytes iNKT matures Nrp-1⁻ n'expriment pas cette molécule (**Figure 51**). Il est donc possible que cette expression de PD-1 empêche partiellement, ou retarde, l'activation des lymphocytes iNKT ETR en réponse à l'injection d' α -GalCer *in vivo*.

Si la découverte du marqueur spécifique Nrp-1 permet de mieux décrire et caractériser les lymphocytes iNKT ETR, les propriétés particulières de ces cellules ont sans doute déjà été mises en évidence, sans forcément savoir qu'il s'agissait de cellules récemment sorties du thymus. Une analyse rétrospective de la littérature m'a permis d'identifier plusieurs études pour lesquelles je pense que les auteurs avaient affaire aux lymphocytes iNKT ETR.

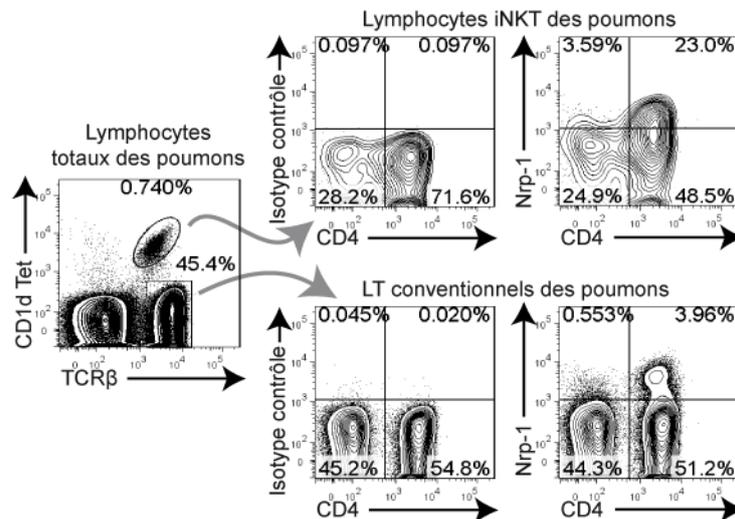


Figure 52. Expression de Nrp-1 par les lymphocytes iNKT des poumons.

Les lymphocytes des poumons de souris C57BL/6 âgée de 8 semaines ont été préparés pour l'analyse de l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes iNKT (TCR β^+ CD1d Tet⁺) et dans les lymphocytes T conventionnels (TCR β^+ CD1d Tet⁻) par cytométrie de flux. La comparaison du marquage obtenu avec l'isotype contrôle permet de bien distinguer une population de lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ ainsi qu'une population de lymphocytes T conventionnels Nrp-1⁺ (les Treg). Ces résultats sont représentatifs de plus de dix expériences indépendantes.

Deux études, menées sur des souris Balb/c, ont montré qu'un sous-type de lymphocytes iNKT exprime le récepteur de l'IL-25, appelé IL-17RB, et joue un rôle primordial dans l'inflammation pulmonaire allergique déclenchée par la cytokine IL-25 [214, 223]. Les lymphocytes iNKT IL-17RB⁺ présentent un phénotype CD4⁺ CD69⁻ CD122^{lo} TCR^{hi}, et sont abondants dans le thymus, la rate et les poumons, mais pas le foie des souris Balb/c. Autant de caractéristiques phénotypiques et de localisation partagées par les lymphocytes iNKT ETR Nrp-1⁺, que ce soit dans les souris Balb/c ou les souris C57BL/6. En effet, j'ai retrouvé une forte proportion de lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ dans les poumons de souris C57BL/6 (**Figure 52**). En revanche, ces deux études montrent que le sous-type de lymphocytes iNKT IL-17RB⁺ n'existe pas dans les souris de souche C57BL/6. Il semble donc que la capacité des lymphocytes iNKT ETR à répondre à l'IL-25 ne soit observée que dans la souche Balb/c. Il n'est par ailleurs pas étonnant que les lymphocytes iNKT ETR soient impliqués dans un modèle pathologique dépendant d'une inflammation de type Th2, étant donné le profil de sécrétion de cytokines de ces cellules.

Il a aussi été montré qu'une population de lymphocytes iNKT NK1.1⁻ exprime fortement CD1d et est capable de s'autoprésenter le ligand α -GalCer en l'absence de cellules présentatrices d'antigène [224]. Dans le thymus, CD1d est exprimé en abondance par les lymphocytes iNKT immatures (stades 1 et 2) et permet leur développement optimal [63]. J'ai pu observer que les lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ spléniques expriment beaucoup plus la molécule présentatrice d'antigène CD1d (**Figure 53**) que les lymphocytes iNKT matures. Il apparaît donc que les lymphocytes iNKT ETR expriment fortement CD1d. La question de savoir si l'expression autonome de CD1d par ces cellules est nécessaire pour le processus de maturation reste ouverte.

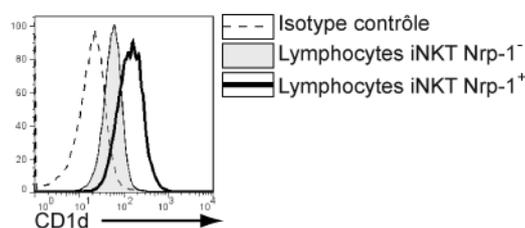


Figure 53. Expression de CD1d dans les lymphocytes iNKT Nrp-1⁻ et Nrp-1⁺ de la rate

Les lymphocytes de la rate de souris C57BL/6 âgée de 8 semaines ont été préparés pour l'analyse par cytométrie de flux de l'expression de CD1d sur les lymphocytes iNKT (TCR β ⁺ CD1d Tet⁺) Nrp-1⁻ et Nrp-1⁺. Ce résultat est représentatif de quatre expériences indépendantes.

5.3. Régulation homéostatique des lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17

Un autre sous-type de lymphocytes iNKT murins correspondant vraisemblablement à des cellules ETR et ayant été beaucoup décrit dans la littérature récemment sont les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17. En effet, les expériences d'activation *in vitro* et *in vivo* de lymphocytes iNKT m'ont permis de déterminer que les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 expriment dans leur quasi-totalité Nrp-1. De plus, après thymectomie des souris à l'âge adulte, le nombre de lymphocytes iNKT capables de produire l'IL-17 dans la rate et les ganglions lymphatiques périphériques est divisé par 4 par rapport aux souris contrôle. J'ai donc pu déduire de ces expériences que les lymphocytes iNKT appartenaient, dans leur grande majorité, au groupe des lymphocytes iNKT ETR.

Ces résultats sont pour le moins inattendus et les études précédentes des lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 présageaient plutôt que ces derniers appartenaient aux lymphocytes iNKT NK1.1⁻ matures, et ce pour plusieurs raisons. D'une part, on retrouve des lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 dans les ganglions lymphatiques de souris âgées de 4 mois, âge auquel l'export thymique est diminué [65]. D'autre part, l'hypothèse que les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 pouvaient être des cellules ETR a été écartée par Coquet *et al.* sous le prétexte qu'ils ne parvenaient pas, grâce à la technique de l'injection de FITC intra-thymique, à détecter des lymphocytes iNKT ETR dans les ganglions lymphatiques périphériques, organes qui sont pourtant très riches en lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 [77]. Or mes résultats montrent clairement que ces conclusions ont été avancées hâtivement. D'une part, bien que les populations de lymphocytes iNKT NK1.1⁺ et NK1.1⁻ soient à l'équilibre dans les organes lymphoïdes murins après 2 mois de vie, l'export thymique des lymphocytes T naïfs et des lymphocytes iNKT est encore très important à l'âge de 2-3 mois, comme l'attestent mes expériences de thymectomie à l'âge adulte. Des souris âgées de 4 mois ont certes un thymus plus petit que des souris de 4 semaines, mais l'involution thymique n'est pas totale à cet âge, qui est encore jeune pour ces animaux. D'autre part, comme je l'ai expliqué plus tôt, il est très délicat de rechercher des lymphocytes iNKT ETR dans les ganglions lymphatiques. En effet, les lymphocytes iNKT ne représentent qu'environ 0,1-0,2% des lymphocytes dans ces organes. Donc, en faisant l'hypothèse que 40% (c'est environ le pourcentage de cellules Nrp-1⁺ parmi les lymphocytes iNKT de ces organes) des lymphocytes iNKT sont renouvelés par l'export thymique tous les 5 jours (c'est la vitesse de renouvellement des lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ spléniques que j'ai calculée) et que l'on cherche à analyser les cellules ETR 36 heures après injection intra-thymique de FITC (qui marque environ 30% des thymocytes), il faudra être capable de détecter entre 0,005% et 0,01% des lymphocytes. Ce n'est *a priori* pas impossible, mais il n'est pas

certaines que Coquet *et al.* se soient donnés les moyens de détecter des évènements aussi rares.

Il pourrait cependant m'être opposé qu'il reste encore des lymphocytes iNKT capables de produire de l'IL-17 dans la rate et les ganglions lymphatiques périphériques de souris ayant subi une ablation du thymus. Existerait-il donc plusieurs populations de lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 ? L'une, majoritaire, serait constituée exclusivement de lymphocytes ETR, alors que l'autre, minoritaire, serait constituée de cellules matures. Etant donné la grande diversité fonctionnelle des lymphocytes iNKT, cette hypothèse est plausible. Une autre possibilité est que l'ablation, même complète, des deux lobes thymiques ne soit pas suffisante pour abroger complètement la fonction d'export de lymphocytes T nouvellement formés. Il a en effet été montré que les souris peuvent posséder de petits thymi ectopiques, appelés « thymi cervicaux », capables de fonctionner aussi bien que le thymus thoracique [225, 226]. Ces organes, qui sont présents dans environ 30-50% des souris C57BL/6 et plus de 50% des souris Balb/c, pourraient avoir contribué à l'export de lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 en l'absence du thymus thoracique.

Malgré le point d'interrogation soulevé ci-avant, mes résultats montrent que la grande majorité des lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 sont bien des cellules récemment exportées du thymus. La fonction d'export thymique est donc particulièrement importante pour le maintien de cette population aux fonctions immunitaires encore mal connues. On peut logiquement se demander ce que deviennent ces cellules après leur sortie du thymus et leur passage par les organes lymphoïdes secondaires. On peut déduire des expériences de thymectomie que leur présence dans les organes lymphoïdes comme la rate (et probablement aussi les ganglions lymphatiques périphériques) n'est que transitoire. Plusieurs scénarios sont alors possibles : (i) ces cellules deviennent matures et perdent la capacité de produire de l'IL-17 ; (ii) ces cellules meurent rapidement dans ces organes ; (iii) ces cellules migrent préférentiellement vers d'autres tissus. Les expériences de Michel *et al.* ont montré que les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17, triés positivement à partir de souris transgéniques exprimant GFP sous le contrôle du promoteur du facteur de transcription ROR- γ t, ne donnent pas d'autre « descendance » que des lymphocytes iNKT ROR- γ t⁺ producteurs d'IL-17 après culture dans le modèle FTOC [117]. Il semble donc que les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 n'aient pas la possibilité de maturer en d'autres types de producteurs de cytokines. Il n'y a pas, à ma connaissance, d'étude publiée étudiant spécifiquement l'apoptose des lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17. Par contre, on sait que les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 sont présents dans des tissus comme les poumons [119, 120] et la peau [65]. Il est donc probable qu'au moins une partie des

lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 migrent rapidement vers ces tissus à leur sortie du thymus.

5.4. Rôle de Nrp-1 dans le développement et la fonction des lymphocytes iNKT

A la lumière des résultats obtenus sur les lymphocytes T conventionnels au cours de ma thèse, il apparaît encore plus clair que l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes iNKT thymiques et ETR est probablement déclenchée par l'activation du TCR lors de la phase de sélection positive des thymocytes présentant le réarrangement canonique V α 14J α 18 du TCR. De même, l'activation de la voie Ca²⁺/calcineurine/NFAT est sans doute impliquée dans l'induction de Nrp-1 à la surface des précurseurs thymiques iNKT. Le rôle crucial du facteur de transcription Egr2, cible directe de NFAT, dans le développement thymique des lymphocytes iNKT a récemment été démontré [53]. Ce travail souligne donc l'importance du signal calcique dans le développement et la maturation des lymphocytes iNKT [52]. Il est donc possible que l'expression de Nrp-1 soit impliquée dans le processus de développement et de maturation de ces cellules dans le thymus.

Récemment, plusieurs études ont montré que Nrp-1 pouvait servir de récepteur au TGF- β 1 sous sa forme latente ou active [171, 173, 174]. D'une part, la fixation du TGF- β 1 latent à Nrp-1 induit un changement de conformation du LAP qui aboutit à la libération de la forme active du TGF- β 1 [173]. D'autre part, la fixation du TGF- β 1 actif sur Nrp-1 augmente la phosphorylation des protéines de signalisation Smad2/3 en aval du TGF- β RII [174]. Or on sait que la signalisation du TGF- β 1 dans les thymocytes est nécessaire au développement des lymphocytes iNKT. En effet, l'ablation du gène codant pour le TGF- β RII spécifiquement dans les thymocytes immatures induit notamment une réduction drastique du nombre et de la fonction des lymphocytes iNKT thymiques et périphériques [15, 16]. Doisne *et al.* ont tout récemment montré que plusieurs voies de signalisation en aval du TGF- β 1 jouaient des rôles différents à différents stades du développement et de la maturation des lymphocytes iNKT [227]. Il est donc probable que Nrp-1 soit impliqué, en tant que récepteur/activateur favorisant la signalisation *via* Smad2/3, dans les étapes précoces du développement des lymphocytes iNKT ainsi que dans leur maturation. Il a aussi été suggéré que l'expression de certains marqueurs importants pour la localisation des lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 dans les tissus (CD103 et CCR6) pourrait être dépendante de la signalisation du TGF- β 1 [65]. L'expression spécifique de Nrp-1 sur les cellules iNKT productrices d'IL-17 pourrait faciliter cet effet du TGF- β 1. Enfin, si l'on connaissait la capacité du TGF- β 1 à induire l'expression de Foxp3 dans les lymphocytes T conventionnels activés, on sait maintenant qu'une partie des lymphocytes iNKT peuvent eux aussi exprimer Foxp3 lorsqu'ils sont activés en présence de cette cytokine [228]. Il serait intéressant de regarder si les lymphocytes iNKT ETR Nrp-1⁺ sont plus aptes à se différencier en cellules Foxp3⁺ en présence de TGF- β 1 que les lymphocytes iNKT matures Nrp-1⁻.

Dans les lymphocytes T humains et les lymphocytes Treg Foxp3⁺ murins, l'expression de Nrp-1 favoriserait la formation de contacts cellulaires prolongés avec les cellules dendritiques [191, 198]. Ces contacts cellulaires feraient intervenir, au sein d'une synapse immunologique, des interactions homotypiques en *trans* entre les molécules Nrp-1 exprimées sur les lymphocytes T et les molécules Nrp-1 exprimées par les cellules dendritiques. Etant donné l'expression forte de Nrp-1 par les thymocytes DP corticaux, il est possible que de telles interactions soient aussi requises pour permettre des contacts prolongés entre les précurseurs thymiques iNKT et les cellules DP CD1d⁺ leur présentant un ligand endogène pour leur sélection. De la même manière, l'activation des lymphocytes iNKT dans les ganglions lymphatiques par des ligands glycolipidiques particuliers nécessite l'établissement de contacts prolongés avec les macrophages du sinus subcapsulaire leur présentant l'antigène [71]. Or les macrophages activés peuvent exprimer Nrp-1 [197], tout comme une grande partie des lymphocytes iNKT des ganglions lymphatiques. Il est donc possible que Nrp-1 joue aussi un rôle important dans la formation d'une synapse immunologique entre ces deux types cellulaires lors des réponses immunitaires périphériques. Enfin, les interactions prolongées entre les lymphocytes Treg et les cellules dendritiques participent à l'action immunosuppressive des premiers [191]. Les lymphocytes iNKT sont eux-aussi capables, *in vitro* et *in vivo*, d'inhiber la différenciation de lymphocytes T activés en effecteurs producteurs de cytokines [229]. Cette inhibition, dépendante du contact cellulaire et favorisée par l'activation des lymphocytes iNKT par α -GalCer, pourrait aussi faire intervenir Nrp-1, qui est exprimé à la fois par les lymphocytes iNKT et T conventionnels activés.

L'expression de Nrp-1 est indispensable aux effets de son ligand Sema3A sur la dynamique du cytosquelette dans ses cellules cibles. Ce rôle de Sema3A, important pour le guidage des axones lors du développement du système nerveux central, est aussi impliqué dans les effets de Sema3A sur le cytosquelette des cellules du système immunitaire. Ainsi, Sema3A désorganise le cytosquelette d'actine au niveau de la synapse immunologique entre les lymphocytes T humains et les cellules dendritiques et diminue donc l'activation des lymphocytes T [207, 208]. L'expression de Nrp-1 sur les précurseurs thymiques iNKT en prolifération ainsi que sur les lymphocytes iNKT matures activés pourrait permettre le contrôle de la prolifération de ces cellules *via* l'action de Sema3A. De plus, au sein du thymus humain, le couple Sema3A/Nrp-1 régule la migration des thymocytes en réponse à plusieurs signaux pro-migratoires [184]. Une autre protéine de la famille des sémaphorines de classe 3, Sema3E, est exprimée au niveau de la médulla du thymus murin et empêche la migration des thymocytes DP immatures exprimant son récepteur PlexinD1 vers cette zone

du thymus [187]. Bien que la majorité des effets de Sema3E sur les cellules nerveuses, cancéreuses, et endothéliales soient indépendantes de l'expression de Nrp-1 [230-232], la co-expression de Nrp-1 et PlexinD1 régule l'effet répulsif de Sema3E sur certains axones [230]. L'expression de Nrp-1 par les thymocytes immatures et les lymphocytes iNKT thymiques immatures pourrait donc être importante pour la régulation de la migration de ces cellules au sein du thymus. Enfin, l'expression de Sema3A par les cellules endothéliales lymphatiques joue un rôle crucial dans la transmigration des cellules dendritiques activées Nrp-1⁺ nécessaire à la migration de ces cellules des tissus infectés vers les ganglions [200]. L'expression de Nrp-1 pourrait alors aussi jouer un rôle particulier dans la sortie des lymphocytes iNKT du stade 2 du thymus vers la périphérie, ou dans la localisation préférentielle des lymphocytes iNKT Nrp-1⁺ dans les ganglions lymphatiques.

5.5. Mécanismes de régulation positive et négative de l'expression de Nrp-1

Plusieurs expériences présentées dans ce manuscrit attestent du rôle de l'activation du TCR dans l'induction de l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes T conventionnels et iNKT. D'une part, on peut noter, dans les organes lymphoïdes des souris naïves, une corrélation nette entre l'expression de Nrp-1 et la prolifération associée à la signalisation du TCR ou du pré-TCR : Nrp-1 est exprimé dans les thymocytes immatures à partir de la β -sélection jusqu'à la sélection positive, dans les lymphocytes iNKT thymiques des stades immatures (stade 1 et 2) et les lymphocytes iNKT ETR, ainsi que dans les lymphocytes T conventionnels CD44^{hi} en prolifération rapide (Ki67⁺). De plus, l'activation de lymphocytes T conventionnels et iNKT *in vitro* par plusieurs agonistes du TCR a clairement démontré que l'induction de Nrp-1 était dépendante de l'intensité de stimulation du TCR. L'impact de signaux de co-stimulation et de l'apport d'IL-2 exogène sur l'expression de Nrp-1 induite par l'activation du TCR a aussi pu être mesuré. De manière très intéressante, le couplage de l'expression de Nrp-1 à la dilution du CFSE suggère que l'expression de Nrp-1 est d'autant plus importante que les cellules sont dans une phase active de prolifération. Cependant, en dessous d'un certain seuil d'intensité de stimulation du TCR, la prolifération des lymphocytes T activés n'est pas associée à l'expression de Nrp-1. Inversement, les expériences de réactivation de lymphocytes T nous montrent que l'expression de Nrp-1 après activation du TCR peut être très rapide et vraisemblablement précéder la première division des lymphocytes T réactivés. Bien que l'expression du facteur de transcription Foxp3 soit suffisante pour induire l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T [189, 191], l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T activés par le TCR est indépendante de l'expression de Foxp3.

Les expériences réalisées *in vitro* sur les lymphocytes T conventionnels montrent des rôles antagonistes du facteur de transcription NFAT et de sa kinase régulatrice GSK3 sur l'expression de Nrp-1 après engagement du TCR. Le blocage de la voie de signalisation Ca²⁺/calcineurine/NFAT par la drogue immunosuppressive CsA diminue dramatiquement l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes T réactivés. L'expression de Nrp-1 après engagement du TCR semble particulièrement dépendante de cette voie de signalisation puisqu'une dose 10 fois inférieure à la dose recommandée de CsA suffit à l'inhiber presque totalement. Dans le système des lymphocytes OT-1 activés par leur peptide agoniste SIINFEKL présenté à la surface de cellules dendritiques, la dose de 10 ng/ml de CsA n'a pas d'effet notable sur la prolifération des cellules mais suffit à inhiber de près de 50% l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes T divisés. L'inhibition de l'activité de la kinase GSK3 par le LiCl promeut l'activité de NFAT en empêchant sa phosphorylation par GSK3 et

donc sa sortie du noyau [220, 221]. Dans les lymphocytes T activés, ceci a pour effet de permettre une expression beaucoup plus importante de Nrp-1 dans les lymphocytes divisés. Dans leur ensemble, ces expériences soulignent le rôle central de NFAT dans l'expression de Nrp-1 après activation du TCR.

En dehors de Foxp3, les facteurs de transcription capables d'activer l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T ne sont pas connus. Par contre, certains facteurs de transcription, décrits dans d'autres systèmes cellulaires comme des inducteurs de la transcription du gène *NRP1*, sont impliqués dans l'activation et le développement des lymphocytes T. Le facteur de transcription AP-1 peut se fixer sur une région conservée du promoteur de *NRP1* et activer sa transcription dans les cellules endothéliales [233]. Or AP-1 est un partenaire de NFAT qui participe conjointement à l'expression de plusieurs gènes cibles de NFAT dans les lymphocytes T activés [6, 234]. Le rôle crucial de NFAT dans l'induction de Nrp-1 dans les lymphocytes T activés pourrait donc nécessiter la formation de complexes NFAT/AP-1 et leur fixation sur le promoteur de *NRP1*. Toujours dans les cellules endothéliales, l'activation de la voie Notch1 par son ligand DLL1 active la transcription du gène *NRP1* et induit l'expression de Nrp-1 à la surface de ces cellules [235]. Or Notch1 est un régulateur extrêmement important du développement des lymphocytes T qui agit notamment au cours de la β -sélection en synergie avec la signalisation du pré-TCR [1]. L'activation de Notch1 peut résulter en l'activation de la calcineurine et de NFAT dans certains types cellulaires [236]. L'expression de Nrp-1 dans les thymocytes immatures et les lymphocytes T activés pourrait donc aussi dépendre de l'activité de la voie de signalisation de Notch1. Grâce au programme Mapper (Chip Bioinformatics, University of Florida), j'ai pu identifier *in silico*, en amont du site d'initiation de la transcription du gène *NRP1*, un site consensus de fixation du facteur de transcription « myocyte enhancer factor 2 » (MEF2) très conservé. Or MEF2 est un facteur de transcription dont l'activité dépend de l'activité de la calcineurine et qui joue un rôle important, en partenariat avec NFAT, dans la transcription de gènes cibles comme *IL2* et *Nur77* dans les thymocytes et les lymphocytes T activés [237-239]. MEF2 pourrait donc aussi être important pour l'induction de Nrp-1 après engagement du TCR.

L'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T activés est maximale environ 36 à 48 heures après l'activation initiale. En l'absence de nouvel engagement du TCR, l'expression de Nrp-1 diminue ensuite progressivement jusqu'à redevenir très faible à nulle 5 jours après l'activation initiale. D'ailleurs, mis à part les sous-types de cellules en prolifération homéostatique intense, les lymphocytes T mémoire murins n'expriment que peu ou pas Nrp-1. De même, les lymphocytes iNKT matures sont Nrp-1⁻ dans les souris naïves. Il semble

donc que l'absence de stimulation forte et continue du TCR soit à l'origine de la diminution d'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T et iNKT. Néanmoins, il est intrigant que des processus nécessitant un engagement du TCR, comme la sélection positive des thymocytes ou la maturation périphérique des lymphocytes iNKT, s'accompagnent d'un arrêt de l'expression de Nrp-1 (et n'induisent pas la prolifération des cellules impliquées). L'intensité de stimulation du TCR ainsi que le contexte moléculaire secondaire de ces interactions sont sans doute des éléments déterminants dans la « décision » d'un thymocyte ou d'un lymphocyte mature d'exprimer Nrp-1. Pour les lymphocytes iNKT, on peut ainsi faire l'hypothèse qu'un signal faible (ligand endogène) couplé à l'activation de SAP (suite à l'engagement des récepteurs de la famille Slam) induit la prolifération et l'expression de Nrp-1, alors qu'un signal faible (ligand endogène présenté en périphérie) en l'absence d'engagement de Slam n'induit ni la prolifération ni l'expression de Nrp-1. Un signal fort (forte dose d' α -GalCer) serait capable d'induire la prolifération et l'expression de Nrp-1, même en l'absence d'engagement de Slam (**Figure 54**). Ce modèle s'appliquerait aussi à la sélection positive des thymocytes et à l'activation des lymphocytes T conventionnels matures.

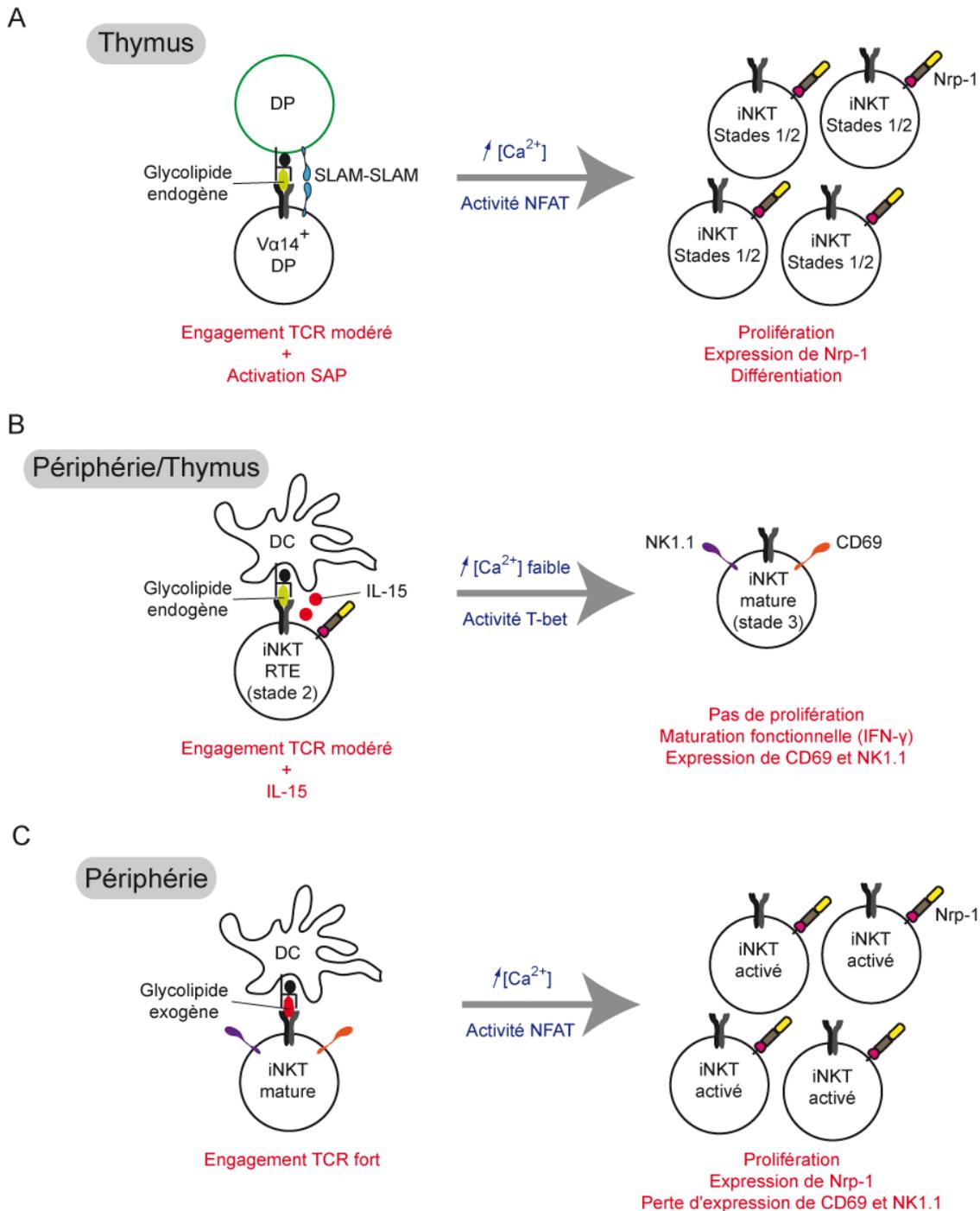


Figure 54. Modèle d'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes iNKT murins en fonction du contexte de la stimulation du TCR

(A) Dans le thymus, l'engagement du TCR semi-invariant des précurseurs iNKT par un ligand endogène présenté par un thymocytes DP, associé à la signalisation de SAP déclenchée par l'interaction Slam-Slam, déclenchent un signal calcique fort qui résulte en l'activation de NFAT, la prolifération, l'expression de Nrp-1 et la différenciation en lymphocytes iNKT. (B) Dans le thymus et en périphérie, l'engagement du TCR des lymphocytes iNKT du stade 2 par un ligand endogène présenté par les cellules dendritiques n'induit qu'un signal calcique faible insuffisant pour activer NFAT, maintenir l'expression de Nrp-1 et induire la prolifération, mais la signalisation de l'IL-15 permet d'activer T-bet et d'induire la maturation des lymphocytes iNKT. (C) Dans le cas d'une activation par un agoniste fort comme α-GalCer, le signal résultant de l'engagement du TCR est suffisamment fort pour induire par lui-même l'activité de NFAT, la prolifération, et l'expression de Nrp-1.

5.6. Nrp-1 : une plateforme intégrative de mécanismes régulateurs

L'expression de récepteurs ou de ligands à la surface des lymphocytes T activés peut avoir plusieurs rôles dans l'activation et/ou la régulation des réponses immunitaires. Ainsi, l'expression de CD25 est nécessaire à la prolifération des lymphocytes T activés en réponse à l'IL-2 sécrétée de manière autocrine et paracrine, alors que l'engagement du marqueur d'activation CTLA-4 par ses ligands CD80 et CD86 exprimés par les cellules dendritiques a pour effet de diminuer la prolifération des lymphocytes T. Certains marqueurs exprimés par les lymphocytes T activés participent à l'adhésion de ces cellules (CD44, intégrines), à leur migration préférentielle vers les tissus inflammés ou les follicules (CCR4 ou CXCR5, respectivement), ou à leur différenciation en différents types d'effecteurs (IFN- γ R, IL-4R). Enfin, certaines molécules exprimées par les lymphocytes T après engagement de leur TCR permettent l'activation optimale des lymphocytes B (CD40L, ICOS, OX40). Je me suis donc demandé si l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes T activés pouvait servir des fonctions similaires à celles d'autres marqueurs d'activation.

Pour essayer de répondre à cette question, j'ai utilisé un anticorps polyclonal capable de bloquer spécifiquement la fixation de ses différents ligands connus sur Nrp-1. En ajoutant cet anticorps pendant l'activation de lymphocytes T par leur TCR, j'ai pu observer que le blocage de Nrp-1 induit une augmentation de la prolifération. J'ai ensuite mis en évidence que Sema3A, un ligand de Nrp-1, est exprimé par les lymphocytes T activés et inhibe la prolifération des lymphocytes T. L'effet immunosuppresseur de Sema3A sur les lymphocytes T avait déjà été mis en évidence dans des modèles humains *in vitro* [207, 208]. De plus, l'existence d'une boucle autocrine de régulation négative de la prolifération des lymphocytes T activés par le couple Sema-3A/Nrp-1 pouvait être supposée d'après une étude précédente [210]. Mes résultats montrent que les lymphocytes T murins expriment à la fois Sema3A et Nrp-1 après engagement de leur TCR, comme c'est le cas pour les lymphocytes T humains [196, 208]. Dans les lymphocytes T humains, l'action immunosuppressive de Sema3A passe par l'inhibition de la réorganisation du cytosquelette au niveau de la synapse immunologique [207, 208]. On peut aussi imaginer que l'activation de GSK3 par la voie de signalisation déclenchée par Sema3A [240] participe de cet effet en accélérant l'export nucléaire de NFAT. Les cellules dendritiques activées sont elles aussi capables de produire Sema3A quand elles sont activées, surtout en présence de CD40L [208]. Il est donc probable que la concentration locale en Sema3A au niveau de la synapse entre un lymphocyte T et une cellule dendritique lui présentant son antigène spécifique soit faible dans les premières heures de l'interaction, mais qu'elle augmente au cours du temps et soit maximale environ

36^h après le début de l'interaction. La Sema3A agirait alors localement sur le lymphocyte T exprimant Nrp-1, déstabiliserait le cytosquelette d'actine, et participerait ainsi à l'interruption du contact entre la cellule dendritique et le lymphocyte T, au moment de l'initiation de la prolifération [8] (**Figure 55**).

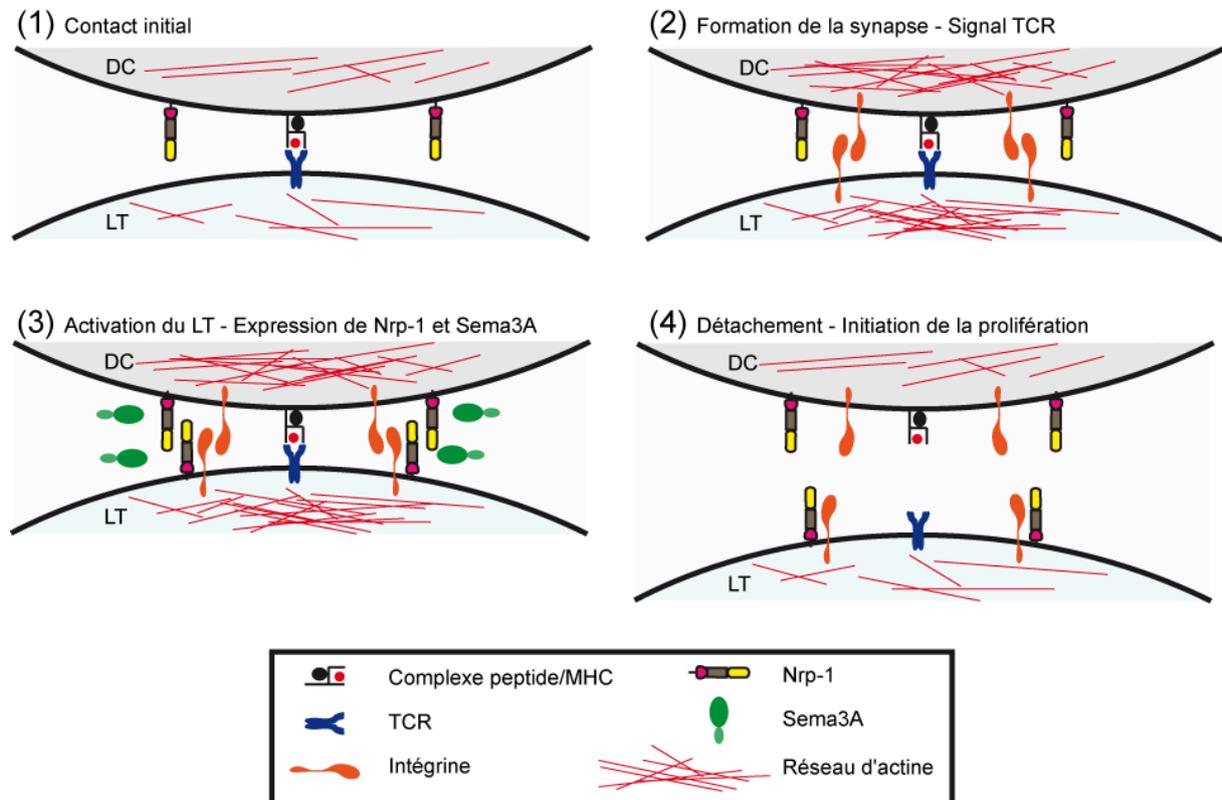


Figure 55. Modèle décrivant le rôle du couple Nrp-1/Sema3A dans la dynamique des contacts cellulaires pendant l'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques

Lorsqu'un lymphocyte T rencontre une cellule dendritique présentant son antigène spécifique, il établit un contact (1). Cette zone de contact s'organise en une synapse immunologique, mettant en jeu des interactions moléculaires fortes (intégrines) et un réseau dense d'actine filamenteuse, qui permet la signalisation optimale du TCR (2). Le lymphocyte T activé se met à exprimer Nrp-1, et à la fois le lymphocyte T activé et la cellule dendritique activée produisent Sema3A. L'expression de Nrp-1 et la production de Sema3A sont maximales environ 36^h après le contact initial (3). L'action de Sema3A induit la désorganisation du réseau d'actine, l'affaiblissement de la synapse immunologique, et permet donc le détachement du lymphocyte T de la cellule dendritique au moment de l'initiation de la prolifération (4).

Un autre ligand de Nrp-1, TGF- β 1, participe vraisemblablement à la fonction régulatrice de l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes T activés. En effet, l'ajout de l'anticorps bloquant de Nrp-1 inhibe deux effets majeurs du TGF- β 1 sur les lymphocytes T CD4⁺ : l'inhibition de la prolifération et la conversion en lymphocytes iTreg. Dans ces expériences *in vitro*, j'ai utilisé le TGF- β 1 recombinant sous sa forme active. C'est donc bien le rôle de corécepteur joué par Nrp-1 dans la signalisation du TGF- β 1 qui est impliqué ici [174], et non celui de simple récepteur activateur de la forme latente de TGF- β 1 [173]. Ces

résultats suggèrent par ailleurs que l'expression de Nrp-1 par les lymphocytes T CD4⁺ activés pourrait être importante pour leur différenciation préférentielle en lymphocytes T_H17 ou iTreg, tous deux dépendants de l'activité du TGF-β1.

Mes résultats obtenus *in vitro* suggèrent donc que Nrp-1 pourrait participer à plusieurs fonctions sur les lymphocytes T activés : régulation de la prolifération, modification des contacts avec les cellules dendritiques, différenciation en lymphocytes effecteurs. Une multiplicité de ligands et de co-récepteurs capables de se fixer à Nrp-1 et d'induire des voies de signalisation différentes a déjà été impliquée dans la régulation des réponses immunitaires. Nrp-1 serait donc une plateforme capable d'intégrer plusieurs mécanismes régulateurs en fonction du contexte cellulaire et moléculaire de l'engagement du TCR sur les lymphocytes T.

5.7. Expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T humains

La première étude de Nrp-1 dans les lymphocytes T a été réalisée sur des cellules humaines [198]. Nous avons depuis montré, avec mon camarade thésard Amédée Renand, que Nrp-1 n'est pas exprimé sur les lymphocytes Treg Foxp3⁺ humains contrairement à ce qui est observé chez la souris [196]. Au cours de cette étude, nous avons remarqué que l'expression de Nrp-1 était très faible ou nulle sur les lymphocytes T du sang périphérique, mais que l'activation du TCR induisait l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes T activés. Nous avons aussi remarqué qu'il existait, dans les organes lymphoïdes secondaires humains (ganglions lymphatiques et amygdales), une population de lymphocytes T CD4⁺ Nrp-1⁺ n'exprimant pas les marqueurs des lymphocytes Treg CD25 et Foxp3. Cette population avait déjà été mise en évidence dans un travail préalable qui avait montré que ces cellules Nrp-1⁺ avait un phénotype comparable à celui des lymphocytes T folliculaires (CD4⁺ CD45RO⁺ CD57⁺ CD69⁺) [195]. Alors que mon travail de thèse s'est focalisé sur l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T murins, Amédée Renand a lui, pendant son doctorat, poursuivi une caractérisation plus fine de cette population de lymphocytes T CD4⁺ Nrp-1⁺ présents dans les amygdales humaines. Ses résultats sont clairs et très intéressants. Parmi les lymphocytes T des amygdales, Nrp-1 est exprimé exclusivement sur environ 10 à 40% des lymphocytes T_{FH} (CD4⁺ CXCR5^{hi} PD-1^{hi} ICOS^{hi}). L'abondance des lymphocytes T_{FH} Nrp-1⁺ est corrélée au nombre de lymphocytes B du centre germinatif (CD19⁺ IgD⁻ CD38⁺) présents dans les amygdales, et la culture *in vitro* de lymphocytes T_{FH} Nrp-1⁻ avec des lymphocytes B autologues induit l'expression de Nrp-1 à la surface des lymphocytes T_{FH} en l'absence de stimulation exogène. Les résultats d'Amédée Renand suggèrent donc que l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes T_{FH} des amygdales reflète leur état d'activation et que Nrp-1 pourrait être impliqué dans les interactions entre lymphocytes T_{FH} et lymphocytes B au sein des centres germinatifs.

Nrp-1 est donc un marqueur d'activation des lymphocytes T conservé entre le système immunitaire murin et humain. Le fait que l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes Treg n'ait pas été conservée dans l'évolution du système immunitaire suggère que Nrp-1 ne joue pas un rôle primordial dans ces cellules. A l'inverse, l'évolution a maintenu l'expression de Nrp-1 en réponse à l'engagement du TCR. On peut donc supposer que Nrp-1 joue un rôle important lors de l'activation et la prolifération des lymphocytes T.

5.8. Perspectives de recherche et applications proposées

Les travaux que j'ai présentés dans ce manuscrit pourraient être le point de départ de plusieurs projets de recherche visant à approfondir notre compréhension du rôle de Nrp-1 dans le système immunitaire.

Pour mieux comprendre le rôle de Nrp-1, un modèle murin déficient pour le gène *NRP1* serait particulièrement utile. Malheureusement, les souris *NRP1*^{-/-} meurent à un stade embryonnaire précoce (10,5 jours *post coitum*), ce qui empêche leur utilisation directe pour des études en immunologie [143]. Cependant, deux souches de souris pourraient permettre d'étudier certains aspects fonctionnels de Nrp-1. L'une de ces souches est homozygote pour un gène *NRP1* muté, codant pour une protéine Nrp-1 ne contenant pas le site de fixation de Sema3A, mais pouvant encore lier le VEGF [141]. Ces souris survivent jusqu'à l'âge adulte dans 20-30% des cas et pourraient permettre d'étudier spécifiquement le rôle des interactions Sema3A/Nrp-1 dans les réponses immunitaires. L'autre souche est homozygote pour un gène *NRP1* dont l'exon 2 est flanqué de sites LoxP [141]. Le croisement de cette souche avec des souris exprimant la recombinaise Cre spécifiquement dans certains tissus et/ou sous contrôle d'un promoteur inductible permet d'invalider *NRP1* dans les tissus et/ou au moment voulus. Ainsi, des souris déficientes pour *NRP1* uniquement dans les lymphocytes T ont déjà été générées par le croisement des souches *NRP1*^{flox/flox} et Lck-Cre [188]. L'analyse des thymocytes et des lymphocytes T dans ces souris n'ont pas révélé de phénotype immunitaire majeur de ces souris. Il serait néanmoins intéressant d'étudier le compartiment des lymphocytes iNKT dans ces souris. Il est aussi probable que le rôle de Nrp-1 se révèle plus important dans des modèles d'activation des lymphocytes T que dans l'homéostasie de souris naïves.

L'expression spécifique de Nrp-1 sur les lymphocytes iNKT ETR permettrait de mieux étudier ce sous-type de lymphocytes iNKT jusqu'ici négligé faute de marqueur pertinent. Une étude complète des propriétés effectrices, du potentiel de différenciation et de plasticité, ainsi que des différents processus de maturation et de migration des lymphocytes iNKT ETR apporterait des informations cruciales sur la biologie des lymphocytes iNKT. De même, le sous-type de lymphocytes T conventionnels CD4⁺ CD44^{hi} Nrp-1⁺ mériterait d'être mieux caractérisé. A la lumière des résultats obtenus sur les T_{FH} humains dans mon laboratoire, on peut se demander si Nrp-1 ne marquerait pas aussi un sous-type de T_{FH} activés naturellement présents dans les souris naïves. En effet, il a été montré que des dépôts antigéniques, sous la forme de complexes peptide/CMH-II, peuvent persister dans les ganglions lymphatiques longtemps après une immunisation et entretenir des réservoirs de

lymphocytes T_{FH} mémoire dans un état semi-actif (CD69⁺) [241]. Le rôle crucial de SAP et de ses récepteurs associés de la famille Slam dans le positionnement et la fonction des lymphocytes T_{FH} dans les centres germinatifs [37, 242-244], tout comme l'expression préférentielle de Notch1 dans les cellules T_{FH} du centre germinatif [245], sont autant d'indices qui pourraient suggérer que Nrp-1 jouerait aussi un rôle important dans la régulation des réponses humorales de haute affinité.

Les cellules tumorales peuvent échapper à l'immuno-surveillance des lymphocytes T en produisant du TGF-β1 et de la Sema3A [207, 208, 246, 247]. Puisque Nrp-1, un récepteur de ces deux protéines est exprimé sur les lymphocytes T activés, on peut imaginer bloquer leur effet en ciblant Nrp-1. Deux stratégies sont envisageables : l'une consisterait à utiliser un anticorps bloquant la fixation de ses ligands à Nrp-1, alors que l'autre reposerait sur l'inhibition de l'expression de Nrp-1 sur les lymphocytes T activés. On peut par exemple imaginer que la CsA à faible dose, en affectant spécifiquement l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T activés, aurait un effet positif sur l'immuno-surveillance de tumeurs sécrétant TGF-β1 et/ou Sema3A. L'idée d'utiliser un médicament immunosuppresseur pour « booster » le système immunitaire peut paraître paradoxal, mais en pratique, on sait déjà que de telles drogues peuvent être à l'origine de pathologies dues à une sur-activation de certains lymphocytes T [248, 249].

L'identification de la voie de signalisation Ca²⁺/calcineurine/NFAT comme étant nécessaire et suffisante à l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T activés apporte un nouveau mécanisme de modulation de l'expression de ce récepteur. Il serait légitime de se demander si cette voie de signalisation est aussi responsable de l'expression inductible de Nrp-1 dans d'autres tissus, notamment dans le système nerveux central. En cas de lésion de la moelle épinière [165] ou de dommages au niveau du système nerveux central dus à un épisode d'ischémie [250], Nrp-1 et Sema3A sont rapidement exprimés au niveau des tissus neuronaux lésés. L'action locale de Sema3A sur les neurones Nrp-1⁺ inhibe alors la réparation de la blessure et est aussi responsable de l'apoptose de ces neurones. L'expression de Nrp-1 pourrait dans ce cas être dépendante de la voie Ca²⁺/calcineurine/NFAT induite par le fort stress causé aux cellules pendant ces blessures, ce qui permettrait l'emploi de CsA dans le traitement de ces lésions. D'autre part, l'activité nerveuse module les propriétés synaptiques et la structure des dendrites par des mécanismes dépendants de la voie de signalisation Ca²⁺/calcineurine/NFAT [251]. Etant donné le rôle de Nrp-1 dans l'établissement des connexions synaptiques et de l'arborescence dendritique au cours du développement du cortex cérébral [252, 253], il est

probable que l'induction de Nrp-1 en réponse à la signalisation de NFAT soit aussi impliquée dans la plasticité neuronale à l'âge adulte.

L'expression préférentielle de Nrp-1 sur les cellules tumorales et sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins néo-formés par l'angiogénèse tumorale a fait de cette molécule une cible thérapeutique d'intérêt pour le développement de nouveaux traitements des cancers. Outre le développement d'anticorps bloquants anti-Nrp1 à visée anti-angiogénique [158, 159], certaines équipes ont misé sur l'utilisation de peptides capables de se fixer à Nrp-1 pour adresser des médicaments de chimiothérapie directement dans les cellules tumorales et le tissu qui les entoure [254-257]. On peut d'une part se demander quel sera l'impact de telles thérapies sur le système immunitaire de patients atteints de cancers. Ces médicaments pourraient détruire les lymphocytes T activés exprimant Nrp-1 et diminuer ainsi l'efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale. A l'inverse, on pourrait détourner cette technologie et l'utiliser à des fins immunosuppressives, par exemple pour le traitement des maladies auto-immunes. On pourrait ainsi cibler spécifiquement les lymphocytes T activés au sein d'un tissu inflammatoire et leur adresser des drogues cytotoxiques, immunosuppressives, ou même des composés capables d'influencer leur différenciation en cellules régulatrices (acide rétinoïque par exemple).

En conclusion, Nrp-1 et ses nombreux ligands sont impliqués dans un nombre croissant de processus biologiques physiologiques et pathologiques. Les résultats obtenus pendant cette thèse ouvrent donc de nombreuses perspectives de recherches fondamentales et d'interventions thérapeutiques dans des domaines variés tels que l'immunologie, la cancérologie et la neurologie.

Bibliographie

1. Carpenter, A. C. and R. Bosselut. 2010. Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol* 11:666-673.
2. Witt, C. M. and E. A. Robey. 2005. Thymopoiesis in 4 dimensions. *Semin Immunol* 17:95-102.
3. Takahama, Y. 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6:127-135.
4. Zachariah, M. A. and J. G. Cyster. 2010. Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction. *Science* 328:1129-1135.
5. Lin, J. and A. Weiss. 2010. Proximal tyrosine kinases that initiate T cell activation. *Nat Rev Immunol* Poster.
6. Muller, M. R. and A. Rao. 2010. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol* 10:645-656.
7. Bousso, P. 2008. T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. *Nat Rev Immunol*.
8. Mempel, T. R., S. E. Henrickson and U. H. Von Andrian. 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427:154-159.
9. Fife, B. T., K. E. Pauken, T. N. Eagar, T. Obu, J. Wu, Q. Tang, M. Azuma, M. F. Krummel and J. A. Bluestone. 2009. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat Immunol* 10:1185-1192.
10. Schneider, H., J. Downey, A. Smith, B. H. Zinselmeyer, C. Rush, J. M. Brewer, B. Wei, N. Hogg, P. Garside and C. E. Rudd. 2006. Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science* 313:1972-1975.
11. Rieux-Laucat, F., F. Le Deist, C. Hivroz, I. A. Roberts, K. M. Debatin, A. Fischer and J. P. de Villartay. 1995. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268:1347-1349.
12. Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura and M. Ono. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133:775-787.
13. Li, M. O. and R. A. Flavell. 2008. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* 134:392-404.
14. Taylor, A. W. 2009. Review of the activation of TGF-beta in immunity. *J Leukoc Biol* 85:29-33.
15. Marie, J. C., D. Liggitt and A. Y. Rudensky. 2006. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* 25:441-454.
16. Li, M. O., S. Sanjabi and R. A. Flavell. 2006. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 25:455-471.
17. Li, M. O., Y. Y. Wan and R. A. Flavell. 2007. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 26:579-591.
18. Veldhoen, M., C. Uyttenhove, J. van Snick, H. Helmbj, A. Westendorf, J. Buer, B. Martin, C. Wilhelm and B. Stockinger. 2008. Transforming growth factor-beta 'reprograms'

the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 9:1341-1346.

19. Surh, C. D. and J. Sprent. 2008. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 29:848-862.

20. Godfrey, D. I., H. R. MacDonald, M. Kronenberg, M. J. Smyth and L. Van Kaer. 2004. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 4:231-237.

21. Matsuda, J. L., O. V. Naidenko, L. Gapin, T. Nakayama, M. Taniguchi, C. R. Wang, Y. Koezuka and M. Kronenberg. 2000. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med* 192:741-754.

22. Oh, S. J., J. H. Kim, C. K. Min and D. H. Chung. 2008. Role of type II NKT cells in the suppression of graft-versus-host disease. *Crit Rev Immunol* 28:249-267.

23. Terabe, M. and J. A. Berzofsky. 2008. The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv Cancer Res* 101:277-348.

24. Bendelac, A., P. B. Savage and L. Teyton. 2007. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 25:297-336.

25. Cerundolo, V., J. D. Silk, S. H. Masri and M. Salio. 2009. Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies. *Nat Rev Immunol* 9:28-38.

26. Kinjo, Y., D. Wu, G. Kim, G. W. Xing, M. A. Poles, D. D. Ho, M. Tsuji, K. Kawahara, C. H. Wong and M. Kronenberg. 2005. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* 434:520-525.

27. Kinjo, Y., E. Tupin, D. Wu, M. Fujio, R. Garcia-Navarro, M. R. Benhnia, D. M. Zajonc, G. Ben-Menachem, G. D. Ainge, G. F. Painter, A. Khurana, K. Hoebe, S. M. Behar, B. Beutler, I. A. Wilson, M. Tsuji, T. J. Sellati, C. H. Wong and M. Kronenberg. 2006. Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol* 7:978-986.

28. Mattner, J., K. L. Debord, N. Ismail, R. D. Goff, C. Cantu, 3rd, D. Zhou, P. Saint-Mezard, V. Wang, Y. Gao, N. Yin, K. Hoebe, O. Schneewind, D. Walker, B. Beutler, L. Teyton, P. B. Savage and A. Bendelac. 2005. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 434:525-529.

29. Zhou, D., J. Mattner, C. Cantu, 3rd, N. Schrantz, N. Yin, Y. Gao, Y. Sagiv, K. Hudspeth, Y. P. Wu, T. Yamashita, S. Teneberg, D. Wang, R. L. Proia, S. B. Levery, P. B. Savage, L. Teyton and A. Bendelac. 2004. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 306:1786-1789.

30. Li, Y., E. Girardi, J. Wang, E. D. Yu, G. F. Painter, M. Kronenberg and D. M. Zajonc. 2010. The V α 14 invariant natural killer T cell TCR forces microbial glycolipids and CD1d into a conserved binding mode. *J Exp Med*.

31. Pellicci, D. G., O. Patel, L. Kjer-Nielsen, S. S. Pang, L. C. Sullivan, K. Kyparissoudis, A. G. Brooks, H. H. Reid, S. Gras, I. S. Lucet, R. Koh, M. J. Smyth, T. Mallevey, J. L. Matsuda, L. Gapin, J. McCluskey, D. I. Godfrey and J. Rossjohn. 2009. Differential recognition of CD1d- α -galactosyl ceramide by the V β 8.2 and V β 7 semi-invariant NKT T cell receptors. *Immunity* 31:47-59.

32. Florence, W. C., C. Xia, L. E. Gordy, W. Chen, Y. Zhang, J. Scott-Browne, Y. Kinjo, K. O. Yu, S. Keshipeddy, D. G. Pellicci, O. Patel, L. Kjer-Nielsen, J. McCluskey, D. I. Godfrey, J. Rossjohn, S. K. Richardson, S. A. Porcelli, A. R. Howell, K. Hayakawa, L. Gapin, D. M. Zajonc, P. G. Wang and S. Joyce. 2009. Adaptability of the semi-invariant natural killer T-cell receptor towards structurally diverse CD1d-restricted ligands. *EMBO J* 28:3579-3590.

33. Bezbradica, J. S., T. Hill, A. K. Stanic, L. Van Kaer and S. Joyce. 2005. Commitment toward the natural T (iNKT) cell lineage occurs at the CD4+8+ stage of thymic ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5114-5119.
34. Benlagha, K., D. G. Wei, J. Veiga, L. Teyton and A. Bendelac. 2005. Characterization of the early stages of thymic NKT cell development. *J Exp Med* 202:485-492.
35. Gapin, L., J. L. Matsuda, C. D. Surh and M. Kronenberg. 2001. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol* 2:971-978.
36. Bendelac, A. 1995. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J Exp Med* 182:2091-2096.
37. Schwartzberg, P. L., K. L. Mueller, H. Qi and J. L. Cannons. 2009. SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nat Rev Immunol* 9:39-46.
38. Nichols, K. E., J. Hom, S. Y. Gong, A. Ganguly, C. S. Ma, J. L. Cannons, S. G. Tangye, P. L. Schwartzberg, G. A. Koretzky and P. L. Stein. 2005. Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nat Med* 11:340-345.
39. Pasquier, B., L. Yin, M. C. Fondaneche, F. Relouzat, C. Bloch-Queyrat, N. Lambert, A. Fischer, G. de Saint-Basile and S. Latour. 2005. Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J Exp Med* 201:695-701.
40. Benlagha, K., T. Kyin, A. Beavis, L. Teyton and A. Bendelac. 2002. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* 296:553-555.
41. Pellicci, D. G., K. J. Hammond, A. P. Uldrich, A. G. Baxter, M. J. Smyth and D. I. Godfrey. 2002. A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. *J Exp Med* 195:835-844.
42. Mycko, M. P., I. Ferrero, A. Wilson, W. Jiang, T. Bianchi, A. Trumpp and H. R. MacDonald. 2009. Selective requirement for c-Myc at an early stage of V(alpha)14i NKT cell development. *J Immunol* 182:4641-4648.
43. Dose, M., B. P. Sleckman, J. Han, A. L. Bredemeyer, A. Bendelac and F. Gounari. 2009. Intrathymic proliferation wave essential for Valpha14+ natural killer T cell development depends on c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:8641-8646.
44. Dose, M. and F. Gounari. 2009. The My(c)stery of iNKT cell ontogeny. *Cell Cycle* 8:3082-3085.
45. Berzins, S. P., F. W. McNab, C. M. Jones, M. J. Smyth and D. I. Godfrey. 2006. Long-term retention of mature NK1.1+ NKT cells in the thymus. *J Immunol* 176:4059-4065.
46. Allende, M. L., D. Zhou, D. N. Kalkofen, S. Benhamed, G. Tuymetova, C. Borowski, A. Bendelac and R. L. Proia. 2008. S1P1 receptor expression regulates emergence of NKT cells in peripheral tissues. *FASEB J* 22:307-315.
47. Franki, A. S., K. Van Beneden, P. Dewint, K. J. Hammond, S. Lambrecht, G. Leclercq, M. Kronenberg, D. Deforce and D. Elewaut. 2006. A unique lymphotoxin {alpha}beta-dependent pathway regulates thymic emigration of V{alpha}14 invariant natural killer T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9160-9165.
48. Guo, J., A. Hawwari, H. Li, Z. Sun, S. K. Mahanta, D. R. Littman, M. S. Krangel and Y. W. He. 2002. Regulation of the TCRalpha repertoire by the survival window of CD4(+)CD8(+) thymocytes. *Nat Immunol* 3:469-476.
49. D'Cruz, L. M., C. Y. Yang and A. W. Goldrath. 2010. Transcriptional regulation of NKT cell development and homeostasis. *Curr Opin Immunol* 22:199-205.

50. D'Cruz, L. M., J. Knell, J. K. Fujimoto and A. W. Goldrath. 2010. An essential role for the transcription factor HEB in thymocyte survival, Tcra rearrangement and the development of natural killer T cells. *Nat Immunol* 11:240-249.
51. Becker, A. M., J. S. Blevins, F. L. Tomson, J. L. Eitson, J. J. Medeiros, F. Yarovsky, M. V. Norgard and N. S. van Oers. 2010. Invariant NKT cell development requires a full complement of functional CD3 zeta immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *J Immunol* 184:6822-6832.
52. Godfrey, D. I., S. Stankovic and A. G. Baxter. 2009. Developing NKT cells need their calcium. *Nat Immunol* 10:231-233.
53. Lazarevic, V., A. J. Zullo, M. N. Schweitzer, T. L. Staton, E. M. Gallo, G. R. Crabtree and L. H. Glimcher. 2009. The gene encoding early growth response 2, a target of the transcription factor NFAT, is required for the development and maturation of natural killer T cells. *Nat Immunol* 10:306-313.
54. Griewank, K., C. Borowski, S. Rietdijk, N. Wang, A. Julien, D. G. Wei, A. A. Mamchak, C. Terhorst and A. Bendelac. 2007. Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development. *Immunity* 27:751-762.
55. Wang, L., T. Carr, Y. Xiong, K. F. Wildt, J. Zhu, L. Feigenbaum, A. Bendelac and R. Bosselut. 2010. The sequential activity of Gata3 and Thpok is required for the differentiation of CD1d-restricted CD4+ NKT cells. *Eur J Immunol* 40:2385-2390.
56. Kim, P. J., S. Y. Pai, M. Brigl, G. S. Besra, J. Gumperz and I. C. Ho. 2006. GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells. *J Immunol* 177:6650-6659.
57. Townsend, M. J., A. S. Weinmann, J. L. Matsuda, R. Salomon, P. J. Farnham, C. A. Biron, L. Gapin and L. H. Glimcher. 2004. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity* 20:477-494.
58. Godfrey, D. I., S. Stankovic and A. G. Baxter. 2010. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol* 11:197-206.
59. Castillo, E. F., L. F. Acero, S. W. Stonier, D. Zhou and K. S. Schluns. 2010. Thymic and peripheral microenvironments differentially mediate development and maturation of iNKT cells by IL-15 transpresentation. *Blood*.
60. Ohteki, T., S. Ho, H. Suzuki, T. W. Mak and P. S. Ohashi. 1997. Role for IL-15/IL-15 receptor beta-chain in natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha beta+ cell development. *J Immunol* 159:5931-5935.
61. Matsuda, J. L., L. Gapin, S. Sidobre, W. C. Kieper, J. T. Tan, R. Ceredig, C. D. Surh and M. Kronenberg. 2002. Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. *Nat Immunol* 3:966-974.
62. McNab, F. W., S. P. Berzins, D. G. Pellicci, K. Kyparissoudis, K. Field, M. J. Smyth and D. I. Godfrey. 2005. The influence of CD1d in postselection NKT cell maturation and homeostasis. *J Immunol* 175:3762-3768.
63. Wei, D. G., H. Lee, S. H. Park, L. Beaudoin, L. Teyton, A. Lehuen and A. Bendelac. 2005. Expansion and long-range differentiation of the NKT cell lineage in mice expressing CD1d exclusively on cortical thymocytes. *J Exp Med* 202:239-248.
64. McNab, F. W., D. G. Pellicci, K. Field, G. Besra, M. J. Smyth, D. I. Godfrey and S. P. Berzins. 2007. Peripheral NK1.1- NKT cells are mature and functionally distinct from their thymic counterparts. *J Immunol* 179:6630-6637.
65. Doisne, J. M., C. Becourt, L. Amniai, N. Duarte, J. B. Le Luque, G. Eberl and K. Benlagha. 2009. Skin and peripheral lymph node invariant NKT cells are mainly retinoic acid

- receptor-related orphan receptor (γ)^{t+} and respond preferentially under inflammatory conditions. *J Immunol* 183:2142-2149.
66. Brigl, M. and M. B. Brenner. 2010. How invariant natural killer T cells respond to infection by recognizing microbial or endogenous lipid antigens. *Semin Immunol* 22:79-86.
 67. Sada-Ovalle, I., A. Chiba, A. Gonzales, M. B. Brenner and S. M. Behar. 2008. Innate invariant NKT cells recognize Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages, produce interferon-gamma, and kill intracellular bacteria. *PLoS Pathog* 4:e1000239.
 68. Darmoise, A., S. Teneberg, L. Bouzonville, R. O. Brady, M. Beck, S. H. Kaufmann and F. Winau. 2010. Lysosomal alpha-galactosidase controls the generation of self lipid antigens for natural killer T cells. *Immunity* 33:216-228.
 69. Geissmann, F., T. O. Cameron, S. Sidobre, N. Manlongat, M. Kronenberg, M. J. Briskin, M. L. Dustin and D. R. Littman. 2005. Intravascular immune surveillance by CXCR6⁺ NKT cells patrolling liver sinusoids. *PLoS Biol* 3:e113.
 70. Lee, W. Y., T. J. Moriarty, C. H. Wong, H. Zhou, R. M. Strieter, N. van Rooijen, G. Chaconas and P. Kubers. 2010. An intravascular immune response to *Borrelia burgdorferi* involves Kupffer cells and iNKT cells. *Nat Immunol* 11:295-302.
 71. Barral, P., P. Polzella, A. Bruckbauer, N. van Rooijen, G. S. Besra, V. Cerundolo and F. D. Batista. 2010. CD169(+) macrophages present lipid antigens to mediate early activation of iNKT cells in lymph nodes. *Nat Immunol* 11:303-312.
 72. Uldrich, A. P., N. Y. Crowe, K. Kyparissoudis, D. G. Pellicci, Y. Zhan, A. M. Lew, P. Bouillet, A. Strasser, M. J. Smyth and D. I. Godfrey. 2005. NKT cell stimulation with glycolipid antigen in vivo: costimulation-dependent expansion, Bim-dependent contraction, and hyporesponsiveness to further antigenic challenge. *J Immunol* 175:3092-3101.
 73. Wilson, M. T., C. Johansson, D. Olivares-Villagomez, A. K. Singh, A. K. Stanic, C. R. Wang, S. Joyce, M. J. Wick and L. Van Kaer. 2003. The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10913-10918.
 74. Wang, J., L. Cheng, Z. Wondimu, M. Swain, P. Santamaria and Y. Yang. 2009. Cutting edge: CD28 engagement releases antigen-activated invariant NKT cells from the inhibitory effects of PD-1. *J Immunol* 182:6644-6647.
 75. Parekh, V. V., S. Lalani, S. Kim, R. Halder, M. Azuma, H. Yagita, V. Kumar, L. Wu and L. V. Kaer. 2009. PD-1/PD-L blockade prevents anergy induction and enhances the anti-tumor activities of glycolipid-activated invariant NKT cells. *J Immunol* 182:2816-2826.
 76. Chang, W. S., J. Y. Kim, Y. J. Kim, Y. S. Kim, J. M. Lee, M. Azuma, H. Yagita and C. Y. Kang. 2008. Cutting edge: Programmed death-1/programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell anergy. *J Immunol* 181:6707-6710.
 77. Coquet, J. M., S. Chakravarti, K. Kyparissoudis, F. W. McNab, L. A. Pitt, B. S. McKenzie, S. P. Berzins, M. J. Smyth and D. I. Godfrey. 2008. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1⁻ NKT cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:11287-11292.
 78. Lee, P. T., K. Benlagha, L. Teyton and A. Bendelac. 2002. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med* 195:637-641.
 79. Gumperz, J. E., S. Miyake, T. Yamamura and M. B. Brenner. 2002. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* 195:625-636.

80. Sullivan, B. A., N. A. Nagarajan, G. Wingender, J. Wang, I. Scott, M. Tsuji, R. W. Franck, S. A. Porcelli, D. M. Zajonc and M. Kronenberg. 2010. Mechanisms for glycolipid antigen-driven cytokine polarization by Valpha14i NKT cells. *J Immunol* 184:141-153.
81. Kitamura, H., K. Iwakabe, T. Yahata, S. Nishimura, A. Ohta, Y. Ohmi, M. Sato, K. Takeda, K. Okumura, L. Van Kaer, T. Kawano, M. Taniguchi and T. Nishimura. 1999. The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J Exp Med* 189:1121-1128.
82. Cui, J., T. Shin, T. Kawano, H. Sato, E. Kondo, I. Taura, Y. Kaneko, H. Koseki, M. Kanno and M. Taniguchi. 1997. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 278:1623-1626.
83. Wingender, G., P. Krebs, B. Beutler and M. Kronenberg. 2010. Antigen-specific cytotoxicity by invariant NKT cells in vivo is CD95/CD178-dependent and is correlated with antigenic potency. *J Immunol* 185:2721-2729.
84. Galli, G., P. Pittoni, E. Tonti, C. Malzone, Y. Uematsu, M. Tortoli, D. Maione, G. Volpini, O. Finco, S. Nuti, S. Tavarini, P. Dellabona, R. Rappuoli, G. Casorati and S. Abrignani. 2007. Invariant NKT cells sustain specific B cell responses and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3984-3989.
85. Diana, J., T. Griseri, S. Lagaye, L. Beaudoin, E. Autrusseau, A. S. Gautron, C. Tomkiewicz, A. Herbelin, R. Barouki, M. von Herrath, M. Dalod and A. Lehuen. 2009. NKT cell-plasmacytoid dendritic cell cooperation via OX40 controls viral infection in a tissue-specific manner. *Immunity* 30:289-299.
86. Ishikawa, A., S. Motohashi, E. Ishikawa, H. Fuchida, K. Higashino, M. Otsuji, T. Iizasa, T. Nakayama, M. Taniguchi and T. Fujisawa. 2005. A phase I study of alpha-galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11:1910-1917.
87. Chang, D. H., K. Osman, J. Connolly, A. Kukreja, J. Krasovsky, M. Pack, A. Hutchinson, M. Geller, N. Liu, R. Annable, J. Shay, K. Kirchhoff, N. Nishi, Y. Ando, K. Hayashi, H. Hassoun, R. M. Steinman and M. V. Dhodapkar. 2005. Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T cells after injection of alpha-galactosyl-ceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients. *J Exp Med* 201:1503-1517.
88. Giaccone, G., C. J. Punt, Y. Ando, R. Ruijter, N. Nishi, M. Peters, B. M. von Blumberg, R. J. Scheper, H. J. van der Vliet, A. J. van den Eertwegh, M. Roelvink, J. Beijnen, H. Zwierzina and H. M. Pinedo. 2002. A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 8:3702-3709.
89. Emoto, M., T. Yoshida, T. Fukuda, I. Kawamura, M. Mitsuyama, E. Kita, R. Hurwitz, S. H. Kaufmann and Y. Emoto. 2010. Alpha-galactosylceramide promotes killing of *Listeria monocytogenes* within the macrophage phagosome through invariant NKT-cell activation. *Infect Immun* 78:2667-2676.
90. Emoto, M., Y. Emoto, I. Yoshizawa, E. Kita, T. Shimizu, R. Hurwitz, V. Brinkmann and S. H. Kaufmann. 2010. Alpha-GalCer ameliorates listeriosis by accelerating infiltration of Gr-1+ cells into the liver. *Eur J Immunol* 40:1328-1341.
91. Ishikawa, H., K. Tanaka, E. Kutsukake, T. Fukui, H. Sasaki, A. Hata, S. Noda and T. Matsumoto. 2010. IFN-gamma production downstream of NKT cell activation in mice infected with influenza virus enhances the cytolytic activities of both NK cells and viral antigen-specific CD8+ T cells. *Virology* 407:325-332.

92. Huck, K., O. Feyen, T. Niehues, F. Ruschendorf, N. Hubner, H. J. Laws, T. Telleps, S. Knapp, H. H. Wacker, A. Meindl, H. Jumaa and A. Borkhardt. 2009. Girls homozygous for an IL-2-inducible T cell kinase mutation that leads to protein deficiency develop fatal EBV-associated lymphoproliferation. *J Clin Invest* 119:1350-1358.
93. Rigaud, S., M. C. Fondaneche, N. Lambert, B. Pasquier, V. Mateo, P. Soulas, L. Galicier, F. Le Deist, F. Rieux-Laucat, P. Revy, A. Fischer, G. de Saint Basile and S. Latour. 2006. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* 444:110-114.
94. Moll, M., C. Kuylenstierna, V. D. Gonzalez, S. K. Andersson, L. Bosnjak, A. Sonnerborg, M. F. Quigley and J. K. Sandberg. 2009. Severe functional impairment and elevated PD-1 expression in CD1d-restricted NKT cells retained during chronic HIV-1 infection. *Eur J Immunol* 39:902-911.
95. Azakami, K., T. Sato, N. Araya, A. Utsunomiya, R. Kubota, K. Suzuki, D. Hasegawa, T. Izumi, H. Fujita, S. Aratani, R. Fujii, N. Yagishita, H. Kamijuku, T. Kanekura, K. Seino, K. Nishioka, T. Nakajima and Y. Yamano. 2009. Severe loss of invariant NKT cells exhibiting anti-HTLV-1 activity in patients with HTLV-1-associated disorders. *Blood* 114:3208-3215.
96. Lisbonne, M., S. Diem, A. de Castro Keller, J. Lefort, L. M. Araujo, P. Hachem, J. M. Fourneau, S. Sidobre, M. Kronenberg, M. Taniguchi, P. Van Endert, M. Dy, P. Askenase, M. Russo, B. B. Vargaftig, A. Herbelin and M. C. Leite-de-Moraes. 2003. Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J Immunol* 171:1637-1641.
97. Akbari, O., P. Stock, E. Meyer, M. Kronenberg, S. Sidobre, T. Nakayama, M. Taniguchi, M. J. Grusby, R. H. DeKruyff and D. T. Umetsu. 2003. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 9:582-588.
98. Matangkasombut, P., G. Marigowda, A. Ervine, L. Idris, M. Pichavant, H. Y. Kim, T. Yasumi, S. B. Wilson, R. H. DeKruyff, J. L. Faul, E. Israel, O. Akbari and D. T. Umetsu. 2009. Natural killer T cells in the lungs of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 123:1181-1185.
99. Pham-Thi, N., J. de Blic and M. C. Leite-de-Moraes. 2006. Invariant natural killer T cells in bronchial asthma. *N Engl J Med* 354:2613-2616; author reply 2613-2616.
100. Pham-Thi, N., J. de Blic, M. Le Bourgeois, M. Dy, P. Scheinmann and M. C. Leite-de-Moraes. 2006. Enhanced frequency of immunoregulatory invariant natural killer T cells in the airways of children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 117:217-218.
101. Hachem, P., M. Lisbonne, M. L. Michel, S. Diem, S. Roongapinun, J. Lefort, G. Marchal, A. Herbelin, P. W. Askenase, M. Dy and M. C. Leite-de-Moraes. 2005. Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN-gamma. *Eur J Immunol* 35:2793-2802.
102. Meyer, E. H., S. Goya, O. Akbari, G. J. Berry, P. B. Savage, M. Kronenberg, T. Nakayama, R. H. DeKruyff and D. T. Umetsu. 2006. Glycolipid activation of invariant T cell receptor+ NK T cells is sufficient to induce airway hyperreactivity independent of conventional CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2782-2787.
103. Gombert, J. M., A. Herbelin, E. Tancrede-Bohin, M. Dy, C. Carnaud and J. F. Bach. 1996. Early quantitative and functional deficiency of NK1+-like thymocytes in the NOD mouse. *Eur J Immunol* 26:2989-2998.
104. Carnaud, C., J. Gombert, O. Donnars, H. Garchon and A. Herbelin. 2001. Protection against diabetes and improved NK/NKT cell performance in NOD.NK1.1 mice congenic at the NK complex. *J Immunol* 166:2404-2411.

105. Sharif, S., G. A. Arreaza, P. Zucker, Q. S. Mi, J. Sondhi, O. V. Naidenko, M. Kronenberg, Y. Koezuka, T. L. Delovitch, J. M. Gombert, M. Leite-De-Moraes, C. Gouarin, R. Zhu, A. Hameg, T. Nakayama, M. Taniguchi, F. Lepault, A. Lehuen, J. F. Bach and A. Herbelin. 2001. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat Med* 7:1057-1062.
106. Hong, S., M. T. Wilson, I. Serizawa, L. Wu, N. Singh, O. V. Naidenko, T. Miura, T. Haba, D. C. Scherer, J. Wei, M. Kronenberg, Y. Koezuka and L. Van Kaer. 2001. The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med* 7:1052-1056.
107. Novak, J., L. Beaudoin, S. Park, T. Griseri, L. Teyton, A. Bendelac and A. Lehuen. 2007. Prevention of type 1 diabetes by invariant NKT cells is independent of peripheral CD1d expression. *J Immunol* 178:1332-1340.
108. Beaudoin, L., V. Laloux, J. Novak, B. Lucas and A. Lehuen. 2002. NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells. *Immunity* 17:725-736.
109. Kohrt, H. E., A. B. Pillai, R. Lowsky and S. Strober. 2010. NKT cells, Treg, and their interactions in bone marrow transplantation. *Eur J Immunol* 40:1862-1869.
110. Morris, E. S., K. P. MacDonald, V. Rowe, T. Banovic, R. D. Kuns, A. L. Don, H. M. Bofinger, A. C. Burman, S. D. Olver, N. Kienzle, S. A. Porcelli, D. G. Pellicci, D. I. Godfrey, M. J. Smyth and G. R. Hill. 2005. NKT cell-dependent leukemia eradication following stem cell mobilization with potent G-CSF analogs. *J Clin Invest* 115:3093-3103.
111. Kuns, R. D., E. S. Morris, K. P. Macdonald, K. A. Markey, H. M. Morris, N. C. Raffelt, T. Banovic, A. L. Don, V. Rowe, A. C. Burman, A. D. Clouston, C. Farah, G. S. Besra, P. A. Illarionov, M. J. Smyth, S. A. Porcelli and G. R. Hill. 2009. Invariant natural killer T cell-natural killer cell interactions dictate transplantation outcome after alpha-galactosylceramide administration. *Blood* 113:5999-6010.
112. Morris, E. S., K. P. MacDonald, R. D. Kuns, H. M. Morris, T. Banovic, A. L. Don, V. Rowe, Y. A. Wilson, N. C. Raffelt, C. R. Engwerda, A. C. Burman, K. A. Markey, D. I. Godfrey, M. J. Smyth and G. R. Hill. 2009. Induction of natural killer T cell-dependent alloreactivity by administration of granulocyte colony-stimulating factor after bone marrow transplantation. *Nat Med* 15:436-441.
113. Cua, D. J. and C. M. Tato. 2010. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 10:479-489.
114. Kennedy, J., D. L. Rossi, S. M. Zurawski, F. Vega, Jr., R. A. Kastelein, J. L. Wagner, C. H. Hannum and A. Zlotnik. 1996. Mouse IL-17: a cytokine preferentially expressed by alpha beta TCR + CD4-CD8-T cells. *J Interferon Cytokine Res* 16:611-617.
115. Yoshiga, Y., D. Goto, S. Segawa, Y. Ohnishi, I. Matsumoto, S. Ito, A. Tsutsumi, M. Taniguchi and T. Sumida. 2008. Invariant NKT cells produce IL-17 through IL-23-dependent and -independent pathways with potential modulation of Th17 response in collagen-induced arthritis. *Int J Mol Med* 22:369-374.
116. Rachitskaya, A. V., A. M. Hansen, R. Horai, Z. Li, R. Villasmil, D. Luger, R. B. Nussenblatt and R. R. Caspi. 2008. Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and RORgammat and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. *J Immunol* 180:5167-5171.
117. Michel, M. L., D. Mendes-da-Cruz, A. C. Keller, M. Lochner, E. Schneider, M. Dy, G. Eberl and M. C. Leite-de-Moraes. 2008. Critical role of ROR-gammat in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19845-19850.

118. Lee, K. A., M. H. Kang, Y. S. Lee, Y. J. Kim, D. H. Kim, H. J. Ko and C. Y. Kang. 2008. A distinct subset of natural killer T cells produces IL-17, contributing to airway infiltration of neutrophils but not to airway hyperreactivity. *Cell Immunol* 251:50-55.
119. Michel, M. L., A. C. Keller, C. Paget, M. Fujio, F. Trottein, P. B. Savage, C. H. Wong, E. Schneider, M. Dy and M. C. Leite-de-Moraes. 2007. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med* 204:995-1001.
120. Pichavant, M., S. Goya, E. H. Meyer, R. A. Johnston, H. Y. Kim, P. Matangkasombut, M. Zhu, Y. Iwakura, P. B. Savage, R. H. DeKruyff, S. A. Shore and D. T. Umetsu. 2008. Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. *J Exp Med* 205:385-393.
121. Jung, S., H. S. Shin, C. Hong, H. Lee, Y. K. Park, J. H. Shin, S. Hong, G. R. Lee and S. H. Park. 2009. Natural killer T cells promote collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. *Biochem Biophys Res Commun* 390:399-403.
122. Cackowski, F. C., L. Xu, B. Hu and S. Y. Cheng. 2004. Identification of two novel alternatively spliced Neuropilin-1 isoforms. *Genomics* 84:82-94.
123. Rossignol, M., M. L. Gagnon and M. Klagsbrun. 2000. Genomic organization of human neuropilin-1 and neuropilin-2 genes: identification and distribution of splice variants and soluble isoforms. *Genomics* 70:211-222.
124. Gagnon, M. L., D. R. Bielenberg, Z. Gechtman, H. Q. Miao, S. Takashima, S. Soker and M. Klagsbrun. 2000. 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* 97:2573-2578.
125. Pellet-Many, C., P. Frankel, H. Jia and I. Zachary. 2008. Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochem J* 411:211-226.
126. Takagi, S., T. Hirata, K. Agata, M. Mochii, G. Eguchi and H. Fujisawa. 1991. The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors. *Neuron* 7:295-307.
127. Gu, C., B. J. Limberg, G. B. Whitaker, B. Perman, D. J. Leahy, J. S. Rosenbaum, D. D. Ginty and A. L. Kolodkin. 2002. Characterization of neuropilin-1 structural features that confer binding to semaphorin 3A and vascular endothelial growth factor 165. *J Biol Chem* 277:18069-18076.
128. Roth, L., C. Nasarre, S. Dirrig-Grosch, D. Aunis, G. Cremel, P. Hubert and D. Bagnard. 2008. Transmembrane domain interactions control biological functions of neuropilin-1. *Mol Biol Cell* 19:646-654.
129. Cai, H. and R. R. Reed. 1999. 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* 19:6519-6527.
130. Takagi, S., T. Tsuji, T. Amagai, T. Takamatsu and H. Fujisawa. 1987. Specific cell surface labels in the visual centers of *Xenopus laevis* tadpole identified using monoclonal antibodies. *Dev Biol* 122:90-100.
131. Kolodkin, A. L., D. V. Levengood, E. G. Rowe, Y. T. Tai, R. J. Giger and D. D. Ginty. 1997. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90:753-762.
132. He, Z. and M. Tessier-Lavigne. 1997. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90:739-751.

133. Soker, S., S. Takashima, H. Q. Miao, G. Neufeld and M. Klagsbrun. 1998. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92:735-745.
134. Antipenko, A., J. P. Himanen, K. van Leyen, V. Nardi-Dei, J. Lesniak, W. A. Barton, K. R. Rajashankar, M. Lu, C. Hoemme, A. W. Puschel and D. B. Nikolov. 2003. Structure of the semaphorin-3A receptor binding module. *Neuron* 39:589-598.
135. Kruger, R. P., J. Aurandt and K. L. Guan. 2005. Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:789-800.
136. Takahashi, T., A. Fournier, F. Nakamura, L. H. Wang, Y. Murakami, R. G. Kalb, H. Fujisawa and S. M. Strittmatter. 1999. Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 99:59-69.
137. Polleux, F., T. Morrow and A. Ghosh. 2000. Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404:567-573.
138. Song, H., G. Ming, Z. He, M. Lehmann, L. McKerracher, M. Tessier-Lavigne and M. Poo. 1998. Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science* 281:1515-1518.
139. Pan, Q., Y. Chathery, Y. Wu, N. Rathore, R. K. Tong, F. Peale, A. Bagri, M. Tessier-Lavigne, A. W. Koch and R. J. Watts. 2007. Neuropilin-1 binds to VEGF121 and regulates endothelial cell migration and sprouting. *J Biol Chem* 282:24049-24056.
140. von Wronski, M. A., N. Raju, R. Pillai, N. J. Bogdan, E. R. Marinelli, P. Nanjappan, K. Ramalingam, T. Arunachalam, S. Eaton, K. E. Linder, F. Yan, S. Pochon, M. F. Tweedle and A. D. Nunn. 2006. Tuftsin binds neuropilin-1 through a sequence similar to that encoded by exon 8 of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 281:5702-5710.
141. Gu, C., E. R. Rodriguez, D. V. Reimert, T. Shu, B. Fritzsich, L. J. Richards, A. L. Kolodkin and D. D. Ginty. 2003. Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Dev Cell* 5:45-57.
142. Wang, L., D. Mukhopadhyay and X. Xu. 2006. C terminus of RGS-GAIP-interacting protein conveys neuropilin-1-mediated signaling during angiogenesis. *FASEB J* 20:1513-1515.
143. Kitsukawa, T., M. Shimizu, M. Sanbo, T. Hirata, M. Taniguchi, Y. Bekku, T. Yagi and H. Fujisawa. 1997. Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19:995-1005.
144. Kawasaki, T., T. Kitsukawa, Y. Bekku, Y. Matsuda, M. Sanbo, T. Yagi and H. Fujisawa. 1999. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 126:4895-4902.
145. Kitsukawa, T., A. Shimono, A. Kawakami, H. Kondoh and H. Fujisawa. 1995. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* 121:4309-4318.
146. Herzog, Y., C. Kalcheim, N. Kahane, R. Reshef and G. Neufeld. 2001. Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins. *Mech Dev* 109:115-119.
147. Yuan, L., D. Moyon, L. Pardanaud, C. Breant, M. J. Karkkainen, K. Alitalo and A. Eichmann. 2002. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* 129:4797-4806.
148. Vieira, J. M., Q. Schwarz and C. Ruhrberg. 2007. Selective requirements for NRP1 ligands during neurovascular patterning. *Development* 134:1833-1843.

149. Schwarz, Q., C. H. Maden, J. M. Vieira and C. Ruhrberg. 2009. Neuropilin 1 signaling guides neural crest cells to coordinate pathway choice with cell specification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:6164-6169.
150. Schwarz, Q., C. H. Maden, K. Davidson and C. Ruhrberg. 2009. Neuropilin-mediated neural crest cell guidance is essential to organise sensory neurons into segmented dorsal root ganglia. *Development* 136:1785-1789.
151. Schwarz, Q., J. M. Vieira, B. Howard, B. J. Eickholt and C. Ruhrberg. 2008. Neuropilin 1 and 2 control cranial gangliogenesis and axon guidance through neural crest cells. *Development* 135:1605-1613.
152. Hu, B., P. Guo, I. Bar-Joseph, Y. Imanishi, M. J. Jarzynka, O. Bogler, T. Mikkelsen, T. Hirose, R. Nishikawa and S. Y. Cheng. 2007. Neuropilin-1 promotes human glioma progression through potentiating the activity of the HGF/SF autocrine pathway. *Oncogene* 26:5577-5586.
153. Wey, J. S., M. J. Gray, F. Fan, A. Belcheva, M. F. McCarty, O. Stoeltzing, R. Somcio, W. Liu, D. B. Evans, M. Klagsbrun, G. E. Gallick and L. M. Ellis. 2005. Overexpression of neuropilin-1 promotes constitutive MAPK signalling and chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Br J Cancer* 93:233-241.
154. Parikh, A. A., F. Fan, W. B. Liu, S. A. Ahmad, O. Stoeltzing, N. Reinmuth, D. Bielenberg, C. D. Bucana, M. Klagsbrun and L. M. Ellis. 2004. Neuropilin-1 in human colon cancer: expression, regulation, and role in induction of angiogenesis. *Am J Pathol* 164:2139-2151.
155. Akagi, M., M. Kawaguchi, W. Liu, M. F. McCarty, A. Takeda, F. Fan, O. Stoeltzing, A. A. Parikh, Y. D. Jung, C. D. Bucana, P. F. Mansfield, D. J. Hicklin and L. M. Ellis. 2003. Induction of neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor by epidermal growth factor in human gastric cancer cells. *Br J Cancer* 88:796-802.
156. Bachelder, R. E., A. Crago, J. Chung, M. A. Wendt, L. M. Shaw, G. Robinson and A. M. Mercurio. 2001. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res* 61:5736-5740.
157. Kreuter, M., K. Woelke, R. Bieker, C. Schliemann, M. Steins, T. Buechner, W. E. Berdel and R. M. Mesters. 2006. Correlation of neuropilin-1 overexpression to survival in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 20:1950-1954.
158. Pan, Q., Y. Chanthery, W. C. Liang, S. Stawicki, J. Mak, N. Rathore, R. K. Tong, J. Kowalski, S. F. Yee, G. Pacheco, S. Ross, Z. Cheng, J. Le Couter, G. Plowman, F. Peale, A. W. Koch, Y. Wu, A. Bagri, M. Tessier-Lavigne and R. J. Watts. 2007. Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell* 11:53-67.
159. Liang, W. C., M. S. Dennis, S. Stawicki, Y. Chanthery, Q. Pan, Y. Chen, C. Eigenbrot, J. Yin, A. W. Koch, X. Wu, N. Ferrara, A. Bagri, M. Tessier-Lavigne, R. J. Watts and Y. Wu. 2007. Function blocking antibodies to neuropilin-1 generated from a designed human synthetic antibody phage library. *J Mol Biol* 366:815-829.
160. Neufeld, G. and O. Kessler. 2008. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8:632-645.
161. Futamura, M., H. Kamino, Y. Miyamoto, N. Kitamura, Y. Nakamura, S. Ohnishi, Y. Masuda and H. Arakawa. 2007. Possible role of semaphorin 3F, a candidate tumor suppressor gene at 3p21.3, in p53-regulated tumor angiogenesis suppression. *Cancer Res* 67:1451-1460.
162. Ochi, K., T. Mori, Y. Toyama, Y. Nakamura and H. Arakawa. 2002. Identification of semaphorin3B as a direct target of p53. *Neoplasia* 4:82-87.

163. Maione, F., F. Molla, C. Meda, R. Latini, L. Zentilin, M. Giacca, G. Seano, G. Serini, F. Bussolino and E. Giraudo. 2009. Semaphorin 3A is an endogenous angiogenesis inhibitor that blocks tumor growth and normalizes tumor vasculature in transgenic mouse models. *J Clin Invest* 119:3356-3372.
164. Kessler, O., N. Shraga-Heled, T. Lange, N. Gutmann-Raviv, E. Sabo, L. Baruch, M. Machluf and G. Neufeld. 2004. Semaphorin-3F is an inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 64:1008-1015.
165. Kaneko, S., A. Iwanami, M. Nakamura, A. Kishino, K. Kikuchi, S. Shibata, H. J. Okano, T. Ikegami, A. Moriya, O. Konishi, C. Nakayama, K. Kumagai, T. Kimura, Y. Sato, Y. Goshima, M. Taniguchi, M. Ito, Z. He, Y. Toyama and H. Okano. 2006. A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med* 12:1380-1389.
166. Kikuchi, K., A. Kishino, O. Konishi, K. Kumagai, N. Hosotani, I. Saji, C. Nakayama and T. Kimura. 2003. In vitro and in vivo characterization of a novel semaphorin 3A inhibitor, SM-216289 or xanthofulvin. *J Biol Chem* 278:42985-42991.
167. Tominaga, M., H. Ogawa and K. Takamori. 2008. Decreased production of semaphorin 3A in the lesional skin of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 158:842-844.
168. Yamaguchi, J., F. Nakamura, M. Aihara, N. Yamashita, H. Usui, T. Hida, K. Takei, Y. Nagashima, Z. Ikezawa and Y. Goshima. 2008. Semaphorin3A alleviates skin lesions and scratching behavior in NC/Nga mice, an atopic dermatitis model. *J Invest Dermatol* 128:2842-2849.
169. Tominaga, M., S. Tenggara, A. Kamo, H. Ogawa and K. Takamori. 2009. Psoralen-ultraviolet A therapy alters epidermal Sema3A and NGF levels and modulates epidermal innervation in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 55:40-46.
170. Dhar, K., G. Dhar, M. Majumder, I. Haque, S. Mehta, P. J. Van Veldhuizen, S. K. Banerjee and S. Banerjee. 2010. Tumor cell-derived PDGF-B potentiates mouse mesenchymal stem cells-pericytes transition and recruitment through an interaction with NRP-1. *Mol Cancer* 9:209.
171. Cao, S., U. Yaqoob, A. Das, U. Shergill, K. Jagavelu, R. C. Huebert, C. Routray, S. Abdelmoneim, M. Vasdev, E. Leof, M. Charlton, R. J. Watts, D. Mukhopadhyay and V. H. Shah. 2010. Neuropilin-1 promotes cirrhosis of the rodent and human liver by enhancing PDGF/TGF-beta signaling in hepatic stellate cells. *J Clin Invest* 120:2379-2394.
172. Ball, S. G., C. Bayley, C. A. Shuttleworth and C. M. Kielty. 2010. Neuropilin-1 regulates platelet-derived growth factor receptor signalling in mesenchymal stem cells. *Biochem J* 427:29-40.
173. Glinka, Y. and G. J. Prud'homme. 2008. Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J Leukoc Biol* 84:302-310.
174. Cao, Y., A. Szaboles, S. K. Dutta, U. Yaqoob, K. Jagavelu, L. Wang, E. B. Leof, R. A. Urrutia, V. H. Shah and D. Mukhopadhyay. 2010. Neuropilin-1 mediates divergent R-Smad signaling and the myofibroblast phenotype. *J Biol Chem*.
175. Allen, C. D., K. M. Ansel, C. Low, R. Lesley, H. Tamamura, N. Fujii and J. G. Cyster. 2004. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 5:943-952.
176. Stumm, R. and V. Holtt. 2007. CXC chemokine receptor 4 regulates neuronal migration and axonal pathfinding in the developing nervous system: implications for neuronal regeneration in the adult brain. *J Mol Endocrinol* 38:377-382.

177. Mizui, M., A. Kumanogoh and H. Kikutani. 2009. Immune semaphorins: novel features of neural guidance molecules. *J Clin Immunol* 29:1-11.
178. Suzuki, K., A. Kumanogoh and H. Kikutani. 2008. Semaphorins and their receptors in immune cell interactions. *Nat Immunol* 9:17-23.
179. Belaid-Choucair, Z., Y. Lepelletier, G. Poncin, A. Thiry, C. Humblet, M. Maachi, A. Beaulieu, E. Schneider, A. Briquet, P. Mineur, C. Lambert, D. Mendes-Da-Cruz, M. L. Ahui, V. Asnafi, M. Dy, J. Boniver, B. V. Nusgens, O. Hermine and M. P. Defresne. 2008. Human bone marrow adipocytes block granulopoiesis through neuropilin-1-induced granulocyte colony-stimulating factor inhibition. *Stem Cells* 26:1556-1564.
180. Belaid, Z., F. Hubint, C. Humblet, J. Boniver, B. Nusgens and M. P. Defresne. 2005. Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic and fatty bone marrow: evidence that neuropilin-1 is produced by fat cells. *Haematologica* 90:400-401.
181. Tordjman, R., N. Ortega, L. Coulombel, J. Plouet, P. H. Romeo and V. Lemarchandel. 1999. Neuropilin-1 is expressed on bone marrow stromal cells: a novel interaction with hematopoietic cells? *Blood* 94:2301-2309.
182. Yamada, Y., Y. Oike, H. Ogawa, Y. Ito, H. Fujisawa, T. Suda and N. Takakura. 2003. Neuropilin-1 on hematopoietic cells as a source of vascular development. *Blood* 101:1801-1809.
183. Mendes-da-Cruz, D. A., Y. Lepelletier, A. C. Brignier, S. Smaniotto, A. Renand, P. Milpied, M. Dardenne, O. Hermine and W. Savino. 2009. Neuropilins, semaphorins, and their role in thymocyte development. *Ann N Y Acad Sci* 1153:20-28.
184. Lepelletier, Y., S. Smaniotto, R. Hadj-Slimane, D. M. Villa-Verde, A. C. Nogueira, M. Dardenne, O. Hermine and W. Savino. 2007. Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5545-5550.
185. Yamamoto, T., S. Morita, R. Go, M. Obata, Y. Katsuragi, Y. Fujita, Y. Maeda, M. Yokoyama, Y. Aoyagi, H. Ichikawa, Y. Mishima and R. Kominami. 2010. Clonally expanding thymocytes having lineage capability in gamma-ray-induced mouse atrophic thymus. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 77:235-243.
186. Takahashi, K., M. Ishida, K. Hirokawa and H. Takahashi. 2008. Expression of the semaphorins Sema 3D and Sema 3F in the developing parathyroid and thymus. *Dev Dyn* 237:1699-1708.
187. Choi, Y. I., J. S. Duke-Cohan, W. B. Ahmed, M. A. Handley, F. Mann, J. A. Epstein, L. K. Clayton and E. L. Reinherz. 2008. PlexinD1 glycoprotein controls migration of positively selected thymocytes into the medulla. *Immunity* 29:888-898.
188. Corbel, C., V. Lemarchandel, V. Thomas-Vaslin, A. S. Pelus, C. Agboton and P. H. Romeo. 2007. Neuropilin 1 and CD25 co-regulation during early murine thymic differentiation. *Dev Comp Immunol* 31:1082-1094.
189. Bruder, D., M. Probst-Kepper, A. M. Westendorf, R. Geffers, S. Beissert, K. Loser, H. von Boehmer, J. Buer and W. Hansen. 2004. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 34:623-630.
190. Hill, J. A., M. Feuerer, K. Tash, S. Haxhinasto, J. Perez, R. Melamed, D. Mathis and C. Benoist. 2007. Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* 27:786-800.

191. Sarris, M., K. G. Andersen, F. Randow, L. Mayr and A. G. Betz. 2008. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 28:402-413.
192. Mizui, M. and H. Kikutani. 2008. Neuropilin-1: the glue between regulatory T cells and dendritic cells? *Immunity* 28:302-303.
193. Battaglia, A., A. Buzzonetti, G. Monego, L. Peri, G. Ferrandina, F. Fanfani, G. Scambia and A. Fattorossi. 2008. Neuropilin-1 expression identifies a subset of regulatory T cells in human lymph nodes that is modulated by preoperative chemoradiation therapy in cervical cancer. *Immunology* 123:129-138.
194. Battaglia, A., A. Buzzonetti, C. Baranello, G. Ferrandina, E. Martinelli, F. Fanfani, G. Scambia and A. Fattorossi. 2009. Metastatic tumour cells favour the generation of a tolerogenic milieu in tumour draining lymph node in patients with early cervical cancer. *Cancer Immunol Immunother.*
195. Dzionek, A., Y. Inagaki, K. Okawa, J. Nagafune, J. Rock, Y. Sohma, G. Winkels, M. Zysk, Y. Yamaguchi and J. Schmitz. 2002. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol* 63:1133-1148.
196. Milpied, P., A. Renand, J. Bruneau, D. A. Mendes-da-Cruz, S. Jacquelin, V. Asnafi, M. T. Rubio, E. MacIntyre, Y. Lepelletier and O. Hermine. 2009. Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3+ Treg. *Eur J Immunol* 39:1466-1471.
197. Ji, J. D., K. H. Park-Min and L. B. Ivashkiv. 2009. Expression and function of semaphorin 3A and its receptors in human monocyte-derived macrophages. *Hum Immunol* 70:211-217.
198. Tordjman, R., Y. Lepelletier, V. Lemarchandel, M. Cambot, P. Gaulard, O. Hermine and P. H. Romeo. 2002. A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol* 3:477-482.
199. Delaire, S., C. Billard, R. Tordjman, A. Chedotal, A. Elhabazi, A. Bensussan and L. Bousmell. 2001. Biological activity of soluble CD100. II. Soluble CD100, similarly to H-SemaIII, inhibits immune cell migration. *J Immunol* 166:4348-4354.
200. Takamatsu, H., N. Takegahara, Y. Nakagawa, M. Tomura, M. Taniguchi, R. H. Friedel, H. Rayburn, M. Tessier-Lavigne, Y. Yoshida, T. Okuno, M. Mizui, S. Kang, S. Nojima, T. Tsujimura, Y. Nakatsuji, I. Katayama, T. Toyofuku, H. Kikutani and A. Kumanogoh. 2010. Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II. *Nat Immunol* 11:594-600.
201. Takegahara, N., H. Takamatsu, T. Toyofuku, T. Tsujimura, T. Okuno, K. Yukawa, M. Mizui, M. Yamamoto, D. V. Prasad, K. Suzuki, M. Ishii, K. Terai, M. Moriya, Y. Nakatsuji, S. Sakoda, S. Sato, S. Akira, K. Takeda, M. Inui, T. Takai, M. Ikawa, M. Okabe, A. Kumanogoh and H. Kikutani. 2006. Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat Cell Biol* 8:615-622.
202. Eun, S. Y., B. P. O'Connor, A. W. Wong, H. W. van Deventer, D. J. Taxman, W. Reed, P. Li, J. S. Blum, K. P. McKinnon and J. P. Ting. 2006. Cutting edge: rho activation and actin polarization are dependent on plexin-A1 in dendritic cells. *J Immunol* 177:4271-4275.
203. Wong, A. W., W. J. Brickey, D. J. Taxman, H. W. van Deventer, W. Reed, J. X. Gao, P. Zheng, Y. Liu, P. Li, J. S. Blum, K. P. McKinnon and J. P. Ting. 2003. CIITA-regulated plexin-A1 affects T-cell-dendritic cell interactions. *Nat Immunol* 4:891-898.

204. Ghez, D., Y. Lepelletier, S. Lambert, J. M. Fourneau, V. Blot, S. Janvier, B. Arnulf, P. M. van Endert, N. Heveker, C. Pique and O. Hermine. 2006. Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J Virol* 80:6844-6854.
205. Colisson, R., L. Barblu, C. Gras, F. Raynaud, R. Hadj-Slimane, C. Pique, O. Hermine, Y. Lepelletier and J. P. Herbeuval. 2010. Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 115:2177-2185.
206. Bourbie-Vaudaine, S., N. Blanchard, C. Hivroz and P. H. Romeo. 2006. Dendritic cells can turn CD4+ T lymphocytes into vascular endothelial growth factor-carrying cells by intercellular neuropilin-1 transfer. *J Immunol* 177:1460-1469.
207. Catalano, A., P. Caprari, S. Moretti, M. Faronato, L. Tamagnone and A. Procopio. 2006. Semaphorin-3A is expressed by tumor cells and alters T-cell signal transduction and function. *Blood* 107:3321-3329.
208. Lepelletier, Y., I. C. Moura, R. Hadj-Slimane, A. Renand, S. Fiorentino, C. Baude, A. Shirvan, A. Barzilai and O. Hermine. 2006. Immunosuppressive role of semaphorin-3A on T cell proliferation is mediated by inhibition of actin cytoskeleton reorganization. *Eur J Immunol* 36:1782-1793.
209. Moretti, S., A. Procopio, R. Lazzarini, M. R. Rippon, R. Testa, M. Marra, L. Tamagnone and A. Catalano. 2008. Semaphorin3A signaling controls Fas (CD95)-mediated apoptosis by promoting Fas translocation into lipid rafts. *Blood* 111:2290-2299.
210. Yamamoto, M., K. Suzuki, T. Okuno, T. Ogata, N. Takegahara, H. Takamatsu, M. Mizui, M. Taniguchi, A. Chedotal, F. Suto, H. Fujisawa, A. Kumanogoh and H. Kikutani. 2008. Plexin-A4 negatively regulates T lymphocyte responses. *Int Immunol* 20:413-420.
211. Lepelletier, Y., S. Lecourt, A. Renand, B. Arnulf, V. Vanneaux, J. P. Femand, P. Menasche, T. Domet, J. P. Marolleau, O. Hermine and J. Larghero. 2010. Galectin-1 and semaphorin-3A are two soluble factors conferring T-cell immunosuppression to bone marrow mesenchymal stem cell. *Stem Cells Dev* 19:1075-1079.
212. Catalano, A. 2010. The Neuroimmune Semaphorin-3A Reduces Inflammation and Progression of Experimental Autoimmune Arthritis. *J Immunol*.
213. Mallewaey, T., J. P. Scott-Browne, J. L. Matsuda, M. H. Young, D. G. Pellicci, O. Patel, M. Thakur, L. Kjer-Nielsen, S. K. Richardson, V. Cerundolo, A. R. Howell, J. McCluskey, D. I. Godfrey, J. Rossjohn, P. Marrack and L. Gapin. 2009. T cell receptor CDR2 beta and CDR3 beta loops collaborate functionally to shape the iNKT cell repertoire. *Immunity* 31:60-71.
214. Terashima, A., H. Watarai, S. Inoue, E. Sekine, R. Nakagawa, K. Hase, C. Iwamura, H. Nakajima, T. Nakayama and M. Taniguchi. 2008. A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. *J Exp Med* 205:2727-2733.
215. Boyman, O., J. H. Cho, J. T. Tan, C. D. Surh and J. Sprent. 2006. A major histocompatibility complex class I-dependent subset of memory phenotype CD8+ cells. *J Exp Med* 203:1817-1825.
216. Robertson, J. M., M. MacLeod, V. S. Marsden, J. W. Kappler and P. Marrack. 2006. Not all CD4+ memory T cells are long lived. *Immunol Rev* 211:49-57.
217. Purton, J. F., J. T. Tan, M. P. Rubinstein, D. M. Kim, J. Sprent and C. D. Surh. 2007. Antiviral CD4+ memory T cells are IL-15 dependent. *J Exp Med* 204:951-961.

218. Misumi, Y., K. Miki, A. Takatsuki, G. Tamura and Y. Ikehara. 1986. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 261:11398-11403.
219. Zhang, J., K. V. Salojin, J. X. Gao, M. J. Cameron, I. Bergerot and T. L. Delovitch. 1999. p38 mitogen-activated protein kinase mediates signal integration of TCR/CD28 costimulation in primary murine T cells. *J Immunol* 162:3819-3829.
220. Beurel, E., S. M. Michalek and R. S. Jope. 2010. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends Immunol* 31:24-31.
221. Gomez-Sintes, R. and J. J. Lucas. 2010. NFAT/Fas signaling mediates the neuronal apoptosis and motor side effects of GSK-3 inhibition in a mouse model of lithium therapy. *J Clin Invest* 120:2432-2445.
222. Hammond, K. J., D. G. Pellicci, L. D. Poulton, O. V. Naidenko, A. A. Scalzo, A. G. Baxter and D. I. Godfrey. 2001. CD1d-restricted NKT cells: an interstrain comparison. *J Immunol* 167:1164-1173.
223. Stock, P., V. Lombardi, V. Kohlrautz and O. Akbari. 2009. Induction of airway hyperreactivity by IL-25 is dependent on a subset of invariant NKT cells expressing IL-17RB. *J Immunol* 182:5116-5122.
224. Hameg, A., I. Apostolou, M. Leite-De-Moraes, J. M. Gombert, C. Garcia, Y. Koezuka, J. F. Bach and A. Herbelin. 2000. A subset of NKT cells that lacks the NK1.1 marker, expresses CD1d molecules, and autopresents the alpha-galactosylceramide antigen. *J Immunol* 165:4917-4926.
225. Terszowski, G., S. M. Muller, C. C. Bleul, C. Blum, R. Schirmbeck, J. Reimann, L. D. Pasquier, T. Amagai, T. Boehm and H. R. Rodewald. 2006. Evidence for a functional second thymus in mice. *Science* 312:284-287.
226. Dooley, J., M. Erickson, G. O. Gillard and A. G. Farr. 2006. Cervical thymus in the mouse. *J Immunol* 176:6484-6490.
227. Doisne, J. M., L. Bartholin, K. P. Yan, C. N. Garcia, N. Duarte, J. B. Le Luduec, D. Vincent, F. Cyprian, B. Horvat, S. Martel, R. Rimokh, R. Losson, K. Benlagha and J. C. Marie. 2009. iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling. *J Exp Med* 206:1365-1378.
228. Monteiro, M., C. F. Almeida, M. Caridade, J. C. Ribot, J. Duarte, A. Agua-Doce, I. Wollenberg, B. Silva-Santos and L. Graca. 2010. Identification of regulatory Foxp3+ invariant NKT cells induced by TGF-beta. *J Immunol* 185:2157-2163.
229. Novak, J., L. Beaudoin, T. Griseri and A. Lehuen. 2005. Inhibition of T cell differentiation into effectors by NKT cells requires cell contacts. *J Immunol* 174:1954-1961.
230. Chauvet, S., S. Cohen, Y. Yoshida, L. Fekrane, J. Livet, O. Gayet, L. Segu, M. C. Buhot, T. M. Jessell, C. E. Henderson and F. Mann. 2007. Gating of Semaphorin 3E/PlexinD1 signaling by neuropilin-1 switches axonal repulsion to attraction during brain development. *Neuron* 56:807-822.
231. Gu, C., Y. Yoshida, J. Livet, D. V. Reimert, F. Mann, J. Merte, C. E. Henderson, T. M. Jessell, A. L. Kolodkin and D. D. Ginty. 2005. Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins. *Science* 307:265-268.
232. Casazza, A., V. Finisguerra, L. Capparuccia, A. Camperi, J. M. Swiercz, S. Rizzolio, C. Rolny, C. Christensen, A. Bertotti, I. Sarotto, M. Risio, L. Trusolino, J. Weitz, M. Schneider, M. Mazzone, P. M. Comoglio and L. Tamagnone. 2010. Semaphorin 3E-Plexin D1 signaling drives human cancer cell invasiveness and metastatic spreading in mice. *J Clin Invest* 120:2684-2698.

233. Rossignol, M., J. Pouyssegur and M. Klagsbrun. 2003. Characterization of the neuropilin-1 promoter; gene expression is mediated by the transcription factor Sp1. *J Cell Biochem* 88:744-757.
234. Im, S. H. and A. Rao. 2004. Activation and deactivation of gene expression by Ca²⁺/calcineurin-NFAT-mediated signaling. *Mol Cells* 18:1-9.
235. Sorensen, I., R. H. Adams and A. Gossler. 2009. DLL1-mediated Notch activation regulates endothelial identity in mouse fetal arteries. *Blood* 113:5680-5688.
236. Mammucari, C., A. Tommasi di Vignano, A. A. Sharov, J. Neilson, M. C. Havrda, D. R. Roop, V. A. Botchkarev, G. R. Crabtree and G. P. Dotto. 2005. Integration of Notch 1 and calcineurin/NFAT signaling pathways in keratinocyte growth and differentiation control. *Dev Cell* 8:665-676.
237. Pan, F., Z. Ye, L. Cheng and J. O. Liu. 2004. Myocyte enhancer factor 2 mediates calcium-dependent transcription of the interleukin-2 gene in T lymphocytes: a calcium signaling module that is distinct from but collaborates with the nuclear factor of activated T cells (NFAT). *J Biol Chem* 279:14477-14480.
238. McKinsey, T. A., C. L. Zhang and E. N. Olson. 2002. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem Sci* 27:40-47.
239. Youn, H. D., T. A. Chatila and J. O. Liu. 2000. Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. *EMBO J* 19:4323-4331.
240. Montolio, M., J. Messeguer, I. Masip, P. Guijarro, R. Gavin, J. Antonio Del Rio, A. Messeguer and E. Soriano. 2009. A semaphorin 3A inhibitor blocks axonal chemorepulsion and enhances axon regeneration. *Chem Biol* 16:691-701.
241. Fazilleau, N., M. D. Eisenbraun, L. Malherbe, J. N. Ebright, R. R. Pogue-Caley, L. J. McHeyzer-Williams and M. G. McHeyzer-Williams. 2007. Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells. *Nat Immunol* 8:753-761.
242. Yusuf, I., R. Kageyama, L. Monticelli, R. J. Johnston, D. Ditoro, K. Hansen, B. Barnett and S. Crotty. 2010. Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *J Immunol* 185:190-202.
243. Cannons, J. L., H. Qi, K. T. Lu, M. Dutta, J. Gomez-Rodriguez, J. Cheng, E. K. Wakeland, R. N. Germain and P. L. Schwartzberg. 2010. Optimal germinal center responses require a multistage T cell:B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84. *Immunity* 32:253-265.
244. Qi, H., J. L. Cannons, F. Klauschen, P. L. Schwartzberg and R. N. Germain. 2008. SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* 455:764-769.
245. Rasheed, A. U., H. P. Rahn, F. Sallusto, M. Lipp and G. Muller. 2006. Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression. *Eur J Immunol* 36:1892-1903.
246. Wrzesinski, S. H., Y. Y. Wan and R. A. Flavell. 2007. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 13:5262-5270.
247. Catalano, A., P. Caprari, S. Rodilossi, P. Betta, M. Castellucci, A. Casazza, L. Tamagnone and A. Procopio. 2004. Cross-talk between vascular endothelial growth factor and semaphorin-3A pathway in the regulation of normal and malignant mesothelial cell proliferation. *FASEB J* 18:358-360.

248. Araki, K., S. Gangappa, D. L. Dillehay, B. T. Rouse, C. P. Larsen and R. Ahmed. 2010. Pathogenic virus-specific T cells cause disease during treatment with the calcineurin inhibitor FK506: implications for transplantation. *J Exp Med*.
249. Fischer, A. C., P. P. Ruvolo, R. Burt, L. R. Horwitz, E. C. Bright, J. M. Hess, W. E. Beschorner and A. D. Hess. 1995. Characterization of the autoreactive T cell repertoire in cyclosporin-induced syngeneic graft-versus-host disease. A highly conserved repertoire mediates autoaggression. *J Immunol* 154:3713-3725.
250. Jiang, S. X., M. Sheldrick, A. Desbois, J. Slinn and S. T. Hou. 2007. Neuropilin-1 is a direct target of the transcription factor E2F1 during cerebral ischemia-induced neuronal death in vivo. *Mol Cell Biol* 27:1696-1705.
251. Schwartz, N., A. Schohl and E. S. Ruthazer. 2009. Neural activity regulates synaptic properties and dendritic structure in vivo through calcineurin/NFAT signaling. *Neuron* 62:655-669.
252. Morita, A., N. Yamashita, Y. Sasaki, Y. Uchida, O. Nakajima, F. Nakamura, T. Yagi, M. Taniguchi, H. Usui, R. Kato-Semba, K. Takei and Y. Goshima. 2006. Regulation of dendritic branching and spine maturation by semaphorin3A-Fyn signaling. *J Neurosci* 26:2971-2980.
253. Tran, T. S., M. E. Rubio, R. L. Clem, D. Johnson, L. Case, M. Tessier-Lavigne, R. L. Huganir, D. D. Ginty and A. L. Kolodkin. 2009. Secreted semaphorins control spine distribution and morphogenesis in the postnatal CNS. *Nature* 462:1065-1069.
254. Sugahara, K. N., T. Teesalu, P. P. Karmali, V. R. Kotamraju, L. Agemy, D. R. Greenwald and E. Ruoslahti. 2010. Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science* 328:1031-1035.
255. Teesalu, T., K. N. Sugahara, V. R. Kotamraju and E. Ruoslahti. 2009. C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:16157-16162.
256. Sugahara, K. N., T. Teesalu, P. P. Karmali, V. R. Kotamraju, L. Agemy, O. M. Girard, D. Hanahan, R. F. Mattrey and E. Ruoslahti. 2009. Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. *Cancer Cell* 16:510-520.
257. Tirand, L., C. Frochot, R. Vanderesse, N. Thomas, E. Trinquet, S. Pinel, M. L. Viriot, F. Guillemin and M. Barberi-Heyob. 2006. A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J Control Release* 111:153-164.

Annexes

Annexe 1 : “Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3⁺ Treg”

Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3⁺ Treg

Pierre Milpied^{*1}, Amédée Renand^{*1}, Julie Bruneau², Daniella A. Mendes-Da-Cruz¹, Sébastien Jacquelin¹, Vahid Asnaft², Marie-Thérèse Rubio¹, Elizabeth MacIntyre², Yves Lepelletier^{**1} and Olivier Hermine^{**1,3}

¹ CNRS UMR 8147, Université Paris Descartes, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris, France

² INSERM EMI0210, Université Paris Descartes, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris, France

³ Service d'hématologie clinique Université Paris Descartes, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris, France

Treg are immune cells that play a critical role in the regulation of the immune response. Although the transcription factor Foxp3 is widely accepted as the standard marker of Treg, specific surface markers are needed to better characterize these cells and decipher their mechanisms of action. Neuropilin-1 (Nrp-1), a membrane protein primarily involved in the nervous system, was identified as a specific marker of murine Treg, but its expression has not been rigorously investigated in human Treg. Here we show that in contrast to murine Treg and regardless of their origins (blood, thymus, spleen, lymph node or tonsil), human Foxp3⁺ Treg do not specifically express Nrp-1. However, a population of Foxp3⁻ Nrp-1⁺ T cells can be detected in human secondary lymphoid organs, and Nrp-1 expression is induced on peripheral blood T lymphocytes upon *in vitro* activation. We conclude that Nrp-1 cannot be used as a specific marker of human Treg, but might represent a novel activation marker of human T cells both *in vitro* and *in vivo*.

Key words: Human · Lymphoid organs · Mouse · Neuropilin-1 · Treg

Introduction

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes (Treg) are immune response modulators of crucial importance in many physiological and pathological situations, which are characterized by their ability to inhibit antigen specific T lymphocyte activation [1]. Even though the molecular and cellular mechanisms underlying their suppressive activity are under intense investigation, they are not yet totally elucidated. The discovery that the transcription factor Foxp3 plays a key role in murine Treg differentiation and function and is an exclusive marker of Treg [2] was considered a significant step toward the understanding of both the characterization and the function of these cells. In human, Foxp3 is the most commonly used marker of

Treg as it permits the distinction between activated conventional T cells (Tconv) and Treg. However, its intra-nuclear localization does not allow its use as a marker for Treg selection for subsequent functional analysis.

In order to identify specific cell surface markers of Treg, Bruder *et al.* have shown by using a transcriptomic approach that in contrast to Tconv, neuropilin-1 (Nrp-1) is strongly and constitutively expressed in murine Treg [3].

Nrp-1 is a transmembrane protein mainly involved in axonal guidance [4] and angiogenesis as a receptor of class 3 semaphorins [5] and vascular endothelial growth factors [6]. In the immune system, we and others have shown that Nrp-1 is involved in the priming of T cells by DC [7] and in the regulation of the immunological synapse and response [8, 9]. More recently, Sarris *et al.* have

Correspondence: Professor Olivier Hermine
e-mail: hermine@necker.fr

*These authors contributed equally to this work.

**These authors co-directed this work.

extended our findings by demonstrating that high expression of Nrp-1 on Treg cells promoted their prolonged interaction with immature DC [10]. They hypothesized that this phenomenon could contribute to peripheral tolerance by providing an advantage to Treg to interact with immature DC that present autoantigens, thereby preventing activation of naive autoreactive T cells. Therefore, Nrp-1 might be considered not only as a specific marker of murine Treg, but also as a key player to be added to the list of molecular mechanisms by which Treg exert their suppressive effects.

Considerable confusion has however emerged in some studies that have used this antigen to further characterize Treg cells in human pathology [11–13] because there is no clear evidence or study demonstrating the specific expression of Nrp-1 in human CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ Treg. In order to clarify this point, we have analyzed Nrp-1 expression in murine and human Tconv and Treg subsets obtained from various immune organs by flow cytometry. We report here that in humans, Nrp-1 is not a marker of Foxp3⁺ Treg, but is expressed on a subset of secondary lymphoid organs T cells and can be induced on T cells by *in vitro* activation.

Results and discussion

Nrp-1 is not differentially expressed on human Foxp3⁺ Treg, regardless of their organ origin

Several experiments performed in our laboratory were unable to show clear Nrp-1 expression in human CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg isolated from the blood of healthy donors in contrast to murine Treg. This unexpected observation prompted us to investigate whether this difference of expression between mice and human Treg was due to organ-specific origins (blood *versus* spleen) or to species specificities (human *versus* mouse).

To address this question, we have analyzed Nrp-1 expression by flow cytometry at the surface of Treg originating from the blood, thymus, spleen and peripheral lymph nodes of mice and from the blood, thymus, spleen, peripheral lymph nodes and tonsils of men. For each organ of both human and mouse, we analyzed Nrp-1 staining in two electronically gated populations: CD3⁺CD4⁺Foxp3⁻CD25⁻ Tconv and CD3⁺CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ Treg (Fig. 1A). For thymocytes staining, Tconv were CD8⁻CD4⁺Foxp3⁻CD25⁻ and Treg were CD8⁻CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺.

In all organs tested and in contrast to Tconv, Nrp-1 was found to be highly and specifically expressed on the cell surface of murine Treg (Fig. 1A and C). These results confirm and extend the finding of Bruder *et al.* [3] and demonstrate that the Nrp-1-specific expression on Treg is not limited to a specific organ but is rather a general characteristic of these cells in mice.

In sharp contrast, in all human organs tested, the expression of Nrp-1 was very low on both Treg and Tconv, as compared with the high Nrp-1 levels expressed by plasmacytoid dendritic cells (Fig. 1A and B). Although Nrp-1 expression on human Tconv and Treg cells was consistently low, some differences between these subsets could

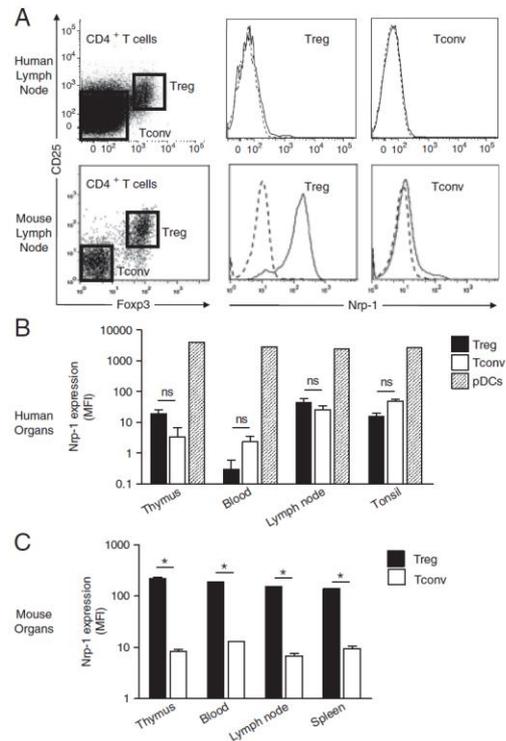


Figure 1. Differential expression of Nrp-1 in human and mouse Foxp3⁺ Treg. (A) Human (top) and mouse (bottom) lymph node cell preparations were stained with anti-CD3 ϵ , anti-CD4, anti-CD25, anti-FoxP3 and anti-Nrp-1 antibodies (or an irrelevant fluorochrome-matched IgG) and analyzed by flow cytometry. CD3⁺CD4⁺ cells were gated as CD4⁺ T lymphocytes and two subsets were defined according to their CD25 and Foxp3 expression (left): Tconv (Foxp3⁻CD25⁻, Tconv) and Treg (Foxp3⁺CD25⁺, Treg). Nrp-1 expression was analyzed in Treg cells (middle) and Tconv cells (right) (dashed line: control IgG staining; solid line: anti-Nrp-1 staining). (B) The same FACS analysis was performed on various samples of human thymus ($n=2$, two experiments), blood ($n=3$, three experiments), lymph node ($n=7$, five experiments) and tonsil ($n=3$, three experiments); for the thymus, anti-CD3 ϵ was replaced by anti-CD8 and single positive CD4⁺CD8⁻ cells were analyzed as in (A). Bars show Nrp-1 expression (mean fluorescence intensity of anti-Nrp-1 staining compared with control IgG staining) in Treg (black) and Tconv (white) subsets for each organ. Nrp-1 expression of plasmacytoid dendritic cells (pDC, striped) is displayed as a positive control for intense human Nrp-1 staining. (C) Cells from mouse thymus ($n=3$), blood ($n=3$), lymph nodes ($n=3$) and spleen ($n=3$) were analyzed as in (B). Bars in (B) and (C) show mean \pm SEM. Data were compared using Wilcoxon's signed-rank test and Student's paired t-test for human and murine data, respectively (* $p<0.05$; ns: not significant).

be noted: Treg seemed to express more Nrp-1 than Tconv in the thymus, but less in tonsils. These apparent divergences were not of statistical significance in any organ when Wilcoxon's signed-rank test was applied to the data. No difference was found in the spleen

(data not shown), but no statistical analysis could be performed as only one sample could be recovered for this study. In summary, in contrast to mouse organs, the expression level of Nrp-1 on Tregs was very low in all human organs. As such, Nrp-1 cannot be considered to be a surface marker for human Foxp3⁺ Treg.

Nrp-1-expressing T cells in secondary lymphoid organs

In our experiments, the expression levels of Nrp-1 were almost undetectable on peripheral blood T cells but much higher in secondary lymphoid organs. Since two previous reports had identified Nrp-1-expressing T cells in human tonsils [14] and lymph nodes [15], we further analyzed our data focusing on such subsets.

Nrp-1-expressing T cells were variably abundant in secondary lymphoid organs, but consistently rare in peripheral blood (Fig. 2A and B). In tonsils, Nrp-1⁺ T cells (which represented an average of 5.43% of CD4⁺ T cells) were mostly CD25⁻ and Foxp3⁻ as only 0.32 and 0.19% of CD4⁺ T cells were Nrp-1⁺CD25⁺ and Nrp-1⁺Foxp3⁺, respectively (Fig. 2A and B). In lymph nodes, the proportion of Nrp-1⁺ T cells was heterogeneous, but only a small

proportion of these cells expressed the regulatory markers CD25 and Foxp3 (Fig. 2A and B). In some lymph node samples, a maximum of 20% of Nrp-1⁺ T cells were positive for Foxp3 and CD25 (Fig. 2, lymph node no. 1), but the populations were so small that Nrp-1⁺Foxp3⁺ T cells only represent an average of 0.27% of all CD4⁺ T cells and approximately 5% of all Foxp3⁺ T cells (Fig. 2B). Our data on tonsil samples are concordant with the previous data from Dzionek *et al.* [14] that identified Nrp-1⁺ T cells as follicular helper T cells. The report on lymph node Nrp-1⁺ T cells stated that a high proportion (approximately 40%) of Nrp-1⁺ T cells were CD25⁺Foxp3⁺ and that this regulatory phenotype *in vivo* was associated with regulatory functions *in vitro* [15]. Our results on a total of seven lymph nodes do not refute the fact that Nrp-1⁺ Treg exist in lymph nodes, but clearly show that such a subset is present at a very low and heterogeneous rate and that the majority of Nrp-1⁺ T cells have a non-regulatory phenotype. Recently, the same group published that metastatic tumor draining lymph nodes were enriched in Nrp-1⁺ Treg when compared with metastasis-free tumor draining lymph nodes [16]. A tolerogenic cytokine milieu might therefore increase the amount of regulatory phenotype Nrp-1⁺ T cells and this could be an explanation for our heterogeneous and apparently diverging results.

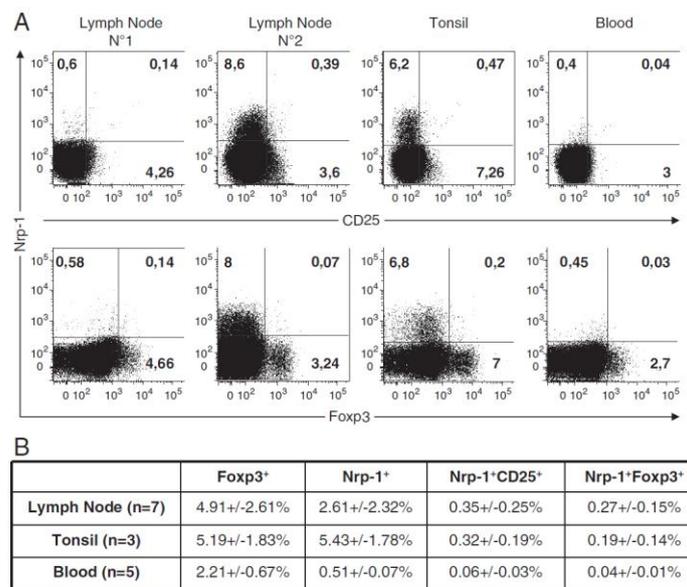


Figure 2. Nrp-1-expressing T cells in human secondary lymphoid organs are not Foxp3⁺ Treg. (A) Cells from human samples were stained as in Fig. 1 and further analyzed in the CD3⁺ CD4⁺ gate for the co-expression of Nrp-1 and CD25 (upper row) or Foxp3 (lower row). Dot plot analysis of two lymph nodes, one tonsil and one blood sample is shown here. Lymph node no. 1 (far left) is representative of the majority of the lymph nodes analyzed, whereas lymph node no. 2 (middle left) has a uniquely abundant Nrp-1⁺ T-cell population. Tonsil and blood (middle right and far right, respectively) are representative of all the samples analyzed. Numbers in each quadrant represent the percentage of cells in this quadrant. (B) The table summarizes the results illustrated in (A): the percentages of Foxp3⁺, Nrp-1⁺, double-positive Nrp-1⁺CD25⁺ and Nrp-1⁺Foxp3⁺ cells in the CD3⁺CD4⁺ gate were assessed for every lymph node (n = 7), tonsil (n = 3) and blood (n = 3) sample recovered. Data are expressed as mean ± SD.

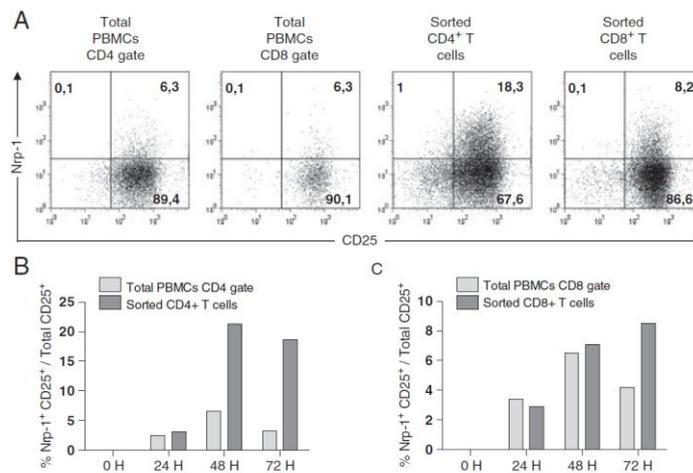


Figure 3. Expression of Nrp-1 on activated CD4⁺ and CD8⁺ human T cells. Human total PBMC or sorted CD4⁺ and CD8⁺ T cells were activated by plate-bound anti-CD3 ϵ and anti-CD28 antibodies as described in the *Materials and methods*, recovered at various time points and labeled for FACS analysis of CD3, CD4, CD8, CD25 and Nrp-1. (A) Dot plots show CD25 versus Nrp-1 expression patterns after 48 h. Numbers in each quadrant represent the percentage of cells in this quadrant. (B) and (C) graphs show the percentage of Nrp-1-expressing cells in activated CD25⁺ CD4 T cells (B) and CD25⁺ CD8 T cells (C) in either total PBMC (light gray) or sorted cells (dark gray) after 24, 48 and 72 h of culture. These data are representative of two distinct experiments.

Nrp-1 is expressed on human peripheral blood T cells upon *in vitro* activation

As all secondary lymphoid organs analyzed in this study had been removed due to reactive hyperplasia, we wondered whether Nrp-1 expression could be induced on peripheral T cells by activation. Indeed, when human PBMC were activated by anti-CD3 ϵ and anti-CD28 antibodies for 48 h, a relatively high percentage of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells expressed CD25 and Nrp-1 concomitantly (Fig. 3A, left panels). It has been reported that T cells could acquire Nrp-1 expression after contact with Nrp-1-expressing DC or activated monocytes by an intercellular cell transfer mechanism called trogocytosis [17]. To assess whether the Nrp-1 expression on T cells in our activated PBMC culture was due to such a mechanism, we repeated the experiment using magnetically purified CD4⁺ and CD8⁺ T cells. In such cultures, Nrp-1 was expressed on an even higher proportion of activated CD25⁺ T cells after 48 h than when they were activated in PBMC cultures containing monocytes (Fig. 3A, right panels), thus discarding trogocytosis as the main source of Nrp-1 on T cells. The expression of Nrp-1 on activated T cells was detected at 24 h of culture and seemed to reach a maximum between 48 and 72 h (Fig. 3B and C). Altogether, these results show that Nrp-1 expression can be induced on peripheral T cells upon *in vitro* activation.

Concluding remarks

Taken together, our results demonstrate that the difference in Nrp-1 expression initially observed between murine Treg isolated from the spleen and human Treg isolated from the blood is not due

to organ specificity, but rather to species specificity. As a result, since Nrp-1 is not differentially expressed on human Foxp3⁺ Treg, it should not be used as a specific surface marker of these cells in human blood or other organs. As a consequence, studies that have used Nrp-1 to demonstrate the role of Treg in several pathological conditions should be interpreted with caution.

However, the presence of non-negligible amounts of Nrp-1-expressing T cells in reactive secondary lymphoid organs and the induction of Nrp-1 expression in peripheral blood T cells after *in vitro* activation raises interesting questions. We can, for instance, wonder whether Nrp-1⁺ T cells interact longer with Nrp-1⁺ DC subsets such as pDC or whether they possess intrinsic regulatory properties through expression of membrane-bound TGF- β 1 [18]. Further work will be thus required to assess the role of Nrp-1 expression in activated T cells.

In any case, this phenotypic divergence between mouse and human Treg raises the question of the signification of the loss of Nrp-1 expression on Treg during phylogenetic evolution from mice to men and suggests that in both species their mechanisms of action may be different.

Materials and methods

Mice, patients, cells preparation

Six- to ten-week-old female C57BL/6 mice were purchased at Janvier (France). For the isolation of PBMC, mice were anesthetized, exsanguinated and blood samples were diluted two to three

times in PBS. Mononuclear cells were then separated on a Lymphocyte Preparation Medium (PAA, France) gradient by centrifugation 20 min at 1600 rpm at room temperature. Cells were then washed twice in cold PBS before analysis. The spleen, lymph nodes (inguinal and mesenteric) and thymus of sacrificed mice were homogenized in a red blood cell lysis buffer (ACK) (Cambrex, France) and the resulting homogenates were filtered through a 40 µm nylon membrane and washed twice in cold PBS before analysis.

Human PBMC were isolated on a Lymphocyte Preparation Medium (PAA) gradient from adult healthy volunteers. Human thymic tissue was obtained from children undergoing cardiac surgery. Tonsils were obtained from children undergoing tonsillectomy. Non-malignant lymph nodes were obtained from patients (age range: 5–57 yrs, median: 12 yrs) with non-specific reactive follicular hyperplasia validated by histo-pathological analysis. Non-malignant spleen was obtained from a patient with leishmaniasis. Briefly, organs were perfused with RPMI 1640+20% FCS, dissociated on a 100 µm nylon membrane and washed with cold PBS before staining. Experimental procedures with human samples have been approved by the Necker Hospital Ethical Committees for human research, and were done according to the European Union guidelines and the declaration of Helsinki.

For *in vitro* activation experiments, CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells were sorted using CD4⁺ T Cell Isolation Kit II and CD8⁺ T Cell Isolation Kit, respectively, according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Germany).

Flow cytometry, antibodies

Intracellular mouse Foxp3 staining was carried out with APC-labeled anti-Foxp3 (FJK-16s) with the eBioscience kit following manufacturer's instructions. Purified anti-CD16/32 (2.4G2), PerCP-Cy5.5-labeled anti-CD25 (PC61.5), Pacific Blue-labeled anti-CD4 (RM4-5), PE-Cy7-labeled anti-CD8 (53–6.7), APC-labeled anti-TCRβ (H57-597) (all from BD Biosciences, France), goat anti-rat Nrp-1 (AF566, R&D Systems, France), control goat IgG (Southern Biotechnology Associates, France) and secondary FITC-labeled donkey anti-goat (Santa Cruz Biotechnology, France) antibodies were used for the analysis of mouse cells. Intracellular human Foxp3 staining was done with PE- or APC-labeled anti-Foxp3 (3G3) with the Miltenyi Biotec kit or the eBioscience kit following the manufacturer's instructions. PE-labeled anti-CD25 (4E3), PE-, APC- or Biotin-labeled anti-human Nrp-1 (anti-BDCA4, clone AD5-17F6) (all from Miltenyi Biotec), FITC-, APC-Cy7- or Biotin-labeled anti-CD4 (RPA-T4), FITC- or Pacific Blue-labeled anti-CD8 (RPA-T8), Pacific Blue-labeled anti-CD3ε (SP34-02), control APC-labeled mouse IgG1, and PerCP-labeled streptavidin (all from BD Biosciences) were used for the analysis of human cells. Cells were passed on a FACSCanto II (BD Biosciences) flow cytometer. Data were analyzed using the FACSDiva software (BD Biosciences) and the Flowjow software (Tree Star, San Carlos, CA, USA).

T-cell activation

For *in vitro* T-cell activation, 10⁶ total PBMC or 2.10⁵ sorted T cells were cultured in 24-well plates which had been coated with 5 µg/mL anti-CD3ε (UCHT1, R&D Systems) and 2.5 µg/mL anti-CD28 (37407, R&D Systems). Culture medium consisted of RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the Prism 5.0 software (GraphPad) using Wilcoxon's signed-rank test or a paired student's *t*-test. A *p*-value inferior to 0.05 was considered significant.

Acknowledgements: P. Milpied and A. Renand are recipients of grants from Ministère de la Recherche and Ligue Nationale contre le Cancer, respectively. This work was supported by grants from Ligue Nationale contre le Cancer (LNCC, France), Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC, France), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, France), INCA (France), ANR (France), Cancéropole (France) and the Fondation de France (France). We wish to thank Dr. F. Audat and Dr. J. A. Ribeil (Department of Biotherapy, Hôpital Necker) for providing us with blood samples. We thank Dr. O. Devergne (CNRS UMR 8147, Hôpital Necker) for providing us with tonsils.

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- 1 Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. and Ono, M., Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008. 133: 775–787.
- 2 Hori, S., Nomura, T. and Sakaguchi, S., Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003. 299: 1057–1061.
- 3 Bruder, D., Probst-Kepper, M., Westendorf, A. M., Geffers, R., Beissert, S., Loser, K., von Boehmer, H. et al., Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 2004. 34: 623–630.
- 4 Chen, H., He, Z., Bagri, A. and Tessier-Lavigne, M., Semaphorin-neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorins. *Neuron* 1998. 21: 1283–1290.
- 5 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.
- 6 Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G. and Klagsbrun, M., Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998. 92: 735–745.

- 7 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.
- 8 Catalano, A., Caprari, P., Moretti, S., Faronato, M., Tamagnone, L. and Procopio, A., Semaphorin-3A is expressed by tumor cells and alters T-cell signal transduction and function. *Blood* 2006. 107: 3321–3329.
- 9 Lepelletier, Y., Moura, I. C., Hadj-Slimane, R., Renand, A., Fiorentino, S., Baude, C., Shirvan, A. et al., Immunosuppressive role of semaphorin-3A on T cell proliferation is mediated by inhibition of actin cytoskeleton reorganization. *Eur. J. Immunol.* 2006. 36: 1782–1793.
- 10 Sarris, M., Andersen, K. G., Randow, F., Mayr, L. and Betz, A. G., Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 2008. 28: 402–413.
- 11 Lim, A. Y., Price, P., Beilharz, M. W. and French, M. A., Cell surface markers of regulatory T cells are not associated with increased forkhead box p3 expression in blood CD4+ T cells from HIV-infected patients responding to antiretroviral therapy. *Immunol. Cell Biol.* 2006. 84: 530–536.
- 12 Smyth, L. J., Starkey, C., Vestbo, J. and Singh, D., CD4-regulatory cells in COPD patients. *Chest* 2007. 132: 156–163.
- 13 Zhou, H., Zhang, L., Tong, L., Cai, M., Guo, H., Yang, C., Shi, B. and Chen, Z. K., Expression of neuropilin-1 in kidney graft biopsies: what is the significance? *Transplant. Proc.* 2007. 39: 81–83.
- 14 Dzionek, A., Inagaki, Y., Okawa, K., Nagafune, J., Rock, J., Sohma, Y., Winkels, G. et al., Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum. Immunol.* 2002. 63: 1133–1148.
- 15 Battaglia, A., Buzzonetti, A., Monego, G., Peri, L., Ferrandina, G., Fanfani, F., Scambia, G. and Fattorossi, A., Neuropilin-1 expression identifies a subset of regulatory T cells in human lymph nodes that is modulated by preoperative chemoradiation therapy in cervical cancer. *Immunology* 2008. 123: 129–138.
- 16 Battaglia, A., Buzzonetti, A., Baranello, C., Ferrandina, G., Martinelli, E., Fanfani, F., Scambia, G. and Fattorossi, A., Metastatic tumour cells favour the generation of a tolerogenic milieu in tumour draining lymph node in patients with early cervical cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2009. DOI 10.1007/s00262-008-0646-7.
- 17 Bourbie-Vaudaine, S., Blanchard, N., Hivroz, C. and Romeo, P. H., Dendritic cells can turn CD4+ T lymphocytes into vascular endothelial growth factor-carrying cells by intercellular neuropilin-1 transfer. *J. Immunol.* 2006. 177: 1460–1469.
- 18 Glinka, Y. and Prud'homme, G. J., Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor β -1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J. Leukoc. Biol.* 2008.

Abbreviations: Nrp-1: neuropilin-1 · Tconv: conventional T cells

Full correspondence: Professor Olivier Hermine, CNRS UMR 8147, Hôpital Necker, Bâtiment Sèvres Porte S2, 161 rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France
 Fax: +33-1-44-49-06-76
 e-mail: hermine@necker.fr

Current address: Dr. Daniella A. Mendes-Da-Cruz, Oswaldo Cruz Institute – Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

Received: 31/10/2008

Revised: 18/2/2009

Accepted: 31/3/2009

Annexe 2 : “Neuropilins, semaphorins, and their roles in thymocyte development”

Neuropilins, Semaphorins, and Their Role in Thymocyte Development

Daniella Arêas Mendes-da-Cruz,^{a,b} Yves Lepelletier,^b
Anne C. Brignier,^b Salette Smaniotto,^c Amédée Renand,^b
Pierre Milpied,^b Mireille Dardenne,^b Olivier Hermine,^{b,d,e}
and Wilson Savino^{a,e}

^aOswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

^bParis Descartes University, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8147, Necker Hospital, Paris, France

^cInstitute of Biomedical and Health Sciences, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil

^dAssistance Publique, Hôpitaux de Paris, Paris, France

Some molecules described in the nervous system are also expressed in cells involved in the control of the immune response, suggesting they have a role as common mechanisms between neuroendocrine and immune systems. In this review, we focus on the expression and role of neuropilins (NPs) and their soluble ligands class 3 semaphorins in thymus physiology, particularly migration of developing thymocytes. We also discuss the concept of multivectorial thymocyte migration, including semaphorins, as a new individual cell migration vector.

Key words: semaphorins; neuropilins; thymus; thymocyte migration; thymocyte development

It is largely accepted that a variety of molecular interactions typically found in nervous tissue can be found in the immune system. In particular, the thymus is a primary site for T cell development in which various interactions mediated by neuroendocrine moieties have been defined.¹ Herein we will focus on the expression and role of neuropilins (NPs) and their soluble ligands semaphorins (SEMA) in thymus physiology, particularly migration of developing thymocytes. Yet, before entering the discussion of recent data on this subject, we briefly provide some background data on thymus physiology

and “neuroendocrine”-mediated intrathymic cellular interactions.

General Aspects of the Thymus

Thymocyte differentiation occurs as cells migrate within the thymic lobules. Thymocyte precursors enter the thymus by the corticomedullary region and subsequently migrate to the subcapsular region of the organ. Most of the immature thymocytes, including those bearing the phenotypes T cell receptor (TCR) TCR⁻CD3⁻CD4⁻CD8⁻ and TCR^{low}CD3^{low}CD4⁺CD8⁺, are located cortically, whereas mature TCR^{high}CD3^{high}CD4⁺CD8⁻ and TCR^{high}CD3^{high}CD4⁻CD8⁺ cells, which will leave the thymus and migrate to peripheral lymphoid organs, are found in the medulla. During their journey within the thymus,

Address for correspondence: Daniella Arêas Mendes-da-Cruz and Wilson Savino, Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Ave. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, Brazil. Voice: 55 21 38658116; fax: 55 21 22094110. daniella@ioc.fiocruz.br or savino@fiocruz.br

^eThese authors contributed equally to this work.

Neuroimmunomodulation: Ann. N.Y. Acad. Sci. 1153: 20–28 (2009).
doi: 10.1111/j.1749-6632.2008.03980.x © 2009 New York Academy of Sciences.

developing thymocytes encounter cortical and medullary microenvironments through distinct cell–cell and cell–matrix interactions. Generally, thymocytes bearing TCR/CD3 complexes that interact with low or medium affinity with major histocompatibility complex (MHC)-presented antigens are positively selected and continue their maturation process. However, thymocytes bearing TCR/CD3 complexes that interact with high affinity with MHC-presented antigens die by apoptosis in a process called negative selection, which prevents the exit of mature T cells with autoimmune potential.^{2,3} The thymic microenvironment comprises different cell types with distinct roles, including thymic epithelial cells (TEC), dendritic cells (DC), macrophages, and fibroblasts. Positive selection seems to be driven by TEC, whereas negative selection is mainly secondary to interactions involving DC with thymocytes.² The major function of thymic macrophages seems to be the phagocytosis of apoptotic thymocytes, and fibroblasts play a role in the TCR⁻CD4⁻CD8⁻ to TCR⁺CD4⁺CD8⁺ progression.^{4,5} Among microenvironmental cell types, TEC correspond to the major component. They are seen in both cortex and medullary regions where they form special niches, which may be involved in specific interactions with developing thymocytes. In the outer cortex of the thymic lobules, TEC can form the so-called thymic nurse cell (TNC), a lymphoepithelial complex in which one single epithelial cell can harbor a variable number of thymocytes from two to 200.⁶ Since immature as well as some mature thymocytes can be found in TNCs, it has been suggested that they can form a particular microenvironment able to support thymocyte differentiation.^{6a}

Microenvironmental cells also modulate thymocyte development by the production of extracellular matrix (ECM) proteins and soluble polypeptides. TEC express thymic hormones, including thymulin, thymopoietin, and thymosin-1; cytokines, such as interleukin-1 (IL-1), IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, and stem cell

factor; and chemokines, including CXCL12, CXCL10, CCL4, CCL19, and CCL25.^{1,7} Some of these soluble polypeptides are able to stimulate or inhibit thymocyte migration alone or combined with other molecules. Soluble chemokines can be presented to cells by insoluble ECM proteins, which, in turn, might modulate adhesion or de-adhesion capacities. For example, the chemokine CXCL12 is better presented to T cells when it is bound to ECM molecules as fibronectin or laminin. The combined action of these molecules in *ex vivo* migration assays has a synergic effect on thymocyte migration, resulting in a migration index greater than the sum of the migration indexes obtained by each stimulus alone.^{8,9} Cell migration then derives from a balanced response to the various stimuli (positive and/or negative) provided by the microenvironment.

Intrathymic Interactions Involving Molecules Found in the Nervous System

Several molecules involved in the cross-talk between neuronal cells have been characterized. Interestingly, some of these molecules are also expressed in cells involved in the control of the immune response, suggesting their possible role as common mediators between neuroendocrine and immune systems. Several neuropeptides, such as somatostatin, neuropeptide Y (NPY), substance P, and vasointestinal polypeptide, are expressed in the brain but also in the thymus of different species from zebrafish to human and can alter thymocyte development.¹⁰ Some of these molecules, such as NPY, which inhibits the fMLP (formyl-met-leu-phe) chemotactic effect on mouse thymocytes, can also modify thymocyte migration.¹¹

Ephrins and their receptors, Ephs, are highly expressed in the nervous system during development and were described as important in growth cone collapse and cell detachment.¹² Recently, the expression of ephrins and Ephs has been reported in thymocytes and thymic

TABLE 1. Thymocyte Migration Response toward Various Stimuli

Molecule	Migratory activity	Responsive CD4/CD8-defined thymocyte subsets	References
Fibronectin	Haptotaxis	All subsets, mainly CD4* [§] and CD8 SP [§]	20, 22
Laminin	Haptotaxis	All subsets, mainly CD4* [§] and CD8 SP [§]	21, 22
CXCL12	Chemotaxis	All subsets, mainly DP* [§]	7, 18, 19
CCL4	Chemotaxis	All subsets, mainly CD4* and CD8 SP*	18, 19
CCL25	Chemotaxis	All subsets, mainly DP* [§]	7, 18, 19
Ephrins A1, A2, and B1	Inhibition of CXCL12-induced chemotaxis	ND [§]	15
Neuropeptide Y	Inhibition of fMLP-induced chemotaxis	ND*	11
Cellular prion protein	Involvement in laminin-driven migration	ND*	17

fMLP = formyl-met-leu-phe; *results observed with mouse thymocytes, which can diverge depending on the mouse strain; [§]results observed with human thymocytes; DP, CD4⁺CD8⁺ double-positive thymocytes; SP, single-positive thymocytes; ND, CD4/CD8-defined subsets not defined.

stromal cells. EphA4, B2, and B3 knockout mice present altered thymocyte development, suggesting that these molecules could be important in the organization of the thymus and thymocyte migration.^{13,14} In this respect, some Eph ligands, such as ephrins A1, A3, and B2 (but not ephrin B3), have been shown to inhibit the CXCL12-induced chemotaxis of human thymocytes by modifying CXCR4 (a CXCL12 receptor) signaling and chemokine-induced actin polymerization.¹⁵

Although the nervous system is the main site for the cellular prion protein [PrP(C)] expression, this molecule is also expressed in the thymus. Interestingly, mice overexpressing PrP(C) present thymic hypoplasia with accumulation of CD4-CD8 double-negative cells.¹⁶ More recently, we showed that, in addition to a huge hypoplasia of the organ, thymocytes from PrP(C) transgenic mice do not respond to laminin in terms of cell migration.¹⁷

The effect of these molecules as well as chemokines and ECM molecules on thymocyte migration is summarized in Table 1.^{7,11,15,17-22}

Recently, we and others described the expression of another group of molecules in the thymus originally described in the nervous system, the NPs and their respective ligands class 3 SEMAs.²³

The Expression of Neuropilins and Class 3 Semaphorins in the Thymus

NPs are transmembrane glycoprotein receptors for secreted class 3 SEMAs and several vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms. They were initially described as modulators of axon guidance, angiogenesis, and organogenesis.^{24,25} There are two NPs described to date (NP1 and NP2), although NP2 has several transmembrane isoforms and the two NPs have several soluble forms. NP1 binds SEMA3A, 3B, 3C, and 3D, VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅, and VEGF-B, C, D, and E, while NP2 binds SEMA3F, 3B, 3C, and 3D, VEGF-A₁₄₅, and VEGF-A₁₆₅, C, and D.²⁶⁻²⁸ As NPs have a short cytoplasmic domain that lacks signaling activities, NPs also bind other transmembrane proteins called plexins, more specifically class A plexins, which act as co-receptors to transduce the effects of class 3 SEMAs.²⁹

In the human thymus, NP1 is expressed at low percentages on all CD4/CD8-defined thymocyte subsets (Table 2) and at high levels on microenvironmental cells, including TEC and DC.²³

In the mouse thymus primordium, NP1 appears later in development, at day E12.5, but

TABLE 2. Neuropilin (NP)1 Expression in Human and Mouse CD4/CD8-defined Thymocyte Subsets

	Total	DN	DP	CD4	CD8
Human	5.1 ± 1.2	10.5 ± 2.4	5.8 ± 1.3	8.4 ± 1.9	8.9 ± 2.0
Newborn mice	90.2 ± 1.1	55.5 ± 2.1	95.9 ± 0.9	54.5 ± 4.3	87.8 ± 2.8
Young adult mice	88.5 ± 0.6	25.2 ± 1.3	98.9 ± 0.7	21.9 ± 0.5	94.6 ± 2.4

Total = total thymocytes; DN, CD4⁻CD8⁻ double-negative thymocytes; DP, CD4⁺CD8⁺ double-positive thymocytes; CD4, CD4⁺CD8⁻ single-positive thymocytes; CD8, CD4⁻CD8⁺ single-positive thymocytes. Results are mean ± SE expressed as percentages from 19 human samples,²³ five newborn mice, and two young adult mice.

the expression increases with age.^{30,31} When we analyzed the expression of NP1 in newborn mice (day 1) by flow cytometry, we found that thymocytes express high levels of this molecule, mainly the double-positive (DP) CD4⁺CD8⁺ and CD4⁻CD8⁺ (CD8) subpopulations (Table 2). Similar results were observed in young adults. About 88% of mouse thymocytes express NP1, mainly the DP and CD8 subpopulations (Table 2). In contrast, Corbel and colleagues³⁰ have shown that only a small amount of mature CD4⁺CD8⁻ (CD4) and CD8 thymocytes express this molecule. This may be due to differences in the reagents applied. In any case, in the CD4 subpopulation NP1 was described as a marker for mouse CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg), as this molecule seems to be constitutively expressed at the surface of mouse Tregs independently of their activation status.^{30,32}

NP2 is also expressed in the mouse thymus primordium during development (from day E12.5 on), mainly in trabeculae and vessels.³¹ In adult mice, Odaka *et al.* showed that the expression of NP2 was restricted to the lymphatic vessels.³³ These results are consistent with those showing that NP2-deficient mice present abnormal lymphatic vessel development.³⁴ The expression of the NP2 ligand SEMA3F (but not SEMA3D) in the mouse thymus is observed earlier during development, from day E10.5 in microenvironmental cells.³¹

Besides the expression of NPs and SEMAs, class A plexins can also be found in the human thymus, particularly in thymocytes (as shown in Fig. 1), suggesting that the in-

teractions mediated by NPs/SEMAs in the thymus are functional in terms of signaling transduction.

Functional Roles of Neuropilins and Class 3 Semaphorins in the Thymus

Little is known about the function of NPs and SEMAs in the thymus. SEMA3A regulates human thymocyte adhesion onto TEC monolayers, as pre-incubation of thymocytes with this molecule resulted in 50% adhesion inhibition of all CD4/CD8-defined subsets in a dose-dependent manner. This inhibition was observed mainly in NP1-positive cells. Furthermore, SEMA3A exerts a chemorepulsive effect on human thymocytes and inhibits fibronectin and laminin-induced thymocyte migration,²³ showing the importance of SEMA3A/NP1 interactions in thymocyte guidance alone or combined with other molecules as ECM ligands.

Although the expression of NP1 in mouse thymocytes is much higher than that found in humans, thymocyte development (including Tregs) in mice deficient for NP1 in the T cell lineage was not affected.³⁰ These animals display normal percentages of thymocytes and peripheral CD4 and CD8 T lymphocytes, suggesting that NP1/SEMA3A in thymocyte migratory events and egress is likely replaced by other interactions, at least in this species. Interestingly, there is evidence suggesting the NP-independent direct interaction of class 3 SEMAs with plexins (in the case of SEMA3E/plexin-D1).³⁵ This could,

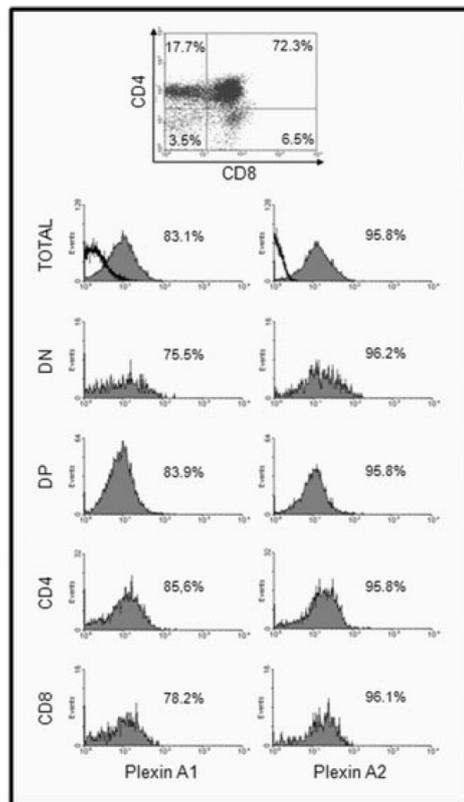


Figure 1. Expression of plexins A1 and A2 on human thymocytes by flow cytometry. Dot plots represent CD4/CD8-defined thymocyte subpopulations, and numbers indicate the classic percentage values of each subpopulation. Gray-filled histograms represent the expression of plexins, while open histograms represent fluorochrome-labeled, isotype-matched, unrelated immunoglobulins. Numbers indicate percentage values of cells expressing the respective plexins. TOTAL, total thymocyte; DN, CD4⁻CD8⁻ double-negative thymocytes; DP, CD4⁺CD8⁺ double-positive thymocytes; CD4, CD4⁺CD8⁻ single-positive thymocytes; CD8, CD4⁻CD8⁺ single-positive thymocytes.

in part, account for the normal T cell phenotype in NP1 knockout mice. Nevertheless, T cell development is normal in plexin-A1-deficient mice,³⁶ suggesting that the SEMA-NP-plexin combination can originate multiple cellular responses depending on the kind of interaction and the molecules involved, or other plexins could then act as compensatory

mechanisms. In any case, this issue clearly deserves further investigation.

Although the expression of SEMA3F, SEMA3D, and NP2 in the mouse thymus has been studied during development, their functional role in this organ is still largely unknown. Since the expression of NP2 in the mouse thymus primordium seems to be restricted to the vessels, it was suggested that SEMA3F and SEMA3D might be involved in guidance of T precursor cells into the thymus.³¹

Other Semaphorins Seem to Play a Role in Cell Migration in the Immune System

In addition to SEMA3A, 3D, and 3E, the expression and role of other SEMAs have been reported in the immune system. Unlike the soluble secreted class 3, class 4–7 SEMAs are transmembrane proteins that can also serve as receptors and interact with other transmembrane molecules. The first SEMA described in lymphoid tissues, especially in the thymus, was SEMA4D.³⁷ In this work, the authors described the expression of this SEMA in the thymus and on the surface of thymocytes, suggesting the role of this molecule in maturation-dependent thymocyte migration. SEMA4D is actually expressed by most hematopoietic cells, and the recombinant soluble molecule inhibits spontaneous migration of B cell and monocyte lineages and chemokine-driven [CCL7 or monocyte chemoattractant protein-3] monocyte migration. Interestingly, similar results were observed with SEMA3A but not with SEMA3E.³⁸

SEMA7A, which is expressed by activated peripheral T cells, stimulates monocytes and macrophages to produce inflammatory cytokines through its interactions with the $\alpha 1\beta 1$ integrin, a collagen receptor.³⁹ In terms of cell migration, although soluble SEMA7A is an attractant for human monocytes,⁴⁰ it seems to inhibit spontaneous human T cell migration,⁴¹ and effector T cells can migrate normally into

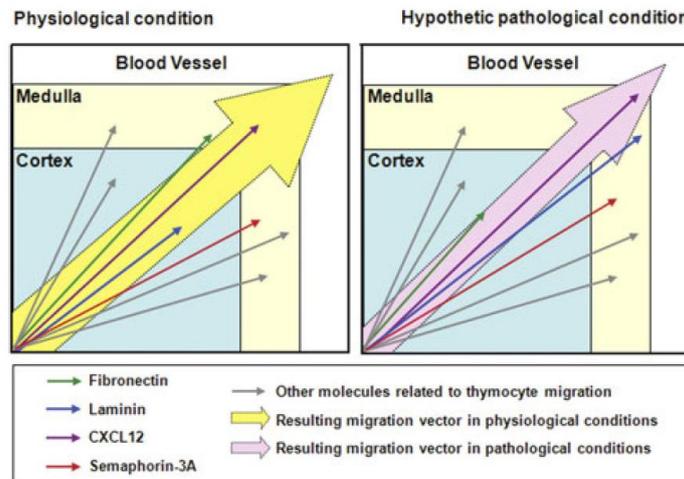


Figure 2. Concept of multivectorial thymocyte migration, including semaphorins (SEMA) as new individual cell migration vectors. The left panel schematically defines the hypothesis stating that thymocyte migration results from a balance of several and simultaneous ligand/receptor pair interactions. Accordingly, individual vectors form a resulting vector that leads thymocytes throughout their journey within the thymic lobules from the cortex toward the medulla, with mature subsets ultimately being exported from the organ through the blood vessel walls. Right panel states that such multivectorial migration can be altered in pathological conditions if one or more individual vectors are altered. Narrow arrows represent individual migration vectors induced by specific stimuli, such as fibronectin (green), laminin (blue), CXCL12 (violet), SEMAs (red), and other molecules (gray). Large yellow and lilac-filled arrows represent the final resulting migration vector (adapted from Ref. 49). (In color in *Annals* online.)

antigen-challenged sites in SEMA7A-deficient mice.³⁹ Moreover, SEMA7A is expressed by mouse thymocytes at all development stages, from embryo to adult, and by human thymocytes, mainly in the DP and CD8 subpopulations.⁴² Yet, its role in thymus physiology remains unknown.

Furthermore, a viral SEMA protein, known as A39R, is able to inhibit DC integrin-mediated adhesion and migration to the chemokine CCL3 (macrophage inflammatory protein-1 α) in a dose-dependent manner.⁴³

Given the importance of the SEMAs cited above in cell migration in the peripheral immune system (and not only in T cells), it is conceivable that they can be expressed intrathymically and have a role in thymocyte migration and development.

Possible Role of Neuropilins and Semaphorins in Thymic Pathologies

NPs and SEMAs have been implicated in different pathologies, mainly neurodevelopmental disorders and cancer. The expression levels of NPs and SEMAs are altered in tumors of many types, and these molecules are correlated with tumor progression.^{44,45} As NPs are also coreceptors for different VEGF families, several studies show the importance of this molecule in normal and tumor angiogenesis. In the human thymus, VEGF is expressed by stromal cells, mainly in the subcapsular region. This expression is altered in thymomas, depending on their type, and is correlated with the tumor microvascular density.⁴⁶ Furthermore, mouse treated with VEGF at concentrations similar

to those observed in cancer patients presented thymic atrophy by a dramatic reduction in DP thymocytes without apoptosis induction, suggesting that VEGF could modulate thymocyte development.⁴⁷

VEGF and SEMAs bind to specific sites of NPs, and a functional competition between these two molecules seems to regulate NP signaling events.^{26,27} For example, SEMA3A inhibits the migration of breast cancer cell lines through NP1/plexin-A1 interactions, but this activity is antagonized by VEGF, suggesting that the ratio of endogenous VEGF and SEMA3A concentrations in carcinoma cells determines their chemotactic rate.⁴⁸

Taking into account that VEGF and SEMA as well as their receptors are expressed in the thymus and considering the altered expression of VEGF in some types of thymomas, it is also possible that NPs and SEMAs play a role in thymic pathologic processes.

Concluding Remarks

The data discussed above reinforce the notion that thymocyte migration is a complex event, comprising multiple combined molecular interactions that lead to chemoattraction or repulsion involving various molecules, such as ECM molecules, hormones, chemokines, and the recently proposed NPs/SEMAs. As a result of all stimuli together, in a concept that we call multivectorial migration (Fig. 2), thymocytes will respond by migrating to a given direction with a given velocity. The resulting migration vector can change, depending on the concentration and combination of stimuli in each thymic region as well as the thymocyte capacity to respond via their specific receptors. In this context, SEMA3A/NP1 interactions are additional players in thymocyte migration. Accordingly, natural pathological changes in this particular molecular interaction may have consequences on the whole process of thymocyte migration. This is an exciting field that is completely open for further investigation.

Acknowledgments

This work was developed in the context of the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)-Fiocruz Associated Laboratory of Immunology and Immunopathology. It was partially funded with grants by CNRS/Fiocruz French/Brazilian conjoint program, CNRS, The Foundation for Medical Research, The National League against Cancer, The National Cancer Institute (France); and Fiocruz (Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Brazil), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Brazil).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Savino, W. & M. Dardenne. 2000. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr. Rev.* **21**: 412–443.
2. Giofani, M. & J.C. Zuniga-Pflucker. 2007. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**: 463–493.
3. Petrie, H.T. & J.C. Zuniga-Pflucker. 2007. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu. Rev. Immunol.* **25**: 649–679.
4. Anderson, G. *et al.* 1997. Fibroblast dependency during early thymocyte development maps to the CD25+ CD44+ stage and involves interactions with fibroblast matrix molecules. *Eur. J. Immunol.* **27**: 1200–1206.
5. Surh, C.D. & J. Sprent. 1994. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* **372**: 100–103.
- 6a. de Waal Malefijt, R. *et al.* 1986. T-cell differentiation within thymic nurse cells. *Lab Invest.* **55**: 25–34.
6. Villa-Verde, D.M. *et al.* 1995. The thymic nurse cell complex: an in vitro model for extracellular matrix-mediated intrathymic T cell migration. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **28**: 907–912.
7. Annunziato, F. *et al.* 2001. Chemokines and lymphopoiesis in human thymus. *Trends Immunol.* **22**: 277–281.

8. Savino, W. *et al.* 2002. Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends Immunol.* **23**: 305–313.
9. Savino, W. *et al.* 2004. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J. Leukoc. Biol.* **75**: 951–961.
10. Silva, A.B., D. Aw & D.B. Palmer. 2006. Evolutionary conservation of neuropeptide expression in the thymus of different species. *Immunology* **118**: 131–140.
11. Medina, S. *et al.* 1998. Changes with ageing in the modulation of murine lymphocyte chemotaxis by CCK-8S, GRP and NPY. *Mech. Ageing Dev.* **102**: 249–261.
12. Pasquale, E.B. 2008. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* **133**: 38–52.
13. Alfaro, D. *et al.* 2007. EphrinB1-EphB signaling regulates thymocyte-epithelium interactions involved in functional T cell development. *Eur. J. Immunol.* **37**: 2596–2605.
14. Munoz, J.J. *et al.* 2006. Thymic alterations in EphA4-deficient mice. *J. Immunol.* **177**: 804–813.
15. Sharfe, N. *et al.* 2002. Ephrin stimulation modulates T cell chemotaxis. *Eur. J. Immunol.* **32**: 3745–3755.
16. Jouvin-Marche, E. *et al.* 2006. Overexpression of cellular prion protein induces an antioxidant environment altering T cell development in the thymus. *J. Immunol.* **176**: 3490–3497.
17. Terra-Granado, E. *et al.* 2007. Is there a role for cellular prion protein in intrathymic T cell differentiation and migration? *Neuroimmunomodulation* **14**: 213–219.
18. Campbell, D.J., C.H. Kim & E.C. Butcher. 2003. Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunol. Rev.* **195**: 58–71.
19. Campbell, J.J., J. Pan & E.C. Butcher. 1999. Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J. Immunol.* **163**: 2353–2357.
20. Crisa, L. *et al.* 1996. 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**: 215–228.
21. Vivinus-Nebot, M. *et al.* 2004. Mature human thymocytes migrate on laminin-5 with activation of metalloproteinase-14 and cleavage of CD44. *J. Immunol.* **172**: 1397–1406.
22. Yanagawa, Y., K. Iwabuchi & K. Onoe. 2001. Enhancement of stromal cell-derived factor-1 α -induced chemotaxis for CD4/8 double-positive thymocytes by fibronectin and laminin in mice. *Immunology* **104**: 43–49.
23. Lepelletier, Y. *et al.* 2007. Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 5545–5550.
24. de Wit, J. & J. Verhaagen. 2003. Role of semaphorins in the adult nervous system. *Prog. Neurobiol.* **71**: 249–267.
25. Kruger, R.P., J. Aurandt & K.L. Guan. 2005. Semaphorins command cells to move. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 789–800.
26. Geretti, E., A. Shimizu & M. Klagsbrun. 2008. Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. *Angiogenesis* **11**: 31–39.
27. Neufeld, G. *et al.* 2002. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* **12**: 13–19.
28. Otrrock, Z.K., J.A. Makarem & A.I. Shamseddine. 2007. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol. Dis.* **38**: 258–268.
29. Castellani, V. & G. Rougon. 2002. Control of semaphorin signaling. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**: 532–541.
30. Corbel, C. *et al.* 2007. Neuropilin 1 and CD25 coregulation during early murine thymic differentiation. *Dev. Comp. Immunol.* **31**: 1082–1094.
31. Takahashi, K. *et al.* 2008. Expression of the semaphorins Sema 3D and Sema 3F in the developing parathyroid and thymus. *Dev. Dyn.* **237**: 1699–1708.
32. Bruder, D. *et al.* 2004. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* **34**: 623–630.
33. Odaka, C. *et al.* 2006. Distribution of lymphatic vessels in mouse thymus: immunofluorescence analysis. *Cell Tissue Res.* **325**: 13–22.
34. Yuan, L. *et al.* 2002. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* **129**: 4797–806.
35. Gu, C. *et al.* 2005. Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins. *Science* **307**: 265–268.
36. Takegahara, N. *et al.* 2006. Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat. Cell Biol.* **8**: 615–622.
37. Furuyama, T. *et al.* 1996. Identification of a novel transmembrane semaphorin expressed on lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **271**: 33376–33381.
38. Delaire, S. *et al.* 2001. Biological activity of soluble CD100. II. Soluble CD100, similarly to H-SemaIII, inhibits immune cell migration. *J. Immunol.* **166**: 4348–4354.
39. Suzuki, K. *et al.* 2007. Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through α 1 β 1 integrin. *Nature* **446**: 680–684.
40. Holmes, S. *et al.* 2002. Sema7A is a potent monocyte stimulator. *Scand. J. Immunol.* **56**: 270–275.

41. Vincent, P. *et al.* 2005. A role for the neuronal protein collapsin response mediator protein 2 in T lymphocyte polarization and migration. *J. Immunol.* **175**: 7650–7660.
42. Mine, T. *et al.* 2000. CDw103 expression during T-cell development. *Tissue Antigens* **55**: 429–436.
43. Walzer, T. *et al.* 2005. 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.* **174**: 51–59.
44. Ellis, L.M. 2006. The role of neuropilins in cancer. *Mol. Cancer Ther.* **5**: 1099–1107.
45. Neufeld, G. & O. Kessler. 2008. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **8**: 632–645.
46. Cimpean, A.M. *et al.* 2008. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor A (VEGF), and its receptors (VEGFR1, 2) in normal and pathologic conditions of the human thymus. *Anat.* **190**: 238–245.
47. Ohm, J.E. *et al.* 2003. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood* **101**: 4878–4886.
48. Bachelder, R.E. *et al.* 2003. Competing autocrine pathways involving alternative neuropilin-1 ligands regulate chemotaxis of carcinoma cells. *Cancer Res.* **63**: 5230–5233.
49. Mendes-da-Cruz, D.A. *et al.* 2008. Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. *J. Immunol.* **180**: 4639–4647.

Annexe 3 : “IL-17-producing invariant NKT cells in lymphoid organs are recent thymic emigrants identified by neuropilin-1 expression”

IL-17-producing invariant NKT cells in lymphoid organs are recent thymic emigrants identified by neuropilin-1 expression

Pierre Milpied^{}, Amédée Renand^{*}, Séverine Diem^{*}, André Herbelin^{*,1}, Maria Leite-de-Moraes^{*}, Marie-Thérèse Rubio^{*} and Olivier Hermine^{*,2}.*

^{*} CNRS UMR 8147, Université Paris Descartes, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker – Enfants Malades, 75015 Paris, France.

Corresponding author: Prof. Olivier Hermine; Phone: +33 1 44 49 53 86; Fax: +33 1 44 49 06 76; E-mail: ohermine@gmail.com.

Running title: Neuropilin-1-expressing iNKT cells

Abstract

Invariant natural killer T (iNKT) cells are T lymphocytes with a restricted T cell antigen receptor repertoire that specifically recognizes glycolipid antigens. Upon activation, iNKT cells rapidly produce diverse cytokines like IFN- γ , IL-4, IL-13 or IL-17, and act as innate initiators of immune responses. Despite increasing knowledge on the mechanisms involved in thymic development of iNKT cells, the functional properties of recently exported iNKT cells remain largely unexplored, principally because of a lack of *bona fide* markers to distinguish recent thymic emigrant (RTE) from long-lived immature-like iNKT cells. We identified a subset of iNKT cells expressing the murine regulatory T cell marker neuropilin-1 (Nrp-1). Nrp-1⁺ iNKT cells had an immature phenotype and displayed enhanced proliferative properties *in vivo*. Using intrathymic FITC injection and adult thymectomy, we showed that the Nrp-1⁺ subset corresponded to RTE iNKT cells. Multiple intracellular cytokine staining after *in vivo* challenge revealed that, in sharp contrast with mature Nrp-1⁻ iNKT cells, up to 80% of Nrp-1⁺ RTE iNKT cells failed to simultaneously produce IFN- γ , IL-4 and IL-13. Remarkably, the pro-inflammatory cytokine IL-17 was exclusively produced by Nrp-1⁺ RTE iNKT cells in lymphoid organs. Collectively, our results describe a new accurate marker for RTE iNKT cells allowing the functional analysis of these cells *in vivo*, and shed light on the homeostatic requirements of IL-17-producing iNKT cells.

Introduction

Invariant natural killer T (iNKT) cells are T lymphocytes expressing a semi-invariant TCR which recognizes endogenous and exogenous glycolipid antigens presented by the MHC class I-like molecule CD1d (1). Most iNKT cells are characterized by an activated memory phenotype (CD44^{high}, CD69⁺), the expression of NK cell markers (CD122, NK1.1), and the rapid secretion of both type 1 (IFN- γ) and type 2 (IL-4, IL-13) cytokines after TCR stimulation (2). Invariant NKT cells develop in the thymus where double positive (DP) thymocytes expressing the canonical V α 14J α 18 TCR rearrangement are positively selected by CD1d-expressing DP cells (3-5). Selected iNKT cells undergo several steps of maturation characterized by distinct phenotypes and functions: stage 1 (NK1.1⁻ CD44^{low}) and stage 2 (NK1.1⁻ CD44^{high}) iNKT cells proliferate intensely and secrete mostly type 2 cytokines whereas stage 3 (NK1.1⁺ CD44^{high}) iNKT cells are resting, secrete both type 1 and type 2 cytokines, and are long-term thymus residents (6, 7). Thymic export of iNKT cells to the periphery occurs at stage 2 and most of the exported cells quickly mature into NK1.1⁺ iNKT cells (6). However, some iNKT cells remain NK1.1⁻ long after thymic export (8). The peripheral iNKT cell pool thus consists of NK1.1⁺ and NK1.1⁻ cells with different cytokine profiles: NK1.1⁺ iNKT cells produce large amounts of both type 1 and type 2 cytokines, whereas NK1.1⁻ iNKT cells produce more type 2 than type 1 cytokines and comprise a subset of IL-17-producing cells (9, 10). Because the absence of the NK1.1 marker is not sufficient to discriminate recent thymic emigrant (RTE) from long-lived NK1.1⁻ iNKT cells, there is no clear data on the functional properties of RTE iNKT cells. Notably, whether IL-17-producing iNKT cells are part of the RTE or of the long-lived NK1.1⁻ iNKT cells subsets has not been addressed directly.

Neuropilin-1 (Nrp-1) is a transmembrane receptor for class 3 semaphorins (11) and vascular endothelium growth factor isoforms (12). Nrp-1 is expressed in a wide range of tissues and mediates diverse cellular functions such as migration, adhesion, proliferation, and apoptosis (13, 14). In the mouse immune system, Nrp-1 is a marker of Foxp3⁺ regulatory T (Treg) cells (15) and participates in their suppressive functions through homotypic interactions with Nrp-1 at the surface of DC (16). Nrp-1 is also expressed on immature thymocytes but its function in this setting has not been clearly identified (17). The expression of Nrp-1 in other murine T cell subsets has not been investigated to date.

Here we report that Nrp-1 expression characterizes RTE iNKT cells and use the Nrp-1 marker to discriminate and functionally analyze RTE iNKT cells. We describe that most Nrp-1⁺ RTE iNKT cells fail to simultaneously produce IFN- γ , IL-4 and IL-13, and show that the size of the peripheral lymphoid pool of IL-17-producing iNKT cells, which express Nrp-1, is maintained by continuous thymic export.

Materials and methods

Mice

C57BL/6 mice were purchased from Janvier (Le-Genest-Saint-Isle, France). Mice were kept in specific pathogen-free conditions at our animal facility, and experimental studies were performed in accordance with the French Institutional Committee.

Cell preparation

Single cell suspensions of spleen, thymus and peripheral lymph nodes (pLN: pooled inguinal, brachial and axillary lymph nodes) were obtained by mechanical disruption and passing through a 40 μ m cell strainer. Red blood cells were removed from spleen cell suspensions by hypotonic shock with ammonium chloride buffer. Viable cells were counted on a hemacytometer using Trypan Blue exclusion, and the absolute numbers of lymphocyte subsets were calculated after FACS analysis.

Flow cytometry

Cell surface staining was performed in PBS buffer containing 2% (v/v) FCS and 0.01% (w/v) NaN_3 on ice (FACS buffer). For intracellular cytokine staining, surface-labeled cells were fixed for 5 minutes in 4% (w/v) paraformaldehyde (in PBS) at room temperature, and stained for 30 minutes at room temperature in FACS buffer supplemented with 0.5% (w/v) saponin (Sigma-Aldrich). Nuclear Ki67 staining was done using the fixation and permeabilization reagents from a Foxp3 staining kit (eBioscience) following the manufacturer's instructions. BrdU incorporation was analyzed using the BrdU flow kit from BD Biosciences following the manufacturer's instructions.

Prior to cell surface staining, surface Fc receptors were saturated by incubation with ascite-purified antibody to CD16/CD32 (2.4G2) for 10 minutes on ice. AlexaFluor 488 anti-Ki67 (B56), Pacific Blue anti-CD3 ϵ (500A2), PerCP and Pacific Blue anti-CD4 (RM4-5), FITC and PerCP-Cy5.5 anti-CD69 (H1.2F3), PE anti-NK1.1 (PK136), PerCP-Cy5.5 anti-CD19 (6D5), FITC anti-TCR β (H57-597), PE anti-CD122 (TM- β 1), PE anti-CD24 (M1/69), purchased from BD Biosciences, and Pacific Blue anti-IFN- γ (XMG1.2), PE-Cy7 anti-IL-4 (BVD6-24G2), PE anti-IL-13 (eBio 13A), PE anti-IL-17 (eBio 17B7), PerCP-Cy5.5 anti-

NK1.1 (PK136), allophycocyanin (APC)-AlexaFluor 750 anti-TCR β (H57-597), purchased from eBioscience. The empty and PBS57-loaded APC- and PE-labeled mouse CD1d tetramers were obtained from the NIH Tetramer Core Facility. The following antibodies were used for Nrp-1 expression analysis: polyclonal goat anti-rat Nrp-1 (AF566, R&D Systems), FITC, PE, and PE-Cy7 donkey anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology), and AlexaFluor 647 donkey anti-goat IgG (Invitrogen).

Data were acquired on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) using FACSDiva software (BD Biosciences) and were analyzed with the FlowJo software (Treestar). FACS data are displayed as 5% contour dot plots showing outliers, or histogram overlays with “% of max” scaling.

iNKT cell enrichment and cell sorting

When indicated, cell suspensions were enriched in iNKT cells by depletion using antibodies directed against CD8 α (53-6.7), CD62L (MEL-14) and CD19 (6D5), all purchased from Biolegend, and magnetic beads coupled to anti-rat IgG antibodies, purchased either from Invitrogen or from Ademtech, following the manufacturer’s instructions.

For cell sorting, iNKT cell-enriched spleen cell suspensions were stained with PE CD1d Tet, FITC anti-TCR β , and anti-Nrp-1 followed by AlexaFluor 647 anti-goat IgG. Cells were then sorted on a FACS Aria (BD Biosciences) cell sorter.

BrdU treatment

Mice were injected i.p. with 2 mg BrdU (Sigma-Aldrich) in 200 μ l PBS and were then given BrdU for the following five days in their drinking water (0.8 mg/ml) before sacrifice and analysis.

Cell culture and in vitro activation of iNKT cells

Total spleen cells (50×10^6 cells/ml) were labeled with 5 μ M CFSE (Sigma-Aldrich) in PBS for 10 minutes at 37°C, and rinsed twice with cold PBS + 2% FCS. CFSE-labeled splenocytes (2×10^6 cells/ml/well) were then cultured for 3 days in 24-well plates in

lymphocyte culture medium (RPMI 1640 + 10% (v/v) FCS + 10 mM HEPES + 50 μ M 2-ME + 2 mM L-glutamin + 100 U/ml penicillin + 100 μ g/ml streptomycin). Recombinant human IL-7 and IL-15 (R&D Systems) were used at 20 ng/ml. α -GalCer (Alexis Biochemicals) was used at 100 ng/ml.

FACS-sorted iNKT cells (20,000) were cultured in 200 μ l lymphocyte culture medium in U-bottom 96-well plates. Nrp-1⁻ iNKT cells were activated by anti-CD3 ϵ (clone 145-2C11, generous gift of J. Diana, INSERM U561, Paris) and anti-CD28 (clone 37.51, Biolegend) antibodies that had been previously coated at 5 μ g/ml in 50 μ l PBS for 2 hours at 37°C.

In some experiments, iNKT-enriched cell suspensions (500,000 cells/well in 200 μ l) were cultured in U-bottom 96-well plates in lymphocyte culture medium supplemented with 10 nM PMA, 1 μ M ionomycin and 5 μ g/ml brefeldin A (all from Sigma-Aldrich) for 3 hours. Cells were then recovered and washed once in PBS + 2% FCS before staining.

All cell cultures were done at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

In vivo activation of iNKT cells

For long term activation of iNKT cells, mice were injected i.p. with 2 μ g α -GalCer in 200 μ l PBS. For short term activation of iNKT cells and intracellular cytokine staining, mice were injected i.p. with 250 μ g brefeldin A in 200 μ l PBS (unless otherwise stated), followed 30 minutes later by i.p. injection of 2 μ g α -GalCer in 200 μ l PBS. Mice were sacrificed after 2 hours for spleen cell recovery and analysis.

Intrathymic FITC injection

Five week-old mice were deeply anesthetized by i.p. injection of a mixture of ketamine (10 mg/kg) and xylazine (1 mg/kg) in 200 μ l PBS. The shaved skin above the rib cage was cut open with fine scissors and the rib cage was opened by a 5 mm-long incision of the sternum to gain access to the thymus. Both thymic lobes were injected with 10 μ l of a 2 mg/ml FITC (Sigma-Aldrich) solution in PBS. The wound was closed by sewing the two flaps of skin together with 2-3 suture points, and the animals were left to recover on their flanks in a heated cage. Control animals were left untreated.

Adult mouse thymectomy

Eight week-old mice were deeply anesthetized and their rib cage was opened as described above. The two thymic lobes were then carefully removed with an aspirator. The wound was closed and the animals were left to recover. Control (sham-thymectomized) animals were anesthetized and had their rib cage opened. After four weeks, the animals were sacrificed for analysis. At that point, the completeness of thymectomy was checked and mice with thymus remnants were excluded from the study.

Statistical analyses

Data were expressed as mean \pm SEM and were compared with the statistical test indicated in the figure legend using Prism 5.0 software (Graphpad). A p-value inferior to 0.05 was considered significant.

Results

Characterization of an immature phenotype proliferating Nrp-1⁺ iNKT cell subset in the spleen

Most of the work concerning Nrp-1 in the murine immune system has focused on Foxp3⁺ Treg cells because they express high levels of surface Nrp-1. Our analyses of mouse lymphocytes however revealed that some Foxp3⁻ T cells also express Nrp-1. We therefore chose to investigate whether Nrp-1 could also be expressed by iNKT cells.

We used CD1d tetramers loaded with the α -galactosylceramide (α -GalCer) analog PBS57 (CD1d Tet) to analyze the expression of Nrp-1 in iNKT cells of C57BL/6 mice. In the spleen, a subset of iNKT cells, representing 10-15% of total iNKT cells, expressed Nrp-1 at levels similar to Treg cells (Fig. 1A). Splenic Nrp-1⁺ iNKT cells had an immature phenotype since they were CD69⁻ and had lower NK1.1 and CD122 expression (Fig. 1B) than Nrp-1⁻ iNKT cells. During our FACS experiments, we noticed that Nrp-1⁺ iNKT cells were larger (increased forward light scatter) than Nrp-1⁻ iNKT cells. Increased cell size is often associated with lymphocyte proliferation, which can be assessed by the intranuclear expression of the Ki67 marker. In the spleen, the Nrp-1⁺ iNKT cell subset included a high percentage of Ki67⁺ cells (Fig. 1C). BrdU incorporation experiments confirmed that Nrp-1⁺ iNKT cells were proliferating more than their Nrp-1⁻ counterparts *in vivo* (Fig. 1D).

TCR activation of iNKT cells induces Nrp-1 expression

TCR activation with agonist glycolipids induces iNKT cell proliferative expansion *in vivo* and *in vitro* (18). Yet, homeostatic proliferation of iNKT cells *in vivo* is dependent on the cytokines IL-7 and IL-15 and does not require TCR engagement (19). To explore the events leading to Nrp-1 expression on splenic proliferating iNKT cells, we used various stimuli to activate iNKT cells and analyzed Nrp-1 expression. *In vitro*, IL-7, IL-15 and α -GalCer induced the proliferation of iNKT cells (Fig. 2A, left column), but only cultures treated with α -GalCer showed Nrp-1 expression on blastic iNKT cells (Fig. 2A, right column). Activation of sorted splenic Nrp-1⁻ iNKT cells with anti-CD3 ϵ and anti-CD28 induced Nrp-1 expression in a time-dependent manner (Fig. 2B), indicating that TCR activation of iNKT cells can induce Nrp-1 *de novo* expression. *In vivo* TCR activation resulted in the massive and durable expression of Nrp-1 on iNKT cells since 3 and 7 days after α -GalCer challenge, the Nrp-1⁺

CD69⁺ phenotype was expressed by 89.5 % and 63 % of splenic iNKT cells, respectively (Fig. 2C).

Thus, Nrp-1 expression on the subset of proliferating iNKT cells described in naive mice is likely due to previous TCR activation.

Nrp-1 is expressed by recent thymic emigrant iNKT cells

TCR activation of CD24⁺ thymocytes bearing the characteristic V α 14J α 18 TCR rearrangement by CD1d-expressing cortical DP thymocytes is the initial event leading to iNKT cells expansion and development (2, 20). In the thymus, Nrp-1 was highly expressed on CD24⁺ CD1d Tet⁺ thymocytes and on stage 1 and 2 thymic iNKT cells, but only dimly expressed on stage 3 iNKT cells (Fig. 3A and 3B), indicating that Nrp-1 expression in thymic iNKT cells is associated with TCR-induced proliferation.

Invariant NKT cells emigrating from the thymus mostly bear the stage 2 phenotype and complete their maturation in the periphery (6). To evaluate the contribution of thymic export to the splenic Nrp-1⁺ iNKT cell pool, we labeled thymocytes *in situ* with FITC and analyzed FITC⁺ iNKT cells in the spleen shortly after. After 36 hours, RTE iNKT cells were detected in the spleen and the vast majority of them expressed Nrp-1 (Fig. 3C and 3D). Given the percentage of randomly labeled thymocytes (30% in average) and the relative proportion of FITC⁺ cells in splenic Nrp-1⁺ iNKT cells 36h after intrathymic FITC injection (10% in average), we evaluated that the Nrp-1⁺ iNKT cell pool would be entirely renewed by thymic emigrants every 5 days. These data show that Nrp-1 is expressed by most RTE iNKT cells, and suggest that Nrp-1 expression on peripheral iNKT cells is transitory after export from the thymus, and that the Nrp-1⁺ iNKT cell pool is maintained by continuous thymic output.

Nrp-1⁺ iNKT cells display an altered type 1 and type 2 cytokines production profile

The innate effector properties of iNKT cells rely on their ability to rapidly and massively produce both type 1 (IFN- γ) and type 2 (IL-4, IL-13) cytokines after antigen encounter. We used intracellular cytokine staining to evaluate the simultaneous production of these cytokines by splenic Nrp-1⁺ and Nrp-1⁻ iNKT cells after *in vivo* α -GalCer challenge. Taking each cytokine individually, Nrp-1⁺ iNKT cells contained less IFN- γ , IL-4 and IL-13

producers than Nrp-1⁻, with the sharpest reduction observed for IFN- γ (Fig. 4A). Next we used a gating strategy that allowed us to quantify the percentage of Nrp-1⁻ and Nrp-1⁺ iNKT cells producing any combination of the three cytokines (Fig. 4B). Nrp-1⁻ iNKT cells had the expected profile, with the majority of cells producing IFN- γ , IL-4 and IL-13 simultaneously and a high proportion producing IFN- γ and IL-4, but not IL-13 (Fig. 4C, left). Nrp-1⁺ iNKT cells displayed a different profile: less than 20% were triple producers, and about half of Nrp-1⁺ iNKT cells failed to produce any of these cytokines (Fig. 4C, right). The absence of IFN- γ , IL-4 and IL-13 production by a relative majority of Nrp-1⁺ iNKT cells was not due to a default in antigen sensing or to a lack of activation since CD69 was upregulated in both Nrp-1⁻ and Nrp-1⁺ iNKT cell subsets shortly after α -GalCer injection (Fig. S1).

Nrp-1 is expressed by IL-17 producing iNKT cells

We have recently identified a subset of NK1.1⁻ iNKT cells specialized in the production of the pro-inflammatory cytokine IL-17 after activation (10). Noteworthy, IL-17-producing iNKT cells do not produce IFN- γ and IL-4 after stimulation. After *in vivo* challenge with α -GalCer, a small subset of splenic iNKT cells produced IL-17 but not IFN- γ (Fig. 5A), consistent with our previous findings. In contrast with IFN- γ -producing iNKT cells that were mostly Nrp-1⁻, IL-17-producing splenic iNKT cells expressed Nrp-1 (Fig. 5A and 5B). IL-17-producing iNKT cells derive from an alternative thymic differentiation pathway (21) and are particularly abundant in peripheral lymph nodes (pLN) (22). *In vitro* stimulation of thymic iNKT cells with PMA and ionomycin similarly induced IL-17 production by a small subset of iNKT cells that expressed high levels of Nrp-1 (Fig. 5C and 5D). Nrp-1⁺ iNKT cells were abundant in pLN where they accounted for 42 \pm 2% of total iNKT cells (grey histogram in Fig. 5E and data not shown). Likewise, IL-17-producing, but not IFN- γ -producing iNKT cells in pLN also expressed Nrp-1 (Fig. 5E and 5F), indicating that Nrp-1 is a characteristic marker of the IL-17-producing iNKT cell subset in lymphoid organs.

Adult thymectomy depletes Nrp-1⁺ and IL-17 producing iNKT cells

IL-17-producing iNKT cells have been extensively described in the peripheral lymphoid organs and tissues of young adult mice (9, 10, 21-26) but the contribution of thymic

output to the homeostatic requirements of these cells has not been rigorously investigated. In mice, most of the thymic export of iNKT cells occurs in the first few weeks after birth and the percentage of iNKT cells among peripheral lymphocytes is considered to be stable after 7-8 weeks of life. We thymectomized mice at 8 weeks of age and prepared their spleen and pLN four weeks after surgery to quantitatively analyze the IL-17-producing and Nrp-1⁺ iNKT cell subsets. The percentages and absolute counts of total iNKT cells in the spleen were unaffected by thymectomy, but the Nrp-1⁺ CD69⁻ iNKT cell subset was almost completely absent from the spleens of thymectomized animals (Fig. 6A and 6B), consistent with the idea that the peripheral Nrp-1⁺ iNKT cell pool is maintained through continuous thymic output. We used *in vitro* activation of iNKT-enriched cell suspensions to assess the total number of iNKT cells capable of producing IL-17 in the spleens of control and thymectomized animals. The spleens of control animals contained approximately 6,000 IL-17-producing iNKT cells, whereas thymectomized mice contained less than 2,000 per spleen (Fig. 6C). In pLN, adult thymectomy caused a significant decrease in the numbers of total and Nrp-1⁺ iNKT cells (Fig. 6D), and IL-17 producing iNKT cells were equally affected (Fig. 6E). These experiments clearly establish that most Nrp-1⁺ and IL-17-producing iNKT cells in adult mice peripheral lymphoid organs are RTE.

Discussion

In this work, we have characterized a subset of iNKT cells expressing the murine Treg marker Nrp-1. Nrp-1⁺ iNKT cells, which bear an immature phenotype (CD69⁻, NK1.1^{low}, CD122^{low}) and are proliferating *in vivo*, are RTE that have acquired (or retained) Nrp-1 expression after positive selection-induced TCR activation in the thymus. We and others have reported Nrp-1 expression on activated human T cells (27) and immature proliferating murine thymocytes (17, 28) independently of Foxp3 expression. Thus Nrp-1 might be a general marker of TCR-activated T cells, and its presence on RTE iNKT cells, but not on naive and RTE conventional T cells (data not shown), likely reflects the unconventional selection and development processes of iNKT cells. The very early activation marker CD69 has already been described as an age-related maturation marker of splenic iNKT cells (29). It is therefore coherent that RTE iNKT cells in adult mice exhibit low CD69 expression. Because 3 days after α -GalCer injection splenic iNKT cells were mostly CD69⁻, it is tempting to speculate that low CD69 expression on RTE iNKT cells results from the intrathymic proliferation wave triggered by positive selection. The Nrp-1⁺ CD69⁻ characteristic phenotype of RTE iNKT cells may thus be imprinted by TCR activation-induced proliferation inside the thymus and rapidly changed into the classic Nrp-1⁻ CD69⁺ phenotype upon maturation in the periphery.

We have used simultaneous intracellular staining of IFN- γ , IL-4 and IL-13 after *in vivo* activation to evaluate the functional properties of Nrp-1⁺ RTE iNKT cells at the single cell level. In contrast to mature Nrp-1⁻ iNKT cells which produced both type 1 and type 2 cytokines, many Nrp-1⁺ iNKT cells failed to produce any of these cytokines. Gata-3 and T-bet, the two master transcription factors controlling type 2 and type 1 cytokines production, respectively, are also necessary for iNKT cell terminal maturation (29, 30). RTE iNKT cells might therefore not be fully equipped to produce both types of cytokines simultaneously. However those RTE iNKT cells that produced cytokines 2 hours after α -GalCer challenge showed a bias towards IL-4 and/or IL-13 production without IFN- γ concomitant expression. This observation, together with the increased proliferation of RTE iNKT cells, likely explain the strong type 2 cytokines bias previously reported in the culture supernatant of activated immature thymic iNKT cells (6, 9).

Our results also show that IL-17 producing iNKT cells, which express the RTE marker Nrp-1, are depleted from the spleen and pLN of adult mice one month after thymectomy. Thus continuous thymic export of Nrp-1⁺ iNKT cells crucially contributes to the size of the

IL-17-producing iNKT cell pool in lymphoid organs of adult mice. We have previously shown that IL-17-producing iNKT cells represent a distinct and definitive lineage of iNKT cells that cannot give rise to “classic” IL-4 and IFN- γ producers upon transfer into fetal thymic organ cultures (21). To explain the disappearance of IL-17-producing iNKT cells from lymphoid organs after thymectomy, we propose that IL-17-producing iNKT cells may only transitionally reside in peripheral lymphoid organs after thymic export, and preferentially survive in and home to tissues like the lungs (10) and the skin (22). Collectively, these results allow us to propose an updated diagram of phenotypic characteristics and functional properties of iNKT cells throughout their life from thymic development to final tissue residency (Fig. 7).

Nrp-1 has been shown to bind and activate latent TGF- β 1 (31), a cytokine crucially involved in several steps of iNKT cell development and maturation (32). Nrp-1 expression might increase the local concentration of active TGF- β 1 around developing iNKT cells and thus facilitate the development of these cells in an autocrine and paracrine manner. Increased sensitivity of Nrp-1⁺ iNKT cells to TGF- β 1 might also regulate the acquisition of specific tissue-homing receptors (e.g. CD103) on IL-17-producing iNKT cells, as suggested by Doisne *et al.* (22). Nrp-1 mediates long term interactions between Treg cells and immature dendritic cells through Nrp-1/Nrp-1 trans interactions (16). Recent *in vivo* imaging work has revealed the importance of cognate stable interactions between iNKT cells and subcapsular sinus macrophages for the initiation of immune responses to glycolipids in lymph nodes (33). Nrp-1, which is highly expressed by lymph node-resident iNKT cells and may be expressed by macrophages (34), might play a pro-adhesive role in this context. The possible roles played by Nrp-1 in iNKT cells development, trafficking and functions are currently under investigation.

In conclusion, based on the characteristic Nrp-1⁺ phenotype we have identified important functional features of RTE iNKT cells. Remarkably, IL-17-producing iNKT cells in lymphoid organs are Nrp-1⁺ and are depleted after thymectomy, thus implying that thymic output is a key homeostatic requirement of this pro-inflammatory iNKT cell subset. Together, these results provide the basis for a thorough analysis of the contribution of RTE iNKT cells in animal models of inflammation, infection and autoimmunity.

Acknowledgements

The authors wish to thank A.Lehuen for sharing unpublished data and helpful discussions; A.Napolitano and P.Dellabona for sharing unpublished data and helpful informations; J.Mégret and C.Garcia for cell sorting; M.McHeyzer-Williams for critically reviewing the manuscript. We thank the NIH Tetramer Core Facility for providing CD1d tetramer reagents.

References

1. Cerundolo, V., J. D. Silk, S. H. Masri, and M. Salio. 2009. Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies. *Nat Rev Immunol* 9:28-38.
2. Bendelac, A., P. B. Savage, and L. Teyton. 2007. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 25:297-336.
3. Bendelac, A. 1995. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J Exp Med* 182:2091-2096.
4. Gapin, L., J. L. Matsuda, C. D. Surh, and M. Kronenberg. 2001. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol* 2:971-978.
5. Wei, D. G., H. Lee, S. H. Park, L. Beaudoin, L. Teyton, A. Lehuen, and A. Bendelac. 2005. Expansion and long-range differentiation of the NKT cell lineage in mice expressing CD1d exclusively on cortical thymocytes. *J Exp Med* 202:239-248.
6. Benlagha, K., T. Kyin, A. Beavis, L. Teyton, and A. Bendelac. 2002. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* 296:553-555.
7. Berzins, S. P., F. W. McNab, C. M. Jones, M. J. Smyth, and D. I. Godfrey. 2006. Long-term retention of mature NK1.1+ NKT cells in the thymus. *J Immunol* 176:4059-4065.
8. McNab, F. W., D. G. Pellicci, K. Field, G. Besra, M. J. Smyth, D. I. Godfrey, and S. P. Berzins. 2007. Peripheral NK1.1- NKT cells are mature and functionally distinct from their thymic counterparts. *J Immunol* 179:6630-6637.
9. Coquet, J. M., S. Chakravarti, K. Kyparissoudis, F. W. McNab, L. A. Pitt, B. S. McKenzie, S. P. Berzins, M. J. Smyth, and D. I. Godfrey. 2008. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:11287-11292.

10. Michel, M. L., A. C. Keller, C. Paget, M. Fujio, F. Trottein, P. B. Savage, C. H. Wong, E. Schneider, M. Dy, and M. C. Leite-de-Moraes. 2007. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med* 204:995-1001.
11. Takahashi, T., A. Fournier, F. Nakamura, L. H. Wang, Y. Murakami, R. G. Kalb, H. Fujisawa, and S. M. Strittmatter. 1999. Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 99:59-69.
12. Soker, S., S. Takashima, H. Q. Miao, G. Neufeld, and M. Klagsbrun. 1998. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92:735-745.
13. Pellet-Many, C., P. Frankel, H. Jia, and I. Zachary. 2008. Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochem J* 411:211-226.
14. Zachary, I. C., P. Frankel, I. M. Evans, and C. Pellet-Many. 2009. The role of neuropilins in cell signalling. *Biochem Soc Trans* 37:1171-1178.
15. Bruder, D., M. Probst-Kepper, A. M. Westendorf, R. Geffers, S. Beissert, K. Loser, H. von Boehmer, J. Buer, and W. Hansen. 2004. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 34:623-630.
16. Sarris, M., K. G. Andersen, F. Randow, L. Mayr, and A. G. Betz. 2008. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 28:402-413.
17. Corbel, C., V. Lemarchandel, V. Thomas-Vaslin, A. S. Pelus, C. Agboton, and P. H. Romeo. 2007. Neuropilin 1 and CD25 co-regulation during early murine thymic differentiation. *Dev Comp Immunol* 31:1082-1094.
18. Wilson, M. T., C. Johansson, D. Olivares-Villagomez, A. K. Singh, A. K. Stanic, C. R. Wang, S. Joyce, M. J. Wick, and L. Van Kaer. 2003. The response of natural killer T

- cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10913-10918.
19. Matsuda, J. L., L. Gapin, S. Sidobre, W. C. Kieper, J. T. Tan, R. Ceredig, C. D. Surh, and M. Kronenberg. 2002. Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. *Nat Immunol* 3:966-974.
 20. Benlagha, K., D. G. Wei, J. Veiga, L. Teyton, and A. Bendelac. 2005. Characterization of the early stages of thymic NKT cell development. *J Exp Med* 202:485-492.
 21. Michel, M. L., D. Mendes-da-Cruz, A. C. Keller, M. Lochner, E. Schneider, M. Dy, G. Eberl, and M. C. Leite-de-Moraes. 2008. Critical role of ROR-gammat in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19845-19850.
 22. Doisne, J. M., C. Becourt, L. Amniai, N. Duarte, J. B. Le Luduec, G. Eberl, and K. Benlagha. 2009. Skin and peripheral lymph node invariant NKT cells are mainly retinoic acid receptor-related orphan receptor (gamma)t+ and respond preferentially under inflammatory conditions. *J Immunol* 183:2142-2149.
 23. Lee, K. A., M. H. Kang, Y. S. Lee, Y. J. Kim, D. H. Kim, H. J. Ko, and C. Y. Kang. 2008. A distinct subset of natural killer T cells produces IL-17, contributing to airway infiltration of neutrophils but not to airway hyperreactivity. *Cell Immunol* 251:50-55.
 24. Pichavant, M., S. Goya, E. H. Meyer, R. A. Johnston, H. Y. Kim, P. Matangkasombut, M. Zhu, Y. Iwakura, P. B. Savage, R. H. DeKruyff, S. A. Shore, and D. T. Umetsu. 2008. Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. *J Exp Med* 205:385-393.
 25. Rachitskaya, A. V., A. M. Hansen, R. Horai, Z. Li, R. Villasmil, D. Luger, R. B. Nussenblatt, and R. R. Caspi. 2008. Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-

- 23 receptor and ROR γ and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. *J Immunol* 180:5167-5171.
26. Yoshiga, Y., D. Goto, S. Segawa, Y. Ohnishi, I. Matsumoto, S. Ito, A. Tsutsumi, M. Taniguchi, and T. Sumida. 2008. Invariant NKT cells produce IL-17 through IL-23-dependent and -independent pathways with potential modulation of Th17 response in collagen-induced arthritis. *Int J Mol Med* 22:369-374.
27. Milpied, P., A. Renand, J. Bruneau, D. A. Mendes-da-Cruz, S. Jacquelin, V. Asnafi, M. T. Rubio, E. MacIntyre, Y. Lepelletier, and O. Hermine. 2009. Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3⁺ Treg. *Eur J Immunol* 39:1466-1471.
28. Yamamoto, T., S. Morita, R. Go, M. Obata, Y. Katsuragi, Y. Fujita, Y. Maeda, M. Yokoyama, Y. Aoyagi, H. Ichikawa, Y. Mishima, and R. Kominami. 2010. Clonally expanding thymocytes having lineage capability in gamma-ray-induced mouse atrophic thymus. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 77:235-243.
29. Kim, P. J., S. Y. Pai, M. Brigl, G. S. Besra, J. Gumperz, and I. C. Ho. 2006. GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells. *J Immunol* 177:6650-6659.
30. Townsend, M. J., A. S. Weinmann, J. L. Matsuda, R. Salomon, P. J. Farnham, C. A. Biron, L. Gapin, and L. H. Glimcher. 2004. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity* 20:477-494.
31. Glinka, Y., and G. J. Prud'homme. 2008. Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J Leukoc Biol* 84:302-310.
32. Doisne, J. M., L. Bartholin, K. P. Yan, C. N. Garcia, N. Duarte, J. B. Le Luduec, D. Vincent, F. Cyprian, B. Horvat, S. Martel, R. Rimokh, R. Losson, K. Benlagha, and J.

- C. Marie. 2009. iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling. *J Exp Med* 206:1365-1378.
33. Barral, P., P. Polzella, A. Bruckbauer, N. van Rooijen, G. S. Besra, V. Cerundolo, and F. D. Batista. 2010. CD169(+) macrophages present lipid antigens to mediate early activation of iNKT cells in lymph nodes. *Nat Immunol* 11:303-312.
34. Ji, J. D., K. H. Park-Min, and L. B. Ivashkiv. 2009. Expression and function of semaphorin 3A and its receptors in human monocyte-derived macrophages. *Hum Immunol* 70:211-217.

Footnotes

¹ Present address: INSERM UMR 935, Université Paris Sud XI, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Hôpital Paul Brousse, 94802 Villejuif, France.

² Correspondance address: Pr. Olivier Hermine, CNRS UMR 8147, Hôpital Necker – Enfants Malades, Bâtiment Sèvres Porte S2 5^{ème} étage, 149 rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

³ This work was supported in part by grants from Institut National du Cancer, Cancéropole Ile de France, Fondation de France, Association pour la Recherche sur le Cancer, fellowships from Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur and from Association pour la Recherche sur le Cancer (P.M.), and a fellowship from La Ligue contre le Cancer (A.R.).

⁴ Abbreviations used in that study: α -GalCer, α -galactosylceramide; DP, double positive; iNKT, invariant natural killer T; MFI, mean fluorescence intensity; Nrp-1, neuropilin-1; pLN, peripheral lymph nodes; RTE, recent thymic emigrant; Treg, regulatory T.

Figure legends

FIGURE 1. Phenotypic and proliferative characteristics of splenic Nrp-1⁺ iNKT cells. *A*, FACS analysis of splenic TCRβ⁺ CD1d Tet⁺ iNKT cells and TCRβ⁺ CD1d Tet⁻ conventional T cells showing Nrp-1 expression in a subset of iNKT cells and in a subset of CD4⁺ T cells. *B*, Histogram overlays showing CD69 (left), NK1.1 (middle) and CD122 (right) expression in splenic conventional T cells (dashed line), Nrp-1⁻ (grey histogram) and Nrp-1⁺ (black line) iNKT cells. *C*, Intranuclear expression of the proliferation-associated marker Ki67 in spleen Nrp-1⁻ (filled histogram) and Nrp-1⁺ (thick black line) iNKT cells. The percentage of Ki67⁺ cells in each subset is indicated ($n = 5$, ***: $p < 0.001$, paired student's t test). *D*, Mice were treated with BrdU and the percentage of cells with DNA-incorporated BrdU among spleen Nrp-1⁻ (filled histogram) and Nrp-1⁺ (thick black line) iNKT cells was determined by FACS ($n = 5$, ***: $p < 0.001$, paired student's t test).

FIGURE 2. Nrp-1 expression is induced on iNKT cells after TCR activation. *A*, Analysis of Nrp-1 expression on CD1d Tet⁺ cells after *in vitro* culture of CFSE-labeled spleen cells with IL-7, IL-15, or α-GalCer for 72 hours. These data are representative of two distinct experiments performed in duplicate wells. *B*, FACS-sorted spleen Nrp-1⁻ iNKT cells were activated with anti-CD3ε and anti-CD28, and Nrp-1 expression on activated iNKT cells was analyzed by FACS at 24 and 48 hours. Representative data of one out of three experiments are shown. *C*, Mice were injected i.p. with α-GalCer or control diluent, and CD69 and Nrp-1 expression on gated TCRβ⁺ CD1d Tet⁺ spleen iNKT cells was analyzed after 3 and 7 days. Representative data of one mouse out of two per time point in one out of two experiments are shown.

FIGURE 3. RTE iNKT cells express Nrp-1. *A*, Thymi from 5 week-old mice ($n = 3$) were analyzed by FACS to determine the expression of Nrp-1 in CD24⁺ CD1d Tet⁺ (CD24⁺, dotted line), CD24⁻ CD1d Tet⁺ CD44^{low} NK1.1⁻ (stage 1, straight line), CD24⁻ CD1d Tet⁺ CD44^{high} NK1.1⁻ (stage 2, dashed line), and CD24⁻ CD1d Tet⁺ CD44^{high} NK1.1⁺ (stage 3, thick black line) iNKT cells, compared to control isotype staining (full grey histogram). *B*, Nrp-1 relative mean fluorescence intensity (MFI) (relative to control isotype staining) in the different thymic stages of iNKT cell development. *C* and *D*, Five week-old mice were intrathymically injected with FITC, and their spleens were recovered after 36 hours. Splenocytes were enriched in iNKT cells and Nrp-1 expression was analyzed in iNKT cells by FACS. *C*, Representative analysis of Nrp-1 and FITC expression in splenic CD1d Tet⁺ iNKT cells. *D*, Nrp-1 expression by FITC⁻ and FITC⁺ splenic iNKT cells from treated animals ($n = 3$, **: $p < 0.01$, student's paired t test). This experiment was performed twice with similar results.

FIGURE 4. Type 1 and type 2 cytokines production profiles of splenic Nrp-1⁻ and Nrp-1⁺ iNKT cells. Mice were injected i.p. with brefeldin A then α -GalCer or control diluent, and sacrificed 2 hours after the last injection. IFN- γ , IL-4 and IL-13 production was analyzed in Nrp-1⁻ and Nrp-1⁺ iNKT cells by intracellular cytokine staining of total spleen cells. *A*, IFN- γ (left), IL-4 (middle) and IL-13 (right) production in activated Nrp-1⁻ (full grey histogram) and Nrp-1⁺ (black line) iNKT cells compared to control iNKT cells (dashed line). *B*, Gating strategy used for the simultaneous analysis of IFN- γ , IL-4 and IL-13 production in Nrp-1⁻ and Nrp-1⁺ iNKT cells. Splenic iNKT cells were identified as CD1d Tet⁺ CD19⁻, and split into the Nrp-1⁻ and Nrp-1⁺ subsets. Each subset was then further subdivided into IFN- γ producers and non-producers; finally IL-4 and IL-13 production was analyzed in each subgroup. The thresholds for intracellular cytokines detection were set according to the fluorescence

intensities observed for splenic iNKT cells of control mice (bottom dot plots). *C*, Pie charts representing the mean percentages of cells producing the 8 possible combinations of IFN- γ , IL-4 and IL-13 among gated Nrp-1⁻ (left) and Nrp-1⁺ (right) splenic iNKT cells. For both subsets, the mean \pm SEM percentage of cells expressing each combination is indicated. Data were compared with a paired student's t test and the p-value summary is indicated for each combination (***: p<0.001, **: p<0.01, *: p<0.05, NS: not significant, *n* = 4, pooled data from two distinct experiments).

FIGURE 5. IL-17 producing iNKT cells express Nrp-1. *A* and *B*, Mice were treated as in Fig. 4 and iNKT-enriched spleen cell suspensions were prepared for FACS analysis of IFN- γ and IL-17 production in CD1d Tet⁺ iNKT cells. *A*, Dot plot analysis of IFN- γ and IL-17 expression by splenic iNKT cells of control- or α -GalCer-treated mice, and histogram overlay analysis of Nrp-1 expression in total (full grey histogram), IFN- γ ⁺ (dashed line) and IL-17⁺ (black line) iNKT cells. *B*, Nrp-1 relative MFI of total, IFN- γ ⁺ and IL-17⁺ splenic iNKT cells (*: p<0.05, ***: p<0.001, paired student's t test, *n* = 4, pooled data from two distinct experiments). *C*, *D*, *E* and *F*, Thymi and pLN from three 8 week-old mice were pooled and enriched in iNKT cells. Enriched cells were activated *in vitro* with PMA and ionomycin in the presence of brefeldin A and prepared for FACS analysis of IFN- γ and IL-17 production in CD1d Tet⁺ iNKT cells. *C* and *E*, Dot plot analyses of IFN- γ and IL-17 expression by thymic (*C*) and pLN (*E*) iNKT cells in control conditions (culture medium) and after activation (PMA/ionomycin), and histogram overlay analysis of Nrp-1 expression in total (full grey histogram), IFN- γ ⁺ (dashed line) and IL-17⁺ (black line) iNKT cells. *D* and *F*, Nrp-1 relative MFI of total, IFN- γ ⁺ and IL-17⁺ thymic (*D*) and pLN (*F*) iNKT cells (*: p<0.05, NS: not significant, paired student's t test, pooled data from three distinct experiments).

FIGURE 6. Adult thymectomy depletes Nrp-1⁺ and IL-17-producing iNKT cells. Eight week-old mice were thymectomized (Tx) or sham-thymectomized (sTx) and sacrificed four weeks later for analysis. *A*, Representative FACS analysis of Nrp-1 and CD69 expression in splenic CD1d Tet⁺ CD19⁻ iNKT cells of sTx and Tx mice. *B* and *D*, Absolute numbers of total iNKT cells, Nrp-1⁺ and Nrp-1⁻ iNKT cells in the spleen (*B*) and pLN (*D*) of sTx (light grey) and Tx (dark grey) mice. *C* and *E*, Absolute numbers of IL-17 producing iNKT cells in the spleen (*C*) and pLN (*E*) of sTx (light grey) and Tx (dark grey) mice, assessed by intracellular cytokine staining of *in vitro* activated iNKT-enriched cell suspensions. Data were compared using unpaired student's t test (NS: not significant, **: p<0.01, *n* = 4 for sTx vs *n* = 5 for Tx, pooled data from two distinct experiments).

FIGURE 7. Schematic view of phenotypic markers and cytokine production profiles of immature thymic, RTE and long-lived resident iNKT cells. As iNKT cells develop inside the thymus, emigrate from the thymus, mature and home to their final residency, they express different characteristic combinations of the CD44, NK1.1 and Nrp-1 markers, and have diverse abilities for cytokine secretion upon activation.

FIGURE 1.

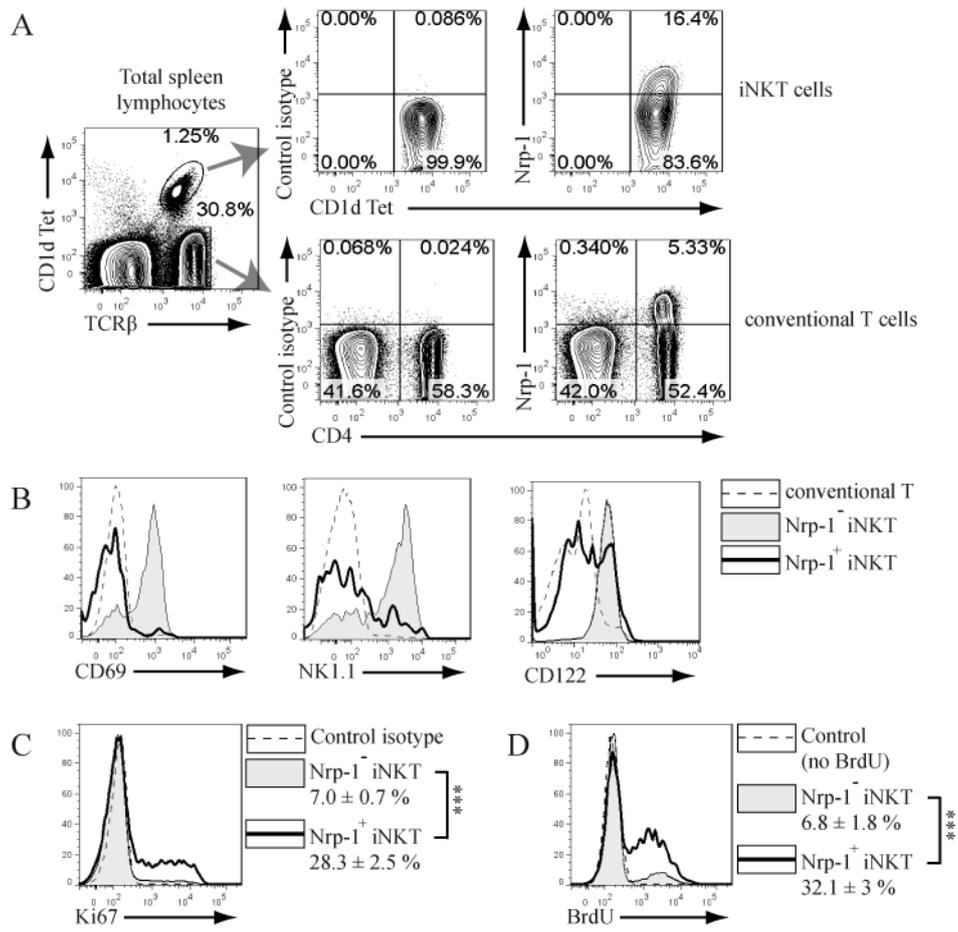


FIGURE 2.

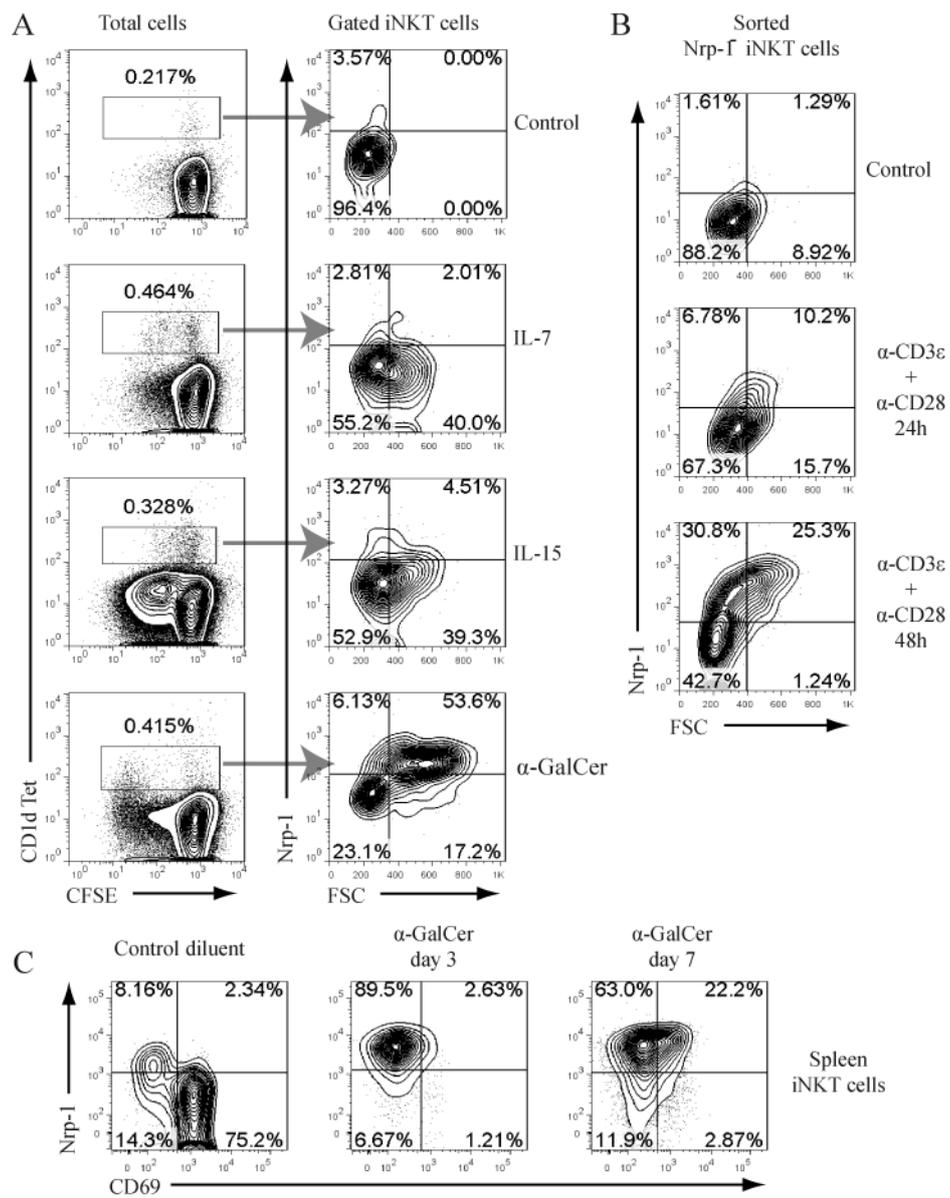


FIGURE 3.

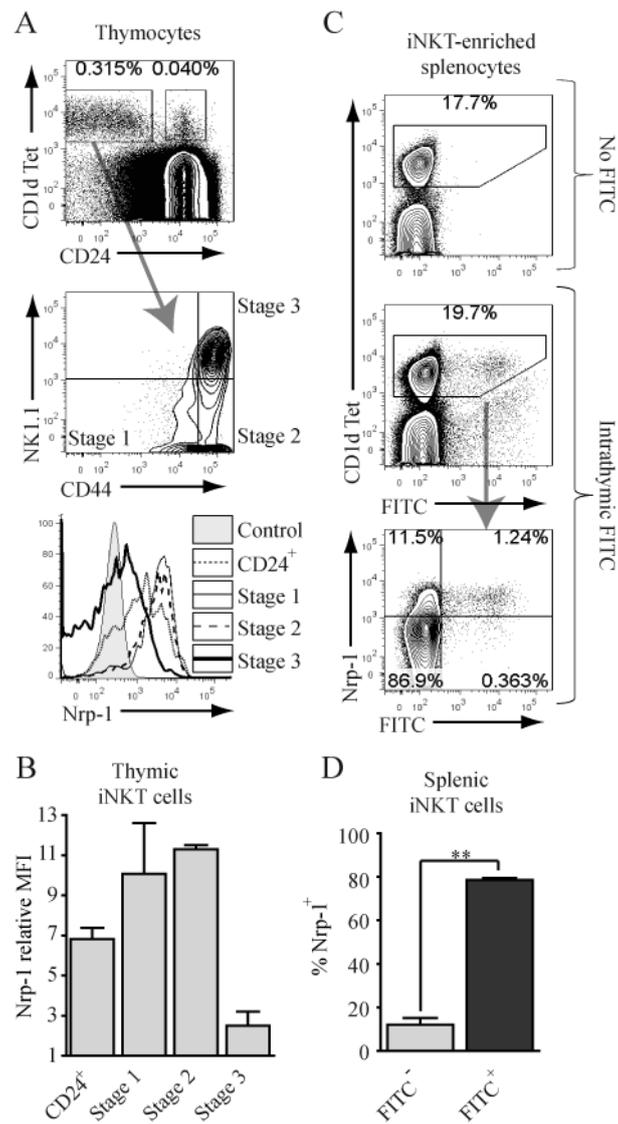


FIGURE 4.

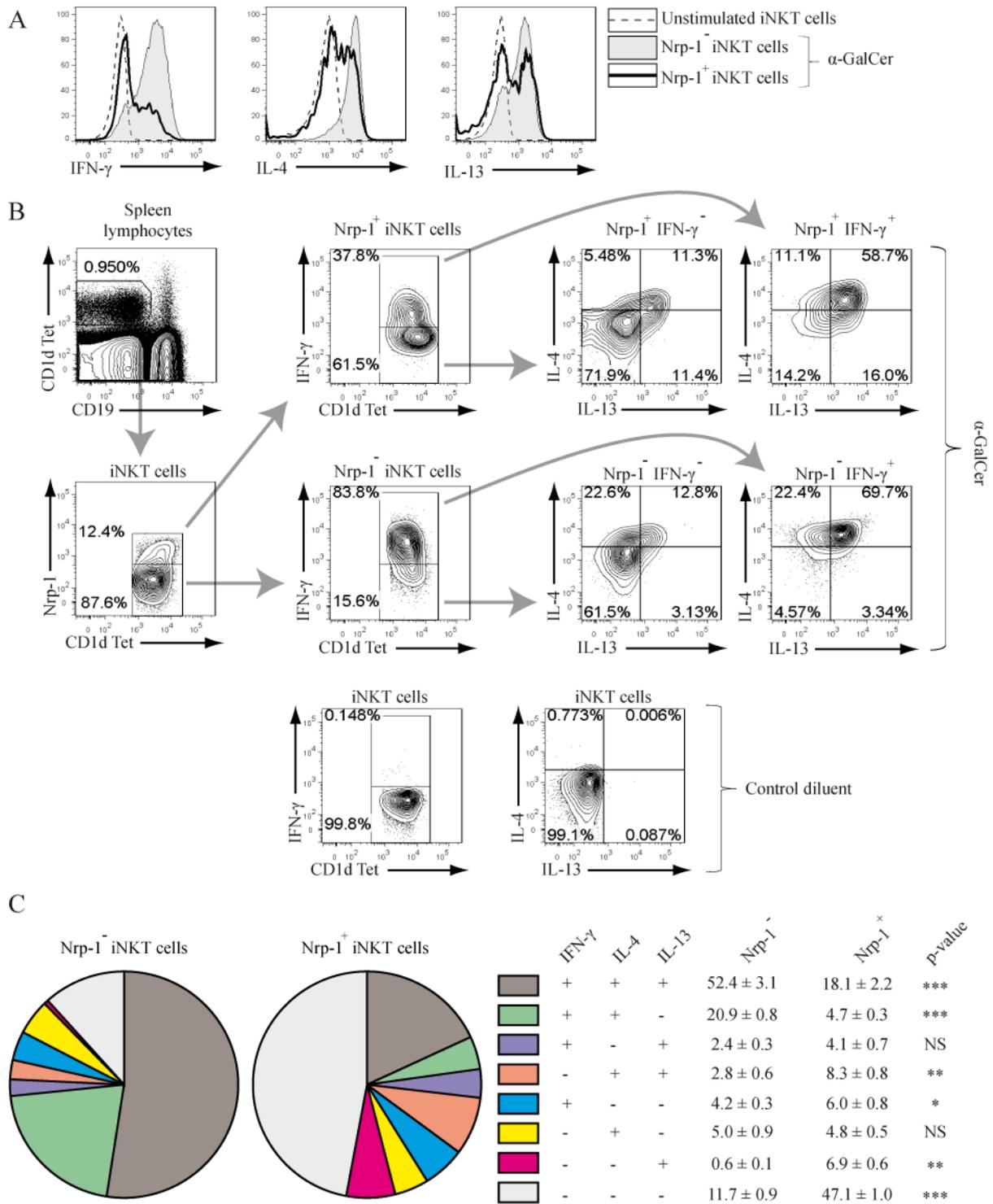


FIGURE 5.

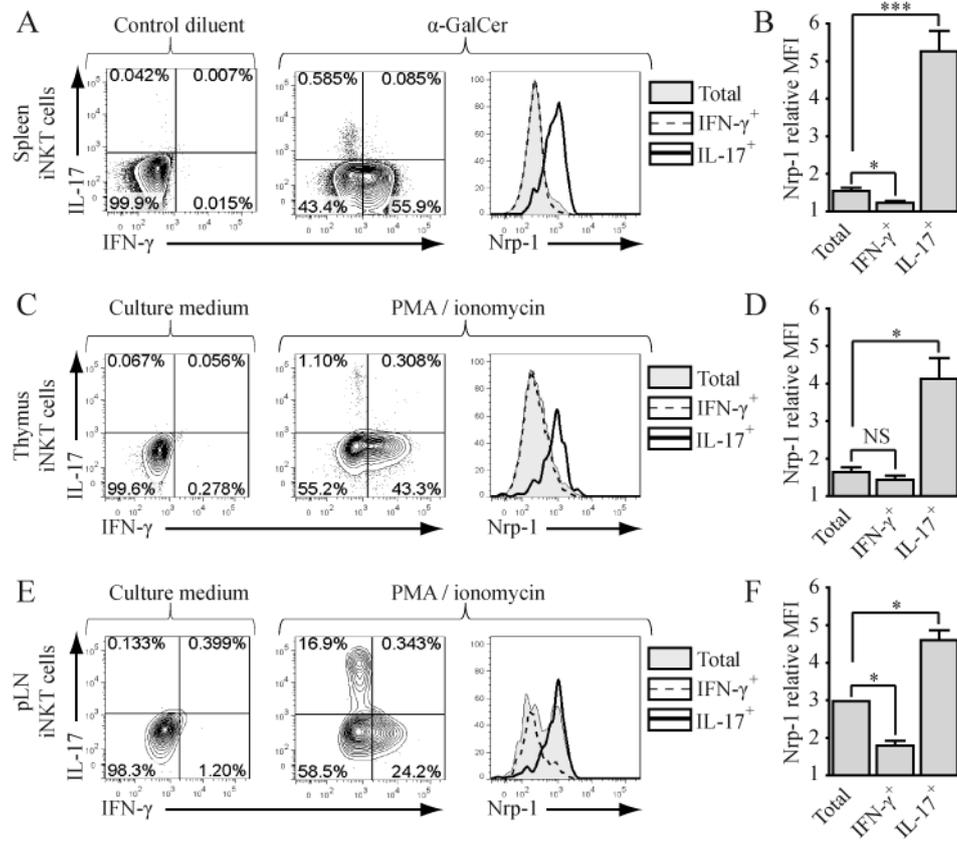


FIGURE 6.

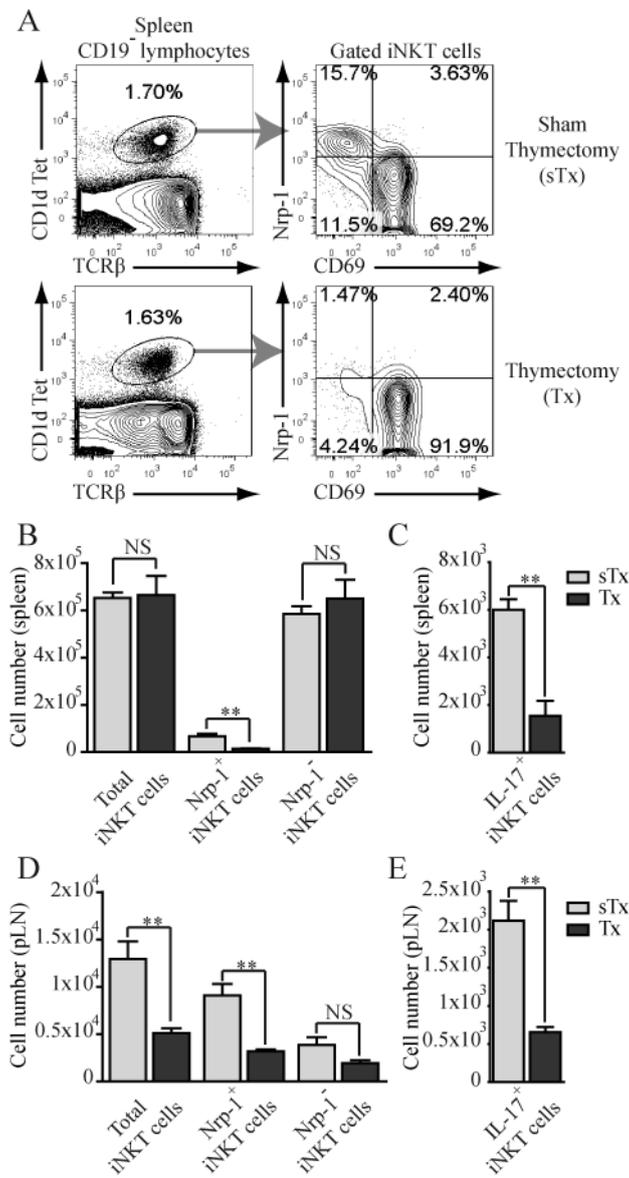
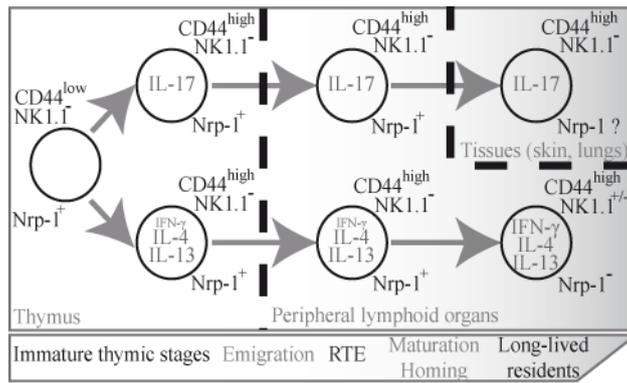
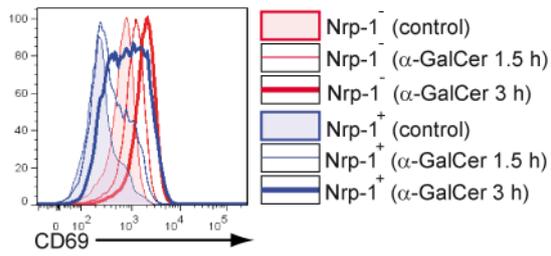


FIGURE 7.



SUPPLEMENTAL FIGURE 1.



SUPPLEMENTAL FIGURE 1. CD69 upregulation in Nrp-1⁻ and Nrp-1⁺ iNKT cells after α -GalCer injection. Mice were injected i.p. with 2 μ g α -GalCer without prior injection of brefeldin A and CD69 expression in splenic Nrp-1⁻ (red) and Nrp-1⁺ (blue) TCR β ⁺ CD1d Tet⁺ iNKT cells was analyzed after 0 h (control, shaded full histogram), 1.5 h (thin line) and 3 h (thick line). These data are representative of three distinct experiments.

Résumé

La neuropiline-1 (Nrp-1) est une protéine transmembranaire agissant comme récepteur des sémaphorines de classe 3 (Sema3) et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). En plus de son rôle crucial dans le développement des systèmes nerveux et cardiovasculaires, Nrp-1 est impliquée dans des processus physiopathologiques impliquant certains de ses ligands classiques (Sema3 et VEGF) ou récemment caractérisés (TGF- β 1 et PDGF) dans les tissus adultes. Dans le système immunitaire, Nrp-1 participe aux interactions entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques, transmet les effets immunorégulateurs de Sema3A sur les lymphocytes T, et est impliqué dans le mécanisme suppresseur des lymphocytes T régulateurs (Treg) Foxp3⁺. Cependant, l'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T non-Treg humains et murins n'a été que peu étudiée.

L'objectif de ce projet était de caractériser les populations de lymphocytes T Nrp-1⁺ non-Treg chez la souris, d'analyser leurs fonctions, d'identifier les mécanismes conduisant à l'expression de Nrp-1 dans ces cellules, et de comprendre le rôle joué par Nrp-1 dans les réponses immunitaires T.

Mon travail s'est d'une part intéressé à une population de lymphocytes T non-conventionnels appelés lymphocytes « invariant natural killer T » (iNKT). Les lymphocytes iNKT sont des lymphocytes T $\alpha\beta$ dérivés du thymus aux propriétés immunomodulatrices reposant sur la sécrétion rapide de cytokines T_H1 et T_H2 après engagement de leur TCR semi-invariant par des complexes CD1d/glycolipide. Un sous-type distinct de cellules iNKT, dont l'origine et l'homéostasie sont encore mal connues, produit la cytokine pro-inflammatoire IL-17. Dans ce travail, j'ai montré que les lymphocytes iNKT émigrés thymiques récents sont identifiés spécifiquement par l'expression de Nrp-1. Les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 expriment Nrp-1 et dépendent de l'export thymique.

D'autre part, Nrp-1 est exprimé par les thymocytes immatures en division et certains lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels mémoires en prolifération homéostatique rapide. *In vitro*, l'activation des lymphocytes T par le TCR induit l'expression de Nrp-1 de manière dépendante de la voie de signalisation Ca²⁺/calcineurine/NFAT. L'expression de Nrp-1 dans les lymphocytes T activés les sensibilise aux effets régulateurs de Sema3A et TGF- β 1.

En conclusion, ces résultats apportent de nouvelles données concernant l'expression et la fonction de Nrp-1 dans le système immunitaire. Plus généralement, cette étude permet d'envisager des stratégies thérapeutiques ciblant les processus dépendants de Nrp-1 dans les pathologies du système immunitaire et du système nerveux ou les cancers.

Mots-clés : neuropiline – lymphocyte iNKT – export thymique – IL-17 – lymphocyte T – TCR – immunorégulation.

Abstract « Neuropilin-1 expression in murine conventional T and invariant natural killer T (iNKT) T cells »

Neuropilin-1 (Nrp-1) is a one way transmembrane protein originally identified as a receptor for both axonal guidance cues (class 3 semaphorins, Sema3) and angiogenic factors (vascular endothelial growth factor, VEGF). In addition to its role in the development of the nervous and cardiovascular systems, Nrp-1 has been attributed critical functions in numerous adult physiological and pathological processes following the binding of old (Sema3 and VEGF) and new (TGF- β and PDGF) ligands. In the immune system, Nrp-1 participates in the immune synapse between T cells and dendritic cells, acts as a coreceptor for the immunoregulatory Sema3A on T cells, and is involved in the suppressive functions of murine Foxp3⁺ regulatory T (Treg) cells. However, little is known about Nrp-1 expression in human and murine non-Treg T cells.

The aim of this project was to characterize non-Treg Nrp-1⁺ T cell populations in mice, analyze their functions, identify the mechanisms leading to Nrp-1 expression in these cells, and understand the role of Nrp-1 in T cell responses.

On the one hand, I have studied a population of unconventional innate-like T cells named invariant natural killer T (iNKT) cells. iNKT cells are thymus-derived CD1d-reactive $\alpha\beta$ T cells with potent immunomodulatory properties based on their quick release of both T_H1 and T_H2 cytokines after TCR triggering. A distinct subset of iNKT cells, whose origin and homeostasis are still poorly understood, produces the pro-inflammatory cytokine IL-17. In the present study, I have found that IL-17-producing iNKT cells are part of the recent thymic emigrant iNKT cell pool, which can be unequivocally identified as Nrp-1⁺ iNKT cells in peripheral lymphoid organs of naive mice.

On the other hand, I have analyzed Nrp-1 expression in conventional non-Treg $\alpha\beta$ T cells. In naive mice, Nrp-1 is expressed on proliferating immature thymocytes and memory phenotype mature T cells with an increased homeostatic proliferation rate. *In vitro* experiments have shown that Nrp-1 expression is induced in T cells by TCR activation in a Ca²⁺/calcineurin/NFAT signaling pathway-dependent manner. Nrp-1 expression in activated T cells sensitizes them to the regulatory effects of its ligands Sema3A and TGF- β 1.

In conclusion, the results presented here provide original data on Nrp-1 expression and function in the immune system. More generally, this study paves the way for further basic and translational research on Nrp-1-mediated processes in immune-related diseases, cancer, and neurological disorders.

Keywords: neuropilin – iNKT cell – thymic export – IL-17 – T cell – TCR – immune regulation.

Thèse préparée dans le laboratoire CNRS UMR 8147 « Cytokines, Hématopoïèse et Réponse Immune »
Hôpital Necker – Enfants Malades, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris.