



HAL
open science

La neuropiline 1 et le récepteur alpha à l'IL-2 (CD25) : expression et implication dans l'homéostasie des lymphocytes T chez l'homme dans un contexte normal ou pathologique

Amédée Renand

► **To cite this version:**

Amédée Renand. La neuropiline 1 et le récepteur alpha à l'IL-2 (CD25) : expression et implication dans l'homéostasie des lymphocytes T chez l'homme dans un contexte normal ou pathologique. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T032 . tel-00603951v2

HAL Id: tel-00603951

<https://theses.hal.science/tel-00603951v2>

Submitted on 18 Oct 2011

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

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

UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

2011

N° attribué par la bibliothèque

|||||

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Champ disciplinaire : Médecine

Ecole doctorale de rattachement : Cancérologie (418)

Présentée et soutenue publiquement

par

Amédée Renand

Le 23 Juin 2011

La neuropiline 1 et le récepteur alpha à l'IL-2 (CD25) :
Expression et implication dans l'homéostasie des lymphocytes T chez
l'homme dans un contexte normal ou pathologique.

Directeur de thèse : Olivier HERMINE

JURY

Jean KANELLOPOULOS – Président du Jury

Claire HIVROZ – Rapporteur

Vassili SOUMELIS – Rapporteur

Frédéric RIEUX-LAUCAT – Examineur

Marc BONNEVILLE – Examineur

Olivier HERMINE – Directeur de thèse

*Thèse préparée dans l'unité du CNRS UMR 8147 « Cytokines, hématopoïèse et
réponse immune », à l'hôpital Necker, Paris.*

Résumé

Des études récentes ont montré une implication de la neuropiline 1 (Nrp1) dans le contrôle de l'activation des lymphocytes T. Son invalidation s'accompagne d'une aggravation de l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE). La sémaphorine 3A (Sema-3A), ligand principal de la Nrp1, semble participer à une boucle autocrine de rétro contrôle négatif de la prolifération des lymphocytes T. Cependant, peu d'études ont été réalisées chez l'homme pour déterminer dans quelle(s) situation(s) la Nrp1 est exprimée par les lymphocytes T. Notre travail a consisté à étudier l'expression de la Nrp1 par les populations lymphocytaires T humaines afin de comprendre à quel niveau peut avoir lieu ce rétro contrôle. Nous montrons que les lymphocytes T régulateurs (Treg) chez l'homme n'expriment pas la Nrp1, contrairement aux Treg murins. En revanche, la Nrp1 est exprimée par les lymphocytes T effecteurs après engagement avec l'antigène, soit au niveau des organes lymphoïdes secondaires pour les lymphocytes T folliculaires helper (Tfh) en interaction avec les lymphocytes B, soit au niveau des sites d'inflammations périphériques pour les lymphocytes T effecteurs mémoires (TEM). Dans les deux cas, cette expression survient en fin d'activation et pourrait servir de frein à une activation incontrôlée des lymphocytes T.

D'autre part, nous avons abordé le rôle du récepteur alpha à l'IL-2 (CD25) dans l'homéostasie des lymphocytes T. L'étude chez la souris *il2ra*^{-/-} a révélé un rôle important du CD25 pour la survie des Treg *in vivo*, mais aussi pour l'acquisition de lymphocytes T mémoires. Seulement deux cas de déficience en CD25, associés à des maladies auto-immunes, ont été décrits chez l'homme. Cependant, ces études n'ont pas abordé à quel niveau le CD25 intervient sur l'homéostasie des lymphocytes T. Nous complétons ces études par la présentation de trois nouveaux cas de déficience en CD25 développant des maladies auto-immunes de type IPEX. Nous montrons que le CD25 intervient activement dans le maintien des populations Treg naïves et effectrices, mais aussi dans celui des populations lymphocytaires effectrices mémoires.

Mots-clés: neuropiline - récepteur alpha à l'IL-2 - lymphocyte T – homéostasie - lymphocyte T folliculaire auxiliaire - lymphocyte T régulateur.

Abstract

Neuropilin 1 and IL-2 receptor alpha (CD25): expression and implication in normal or pathologic human T cell homeostasis.

Recent studies have shown the involvement of neuropilin 1 (Nrp1) in the control of T cell activation, and disruption of this receptor promotes aggravation of experimental autoimmune encephalitis (EAE). Through its principal ligand, semaphorin 3A (Sema-3A), Nrp1 appears to participate in an autocrine negative feedback of T cell proliferation. However, few studies have been conducted in humans to determine when Nrp1 is expressed by T cells. Here we show that regulatory T cells (Treg) in humans do not express Nrp1, unlike murine Treg cells. In contrast, we show that Nrp1 is expressed by effector T cells after engagement with antigen, either in secondary lymphoid organs for follicular helper T cells (Tfh) interacting with B cells, either in peripheral inflammation for effector memory T cells (TEM). We conclude that this expression corresponds to a level of late activation in both cases and may control T cell activation.

The study in mice *il2ra*^{-/-} revealed a significant role of IL-2 receptor alpha (CD25) for the survival of Treg *in vivo*, but also for the differentiation of memory T cells. Only two cases of CD25 deficiency associated with autoimmune diseases have been described in humans. However, these studies do not assess at what level CD25 is involved in T cell homeostasis. Here we provide further insight of these studies by presenting three new cases of CD25 deficiency developing autoimmune diseases like IPEX. We show that CD25 plays an active role to maintain naive and effector Treg cell populations of, and effector memory T cell populations.

Keywords: *neuropilin, IL-2 receptor alpha, T cell, homeostasis, follicular helper T cell, regulatory T cell.*

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de cette thèse, que ce soit d'un point de vue scientifique, administratif, ou psychologique. Merci tout d'abord à ma conjointe *Cécile*, à ma famille, *Gilles, Norma, Elie, Aurora, Lupe, Pablo, Georges, Violette, Pascal* et à mes amis de m'avoir témoigné leur soutien durant cette aventure.

Je remercie Michel Dy, directeur de l'unité CNRS UMR8147, et Christian Auclair, directeur de l'école doctorale de Paris sud-XI, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser et de présenter ce travail de thèse.

Je tiens à remercier particulièrement Olivier Hermine, directeur de ma thèse, qui m'a ouvert les portes de la recherche académique et m'a permis de m'épanouir dans ce domaine. Je suis reconnaissant aux membres du jury pour l'honneur qu'ils me font d'évaluer le fruit de mes premières années de recherche : Jean Kanellopoulos, président du jury, Claire Hivroz et Vassili Soumelis, rapporteurs de ce manuscrit, Marc Bonneville et Frédéric Rieux-Laucat. L'expérience de ce dernier a aussi été fort appréciée pour l'étude des patients présentant des mutations génétiques.

Mes remerciements vont également à la Ligue Nationale contre le Cancer et à la Fondation pour la Recherche Médicale, ainsi qu'aux donateurs de ces deux associations, pour le soutien qu'elles ont apporté au financement de cette recherche.

L'efficacité et la disponibilité du personnel administratif impliqué dans ce travail méritent également mes remerciements : Muriel Nicoletti, secrétaire de l'école doctorale, Nadia lafrate, service du personnel de la faculté de médecine Paris-Sud, Isabelle Douillez, secrétaire du professeur Olivier Hermine.

Je remercie aussi toute la camaraderie qui a permis d'associer cette thèse à une expérience sociale, professionnelle et conviviale inoubliable. Merci à vous, *Pierre M, Sébastien, Julie V, Machuss, Anoa, Pablo (junior), Roberto, Michaël, Sylvaine, Daniella, Julie B, Jean-Noël, Pierre J, Flavie, Françoise, Patrick, Pierre L, Hassen, Petit Viking, Marie, Georgia, Emmanuela, Antoine, Lucia, Anne, Loredana, Séverine, François, Julien, Ivan, Jean-Benoît, Vivi, Sophie K, Sophie G, Bérangère, Ruddy, Flora, Rachel, Mélanie, Pascal, Lucie, Christophe, Sarah, Francine, Raouf, Yousra, Bénédicte, Jérôme et Corinne* (plateforme du tri-cellulaire), *Meriem et Nicolas* (plateforme d'imagerie), et tous ceux que j'aurais oubliés.

Liste des abréviations

ADH : alcool déshydrogénase	FasL : « Fas Ligand »
ADN : acide désoxyribonucléique	FDC : follicular dendritic cell »
AICD : « activation induced cell death »	Foxp3 : « Forkhead box P3 »
ALDH : aldéhydes déshydrogénase	FSC : « forward light scatter »
AP-1 : « activator protein 1 »	GAP : « GTPase-Activating Protein »
ARN : acide ribonucléique	GATA-3 : « trans-acting T-cell specific transcription factor 3 »
ATRA : « all- <i>trans</i> retinoic acid »	GC : « germinal center »
Bcl-6 : « B cell lymphoma 6 »	gfp : « green fluorescent protein »
BCR : « B cell receptor »	GITR : « glucocorticoid-Induced TNF-receptor-related protein »
CCR : « CC chemokine receptor »	GMPc : guanosine monophosphate cyclique
CD : « cluster of differentiation »	GTP : guanosine triphosphate
CFSE : « Carboxyfluorescein Succinimidyl ester »	GVH : « graft-versus-host »
CIP : « cytokines induced proliferation »	HLADR : « human leucocyte antigen DR »
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	ICOS : « inducible T-cell costimulator »
CMV : Cytomégalovirus	IFN : interféron
CRABP : « cellular retinoic acid binding protein »	Ig : immunoglobuline
CTL : « cytotoxic T lymphocyte »	IL : interleukine
CTLA-4 : « cytotoxic T lymphocyte antigen 4 »	IL2RA : « interleukin 2 receptor alpha »
CUB : « complement binding factors »	IPEX : « immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome »
CXCL : « CXC chemokine ligand »	iTreg : « induced regulatory T cell »
CXCR : « CXC chemokine receptor »	Jak : « Janus kinase »
DC : « dendritic cell »	kDa : Kilo dalton
EAE : encéphalite auto-immune expérimentale	KDR : « kinase insert domain receptor »
ERK : « extracellular signal-regulated kinases »	

KLRG1 : « killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1 »

LAG3 : « lymphocyte activation gene 3 »

LAP : « latency associated peptide »

MAPK : « mitogen-activated protein kinase »

NFAT : « nuclear factor of activated T cells »

NK : « natural killer »

NOG : « non-obese diabetic-scid-common γ -chain-deficient mice »

Nrp : Neuropiline

PBMC : « peripheral blood mononuclear cell »

PD-1 : « programmed death 1 »

PDC : « plasmacytoid dendritic cell »

Pi-3K : « phosphatidylinositol 3 kinase »

PIGF : « placental growth factor »

PMA : phorbol 12-myristate 13-acétate

RAR : « retinoic acid receptor »

Ras : « rat sarcoma »

ROR- γ t : « retinoic acid receptor related orphan receptor γ t »

SAP : « Slam-associated protein »

Sema : Sémaphorine

SLAM : « signaling lymphocyte activating molecule »

SLE : « systemic lupus erythematic »

TCM : « central memory T cell »

TCR : « T cell receptor »

TEC : « thymic endothelial cell »

Tfh : « T follicular helper »

TGF : « transforming growth factor »

Th : « T helper »

VEGF : « vascular endothelial growth factor »

VEGFR : « VEGF receptor »

WT : « wild type »

Sommaire

Résumé	4
Abstract	5
Remerciements	7
Liste des abréviations	9
Sommaire	11
Avant-propos	15
INTRODUCTION	17
1. Le récepteur alpha à l'IL-2 (CD25) : implication dans l'immunorégulation de l'homéostasie des populations lymphocytaires T	17
1.1. La diversité des lymphocytes T CD4	19
1.1.1. Les lymphocytes T CD4 folliculaires « helper » (Tfh)	21
1.2. Les lymphocytes T régulateurs « naturels »	24
1.2.1. Le rôle du facteur de transcription Foxp3	25
1.2.2. Délimitation de la population Treg chez l'homme	26
1.2.3. Les mécanismes de suppression des Treg chez l'homme	28
1.2.4. L'implication des Treg en recherche clinique	30
1.3. L'homéostasie des lymphocytes T chez l'homme	32
1.3.1. Les lymphocytes T mémoires	32
1.3.1.1. Les lymphocytes T mémoires centraux et effecteurs	34
1.3.1.2. La différenciation des lymphocytes T mémoires	36
1.3.2. L'homéostasie des lymphocytes T mémoires et naïfs	37
1.3.2.1. Le rôle du thymus	38
1.3.2.2. L'efficacité des Treg	40
1.3.2.3. L'environnement en cytokines	40
1.4. L'importance du récepteur alpha à l'IL-2 (CD25) dans le maintien de l'homéostasie des lymphocytes T	42

1.4.1. Le récepteur alpha à l'IL-2 (CD25)	42
1.4.2. L'importance de l'expression du CD25 dans le maintien des Treg	44
1.4.3. L'importance du CD25 dans l'homéostasie des lymphocytes T	46
1.4.4. Les anomalies et déficiences du gène <i>IL-2RA</i> chez l'homme	49
2. La neuropiline 1 (Nrp1) : caractérisation de son expression dans le système immunitaire chez l'homme	51
2.1. La structure de la neuropiline 1	51
2.2. Les ligands de la neuropiline 1	52
2.2.1. La sémaphorine 3A	52
2.2.2. Les VEGF	54
2.3. Les fonctions de la neuropiline 1	55
2.3.1. La fonction au cours du développement	55
2.3.2. La fonction au niveau cellulaire	57
2.4. La neuropiline 1 dans le système immunitaire	60
2.4.1. La neuropiline 1 sur les cellules dendritiques	60
2.4.2. La neuropiline 1 sur les lymphocytes T	61
2.4.3. La neuropiline 1 et les Treg	65
2.4.4. La neuropiline 1 au niveau du Thymus	66
PROBLEMATIQUE	67
METHODES	68
I) Les différents prélèvements humains	68
II) L'identification des populations cellulaires par cytométrie en flux	69
III) Les tests fonctionnels <i>in vitro</i>	71

RESULTATS	73
I) La neuropiline 1 n'est pas un marqueur des Treg chez l'homme	74
II) L'expression de la neuropiline 1 sur les lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires chez l'homme est spécifique de la population Tfh interagissant avec les lymphocytes B	75
III) L'expression de la neuropiline 1 est caractéristique d'une hyperactivité des lymphocytes T dans l'inflammation périphérique	97
IV) Le défaut génétique du CD25 chez l'homme est associé à un déséquilibre de l'homéostasie des lymphocytes Treg et T effecteurs	109
DISCUSSIONS	129
I) La cartographie de la Nrp1 sur les lymphocytes T chez l'homme	129
II) L'implication du CD25 dans le maintien de l'homéostasie des lymphocytes T chez l'homme	141
REFERENCES	145

Avant-propos

Le système immunitaire permet de lutter contre les pathogènes extérieurs. Cependant, dans certains cas, ce système de défense peut se retourner contre son hôte et avoir des conséquences néfastes avec émergence de maladies auto-immunes et/ou inflammatoires. Ces dernières suscitent de nombreuses interrogations, notamment sur les mécanismes impliqués dans la dérégulation du système immunitaire, et leur compréhension reste un enjeu essentiel pour la médecine actuelle. Les lymphocytes T occupent une place centrale dans ce phénomène et leur hyperactivation est un facteur d'aggravation majeur des maladies auto-immunes. Toutefois, la propriété des lymphocytes T régulateurs (Treg) d'inhiber les lymphocytes T auto-réactifs place ces cellules au centre de nombreuses études ayant pour objectif final leur utilisation en thérapie cellulaire. Cependant, les avancées actuelles ne permettent pas encore d'utiliser cette thérapie dans la plupart des maladies auto-immunes. Il est donc important de chercher d'autres mécanismes de régulation, éventuellement sensible à des agents pharmacologiques, capables soit d'inhiber directement l'hyperactivation des lymphocytes T auto-réactifs, soit de favoriser l'action immunorégulatrice des Treg.

L'interleukine 2 (IL-2) est une cytokine impliquée lors de l'activation des lymphocytes T, mais elle possède également un rôle immunorégulateur non négligeable. En effet, elle est capable de moduler la physiologie et la survie des lymphocytes T régulateurs. Bien que l'utilisation de l'IL-2 semble être une perspective thérapeutique intéressante pour traiter diverses pathologies auto-immunes, il est encore difficile d'établir avec certitude l'influence de celle-ci sur notre physiologie. La majorité des travaux dans ce domaine se concentre autour de modèles d'études chez l'animal et le parallèle chez l'homme est encore trop peu pertinent. En effet, les travaux chez l'homme restent encore très limités, mais l'étude de mutations génétiques responsables de pathologies permet néanmoins d'apporter des informations primordiales. Dans notre étude, nous apporterons des éléments pour une meilleure compréhension de l'influence de l'IL-2 sur l'homéostasie des lymphocytes T et T régulateurs chez l'homme, par la présentation de trois cas de mutation sur le gène de l'*IL2RA*, gène du récepteur alpha à l'IL-2 (CD25).

D'autre part, notre laboratoire fut l'un des premiers à publier des résultats montrant l'implication de la neuropiline 1 (Nrp1) dans la fonction des lymphocytes T (Tordjman et al., 2002). Bruder *et al*, ont ensuite montré que les lymphocytes T régulateurs murins exprimaient de manière spécifique la neuropiline 1 (Bruder et al., 2004). Depuis cette découverte, la neuropiline 1 suscite de plus en plus d'intérêt pour son implication dans le contrôle de la réponse immunitaire. Cependant, peu d'études sont réalisées sur le rôle de l'expression de la neuropiline 1 chez l'homme, que ce soit dans un contexte normal ou pathologique. Ainsi, nous avons axé nos recherches autour de l'expression de la Nrp1 par les lymphocytes T humains afin de mieux comprendre l'implication de ce récepteur dans la régulation du système immunitaire, qui pourrait conduire à la proposition de nouvelles orientations thérapeutiques.

INTRODUCTION

1. Le récepteur alpha à l'IL-2 (CD25) : implication dans l'immunorégulation de l'homéostasie des populations lymphocytaires T

Les lymphocytes T sont les acteurs principaux de la réponse immunitaire spécifique. Ils sont indispensables à l'acquisition d'une mémoire immunitaire contre les antigènes. Nous pouvons distinguer schématiquement deux types principaux de lymphocytes T dits conventionnels : les lymphocytes T CD4 qui sont restreints à la reconnaissance du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) à la surface des cellules présentatrices de l'antigène, et les lymphocytes T CD8 qui sont restreints à la reconnaissance du CMH de classe I. Les lymphocytes T CD4 et T CD8 issus du thymus se retrouvent dans la circulation sanguine sous forme naïve et expriment le marqueur de surface CD45RA jusqu'à la rencontre d'un antigène. La rencontre entre un lymphocyte T naïf et une cellule présentatrice d'antigène (généralement une cellule dendritique (DC)), dans les organes lymphoïdes secondaires, provoque alors la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs puis mémoires, exprimant le marqueur de surface CD45RO. Ce contact est dépendant de l'interaction entre le TCR du lymphocyte T et le peptide antigénique présenté par le CMH de la DC. Les lymphocytes T CD8 vont principalement acquérir une fonction cytotoxique de façon spécifique d'un antigène et les lymphocytes T CD4 vont principalement devenir des lymphocytes T auxiliaires professionnels. Par la sécrétion de cytokines, les lymphocytes T auxiliaires vont aider les lymphocytes B (producteurs d'anticorps) et les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) pour leurs fonctions.

La population T CD4 n'est pas une population homogène. Dès la sortie du thymus deux populations de lymphocytes T CD4 naïfs se distinguent : les lymphocytes T CD4, dits conventionnels, qui aboutiront, après rencontre avec un antigène, aux lymphocytes T auxiliaires, et les lymphocytes T CD4 régulateurs (Treg), dits naturels, qui n'ont pas de fonctions auxiliaires, mais interviennent dans l'organisme pour contrôler la tolérance au soi et l'homéostasie du système immunitaire. Les lymphocytes T CD4 régulateurs sont généralement spécifiques

d'auto-antigènes et interviennent dans le contrôle des maladies auto-immunes (Figure. 1).

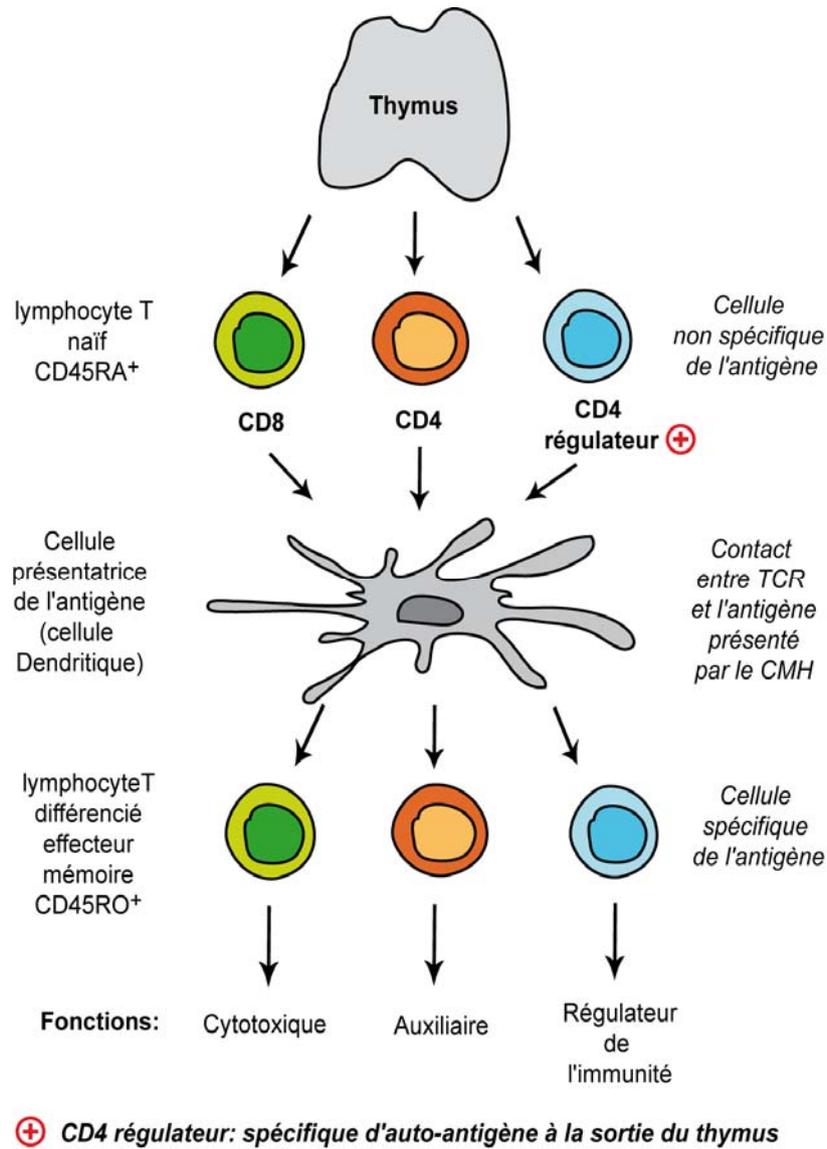


Figure. 1 Schéma simplifié de la différenciation des lymphocytes T naifs. Les lymphocytes T CD8, CD4 et CD4 régulateur (Treg) sortent du thymus sous forme naïve. La rencontre avec l'antigène présenté par le CMH d'une cellule présentatrice de l'antigène et le TCR du lymphocyte T va provoquer la différenciation de lymphocytes T naifs en lymphocytes effecteurs cytotoxiques et auxiliaires.

1.1. La diversité des lymphocytes T CD4

En plus de la distinction entre lymphocytes T auxiliaires et lymphocytes T régulateurs, les lymphocytes T CD4 auxiliaires se différencient également en plusieurs sous-types de populations effectrices selon les cytokines présentes dans le microenvironnement. En effet, on peut distinguer cinq sous-types de lymphocytes T CD4 effecteurs. Les plus classiques et mieux caractérisés étant les Th1 et les Th2. Plus récemment, les Th17, les lymphocytes T folliculaires « helper » (Tfh) et les lymphocytes T régulateurs induits (iTreg) ont été ajoutés à la liste de ces sous-populations T CD4 auxiliaires (Figure. 2).

Les cellules Th1 sont caractérisées par leur production en IFN- γ et par l'expression du facteur de transcription T-bet, et interviennent dans l'immunité contre les microorganismes intracellulaires. La production d'IL-12 par les cellules de l'immunité innée va induire la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en cellules Th1.

Les cellules Th2 se différencient en présence d'IL-4 et requièrent le facteur de transcription GATA-3. Ces cellules produisent les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 et interviennent dans l'immunité humorale pour contrôler différents pathogènes extracellulaires.

Les cellules Th17 produisent de l'IL-17 et de l'IL-22 et jouent un rôle important dans l'élimination des bactéries et des champignons à la surface des muqueuses. La différenciation en cellules Th17 requiert le facteur de transcription ROR γ t, induit par le TGF- β et par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-21 chez la souris (Chen et al., 2007). Chez l'homme cette différenciation nécessite en plus la présence de l'IL-23 et de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β , qui permet notamment l'inhibition de la production d'IL-10 (Volpe et al., 2008).

L'induction de lymphocytes T régulateurs (iTreg) est dépendante du TGF- β et du facteur de transcription Foxp3. Ces cellules ont les mêmes propriétés que les lymphocytes T régulateurs naturels (Treg directement issus du thymus), et interviennent dans le contrôle de la réponse immunitaire via leur production d'IL-10 et de TGF- β . Cependant, il est encore difficile de déterminer l'importance de ces cellules *in vivo*, même si l'induction *in vitro* de lymphocytes T régulateurs humains

spécifiques de l'antigène reste un enjeu à long terme pour l'immunothérapie des maladies auto-immunes (Sallusto and Lanzavecchia, 2009).

Enfin, les cellules Tfh constituent une sous-population de lymphocytes T auxiliaires qui régulent la maturation des lymphocytes B. Leur différenciation est dépendante du répresseur de transcription Bcl-6, et de l'IL-21. Ces cellules productrices d'IL-21 ont la capacité de migrer au niveau des follicules des organes lymphoïdes secondaires et d'induire la production d'anticorps par les lymphocytes B (King, 2009).

Le point de vue classique de lignée différente pour chaque type de lymphocytes T CD4 différenciés est remis en question depuis plusieurs années. Il est intéressant de noter que les lymphocytes T CD4 différenciés possèdent une certaine plasticité et peuvent ainsi changer de profil de sécrétion en cytokines selon les modifications du microenvironnement (O'Shea and Paul, 2010).

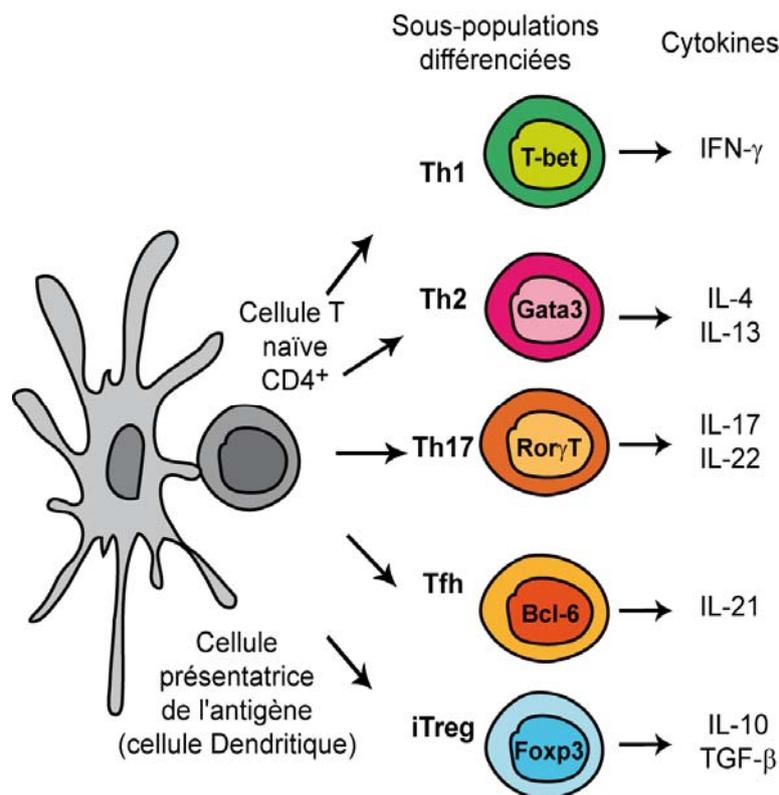


Figure. 2 Schéma classique de la différenciation des lymphocytes T CD4. La différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs aboutit à l'émergence de diverses lymphocytes T auxiliaires caractérisés par leurs facteurs de transcription (T-bet, Gata3, Roryt...) et leurs productions en cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-21...).

1.1.1. Les lymphocytes T CD4 folliculaires « helper » (Tfh)

Les Tfh sont l'un des sous-types de lymphocytes T CD4 qui régulent le développement des lymphocytes B spécifiques de l'antigène dans l'immunité *in vivo*. La différenciation des lymphocytes B se caractérise par le développement des plasmocytes qui vont produire les anticorps, ou des lymphocytes B du centre germinatif qui constitueront un pool de lymphocyte B mémoires. L'expression du récepteur aux chemokines CXCR5 par les lymphocytes B leur permet de migrer vers les zones folliculaires des organes lymphoïdes, riches en CXCL13 (chimiokine ayant pour récepteur spécifique le CXCR5). C'est dans les follicules, comprenant le centre germinatif, que les lymphocytes B vont pouvoir se différencier. Les Tfh ont la particularité d'exprimer le CXCR5 et vont ainsi migrer au niveau des follicules, et plus particulièrement vers les centres germinatifs. Cette proximité géographique va permettre de favoriser le contact entre Tfh et lymphocytes B (Fazilleau et al., 2009a; King, 2009; Yu and Vinuesa, 2010). Les autres lymphocytes T, naïfs ou effecteurs, n'exprimant pas le récepteur CXCR5, ne pourront donc pas migrer vers les follicules. Ces lymphocytes seront donc localisés dans la zone T des organes lymphoïdes secondaires (Figure. 3).

Dans les amygdales de l'homme, les Tfh ont été caractérisés pour la première fois par l'expression du récepteur CXCR5. Seulement ces cellules sont capables d'induire la production d'immunoglobulines de type G et A en co-culture *in vitro* avec des lymphocytes B issus de la même amygdale (Breitfeld et al., 2000; Schaerli et al., 2000). Depuis, d'autres marqueurs ont été identifiés pour caractériser les Tfh. Ainsi, l'expression de la molécule de la famille des co-stimulateurs ICOS, de PD-1, d'OX40 et du répresseur de transcription Bcl-6, permettent d'identifier les cellules Tfh fonctionnelles chez l'homme (Chtanova et al., 2004; Fazilleau et al., 2009b; Haynes et al., 2007; Rasheed et al., 2006; Walker et al., 1999; Yu et al., 2009b). Par ailleurs, l'utilisation du marqueur CD57 pour identifier les Tfh est actuellement controversée. Des travaux seraient nécessaire pour mieux comprendre son profil d'expression (Kim et al., 2001; Rasheed et al., 2006).

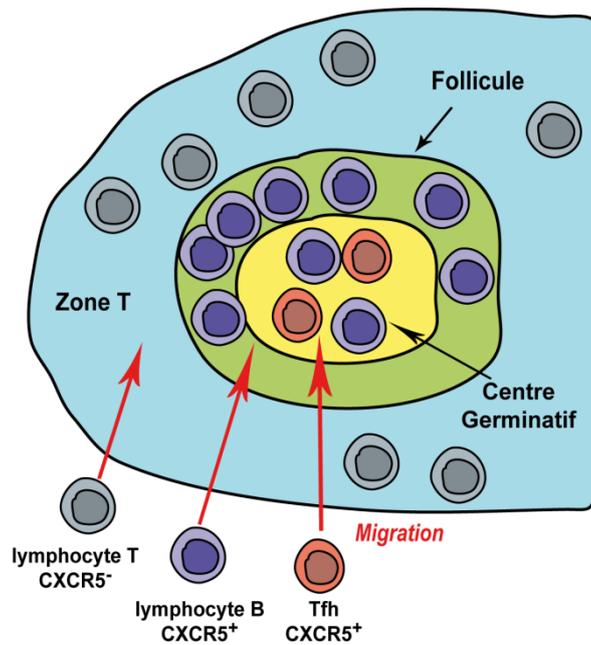


Figure. 3 Représentation schématique de la répartition des Tfh dans les organes lymphoïdes secondaires. Les lymphocytes B et les Tfh vont se concentrer au niveau des follicules riches en CXCL13 grâce à l'expression de leur récepteur CXCR5. Les autres lymphocytes T, n'exprimant pas le CXCR5 vont se retrouver en périphérie dans la zone T.

En plus de la sécrétion en IL-21, la fonction des Tfh est dépendante de leur contact étroit avec les lymphocytes B via une interaction TCR et CMH de classe II. A ce niveau les molécules ICOS, CD40 ligand et SAP (molécule associée aux molécules d'activation SLAM des lymphocytes) jouent un rôle prépondérant pour permettre la différenciation des lymphocytes B (Fazilleau et al., 2009a; Qi et al., 2008; Rasheed et al., 2006). L'implication de PD-1 et d'OX40 dans l'interaction Tfh et lymphocytes B suscite néanmoins encore quelques interrogations (Haynes et al., 2007; Walker et al., 1999).

L'interaction entre Tfh et lymphocytes B est indispensable pour la production d'anticorps mais aussi pour la formation du centre germinatif. Ainsi, un défaut de l'expression d'ICOS va non seulement provoquer une diminution de la production d'anticorps, mais également un défaut de la formation des centres germinatifs, constitués de cellules B mémoires (Bossaller et al., 2006). Cette étude montre clairement l'importance d'ICOS dans la fonction et le maintien de la population Tfh.

Les SLAM et en particulier SAP jouent un rôle important dans la formation du centre germinatif et surtout dans celle du pool de lymphocytes B mémoires (Qi et al.,

2008). En effet, SAP à la surface des lymphocytes T permet un contact stable avec les lymphocytes B, indispensable à l'expansion de ces derniers.

Il semblerait que la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes ou en lymphocytes B mémoires du centre germinatif suive deux voies distinctes régulées par les Tfh (Fazilleau et al., 2009a). A ce jour, il est encore difficile de savoir avec précision quels sont les facteurs influençant l'engagement des lymphocytes B dans une différenciation en lymphocytes B mémoires du centre germinatif, ou en plasmocytes producteurs d'anticorps (Figure. 4).

Les Tfh sont impliquées dans diverses maladies auto-immunes et favorisent la production d'auto-anticorps (Vinuesa et al., 2005). Ainsi, il est montré, chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminés (SLE : maladie associée à la présence d'auto-anticorps) et dans des modèles murins, que la population Tfh joue un rôle important dans l'évolution de la pathologie et que l'inhibition de la fonction Tfh aboutit à une diminution de la production d'auto-anticorps (Grammer et al., 2003; Hu et al., 2009; Simpson et al., 2010). Cependant, la biologie des Tfh, encore méconnue au sein de certains lymphomes, nécessiterait de plus amples investigations. Dans le cas des lymphomes T angioimmunoblastiques, une similitude entre la population T tumorale et les Tfh a été observée. Toutefois, l'origine Tfh de ces cellules tumorales n'est pas encore décrite et reste hypothétique (de Leval et al., 2007).

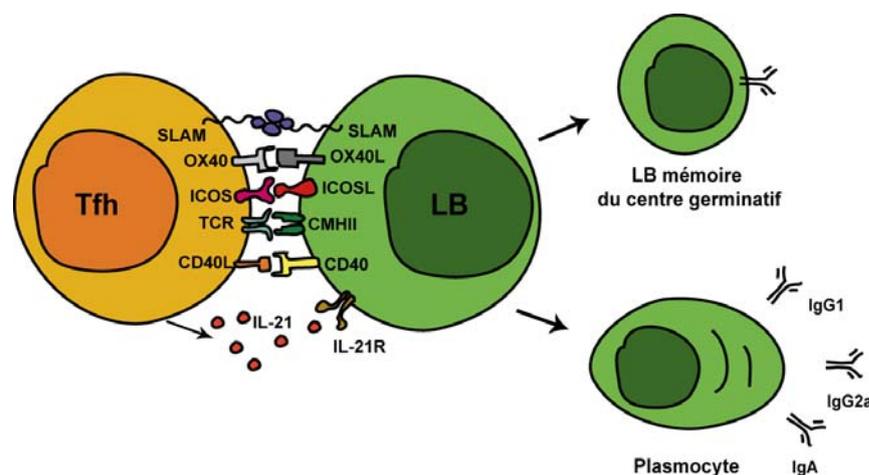


Figure. 4 Représentation des interactions moléculaires permettant la différenciation des lymphocytes B. Par l'expression de diverses molécules (ICOS, CD40L, SLAM...) les Tfh ont la capacité d'induire la différenciation des lymphocytes B (LB) en lymphocytes B mémoires ou en plasmocytes producteurs d'anticorps.

1.2. Les lymphocytes T régulateurs « naturels »

Une bonne régulation des lymphocytes T effecteurs est indispensable pour contrôler un emballement du système immunitaire et pour éviter l'émergence des maladies auto-immunes et/ou allergiques et/ou inflammatoires. Ainsi, une réponse aberrante Th1 et Th17 jouera un rôle crucial dans le développement de maladies auto-immunes, alors qu'une réponse Th2 sera impliquée dans le développement des allergies et de l'asthme. Ce sont les lymphocytes T CD4 régulateurs (Treg) qui joueront un rôle important dans le contrôle de ces réponses. Les Treg sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription Foxp3 ainsi que du récepteur alpha à l'IL-2 (CD25), et ce, aussi bien chez l'homme que chez la souris (Dieckmann et al., 2001; Fontenot et al., 2003; Khattri et al., 2003; Sakaguchi et al., 1995). Des mutations des gènes *IL2RA* ou *FOXP3* avec perte de fonction sont à l'origine de diverses maladies auto-immunes et d'allergies (Wing and Sakaguchi, 2010). Les Treg exercent un pouvoir suppresseur, grâce à leur capacité à inhiber l'activation, la prolifération et la sécrétion en cytokines d'une grande partie des cellules immunitaires, telles que les lymphocytes T CD4 et CD8, les cellules NK (natural killer), les lymphocytes B et aussi les cellules présentatrices de l'antigène. En contrepartie de ce contrôle de la tolérance au soi, les Treg inhibent aussi la réponse anti-tumorale. L'étude de cette population régulatrice suscite beaucoup d'intérêts et est devenue l'une des cibles principales pour les nouvelles applications thérapeutiques.

Contrairement aux lymphocytes T régulateurs induits (iTreg), qui acquièrent leur fonction régulatrice après activation, les Treg naturels CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ sont programmés dès la sortie du thymus pour exercer leurs pouvoirs suppresseurs.

1.2.1. Le rôle du facteur de transcription Foxp3

Le facteur de transcription Foxp3 joue un rôle majeur dans le maintien de la population Treg. Les défauts génétiques de Foxp3 chez la souris *scurfy* et chez les patients ont pour conséquence le développement de sévères maladies auto-immunes, notamment du syndrome lié à l'X, d'immunodysrégulation, de polyendocrinopathie, et d'entéropathie (IPEX) chez l'homme (Bennett et al., 2001). L'induction de Foxp3 dans des lymphocytes T naïfs de souris, après activation du TCR et l'apport de TGF- β *in vitro*, leur confèrent une activité suppressive. Ces lymphocytes, dits Treg induits (iTreg) expriment les marqueurs spécifiques aux Treg tels que le CD25, le CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) et le GITR (glucocorticoid-induced TNF-receptor-related protein), mais se révèlent différents des Treg « naturels » sur le profil du transcriptome (Hill et al., 2007). De la même façon, chez l'homme, cette induction *in vitro* de Foxp3 est également possible au sein des lymphocytes T naïfs activés via leur TCR et en présence de TGF- β . Cependant, contrairement aux Treg « naturels », ces lymphocytes montrent une activité régulatrice faible et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ) (Tran et al., 2007). De plus, il est encore difficile de déterminer la proportion d'iTreg chez l'homme et leur importance par rapport aux Treg « naturels ».

1.2.2. Délimitation de la population Treg chez l'homme

Chez la souris, la population Treg est identifiée par l'expression du CD4, de Foxp3 et, surtout, du CD25 (Sakaguchi et al., 1995). Chez l'homme, l'identification des Treg est plus délicate. Il est décrit actuellement que la population CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁺ est une population lymphocytaire hétérogène (Miyara et al., 2009). Ainsi, au sein de la population Foxp3⁺ nous retrouvons les Treg naïfs, les Treg effecteurs, mais également des lymphocytes T effecteurs activés. Les Treg naïfs ont été caractérisés par leur expression du CD45RA (marqueur des cellules naïves) et par une faible expression en Foxp3 (Fritzsching et al., 2006; Fuchizawa et al., 2007; Miyara et al., 2009; Valmori et al., 2005). Ces lymphocytes ont un pouvoir suppresseur et sont présents dans le sang périphérique de l'homme et en grande quantité dans le sang de cordon.

Chez l'homme, Les Treg ont longtemps été identifiés sur la base de leur forte expression de Foxp3 et CD25 (Dieckmann et al., 2001). Cependant, cette méthode ne prend pas en compte les Treg naïfs qui expriment faiblement ces deux marqueurs. L'expression du CD25 associée à une faible expression du CD127 (récepteur alpha à l'IL-7) a également été utilisée pour identifier les Treg, mais ne permet pas de discriminer les lymphocytes T effecteurs activés présentant aussi ces caractéristiques (Seddiki et al., 2006). Finalement, l'association de l'expression du CD25 et du CD45RA permet d'identifier les Treg naïfs et effecteurs (Miyara et al., 2009). Les lymphocytes T CD4 possédant un réel pouvoir régulateur comprennent : les Treg naïfs, qui expriment le CD25, le CD45RA et faiblement Foxp3, et les Treg effecteurs, qui expriment fortement aussi bien le CD25 que Foxp3, sans exprimer le CD45RA. Par contre, les lymphocytes T exprimant de façon intermédiaire à la fois le CD25 et Foxp3, sans exprimer le CD45RA, sont identifiés comme des lymphocytes T effecteurs activés sans pouvoir régulateur. De plus, ces derniers produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , contrairement aux Treg naïfs et effecteurs. Les Treg naïfs ont un fort potentiel de prolifération *in vivo* et *in vitro*, et se convertissent en Treg effecteurs après stimulation par leur TCR. Le transfert des Treg naïfs chez la souris NOG et l'étude de l'expansion clonale chez des donneurs volontaires a permis de démontrer que les Treg effecteurs provenaient de l'activation des Treg naïfs. Tout comme les Treg naïfs, les Treg effecteurs ont un pouvoir

régulateur mais ne prolifèrent en revanche pas *in vitro*. L'expression du marqueur de prolifération, Ki-67, *ex vivo* par les Treg effecteurs correspondrait au niveau de prolifération et d'expansion clonale des Treg naïfs (Figure. 5).

L'expression de Ki-67 sur les Treg effecteurs corrèle aussi avec l'expression du HLADR (CMH de classe II DR⁺) et de ICOS qui ont déjà été décrits pour délimiter des sous-populations de Treg effecteurs (Baecher-Allan et al., 2006; Ito et al., 2008).

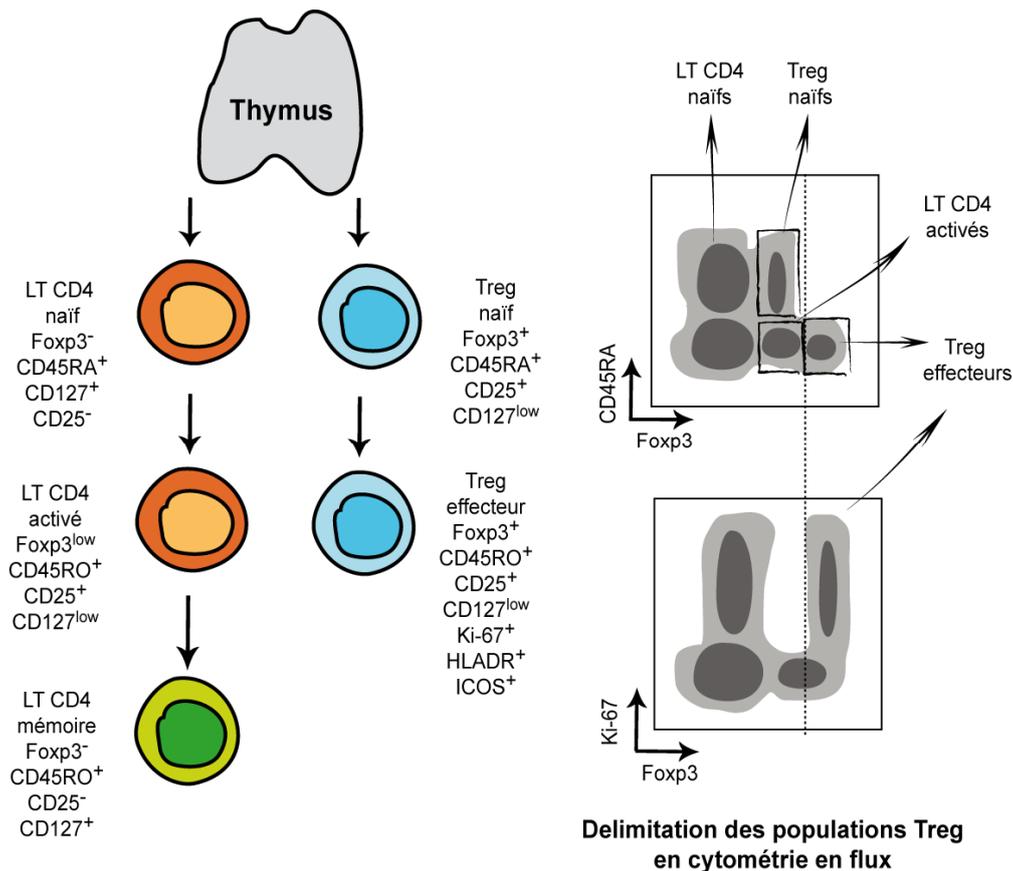


Figure. 5 Différenciation et délimitation des populations Treg chez l'homme. Les Treg chez l'homme sont constitués de cellules naïves et de cellules effectrices. La délimitation de ces cellules se caractérise pour les Treg naïfs par l'expression de FoxP3, du CD25 et du CD45RA. Le contact avec l'antigène va provoquer une forte prolifération des Treg naïfs et la différenciation en Treg effecteurs caractérisés par l'expression de Foxp3, du CD25 et de Ki-67 (elles auront perdu l'expression du CD45RA). L'expression de Foxp3 est aussi retrouvée sur les lymphocytes T CD4 (LT) au cours de leur activation. Ainsi, toute cellule Foxp3⁺ n'est pas forcément un Treg.

1.2.3. Les mécanismes de suppression des Treg chez l'homme

La caractérisation des mécanismes et du pouvoir suppresseur des Treg humains est limitée à des tests fonctionnels *in vitro*. Les Treg ont la capacité d'inhiber la prolifération des cellules cibles après stimulation du TCR. Le mécanisme précis de suppression des Treg chez l'homme n'est pas totalement élucidé bien que de nombreuses études, *in vitro* et *in vivo* chez la souris, démontrent l'implication de différents mécanismes (Shevach, 2009). Ceci inclut la modulation de l'environnement en cytokines, la dérégulation du métabolisme de la cellule cible, l'altération de la cellule présentatrice d'antigènes (principalement les cellules dendritiques) et la cytolyse. L'action des Treg chez l'homme est principalement décrite comme dépendante de leur contact avec la cellule cible, cependant cette action suppressive peut également passer par la production de cytokines immunorégulatrices (ex : TGF- β) ou par l'inhibition de la cellule présentatrice de l'antigène selon le modèle étudié (Figure. 6).

L'implication du CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) semble indispensable à l'action suppressive des Treg Foxp3⁺ *in vivo* chez la souris (Wing et al., 2008). En effet, ce dernier exerce une action directe sur la cellule présentatrice d'antigène provoquant ainsi une diminution de son pouvoir de co-stimulation, et par conséquent, une diminution de l'activation des lymphocytes T par cette cellule présentatrice d'antigène. Son expression est élevée sur les Treg effecteurs humains (Miyara et al., 2009). LAG3 (lymphocyte activation gene 3) joue un rôle direct sur les lymphocytes T, *in vitro* et *in vivo* chez la souris, par l'inhibition de la signalisation du CMH de classe II (CMH II) (Huang et al., 2004). Les Granzymes A et B sont plutôt impliqués dans la lyse des cellules cibles. Leur expression et implication sont retrouvées aussi bien chez la souris que chez l'homme (Cao et al., 2007; Grossman et al., 2004). L'interaction CD95 / CD95L (communément appelé Fas / Fas ligand) va induire l'apoptose de la cellule cible (Strauss et al., 2009). Cette étude montre que chez des patients atteints de cancer, les Treg expriment le CD95L et sont capables d'induire l'apoptose des lymphocytes T CD8 activés exprimant Fas, et non des CD4. Les Treg sont aussi décrits comme ayant la capacité de modifier l'environnement en cytokines. Leur expression en CD25, les rend capables de séquestrer l'IL-2 et créer

ainsi une compétition avec les lymphocytes T effecteurs en cours d'activation pour la consommation de cette cytokine (Pandiyan et al., 2007). Différentes cytokines immunosuppressives sont aussi décrites comme impliquées dans le mécanisme suppresseur des Treg. Le TGF- β , sécrété par les Treg murins, est impliqué dans la tolérance par l'induction de Treg induits (iTreg) (Andersson et al., 2008). L'IL-10 est décrit comme une cytokine immunosuppressive impliquée dans la suppression des cellules présentatrices de l'antigène par les Treg chez l'homme, et aussi dans l'inhibition des lymphocytes T chez la souris (Ito et al., 2008; Shevach, 2009). La Galectine 1, exprimée préférentiellement par les Treg humains, va provoquer l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules cibles (Garin et al., 2007).

La multiplication des mécanismes de suppression des Treg suscite beaucoup de discussions. La recherche sur le dysfonctionnement des Treg dans diverses maladies se limite à des études quantitatives et/ou qualitatives, notamment par la mise en place de tests fonctionnels de suppression *in vitro*.

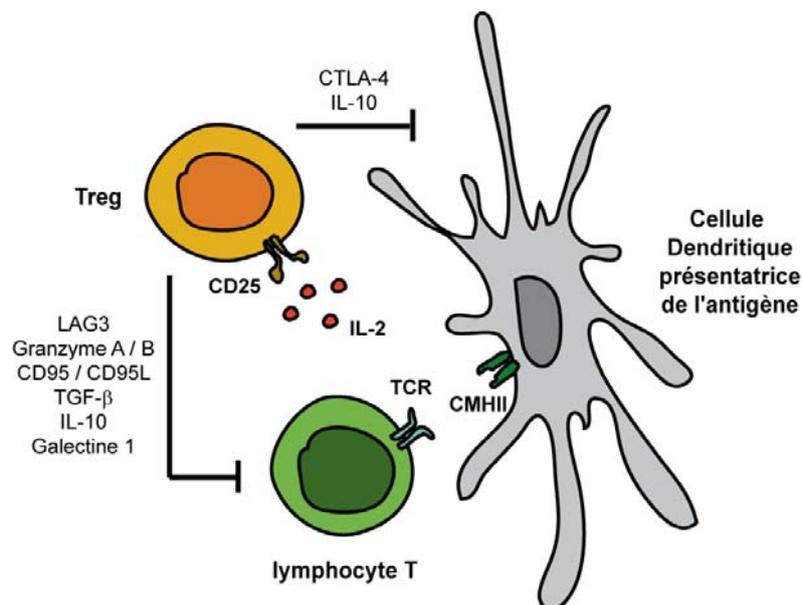


Figure. 6 Mécanismes de suppression des Treg. Les Treg exercent leurs pouvoirs suppresseurs aussi bien sur les cellules présentatrices de l'antigène que sur les lymphocytes T. Cette suppression peut être contact dépendant (CTLA-4, LAG3, CD95L, Granzyme, TGF- β) ou peut passer par la sécrétion de cytokines (IL-10, Galectine 1, TGF- β).

1.2.4. L'implication des Treg en recherche clinique

Les Treg sont au cœur d'intenses recherches du fait de leur importance dans le contrôle de la réponse immunitaire. Ils sont devenus une cible incontournable pour la thérapie cellulaire de patients atteints de maladies auto-immunes ou atteints de GVH (maladie du greffon contre l'hôte) après greffe allogène. Ainsi, l'expansion de ces cellules, pour les transférer aux patients, a pour but d'enrayer la maladie auto-immune ou encore de limiter la GVH. Cependant, l'hétérogénéité des populations CD25⁺ Foxp3⁺, contenant une population non négligeable CD45RO⁺ Foxp3^{low} non suppressive, remet en question l'isolement des Treg sur l'expression du CD25 pour leur expansion à but thérapeutique. L'utilisation de la population Treg naïve semble une alternative intéressante sachant qu'elle possède un fort potentiel de prolifération contrairement aux Treg effecteurs (Sakaguchi et al., 2010).

Les Treg n'ont pas toujours un rôle bénéfique dans la réponse immunitaire. Il est décrit que ces cellules ont la capacité de bloquer la réponse anti-tumorale et que leur inhibition permet un rejet de la tumeur dans différents modèles murins (Colombo and Piconese, 2007). A l'inverse, la diminution voire la disparition des Treg peut augmenter l'immunité anti-infectieuse en augmentant la réponse des lymphocytes T effecteurs (Lund et al., 2008). Cette dualité dans l'action des Treg montre que l'utilisation ou le ciblage de cette population mérite une attention particulière. Par exemple, l'inhibition des Treg dans le cas du cancer peut aboutir à de l'auto-immunité, et leur expansion dans le cas des maladies auto-immunes peut entraîner l'émergence de cancers et d'infections (Figure. 7).

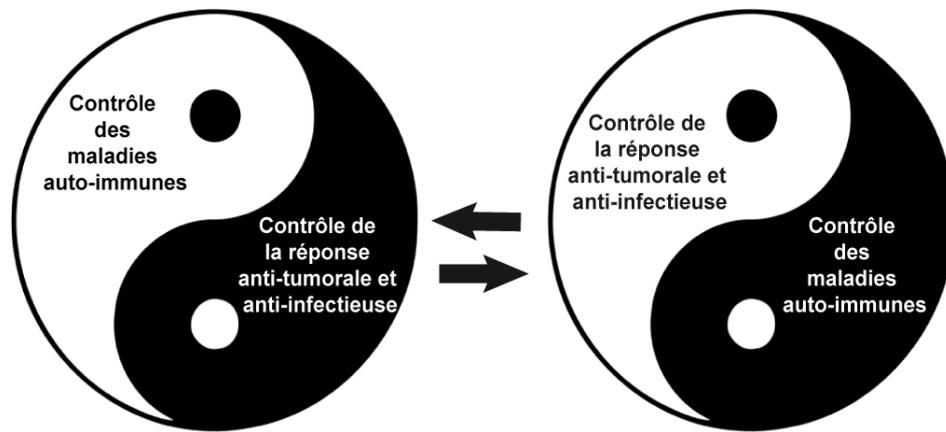


Figure. 7 Dualité de la fonction des Treg : le Yin et le Yang. L'expansion des Treg dans le cas des maladies auto-immunes diminue la réponse anti-tumorale et anti-infectieuse. D'autre part, l'inhibition des Treg augmente la réponse anti-tumorale mais diminue le contrôle de l'émergence des maladies auto-immunes.

La caractérisation et la compréhension des Treg depuis leur mise en évidence dans la tolérance immunologique en 1995 a beaucoup évolué (Sakaguchi et al., 1995). Cette population reste un point important pour la recherche de nouvelles thérapies, mais diverses questions restent encore en suspens, notamment concernant la mise en évidence d'un marqueur spécifique de la population Treg qui permettrait de mieux la cibler par l'utilisation d'anticorps monoclonaux (Sakaguchi et al., 2010).

1.3. L'homéostasie des lymphocytes T chez l'homme

L'homéostasie est définie comme la capacité d'un organisme vivant à maintenir ses constantes biologiques face aux contraintes extérieures.

L'homéostasie des lymphocytes T implique un équilibre dynamique de ces différentes populations lymphocytaire pour le maintien d'une réponse immunitaire capable d'éliminer et de contrôler la prolifération des pathogènes. Cet équilibre passe par la capacité de l'organisme à générer des lymphocytes T effecteurs capables d'éliminer les pathogènes mais aussi à créer des lymphocytes T mémoires pour une protection plus efficace à long terme. Ainsi, il existe un équilibre entre les lymphocytes T naïfs, à l'origine de la génération de nouveaux lymphocytes effecteurs et mémoires, et les lymphocytes T mémoires, qui permettent une protection efficace face aux pathogènes déjà rencontrés. Chez l'homme, divers paramètres peuvent influencer l'homéostasie des lymphocytes T, tels que l'âge et l'état pathologique de la personne, et aboutir à un dérèglement de cette constance.

1.3.1. Les lymphocytes T mémoires

La réponse immunitaire se caractérise par l'acquisition d'une mémoire contre le pathogène rencontré. L'activation spécifique de l'antigène des lymphocytes T naïfs provoque une forte expansion clonale qui aboutit à la différenciation en lymphocytes T effecteurs. La majorité de ces cellules vont mourir durant la phase de contraction, et seulement une faible partie de cellules vont former le pool de lymphocytes mémoires, qui se maintiendront longtemps après immunisation. Cette mémoire immunitaire permettra une meilleure réponse lors d'une seconde rencontre avec l'antigène. Elle sera plus rapide, plus sensible et plus efficace (Figure. 8).

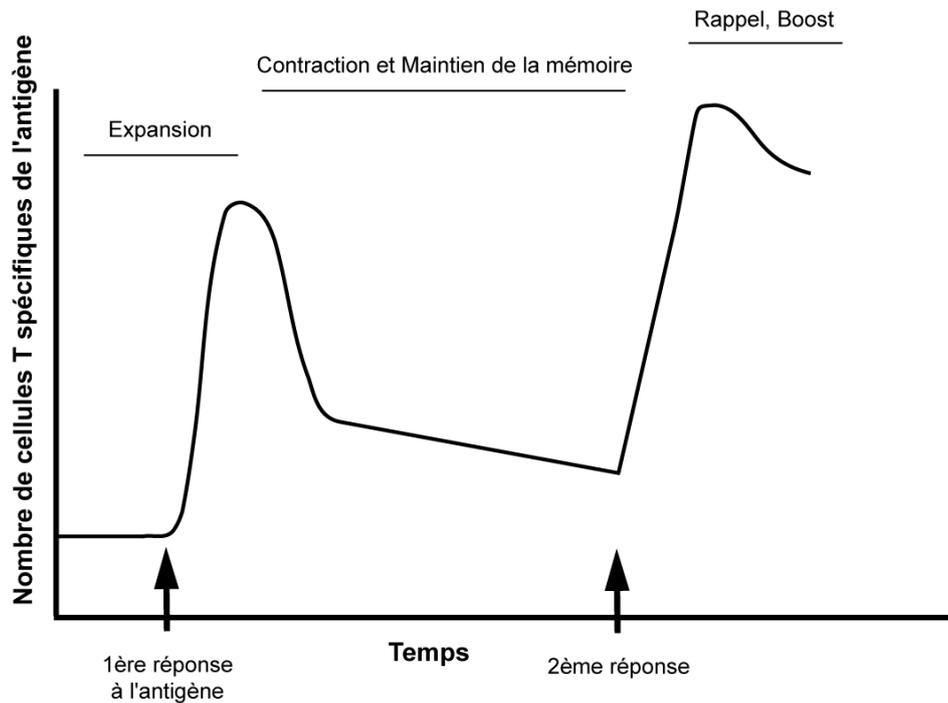


Figure. 8 Acquisition de la mémoire immunitaire. Après rencontre avec un antigène l'organisme acquiert une mémoire vis-à-vis de cet antigène qui permet une seconde réponse plus efficace. La phase d'expansion est la phase effectrice qui permet d'éliminer le pathogène. Lors de la phase de contraction la majorité des cellules effectrices meurent et seulement une faible partie de cellules survivent pour constituer le pool mémoire.

Le pool de lymphocytes T mémoires n'est pas homogène, mais deux catégories de lymphocytes T mémoires se distinguent : les lymphocytes T mémoires effecteurs ($CCR7^- CD45RA^-$) et les lymphocytes T mémoires centraux ($CCR7^+ CD45RA^-$) (Sallusto et al., 1999). Cette représentation est la plus étudiée même si la caractérisation et la classification des cellules mémoires sont encore à approfondir et sont sujettes à discussions (Jameson and Masopust, 2009).

1.3.1.1. Les lymphocytes T mémoires centraux et effecteurs

Les lymphocytes T mémoires effecteurs (TEM) sont caractérisés par un fort potentiel effecteur (production d'IFN- γ et perforine) sur les sites d'inflammation périphériques, mais ils ont une faible durée de vie et un faible potentiel de prolifération après une activation spécifique de l'antigène. Les lymphocytes T mémoires centraux (TCM) sont impliqués dans la réponse mémoire centrale au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Ils ont peu de pouvoir effecteur, mais ont un fort potentiel de prolifération en réponse à l'antigène, ce qui aboutit à leur différenciation en lymphocytes effecteurs. Les TCM ont une longue durée de vie et participent à la mémoire immunitaire à long terme (Sallusto et al., 2004).

L'expression du récepteur aux chemokines CCR7 est essentiellement retrouvée sur les TCM (CCR7⁺ CD45RA⁻) et sur les lymphocytes T naïfs (CCR7⁺ CD45RA⁺) et est indispensable à la migration et la localisation de ces cellules dans les organes lymphoïdes secondaires, lieu de prédilection pour la première réponse immunitaire et la rencontre avec les cellules dendritiques matures présentant l'antigène (Forster et al., 1999). Les TEM n'expriment pas CCR7 et sont donc destinés à migrer en périphérie vers les sites d'inflammation. Leurs fortes capacités effectrices (production d'IFN- γ pour les CD4 et perforine pour les CD8) les rendent très utiles pour une protection immédiate et rapide.

Il existe chez l'homme une population effectrice mémoire qui exprime le CD45RA sans pour autant être une population naïve. Cette population est décrite comme effectrice en différenciation terminale (TEMRA : CCR7⁻ CD45RA⁺). Essentiellement retrouvée chez les lymphocytes T CD8, elle possède une plus grande capacité de production de perforine (qui caractérise l'activité cytotoxique) mais une durée de vie plus faible que les TEM classiques (Geginat et al., 2003; Sallusto et al., 1999). Il est encore difficile de déterminer avec précision le rôle des TEMRA. Il est décrit que ces cellules émergent de la différenciation des TCM et ce, de manière dépendante des cytokines (Geginat et al., 2003). Paradoxalement, les TEMRA sont aussi décrits comme étant une population effectrice en cours de différenciation (Rufer et al., 2003). De plus, cette population CD8 TEMRA est

augmentée significativement chez les personnes âgées à cause d'une fragilité de l'homéostasie de leurs lymphocytes T (Czesnikiewicz-Guzik et al., 2008). Il semblerait que cette population reflète une forte activité des lymphocytes T CD8 effecteurs après une infection virale (Akondy et al., 2009; Cantisan et al., 2010). Sur ces observations, nous pouvons émettre l'hypothèse que la population CD8 TEMRA est une population transitoire au fort potentiel effecteur qui reflète une instabilité et/ou une forte activité du système immunitaire. Ainsi, il est possible d'isoler les populations naïves, TCM, TEM et TEMRA en utilisant les marqueurs CD45RA et CCR7 par la méthode de cytométrie en flux (Figure. 9).

Cependant, il est clair que ces sous-types de lymphocytes T mémoires (TCM, TEM, TEMRA) sont hétérogènes et regroupent aussi bien des cellules Th1, Th2 et Th17. Les Tfh ont plutôt un profil TCM bien qu'ils n'expriment pas CCR7, et sont localisés dans les organes lymphoïdes secondaires au niveau des centres germinatifs grâce à l'expression de CXCR5. Parmi les CD8, les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) producteurs de perforine, sont majoritairement retrouvés dans le compartiment TEMRA et les lymphocytes T effecteurs producteurs d'IFN- γ principalement dans le compartiment TEM (Sallusto et al., 1999).

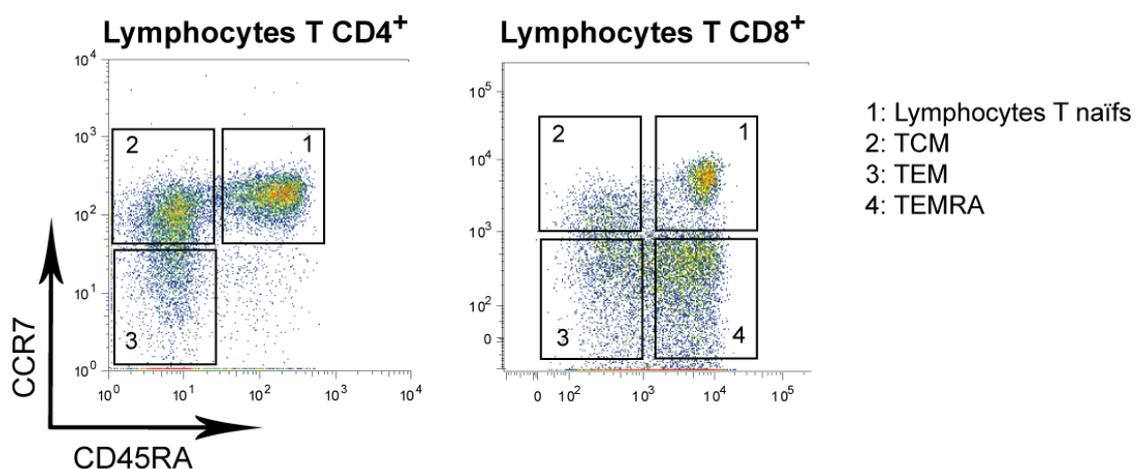


Figure. 9 Délimitation des populations naïves et mémoires dans le sang périphérique.

Par la technique de cytométrie en flux, il est possible d'identifier les différents lymphocytes T naïfs et mémoires grâce aux marqueurs CCR7 et CD45RA. Lymphocytes T naïfs : CCR7⁺ CD45RA⁺ ; TCM : CCR7⁺ CD45RA⁻ ; TEM : CCR7⁻ CD45RA⁻ et TEMRA : CCR7⁻ CD45RA⁺.

1.3.1.2. La différenciation des lymphocytes T mémoires

Dans les organes lymphoïdes secondaires les lymphocytes T naïfs vont s'activer au contact d'une cellule dendritique via l'interaction de leur TCR avec le CMH présentant l'antigène (DC). Cette activation va aboutir à une forte expansion clonale. A ce niveau, une grande partie des lymphocytes T naïfs vont se différencier en lymphocytes T effecteurs producteurs d'IFN- γ , de perforine et de granzyme. Ces lymphocytes ont une courte durée de vie et vont être éliminés lors de la phase de contraction. C'est à ce moment que se constitue la formation des lymphocytes T mémoires TEM et TCM. Chez la souris, l'existence de précurseurs de ces lymphocytes T mémoires, identifiables lors de la phase d'expansion par une faible expression du KLRG1, a été décrite (Jameson and Masopust, 2009). Mais, chez l'homme, la présence de ces précurseurs mémoires n'est pas clairement définie, bien qu'il ait été suggéré que les lymphocytes T naïfs conservant l'expression du CCR7 lors de la phase d'expansion, seraient des précurseurs des TCM (Sallusto et al., 2004) (Figure. 10).

Lors de la seconde réponse à l'antigène les lymphocytes T mémoires vont s'activer et se différencier en lymphocytes T effecteurs. Les TEM auront une forte activité effectrice avant d'entrer rapidement en apoptose. Ce processus est d'autant plus marqué avec les TEMRA. En revanche, les TCM vont proliférer et se différencier en lymphocytes T effecteurs caractérisés par la perte de l'expression de CCR7, et ainsi migrer en périphérie (Geginat et al., 2003).

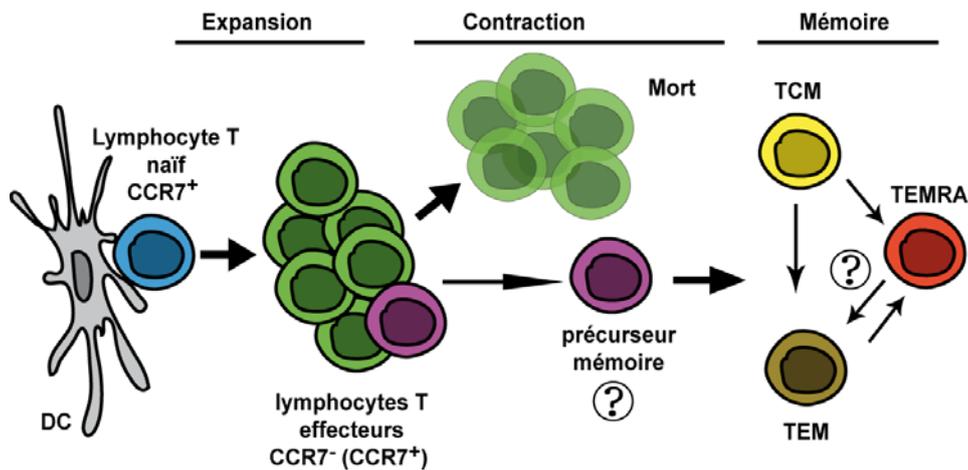


Figure. 10 Différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T mémoires. Au contact de l'antigène, les lymphocytes T naïfs vont fortement proliférer et se différencier en lymphocytes T effecteurs. La majorité de ces cellules va mourir lors de la phase de contraction. Seulement les précurseurs mémoires vont survivre et permettre l'acquisition des lymphocytes T mémoires TCM, TEM et TEMRA. A ce niveau, les TCM ont la capacité de se différencier en TEM ou TEMRA après une réactivation par l'antigène.

1.3.2. L'homéostasie des lymphocytes T mémoires et naïfs

Pour le maintien d'une bonne répartition des compartiments mémoires et naïfs, plusieurs facteurs jouent des rôles primordiaux :

- le thymus, qui permet un renouvellement constant en lymphocytes T naïfs pour alimenter de nouveau la population mémoire.
- la présence et l'efficacité des Treg (voir chapitre I) a. ii.)
- l'environnement en cytokines qui est indispensable à la survie, à la prolifération et à la différenciation des lymphocytes T, naïfs et mémoires.

L'organisme doit pouvoir renouveler et contrôler ses lymphocytes T après un épisode infectieux, qui aura provoqué une forte expansion de lymphocytes T effecteurs à courte durée de vie.

1.3.2.1. Le rôle du thymus

Chez l'individu jeune, le thymus (la source majeure en lymphocytes T naïfs) est très développé et de ce fait il y a prédominance des lymphocytes T naïfs. Avec l'âge le thymus s'atrophie et la production en lymphocytes T naïfs diminue. De plus, l'exposition continue aux antigènes aboutit à l'accumulation de lymphocytes T mémoires (Figure.11). Il a été montré que la réduction du nombre de lymphocytes T naïfs avec l'âge va de pair avec une diminution de la production thymique (Kilpatrick et al., 2008). Par ailleurs, l'augmentation du compartiment mémoire n'est pas homogène selon les populations TCM, TEM et TEMRA et le type CD4 ou CD8 des lymphocytes T. Aussi bien pour les lymphocytes T CD4 que pour les lymphocytes T CD8, c'est principalement la population TEM qui augmente significativement avec l'âge (Zou et al., 2009). De plus, au sein des CD8, la population TEMRA augmente plus significativement avec l'âge et s'accompagne d'une diminution en lymphocytes T naïfs beaucoup plus marquée que pour les CD4 (Czesnikiewicz-Guzik et al., 2008; Hong et al., 2004; Zou et al., 2009). En revanche, qu'il s'agisse des lymphocytes T CD4 ou des lymphocytes T CD8, la population TCM ne varie pas significativement avec l'âge.

Les Treg évoluent également de la même manière. En effet, les Treg naïfs diminuent significativement en réponse à une production thymique qui diminue avec l'âge (Fritzsching et al., 2006; Fuchizawa et al., 2007; Valmori et al., 2005). L'acquisition d'une mémoire à long terme pour les Treg n'est pas totalement élucidée, et une augmentation avec l'âge des Treg effecteurs Ki-67⁺ est également observée (Miyara et al., 2009).

La connaissance de cet effet de l'âge est utile pour comprendre l'évolution de certaines pathologies, notamment dans le cas des maladies auto-immunes. En ce qui concerne les syndromes myélodysplasiques, une corrélation a été observée entre le dérèglement de l'homéostasie des lymphocytes T et l'auto-immunité, suite à des thérapies immunosuppressives (Zou et al., 2009). La réduction du nombre de lymphocytes T naïfs avec l'âge peut être accélérée dans certaines pathologies notamment lors d'immunodéficiences sévères ou de maladies auto-immunes et/ou inflammatoires comme la sclérose en plaques. Cette réduction est associée à une

faible production thymique et à une augmentation de la prolifération périphérique avec accumulation de lymphocytes T mémoires (Duszczyszyn et al., 2010; Giovannetti et al., 2007). L'étude de la population des Treg naïfs est aussi importante, surtout dans le cas des maladies auto-immunes dans lesquelles elles jouent un rôle primordial. Ainsi, il est décrit que dans le cas des scléroses en plaques, la population des Treg naïfs est fortement réduite en raison d'un défaut de production thymique, ce qui pourrait avoir des conséquences néfastes dans l'évolution de la pathologie (Venken et al., 2008). Dans l'ensemble de ces travaux, l'étude de la population naïve est corrélée avec l'âge, ce qui permet d'avoir une vue globale des dérèglements de l'homéostasie au cours du développement.

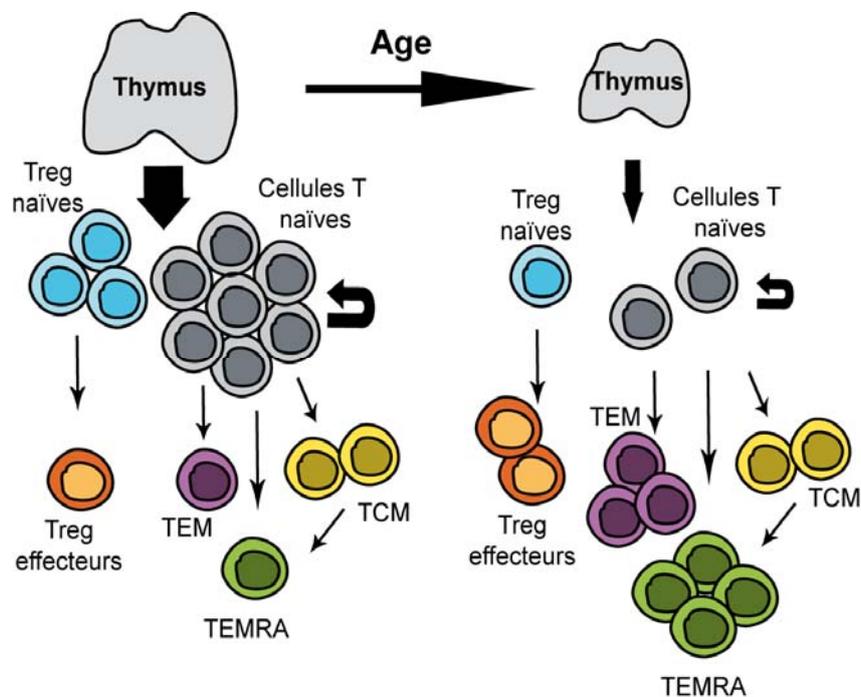


Figure. 11 Evolution des compartiments naïfs et mémoires avec l'âge. Avec l'âge, le Thymus s'atrophie et la production en lymphocytes T naïfs diminue. Ceci aboutit à l'accumulation de lymphocytes T mémoires essentiellement TEM et TEMRA. L'âge est un paramètre important à prendre en compte lors des études du compartiment lymphocytaire T chez l'homme.

1.3.2.2. L'efficacité des Treg

Le thymus joue un rôle central pour la néo génération des lymphocytes T naïfs mais il n'est pas le seul à influencer l'homéostasie de ces cellules. L'environnement en cytokines et la présence des Treg jouent aussi un rôle primordial pour contrôler l'homéostasie des lymphocytes T. Ainsi, chez des patients atteints de mutation sur le gène *FOXP3*, la diminution drastique en Treg naïfs est corrélée avec la sévérité du syndrome IPEX (cf. chapitre I. a. ii.) (Fuchizawa et al., 2007). De plus, une accumulation en lymphocytes T mémoires est observée chez des patients présentant des syndromes IPEX, accumulation qui serait la conséquence d'une diminution en Treg (Costa-Carvalho et al., 2008).

1.3.2.3. L'environnement en cytokines

L'homéostasie des lymphocytes T naïfs, indépendamment d'une néo production thymique, est caractérisée par une faible prolifération en périphérie qui dépend du contact avec des auto-antigènes et de l'environnement en cytokines. L'IL-7 joue un rôle important à ce niveau et permet la survie des lymphocytes T naïfs. Ainsi, l'inhibition de l'IL-7 sera délétère pour la survie des lymphocytes T naïfs, alors que sa surexpression entrainera au contraire, une augmentation du pool de lymphocytes T naïfs. Au niveau des lymphocytes T mémoires, l'IL-7 permet la survie de ces cellules et l'IL-15 est indispensable à leur prolifération (Surh and Sprent, 2008).

Dans certains cas, la prolifération engendrée par l'environnement en cytokines peut être néfaste pour l'organisme. Ainsi, dans le cas des lymphopénies provoquées, les lymphocytes T naïfs vont fortement proliférer (LIP : lymphopenia induced proliferation), sous l'influence de l'IL-7 et de la forte affinité pour des auto-antigènes, afin de reconstituer un pool en lymphocytes T normal, caractérisé par l'accumulation de lymphocytes T mémoires et pouvant provoquer l'émergence de maladies auto-immunes (Datta and Sarvetnick, 2009; Surh and Sprent, 2008). Bien que chez l'homme la lymphopénie, provoquée par une réduction de la production thymique ou

suite à une infection virale ou à une apoptose prononcée des lymphocytes T, soit associée aux maladies auto-immunes telles que le diabète de type I, la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux ou la maladie coeliaque, peu d'études ont montré le rôle central de l'IL-7 dans ces pathologies (Datta and Sarvetnick, 2009). Néanmoins, chez des patients atteints du diabète de type I et ayant reçu une transplantation d'îlots de langerhans en association à un traitement immunosuppresseur, il est observé une lymphopénie associée à une augmentation de l'IL-7 sérique, du nombre de lymphocytes T en prolifération et du nombre de clone T auto-réactifs (Monti et al., 2008). D'autre part, dans un modèle murin de diabète induit et ayant reçu un traitement lymphopénique à la cyclophosphamide, l'inhibition de l'IL-7 exogène par un anticorps bloquant permet d'atténuer l'émergence du diabète associé à la prolifération homéostatique des lymphocytes T auto-réactifs (Calzascia et al., 2008).

Il existe un autre type de lymphoprolifération, liée à l'auto-immunité, qui est indépendant d'une lymphopénie. Chez les souris déficientes pour les récepteurs à l'IL-2 ou à l'IL-15 des lymphoproliférations dites dépendantes des cytokines (CIP : cytokines induced proliferation) sont observées. Dans ces cas, l'absence de récepteur va provoquer une accumulation de cytokines dans le micro environnement, entraînant une hyperactivation des lymphocytes T face aux auto-antigènes et conduisant ainsi à une lymphoprolifération et à l'émergence de maladies auto-immunes (Datta and Sarvetnick, 2009; Surh and Sprent, 2008).

1.4. L'importance du récepteur alpha à l'IL-2 (CD25) dans le maintien de l'homéostasie des lymphocytes T

L'interleukine 2 (IL-2) est une cytokine décrite comme un facteur de croissance indispensable pour la prolifération des cellules T *in vitro*. Cependant, *in vivo*, la fonction de l'IL-2 est plus complexe. En effet, les souris invalidées pour les gènes de l'*il2* ou de ses récepteurs (*il2ra*, *il2rb*) développent diverses maladies auto-immunes fatales et présentent une lymphoprolifération. Paradoxalement, l'IL-2 a donc une fonction régulatrice. Les différentes études sur les souris transgéniques ont permis de décrire l'importance de l'IL-2 pour l'homéostasie des Treg mais aussi pour celle des lymphocytes T mémoires et effecteurs (Letourneau et al., 2009; Malek and Castro, 2010). Nous nous intéresserons ici plus particulièrement à l'absence de l'IL-2R α ou CD25 (*il2ra*^{-/-}), en prenant soin de faire le parallèle avec les souris *il2*^{-/-}, *il2rb*^{-/-} (IL-2R β) et *il2rg*^{-/-} (γc).

1.4.1. Le récepteur alpha à l'IL-2 (CD25)

L'IL-2 est une cytokine de 15kDa composée de quatre courtes hélices alpha qui est produite essentiellement par les lymphocytes T lors de leur activation. L'IL-2 se fixe à son récepteur de haute affinité constitué de trois sous-unités : le récepteur alpha (IL-2R α ou CD25), le récepteur bêta (IL-2R β ou CD122) et une chaîne γc (CD132) (Figure. 13). On trouve ce récepteur principalement sur les Treg et sur les lymphocytes T activés. L'IL-2 se fixe dans un premier temps à l'IL-2R α par une faible interaction. La formation du complexe IL-2/IL-2R α provoque alors un léger changement de conformation de l'IL-2 lui permettant de s'associer à l'IL-2R β . Puis, le complexe IL-2/IL-2R α /IL-2R β recrute la chaîne γc facilitant ainsi la stabilisation du complexe (Letourneau et al., 2009; Malek and Castro, 2010).

La formation du complexe entre l'IL-2 et son récepteur permet la transduction du signal via les tyrosines kinases Jak1 et Jak3 associées à l'IL-2R β et à la chaîne γc . L'IL-2R α n'induit pas de signalisation mais participe activement à la formation du complexe de haute affinité. La phosphorylation des trois résidus tyrosines de la partie

cytoplasmique de l'IL-2R β permet l'activation des voies de signalisation kinases MAPK et Pi-3K et du facteur de transcription Stat5 (Figure. 12). Le complexe IL-2/IL-2R α /IL-2R β / γ c est rapidement internalisé et dégradé, mais le récepteur IL-2R α est recyclé à la surface, ce qui permet la formation de nouveaux complexes en présence d'une source continue d'IL-2 (Yu and Malek, 2001).

L'IL-2 a une très faible durée de vie *in vivo*, ainsi l'expression de son récepteur de haute affinité est indispensable aux lymphocytes T pour répondre aux faibles concentrations d'IL-2. L'IL-2R α est absent des lymphocytes T naïfs et mémoires mais est induit par activation de ces cellules. L'IL-2R β est exprimé sur les lymphocytes T mémoires et induit après activation à la surface des lymphocytes T naïfs. De plus, la population Treg est caractérisée par sa forte expression en IL-2R α . Ainsi, chaque population a une sensibilité différente à l'IL-2 et est plus ou moins affectée en absence d'IL-2.

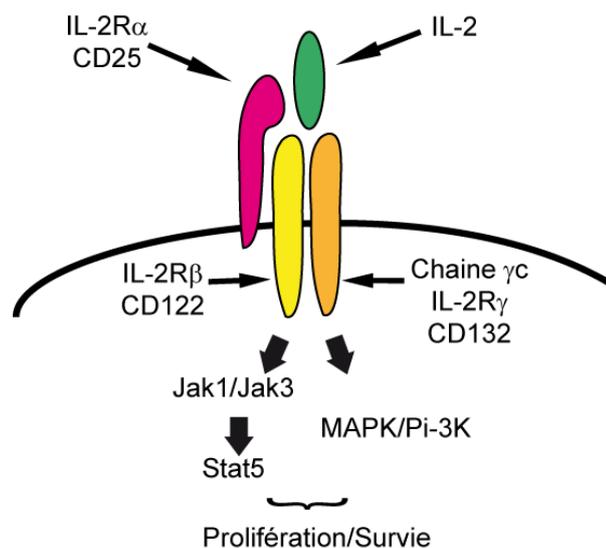


Figure. 12. Représentation du récepteur de haute affinité à l'IL-2 comprenant l'IL-2R α , l'IL-2R β et la chaîne γ c. La stabilisation de ce complexe permet la signalisation des kinases Jak1, Jak3, MAPK et Pi-3K et de l'activation du facteur de transcription Stat5. La signalisation de l'IL-2 joue un rôle important dans la survie et la prolifération cellulaire.

1.4.2. L'importance de l'expression du CD25 dans le maintien des Treg

La souris *il2ra*^{-/-} développe rapidement une lymphoprolifération caractérisée par l'élargissement des organes lymphoïdes secondaires avec une accumulation de lymphocytes T mémoires (Willerford et al., 1995). De plus, cette souris ne présente pas de défaut du développement thymique, mais développe diverses maladies auto-immunes avec l'âge. L'expression de l'IL-2R α est caractéristique de la population Treg Foxp3⁺, qui est indispensable pour contrôler le développement des maladies auto-immunes. Ainsi, l'étude des souris déficientes en l'IL-2 et en son récepteur a permis de mettre en évidence à quel niveau l'IL-2 intervient dans le maintien de cette population régulatrice, et sa responsabilité dans le développement des maladies auto-immunes.

Paradoxalement, les souris *il2*^{-/-}, *il2ra*^{-/-} et *il2rb*^{-/-} ont la capacité de générer des Treg Foxp3⁺ au niveau du thymus (D'Cruz and Klein, 2005; Fontenot et al., 2005; Yu et al., 2009a). Ceci démontre un rôle indépendant de l'IL-2 pour la génération des Treg. En revanche, l'inhibition de la signalisation de l'IL-2 passant par la chaîne γ c chez la souris γ c^{-/-} aboutit à l'absence totale de cellules Foxp3⁺ (Fontenot et al., 2005). Il est intéressant de noter que la proportion de Treg dans le thymus chez les souris *il2*^{-/-}, *il2ra*^{-/-} et *il2rb*^{-/-} est relativement plus faible que chez une souris WT (wild type) (Fontenot et al., 2005) et la restauration partielle de la signalisation passant par l'IL-2R β rétablit cette différence (Yu et al., 2009a). Il est ainsi suggéré qu'une faible signalisation de l'IL-2 est impliquée pour générer un pool normal de Treg. De plus, grâce aux modèles de souris *foxp3*^{gfp} *il2*^{-/-} et *il2ra*^{-/-}, permettant d'isoler facilement les Treg, il est montré que l'IL-2 n'est pas indispensable pour générer des Treg fonctionnels. En effet, *in vitro*, les Treg *il2ra*^{-/-} ou *il2*^{-/-} ont la capacité d'inhiber la prolifération des lymphocytes T (Fontenot et al., 2005).

L'IL-2 est principalement décrit comme ayant un rôle dans le maintien de la population Treg en périphérie. Ainsi, l'utilisation d'anticorps bloquant l'IL-2 va inhiber la prolifération des Treg en périphérie, provoquer leur diminution, et être associée au développement de gastrite auto-immune (Setoguchi et al., 2005). De plus, le transfert de lymphocytes T (contenant des Treg) *il2*^{-/-} ou *il2ra*^{-/-} ne permet pas de restaurer la

population Treg Foxp3⁺ chez l'hôte, ce qui montre un rôle indispensable de l'IL-2 dans le maintien de la population Treg en périphérie (Antony et al., 2006; Fontenot et al., 2005). Cette faible capacité de survie en périphérie des Treg pourrait expliquer le développement tardif des maladies auto-immunes chez la souris *il2ra*^{-/-}, mais n'explique pas la lymphoprolifération précoce au niveau des organes lymphoïdes secondaires (Willerford et al., 1995).

La souris *il2ra*^{-/-} présente des taux accrus d'IL-2 sérique supérieurs à ceux de la souris WT. Il est donc proposé que cette accumulation d'IL-2 sérique soit responsable de la lymphoprolifération caractérisée par l'accumulation de lymphocytes T CD8⁺ mémoires (Sharma et al., 2007). Le transfert de Treg de souris WT dans ce modèle permet de restaurer la population CD8⁺, et diminue fortement la concentration d'IL-2 sérique. Bien que les Treg des souris *il2ra*^{-/-} aient la capacité d'inhiber la prolifération des lymphocytes T *in vitro*, il semblerait que leur incapacité à consommer l'IL-2 *in vivo* favorise l'expansion de la population mémoire CD8⁺. De plus, l'utilisation d'anticorps anti-CD25 chez la souris WT induit l'apparition de maladies auto-immunes, qui se caractérisent par l'invalidation de la capacité suppressive des Treg mais pas de leur déplétion (Kohm et al., 2006). Ceci rejoint l'idée que la sensibilité à l'IL-2 est indispensable à la fonction suppressive des Treg *in vivo*. Il est aussi proposé que l'IL-2 agisse à deux niveaux sur les Treg en périphérie, en induisant leur survie, mais en favorisant aussi leurs capacités suppressives (Barron et al., 2010). L'invalidation de Bim, protégeant de l'apoptose mitochondriale, chez les souris *il2*^{-/-} et *il2ra*^{-/-} permet de restaurer le nombre de Treg en périphérie, mais ne permet pas de protéger les souris des symptômes auto-immuns. Chez ces souris *bim*^{-/-} *il2*^{-/-} l'utilisation du complexe anticorps anti-IL-2 et IL-2, qui augmente la demi-vie de l'IL-2 *in vivo* et évite l'action toxique de l'IL-2 à forte dose, (Boyman et al., 2006; Letourneau et al., 2010), permet de rétablir la capacité suppressive des Treg et prévient les maladies auto-immunes. L'IL-2 agit donc à différents niveaux sur la population Treg (Figure. 13).

1.4.3. L'importance du CD25 dans l'homéostasie des lymphocytes T

Les tests *in vitro* et l'utilisation de souris chimères, contenant des lymphocytes T *il2ra*^{-/-} ou *il2*^{-/-} dans un environnement WT, ont permis de déterminer le rôle de l'IL-2 sur le développement et la différenciation des lymphocytes T mémoires, et ce en évitant l'implication des Treg.

Il est intéressant de noter que l'IL-2 est important pour l'apoptose des lymphocytes T. Il est montré que l'absence d'IL-2 ou de l'IL-2R α sur les lymphocytes T ne permet pas l'apoptose induit par Fas après activation (AICD : activation induced cell death) (Van Parijs et al., 1997). Cette absence d'apoptose participerait activement à l'accumulation de lymphocytes T et à la lymphoprolifération observée chez la souris *il2ra*^{-/-}. De plus, l'inhibition de l'IL-2 favorise l'expansion des lymphocytes T CD8 mémoires et ce, par l'intermédiaire de l'IL15, qui partage l'IL-2R β pour induire son signal (Ku et al., 2000). Ainsi, l'IL-2 participe activement au contrôle de l'accumulation des lymphocytes T et il existe donc une balance entre l'IL-2 et l'IL-15 pour le contrôle du pool de lymphocytes T mémoires.

L'expression de l'IL-2R α et la présence de l'IL-2, au cours de l'activation des lymphocytes T *in vitro*, est indispensable à la génération et la survie des lymphocytes T mémoires à long terme après transfert *in vivo*. Ceci suggère un rôle important de l'IL-2 dans l'acquisition d'une mémoire spécifique de l'antigène (Dooms et al., 2007). Cependant, l'action de l'IL-2 dans la différenciation des lymphocytes T mémoires *in vivo* semble plus complexe. Les lymphocytes T CD8 de souris *il2ra*^{-/-} sont capables de répondre à des antigènes viraux *in vivo* et de développer une mémoire vis-à-vis de cet antigène. Mais, ces lymphocytes T mémoires présentent un défaut de réponse lors d'une deuxième rencontre avec l'antigène, caractérisé par une apoptose et une faible production d'IFN- γ ou une faible capacité d'expansion (Bachmann et al., 2007; Williams et al., 2006). Il est proposé qu'au niveau des lymphocytes T CD8, l'IL-2 soit indispensable à la différenciation en cellules TEM (cf : chap I. b. i. (Mitchell et al., 2010)). Cependant, Obar *et al*, montre que l'IL-2 intervient au niveau des lymphocytes T effecteurs lors de la seconde réponse, et est indispensable pour leur génération (Obar et al., 2010). Dans cette étude, les auteurs ne montrent pas de

défaut majeur de la formation du pool mémoire TEM. Ainsi, l'IL-2 serait important pour la génération des lymphocytes T effecteurs et mémoires, alors que l'IL15 serait impliquée dans leur survie et leur prolifération (Ku et al., 2000; Mitchell et al., 2010).

De plus, la présence de l'IL-2 lors de la phase d'expansion est indispensable à la génération de lymphocytes T effecteurs fonctionnels. La sensibilité des lymphocytes T à l'IL-2, au cours de leur activation, prédéfinit l'orientation de ces cellules vers la différenciation en lymphocytes T effecteurs ou mémoires. Ainsi, lors d'infection virale, les lymphocytes T CD8⁺ ayant une faible expression de l'IL-2R α vont persister plus longtemps, alors que les lymphocytes T ayant une forte expression de l'IL-2R α vont répondre rapidement et fortement à l'antigène (Kalia et al., 2010). Ceci reprend l'idée qu'une forte sensibilité à l'IL-2 permet l'émergence de lymphocytes T effecteurs, alors qu'une faible sensibilité à l'IL-2 ou la présence d'IL15 favorise l'émergence de lymphocytes T mémoires de type TCM. L'IL-2 permet l'augmentation de T-bet, et la diminution d'Eomes et de Bcl-6, qui favorisent la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs, en induisant l'expression de la granzyme B et de la perforine, indispensable à la fonction cytotoxique de ces cellules (Pipkin et al., 2010). Ainsi, les lymphocytes T CD8⁺ *il2ra*^{-/-} ne peuvent pas se différencier en lymphocytes T effecteurs fonctionnels. Ces lymphocytes présentent une augmentation de Bcl-6 et une diminution en granzyme B et en perforine, et ont en conséquence une faible activité cytotoxique. Néanmoins, ces cellules ont la capacité de produire de l'IFN- γ qui pourrait participer à l'inflammation et au développement de maladies auto-immunes chez la souris *il2ra*^{-/-}.

L'IL-2 joue un rôle complexe lors de la réponse immune et exerce une fonction à différents niveaux (Figure. 13). D'une part, elle permet le contrôle de l'expansion des lymphocytes T, et d'autre part, la différenciation des lymphocytes T effecteurs et mémoires lors d'infections virales. Cependant, la souris *il2ra*^{-/-} développe diverses maladies auto-immunes, ce qui suggère une présence importante de lymphocytes T effecteurs. Il n'est pas à exclure qu'en absence de la signalisation de l'IL-2, les lymphocytes T auto-réactifs se différencient en cellules pro-inflammatoires, productrices d'IFN- γ , grâce à l'IL-15.

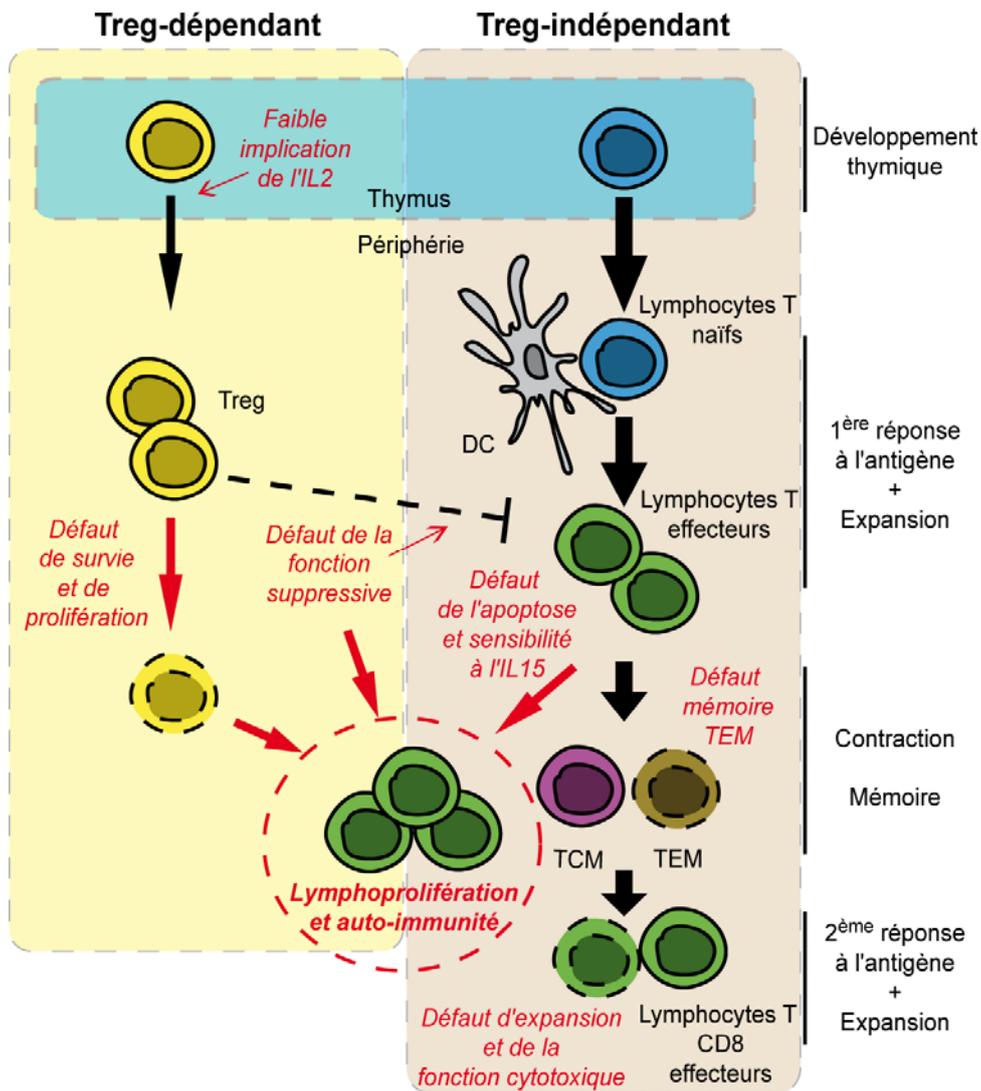


Figure. 13. Descriptif des différentes implications de l'IL-2 sur l'homéostasie des lymphocytes T chez la souris *il2ra*^{-/-}. L'absence de signalisation de l'IL-2 chez la souris *il2ra*^{-/-} provoque un défaut de survie des Treg en périphérie, un défaut de leur fonction suppressive, une lymphoprolifération, un défaut de la génération des lymphocytes T mémoires et un défaut qualitatif des lymphocytes T effecteurs cytotoxiques.

1.4.4. Les anomalies et déficiences du gène *IL-2RA* chez l'homme

La recherche sur le génome de SNP (Single Nucleotid Polymorphism) ont révélé que des polymorphismes sur le gène *IL2RA* étaient associés à des maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaque, le diabète de type 1 ou encore la maladie de Basedow (Alcina et al., 2009; Brand et al., 2007). Dans le cas du diabète de type 1, une étude a montré que les Treg de ces patients présentaient un défaut dans la signalisation de l'IL-2, une diminution de la phosphorylation de Stat5 et une plus faible survie *in vitro* (Long et al., 2010). Bien que ces patients ne présentent pas de défaut d'expression du CD25 et n'aient pas d'anomalies génétiques particulières, ces différentes études montrent une relation entre le développement de maladies auto-immunes et le gène d'*IL2RA*.

Chez l'homme les mutations sur le gène *IL2RA* sont rares et peu décrites. Il existe à ce jour seulement deux cas présentés dans la littérature et ayant développés diverses maladies auto-immunes de type IPEX, laissant suggérer un défaut des Treg, comme observé chez les patient présentant des mutations sur le gène *FOXP3* (cf : Chap I. a. ii. 1 et b. ii. 2.) (Caudy et al., 2007; Sharfe et al., 1997). Les deux patients présentant des mutations sur le gène *IL2RA* ont une absence complète d'expression du CD25 à la surface de leurs lymphocytes T. Cette absence provoque rapidement l'apparition de maladies auto-immunes. Le premier cas décrit est un jeune garçon de trois ans qui présente une immunodéficience sévère avec une auto-immunité caractérisée par l'infiltration de lymphocytes T au sein de différents tissus (poumons, foie, intestin et moelle osseuse) (Sharfe et al., 1997). De plus, ce patient est sujet à différentes infections bactériennes et virales, notamment au virus CMV (Cytomégalovirus). D'un point de vue cellulaire, il est observé une accumulation de lymphocytes T CD8⁺. Cependant, dans cette étude, le compartiment Treg n'a pas été étudié dans la mesure où il n'existait pas encore de bons moyens pour identifier cette population en 1997. Le deuxième cas est un garçon de huit ans qui avait développé diverses maladies auto-immunes similaires au syndrome IPEX (eczéma, entéropathie, lymphopénopathie...) (Caudy et al., 2007). De plus, ce patient était susceptible aux infections à CMV. Par ailleurs, bien que les lymphocytes T de ce patient ne montraient pas d'expression du CD25, il a été observé une population T

CD4⁺ exprimant le facteur de transcription Foxp3, et suggérant donc la présence de Treg. Les auteurs proposent que l'incapacité des Treg à produire de l'IL10 soit la raison du développement de l'auto-immunité chez ce patient.

Le développement des maladies auto-immunes similaires au syndrome IPEX, et la présence de lymphocytes T CD4⁺ Foxp3⁺ chez l'un de ces deux patients, révèlent une fonction plus complexe du CD25 sur le compartiment Treg, contrairement aux sujets IPEX « classiques » (qui présentent des mutations sur le gène *FOXP3* et une diminution du compartiment Treg). Il est encore difficile de connaître avec exactitude l'influence du CD25 sur la survie des Treg en périphérie chez ces patients, et si il existe un rapport avec les observations faites chez la souris *il2ra*^{-/-}. Il est cependant intéressant de noter que, contrairement aux patients IPEX « classiques », ces deux patients ayant des mutations du gène *IL2RA* sont sujets à diverses infections, notamment au virus CMV (Moraes-Vasconcelos et al., 2008). Il est donc possible, et nous ne pouvons pas l'exclure, que l'absence du CD25 chez l'homme ait aussi une influence sur les lymphocytes T, notamment sur leurs fonctions effectrices.

2. La neuropiline 1 (Nrp1) : caractérisation de son expression dans le système immunitaire chez l'homme

L'analyse des souris transgéniques pour la Nrp1 a révélé un rôle essentiel de cette protéine dans le développement embryonnaire du système nerveux et cardiovasculaire (Kawasaki et al., 1999; Kitsukawa et al., 1997). Depuis, de nombreuses études se sont intéressées à son implication dans la physiologie chez l'adulte.

2.1. La structure de la neuropiline 1

Les neuropilines, la neuropiline 1 (Nrp1) et la neuropiline 2 (Nrp2) existent chez tous les vertébrés et leurs gènes se localisent sur le chromosome 10 chez l'homme. La Nrp1 est une glycoprotéine transmembranaire de 923 acides aminés (130 kDa après immunoblotting) qui possède 44% d'homologie en acides aminés ainsi que de nombreuses similitudes de structures et domaines avec la Nrp2. La Nrp1 possède une large région extracellulaire contenant deux domaines CUB (complement binding factors a1/a2), deux domaines d'homologie aux facteurs de coagulation V/VIII (b1/b2), un domaine MAM (mephrine, c), un simple domaine transmembranaire (TM) et un petit domaine cytoplasmique contenant un motif de liaison au domaine PDZ (Figure. 14). Les domaines a1/a2 et b1/b2 sont indispensables à la liaison des ligands. Une des particularités des neuropilines est de posséder un court domaine intracellulaire ne permettant pas d'induire une signalisation, et nécessitant donc une association à des corécepteurs, pour permettre la signalisation des ligands spécifiques (Pellet-Many et al., 2008).

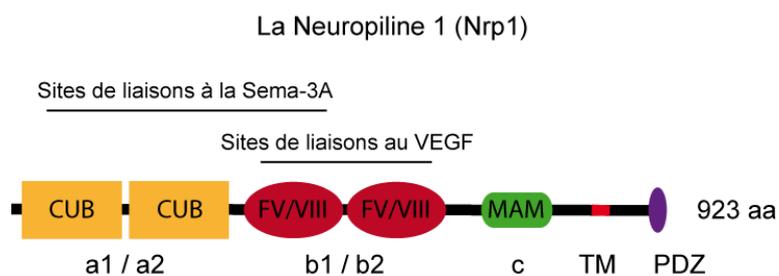


Figure. 14. Structure de la neuropiline 1 (Nrp1).

2.2. Les ligands de la neuropiline 1

La Nrp1 a la capacité de fixer deux ligands avec une forte affinité : les sémaphorines de classe III et le VEGF-A₁₆₅ (vascular endothelial growth factor), et ce en association avec leurs corécepteurs respectifs : les pléxines et les récepteurs aux VEGF (VEGFR).

2.2.1. La sémaphorine 3A

Les sémaphorines constituent une large famille de protéines membranaires, transmembranaires ou sécrétées qui jouent un rôle important dans la croissance des neurones. Elles sont réparties en sept classes comprenant plus de 20 protéines chez les vertébrés (Kolodkin et al., 1993). Les sémaphorines de classe III sont des protéines sécrétées et sont les seules à se fixer sur les neuropilines (He and Tessier-Lavigne, 1997). Il est décrit que le ligand majeur pour la Nrp1 est la sémaphorine 3A (Sema-3A) alors que la Sema-3C et la Sema-3F ont plus d'affinités pour la Nrp2. La Sema-3A se lie à la Nrp1, d'une part par son domaine Sema qui se fixe aux domaines CUB de la Nrp1, et d'autre part par sa région C-terminale riche en résidus basiques, qui interagit avec les domaines b1/b2 de la Nrp1 (Antipenko et al., 2003; He and Tessier-Lavigne, 1997).

La Nrp1 ne possède pas de domaine intracellulaire suffisamment long pour induire une signalisation et doit donc être couplée à un corécepteur pour induire une signalisation. Les pléxines sont les corécepteurs indispensables à l'induction de la

signalisation des sémaphorines. Ainsi les Plexin-A1 et A4 sont les corécepteurs préférentiels de la Nrp1 pour la Sema-3A, alors que la Plexin-A3 coopère avec la Nrp2 pour la fixation de la Sema-3F (Yaron et al., 2005). Les pléxines sont de larges récepteurs transmembranaires comprenant un domaine extracellulaire composé d'un domaine Sema, de deux régions riches en cystéines appelées domaines MRS (Met-Related Sequences), et de trois à quatre domaines de type immunoglobuline. La partie intracellulaire contient deux domaines homologues à des protéines à activité Ras GAP (Pellet-Many et al., 2008). Le complexe Sema-3A, Nrp1, Plexin-A1/A4 forme un dimère constitué de : 2-2-2 (Figure. 15). La partie intracellulaire des Plexin-A va permettre la signalisation et provoquer un « collapsus » des neurones (Takahashi et al., 1999; Tamagnone et al., 1999). A ce niveau, une activation des GTPases de la famille des protéines Rho va provoquer des modifications de l'assemblage d'actine, entraînant alors un changement de conformation du réseau d'actine et provoquant ainsi un changement directionnel ou une chimiorépulsion des neurones (Kruger et al., 2005). Dans certains cas la Sema-3A peut avoir une action attractante due a une forte activité des GMP cycliques (cGMP) intracellulaires (Polleux et al., 2000; Song et al., 1998).

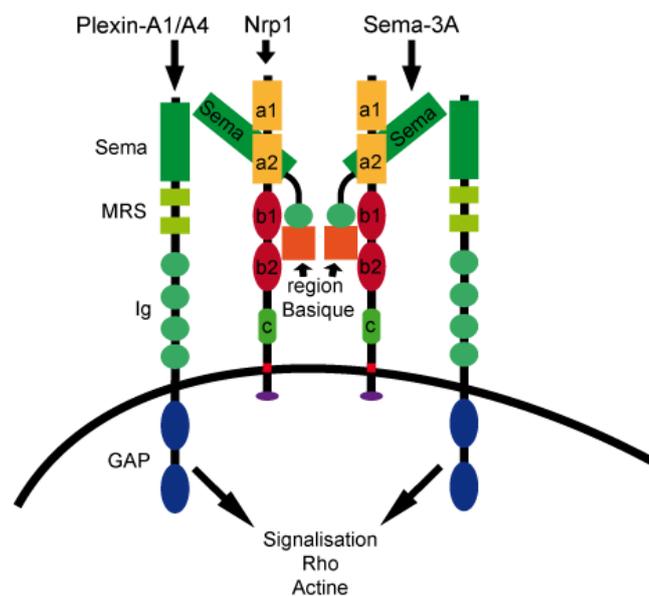


Figure. 15. Complexe du récepteur à la Sema-3A : 2 Plexin-A : 2 Nrp1 : 2 Sema-3A

2.2.2. Les VEGF

Les VEGF (vascular endothelial growth factor) jouent un rôle important dans la vasculogénèse au niveau embryonnaire, et dans l'angiogénèse chez l'adulte. Les VEGF sont des glycoprotéines sécrétées, constituées de polypeptides homodimériques reliés par deux ponts intermoléculaires disulfides. Chez les mammifères, la famille des VEGF est constituée de cinq membres : les VEGF-A-D et le PlGF (placental growth factor) (Ferrara et al., 2003). Les VEGF-A sont les principaux ligands de la Nrp1. Le plus connu et le plus étudié d'entre eux est l'isoforme VEGF-A₁₆₅, qui est la résultante d'un épissage alternatif, contenant l'exon 7 indispensable à la liaison avec la Nrp1 et la Nrp2 (Soker et al., 1996). Sur la Nrp1 les domaines b1 et b2 sont indispensables à leur interaction avec le VEGF-A₁₆₅. Ainsi, la partie C-terminale de l'exon 8 du VEGF va fixer le domaine b1 de la Nrp1, et la liaison de l'exon 7 va permettre de stabiliser le complexe (Jia et al., 2006).

Pour permettre une signalisation, la Nrp1 doit être associée aux VEGFR (VEGF récepteurs). Les VEGFR sont des protéines transmembranaires possédant des domaines immunoglobulines extracellulaires, et deux domaines à activité kinase intracellulaires (Pellet-Many et al., 2008). Ainsi, sur les cellules endothéliales, la Nrp1 doit être associée au VEGFR2/KDR pour induire une signalisation via le VEGF-A et permettre la migration cellulaire (Soker et al., 1998) (Figure. 16). Le mécanisme précis par lequel la Nrp1 joue un rôle dans le complexe VEGF/VEGFR n'est pas clair. Il est proposé que la Nrp1 augmente l'affinité du VEGF-A pour son récepteur ou permette la stabilisation du VEGFR à la surface cellulaire. Cependant, l'inhibition de la fixation du VEGF-A à la Nrp1 diminue la signalisation du VEGFR2 et inhibe l'activation de ERK (Soker et al., 1998). Ainsi, par l'intermédiaire du VEGF-A, la Nrp1 participe activement à la migration des cellules endothéliales chez l'homme.

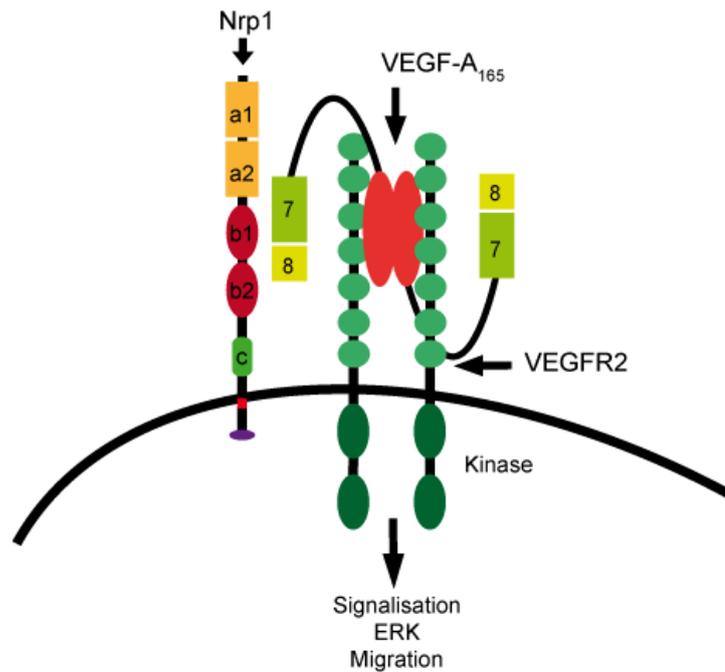


Figure. 16. Complexe Nrp1/VEGF-A₁₆₅/VEGFR2

2.3. Les fonctions de la neuropiline 1

2.3.1. La fonction au cours du développement

L'implication de la Nrp1 dans le développement du système nerveux a été mise en évidence grâce à des modèles de souris génétiquement modifiées (Tableau 1). La souris invalidée pour l'expression de la Nrp1 (*nrp1*^{-/-}) meurt au douzième jour de la vie embryonnaire (E12, E13.5) avec des défauts du système cardiovasculaire et du système nerveux. Les systèmes nerveux central et périphérique sont fortement affectés avec une trajectoire et des connexions anormales des fibres nerveuses (Kitsukawa et al., 1997). Chez cette souris, le réseau sanguin est aussi fortement perturbé avec un défaut du développement des artères (Kawasaki et al., 1999). Le modèle de souris surexprimant la Nrp1 (*nrp1*^{tg}) présente quant à lui un excès des capillaires sanguins, des hémorragies et une défasciculation (fasciculation : capacité des neurones à se regrouper pour former les nerfs) des fibres nerveuses (Kitsukawa et al., 1995).

Génotype	Phénotype	Références
<i>nrp1</i> ^{-/-}	Absence total de Nrp1. Mort au stade embryonnaire E12/E13.5. défauts cardiovasculaires et nerveux	(Kawasaki et al., 1999) (Kitsukawa et al., 1997)
<i>nrp1</i> ^{tg}	Surexpression de la Nrp1. Mort au stade embryonnaire. Excès de capillaires sanguins, hémorragie et défasciculation des nerfs.	(Kitsukawa et al., 1995)
<i>nrp1</i> ^{endo-/-}	Absence de Nrp1 sur cellules endothéliales. Mort au stade embryonnaire. Défauts cardiovasculaires.	(Gu et al., 2003)
<i>nrp1</i> ^{sema-/-}	La Nrp1 ne fixe pas la Sema-3A mais peut fixer le VEGF. Mort post-natale. Connexions nerveuses aberrantes et défasciculation des nerfs crâniens et spinaux.	(Gu et al., 2003)

Tableau 1. Phénotype des souris génétiquement modifiées pour la Nrp1

L'étude des souris invalidées pour la Nrp1 spécifiquement sur les cellules endothéliales (*nrp1*^{endo-/-}), ou mutées sur le domaine a1, empêchant ainsi la fixation de la Sema-3A (*nrp1*^{Sema3A-/-}), a permis de distinguer le rôle spécifique de la Nrp1 au niveau vasculaire et nerveux (Gu et al., 2003). La souris *nrp1*^{endo-/-} a permis de démontrer le rôle essentiel de la Nrp1 dans le développement cardiovasculaire, puisque l'absence de Nrp1 à la surface des cellules endothéliales provoque la mort précoce de l'embryon avec des défauts majeurs des branchements vasculaires. En revanche, la souris *nrp1*^{sema-/-}, dont la Nrp1 est incapable de fixer la Sema-3A mais peut néanmoins fixer le VEGF, survit jusqu'à la naissance et ne possède pas de défauts majeurs du système cardiovasculaire. Cependant, cette souris présente des connexions sensorielles aberrantes et une défasciculation importante des nerfs crâniens et spinaux (Figure. 17). La Sema-3A a donc un effet local au niveau du système nerveux, indispensable à son orientation et à son organisation.

L'implication de la Nrp1 dans le développement cardiovasculaire et nerveux est fonction de son expression cellulaire et des ligands présents. En effet, tandis que le complexe Sema-3A/Nrp1/Plexin-A intervient dans la « guidance » des neurones, le complexe VEGF/Nrp1/VEGFR2 est quant à lui impliqué dans l'angiogénèse.

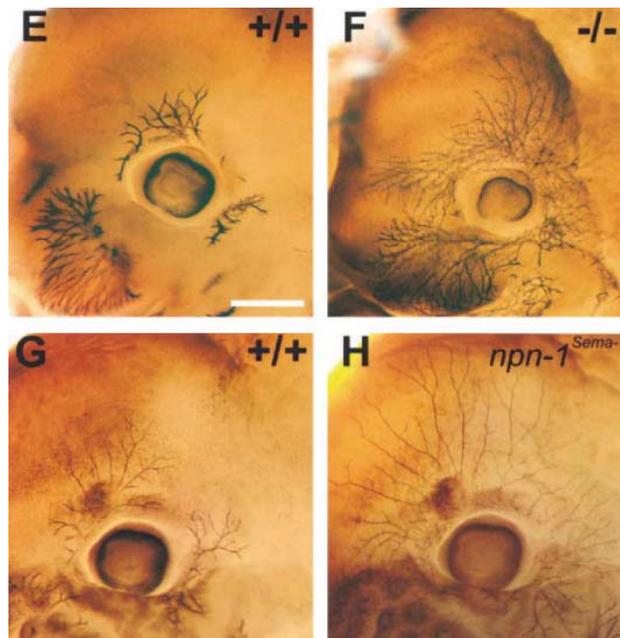


Figure. 17. Présentation du défaut de l'organisation des nerfs crâniens et spinaux chez la souris $npr1^{-/-}$ (F) et $npr1^{Sema-/-}$ (H) (Gu et al., 2003).

2.3.2. La fonction au niveau cellulaire

La Nrp1 est indispensable pour induire la signalisation de la Sema-3A sur les neurones. En culture *in vitro*, la Sema-3A a une action répulsive sur la croissance des axones en induisant un « collapsus » au niveau du cône de croissance (He and Tessier-Lavigne, 1997; Kolodkin et al., 1997). La Sema-3A a aussi un rôle « attractant » sur les dendrites des neurones (Polleux et al., 2000). L'effet de chimioattraction ou de chimiorépulsion des neurones, dû au couple Sema-3A/Nrp1, est modulé par la présence de cGMP au niveau intracellulaire des dendrites des neurones (Polleux et al., 2000; Song et al., 1998). Ceci permet une organisation structurée et complexe du système nerveux au cours du développement (Figure. 18). Chez l'adulte, il est montré que le couple Sema-3A/Nrp1 a une importance dans la régénération et l'invasion des nerfs. En effet, au niveau d'une lésion nerveuse périphérique une accumulation de Sema-3A empêche la cicatrisation et la régénération nerveuse (Pasterkamp et al., 2001). A ce niveau, et plus particulièrement lors de lésion de la moelle épinière chez le rat, l'utilisation d'un inhibiteur de la Sema-3A (SM-216289 ou SICHI) permet la régénération des nerfs

(Kaneko et al., 2006; Montolio et al., 2009). D'autre part, dans le cas des dermatites atopiques, l'injection de Sema-3A au niveau des lésions cutanées permet de diminuer l'invasion nerveuse et d'éviter ainsi le prurit responsable de l'inflammation (Yamaguchi et al., 2008).

Sur les cellules endothéliales la Nrp1, associée au VEGFR2, est impliquée dans la migration cellulaire (Soker et al., 1998). L'utilisation d'anticorps bloquant la Nrp1 pour la fixation du VEGF inhibe la migration des cellules endothéliales, *in vitro*, et la néovascularisation, *in vivo* (Pan et al., 2007). Bien que l'utilisation d'anticorps bloquant la fixation de la Sema-3A ne semble pas affecter significativement la migration des cellules endothéliales (Pan et al., 2007), d'autres études montrent que la Sema-3A induit une chimioréulsion et inhibe l'adhésion des cellules endothéliales de porc (PAE) et humaines (Miao et al., 1999; Serini et al., 2003). La Nrp1 semble aussi jouer un rôle dans l'adhésion des cellules endothéliales à la matrice extra cellulaire et ce, de manière dépendante ou indépendante de ses ligands habituels (Murga et al., 2005; Serini et al., 2003; Valdembri et al., 2009). Cependant, Serini *et al* proposent une action inhibitrice de la Sema-3A sur l'adhésion des cellules endothéliales en inhibant l'activité des intégrines (Serini et al., 2003). La Nrp1 et ses ligands sont donc impliqués à différents niveaux sur la mobilité des cellules endothéliales (Figure. 18).

La Nrp1 est également retrouvée sur différents types de cellules cancéreuses et est impliquée dans la migration, la survie et la prolifération tumorale via le VEGF (Bachelder et al., 2001; Ellis, 2006; Miao et al., 2000). La surexpression de la Nrp1 est souvent associée à un mauvais pronostic et au potentiel métastatique de la tumeur (Hansel et al., 2004; Latil et al., 2000). Naturellement, la Nrp1 est devenue une cible anti-tumorale et l'utilisation de peptides inhibiteurs de la Nrp1 induit l'apoptose de certaines cellules cancéreuses (Barr et al., 2005; Karjalainen et al., 2010b). D'autre part, l'utilisation d'anticorps bloquant la Nrp1, en association avec des anticorps anti-VEGF, permet d'inhiber la vascularisation de la tumeur et ainsi de diminuer sa croissance tumorale, et ce indépendamment de l'expression de la Nrp1 par les cellules cancéreuses (Pan et al., 2007). La Nrp1 est aussi utilisée pour favoriser une meilleure pénétration des drogues au niveau de la tumeur (Sugahara et al., 2010). Ainsi, l'utilisation de peptides fixant la Nrp1, co-administré avec des agents actifs, permet une pénétration au niveau des vaisseaux sanguins et une

atteinte de la tumeur plus en profondeur. Contrairement au VEGF, les sémaphorines sont plutôt décrites comme ayant un rôle anti-tumoral. Différentes sémaphorines de classe III, dont la Sema-3A, ont la capacité de bloquer la migration des cellules tumorales (Kigel et al., 2008). De plus, la délétion des gènes *SEMA3B* et *SEMA3F* dans certains cancers suggère que les sémaphorines de classe III font partie des gènes répresseurs de tumeurs (Futamura et al., 2007; Tse et al., 2002). Cependant, certaines études cliniques montrent une corrélation entre le haut niveau de Sema-3A et la progression tumorale (Muller et al., 2007). Finalement, l'association VEGF/Nrp1 semble plutôt pro-tumorale, alors que l'association Sema-3A/Nrp1 serait plutôt anti-tumorale. Il reste cependant à déterminer avec exactitude l'importance des ligands de la Nrp1 dans la dissémination des cellules tumorales *in vivo*.

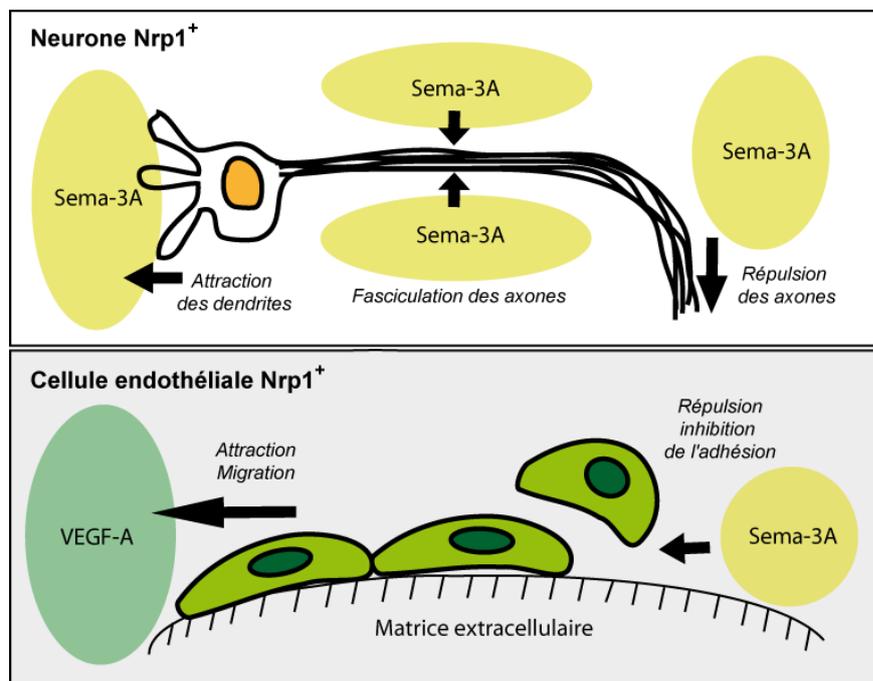


Figure. 18. Récapitulatif des effets dépendants de la Nrp1 sur les neurones (haut) et sur les cellules endothéliales (bas).

2.4. La neuropiline 1 dans le système immunitaire

2.4.1. La neuropiline 1 sur les cellules dendritiques

Dans notre laboratoire il a été mis en évidence que la Nrp1 est principalement exprimée sur les cellules dendritiques (DC). En effet, au cours de la différenciation des monocytes *in vitro*, ceux-ci expriment la Nrp1 avec un maximum au stade de DC (Tordjman et al., 2002). Dans cette étude, l'expression de la Nrp1 est indispensable à l'initiation de la réponse avec les lymphocytes T. La Nrp1 se retrouve au niveau de la synapse immunologique, entre DC et lymphocytes T, et son inhibition par un anticorps bloquant empêche l'activation des lymphocytes T. Les auteurs suggèrent que la Nrp1, par une liaison homotypique, permet une stabilisation de l'interaction entre ces deux types cellulaires.

La découverte de l'analogie entre l'antigène BDCA4 et la Nrp1 a permis d'identifier, *in vivo* chez l'homme, les populations cellulaires exprimant la Nrp1 (Dzionek et al., 2002). Ainsi, la principale population exprimant la Nrp1 est la population des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), qui jouent un rôle important dans la réponse antivirale via leur grande production d'IFN- α/β . Bien que le rôle de la Nrp1 ne soit pas bien connu sur ces cellules, il est montré que certains virus utilisent la Nrp1 comme récepteur pour infecter les cellules immunitaires. Ainsi, le virus HTLV-1, via la Nrp1, cible principalement les pDC ou les DC, infectant ainsi les lymphocytes T CD4 lors des interactions entre ces deux types cellulaires (Ghez et al., 2006; Jones et al., 2008).

En plus de son rôle important dans l'activation des lymphocytes T (Tordjman et al., 2002), la Nrp1 est aussi impliquée dans la motilité des DC *in vivo* (Takamatsu et al., 2010). En effet, cette étude montre clairement que le complexe Nrp1/Plexin-A1/Sema-3A est indispensable à la transmigration des DC. Ainsi, la génération de lymphocytes T spécifiques de l'antigène *in vivo* est altérée en présence de DC *plexin-A1*^{-/-}, en raison d'une incapacité de ces cellules DC à migrer au niveau des ganglions lymphatiques. Ceci se traduit par une incapacité de ces DC à traverser les cellules endothéliales lymphatiques pour gagner la circulation lymphatique. Or, à ce niveau, la Sema-3A, sécrétée par les cellules endothéliales lymphatiques, induit

normalement une contraction de l'actomyosine des DC, via la Plexin-A1, permettant ainsi leur transmigration vers la circulation lymphatique pour atteindre le ganglion lymphatique.

Bien que cette étude ne montre pas clairement un rôle de la Nrp1 lors de ce phénomène, il est néanmoins fortement suggéré qu'elle ait une implication importante dans la signalisation du complexe Sema-3A/Plexin-A1.

2.4.2. La neuropiline 1 sur les lymphocytes T

La Nrp1 a également été mise en évidence sur les lymphocytes T. A ce niveau les résultats sont plutôt discutés. Dzionek *et al*, montrent qu'*ex vivo* seule une population de lymphocytes T mémoires présente dans les amygdales, exprime la Nrp1, et serait proche de la population Tfh (Dzionek et al., 2002). De plus, ils montrent que la Nrp1 est exprimée lors de l'activation des lymphocytes T *in vitro*. D'autre part, Tordjman *et al*, montrent que la Nrp1 est exprimée sur les lymphocytes T naïfs et est impliquée dans l'interaction avec les DC (Tordjman et al., 2002). Nous pouvons donc supposer que la Nrp1 est exprimée à différents niveaux d'intensité selon le type cellulaire et le niveau d'activation.

Bien que la première étude ait montré l'importance de la Nrp1 pour initier la réponse immunitaire (Tordjman et al., 2002), il semblerait que la Nrp1 soit également impliquée dans l'arrêt de l'activation des lymphocytes T par l'intermédiaire de la Sema-3A. En effet, la Sema-3A est produite par les lymphocytes T au cours de leur activation *in vitro*, et exerce une action inhibitrice sur leur prolifération en bloquant la réorganisation du cytosquelette d'actine au niveau de la synapse immunologique entre le lymphocyte T et la DC (Lepelletier et al., 2006). De plus, le maximum d'expression de la Nrp1 sur les lymphocytes T humains est observé après activation de ces cellules par stimulation de leur TCR *in vitro* (Dzionek et al., 2002). L'inhibition de cette boucle autocrine par un anticorps bloquant entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire, démontrant ainsi une action immunosuppressive de la Sema-3A. Il est aussi décrit que la Sema-3A, produite par certaines cellules tumorales, a la capacité de bloquer la prolifération et l'activation des lymphocytes T en inhibant la voie de signalisation Ras (Catalano et al., 2006). De plus, la Sema-3A peut avoir une

action pro-apoptotique, via la Plexin-A1 et la Nrp1, en provoquant le regroupement de molécules Fas au niveau des radeaux lipidiques, sensibilisant ainsi les cellules à l'apoptose induite par le ligand de Fas (FasL) (Moretti et al., 2008).

Cependant, ce sont les études *in vivo*, notamment via l'utilisation des souris transgéniques pour la Nrp1 spécifiquement exprimée sur les lymphocytes T, qui ont permis de mieux comprendre l'action de la Nrp1 sur le contrôle de la prolifération des lymphocytes T. En effet, les lymphocytes T issus de souris *plexin-A4^{-/-}*, *nrp1^{sema-/-}* (Nrp1 incapable de lier la Sema-3A) et *sema-3A^{-/-}* ont une prolifération *in vitro* très supérieure aux lymphocytes T de souris WT (Wild Type), et le transfert de lymphocytes T *plexin-A4^{-/-}*, dans un modèle expérimental d'encéphalite auto-immune (EAE), entraîne une accentuation des signes cliniques avec une hyperactivité des lymphocytes T (Yamamoto et al., 2008). Cette étude montre clairement le rôle de la boucle autocrine de la Sema-3A, ainsi que son action sur le couple Nrp1/Plexin-A4, dans le contrôle de l'activité des lymphocytes T.

Une autre équipe a également démontré que dans le même modèle d'EAE, l'inactivation de la Nrp1 sur les lymphocytes T (*nrp1^{-/-}*) provoque une aggravation de la maladie (Solomon et al., 2011). Les auteurs suggèrent, sans pour autant le prouver, que les lymphocytes T *nrp1^{-/-}* se trouveraient incapables de présenter le TGF- β , ce qui empêcherait la tolérance au soi et le contrôle de la maladie. Dans ce modèle, il est aussi probable que l'hyper activation des lymphocytes T *nrp1^{-/-}* soit la conséquence d'une incapacité des Treg à inhiber les DC par défaut de contact prolongé avec celles-ci, via la Nrp1 (Sarris et al., 2008)(cf. chapitre suivant).

Dans un autre modèle expérimental d'arthrite auto-immune la surexpression de la Sema-3A, par injection d'ADN plasmidique codant pour la Sema-3A, permet de réduire les signes cliniques et l'activation des lymphocytes T, en diminuant la production d'IFN- γ (Catalano, 2010). De plus, l'auteur suggère que l'expression de la Nrp1 durant l'activation des lymphocytes T CD4⁺ leur confère une action immunorégulatrice. En effet, *in vitro*, la Sema-3A va induire la sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes T Nrp1⁺ leur donnant ainsi la capacité d'inhiber la prolifération des autres lymphocytes T, via cette cytokine. Cependant, l'auteur effectue cette démonstration sur des lymphocytes T humains CD4⁺, et le parallèle avec les observations faites chez la souris n'est pas clair. Ainsi, bien que les études apportent des conclusions diverses, il apparaît néanmoins que l'expression de la Nrp1 sur les

lymphocytes T s'avère indispensable pour éviter un « emballement » du système immunitaire et donc une aggravation des maladies auto-immunes (Figure. 19). De plus, il est montré chez l'homme que le polymorphisme nucléotidique simple de deux allèles mineurs dans l'intron 9 du gène de la *NRP1* est associé au diabète de type I chez l'enfant (Hasan et al., 2010).

Ces diverses études démontrent un rôle important de la Nrp1 pour terminer la réponse immunitaire. Toutefois, la Nrp1 est aussi décrite comme impliquée dans la stabilisation de l'interaction entre lymphocytes T et DC pour initier la réponse immunitaire (Tordjman et al., 2002). Ainsi, l'inhibition de la Nrp1 diminue la capacité des DC à induire l'activation des lymphocytes T, et paradoxalement, ne devrait pas induire une hyper activation de ces dernières *in vivo*. Cependant, dans cette étude, les DC sont générées *in vitro* et favorisent l'activation des lymphocytes T allogéniques. Il est possible qu'*in vivo*, la Nrp1 à la surface des DC ait une fonction dépendante du statut de maturation de ces cellules. Bien qu'aucune étude *in vivo* ne démontre l'importance de la Nrp1 dans la liaison entre lymphocytes T et DC et l'émergence d'auto-immunité, il est envisageable qu'un défaut de cette interaction favorise l'activation des clones auto-réactifs par des DC immatures. En effet, les DC immatures participent à la tolérance périphérique en induisant l'anergie ou l'apoptose des clones auto-réactifs, ceci en présentant peu de molécules de costimulations (CD80/CD86) et de molécule de CMH de classe II ou en induisant l'expression de Fas (CD95) à la surface des lymphocytes T (Reis e Sousa, 2006; Torres-Aguilar et al., 2010). De ce fait, un défaut d'interaction prolongée, via la Nrp1, entre ces DC tolérogènes et lymphocytes T auto-réactifs pourrait entraîner une prolifération de ces dernières, et non une anergie, et ainsi favoriser l'émergence de maladies auto-immunes. L'implication de la Nrp1 dans un tel contexte nécessite de plus amples recherches.

Concernant le VEGF, peu d'études ont été réalisées sur l'importance de l'expression de la Nrp1 sur les lymphocytes T pour sa fixation. Néanmoins, il est proposé que lors de l'activation des lymphocytes T par les DC, un transfert de la Nrp1 s'effectue des DC vers les cellules T par trogocytose, permettant ainsi aux lymphocytes T de fixer le VEGF₁₆₅ (Bourbie-Vaudaine et al., 2006). Ceci permettrait alors le remodelage de l'endothélium des vaisseaux sanguins des organes lymphoïdes secondaires lors de l'inflammation.

Une autre étude démontre l'importance de la Nrp1 dans la perméabilité des vaisseaux sanguins et le passage des lymphocytes T CD8⁺ dans le système nerveux central lors de sclérose en plaque provoquée (Suidan et al., 2010). Lors de l'infiltration de l'inflammation du système nerveux central, une production de VEGF provoque la perméabilité des vaisseaux sanguins facilitant ainsi l'infiltration des lymphocytes T CD8⁺ auto-immuns. L'utilisation d'un peptide inhibiteur de la Nrp1 (ATWLPRR) permet de réduire significativement l'infiltration du système nerveux par les cellules T CD8⁺ en réduisant la perméabilité des vaisseaux sanguins. A ce niveau, il serait donc intéressant de connaître le rôle de la Nrp1 sur les lymphocytes T au cours de la transmigration à travers les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins.

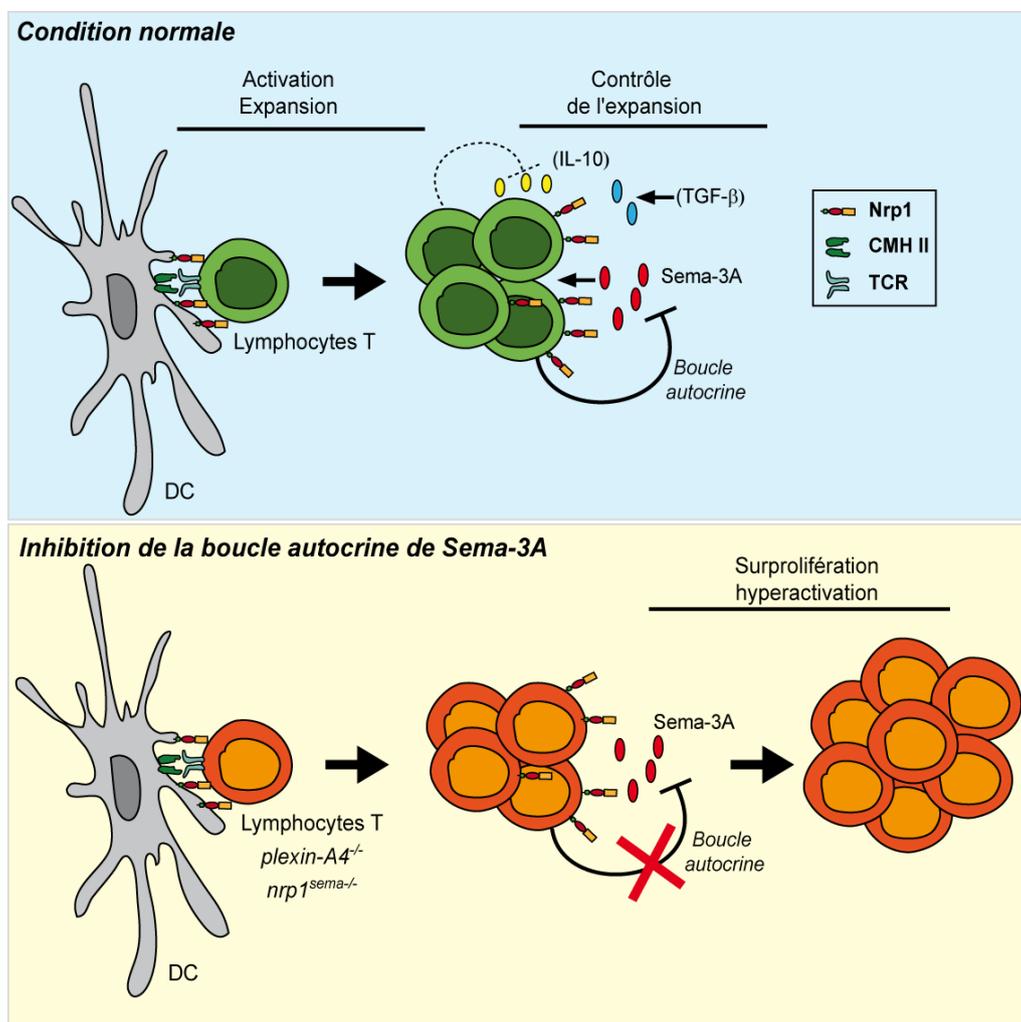


Figure. 19. Schéma de l'implication de la Sema-3A dans le contrôle de la prolifération des lymphocytes T. L'inactivation de la signalisation de la Sema-3A induit une surprolifération des lymphocytes T, potentiellement néfaste dans le cas de maladies auto-immunes.

2.4.3. La neuropiline 1 et les Treg

L'une des découvertes fondamentales sur la Nrp1 fut son identification à la surface des Treg chez la souris, en faisant ainsi un marqueur spécifique de cette population (Bruder et al., 2004). La Nrp1 est impliquée dans le mécanisme suppresseur des Treg et permet une interaction prolongée de ces derniers avec les DC immatures (Sarris et al., 2008). Ceci permettant alors de réduire l'interaction des lymphocytes T naïfs avec les DC immatures et ainsi d'empêcher la réponse immunitaire contre des antigènes, notamment des auto-antigènes. De plus, la Nrp1 peut servir de récepteur au TGF- β sous sa forme latente (LAP-TGF- β) et permettre la libération de la forme active (Glinka and Prud'homme, 2008). Cette fonction pourrait intervenir dans le mécanisme de suppression des Treg, déjà connus comme utilisant le TGF- β pour inhiber la prolifération et l'activation des lymphocytes T.

Chez l'homme peu d'études ont été réalisées sur l'expression de la Nrp1 dans la population Treg. Cependant, un groupe a observé une population CD25⁺ Nrp1⁺ Foxp3⁺ aux capacités régulatrices, dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur (Battaglia et al., 2008). Il semblerait que cette population soit dépendante de l'environnement tumoral du ganglion, et modulée indirectement par les radiothérapies et chimiothérapies associées (Battaglia et al., 2009; Battaglia et al., 2010).

2.4.4. La neuropiline 1 au niveau du Thymus

Au sein du thymus, chez l'homme, la Nrp1 est retrouvée principalement sur les cellules épithéliales thymiques (TEC) et recrutée au niveau du contact avec les thymocytes (Lepelletier et al., 2007). De plus, la Nrp1 est augmentée lors de l'activation des thymocytes via leur TCR, ou après contact avec les TEC. A ce niveau, l'expression de la Sema-3A est aussi augmentée après stimulation des thymocytes par leur TCR. Cette production de Sema-3A induit l'inhibition de leur adhésion aux TEC, permettant leur migration via un mécanisme de chimiorépulsion. Ainsi, le couple Nrp1/Sema-3A intervient dans la migration des thymocytes au cours du développement thymique.

Chez la souris, l'expression de la Nrp1 est retrouvée aux stades précoces de la différenciation des thymocytes et sur la population mature des Treg, mais pas ou peu à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 matures (Corbel et al., 2007). Cependant, dans cette étude, la souris invalidée pour le gène *nrp1* spécifiquement sur le lignage des lymphocytes T, ne présente pas de défaut majeur du développement thymique, ni de la maturation des lymphocytes T. Par ailleurs, bien que les résultats soient contradictoires quant à l'expression de la Nrp1 aux stades matures des thymocytes murins, il est suggéré que la Nrp1, via la Sema-3A, participerait au développement thymique aussi chez la souris (Mendes-da-Cruz et al., 2009). Dans ce domaine, l'implication de la Nrp1 dans le développement thymique nécessite de plus amples investigations afin de déterminer avec précision son importance à ce niveau.

PROBLEMATIQUE

Chez la souris, sur les lymphocytes T, la Nrp1 joue un rôle important pour arrêter la réponse immunitaire, et son inhibition dans différents modèles d'inflammation provoque une hyperactivité des lymphocytes T avec une aggravation de la pathologie, notamment dans le cas des maladies auto-immunes (Catalano, 2010; Solomon et al., 2011; Yamamoto et al., 2008). En revanche, peu d'études se sont intéressées à l'expression de la Nrp1 sur les différents sous-types de lymphocytes T chez l'homme. Nous avons donc choisi de décrire avec précision les modalités de l'expression de la Nrp1 sur les lymphocytes T humains, afin d'apporter un parallèle aux découvertes obtenues jusqu'à présent chez la souris.

Dans un premier temps il nous a fallu vérifier si les Treg humains exprimaient ou non la Nrp1. Or, cette étude a montré clairement que les Treg Foxp3⁺ humains n'exprimaient pas la Nrp1 (Milpied et al., 2009). Cependant, nous avons aussi pu observer que l'expression de la Nrp1 était restreinte à une population T CD25⁻, principalement retrouvée dans les amygdales, et que l'activation des lymphocytes T *in vitro* induisait l'expression de la Nrp1 sur les lymphocytes T activés CD25⁺.

La deuxième question a été de caractériser cette population lymphocytaire T dans les amygdales exprimant la Nrp1 et déterminer les modalités de cette expression. De plus, il a fallu comprendre pourquoi les lymphocytes T activés *in vitro* exprimaient la Nrp1 puis trouver une corrélation avec des observations *in vivo* chez l'homme.

Parallèlement à ces études, nous avons mis en évidence dans le laboratoire, trois cas de déficiences génétiques en CD25 chez des patients atteints de diverses maladies auto-immunes, plus communément appelées syndrome IPEX. Nous nous sommes intéressés aux conséquences de l'absence du CD25 sur l'homéostasie des lymphocytes T et nous avons axé nos recherches sur la population Treg (Foxp3⁺), mais aussi sur les différentes populations lymphocytaires T naïves et mémoires.

METHODES

I) Les différents prélèvements humains

Cette étude a été entièrement réalisée chez l'homme à partir de prélèvements obtenus grâce à l'accord préalable de donneurs sains et de patients consentants. Un récapitulatif des différents prélèvements est rapporté dans le tableau ci-dessous (Tableau 2). Les prélèvements sanguins pour étudier les PBMC (peripheral blood mononuclear cells) ont été obtenus auprès de donneurs sains de 20 à 60 ans. Les thymus sont récupérés chez des enfants ayant eu recours à une chirurgie cardiaque et les amygdales après amygdalectomie. Les ganglions non tumoraux sont quant à eux obtenus de patients ayant une hyperplasie folliculaire non spécifique validée après analyse histo-pathologique. Le sang périphérique de patients atteints de maladies auto-immunes ou inflammatoires, dont trois présentant des mutations sur le gène *IL2RA*, a pu être obtenu, ainsi qu'un prélèvement du liquide articulaire d'un patient présentant une sarcoïdose. L'ensemble des procédures a été approuvé par le comité éthique de l'hôpital Necker et est en accord avec les directives de l'union européenne et les déclarations d'Helsinki.

Non pathologiques	Pathologiques
Sang de cordon (n=5)	PBMC syndrome de Sharp (n=1)
PBMC (20 à 60 ans) (n>50)	PBMC polyarthrite rhumatoïde (n=4)
Thymus (n=3)	PBMC sarcoïdose (n=1)
Ganglions lymphatiques (2 à 57 ans) (n=11)	Liquide articulaire sarcoïdose (n=1)
Amygdales (n=19)	PBMC mutation <i>IL2RA</i> (n=3)

Tableau 2. Récapitulatif des prélèvements utilisés pour cette étude. n = le nombre d'individus (donneurs ou patients).

II) L'identification des populations cellulaires par cytométrie en flux

Le détail des méthodes est décrit dans chaque article avec les clones et les fluorochromes utilisés pour tous les anticorps correspondant. Dans cette partie, je présente brièvement les associations d'anticorps utilisées pour identifier et isoler les populations cellulaires d'intérêt. Premièrement, la population lymphocytaire T se caractérise par l'expression du CD3, alors que la population lymphocytaire B se caractérise par l'expression du CD19. Au sein de la population lymphocytaire T, nous distinguons les lymphocytes T exprimant le marqueur CD4 et les lymphocytes T exprimant le CD8. Puis, par l'utilisation de différents anticorps nous séparons ensuite les différentes sous-populations *ex vivo* chez l'homme et analysons leurs états respectifs d'activations *ex vivo* et *in vitro*.

Les Treg naïfs : CD3⁺ CD4⁺ Foxp3⁺ CD45RA⁺ CD25⁺

Les Treg effecteurs : CD3⁺ CD4⁺ Foxp3^{high} CD45RA⁻ CD25^{high} Ki67⁺ CTLA4⁺

Les lymphocytes T effecteurs Foxp3⁺ : CD3⁺ CD4⁺ Foxp3⁺ CD45RA⁻ CD25⁺ Ki67⁻ CTLA4⁻

Les lymphocytes T naïfs : CD3⁺ CD4⁺ ou CD8⁺ CD45RA⁺ CCR7⁺

Les lymphocytes T centraux mémoires (TCM) : CD3⁺ CD4⁺ ou CD8⁺ CD45RA⁻ CCR7⁺

Les lymphocytes T effecteurs mémoires (TEM) : CD3⁺ CD4⁺ ou CD8⁺ CD45RA⁻ CCR7⁻

Les lymphocytes T en différenciation terminale (TEMRA) : CD3⁺ CD4⁺ ou CD8⁺ CD45RA⁺ CCR7⁻

Les Tfh du centre germinatif (organes lymphoïdes secondaires) : CD3⁺ CD4⁺ CXCR5⁺ CD69⁺ PD-1⁺ ICOS⁺

Les Tfh circulant (sang périphérique) : CD3⁺ CD4⁺ CXCR5⁺

Les lymphocytes B naïfs : CD19⁺ IgD⁺ CD38⁻

Les lymphocytes B pre-GC (pre-centre germinatif) : CD19⁺ IgD⁺ CD38⁺

Les lymphocytes B du centre germinatif : CD19⁺ IgD⁻ CD38⁺

Les lymphocytes B mémoires : CD19⁺ IgD⁻ CD38⁻

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (PDC) : CD4^{low} CD3⁻ BDCA4⁺ (Nrp1⁺)

L'association de ces différents marqueurs permet donc d'identifier chaque population cellulaire et d'étudier ainsi les variations de l'homéostasie, par comparaison entre donneurs sains et patients. De plus, ces marqueurs peuvent également servir à isoler ces populations de manière très pure à l'aide d'un trieur afin d'effectuer des tests de fonctionnalités *in vitro*.

Pour une analyse encore plus complète, nous déterminons également la production en cytokines de ces populations. Pour cela, les cellules doivent être préalablement stimulées par des agents mitotiques (PMA et Ionomycine) et un inhibiteur de la sécrétion (Bréfeldine A), afin d'obtenir une accumulation en cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-21, IL-10) intracellulaires suffisantes pour être détectée par cytométrie en flux.

Enfin, l'état d'activation des lymphocytes T peut également être mesuré dans les différents organes grâce à l'utilisation de marqueurs spécifiques tels que le CD69 en association avec le CD25 et potentiellement la Nrp1, et aussi par l'observation d'une augmentation de l'intensité du FSC (forward light scatter : correspondant à la taille cellulaire). De plus, l'expression du Ki67 met en évidence la prolifération de ces cellules. Cette analyse peut aussi être réalisée après activation *in vitro* pour connaître le degré d'activation de ces cellules.

III) Les tests fonctionnels *in vitro*

Comme précédemment, le détail des tests effectués est plus amplement décrit dans chaque article. Pour résumer, nous pouvons mesurer la capacité de prolifération, d'activation, de différenciation, de survie et d'apoptose de chaque population cellulaire isolée.

La prolifération et l'activation des lymphocytes T

Pour mesurer l'activation et la prolifération des lymphocytes T, ces cellules doivent être stimulées via leur TCR par l'utilisation d'anticorps anti-CD3 (5 à 10µg/ml) et par l'apport d'une costimulation par l'anticorps anti-CD28 (2,5 à 5µg/ml). Ces deux anticorps sont coatés dans le fond des plaques de culture avant le dépôt des cellules avec leur milieu de culture approprié. La prolifération peut être mesurée par deux méthodes différentes : l'incorporation de la thymidine tritiée (³H Thymidine) permet de mesurer la prolifération finale en s'incorporant seulement dans les cellules en cycle, et le marquage au CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) permettant de distinguer les divisions cellulaires par cytométrie en flux. Le CFSE pénètre dans le cytoplasme des cellules au temps 0 puis se répartit dans les cellules filles au cours des divisions cellulaires, entraînant ainsi une diminution de la fluorescence en cytométrie en flux. Le marquage au CFSE est une méthode intéressante car elle permet de séparer les différentes populations au cours des co-cultures grâce à l'ajout de marqueurs supplémentaires. L'activation des lymphocytes T peut se mesurer par l'apparition de marqueurs d'activation tels que le CD69, le CD25, ainsi que le changement de taille cellulaire caractérisé par une augmentation de l'intensité du FSC. Ainsi, nous avons pu évaluer l'expression de la Nrp1 au cours de la prolifération et de l'activation des lymphocytes T. Après activation, nous mesurons également la survie et l'apoptose cellulaire par l'utilisation de marqueurs tels que l'annexine V capable de reconnaître la phosphatidylsérine exprimée à la surface des cellules en cours d'apoptose et le 7AAD ciblant spécifiquement les cellules mortes ou en nécrose. Ces méthodes permettent de caractériser les propriétés de chaque type cellulaire mais aussi d'étudier les effets d'agents extérieurs tels que l'ATRA (all-*trans* retinoic acid) ou le TGF-β.

Co-cultures, survie et différenciation des lymphocytes B

Des co-cultures entre Tfh et lymphocytes B ont été réalisées afin de mesurer la capacité des Tfh à induire la différenciation et la survie des lymphocytes B. Ces deux types cellulaires sont donc déposés dans un même puits de plaque de culture dans un milieu approprié, sans apport d'agents extérieurs ni stimulation. La survie des lymphocytes B est ensuite mesurée comme décrit précédemment par les marquages Annexine V et 7AAD. La capacité de différenciation, en plasmocyte des lymphocytes B, est déterminée par leurs capacités à produire des anticorps *in vitro*. Pour cela, les surnageants de culture sont récoltés et les taux d'immunoglobulines mesurés par la technique de l'ELISA. De cette manière, nous avons donc pu déterminer la quantité d'immunoglobulines de type A ou de type G (IgA ou IgG) produite par les lymphocytes B en co-cultures avec les Tfh.

RESULTATS

Les résultats se répartissent en quatre parties et sont présentés, pour trois des quatre parties, sous forme d'articles publiés (partie I) ou soumis à publication (partie II et IV). La partie III est une présentation de résultats préliminaires qui permettent le développement de perspectives futures. Ces études se sont principalement axées autour de la Nrp1 afin de déterminer son expression chez l'homme et ainsi délimiter son implication dans la réponse immunitaire.

Premièrement, contrairement aux Treg murins, l'expression de la Nrp1 n'est pas retrouvée à la surface des Treg humains.

Deuxièmement, chez l'homme, l'expression de la Nrp1 sur les lymphocytes T des organes lymphoïdes secondaires est spécifique de la seule population Tfh interagissant avec les lymphocytes B.

Troisièmement, l'expression de la Nrp1 est corrélée avec une hyperactivation des lymphocytes T dans l'inflammation périphérique chez l'homme.

Quatrièmement, le défaut génétique du CD25 chez l'homme, responsable du développement du syndrome IPEX, est associé à un déséquilibre de l'homéostasie des Treg et des lymphocytes T effecteurs mémoires.

I) La neuropiline 1 n'est pas un marqueur des Treg chez l'homme

Chez la souris, la Nrp1 a été montrée comme étant exprimée de façon spécifique par les Treg (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) (Bruder et al., 2004). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à son expression par les Treg humains afin d'évaluer l'intérêt de l'étude de la Nrp1 dans les pathologies humaines impliquant les Treg, ainsi que son implication éventuelle dans les thérapies.

Dans un premier temps, notre étude a permis de mettre en évidence que contrairement aux Treg murins de la rate qui expriment bien la Nrp1, les Treg humains dans le sang périphérique ne l'expriment pas. Ainsi, afin de démontrer que l'expression de la Nrp1 sur les Treg n'est pas dépendante de l'organe lymphoïde étudié, nous avons effectué une étude comparative de cette population au sein du thymus, des ganglions (et amygdales chez l'homme) et de la rate chez l'homme et chez la souris. Nos résultats ont montré que quelque soit le compartiment étudié, les Treg humains n'expriment jamais la Nrp1, alors que les Treg murins l'expriment quant à eux constitutivement. Néanmoins, nous avons pu détecter dans les amygdales humaines, une sous-population de lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ capable d'exprimer la Nrp1. De plus, l'activation via le TCR des lymphocytes T humains *in vitro* induit l'expression de la Nrp1 en association avec celle du CD25.

Ainsi, dans cette étude, présentée ci-dessous sous forme d'article publié (Milpied et al., 2009), nous démontrons clairement que chez l'homme, la Nrp1 ne peut pas être utilisée comme un marqueur de la population 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

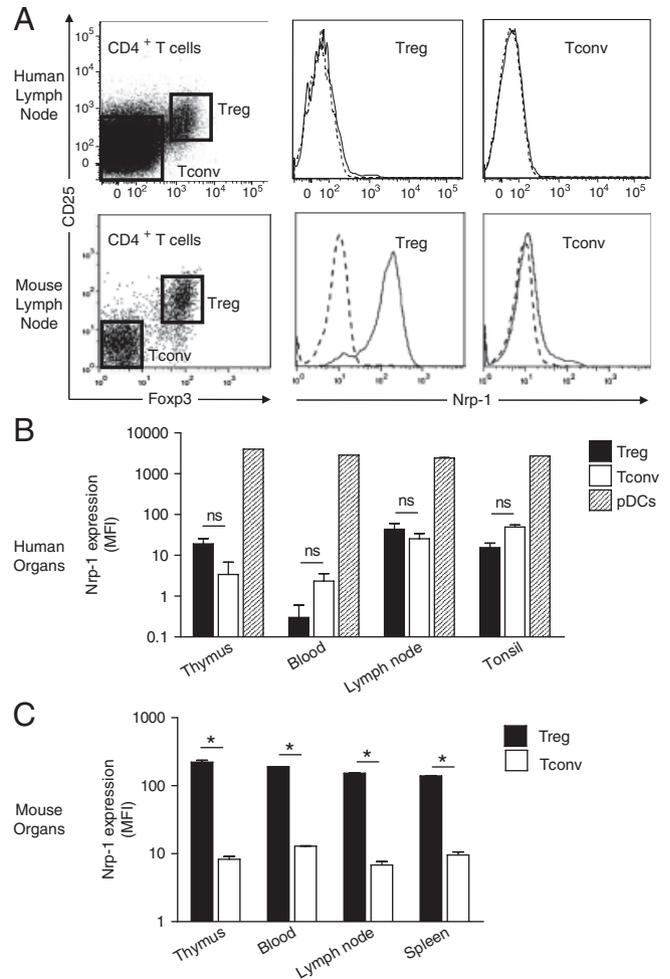


Figure 1. Differential expression of Nrp-1 in human and mouse $Foxp3^+$ Treg. (A) Human (top) and mouse (bottom) lymph node cell preparations were stained with anti-CD3 ϵ , anti-CD4, anti-CD25, anti-FoxP3 and anti-Nrp-1 antibodies (or an irrelevant fluorochrome-matched IgG) and analyzed by flow cytometry. $CD3^+CD4^+$ 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.

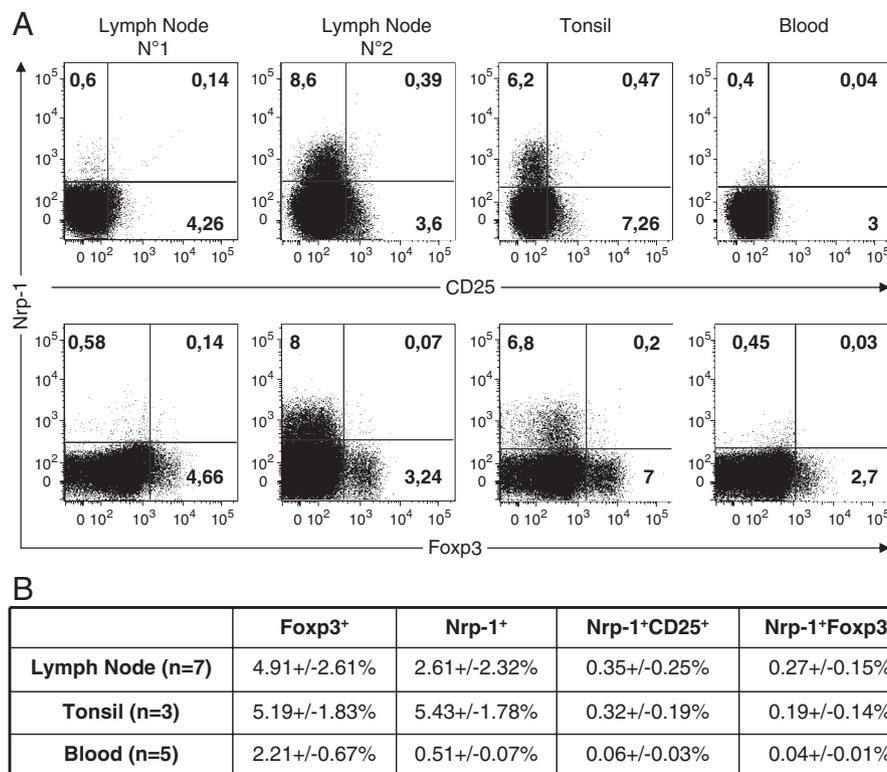


Figure 2. Nrp-1-expressing T cells in human secondary lymphoid organs are not Foxp3⁺ Treg. (A) Cells from human samples were stained as in Fig. 1 and further analyzed in the CD3⁺ CD4⁺ gate for the co-expression of Nrp-1 and CD25 (upper row) or Foxp3 (lower row). Dot plot analysis of two lymph nodes, 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.

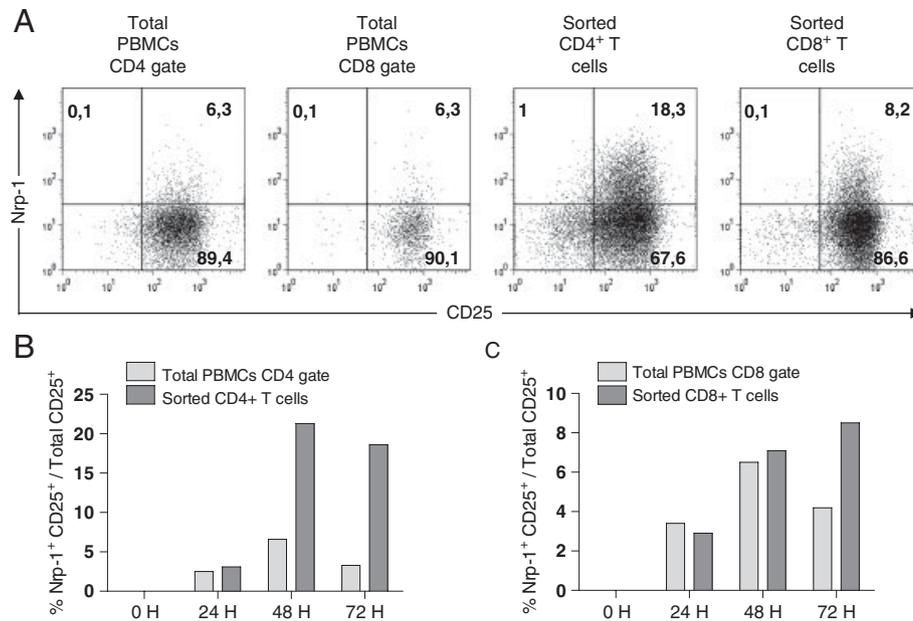


Figure 3. Expression of Nrp-1 on activated CD4⁺ and CD8⁺ human T cells. Human total PBMC or sorted CD4⁺ and CD8⁺ T cells were activated by plate-bound anti-CD3 ϵ and anti-CD28 antibodies as described in the *Materials and methods*, recovered at various time points and labeled for FACS analysis of CD3, 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

II) L'expression de la neuropiline 1 sur les lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires chez l'homme est spécifique de la population Tfh interagissant avec les lymphocytes B

Au cours de l'étude précédente, nous avons identifié une population lymphocytaire T $CD4^+$ $CD25^-$ $Foxp3^-$ exprimant la Nrp1. Le but de cette deuxième étude a donc été de caractériser plus précisément cette population et de comprendre la signification de l'expression de la Nrp1. Des travaux antérieurs avaient déjà suggéré que cette population observée dans les amygdales pouvait appartenir à celle des Tfh, mais cette hypothèse n'avait cependant encore jamais été démontrée (Dzionic et al., 2002).

Nous prouvons ici clairement que chez l'homme l'expression de la Nrp1 est spécifique de la population Tfh au niveau des organes lymphoïdes secondaires, et que cette expression est induite lors de l'interaction avec les lymphocytes B. L'expression de la Nrp1 sur les Tfh reflète le niveau d'activité du centre germinatif et peut ainsi servir de marqueur d'activation des Tfh (Figure. 20). Les résultats sont présentés dans l'article ci-dessous.

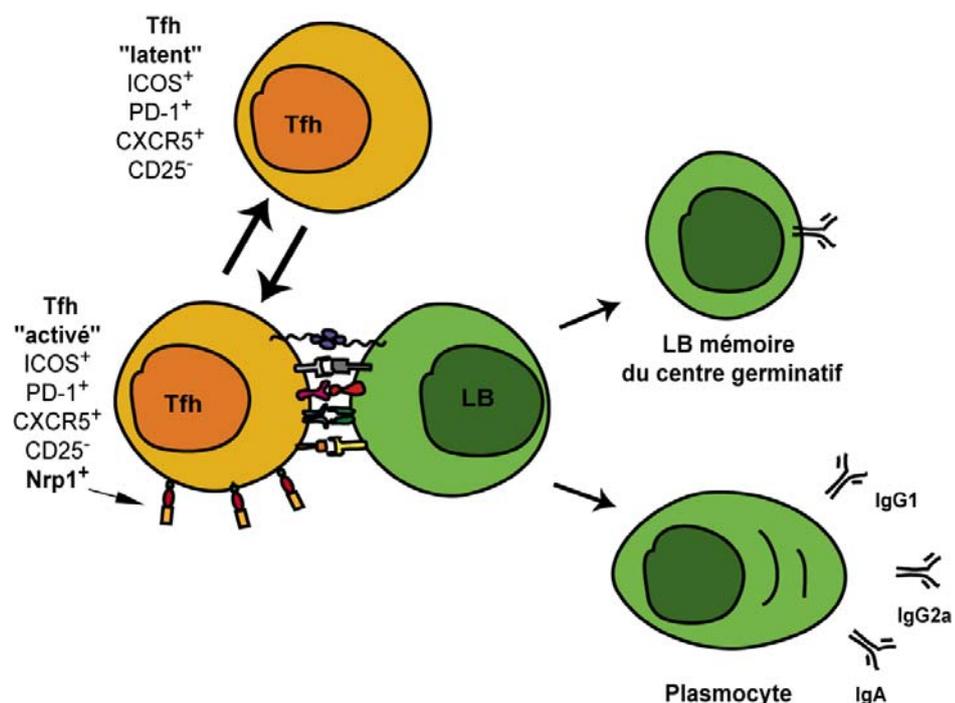


Figure. 20. Schéma récapitulatif de l'expression de la Nrp1 sur les Tfh.

Neuropilin-1 expression in human secondary lymphoid organs is restricted to follicular helper T cells interacting with B cells in germinal centers.

Amédée Renand, Pierre Milpied, Julie Bruneau, Michael Dussiot, Séverine Coulon, Vahid Asnafi, Olivier Hermine.

CNRS, UMR 8147, Hôpital Necker, Université Paris Descartes, Paris

Abstract

Follicular helper T cells (Tfh) play an essential role in the regulation of antigen-specific B cell immunity. Tfh cells are characterized by the expression of the CXCR5 chemokine receptor, the costimulatory molecule ICOS and programmed cell death 1 (PD-1). These cells allow for the differentiation and survival of B cells in the germinal centers of lymph nodes. We here demonstrated that Neuropilin-1 (Nrp1) is selectively expressed by Tfh cells and correlates with their stimulatory activity in human secondary lymphoid organs. Indeed, its expression was dependent on Tfh cells contact with B cells and correlated with the percentage of germinal centers B cells in secondary lymphoid organs. In addition, Tfh cells expressing Nrp1 have the ability to promote survival and immunoglobulin production by B cells. Finally, in contrast to the mouse system, Nrp1⁺ T cells do not exhibit any suppressive activity. Thus, Nrp1 may serve as a marker of Tfh activity in human secondary lymphoid organs.

Introduction

T follicular helper cells (Tfh) constitute a specific population providing help to B cells, thus bolstering the formation of germinal centers, the generation of long-lived plasma cells and the maintenance of memory B cells. In murine and human tonsils, Tfh cells are characterized by the expression of CXCR5, the costimulatory molecules ICOS, PD-1 (programmed cell death 1), OX40 and the transcriptional repressor Bcl-6 (Rasheed et al., 2006; Yu et al., 2009b; Yu and Vinuesa, 2010). *In vitro*, these cells are able to induce the production of IgG and IgA when co-cultured with B cells (Breitfeld et al., 2000; Schaerli et al., 2000). In addition to the secretion of IL-21, Tfh function is dependent on a strong interaction between their TCR and peptide-loaded MHC class II molecules expressed on B cells (Fazilleau et al., 2009a). The costimulatory molecules ICOS, PD-1, CD40 ligand and SAP (molecule associated

with lymphocyte activation molecules SLAM) play a major role in facilitating the differentiation of B cells (Fazilleau et al., 2009a; Qi et al., 2008).

Although Tfh cells interact with B cells in germinal centers, there is currently no specific marker for this phase. We therefore hypothesized that this interaction could induce not only B cell stimulation, but also backward signaling events, possibly leading to activation of Tfh cells. Indeed, TCR engagement on conventional T cells (T conv) induces the expression of various surface markers such as CD69, CD25 or Neuropilin-1 (Nrp1), which are associated with cellular activation and proliferation (Milpied et al., 2009). Although Tfh cells do not proliferate after TCR stimulation, they strongly express CD69 that would result from multiple contacts with antigens (Fazilleau et al., 2009a; Rasheed et al., 2006) but other activation markers were not studied at this time.

Nrp1 plays a key role in axonal guidance and in angiogenesis (Pellet-Many et al., 2008). It serves as a co-receptor to class 3 semaphorins and also to VEGF, in combination with plexin and VEGF-receptors respectively (He and Tessier-Lavigne, 1997; Kolodkin et al., 1997; Soker et al., 1998). Following interaction with Semaphorin-3A (Sema-3A) or VEGF ligands, Nrp1 is also involved in the migration of endothelial cells, in permeabilization of blood vessels, in adherence to the extracellular matrix and in neo-vascularization (Miao et al., 1999; Serini et al., 2003). Nrp1 expression is also found in some cancers and is involved in proliferation, survival and migration of tumor cells (Bachelder et al., 2001; Ellis, 2006; Soker et al., 1998). In tumor models Nrp1 inhibition or/and targeting has been shown effective to control tumor invasion (Karjalainen et al., 2010a; Pan et al., 2007; Sugahara et al., 2010). However, few studies have focused on its expression and function in T cells. In the immune system, in addition to being a specific marker for plasmacytoid dendritic cells (pDCs) (Dzionic et al., 2000), Nrp1 has been attributed a crucial role for the primary activation between T cells and DCs (Tordjman et al., 2002). In mouse, Nrp1 is specifically expressed by Foxp3⁺ regulatory T cells and plays a role in their suppressive mechanisms through interaction with immature DCs (Bruder et al., 2004; Sarris et al., 2008). However, in humans the expression of Nrp1 on T cells is not necessarily found on CD25⁺ FoxP3⁺ T cells (Battaglia et al., 2008; Milpied et al., 2009). We previously demonstrate that the majority of T cells expressing Nrp1 ex

in vivo do not express CD25, whereas its induction on T cells *in vitro* is dependent on the activation, proliferation and expression of CD25 (Milpied et al., 2009).

We asked whether Nrp1 expression could be restricted to Tfh cells in human secondary lymphoid organs, and whether its expression could be an activation marker witnessing interaction with B cells. We show that Nrp1 expression is limited to Tfh cells and that this expression is transient and dependent on contact with B cells. Nrp1 induction on Tfh cells was associated with B cell survival and correlated with the percentage of germinal center B cells (GC B cells). We thus propose Nrp1 as a marker of Tfh cell activation that is specific to the phase of contact with B cells.

Results

Nrp1⁺ CD4⁺ T cells in human tonsils display a Tfh phenotype

We therefore identified the Tfh cell population in tonsils by CXCR5, ICOS and PD-1 staining on the CD3⁺ CD4⁺ T cell population (Fig. 1 A, C). We observe that Nrp1 is significantly and preferentially expressed by the Tfh cell population CXCR5⁺ PD-1⁺ (Fig. 1 A) or CXCR5⁺ ICOS⁺ (Fig. 1 C), as compared with non-Tfh cells (CXCR5⁻PD-1⁻ or CXCR5⁻ICOS⁻) (Fig.1 A-D). This difference in Nrp1 expression between Tfh cells PD-1⁺ (Fig. 1 B) or ICOS⁺ (Fig. 1 D) and non-Tfh cells PD-1⁻ or ICOS⁻ was significant once data from multiple donors was analyzed. This shows that, *ex vivo* in human, the T cell population expressing Nrp1 has a Tfh phenotype in tonsils. We and other have already demonstrated that, contrary to mice, Nrp1 expression in human is not associated with expression of CD25 and Foxp3 (Bruder et al., 2004; Milpied et al., 2009). Moreover, T cells expressing Nrp1 have a memory phenotype and express high levels of CD69 like Tfh cells (Supplementary Fig. 1). The comparison of Nrp1⁻ Tfh (CXCR5⁺ Nrp1⁻), Nrp1⁺ Tfh (CXCR5⁺ Nrp1⁺) and non-Tfh (CXCR5⁻ Nrp1⁻) cell populations (Fig. 1 E) revealed that the Nrp1⁺ Tfh cell population expressed similar levels of PD-1 as compared to Nrp1⁻ Tfh cells, but have lower levels of CXCR5 and ICOS. Interestingly the Nrp1⁺ Tfh cell population produced less IL-21 (Fig. 1 F), at a level comparable to non-Tfh cells. In addition, Nrp1⁺ Tfh cells did not exhibit a particular profile of cytokine production and produced few amounts of IFN- γ and IL-17 (supplementary Fig. 2).

Nrp1⁺ Tfh cells induce B cell survival and immunoglobulin production in vitro

To date, the expression of Nrp1 is associated either with the proliferation of T cells or with regulatory T cells. In tonsils, Nrp1⁺ Tfh cells were not proliferating cells (Fig. 2 A, B) and did not suppress the proliferation of non-Tfh cells in *in vitro* co-culture assay (Fig. 2 C). Differently from previous studies (Battaglia et al., 2008; Bruder et al., 2004; Sarris et al., 2008), Nrp1 expression is thus not correlated with suppressive mechanisms.

In order to confirm that Nrp1⁺ Tfh cells belong to the Tfh cell population, we tested their ability to induce B cells survival and immunoglobulin production *in vitro*. For this, we isolated different T cell populations based on CXCR5 and Nrp1 expression (Fig. 3 A). Nrp1⁺ Tfh cells behave similarly to Nrp1⁻ Tfh cells, as they do not proliferate after TCR stimulation, while non-Tfh cells proliferate in the same culture conditions (Fig. 3 B). On the other hand, co-culture assays between T cells subsets and B cells were performed in the absence of exogenous stimulation. We observed that Nrp1⁺ Tfh cells have the ability to induce B cell survival (Fig. 3 C) and production of IgG and IgA (Fig. 3 D and E), contrary to non-Tfh cells. Although Nrp1⁺ Tfh cells display a lower capacity than Nrp1⁻ Tfh cells to induce IgG and IgA production, this difference was not significant. Thus, Nrp1⁺ Tfh cells show all the phenotype and functional characteristics of Tfh cell.

Tfh cells expressed and maintained Nrp1 during contact with B cells

Next, we sought to determine the origin of Nrp1 expression on Tfh cells and the significance of this expression. When put in co-culture with B cells, Nrp1⁻ Tfh cells upregulated Nrp1 expression in the absence of any other stimulation (Fig. 4 A). Nrp1 expression was not accompanied by increased CD25. Conversely, Nrp1⁺ Tfh cells lost Nrp1 expression when cultured in the absence of B cells, but readily recovered it when co-cultured with B cells. This upregulation was specific of Tfh cells, as it was not observed for non-Tfh cells. Indeed, non-Tfh cells were able to upregulate Nrp1 only upon TCR stimulation by means of anti-CD3 and anti-CD28. In this case, Nrp1 upregulation was accompanied by a parallel and higher upregulation of CD25. When stimulated via their TCR, Tfh cells (both Nrp1⁺ and Nrp1⁻) also upregulated CD25, but concomitant upregulation of Nrp1 was marginal (Fig. 4 A and B). However, few T cells co-expressed CD25 and Nrp1 *ex vivo*, as Nrp1 expression is restricted to CD25⁻ T cells in human tonsil (supplementary Fig. 1) and in secondary lymphoid organs (Milpied et al., 2009). Moreover, B cells do not express Nrp1 in co-culture with Tfh

cells (supplementary Fig. 3). Altogether, these experiments show that Nrp1 expression is specific of Tfh cells and marks their engagement with B cells.

Correlation between Nrp1 expression and germinal center activity in secondary lymphoid organs

In contrast to lymph nodes, tonsils are secondary lymphoid organs with high activity of B cells. In line with their effect on B cell activation, tonsils contained significantly more Tfh cells (CXCR5⁺ PD-1⁺) than lymph nodes (Fig. 5 A). The proportion of Nrp1⁺ population was also higher in tonsils, both on total T cells (Fig. 5 B) and on Tfh cells subset (Fig. 5 C). Because the proportion of CD19⁺ B cells was not different between tonsils and lymph nodes, we analyzed the distribution of B cell subpopulations defined by the CD38 and IgD markers (supplementary Fig. 4 A-B) (Cappione et al., 2005; Grammer et al., 2003; Jackson et al., 2009). Indeed, the higher percentage of IgD⁻ CD38⁺ GC B cells in tonsils (Fig. 5 D) suggests a stronger GC activity compared to lymph nodes. This higher GC activity was correlated with Nrp1 expression both on total T cells (Fig. 5 E) and on Tfh cells (Fig. 5 F). In contrast, we did not observe any correlation between Nrp1 expression and the percentage of naive B cells (supplementary Fig. 4 B-C), the proportion of which was not different between tonsils and lymph nodes (supplementary Fig. 4 D). This suggests that Nrp1 expression on Tfh cells correlate with the GC activity of secondary lymphoid organs (lymph nodes vs. tonsils) in humans. This brings support to our starting hypothesis that Nrp1 expression is specific of Tfh cells and correlates with their activation.

Discussion

There are still some gray areas in the physiology of Tfh cells, including their development, but also their dynamic activation during their contact with B cells. In this study, we show that Nrp1 expression is specific to Tfh cells and follows their activation status both *ex vivo* and after *in vitro* culture. These observations correlate with two studies that suggested Nrp1 expression in Tfh cells, but they did not include classical markers of Tfh cells (Dzionic et al., 2002; Yu et al., 2007). Indeed, *ex vivo* in humans, the expression of Nrp1 is mainly found in the tonsils on T cells expressing CD57 (Dzionic et al., 2002). Although Dzionic *et al* suggested that these cells are Tfh cells, CD57 is not a stringent marker for this subset (Rasheed et al., 2006). In

addition, in *sanroque* mice that present a Tfh over-activity due to increased ICOS expression, an increase Nrp1 mRNA expression is also observed (Yu et al., 2007).

Nrp1 can thus be defined as a marker of Tfh cell activation. Indeed, we showed that its expression is B cell contact-dependent, is specific to Tfh cell population and leads to B cell differentiation. In addition, the percentage of Nrp1 expression on T cells in secondary lymphoid organs (tonsils and lymph nodes) correlated with the percentage of germinal center B cells. Knowing that the Tfh cell population sustains the maintenance of GC B cells, Nrp1 can be proposed as a marker of the Tfh activity in GC. It is noteworthy that Nrp1 expression on Tfh cells is transient, as Tfh cells lost Nrp1 expression in the absence of B cells and maintain it when co-cultured with them. We can speculate that Nrp1 induction is dependent on a strong interaction between the TCR and peptide-MHC class II complex on B cells. Non-Tfh cells expressed Nrp1 after TCR stimulation by anti-CD3 and anti-CD28 *in vitro* (Milpied et al., 2009). This expression is associated with activation and proliferation of these cells. It is likely that *in vitro* activation by means of antibodies is stronger and longer compared to physiological *in vivo* conditions, thus leading to Nrp1 expression. This could explain why it is uncommon to find activated T cells that express Nrp1, *ex vivo*. We cannot exclude that another factors allows for the induction of Nrp1 expression on Tfh cells. Indeed, TCR stimulation alone does not permit Nrp1 induction on CD25⁻ Tfh cells and does not allow to maintain it in Nrp1⁺ Tfh cells. We can hypothesize that an unknown co-stimulatory receptor-ligand interaction may thus be at play.

These observations raise the question of the influence of B cells on Tfh cells during their interactions. Indeed, the B cell differentiation by Tfh cells induces the expression of Nrp1 on these T cells. It is possible that this B cell dependent signal is a negative feedback on Tfh cells because we observed that, *ex vivo*, Nrp1⁺ Tfh cells produce little or no IL-21, express a lower level of CXCR5 and ICOS and had a lower capacity to induce IgG and IgA production by B cells, as compared to Nrp1⁻ Tfh cells. It is known that immunoregulatory proteins, such as TGF- β (Glinka and Prud'homme, 2008), Sema-3A (Catalano et al., 2006; Lepelletier et al., 2006) and Galectin-1 (Hsieh et al., 2008), use Nrp1 as a receptor and could interact with Tfh cells to control their activation. However, Nrp1⁺ Tfh cells have the ability to induce B cells expand and secrete IgG and IgA. This does not exclude the fact that Nrp1 is involved

in the regulation of Tfh activity, but this mechanism does not appear to be significant to inhibit all Tfh cell functions *in vitro*, but may be dependent on the *in vivo* environment.

Nrp1 is expressed only during contact with B cells. Thus, we may suppose that Nrp1 is involved in maintaining the interaction between B cells and Tfh cells. Nrp1 is known to be involved in adhesion and interaction between cells or with the extracellular matrix (Murga et al., 2005; Pan et al., 2007; Shimizu et al., 2000; Valdembri et al., 2009). In particular, it plays an important role in the interaction between T cells and DCs (Sarris et al., 2008; Tordjman et al., 2002). In our experimental conditions, Nrp1 expression was found only on Tfh cells and not on B cells. At this level, we can imagine that the interaction between B cells and Tfh cells induces Nrp1 expression on Tfh cells and provides a better interaction with follicular DCs (FDC). In GC, there are interactions between FDC and B cells, but also between Tfh cells and B cells and between Tfh cells and FDC (Boles et al., 2009; Fazilleau et al., 2009b; Qi et al., 2008; Vinuesa et al., 2010). B cells, Tfh cells and FDC are essential for the formation and maintenance of germinal centers (Fazilleau et al., 2009a; Vinuesa et al., 2010). Moreover, it is shown that at the level of GC, interactions between B cells, Tfh cells and FDC take place in the light zone (Allen et al., 2007a; Victora et al., 2010). Thus, we cannot exclude that these three populations interact together at this level and that Nrp1 is involved in this event, in particular in the interaction between Tfh cells and FDC.

In conclusion, this study demonstrates selective Nrp1 expression on Tfh cells in secondary lymphoid organs and opens many perspectives on the importance of this molecule in immune responses. Being expressed during Tfh cell activation, Nrp1 could serve both as a marker and a therapeutic target in autoimmune diseases implicating autoantibodies, such as systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis (Cappione et al., 2005; Grammer et al., 2003; Simpson et al., 2010).

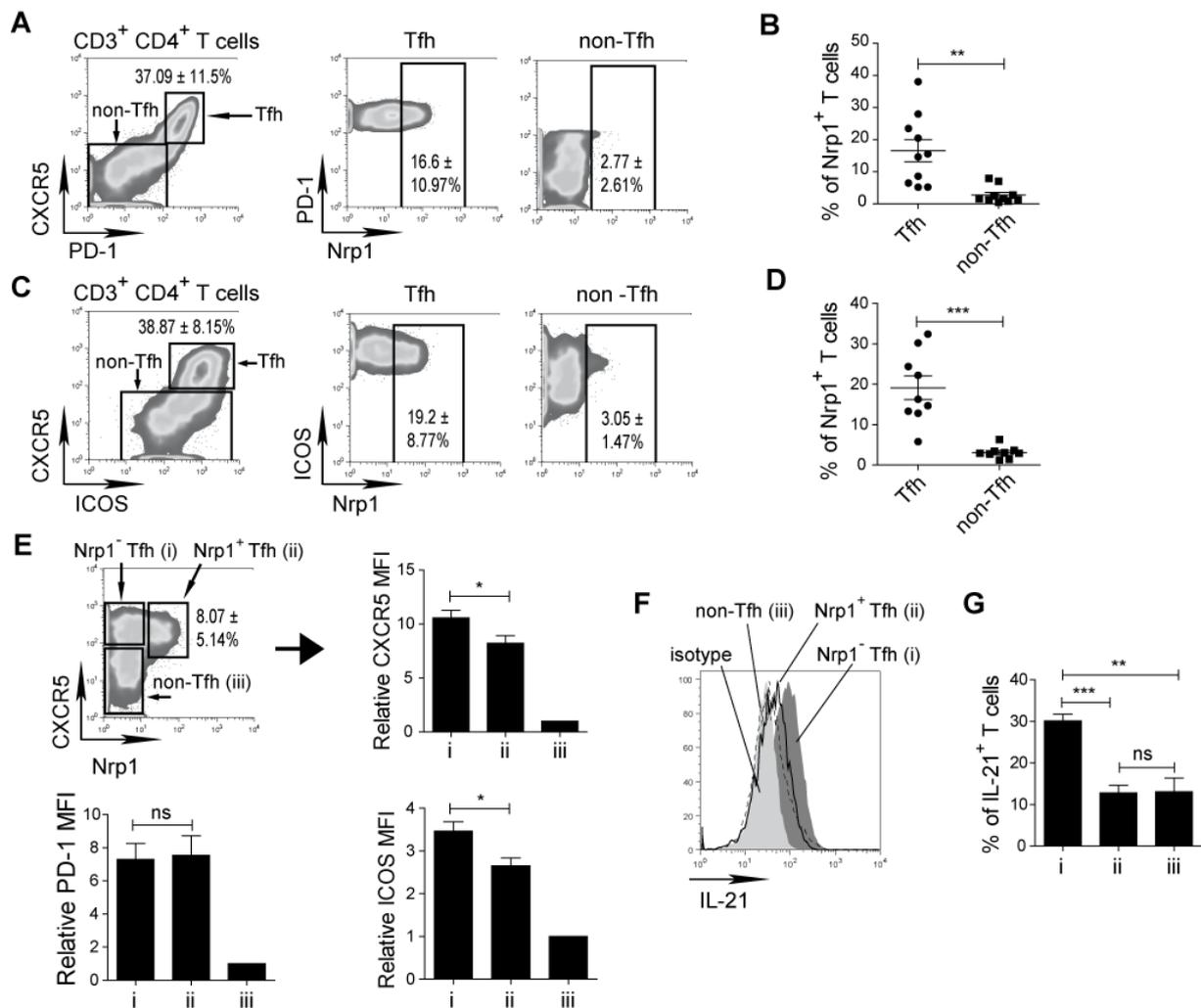


Figure 1. Nrp1⁺ CD4⁺ T cells have a Tfh phenotype in tonsils. (A-D) Tfh cells are delineated in the CD3⁺ CD4⁺ T cell gate using CXCR5, PD-1 (A) and ICOS (C) staining. Tfh cells PD-1⁺ or ICOS⁺ are compared to non-Tfh cells (CXCR5⁻ PD-1⁻ or ICOS⁻) for their Nrp1 expression. (B and D) A statistical analysis was performed on the percentage of Nrp1 expression between Tfh (PD-1⁺ or ICOS⁺) and non-Tfh cells of 10 tonsils. (E) Flow cytometry delineation to compare the expression of CXCR5, PD-1 and ICOS on CXCR5⁺ Nrp1⁻ (Nrp1⁻ Tfh: i), CXCR5⁺ Nrp1⁺ (Nrp1⁺ Tfh: ii) and CXCR5⁻ Nrp1⁻ (non-Tfh: iii) populations. Dot plot was completed by a statistical analysis of CXCR5, PD-1 and ICOS relative MFI of Nrp1⁻ Tfh (i), Nrp1⁺ Tfh (ii) and non-Tfh (iii) populations. (F) Comparison between the production of IL-21 by Nrp1⁻ Tfh, Nrp1⁺ Tfh and non-Tfh populations using flow cytometry. (G) Statistical analysis of IL-21 production by Nrp1⁻ Tfh (i), Nrp1⁺ Tfh (ii) and non-Tfh (iii) populations. In each dot plot, the percentage shown represents the mean ± SD analysis of 10 tonsils. Data were compared using Student's impaired t-test (ns: not significant, *: p≤0.05 **: p≤0.01, ***: p≤0.001).

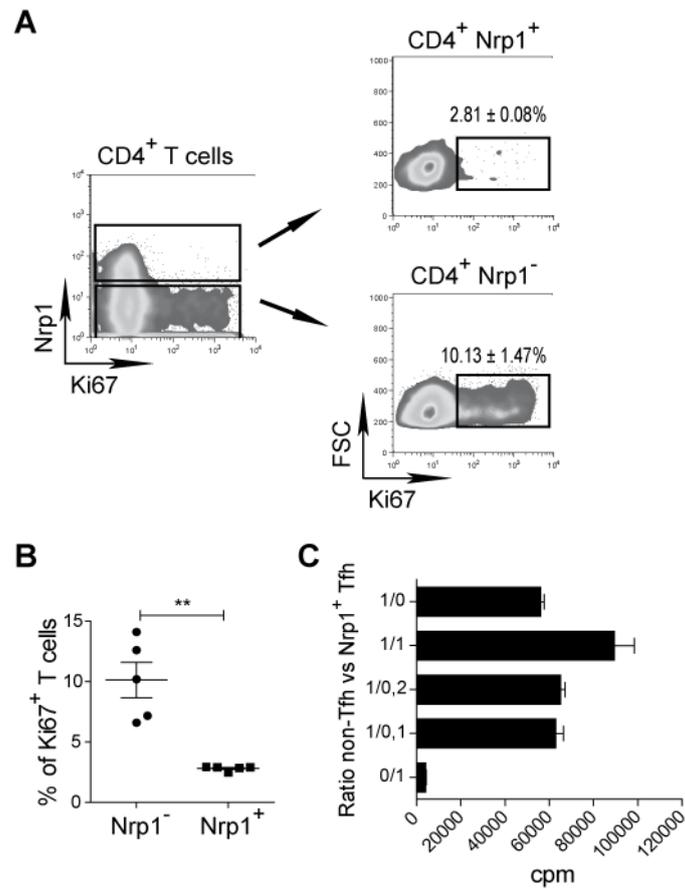


Figure 2. Nrp1⁺ T cells do not represent proliferative or regulatory T cells. (A) Staining of Nrp1 and Ki67 on CD3⁺ CD4⁺ and on Nrp1⁺ and Nrp1⁻ T tonsillar cells. (B) Five tonsils are compared for the expression of Ki67 between Nrp1⁺ and Nrp1⁻ T cells. (C) The regulatory function of Nrp1⁺ Tfh cells was measured by thymidine incorporation after 5 days of co-culture with non-Tfh cells stimulated by anti-CD3 and anti-CD28. Graphs represent three independent experiments. Data were compared using Student's impaired t-test (**: p≤0.01).

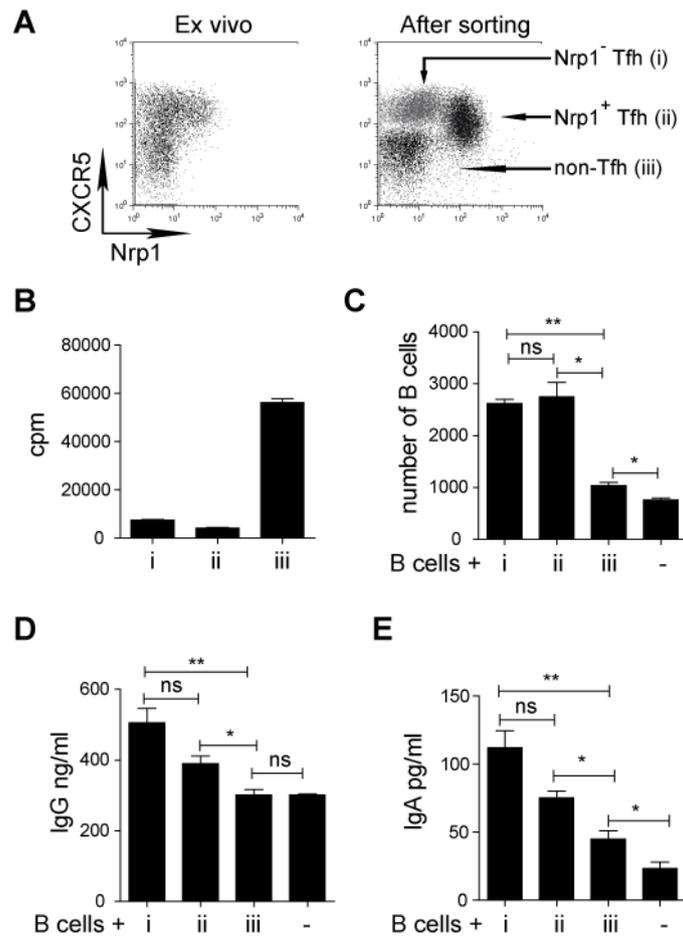


Figure 3. Nrp1⁺ Tfh cells have the ability to induce survival and immunoglobulin production by B cells in vitro. (A) Flow cytometry representation of Nrp1⁻ Tfh cells (CXCR5⁺ Nrp1⁻: i), Nrp1⁺ Tfh (CXCR5⁺ Nrp1⁺: ii) and non-Tfh (CXCR5⁻ Nrp1⁻: iii) isolated populations. These different populations are compared for their ability to proliferate in response to TCR stimulation (B), to maintain B-cell survival in 5 days (C) and to induce the production of IgG (D) and IgA (E) after 10 days of culture. During co-culture with B cells, T cells are not exogenously stimulated by their TCR. Graphs represent 4 separate experiments. Data were compared using Student's impaired t-test (ns: not significant, *: p≤0.05 **: p≤0.01, ***: p≤0.001).

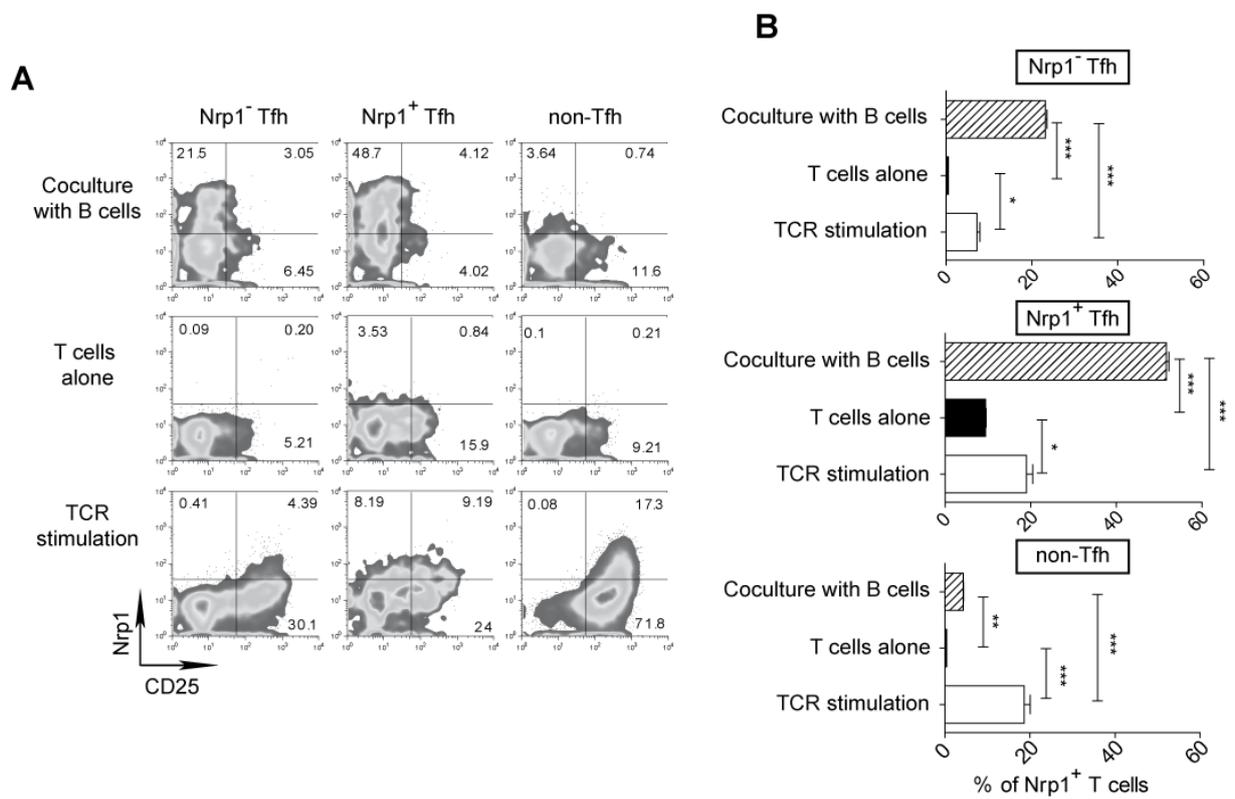


Figure 4. Tfh cells express and maintain Nrp1 during B cells contact. (A) The expression of Nrp1 and CD25 were measured on Nrp1⁻ Tfh, Nrp1⁺ Tfh and non-Tfh cells after 5 days of culture with B cells (top), alone (middle) or after TCR stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (bottom). (B) Graphical representation of the expression of Nrp1 by Nrp1⁻ Tfh (top), Nrp1⁺ Tfh (middle) and non-Tfh cells (bottom) in different conditions after 5 days of culture. Data were compared using Student's impaired t-test (ns: not significant, *: p≤0.05 **: p≤0.01, ***: p≤0.001).

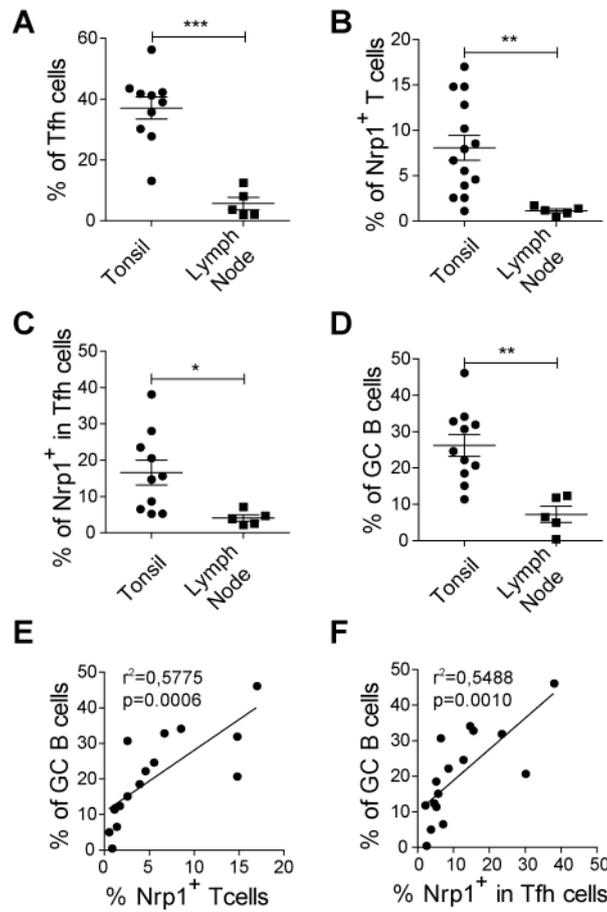
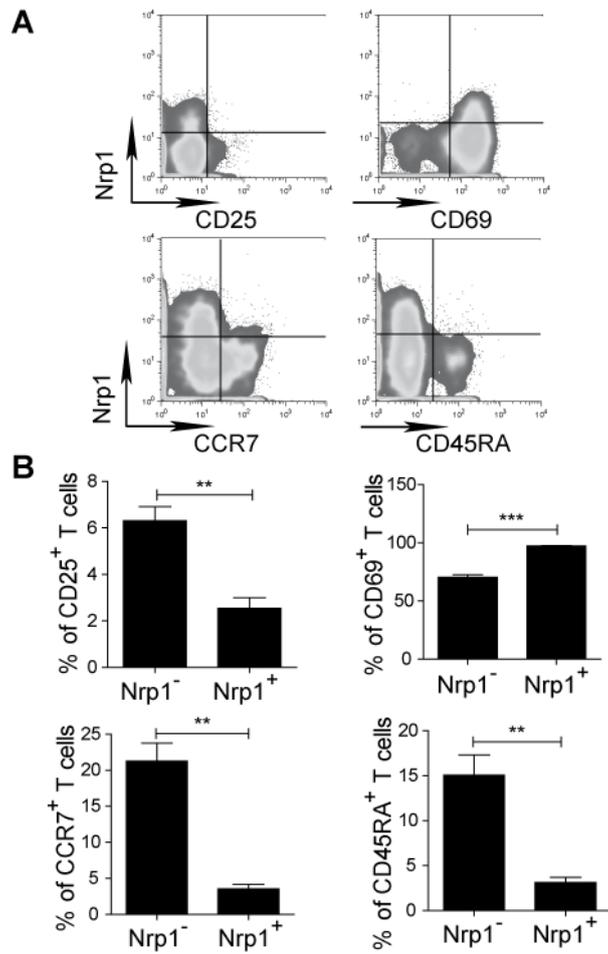
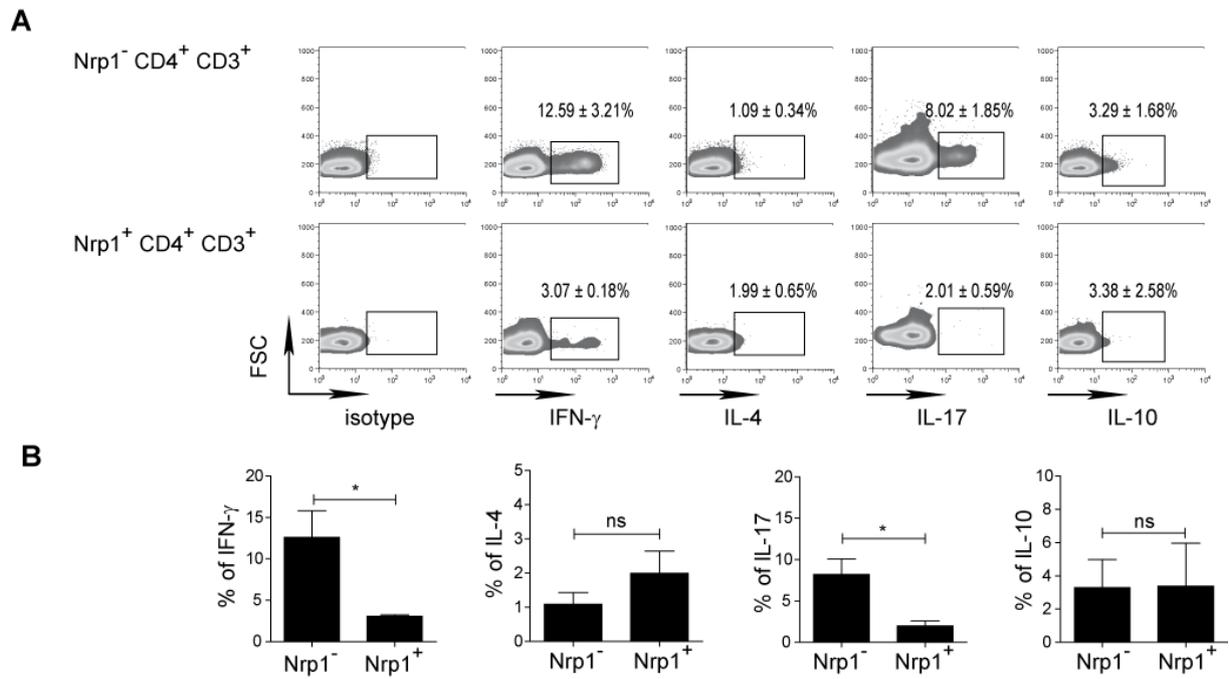


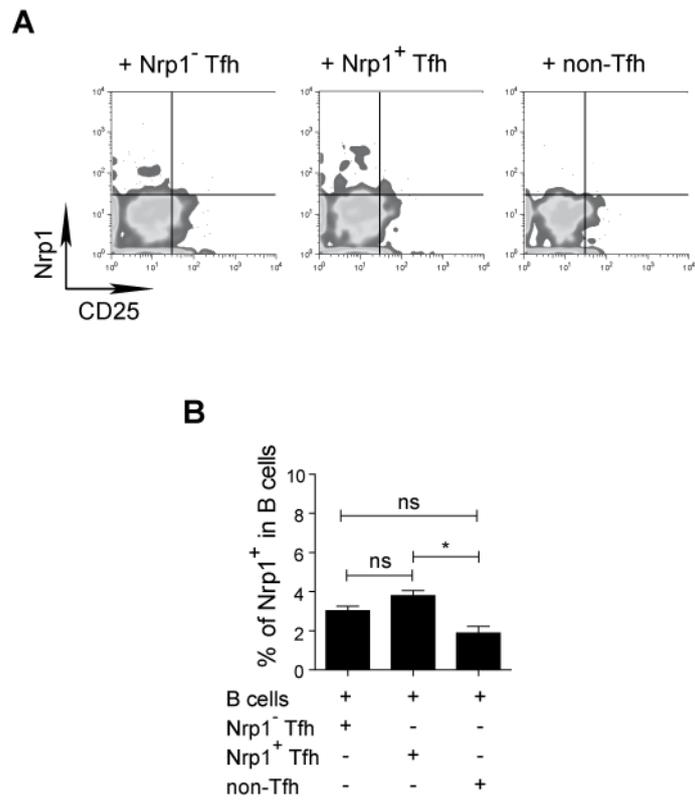
Figure 5. Correlation between Nrp1 expression and germinal center activity in secondary lymph nodes. Tonsils and reactive lymph nodes were compared for their percentage of Tfh cells (A), Nrp1 on total T cells (B), or on Tfh cells (C) and for their percentage of germinal center CD38⁺ IgD⁻ B cells (D). (E-F) Correlation analysis between the percentage of Nrp1 on total T cells (E), or on Tfh cells (F) and the percentage of germinal center B cells. The correlation study includes tonsils and reactive lymph nodes. Data were compared using Student's impaired t-test (ns: not significant, *: p≤0.05 **: p≤0.01, ***: p≤0.001). For correlations representation p≤0.05 indicates a significant linear regression represented by r².



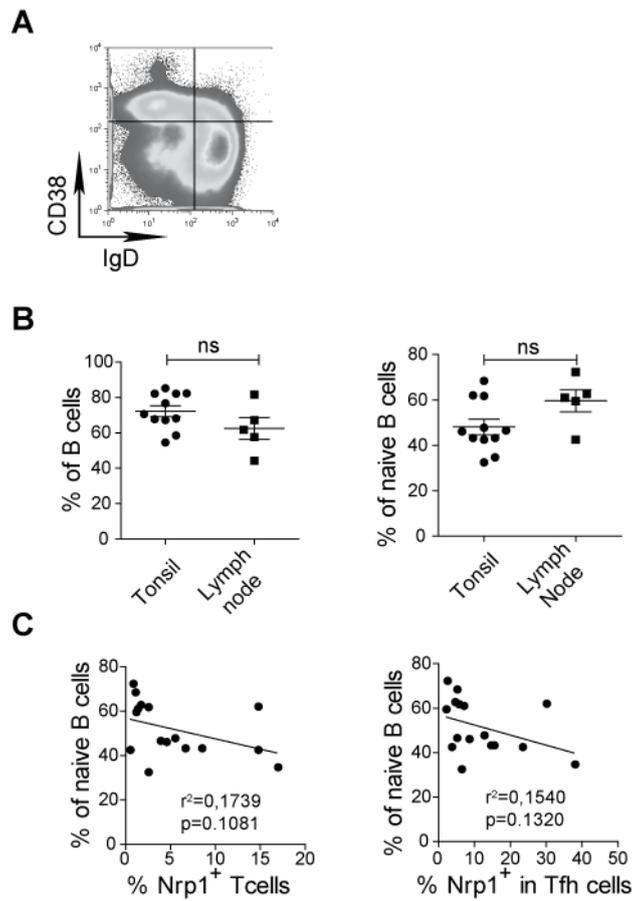
Supplementary Figure 1. Complementary phenotype of Nrp1⁺ T cells in tonsils. (A) Expression of Nrp1 in relation to CD25, CD69, CCR7 and CD45RA expression on CD3⁺CD4⁺ T cell population in tonsils. (B) Analysis for the expression of CD25, CD69, CCR7 and CD45RA between Nrp1⁺ and Nrp1⁻ T cells. Data were compared using Student's impaired t-test (ns: not significant, *: p≤0.05 **: p≤0.01, ***: p≤0.001).



Supplementary Figure 2. Cytokine profile of Nrp1⁺ T cell population. After in vitro stimulation by PMA / Ionomycin, T cells are analyzed for their production of cytokines such as IFN- γ , IL-4, IL-17 and IL-10. (A) Nrp1⁻ CD4⁺CD3⁺ (up) and Nrp1⁺ CD4⁺CD3⁺ (bottom) T cells populations are shown for cytokine expression. (B) Statistical analysis between Nrp1⁻ and Nrp1⁺ T cells expression for cytokines. The percentage shown is the mean \pm SD of a minimum of three tonsils analyzed. Data were compared using Student's impaired t-test (ns: not significant, *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$).



Supplementary Figure 3. B cells do not express Nrp1 in co-culture with Tfh cells. (A) CD25 and Nrp1 staining of B cells in co-culture with Nrp1⁻ Tfh (left), Nrp1⁺ Tfh (middle) and non-Tfh (right) cells. (B) Graphical representation of the expression of Nrp1 on B cells in co-culture with T cell populations. Data were compared using Student's impaired t-test (ns: not significant, *: p≤0.05 **: p≤0.01, ***: p≤0.001).



Supplementary Figure 4. Tonsils and reactive lymph nodes do not show any difference in total and naive B cells proportions. (A) Delineation of CD19⁺ B cell populations using IgD and CD38 staining. Naive, pre GC, GC and post GC B cells are respectively characterized by IgD⁺ CD38⁻, IgD⁺ CD38⁺, IgD⁻ CD38⁺ and IgD⁻ CD38⁻. (B) Comparison between tonsils and reactive lymph nodes for their percentage of total (left) or naïve (right) B cells. (C) Correlation analysis between expression of Nrp1 on total T cells or Tfh cells and percentage of total and naive B cells. Data were compared using Student's impaired t-test (ns: not significant). For correlation representation $p \leq 0.05$ indicates a significant linear regression represented by r^2 .

Materials and Methods

Human samples, Tonsils and reactive lymph nodes

Tonsils were obtained from children undergoing tonsillectomy. Non-malignant lymph nodes (mesenteric, axillary, cervical, submaxillary and mediastinal) were obtained from patients (age range: 2–25 yrs, median: 14 yrs) with non-specific reactive follicular hyperplasia validated by histo-pathological analysis. 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 performed according to the European Union guidelines and the declaration of Helsinki.

Flow cytometry, antibodies

FITC-labeled anti-CD19 (HIB19), APC-labeled anti-CD38 (HB-7), PE-labeled anti-IgD (IA6-2), FITC-labeled anti-CD69 (FN50), FITC-labeled anti-CD45RA (5H9), Alexa-488-labeled anti-Ki67 (B56), 7AAD (all from BD Biosciences, France), efluor 450-labeled anti-CD3 (OKT3), PE-Cy7-labeled anti-CD4 (RPA-TA), PE-labeled anti-CD25 (BC96), Pacific Blue-labeled anti-IFN- γ (4S.B3), Pacific Blue-labeled anti-IL10 (JES3-9D7), PE-labeled anti-IL21 (ebio3A3-N2), APC-labeled anti-IL4 (MP4-25D2), PERCP-cy5.5-labeled anti-IL17 (ebio64DEC17) (all from ebiosciences, France), PERCP-Cy5.5-labeled anti-CXCR5 (TG2/CXCR5), FITC-labeled anti-PD1 (EH12.2H7), Alexa 647-labeled anti-ICOS (C398.4A), PERCP-Cy5.5-labeled anti-CCR7 (TG8/CCR7) (all from Biolegend, France) and PE- or APC-labeled anti-Neuropilin1 (anti-BDCA4, 446921, R&D system, France) were used to delineate and characterized T cells and B cells populations. In order to detect intracellular cytokine production, PBMC were stimulated with 20 ng/ml of PMA and 1 µg/ml ionomycin in the presence of 10 µg/ml brefeldin A (all from Sigma Aldrich) for 5 hours before surface and intracellular staining. Data were acquired on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) using FACSDiva software (BD Biosciences) and were analyzed with FlowJo 8.8.2 software (Treestar).

T cell proliferation and activation

CD4⁺ T cells were isolated from human tonsils using CD4 microbeads (Miltenyi). CD4⁺ CD3⁺ CXCR5⁻ Nrp1⁻, CXCR5⁺ Nrp1⁻ and CXCR5⁺ Nrp1⁺ subsets were isolated

by cell sorting. T cell subsets were activated with 5 µg/ml anti-CD3 ϵ (UCHT1, R&D system) and 2.5 µg/ml anti-CD28 (37407, R&D system) plate-bound antibodies in culture medium (RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 2mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin) during 5 days. In some cases, 1 µCi/well [3 H]-thymidine was added during the last 18 hours of culture and cell proliferation was measured by counting cell associated radioactivity. Cell activation was assessed by CD25 and Nrp1 staining and flow cytometry analysis after 5 days of activation.

B cells culture and co-culture with T cells

CD19 $^+$ B cells were isolated by cell sorting and were cultured (100 x 10 3 cells per 200µl per well) alone or in co-culture with the previously described T cell subsets (50 x 10 3 cells per 200µl per well) in 96-well U-bottom tissue culture plates in culture medium (IMDM supplemented with 10% FCS, 2mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin) during 5 or 10 days. B cell viability was assessed by 7-AAD staining and flow cytometry analysis after 5 days of co-culture. IgG and IgA secretion was determined after 10 days by ELISA.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the appropriate tests, as indicated in the figure legends, using Prism 5.0 software (GraphPad).

Acknowledgements

This work was supported by grants from Ligue Nationale contre le Cancer (LNCC, France), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, France), Ministère de la Recherche, Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC, France), INCa (France), ANR (France), Cancéropole (France) and the Fondation de France (France). We thank Dr Sylvaine You and Dr Roberto Mallone for discussion and reading the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

1. Yu, D. and C.G. Vinuesa, *The elusive identity of T follicular helper cells*. Trends Immunol, 2010. **31**(10): p. 377-83.
2. Yu, D., et al., *The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment*. Immunity, 2009. **31**(3): p. 457-68.
3. Rasheed, A.U., et al., *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, 2006. **36**(7): p. 1892-903.
4. Breitfeld, D., et al., *Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production*. J Exp Med, 2000. **192**(11): p. 1545-52.
5. Schaerli, P., et al., *CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function*. J Exp Med, 2000. **192**(11): p. 1553-62.
6. Fazilleau, N., et al., *Follicular helper T cells: lineage and location*. Immunity, 2009. **30**(3): p. 324-35.
7. Qi, H., et al., *SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation*. Nature, 2008. **455**(7214): p. 764-9.
8. Milpied, P., et al., *Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3+ Treg*. Eur J Immunol, 2009. **39**(6): p. 1466-71.
9. Pellet-Many, C., et al., *Neuropilins: structure, function and role in disease*. Biochem J, 2008. **411**(2): p. 211-26.
10. Soker, S., et al., *Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor*. Cell, 1998. **92**(6): p. 735-45.
11. He, Z. and M. Tessier-Lavigne, *Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III*. Cell, 1997. **90**(4): p. 739-51.
12. Kolodkin, A.L., et al., *Neuropilin is a semaphorin III receptor*. Cell, 1997. **90**(4): p. 753-62.
13. Serini, G., et al., *Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function*. Nature, 2003. **424**(6947): p. 391-7.
14. Miao, H.Q., et al., *Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165*. J Cell Biol, 1999. **146**(1): p. 233-42.
15. Ellis, L.M., *The role of neuropilins in cancer*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(5): p. 1099-107.
16. Bachelder, R.E., et al., *Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells*. Cancer Res, 2001. **61**(15): p. 5736-40.
17. Karjalainen, K., et al., *Targeting neuropilin-1 in human leukemia and lymphoma*. Blood, 2010.
18. Pan, Q., et al., *Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth*. Cancer Cell, 2007. **11**(1): p. 53-67.
19. Sugahara, K.N., et al., *Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs*. Science, 2010. **328**(5981): p. 1031-5.
20. Dzionek, A., et al., *BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6037-46.
21. Tordjman, R., et al., *A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response*. Nat Immunol, 2002. **3**(5): p. 477-82.
22. Bruder, D., et al., *Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells*. Eur J Immunol, 2004. **34**(3): p. 623-30.
23. Sarris, M., et al., *Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition*. Immunity, 2008. **28**(3): p. 402-13.
24. Battaglia, A., et al., *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**(1): p. 129-38.
25. Jackson, S.M., et al., *Key developmental transitions in human germinal center B cells are revealed by differential CD45RB expression*. Blood, 2009. **113**(17): p. 3999-4007.

26. Cappione, A., 3rd, et al., *Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus*. J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3205-16.
27. Grammer, A.C., et al., *Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions*. J Clin Invest, 2003. **112**(10): p. 1506-20.
28. Dzionek, A., et al., *Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions*. Hum Immunol, 2002. **63**(12): p. 1133-48.
29. Yu, D., et al., *Roquin represses autoimmunity by limiting inducible T-cell co-stimulator messenger RNA*. Nature, 2007. **450**(7167): p. 299-303.
30. Glinka, Y. and G.J. Prud'homme, *Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(1): p. 302-10.
31. Lepelletier, Y., et al., *Immunosuppressive role of semaphorin-3A on T cell proliferation is mediated by inhibition of actin cytoskeleton reorganization*. Eur J Immunol, 2006. **36**(7): p. 1782-93.
32. Catalano, A., et al., *Semaphorin-3A is expressed by tumor cells and alters T-cell signal transduction and function*. Blood, 2006. **107**(8): p. 3321-9.
33. Hsieh, S.H., et al., *Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells*. Oncogene, 2008. **27**(26): p. 3746-53.
34. Murga, M., O. Fernandez-Capetillo, and G. Tosato, *Neuropilin-1 regulates attachment in human endothelial cells independently of vascular endothelial growth factor receptor-2*. Blood, 2005. **105**(5): p. 1992-9.
35. Shimizu, M., et al., *Determination of cell adhesion sites of neuropilin-1*. J Cell Biol, 2000. **148**(6): p. 1283-93.
36. Valdembrì, D., et al., *Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates alpha5beta1 integrin traffic and function in endothelial cells*. PLoS Biol, 2009. **7**(1): p. e25.
37. Vinuesa, C.G., et al., *T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection*. Immunol Rev, 2010. **237**(1): p. 72-89.
38. Boles, K.S., et al., *A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC*. Eur J Immunol, 2009. **39**(3): p. 695-703.
39. Fazilleau, N., et al., *The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding*. Nat Immunol, 2009. **10**(4): p. 375-84.
40. Allen, C.D., T. Okada, and J.G. Cyster, *Germinal-center organization and cellular dynamics*. Immunity, 2007. **27**(2): p. 190-202.
41. Victora, G.D., et al., *Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter*. Cell, 2010. **143**(4): p. 592-605.
42. Simpson, N., et al., *Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(1): p. 234-44.

III) L'expression de la neuropiline 1 est caractéristique d'une hyperactivité des lymphocytes T dans l'inflammation périphérique

Amédée Renand, Pierre Milpied, Sophie Georgin-Lavialle, Jean-Benoit Arlet, Olivier Hermine.

CNRS UMR 8147, hôpital Necker, université Paris Descartes, Paris

Dans cette partie, je présente des résultats préliminaires sur l'expression de la Nrp1 à la surface des lymphocytes T au cours de leur activation. Nous avons préalablement montré que l'activation par le TCR des lymphocytes T *in vitro* induit l'expression de la Nrp1 et ce en association avec l'expression du CD25. Cependant, dans les deux études précédentes, réalisées *ex vivo* chez l'homme, et dans lesquelles nous avons analysé les lymphocytes T dans le sang périphérique et dans les organes lymphoïdes secondaires, nous n'avons pas trouvé de lymphocytes T exprimant à la fois la Nrp1 et le CD25. Ces résultats nous ont alors amené à penser que l'absence d'expression de la Nrp1 sur les lymphocytes T activés serait le reflet d'une faible activation de ces cellules. C'est pourquoi, nous avons décidé d'étendre nos recherches à l'étude de prélèvements de patients atteints de maladies auto-immunes ou inflammatoires, afin d'évaluer l'importance de l'expression de la Nrp1 en situation d'activités anormales des lymphocytes T. Nous avons déjà démontré que l'expression de la Nrp1 est caractéristique de l'activité des Tfh dans les organes lymphoïdes secondaires, mais cette expression ne correspond pas à celle observée *in vitro* sur les lymphocytes T activés exprimant le CD25.

Cette étude a été réalisée grâce à des prélèvements sanguins issus d'un patient atteint du syndrome de Sharp, de quatre patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, et d'un patient atteint d'une sarcoïdose articulaire duquel nous avons également pu obtenir un échantillon de liquide articulaire présentant une infiltration leucocytaire. Les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde présentent des taux particulièrement élevés d'auto-anticorps circulants, suggérant une hyperactivité des Tfh.

A l'aide de ces différents prélèvements, nous avons pu répondre à plusieurs hypothèses. Premièrement, l'accumulation d'auto-anticorps a déjà été décrite comme étant le reflet d'une hyperactivité des Tfh chez les patients atteints de lupus

(Simpson et al., 2010). Il est donc intéressant de déterminer la proportion de Tfh circulants chez ces patients et de caractériser leur expression en Nrp1.

Deuxièmement, le liquide articulaire est un lieu d'inflammation provoquée par l'infiltration de lymphocytes T. L'analyse phénotypique de ces lymphocytes T infiltrés est donc intéressante pour évaluer l'importance de l'expression de la Nrp1, au cours de l'activité des lymphocytes T, et établir une corrélation avec les observations faites *in vitro* (Milpied et al., 2009).

Troisièmement, l'inhibition de la Nrp1 sur les lymphocytes T a été décrite comme aggravant les maladies auto-immunes chez la souris (Solomon et al., 2011; Yamamoto et al., 2008). La Nrp1 apparaissant donc nécessaire au contrôle de la réponse immune, nous avons alors cherché un candidat susceptible d'induire une surexpression de la Nrp1 sur les lymphocytes T activés afin de proposer d'éventuelles perspectives thérapeutiques capables de limiter l'activité des lymphocytes T.

A travers cette étude, nous montrons clairement que l'expression de la Nrp1 est restreinte à l'activation des lymphocytes T mémoires de type Tfh ou TEM, au niveau central et périphérique respectivement. Ainsi, au sein des organes lymphoïdes secondaires, seulement les Tfh vont exprimer la Nrp1, caractérisant leur engagement avec les lymphocytes B, alors que, à l'inverse, dans le sang, qu'il s'agisse des donneurs sains ou des patients atteints de maladies auto-immunes, l'expression de la Nrp1 n'apparaît pas sur les Tfh circulant. Par ailleurs, au niveau des sites d'inflammation en périphérie, l'expression de la Nrp1 est exclusivement retrouvée sur les lymphocytes T activés CD25⁺, ce qui correspond à une hyperactivation des lymphocytes T effecteurs, arrivés en fin d'activation. De plus, nous avons découvert que l'acide rétinoïque (ATRA) induisait une surexpression de la Nrp1 lors de l'activation des lymphocytes T *in vitro* et ce, indépendamment de l'induction de Foxp3 caractéristique des Treg.

RESULTATS

Les Tfh circulants n'expriment pas la Nrp1

Dans le sang périphérique la seule population qui exprime la Nrp1 est la population dendritique plasmacytoïde (PDC), elle exprime le CD4 à un niveau intermédiaire, mais pas le CD3 (Figure. 1 A). La visualisation de cette population permet de contrôler l'efficacité du marquage Nrp1 en cytométrie en flux. Le phénotype des Tfh circulants est basé sur l'expression des marqueurs CXCR5 et ICOS, au sein de la population CD4⁺ CD3⁺ (Figure. 1 B). Cette méthode d'analyse permet de distinguer les Tfh circulants (CXCR5⁺) de ceux du centre germinatif (GC Tfh) caractérisés par l'expression simultanée de CXCR5 et ICOS (Morita et al., 2011; Yu and Vinuesa, 2010). Nous observons une très faible expression de la Nrp1 (0,30%) parmi les lymphocytes T CD4⁺ CD3⁺ de donneurs sains, et ce indépendamment de l'expression du CXCR5 (Figure. 1 B).

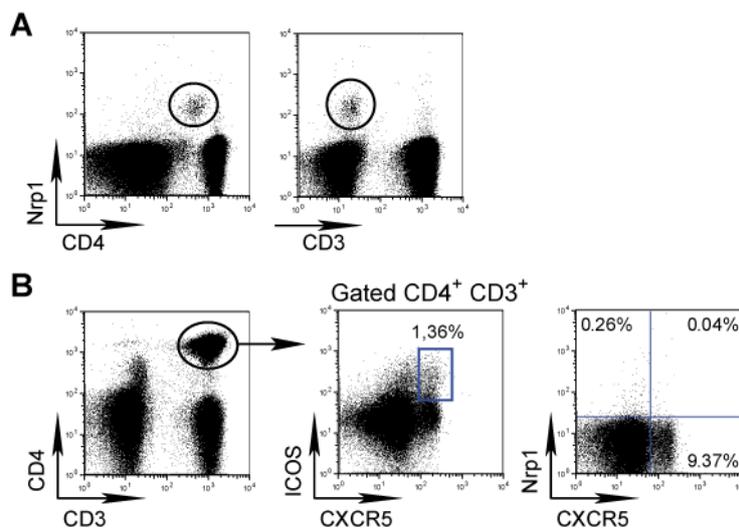


Figure. 1. Les Tfh circulants n'expriment pas la Nrp1. (A) L'identification de la population PDC Nrp1⁺ CD4^{low} CD3⁻ dans le sang périphérique permet de contrôler l'efficacité du marquage Nrp1. (B) L'identification de la population GC Tfh (ICOS^{high} CXCR5⁺) et Tfh circulant (CXCR5⁺) au niveau des lymphocytes T CD4⁺ CD3⁺, révèle que l'expression de la Nrp1 dans le sang périphérique est faible et ne correspond pas aux Tfh. Ce marquage est représentatif de l'ensemble des prélèvements de donneurs sains et atteints des diverses maladies auto-immunes décrites ci-dessus.

Bien que les différents patients présentent des taux élevés d'auto-anticorps circulants, le phénotype des Tfh et l'expression de la Nrp1 ne présentent pas de grande différence avec les donneurs sains (Table 1). Néanmoins, les patients atteints de polyarthrites rhumatoïdes (P2, P3 et P4) ou de sarcoïdose ont une expression plus élevée de CXCR5, sans pour autant présenter de différence dans le pourcentage en GC Tfh (ICOS^{high} CXCR5⁺) contrairement aux études des patients atteints de lupus érythémateux (Simpson et al., 2010). Bien que cette étude soit restreinte et nécessiterait un panel de patients plus important, les Tfh circulants n'expriment pas la Nrp1.

	% Nrp1 ⁺ CXCR5 ^{-/+}	% ICOS ^{high} CXCR5 ⁺	% CXCR5 ⁺
Healthy Donors (n=3)	0,13 ± 0,12%	0,85 ± 0,49%	6,67 ± 2,14%
Syndrome de Sharp	0,35%	0,40%	3,85%
Sarcoïdose	0,36%	0,81%	9,50%
Polyarthrite rhumatoïde (P1)	0,50%	0,61%	6,40%
Polyarthrite rhumatoïde (P2)	0,23%	1,05%	8,30%
Polyarthrite rhumatoïde (P3)	0,15%	0,63%	12,01%
Polyarthrite rhumatoïde (P4)	0,36%	0,88%	18,70%

Table 1.

L'expression de la Nrp1 sur les lymphocytes T activés est retrouvée au niveau des sites d'inflammations périphériques

L'expression de la Nrp1 au cours de l'activation des lymphocytes T *in vitro* et son implication dans le contrôle de la réponse immune chez la souris, nous a amené à étudier les lymphocytes T de l'inflammation périphérique. Nous avons eu l'opportunité d'obtenir un échantillon de liquide articulaire d'un patient atteint d'une sarcoïdose articulaire. Lors de crise « inflammatoire », le patient est victime d'une infiltration de ses articulations par des lymphocytes T, provoquant alors une inflammation importante, au niveau de laquelle le médecin effectue une ponction. L'utilisation d'immunosuppresseurs permet de contrôler ces épisodes inflammatoires.

Nous avons donc réalisé un phénotype des lymphocytes T dans cet échantillon, et avons constaté une forte activité de ces lymphocytes T, principalement CD4⁺, à travers l'expression du CD25 et de la forte augmentation du FSC (forward light scatter) caractéristique des lymphocytes T en prolifération (Figure).

2 A). *In vitro*, l'activation des lymphocytes T induit l'expression du CD25, de la Nrp1 (exclusivement sur les cellules CD25⁺) et une augmentation de l'intensité du FSC. Or, dans le liquide articulaire, nous pouvons remarquer qu'une partie des cellules CD25⁺ expriment la Nrp1 et présentent une intensité plus élevée du FSC. Ceci montre donc que ces lymphocytes T CD4⁺, exprimant à la fois la Nrp1 et le CD25, sont bien des cellules en cours d'activation (Figure. 2 A). De plus, ICOS, autre marqueur pouvant être associé à l'activation, est également retrouvé à la surface de ces cellules, mais pas CXCR5, ce qui exclut une infiltration des Tfh, normalement localisées dans les organes lymphoïdes secondaires (Figure. 2 B). En comparaison, les lymphocytes T CD4⁺ du sang périphérique (PBMC), de ce même patient ont été analysés et n'ont pas ou peu montré d'expression de la Nrp1, y compris parmi les cellules exprimant le CD25 (Figure. 1 A). Dans les amygdales, l'expression de la Nrp1 est restreinte aux Tfh qui, à la différence des lymphocytes T effecteurs classiques, ne prolifèrent pas après activation et n'expriment pas le CD25 (c.f Chap résultats II)). Ainsi, nous avons pu observer au sein des amygdales et du sang périphérique une faible activité des lymphocytes T associée à un faible pourcentage d'expression en CD25 et une absence d'augmentation d'intensité du FSC, ce qui expliquerait l'absence de Nrp1 à la surface des lymphocytes T CD25⁺ dans les organes lymphoïdes secondaires et dans le sang périphérique (Figure. 2 A).

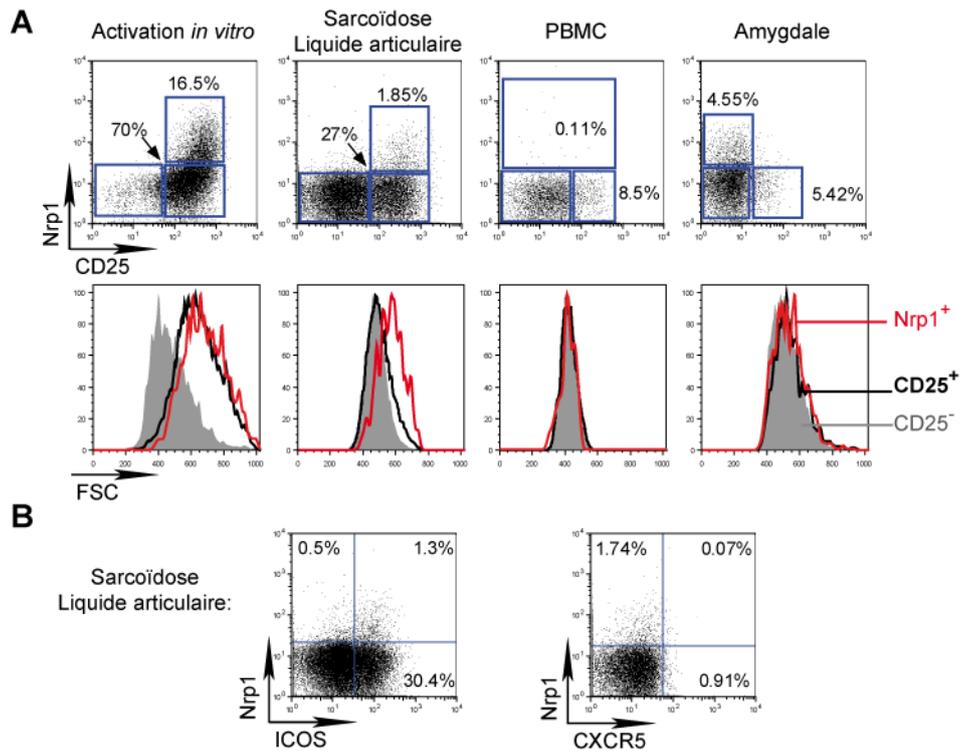


Figure. 2. L'expression de la Nrp1 sur les lymphocytes T activés est restreinte aux sites d'inflammations périphériques. (A) Comparaisons de l'expression du CD25 et de la Nrp1 sur les lymphocytes CD4⁺ CD3⁺ après 72h d'activation *in vitro* avec 10 µg d'anti-CD3 et 5 µg d'anti-CD28 (gauche), l'infiltrat d'une articulation de patient atteint de sarcoïdose (milieu gauche), du sang périphérique du même patient (milieu droite) ou d'une amygdale d'un donneur sain (droite). Chaque population est comparée par rapport à son intensité de FSC, caractérisant la prolifération des lymphocytes T. (B) Phénotype complémentaire des lymphocytes T CD4⁺ CD3⁺ infiltrant pour l'expression d'ICOS et de CXCR5.

L'induction de la Nrp1 sur les lymphocytes T correspond à un niveau d'hyperactivation caractérisant la fin de la réponse immunitaire

Selon le niveau de différenciation, les lymphocytes T ont des potentiels d'activation différents. De même que les lymphocytes T naïfs, les lymphocytes T mémoires centraux (TCM) possèdent un faible potentiel d'activation, alors que les lymphocytes T effecteurs mémoires (TEM) répondent quant à eux très vite à une stimulation par le TCR (Sallusto et al., 1999). De plus, les lymphocytes T naïfs et les TCM s'activent au niveau des organes lymphoïdes secondaires, alors que les TEM ont un tropisme particulier les orientant vers les tissus dans lesquels ils vont s'activer rapidement et éliminer les pathogènes.

Nous avons donc isolé chacune de ces populations sur la base de l'expression du CD45RA et du CCR7 (Figure. 3 A) et évalué leur capacité à exprimer la Nrp1 lors d'activations *in vitro* via une stimulation de leur TCR. Nous avons ainsi pu observer, après stimulation, un niveau d'expression de la Nrp1 élevé sur la population des lymphocytes TEM, coïncidant avec leur état d'activation et leur expression importante de CD25, supérieur à celui détecté sur les lymphocytes T naïfs et TCM (Figure. 3 A, B). Après trois jours d'activation *in vitro*, nous avons isolé la population Nrp1⁺ afin de la caractériser et nous avons constaté une sensibilité particulière de ces cellules à l'apoptose après réactivation par leur TCR (Figure. 3 C). De plus, ces cellules Nrp1⁺ n'ont pas la capacité de proliférer après réactivation de leur TCR (Figure. 3 D). Ces expériences montrent donc que la Nrp1 est exprimée par les lymphocytes T fortement activés lors de la phase précédant leur fin d'activation.

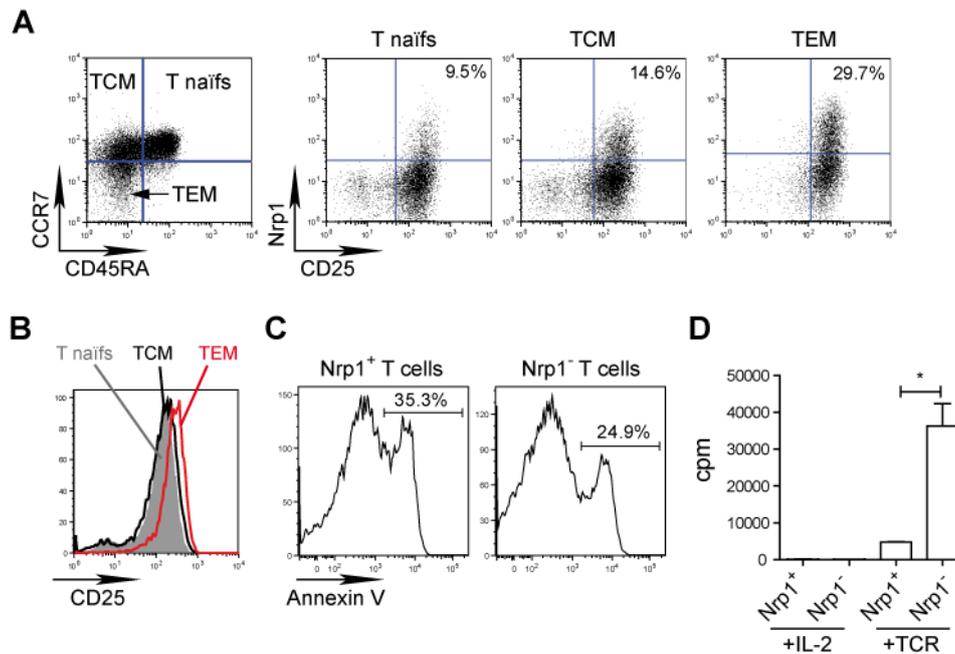


Figure. 3. L'induction de la Nrp1 sur les lymphocytes T correspond à un niveau d'hyperactivation caractérisant la fin de la réponse immunitaire. (A) Les différentes populations de lymphocytes T naïfs, TCM et TEM sont isolées sur l'expression du CD45RA et du CCR7. Ces cellules sont activées par le TCR durant 72h *in vitro* et analysées sur leur expression en CD25 et en Nrp1. (B) Ces trois populations sont comparées par rapport à leur intensité d'expression en CD25 afin de prendre en compte leurs niveaux d'activations. (C) Après 72h d'activation *in vitro*, les lymphocytes T Nrp1⁺ et Nrp1⁻ sont isolés et réactivés par leur TCR. Après 12h de réactivation l'apoptose des cellules est mesurée par un marquage Annexine V. (D) La capacité de prolifération des lymphocytes T Nrp1⁺ et Nrp1⁻ est mesurée par incorporation de ³H Thymidine après trois jours d'activation *in vitro*. Les résultats sont comparés par le test statistique *Student's impaired T test* (ns: non significatif, *: p≤0.05 **: p≤0.01, ***: p≤0.001).

L'acide rétinoïque (ATRA) induit une surexpression de la Nrp1 sur les lymphocytes T indépendamment de l'expression de Foxp3

L'ATRA est un dérivé de la vitamine A qui suscite un intérêt croissant en immunologie de part sa capacité à induire la différenciation de lymphocytes T naïfs en Treg Foxp3⁺ en présence de TGF- β (Schambach et al., 2007). Lors d'expériences *in vitro* d'induction de Treg, nous nous sommes rendus compte que l'utilisation seule de l'ATRA, durant l'activation des lymphocytes T, induisait une forte expression de la Nrp1 (Figure. 4 A) et ce, indépendamment de l'expression de Foxp3 (Figure. 4 B). Ainsi, lors de l'activation des lymphocytes T, l'ATRA seul n'a pas la capacité d'induire l'expression de Foxp3, mais celle de Nrp1, par ailleurs très peu exprimée par les cellules Foxp3⁺. De plus, nous avons constaté que la Nrp1, retrouvée sur les lymphocytes T activés en cours de division, voit son expression augmenter en présence de l'ATRA (Figure. 4 C). En plus d'induire l'expression de la Nrp1, l'ATRA a également la capacité de réduire la prolifération des lymphocytes T *in vitro* (Figure. 4 D). Ainsi, ces résultats mettent en évidence un potentiel immunorégulateur de l'ATRA possiblement lié à ses effets sur l'induction de la Nrp1.

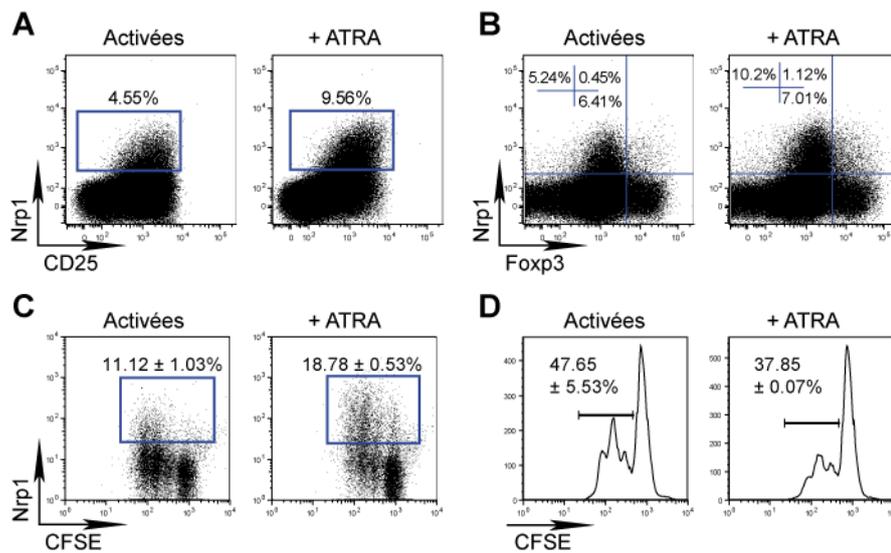


Figure. 4. L'ATRA induit une surexpression de la Nrp1 sur les lymphocytes T indépendamment de l'expression de Foxp3. (A) Après 72h d'activation *in vitro*, l'ajout de 10nM d'ATRA entraîne l'augmentation de la Nrp1 à la surface des lymphocytes T activés CD25⁺. (B) L'induction de la Nrp1 est indépendante de l'expression de Foxp3 sur ces lymphocytes T activés. (C) L'incorporation de CFSE par les lymphocytes T en activation permet de mesurer la divisions cellulaires et l'expression de la Nrp1. (D) Représentation en histogramme de la dilution du CFSE durant l'activation des lymphocytes T en présence ou non d'ATRA. Le pourcentage représente la proportion de cellules entrées en divisions. (C et D) Les pourcentages indiqués représentent la moyenne de trois expériences avec l'écart type.

Dans cette étude, nous montrons que l'expression de la Nrp1 est restreinte à l'activation centrale des Tfh dans les organes lymphoïdes secondaires et à l'activation périphérique des lymphocytes T effecteurs, probablement de type effecteur mémoire (TEM) au niveau des sites d'inflammations. L'expression de la Nrp1 est le reflet d'une forte activation et correspond à un niveau de fin de réponse. Il est décrit que l'inhibition de la Nrp1 ou de la boucle autocrine de la Sema-3A provoque une hyperactivité des lymphocytes T qui, privés de signaux contrôlant leur fin d'activation, continuent de proliférer de manière excessive et de jouer leur rôle d'effecteurs (Catalano, 2010; Lepelletier et al., 2006; Solomon et al., 2011; Yamamoto et al., 2008). Ainsi, l'expression de la Nrp1 est indispensable pour freiner l'activité des lymphocytes T. D'après nos résultats, il semble intéressant d'étudier les effets de l'ATRA, ou d'autres dérivés de la vitamine A, afin de réguler l'activation des lymphocytes T. En effet, l'ATRA permet d'augmenter l'expression de la Nrp1 sur les lymphocytes T en cours d'activation et ce indépendamment de l'induction du facteur de transcription Foxp3. De plus, l'ATRA a la capacité de réduire la prolifération des lymphocytes T *in vitro*. Ces résultats suggèrent que l'ATRA pourrait être utilisé comme un immunorégulateur et que son action exercée sur l'induction d'une surexpression de la Nrp1, permettrait de sensibiliser les lymphocytes T à la Sema-3A exogène ou endogène.

IV) Le défaut génétique du CD25 chez l'homme est associé à un déséquilibre de l'homéostasie des lymphocytes Treg et T effecteurs

Dans le modèle murin de l'inactivation du gène de l'*il2ra*, il a été montré que ce défaut génétique était responsable d'une lymphoprolifération associée à de l'auto-immunité. De plus, il est décrit que l'expression du CD25 est indispensable à la survie des Treg, mais pas à leur génération (Fontenot et al., 2005). Chez l'homme, seulement deux cas ont été décrits et associés à de l'auto-immunité définie comme syndrome IPEX-like, autrement dit comparable aux patients possédant un défaut génétique sur le gène *FOXP3* (Caudy et al., 2007; Sharfe et al., 1997). Cependant, l'influence d'une déficience en CD25 sur l'homéostasie des Treg et des lymphocytes T effecteurs reste encore peu connue chez l'homme.

Dans cette étude, nous présentons trois nouveaux cas humains de déficience en CD25 due à des mutations sur le gène *IL2RA*. Ces patients âgés de 2, 6 et 26 ans, ont développé diverses maladies auto-immunes s'aggravant avec l'âge. Ainsi, notre travail basé sur l'étude de l'homéostasie des Treg naïfs et effecteurs d'une part, et celle des lymphocytes T naïfs et mémoires d'autre part, a donc été réalisé en tenant compte des différences d'âge des donneurs.

Il ressort de cette étude que l'absence de CD25 induit un défaut de l'homéostasie des Treg associé à un défaut de maintien. En parallèle, l'absence de CD25 provoque une hyperactivité des lymphocytes T avec une accumulation de lymphocytes T mémoires effecteurs et une lymphoprolifération. Les résultats sont présentés ci-dessous sous forme d'article.

Genetic CD25-deficiency is associated with impaired regulatory T cells and effector T cells homeostasis and IPEX-like syndrome in humans

Amédée Renand 1, Bénédicte Neuven 2, Pierre Milpied 1, Julie Bruneau 1, Frank Ruemmele, Capucine Picard, Olivier Hermine 1, Frederic Rieux-Laucat 2.

1 CNRS UMR 8147, hôpital Necker, université Paris Descartes, Paris

2 INSERM U 768, hôpital Necker, université Paris Descartes, Paris

Abstract

CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T (Treg) cells play a central role in the control of autoimmunity. In mice, IL-2 / CD25 signaling is dispensable for Treg cell generation but is required for Treg cell homeostasis. Although rare cases of CD25 deficiency due to *IL2RA* gene mutations have been described, the role of CD25 in human Treg and T cell homeostasis remains poorly understood. Here we present three human cases with autosomal recessive mutations in the *IL2RA* gene resulting in the complete absence of CD25 cell surface expression, and in autoimmune diseases resembling the IPEX syndrome. Although the three patients had normal percentages of Foxp3⁺ CD4⁺ T cells in the blood, the balance between naive and effector Treg cells was altered in all patients and was characteristic of a default in Treg cell homeostasis. Moreover, the three patients had an altered CD4/CD8 ratio with higher proportions of CD4⁺ and CD8⁺ effector T cells. These results suggest that CD25 is critical to Treg cell homeostasis, to control effector CD4⁺ and CD8⁺ T cells numbers, and to maintain immune tolerance in humans.

Introduction

Regulatory T (Treg) cells are key players in the control of autoimmunity. Treg cells are characterized by the expression of the transcription factor Foxp3 and high expression of the IL-2 receptor alpha chain (CD25) (Shevach, 2009). Foxp3 deficiency provokes a fatal autoimmune disease in mice and humans associated with a major default in Treg cell development and function. The autoimmune disease observed in *foxp3*^{-/-} mice can be abrogated by the transfer of wild-type Treg cells (Khattari et al., 2003). In humans, a loss-of-function mutation in the *FOXP3* gene is associated with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) syndrome, an association of multiple severe autoimmune diseases (Bacchetta

et al., 2006; Bennett et al., 2001; Gambineri et al., 2008). The disease starts in early infancy and is rapidly fatal without aggressive therapeutic intervention including allogeneous bone marrow transplantation.

In mice, CD25 expression is dispensable for Treg cells generation but is required for their homeostasis (D'Cruz and Klein, 2005). *il2ra*^{-/-} mice rapidly develop an autoimmune disease associated with T cell homeostasis disorder and T cell lymphoproliferation (Sharma et al., 2007; Willerford et al., 1995). *il2ra*^{-/-} mice have normal amounts of Foxp3 positive T cells with normal suppressive function (D'Cruz and Klein, 2005; Fontenot et al., 2005). However, *il2ra*^{-/-} Treg cells are unable to survive upon adoptive transfer in *rag1*^{-/-} mice (Antony et al., 2006). Human studies show that polymorphisms in the *IL2RA* gene or defects in IL2 / CD25 signaling can be associated with autoimmune disorders like type 1 diabetes, multiple sclerosis, Grave's disease, and rheumatoid arthritis (Alcina et al., 2009; Brand et al., 2007). Only two human cases with complete CD25 deficiency have been described, both suffering from multiple severe autoimmune diseases termed IPEX-like syndrome (Caudy et al., 2007; Sharfe et al., 1997). Although the expression of Foxp3 was found to be normal in one of these cases (Caudy et al., 2007), the symptoms of CD25-deficient patients suggested a profound defect in Treg cell homeostasis and/or function that were not studied in that case report.

Recent reports have shown that in humans Foxp3-expressing T cells compartment is heterogeneous. Foxp3 positive cells can be divided in three distinct populations: naive Treg cells (CD25^{low} Foxp3^{low} CD45RA⁺), effector Treg cells (CD25^{high} Foxp3^{high} Ki67⁺ CTLA-4⁺), both exhibiting suppressive activity in contrast to pro-inflammatory cytokine-secreting (CD25^{low} CD45RA⁻ FoxP3^{low}) T cells, which are devoid of suppressive activity (Miyara et al., 2009). This complexity demonstrates the impossibility to use Foxp3 alone to identify Treg cell populations, especially in the absence of CD25 expression. The proportions of naive Treg and effector Treg cells evolve with age following the same rules as conventional T cells. Naïve T cells, including naive Treg cells, are largely represented at birth and decrease with age (Fuchizawa et al., 2007; Miyara et al., 2009; Valmori et al., 2005) while the inverse correlation is observed for memory T cells and effector Treg cells (Miyara et al., 2009). Activation of naive Treg cells in response to antigen stimulation induces their proliferation and give rise to effector Treg cells (Miyara et al., 2009). In human,

however, the role of IL-2/ IL-2RA interaction in these processes is not clearly established

Herein, we analyzed T cell homeostasis, focusing on Treg and memory T cells subsets repartition, in three patients with CD25 deficiency presenting clinical features of IPEX like syndrome. Because the three patients' ages were different, we compared their data to the average age-related evolution of T cell homeostasis in healthy donors. Our results in CD25-deficient patients are consistent with a major role of CD25 signaling in the homeostasis of Treg cells and in the control of memory T cell numbers in humans.

Results and discussion

CD25 expression defect in 4 patients with IPEX-like syndrome

We report on four patients displaying IPEX-like syndrome with early-onset autoimmune enteropathy and various auto-immune diseases appearing overtime (Table 1). P1 and P4 developed invasive CMV infections. P1 died at the age of 3 months due to disseminated CMV infections and P4 died at the age of 26 years after severe sepsis. P4 progressively developed multiple auto-immune diseases during the course of her disease. She presented frequent otitis media in childhood and later developed several staphylococcus aureus skin abscesses. P1 and P2 were siblings, born from non-consanguineous parents. There were 1 girl and 3 boys. In the later, IPEX syndrome related to Foxp3 anomaly was excluded by its sequencing. Percentage of CD4⁺ Foxp3⁺ T cells was normal in all 3 patients tested (Fig.1 A) but CD25 surface expression on Foxp3⁺ CD4⁺ T cells was totally absent (Fig.1 B). Likewise, all patients displayed homozygous mutations in the *IL2RA* gene (Fig.1 C, D) P1 and P2 had homozygous frameshift mutation in exon 1 with premature stop codon, P3 carried 2 frameshift mutations (in exon 1 and 4) with premature stop codon, P4 was homozygous for a nonsense mutation in exon 6.

Overall, the clinical features of IPEX-like syndromes observed in CD25-deficient patients suggest a default in Treg cell function as in classical Foxp3 deficient patients that are associated with IPEX syndromes.

CD25 deficiency alters the distribution of distinct Foxp3⁺ T cells subsets

First we have characterized Foxp3^{high} T cells in P2 and P4 and found a normal intensity of CTLA-4 that is implicated on the suppressive mechanism of Treg cells. (Supplementary Figure 1). But, we cannot exclude a functional defect of Treg cells in the absence of CD25. Thus, in order to understand at the cellular level by which mechanisms CD25 deficiency give rise to an IPEX like syndrome despite the presence of Treg cells, we have analyzed Treg and effector T cell subsets in patients and age matched controls. Recent reports strongly suggest that the subset of CD4⁺ Foxp3⁺ T cells contains, in addition to Treg cells, pro-inflammatory cytokine-secreting CD45RA⁻ FoxP3^{low} T cells, which are devoid of suppressive activity. Only CD45 RA⁺ Foxp3^{low} naive Treg cells and Ki67⁺ Foxp3^{high} effector Treg cells exhibit regulatory functions. In order to determine the repartition of naive Treg cells (Foxp3^{low} CD45RA⁺) and effector Treg cells (Foxp3^{high} Ki67⁺ CD45RA⁻) in CD25-deficient patients we further analyzed CD45RA and Ki67 and Foxp3 expression in gated CD3⁺ CD4⁺ T cells (Fig. 2 A). Major differences were observed for naive and effector Treg cells (Fig. 2 A, Table 2). CD25-deficient patients presented a lack of naive Treg cells as compared to age-matched healthy donors (HD) but no-difference for Foxp3 expression (Fig. 2 B-C). P2 presented an accumulation of effector Treg cells (2.78% Fig. 2 D) and a dramatic decrease of naive Treg cells (Fig. 2 C). In contrast older patients, P3 and P4, had a significant reduction in naive Treg cells but did not present an accumulation of effector Treg cells (Fig. 2 C, D). Parents of P1, P2 and P4 displayed normal distribution of Treg cells compared to age-match HD, suggesting that no inherited genetic alterations other than CD25-deficiency are likely involved in the Treg and T cell phenotypes observed in our patients. Patients with CD25 deficiency showed a significant decrease of naive Treg cells compared to age-matched controls while this difference was not observed for effector Treg cells. If we consider that effector Treg cells derive from the activation of naive Treg cells, these results suggest a role for CD25 in survival or generation of Treg cells more than differentiation or activation.

To complete this analysis, we determined the total Treg cell fraction, as defined by the addition of naive and effector Treg cells percentages, to exclude pro-inflammatory cytokine-secreting Foxp3^{low} CD45RA⁻ (Foxp3⁺ non-Treg) T cells. Foxp3⁺ non-Treg cells are then determined by subtracting total Treg cells from total Foxp3⁺ CD4⁺ T cells. The total Treg cell fraction does not significantly differ with age in HD, revealing a tightly regulated physiological balance between naive and effector

Treg cells, characterized by decrease of naive Treg cells and increase of effector Treg cells with age (Fig. 2 C-E). In comparison, total Treg cells in CD25-deficient patients dramatically decreased with age (Fig. 2 E).

As described by Miyara *et al*, we observed in HD an increase number of Foxp3⁺ non-Treg with age (Fig. 2F). In patients, this increase was more pronounced (Fig. 2F). Interestingly, the ratio between Foxp3⁺ non-Treg cells and total Treg cells, which is low and inferior to 1 in HD, was much higher in patients (Fig. 2G). This finding strongly suggests a high effector T cell activity in patients and may explain the normal percentage of Foxp3 observed in these patients. This observation was further confirmed by analyzing INF- γ expression in one patient (P4) by Foxp3⁺ T cells. The proportion of INF- γ ⁺ Foxp3⁺ T cells was higher in P4 ($18.03 \pm 1.34\%$) as compared to HD ($12.25 \pm 2.76\%$)(Table 2).

Several studies have shown a relationship between Treg cell homeostasis disorder and immune-related diseases like multiple sclerosis (Venken *et al.*, 2008), IPEX (Fuchizawa *et al.*, 2007) or autoimmune enteropathy (Zuber *et al.*, 2007). Because naive Treg cell defects were observed in three patients tested, we can suspect a major implication of this population in their clinical phenotype (Table 1).

CD25 deficiency alters T cell homeostasis

Autoimmunity is a consequence of auto-reactive T cell expansion and it is describe that IL-2 influence memory T cell population (Letourneau *et al.*, 2009), thus it is important to understand the consequence of CD25 deficiency on the T cell compartment. In mice, Treg cells and IL-2 / CD25 signaling play an important role in T cell homeostasis (Sharma *et al.*, 2007). Thus, in order to assess the role of IL-2 / CD25 signaling in human T cell homeostasis, we analyzed the repartition of naive (CD45RA⁺ CCR7⁺), central memory (TCM, CD45RA⁻ CCR7⁺), effector memory (TEM, CD45RA⁻ CCR7⁻) and terminally differentiated effector (TEMRA, CD45RA⁺ CCR7⁻) T cells on gated CD4 and CD8 populations (Sallusto *et al.*, 1999) in CD25-deficient patients. The three patients had an altered CD4/CD8 ratio with lower proportion of CD4⁺ T cells, but normal proportion of CD3⁺ T cell in the lymphoid gate, compared to HD (Table 3). As previously reported in HD (Czesnikiewicz-Guzik *et al.*, 2008), numbers of both naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells decrease and CD4⁺ TEM cells and TEMRA CD8⁺ T cells accumulate with age (Table 3). In the three patients similar

kinetic was observed, but more pronounced with lower proportions of CD4⁺ and CD8⁺ naïve T cells (Table 3). CD25 deficiency, however, did not alter TCM proportions in CD4⁺ T cells and TCM and TEM proportions in CD8⁺ T cells (Table 3). The elevated numbers of CD4⁺ TEM and CD8⁺ TEMRA cells were associated with a high proportion of IFN- γ producing T cells after *in vitro* stimulation in P4 (CD4⁺: 38.90 \pm 2.41%; CD8⁺: 53.80 \pm 6.85%) versus 20-35 year-old HD (CD4⁺: 15.67 \pm 2.15%; CD8⁺: 33.17 \pm 6.04%). Altogether, these results reflect a high T cell activity that probably favors auto-immune disease. Moreover, we observed a difference between the CD4 and CD8 population homeostasis in absence of CD25. We noticed an aberrant proportion of proliferating CD4⁺ T cells (CD4⁺ Ki67⁺, Table 3) in the three patients comparatively to HD, with higher proportion of CD4 TEM cells and lower number of naïve CD4 T cells. In comparison, an increase in CD8⁺ T cells proliferation was only observed in P4 (8,50 \pm 0,47%) comparatively to 20-35 year-old HD (2,26 \pm 0,27%, Table 3) and accumulation of CD8 TEMRA cells and decrease of naïve CD8 T cells was accentuated with age in the three patients.

Indeed, reduced proportions of naïve T cells with accumulation of memory T cells have been observed in patients with Foxp3 mutations (Costa-Carvalho et al., 2008) and common variable immunodeficiency (Datta and Sarvetnick, 2009; Giovannetti et al., 2007), and can be associated to a lack of Treg cells or to lymphopenia-induced proliferation and reduced thymus output. In this study we can't conclude to the specific origin of the T cells disorder, however, accumulation of IFN- γ reveals a possible effector capacity of T cells independently of CD25 expression. Because serum IL-2 concentrations differed in patients (P 2 = 27 pg/ml, P 3 = 800 pg/ml, P 4 < 7 pg/ml), we suspect a major implication of IL-15 in the observed lymphoproliferation and T cell activation because IL-15 could use IL2R β to mediate signaling. Moreover, CD25-deficiency does not affect the capacity of T cells to differentiate into Foxp3-expressing cells upon culture with TGF- β 1 and high dose IL-2 (1000 U/mL) or 10 ng/mL of IL-15 (Supplementary Fig. 2) and these T cells proliferated after T cell receptor (TCR) activation even in the presence of high dose IL-2 (1000 U/mL) or 10 ng/mL of IL-15, with normal cell survival (Supplementary Fig. 3). These observations suggest the implication of IL2R β and IL-15 for T cell activation in absence of CD25. We hypothesize that CD25-deficiency triggers cytokine-induced proliferation (CIP)(Datta and Sarvetnick, 2009) of T cells that results in higher

proportions of effector memory T cells, Ki67⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and decrease of naive T cells. Thus, in addition to the naïve Treg cell defect, the observed CIP might participate in the IPEX-like phenotype of these patients. A default in activation-induced cell death AICD has been observed in *il2ra*^{-/-} mice and could explain the high proportion of effector T cells in our patients (Van Parijs et al., 1997; Willerford et al., 1995). However, we observed a normal response of human CD25-deficient T cells to AICD *in vitro* (data not shown), thereby discarding AICD failure as the main cause of effector T cells accumulation.

Contrary to IPEX patients with *FOXP3* mutation, CD25-deficient patients suffer from various infectious that suggest an effector T cell failure. It was described that TEMRA CD8⁺ T cells have the highest effector capacity in response to antigen (IFN- γ production and perforin expression) (Geginat et al., 2003), and, in mice, IL-2 / CD25 signaling play a critical role for the generation of functional memory T cells (Dooms et al., 2007; Williams et al., 2006). It was described that in the absence of CD25, CD8⁺ T cells differentiate inefficiently into effector cytotoxic T lymphocytes but produce IFN- γ (Pipkin et al.). Despite increased relative numbers of CD8⁺ TEMRA cells, P4 was highly susceptible to CMV infection, thereby implying that effector T cells are functionally impaired to eliminate pathogens but can participate to autoimmunity by producing IFN- γ in the absence of CD25 in humans, and can explain the patients' susceptibility to infection.

Our work describes for the first time the consequence of CD25 deficiency on human T cell homeostasis and its correlation with autoimmune disease evolution (Table 1). CD25 deficiency provokes Treg cells instability with a marked default in naive Treg cells homeostasis. CD25-deficient patients are characterized by a mild T cell lymphoproliferation and a massive accumulation of effector memory T cells. Finally, Treg cells instability and CIP probably participate closely to autoimmunity in absence of CD25.

Figures

Table 1

	patient 1	patient 2	patient 3	patient 4
sexe	male	male	male	female
age first manifestation	birth	birth	2 months	birth
last follow up (age)	3 months	2.5 years	6 years	26 years
last follow up (status)	died	alive	alive	died
auto-immune diseases /age of onset	enteropathy (birth) eczema (1m)	enteropathy (1m) eczema (1.5y)	enteropathy (2m) eczema (2m) asthma (7m) food allergy(1y)	enteropathy (2m) eczema (3y) AIHA (3y) ITP deafness (10y) Biermer gastritis (10y) diabetes (16y) neutropenia (20y)
lymphoproliferation	NA	mild ADP	mild ADP	mild ADP
infections	Disseminated CMV infection	0	otitis media	recurrent otitis media in childhood, cutaneous SD abces pneumonia chronic CMV infection
Immunosuppressive treatment	none	steroids, sirolimus	steroids, azathioprin	steroids, azathioprin, ciclosporin, sirolimus, monoclonal anti CD20 Ab

m= months; y= year; ADP=adenopathy; AIHA= autoimmune hemolytic anemia; ITP= immune thrombocytopenic purpura; CMV= cytomegalovirus

Table 2

	Cord Blood (n=4)	HD (20-35 year) (n=7)	HD (40-60 year) (n=8)	patient 2 (2.5 year)	patient 3 (6 year)	patient 4 (26 year) (4 samples)
CD4⁺ T cells:						
% <i>Foxp3</i> ⁺	4.44 ± 0.98	6.01 ± 0.97	6.62 ± 1.01	5.57	4.13	6.86 ± 0.70
% naive <i>Treg</i> cells	3.56 ± 0.75	1.77 ± 0.34*	1.46 ± 0.21**	0.38	1.03	0.12 ± 0.02**
% effector <i>Treg</i> cells	0.35 ± 0.02	1.69 ± 0.25**	2.61 ± 0.34***	2.78	0.43	0.80 ± 0.10*
% Total <i>Treg</i> (naive + effector)	3.92 ± 0.77	3.46 ± 0.57	4.18 ± 0.49	3.16	1.46	0.92 ± 0.12**
% <i>Foxp3</i> ⁺ non- <i>Treg</i>	1.06 ± 0.36	2.55 ± 0.45	3.36 ± 0.48**	2.41	2.67	5.94 ± 0.62***
ratio (non- <i>Treg</i> / Total <i>Treg</i>)	0.26 ± 0.08	0.75 ± 0.09**	0.85 ± 0.15*	0.76	1.83	6.60 ± 0.63***
% <i>IFN-γ</i> ⁺ <i>Foxp3</i> ⁺ cells	-	12.25 ± 2.76	5.30 ± 1.05	1.28	-	18.03 ± 1.34
	comparative p value with cord blood			comparative p value with HD (20-35 year)		
	* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001			* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001		

Table 3

	Cord Blood (n=4)	HD (20-35 year) (n=7)	HD (40-60 year) (n=8)	patient 2 (2.5 year)	patient 3 (6 year)	patient 4 (26 year) (4 samples)
Total lymphocyte:						
% <i>CD3</i> ⁺	64.37 ± 6.27	70.66 ± 2.58	70.13 ± 2.38	51.7	70.4	88.47 ± 1.43**
Total T cells:						
% <i>CD4</i> ⁺	83.93 ± 3.56	64.50 ± 2.78**	59.23 ± 3.65**	54.5	53.6	47.35 ± 3.27**
% <i>CD8</i> ⁺	8.09 ± 1.24	28.11 ± 2.46***	29.12 ± 4.74*	31.7	32.6	43.28 ± 4.42**
CD4⁺ T cells:						
% naive <i>T</i> cells	46.40 ± 5.22	44.79 ± 2.88	32.30 ± 5.53	12.4	33.1	1.07 ± 0.18***
% <i>TCM</i> cells	42.57 ± 2.11	28.23 ± 1.15***	36.73 ± 5.28	37.6	38.5	34.05 ± 7.85
% <i>TEM</i> cells	6.59 ± 1.82	23.47 ± 2.68**	24.42 ± 3.81*	45.6	22.2	64.08 ± 7.91***
% <i>Ki67</i> ⁺	2.49 ± 0.06	1.81 ± 0.09**	2.14 ± 0.22	9.88	7.99	6.30 ± 0.94***
% <i>IFN-γ</i> ⁺	-	15.67 ± 2.15	11.59 ± 2.06	3.12	-	38.90 ± 2.41**
CD8⁺ T cells						
% naive <i>T</i> cells	64.13 ± 3.69	47.96 ± 6.67	23.75 ± 3.15***	52.9	30.8	3.49 ± 0.92***
% <i>TCM</i> cells	14.97 ± 2.96	5.29 ± 1.67*	10.06 ± 2.92	7.92	0.95	5.43 ± 2.09
% <i>TEM</i> cells	11.95 ± 4.06	29.10 ± 3.53*	28.88 ± 3.29*	22.8	19.2	41.18 ± 3.02*
% <i>TEMRA</i> cells	8.94 ± 2.92	17.67 ± 5.94	37.32 ± 4.72**	16.3	49	49.93 ± 3.5**
% <i>Ki67</i> ⁺	9.43 ± 0.96	2.26 ± 0.27***	3.93 ± 1.05*	4.14	5.29	8.50 ± 0.47***
% <i>IFN-γ</i> ⁺	-	33.17 ± 2.26	33.85 ± 6.04	9.95	-	53.80 ± 6.85*
	comparative p value with cord blood			comparative p value with HD (20-35 year)		
	* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001			* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001		

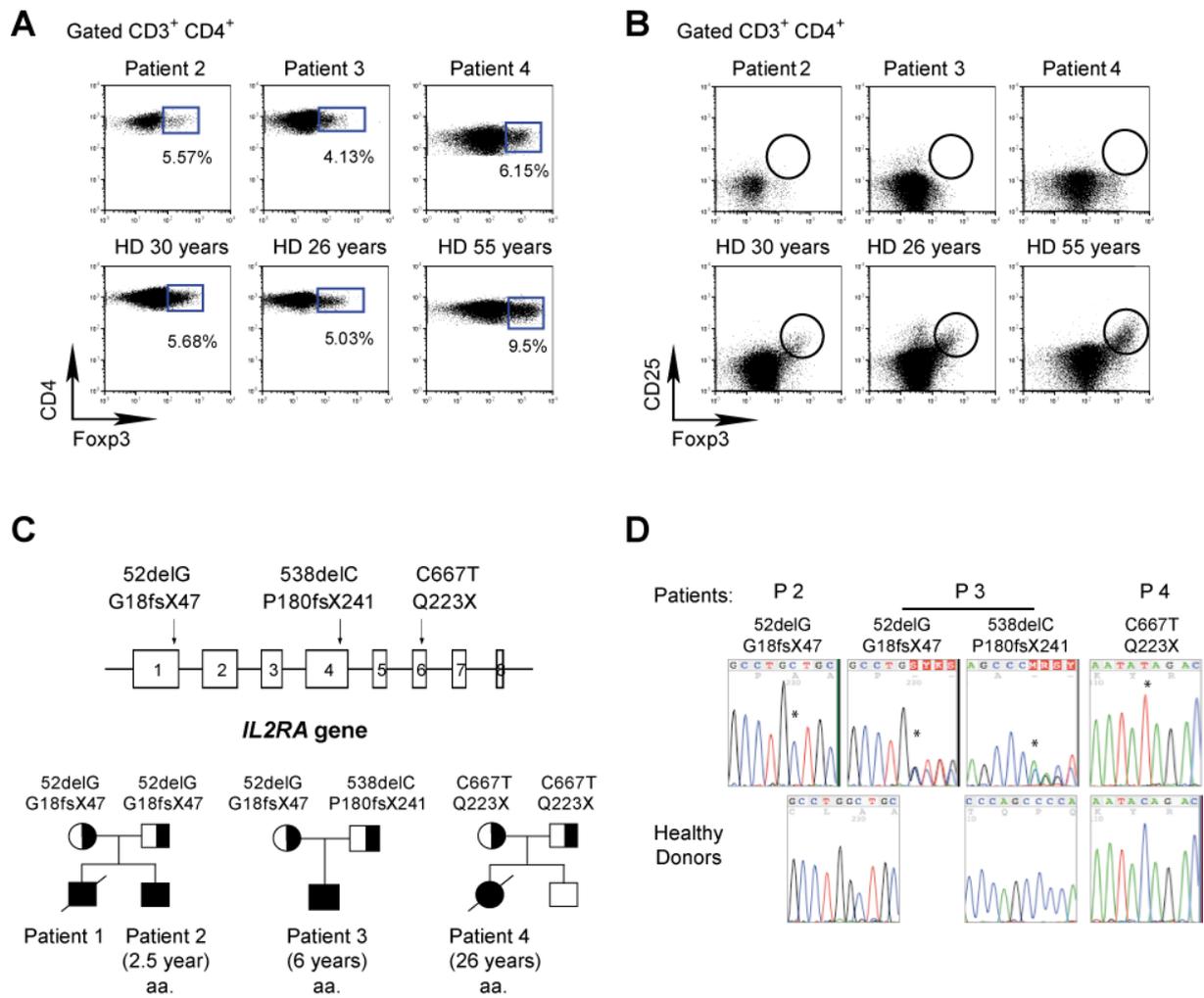


Figure 1. Four patients with autosomal recessive mutations in the *IL2RA* gene resulting in the complete absence of CD25 surface expression. (A-B) Representative flow cytometry profiles from patients and Healthy donors (HD) of the day for the expression of Foxp3 in association with CD25 (B) or with CD4 (A) on gated CD3⁺ CD4⁺ lymphocytes. (C) Schematic representation of the *IL2RA* gene including mutation localization (top) and the phylogenetic analysis of patient mutation (bottom). (D) Sequence trace of patients' genomic DNA showing guanine deletion (*) after position 52 for patient 2. Similar deletion and cytosine deletion (*) after position 538 for patient 3 and switch of cytosine by thymine (*) at position 667 for patient 4.

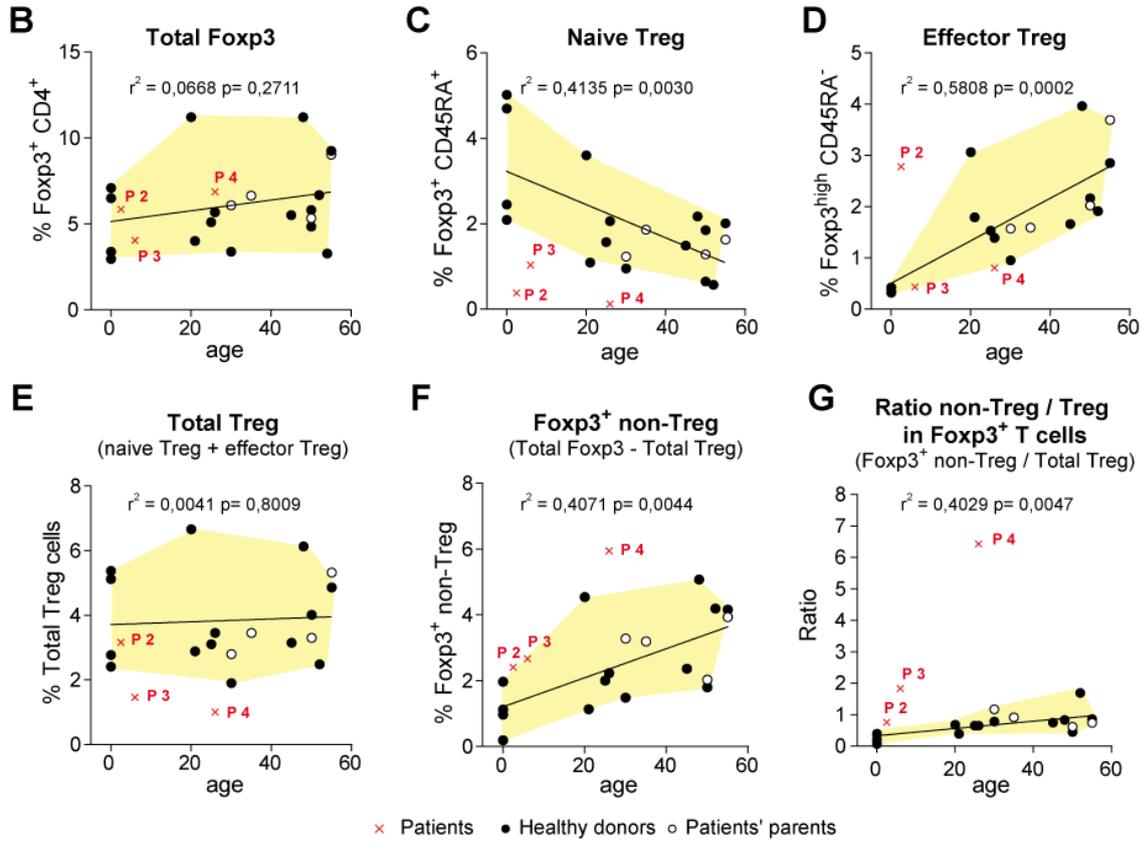
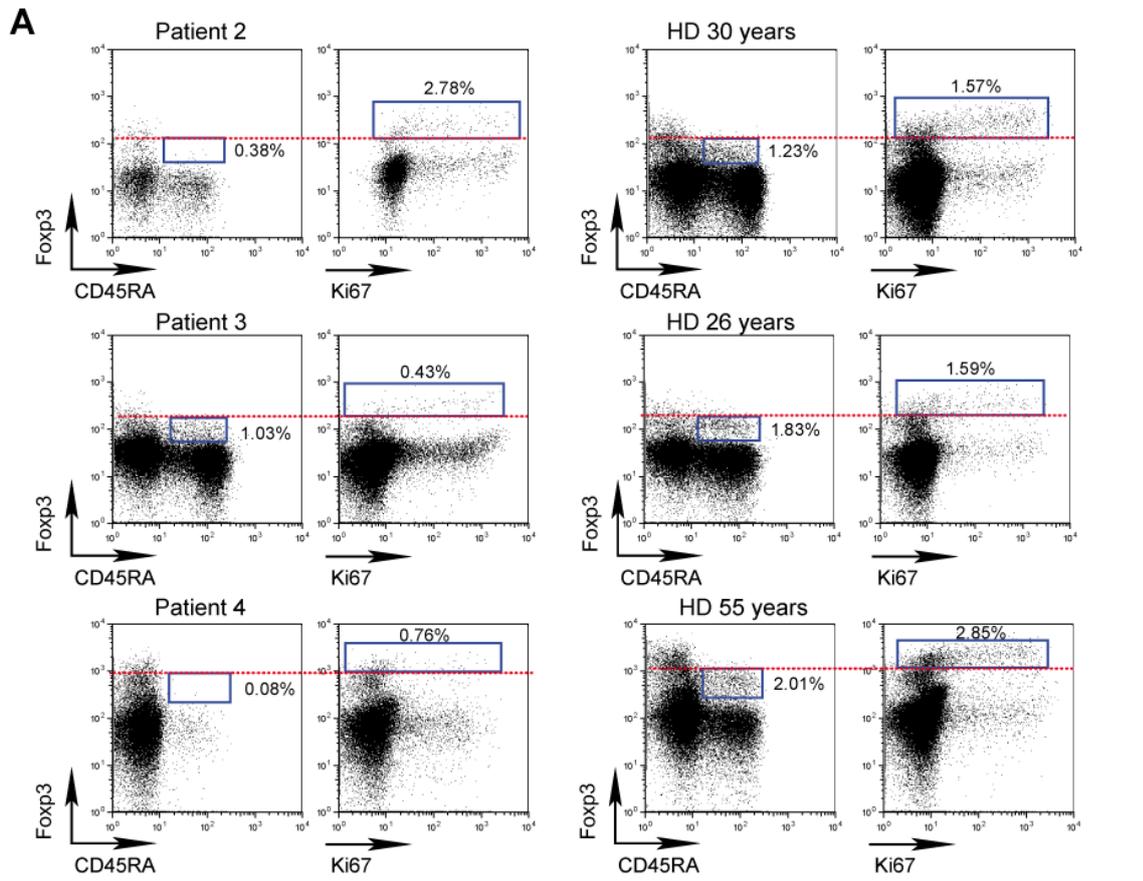
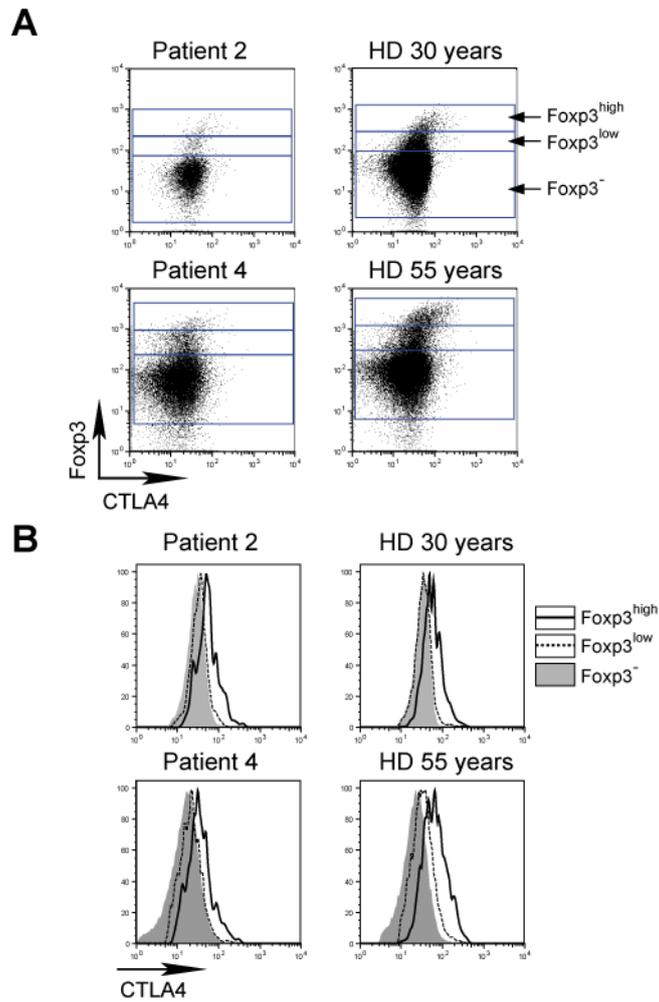
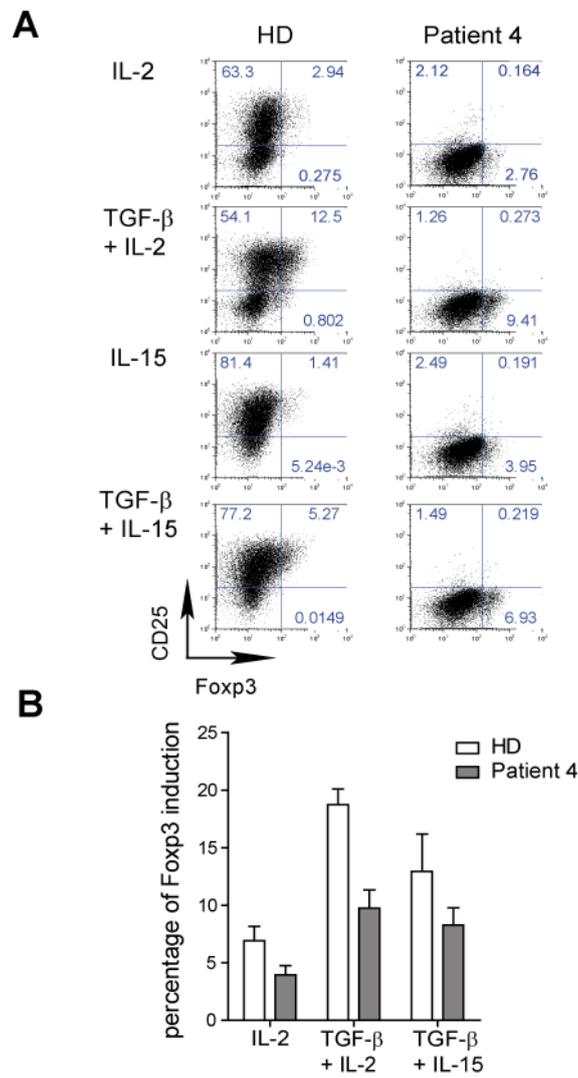


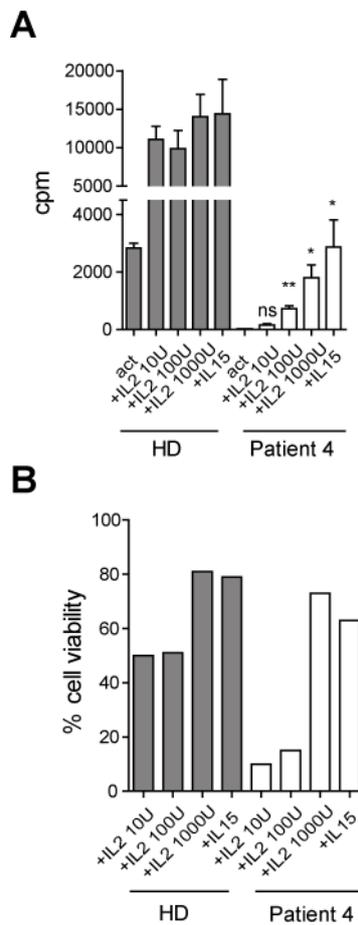
Figure 2. CD25 deficiency alters the distribution of distinct Foxp3⁺ T cell subsets. (A) Representative gate to identify naive Treg (CD45RA⁺ Foxp3⁺) or effector Treg (Ki67⁺ Foxp3^{high}), in three healthy donors comparatively to patients' cells. (B to G) Age-related analysis to determine the homeostasis of Treg population. Healthy donors (dark circles) and parents of patients 4 and 2 (white circles) were used to constitute the normal age-related Treg homeostasis. Patients 2, 3 and 4 (red cross) were incorporated. For patient 4, the red cross represent the mean of the 4 samples. Graphs represent the correlation between age and total Foxp3⁺ CD4⁺ T cells (B), naive Treg cells percentage in CD4⁺ T cells (C), effector Treg cells percentage in CD4⁺ T cells (D), total Treg cells percentages in CD4⁺ T cells (E), Foxp3⁺ non-Treg cells percentages in CD4⁺ T cells (F) and the ratio between Foxp3⁺ non-Treg cells and Total Treg cells in CD4⁺ T cells (F). Total percentage of Treg cells was determined by the ad of CD45RA⁺ Foxp3⁺ and Ki-67⁺ Foxp3^{high} T cells percentage and the Foxp3⁺ non-Treg cells percentage was determined by subtracting Total Foxp3⁺ CD4⁺ percentage by total Treg cells percentage. Line represents linear regression and p value was obtained after linear regression analysis. Linear regression was significant when p value < 0.05.



Supplementary Figure 1. Fopx3^{high} Treg cells of patients present normal CTLA4 expression. (A) Delineation of Fopx3^{high}, Fopx3^{low} and Fopx3⁻ T cells to compare CTLA4 expression. (B) Histograms representation of CTLA4 for each subset Fopx3^{high} (Dark line), Fopx3^{low} (Dashed line) and Fopx3⁻ (full gray) CD4⁺ T cells.



Supplementary Figure 2. CD25 is dispensable for the in vitro induction of Fop3. (A) Induction of Fop3 was measured by flow cytometry after 5 days of activation in presence of TGF- β and IL-15 or high dose of IL-2. (B) Graph representation of 3 experiences of Fop3 induction with patient 4 PBMC.



Supplementary Figure 3. Proliferation and survival of CD25-deficient cells were rescued in presence of IL-15 or high dose of IL-2. (A) PBMC were activated for 5 days and proliferation measured by [³H]-thymidine incorporation. (B) Survival of T cells was measured by 7-AAD expression by flow cytometry. Statistical analysis was performed using the non-parametric T test (* p<0.05; ** p<0.01; ns: not significant).

Materials and Methods

Patients and healthy donors

Umbilical cord blood units were obtained from normal full-term deliveries after mothers' informed consent at the Obstetrics Unit of Necker Hospital (n=4). Peripheral blood samples were obtained from male and female healthy adult volunteers (n=15, 20-60 years), and from three CD25-deficient patients (2.5 year old male, 6 years old male and 26 years old female) with their informed consent or the consent of their parents. 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. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained after centrifugation over a gradient of Lymphocyte Preparation Medium (PAA).

In vitro T cell activation and Foxp3 induction

For T cell activation, PBMCs were activated with 5 µg/ml anti-CD3 ϵ (UCHT1, R&D Systems) and 2.5 µg/ml anti-CD28 (37407, R&D Systems) plate-bound antibodies in culture medium (RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 2mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin) completed with recombinant human IL-2 (10 to 1000 U/ml, Roche) or IL-15 (10 ng/ml, R&D Systems) during 5 days. In some cases, 1 µCi/well [3 H]-thymidine was added during the last 18 hours of culture and cell proliferation was measured by counting cell associated radioactivity. Cell viability was assessed by 7-AAD (BD Biosciences) staining and flow cytometry analysis.

For Foxp3 induction, PBMCs were cultured during 5 days with recombinant human TGF- β 1 (5 ng/ml, R&D Systems) and IL2 (1000 U/ml) or IL15 (10 ng/ml). Foxp3 expression was determined by flow cytometry.

Flow cytometry

Freshly isolated or *in vitro* cultured lymphocytes were stained with anti-CD3 ϵ (OKT3: eFluor450, eBioscience or PE, Beckman Coulter), anti-CD4 (RPA-T4: PECy7, eBioscience), anti-CD25 (BC96: PE, eBioscience or M-A251: FITC, BD Biosciences), anti-CD45RA (5H9: FITC, BD Biosciences), anti-CD8(RPA-T8: APC, BD Biosciences) anti-CCR7 (TG8: PerCPCy5.5, Biolegend), anti-Foxp3 (236A/E7:

APC, eBioscience), anti-Ki67 (B56: AlexaFluor488, BD Biosciences), anti-IFN- γ (4S-B3: PacificBlue, eBioscience), anti-CD152 (BN13: Biotin, BD Biosciences) and streptavidin (PerCP, BD Biosciences). Intracellular staining was performed using the Foxp3 staining kit (eBioscience) following the manufacturer's instructions. For detection of intracellular cytokine production, PBMC were stimulated with 20 ng/ml of PMA and 1 μ g/ml ionomycin in the presence of 10 μ g/ml brefeldin A (all from Sigma Aldrich) for 5 hours before surface and intracellular staining. Data were acquired on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) using FACSDiva software (BD Biosciences) and were analyzed with FlowJo 8.8.2 software (Treestar).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the appropriate tests, as indicated in the figure legends, using Prism 5.0 software (GraphPad).

Acknowledgments

This work was supported by grants from Ligue Nationale contre le Cancer (LNCC, France), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, France), Ministère de la Recherche, Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC, France), INCa (France), ANR (France), Cancéropole (France) and the Fondation de France (France). We thank Dr Sylvaine You and Dr Roberto Mallone for discussion and reading the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

1. Shevach, E.M., *Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression*. *Immunity*, 2009. **30**(5): p. 636-45.
2. Khattri, R., et al., *An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(4): p. 337-42.
3. Bacchetta, R., et al., *Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(6): p. 1713-22.
4. Gambineri, E., et al., *Clinical and molecular profile of a new series of patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome: inconsistent correlation between forkhead box protein 3 expression and disease severity*. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. **122**(6): p. 1105-1112 e1.
5. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. *Nat Genet*, 2001. **27**(1): p. 20-1.
6. D'Cruz, L.M. and L. Klein, *Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(11): p. 1152-9.
7. Sharma, R., et al., *A regulatory T cell-dependent novel function of CD25 (IL-2Ralpha) controlling memory CD8(+) T cell homeostasis*. *J Immunol*, 2007. **178**(3): p. 1251-5.
8. Willerford, D.M., et al., *Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment*. *Immunity*, 1995. **3**(4): p. 521-30.
9. Fontenot, J.D., et al., *A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(11): p. 1142-51.
10. Antony, P.A., et al., *Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo*. *J Immunol*, 2006. **176**(9): p. 5255-66.
11. Alcina, A., et al., *IL2RA/CD25 gene polymorphisms: uneven association with multiple sclerosis (MS) and type 1 diabetes (T1D)*. *PLoS One*, 2009. **4**(1): p. e4137.
12. Brand, O.J., et al., *Association of the interleukin-2 receptor alpha (IL-2Ralpha)/CD25 gene region with Graves' disease using a multilocus test and tag SNPs*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2007. **66**(4): p. 508-12.
13. Caudy, A.A., et al., *CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes*. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. **119**(2): p. 482-7.
14. Sharfe, N., et al., *Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(7): p. 3168-71.
15. Miyara, M., et al., *Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor*. *Immunity*, 2009. **30**(6): p. 899-911.
16. Valmori, D., et al., *A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(7): p. 1953-62.
17. Fuchizawa, T., et al., *Developmental changes of FOXP3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells and their impairment in patients with FOXP3 gene mutations*. *Clin Immunol*, 2007. **125**(3): p. 237-46.
18. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. *Nature*, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
19. Czesnikiewicz-Guzik, M., et al., *T cell subset-specific susceptibility to aging*. *Clin Immunol*, 2008. **127**(1): p. 107-18.
20. Venken, K., et al., *Natural naive CD4+CD25+CD127low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression*. *J Immunol*, 2008. **180**(9): p. 6411-20.
21. Zuber, J., et al., *Severe FOXP3+ and naive T lymphopenia in a non-IPEX form of autoimmune enteropathy combined with an immunodeficiency*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(5): p. 1694-704.

22. Letourneau, S., et al., *IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(4): p. 758-62.
23. Costa-Carvalho, B.T., et al., *A remarkable depletion of both naive CD4+ and CD8+ with high proportion of memory T cells in an IPEX infant with a FOXP3 mutation in the forkhead domain*. Scand J Immunol, 2008. **68**(1): p. 85-91.
24. Giovannetti, A., et al., *Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency*. J Immunol, 2007. **178**(6): p. 3932-43.
25. Datta, S. and N. Sarvetnick, *Lymphocyte proliferation in immune-mediated diseases*. Trends Immunol, 2009. **30**(9): p. 430-8.
26. Van Parijs, L., et al., *Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor*. J Immunol, 1997. **158**(8): p. 3738-45.
27. Geginat, J., A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, *Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4260-6.
28. Doms, H., et al., *Interleukin-2 enhances CD4+ T cell memory by promoting the generation of IL-7R alpha-expressing cells*. J Exp Med, 2007. **204**(3): p. 547-57.
29. Williams, M.A., A.J. Tzgnik, and M.J. Bevan, *Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 890-3.
30. Pipkin, M.E., et al., *Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells*. Immunity, 2010. **32**(1): p. 79-90.

DISCUSSIONS

I) La cartographie de la Nrp1 sur les lymphocytes T chez l'homme

Le facteur de transcription Foxp3 chez l'homme ne cible pas le gène de la Nrp1

La recherche actuelle en immunologie utilise comme modèle principal la souris pour sa facilité d'approche expérimentale. Cependant, il est important de souligner que les résultats de ces travaux, bien que riche d'enseignements cognitifs, ne sont pas toujours transférables à la physiologie et pathologie humaine. Nos travaux sur la Nrp1 en sont un bon exemple. En effet l'expression de la Nrp1 détectée sur la population Treg chez la souris aurait pu permettre une meilleure caractérisation de cette population chez l'homme (Bruder et al., 2004). Mais, nous montrons que la Nrp1 n'est pas retrouvée sur les Treg humains exprimant le facteur de transcription Foxp3. Ainsi, il est impossible d'utiliser ce marqueur chez l'homme pour définir les Treg.

De plus, la transfection de Foxp3 dans des lymphocytes T CD4⁺ Foxp3⁻ murins induit l'expression de la Nrp1 démontrant ainsi que chez la souris, le gène de la Nrp1 est une cible de Foxp3 (Bruder et al., 2004). Or, chez l'homme, les recherches actuelles ne permettent pas de confirmer à cette observation, et il est suggéré que les lymphocytes T Foxp3⁺ Nrp1⁺ retrouvés dans les ganglions drainant la tumeur, pourraient provenir d'une induction de Foxp3 engendrée par la présence de TGF- β dans l'environnement (Battaglia et al., 2009; Battaglia et al., 2008). Cependant, l'expression de la Nrp1 par les lymphocytes T humains est indépendante de l'induction de Foxp3. Et c'est ce que notre étude démontre en mettant en évidence que l'utilisation du TGF- β pour induire l'expression de Foxp3 sur les lymphocytes T CD4⁺ humains, ne permet pas d'induire celle de la Nrp1 (Figure. 21). Au contraire, le TGF- β aurait plutôt tendance à diminuer l'expression de la Nrp1 sur les lymphocytes T activés, ce qui démontre que chez l'homme le facteur de transcription Foxp3 ne cible pas le gène de la Nrp1.

Foxp3 est décrit comme interagissant avec le facteur de transcription NFAT pour d'une part inhiber la transcription des gènes codant pour les cytokines telles

que l'IL-2, l'IL-4 et l'IFN- γ (Bettelli et al., 2005), et d'autre part, favoriser l'expression du GITR et du CTLA-4 (Hu et al., 2007). De plus, NFAT est indispensable à la différenciation des lymphocytes T, et son implication dépend de son interaction avec d'autres facteurs de transcription tels que AP-1 pour permettre la synthèse de cytokines et de récepteurs aux cytokines (Hermann-Kleiter and Baier, 2010). La fixation des facteurs de transcription, telle que NFAT, à l'ADN dépend des sites de liaison présents sur les gènes cibles, et il est probable que le couple NFAT/Foxp3 n'ait pas les mêmes cibles génétiques entre deux espèces.

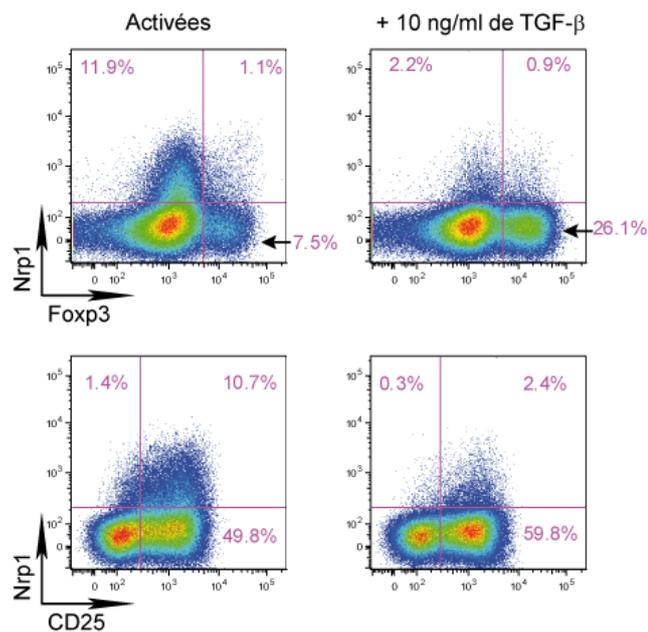


Figure. 21. Chez l'homme, l'induction de Fxp3 dans les lymphocytes T CD4 n'est pas associée à l'expression de la Nrp1. Des lymphocytes T CD4 ont été isolés et activés en culture *in vitro* avec 10 μ g d'anticorps anti-CD3 et 5 μ g d'anticorps anti-CD28, en présence ou non de TGF- β à 10ng/ml. Après 72h d'activation les expressions de Nrp1, Fxp3, et CD25 sont mesurées et analysées par la méthode de cytométrie en flux.

L'importance de la Nrp1 sur les Tfh

Chez l'homme, la Nrp1 exprimée par les lymphocytes T, est retrouvée principalement à la surface des Tfh dans des conditions physiologiques normales au niveau des organes lymphoïdes secondaires, et ce, essentiellement dans les amygdales. Les Tfh circulants CXCR5⁺ n'expriment pas la Nrp1, ce qui laisse penser que cette expression est dépendante de leur localisation. L'expression de la Nrp1 sur les Tfh ne semble pas définir un sous-type cellulaire de Tfh, mais caractérise leur engagement avec les lymphocytes B. En effet, en co-culture *in vitro* les Tfh Nrp1⁻ expriment la Nrp1 au contact des cellules B, et ce en absence de stimulation extérieure. De plus, le taux d'expression de la Nrp1 à la surface des Tfh est corrélé au pourcentage de lymphocytes B du centre germinatif, qui caractérise l'activité des Tfh (Fazilleau et al., 2009a; Yu and Vinuesa, 2010). Nous pouvons donc définir la Nrp1 comme un marqueur de l'activité des Tfh spécifiquement au niveau des centres germinatifs.

Cependant, une question reste en suspens à savoir : quel est le rôle de la Nrp1 sur les Tfh ? D'après nos observations nous pouvons émettre deux hypothèses possibles.

La première hypothèse suggère que la Nrp1 a un rôle de rétro contrôle négatif sur les Tfh. Il est déjà décrit que les plasmocytes contrôlent négativement les Tfh, et inhibent leur production d'IL-21 (Pelletier et al., 2010). En outre, l'absence de plasmocytes aboutit à une hyperactivité des Tfh, mais le mécanisme impliqué dans ce rétro contrôle n'est pas encore connu. Par ailleurs, à la différence des Tfh Nrp1⁻, les Tfh Nrp1⁺ produisent très peu d'IL-21 *ex vivo* et ont une intensité d'expression de CXCR5 et d'ICOS diminuée. Nous pouvons donc supposer que l'induction d'expression de Nrp1 à la surface des Tfh, après interaction avec les lymphocytes B, pourrait servir au rétro contrôle négatif de ces cellules. Il est possible qu'à ce niveau les ligands de la Nrp1, tels que la Sema-3A (Lepelletier et al., 2006), ou encore le TGF- β (Glinka and Prud'homme, 2008), soient impliqués dans ce mécanisme. Par contre, *in vitro*, les Tfh Nrp1⁺ ont la capacité d'induire la différenciation et la survie des lymphocytes B, ce qui suggère l'existence d'une source exogène de ces ligands, pouvant provenir des plasmocytes (Pelletier et al., 2010) ou encore de cellules dendritiques folliculaires (FDC). Actuellement aucune étude n'a mis en évidence l'expression de la Sema-3A aux niveaux des organes lymphoïdes secondaires, mais

il a en revanche été montré que le TGF- β était fortement présent au niveau des centres germinatifs et dans les plasmocytes des organes lymphoïdes secondaires (Ho et al., 2003). De plus, le TGF- β est également retrouvé à la surface des FDC, ainsi que produit par les Tfh eux-mêmes (Dullaers et al., 2009; Suzuki et al., 2010). Cependant, dans ces deux études le TGF- β n'est pas décrit comme immunorégulateur, mais plutôt comme indispensable à l'induction de production d'IgA par les lymphocytes B. Il n'est donc pas à exclure que le TGF- β soit impliqué dans la régulation des Tfh, mais il serait aussi intéressant d'évaluer l'implication et l'expression de la Sema-3A, ligand principal de la Nrp1 et déjà décrite pour ses fonctions immunorégulatrices, au niveau des centres germinatifs (Figure. 22 A).

Notre deuxième hypothèse suggère que la Nrp1 pourrait jouer un rôle dans l'adhésion et l'interaction cellulaire. En effet, une implication directe de la Nrp1 a été décrite via l'interaction de type homotypique s'effectuant entre la Nrp1 des lymphocytes T et la Nrp1 des DC (Sarris et al., 2008; Tordjman et al., 2002). De plus, le maintien du centre germinatif et la sélection des clones de lymphocytes B mémoires du centre germinatif passent par de nombreuses interactions, notamment celles s'effectuant entre les BCR des lymphocytes B et les CMH II des FDC qui permettent une activation antigène spécifique des lymphocytes B, puis une différenciation de ces dernières en cellules B mémoires du centre germinatif. D'autres interactions ont lieu entre les TCR des Tfh et les CMH II des lymphocytes B en association avec les liaisons de diverses molécules de costimulation (Fazilleau et al., 2009a; Yu and Vinuesa, 2010). Chaque étape d'activation aboutit à une prolifération des lymphocytes B du centre germinatif et se caractérise par une dynamique de migration entre la zone claire et la zone sombre du centre germinatif (Allen et al., 2007b; Vitoria et al., 2010). En effet, dans une première étape, les lymphocytes B présents au niveau de la zone claire s'activent au contact des FDC, avant d'effectuer une migration vers la zone sombre où ils prolifèrent. Puis, après expansion clonale, ces lymphocytes B regagnent la zone claire dans laquelle ils sont soumis à une sélection antigénique au contact des Tfh. Ceci provoque une réactivation des lymphocytes B qui migrent de nouveau vers la zone sombre où ils poursuivent leur prolifération. Ainsi, ce mécanisme permet de maintenir un pool constant et important de lymphocytes B mémoires du centre germinatif et de mettre en place une mémoire à long terme grâce à leur différenciation en plasmocytes producteurs d'anticorps. La proximité de ces trois types cellulaires au niveau de la

zone claire, et la possibilité d'interactions entre Tfh et FDC (Boles et al., 2009), laissent à penser qu'il pourrait se former une sorte de « ménage à trois » à ce niveau avec une possible implication de la Nrp1 (Figure. 22 B).

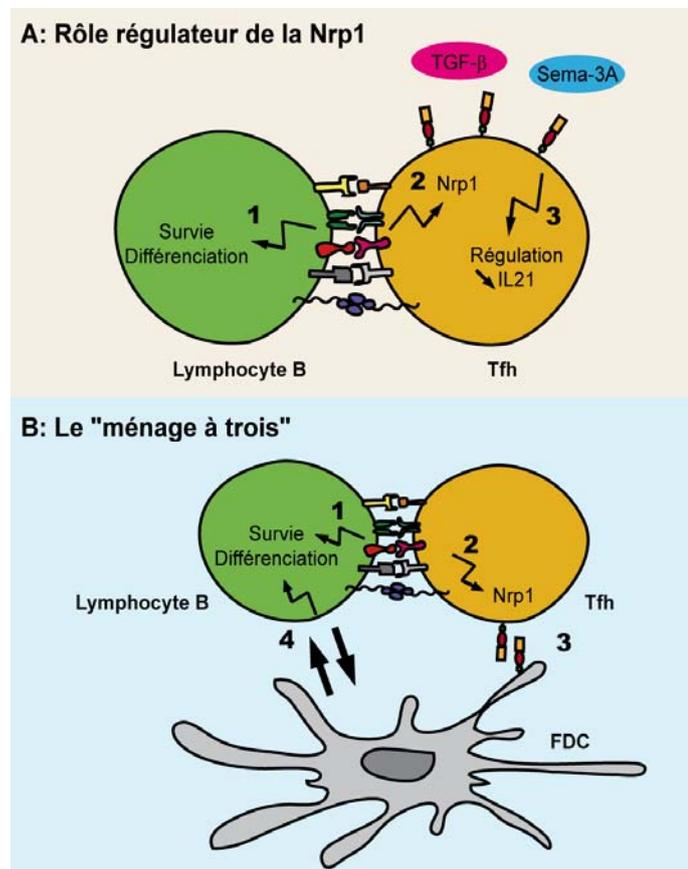


Figure. 22. Hypothèses de l'implication de la Nrp1 au niveau des Tfh. (A) L'expression de la Nrp1 à la surface des Tfh, induite par l'interaction avec les lymphocytes B, permettrait une régulation négative de la réponse Tfh (diminution de l'IL-21) en sensibilisant ces cellules au TGF- β ou à la Sema-3A. (B) L'expression de la Nrp1 permettrait une interaction avec les FDC et ainsi augmenter la survie et la différenciation des lymphocytes B. Ce « ménage à trois » pourrait permettre de stabiliser l'interaction entre Tfh et lymphocyte B.

L'expression de la Nrp1 est transitoire et dépendante du contact avec les lymphocytes B. Ainsi, le maintien de l'expression de la Nrp1 sur les Tfh Nrp1⁺ est strictement lié à leur contact avec les lymphocytes B, alors qu'une simple stimulation du TCR ne le permet pas. De plus, les lymphocytes T non-Tfh ne sont pas capables d'acquérir l'expression de la Nrp1 au contact des lymphocytes B, ce qui suggère l'existence d'un signal spécifique entre Tfh et lymphocytes B pour induire

l'expression de la Nrp1 à la surface des Tfh. Par ailleurs, au cours de cette réponse, plusieurs molécules de costimulation interviennent dans la survie et la différenciation des lymphocytes B, notamment ICOS, PD-1 et SLAM, exprimés par les Tfh et interagissant avec leurs ligands respectifs ICOSL, PD-1L et SLAM à la surface des lymphocytes B. L'expression de la Nrp1 sur les Tfh pourrait de ce fait être la résultante de signalisations induites par une ou plusieurs de ces molécules de costimulation, et il serait intéressant de les étudier de plus près afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ce phénomène. Actuellement, l'hypothèse la plus soutenue serait celle impliquant ICOS, car il a été décrit, dans un modèle de souris *sanroque* invalidé pour le gène *roquin*, une hyperactivité des Tfh, l'émergence de maladies auto-immunes et une augmentation significative d'ICOS et de Nrp1 (Vinuesa et al., 2005; Yu et al., 2007). L'expression d'ICOS est normalement régulée négativement et spécifiquement par la famille des protéines Roquin et par le microRNA mir-101 se fixant sur les mRNA d'ICOS (Athanasopoulos et al., 2010; Yu et al., 2007). Or, il n'est pas décrit d'implication directe des protéines Roquin ou du microRNA mir-101 sur l'expression de la Nrp1. Il n'est cependant pas impossible que l'induction de l'expression de la Nrp1 puisse résulter de la surexpression d'ICOS. Bien qu'ICOS semble jouer un rôle non négligeable dans ce mécanisme, il serait aussi intéressant d'effectuer des études approfondies sur d'autres molécules de costimulation tels que PD-1 ou de SLAM, elles mêmes connues pour réguler l'activité des lymphocytes T, et de ce fait, possiblement impliquées dans l'induction de l'expression de la Nrp1 (Fife and Bluestone, 2008; Schwartzberg et al., 2009).

La Nrp1 est un marqueur de fin de la phase effectrice des lymphocytes T

En plus d'être exprimée par les Tfh, la Nrp1 est exprimée par les lymphocytes T activés, qui auront acquis l'expression du CD25, au niveau des sites d'inflammations périphériques. Il est intéressant d'observer que, *in vitro*, l'expression de la Nrp1 est très fortement retrouvée à la surface des TEM activés, et peu à la surface des lymphocytes T naïfs et TCM. Ceci peut s'expliquer par la capacité d'activation de chacune de ces populations, qui est beaucoup plus importante chez les TEM que chez les lymphocytes T naïfs ou TCM (Sallusto et al., 2004). De plus, les TEM sont localisés en périphérie et interviennent aux niveaux des sites d'inflammations périphériques, tandis que les lymphocytes T naïfs et les TCM sont retenus au niveau des organes lymphoïdes secondaires grâce à leur expression de CCR7. Nous pouvons donc suspecter que les lymphocytes T CD4 Nrp1⁺ retrouvés au niveau des sites d'inflammation sont des TEM activés ce qui suggère que la Nrp1 est induite à la surface des lymphocytes T, suite à une forte activation, lors de la phase effectrice. Ainsi, l'absence d'augmentation du FSC et de l'expression de la Nrp1 à la surface des lymphocytes T CD25⁺ dans les organes lymphoïdes secondaires, proviendrait du fait que ces organes sont des lieux de faible activation des lymphocytes T, car essentiellement consacrés à la différenciation de ces derniers. En effet, au contact de l'antigène, les lymphocytes T naïfs vont se différencier soit en TCM et Tfh qui resteront dans les organes lymphoïdes secondaires, soit en T effecteurs et TEM qui migreront en périphérie pour servir de sentinelles. Lors de leur deuxième rencontre avec l'antigène en périphérie, il se produira une forte activation des TEM, aboutissant à une augmentation sur ces cellules du CD25, du FSC et de la Nrp1. En revanche, au niveau des organes lymphoïdes secondaires, cette deuxième rencontre avec l'antigène provoquera une plus faible activation des TCM qui se différencieront en lymphocytes T effecteurs ou en TEM avant de migrer vers la périphérie (Sallusto et al., 2004). Ceci expliquerait donc pourquoi les lymphocytes T activés des organes lymphoïdes secondaires n'expriment pas la Nrp1. Par ailleurs, l'observation d'une forte expression de la Nrp1 *in vitro* est très certainement corrélée à la force du signal d'activation induit via la stimulation du TCR, qui est beaucoup plus forte *in vitro* qu'*in vivo*. Finalement, nous pouvons affirmer que la Nrp1 est un marqueur d'activation des lymphocytes T au niveau des sites d'inflammations périphériques.

L'expression de la Nrp1 sur les Tfh semble suivre le même schéma. En effet, la première rencontre avec l'antigène entraîne la différenciation des lymphocytes T naïfs en Tfh qui vont exprimer le CXCR5 pour se localiser au niveau des centres germinatifs. Puis, à ce niveau, la deuxième rencontre avec l'antigène, présenté par le CMH des lymphocytes B (Fazilleau et al., 2009a; Yu and Vinuesa, 2010), induit alors l'expression de la Nrp1, confortant ainsi notre hypothèse proposant la Nrp1 comme un marqueur de la phase effectrice des lymphocytes T (Figure. 23).

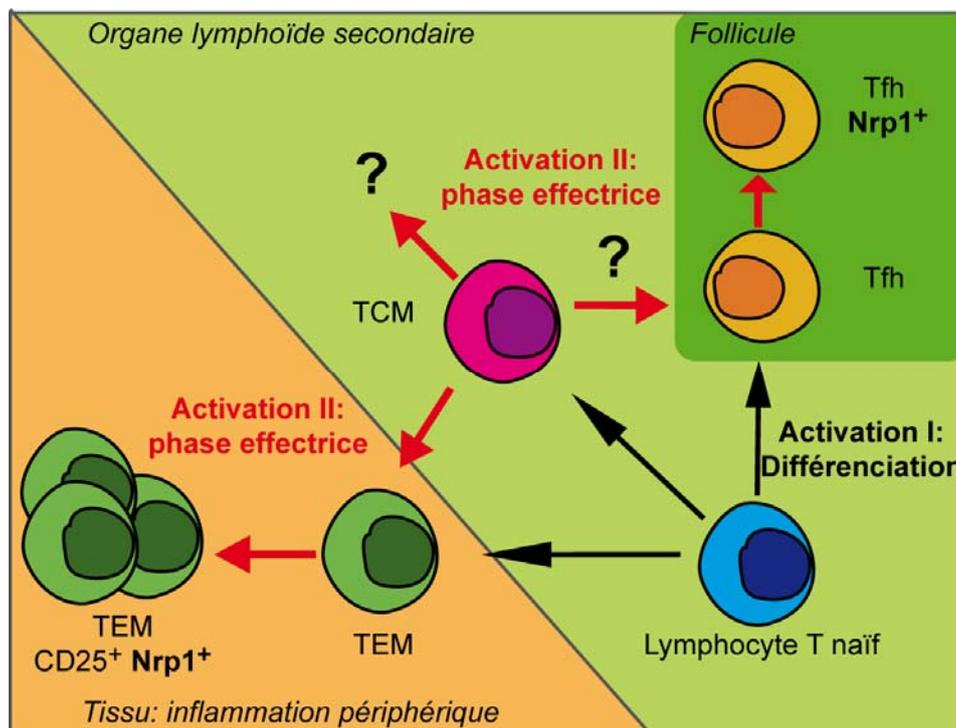


Figure. 23. Schéma de l'expression de la Nrp1 sur les lymphocytes T chez l'homme. L'expression de la Nrp1 est essentiellement retrouvée lors de la phase effectrice.

Cependant il existe des différences entre l'expression de la Nrp1 à la surface des Tfh et à la surface des lymphocytes T effecteurs. En effet, alors que les Tfh, au contact des lymphocytes B, ne prolifèrent pas et n'expriment pas le CD25, les lymphocytes T effecteurs, au contraire, prolifèrent et expriment le CD25 au contact des cellules dendritiques (DC). Pour les lymphocytes T effecteurs la stimulation du TCR via l'anti-CD3 et la signalisation de la molécule de costimulation CD28 sont suffisantes pour induire l'expression de la Nrp1. En revanche, pour les Tfh, la molécule de costimulation impliquée dans l'expression de la Nrp1 à leur surface n'est

à ce jour pas encore clairement établie, bien que certaines études aient commencé à suggérer un possible rôle d'ICOS, comme discuté plutôt. CD28 et ICOS sont des molécules de costimulation des lymphocytes T, cependant, contrairement au CD28, la signalisation d'ICOS ne permet pas d'induire la production de l'IL-2, indispensable à la prolifération des lymphocytes T activés via leur expression de CD25 (van Berkel and Oosterwegel, 2006). Ceci pourrait donc expliquer l'association de l'expression du CD25 et de la Nrp1 à la surface des lymphocytes T effecteurs activés en présence de la signalisation du CD28.

Nous montrons que les lymphocytes T effecteurs Nrp1⁺ sont sensibles à l'apoptose et n'ont pas la capacité de proliférer en réponse à une stimulation du TCR, et qu'ils ne produisent pas ou peu d'IL-21. Ces observations suggèrent que ces cellules auraient reçu des signaux négatifs les empêchant de répondre normalement. Nous émettons ainsi l'hypothèse que la Nrp1 participerait activement à la régulation de l'activité des lymphocytes T. De plus, il est déjà montré que l'absence de la Nrp1 ou l'absence de rétro contrôle via la Sema-3A favorisent une hyperactivation des lymphocytes T (Catalano, 2010; Lepelletier et al., 2006; Solomon et al., 2011; Yamamoto et al., 2008). Ainsi, une forte activation des lymphocytes T (effecteurs ou Tfh) induirait l'expression de la Nrp1 sur les cellules les plus activées afin de les rendre sensibles à la Sema-3A ou au TGF- β , et ainsi bloquer leur expansion. Il serait donc intéressant de connaître les effets d'une surexpression de la Nrp1 à la surface des lymphocytes T afin d'évaluer son rôle dans le contrôle de l'activation de ces cellules.

L'acide rétinoïque (ATRA) : inducteur de la Nrp1 et potentiel immunorégulateur

Il a été intéressant d'observer que l'ATRA possède un fort potentiel d'induction d'expression de la Nrp1 à la surface des lymphocytes T, sans pour autant induire l'expression de Foxp3. Ce constat suscite des interrogations et ouvre des perspectives sur le potentiel immunorégulateur de l'ATRA, et l'implication de la Nrp1 dans ce mécanisme.

L'ATRA ou *all-trans* retinoic acid, est le produit final du métabolisme de la vitamine A décrite comme importante pour le bon fonctionnement de l'immunité. Le défaut en vitamine A provoque un mauvais contrôle des infections avec une augmentation de l'inflammation aussi bien chez la souris que chez l'homme (Semba, 1994; Wiedermann et al., 1996). La vitamine A est présente dans le sang et dans le foie sous forme de rétinol ou de rétinyl ester respectivement. Ses précurseurs sont catalysés par les enzymes rétinol déshydrogénases de type alcool déshydrogénase (ADH) pour donner le rétinol. Ce dernier est ensuite transformé en acide rétinoïque (dont l'ATRA) par les aldéhydes déshydrogénases (ALDH) et ce de manière irréversible. L'ATRA se lie alors aux CRABP (cellular retinoic acid binding protein) pour être directement présenté aux récepteurs nucléaires des acides rétinoïques (RARs). Ce complexe joue le rôle de facteur de transcription en se fixant spécifiquement à une séquence ADN du génome. Il existe trois membres de RAR : le RAR α , le RAR β et le RAR γ (Pino-Lagos et al., 2008).

En immunologie, au niveau cellulaire, l'ATRA agit à différents niveaux notamment sur la maturation des cellules dendritiques (DC), le homing des lymphocytes T, l'induction de Treg Foxp3⁺ et le contrôle des lymphocytes T.

L'ATRA a la capacité d'induire la maturation des DC en présence de cytokines pro-inflammatoires. En l'absence de ces cytokines, l'ATRA exerce plutôt des effets pro-apoptotiques (Geissmann et al., 2003). L'ATRA est aussi décrit pour favoriser le homing des lymphocytes T vers l'intestin. En effet, la différenciation des DC induite en sa présence, favorise l'émergence de DC « des muqueuses », produisant du TGF- β et de l'IL-6, qui permettent l'acquisition des récepteurs de homing pour l'intestin, CCR9 et l'intégrine α 4 β 7, à la surface des lymphocytes T (Saurer et al., 2007). L'ATRA peut être produit par les DC de l'intestin et agir directement sur les lymphocytes T pour induire les expressions de CCR9 et d'intégrine α 4 β 7 (Iwata et

al., 2004). De même, *in vitro*, l'ATRA induit l'expression de CCR9 à la surface des lymphocytes T et, bien que l'expression de la Nrp1, au niveau des amygdales et des sites d'inflammations périphériques exclut l'hypothèse d'une expression exclusive de la Nrp1 par les lymphocytes T ayant un homing pour l'intestin, nous nous interrogeons sur les possibles effets que l'ATRA pourrait exercer sur l'expression de la Nrp1 à la surface de ces lymphocytes T. A ce niveau, une observation semble intéressante, car L'ATRA provoque la production de TGF- β par les DC, mais également par les FDC des plaques de Payer favorisant ainsi la production d'IgA par les lymphocytes B (Saurer et al., 2007; Suzuki et al., 2010). Rappelons que la Nrp1 a été décrite comme capable de fixer le TGF- β afin de le présenter à d'autres types cellulaires (Glinka and Prud'homme, 2008). Ainsi, le TGF- β pourrait être présenté aux lymphocytes B par les Tfh via la Nrp1 pour favoriser et augmenter la production d'IgA.

Il est aussi décrit que l'ATRA favorise la différenciation des iTreg Foxp3⁺. En effet, *in vitro*, les lymphocytes T naïfs peuvent être différenciés en iTreg Foxp3⁺ en présence d'ATRA et de TGF- β (Schambach et al., 2007). Cependant, cet effet serait dû à la capacité de l'ATRA à sensibiliser les lymphocytes T au TGF- β et à inhiber la production d'autres cytokines telles que l'IFN- γ et l'IL-17 (Mucida et al., 2007; Nolting et al., 2009). De plus, *in vivo*, dans un model d'EAE (encéphalite auto-immune expérimentale) l'ATRA ne semble pas favoriser l'émergence des Treg mais inhibe la production d'IL-17 (Xiao et al., 2008). Par ailleurs, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression de Foxp3 par les lymphocytes T activés *in vitro* en présence d'ATRA seul.

D'autres études montrent également une implication directe de l'ATRA sur le contrôle des lymphocytes T. Des travaux effectués sur des souris traitées avec de l'ATRA ont permis de mettre en évidence des effets bénéfiques de ce dernier dans le contrôle de diverses maladies auto-immunes telles que l'uvéorétinites auto-immunes expérimentales (Keino et al., 2010), le lupus érythémateux (Kinoshita et al., 2003; Perez de Lema et al., 2004) ou encore l'arthrite rhumatoïde (Nozaki et al., 2006), et ce, grâce à une diminution de production d'IFN- γ et/ou d'IL-17. Ces études montrent ainsi que l'ATRA peut avoir une action directe sur les lymphocytes T et inhiber leurs actions pro-inflammatoires.

Dans des modèles murins, l'inhibition de la Nrp1 à la surface des lymphocytes T provoque une augmentation de l'auto-immunité (Solomon et al., 2011; Yamamoto et al., 2008). Ainsi, l'induction de la Nrp1 pourrait être une solution pour freiner cette hyperactivité observée dans l'auto-immunité. L'ATRA semblerait être un bon candidat car il permet non seulement d'induire des expressions importantes de Nrp1 au cours de l'activation des lymphocytes T, mais participe en plus activement au contrôle du développement des maladies auto-immunes. Il serait donc intéressant d'évaluer la place centrale de la Nrp1 dans le mécanisme régulateur de l'ATRA. Nous pouvons ainsi imaginer que l'ATRA induirait l'expression de la Nrp1 au cours de l'activation des lymphocytes T, sensibilisant alors ces cellules aux facteurs immunorégulateurs tels que le TGF- β et la Sema-3A, et inhibant par ailleurs leurs productions en cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et l'IL-17.

Au niveau des Tfh, il est aussi possible que l'ATRA agisse de la même manière. En effet, l'ATRA a la capacité de diminuer l'auto-immunité chez les souris présentant un lupus érythémateux ou une arthrite rhumatoïde, qui sont des pathologies associées à la présence d'auto-anticorps et à une forte activité des Tfh (Simpson et al., 2010). Dans ces deux cas l'ATRA diminue la présence d'auto-anticorps et nous pouvons imaginer une action directe de celui-ci sur les Tfh. Ainsi, tout comme sur les lymphocytes T activés, il serait intéressant d'évaluer l'influence directe de l'ATRA sur les Tfh et notamment sur l'expression de la Nrp1, de même que ses effets sur la survie et la différenciation des lymphocytes B.

II) L'implication du CD25 dans le maintien de l'homéostasie des lymphocytes T chez l'homme

Cette étude fut limitée par la rareté des mutations homozygotes chez l'homme, et par conséquent, des prélèvements obtenus. Cependant, nous avons étendu au maximum notre étude afin de comprendre le niveau d'implication du CD25 dans le maintien de l'homéostasie des lymphocytes T chez l'homme.

Tout d'abord, nous constatons que l'absence en CD25 n'empêche pas l'expression de Foxp3. Cependant, nous remarquons un réel déséquilibre des populations Treg lorsque nous utilisons la délimitation des populations Foxp3⁺ proposée par Miyara *et al* (Miyara et al., 2009). En effet, les trois patients présentent un nombre de Treg naïfs (Foxp3⁺ CD45RA⁺) très significativement diminué, mais un taux de Treg effecteurs, exprimant fortement le Foxp3 (Foxp3^{high}), plus ou moins normal. Il peut donc paraître surprenant de retrouver un taux normal de lymphocytes T exprimant le Foxp3 chez ces patients, mais ceci pourrait s'expliquer par la contamination d'une population non-Treg Foxp3⁺, correspondant à la population productrice de cytokines pro-inflammatoires non régulatrice décrite par Miyara *et al*. De plus, l'augmentation d'IFN- γ dans la population Foxp3⁺ chez le patient 4 (P4) rejoint et conforte cette hypothèse. Cette observation révèle une augmentation de la proportion de lymphocytes T effecteurs Foxp3⁺ chez ces patients, témoignant d'une activité du système immunitaire, probablement auto-immune, et démontre l'impossibilité d'utiliser seulement Foxp3 pour caractériser les Treg. Concernant les Treg, nous pouvons d'ores et déjà affirmer que le CD25 est indispensable au maintien de cette population chez l'homme, et plus particulièrement de la population de Treg naïfs. De plus, le fait d'observer chez ces patients des Treg effecteurs, décrits comme provenant de la différenciation des Treg naïfs après activation, suggère que l'absence de CD25 n'empêche pas la différenciation ni l'activation des Treg.

Quelle peut-être l'origine de ce déséquilibre ? Chez ces patients, il existe probablement un défaut de renouvellement de la population Treg et nous pouvons émettre deux hypothèses sur l'origine de ce phénomène. Venken *et al* montrent dans leur étude que la diminution des Treg naïfs chez les patients atteints de sclérose en

plaques est la conséquence d'un défaut de production thymique (Venken et al., 2008) et nous pouvons supposer le même phénomène en l'absence de CD25. Cependant, il aurait fallu mesurer l'expression du CD31 sur les lymphocytes T naïfs afin de caractériser les lymphocytes T récemment émigrés du thymus pour valider cette hypothèse (Kilpatrick et al., 2008; Kohler and Thiel, 2009). Par ailleurs, la diminution des Treg naïfs peut aussi être la conséquence d'un défaut de survie de ces cellules en absence du CD25, ce qui expliquerait alors l'absence de renouvellement de cette population. En effet, il est possible que dans un contexte auto-immun l'hyperactivation des Treg, pour contrôler les clones auto-réactifs, provoque la différenciation des Treg naïfs en Treg effecteurs, et que l'absence du CD25 entraîne une mort précoce de ces cellules, aboutissant alors à l'épuisement des Treg totaux, caractérisé par un faible taux de Treg naïfs mais sans augmentation des Treg effecteurs. Il serait donc intéressant d'étudier *in vitro* la capacité de survie des Treg naïfs et effecteurs humains en présence d'IL-2, et d'évaluer son rôle au cours de l'activation des Treg naïfs, afin de mieux comprendre à quels niveaux le CD25 et l'IL-2 sont impliqués dans l'homéostasie des Treg.

L'apparition de symptômes auto-immuns sévères, de type IPEX chez les patients atteints de mutations sur le gène *IL2RA*, suggère un rôle central des Treg dans le développement de cette pathologie. En effet, les patients classiquement atteints du syndrome IPEX présentent des mutations sur le gène *FOXP3*, généralement associées à un défaut qualitatif et/ou quantitatif en Treg totaux (Bacchetta et al., 2006; Fuchizawa et al., 2007). Cependant, les patients analysés dans notre étude présentent exclusivement un défaut en Treg naïfs et nous pouvons suspecter que cette population naïve jouerait un rôle central dans le contrôle de l'auto-immunité.

L'auto-immunité étant provoquée par l'apparition de clones lymphocytaires T auto-réactifs, il était donc intéressant d'étudier les variations de l'homéostasie des lymphocytes T en absence du CD25. Il est observé chez ces patients une diminution en lymphocytes T naïfs, particulièrement prononcée pour les lymphocytes T CD4, et une augmentation des T effecteurs, associée à une accumulation des cellules productrices d'IFN- γ chez le patient 4. De plus, les lymphocytes T CD4 de ces patients présentent une accumulation de cellules en prolifération exprimant le Ki67. Il

est aussi observé une diminution du compartiment CD4 au sein des lymphocytes T CD3⁺.

La cause de la diminution en lymphocytes T naïfs peut être de diverses origines. Elle peut être la conséquence d'une absence de Treg, qui ne contrôlèrent plus une hyperactivation des lymphocytes T naïfs, comme observée et suggérée chez les patients présentant des mutations du gène *FOXP3* (Costa-Carvalho et al., 2008) ou chez un patient présentant une entéropathie auto-immune (Zuber et al., 2007). Inversement, il est aussi possible que la diminution en lymphocytes T naïfs, la lymphoprolifération et l'accumulation en lymphocytes T effecteurs soient indépendantes des Treg. En effet, divers événements peuvent provoquer la diminution en lymphocytes T naïfs, tel qu'un épisode lymphopénique (LIP = lymphopenia induced proliferation) ou un environnement particulier en cytokines (CIP = Cytokine induced proliferation) (Datta and Sarvetnick, 2009). La LIP peut être la conséquence d'un défaut de production thymique qui aboutit à la prolifération des lymphocytes T naïfs sur des auto-antigènes et à l'accumulation de lymphocytes T effecteurs, comme observé chez les patients atteints d'immunodéficience (Giovannetti et al., 2007). Bien que l'hypothèse d'un défaut de production thymique ne soit pas exclue chez les patients mutés sur le gène de l'*IL2RA*, il est fortement possible que la lymphoprolifération et l'accumulation des lymphocytes T effecteurs mémoires observées, soient la conséquence d'une sensibilité particulière des lymphocytes T à l'IL-15 à défaut de l'IL-2, et correspondraient alors à une CIP. En effet, en l'absence du CD25, il est probable que l'IL-15 utilise le récepteur IL2R γ pour induire l'activation des lymphocytes T. Ceci serait en accord avec les observations *in vitro* qui montrent une prolifération normale des lymphocytes T du patient 4 en présence d'IL-15, et expliquerait l'accumulation de lymphocytes T effecteurs en absence du CD25. Dans ces deux cas, la lymphoprolifération des lymphocytes T peut être à l'origine de l'auto-immunité et de la diminution en Treg.

Finalement, deux scénarios sont possibles pour comprendre l'influence du CD25 sur l'homéostasie des lymphocytes T. Premièrement, le défaut en Treg naïf serait à l'origine de l'expansion des clones auto-immuns et de la lymphoprolifération. Ou, deuxièmement, la lymphoprolifération des lymphocytes T, responsable de l'auto-immunité, provoquerait l'épuisement des Treg dû à un défaut de survie, et

amplifierait l'accumulation des symptômes auto-immuns. Ces deux événements sont difficilement dissociables l'un de l'autre.

Cependant, chez les patients IPEX, ayant des mutations sur le gène *FOXP3*, le développement des maladies auto-immunes leur est rapidement fatal et les Treg occupent une place centrale lors ce phénomène. Par ailleurs, les patients CD25-déficients développent également des maladies auto-immunes, suggérant une implication des Treg, mais décèdent généralement à la suite de maladies infectieuses. Chez les patients déficients pour le CD25 l'augmentation de la population CD8 TEMRA, contenant la majorité des clones anti-CMV, suggère une activité du système immunitaire pour contrôler le virus mais ne permet pas son élimination. Ceci montre que le CD25 et l'IL-2 jouent des rôles non négligeables dans l'acquisition par les lymphocytes T d'une mémoire et d'une capacité à éliminer les pathogènes, tels que le CMV. Comme chez la souris, le CD25 semble aussi influencer le système immunitaire humain à différents niveaux aussi bien sur le compartiment Treg que sur les lymphocytes T effecteurs (D'Cruz and Klein, 2005; Pipkin et al., 2010).

REFERENCES

- Akondy, R.S., N.D. Monson, J.D. Miller, S. Edupuganti, D. Teuwen, H. Wu, F. Quyyumi, S. Garg, J.D. Altman, C. Del Rio, H.L. Keyserling, A. Ploss, C.M. Rice, W.A. Orenstein, M.J. Mulligan, and R. Ahmed. 2009. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8⁺ T cell response. *J Immunol.* 183:7919-30.
- Alcina, A., M. Fedetz, D. Ndagire, O. Fernandez, L. Leyva, M. Guerrero, M.M. Abad-Grau, C. Arnal, C. Delgado, M. Lucas, G. Izquierdo, and F. Matesanz. 2009. IL2RA/CD25 gene polymorphisms: uneven association with multiple sclerosis (MS) and type 1 diabetes (T1D). *PLoS One.* 4:e4137.
- Allen, C.D., T. Okada, and J.G. Cyster. 2007a. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity.* 27:190-202.
- Allen, C.D., T. Okada, H.L. Tang, and J.G. Cyster. 2007b. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science.* 315:528-31.
- Andersson, J., D.Q. Tran, M. Pesu, T.S. Davidson, H. Ramsey, J.J. O'Shea, and E.M. Shevach. 2008. CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *J Exp Med.* 205:1975-81.
- 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.* 39:589-98.
- Antony, P.A., C.M. Paulos, M. Ahmadzadeh, A. Akpınarli, D.C. Palmer, N. Sato, A. Kaiser, C.S. Hinrichs, C.A. Klebanoff, Y. Tagaya, and N.P. Restifo. 2006. Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo. *J Immunol.* 176:5255-66.
- Athanasopoulos, V., A. Barker, D. Yu, A.H. Tan, M. Srivastava, N. Contreras, J. Wang, K.P. Lam, S.H. Brown, C.C. Goodnow, N.E. Dixon, P.J. Leedman, R. Saint,

and C.G. Vinuesa. 2010. The ROQUIN family of proteins localizes to stress granules via the ROQ domain and binds target mRNAs. *FEBS J.* 277:2109-27.

Bacchetta, R., L. Passerini, E. Gambineri, M. Dai, S.E. Allan, L. Perroni, F. Dagna-Bicarelli, C. Sartirana, S. Matthes-Martin, A. Lawitschka, C. Azzari, S.F. Ziegler, M.K. Levings, and M.G. Roncarolo. 2006. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest.* 116:1713-22.

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.* 61:5736-40.

Bachmann, M.F., P. Wolint, S. Walton, K. Schwarz, and A. Oxenius. 2007. Differential role of IL-2R signaling for CD8+ T cell responses in acute and chronic viral infections. *Eur J Immunol.* 37:1502-12.

Baecher-Allan, C., E. Wolf, and D.A. Hafler. 2006. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol.* 176:4622-31.

Barr, M.P., A.M. Byrne, A.M. Duffy, C.M. Condrón, M. Devocelle, P. Harriott, D.J. Bouchier-Hayes, and J.H. Harmey. 2005. A peptide corresponding to the neuropilin-1-binding site on VEGF(165) induces apoptosis of neuropilin-1-expressing breast tumour cells. *Br J Cancer.* 92:328-33.

Barron, L., H. Doms, K.K. Hoyer, W. Kuswanto, J. Hofmann, W.E. O'Gorman, and A.K. Abbas. 2010. Cutting edge: mechanisms of IL-2-dependent maintenance of functional regulatory T cells. *J Immunol.* 185:6426-30.

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.* 58:1363-73.

Battaglia, A., A. Buzzonetti, E. Martinelli, M. Fanelli, M. Petrillo, G. Ferrandina, G. Scambia, and A. Fattorossi. 2010. Selective changes in the immune profile of tumor-draining lymph nodes after different neoadjuvant chemoradiation regimens for locally advanced cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 76:1546-53.

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.* 123:129-38.

Bennett, C.L., J. Christie, F. Ramsdell, M.E. Brunkow, P.J. Ferguson, L. Whitesell, T.E. Kelly, F.T. Saulsbury, P.F. Chance, and H.D. Ochs. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 27:20-1.

Bettelli, E., M. Dastrange, and M. Oukka. 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:5138-43.

Boles, K.S., W. Vermi, F. Facchetti, A. Fuchs, T.J. Wilson, T.G. Diacovo, M. Cella, and M. Colonna. 2009. A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC. *Eur J Immunol.* 39:695-703.

Bossaller, L., J. Burger, R. Draeger, B. Grimbacher, R. Knoth, A. Plebani, A. Durandy, U. Baumann, M. Schlesier, A.A. Welcher, H.H. Peter, and K. Warnatz. 2006. ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. *J Immunol.* 177:4927-32.

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.* 177:1460-9.

Boyman, O., M. Kovar, M.P. Rubinstein, C.D. Surh, and J. Sprent. 2006. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science*. 311:1924-7.

Brand, O.J., C.E. Lowe, J.M. Heward, J.A. Franklyn, J.D. Cooper, J.A. Todd, and S.C. Gough. 2007. Association of the interleukin-2 receptor alpha (IL-2Ralpha)/CD25 gene region with Graves' disease using a multilocus test and tag SNPs. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 66:508-12.

Breitfeld, D., L. Ohl, E. Kremmer, J. Ellwart, F. Sallusto, M. Lipp, and R. Forster. 2000. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med*. 192:1545-52.

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*. 34:623-30.

Calzascia, T., M. Pellegrini, A. Lin, K.M. Garza, A.R. Elford, A. Shahinian, P.S. Ohashi, and T.W. Mak. 2008. CD4 T cells, lymphopenia, and IL-7 in a multistep pathway to autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:2999-3004.

Cantisan, S., R. Solana, R. Lara, A. Rodriguez-Benot, J.M. Vaquero, J. Gutierrez-Aroca, I. Gayoso, M. Montejo, A. Rivero, and J. Torre-Cisneros. 2010. CD45RA expression on HCMV-specific effector memory CD8+ T cells is associated with the duration and intensity of HCMV replication after transplantation. *Clin Immunol*.

Cao, X., S.F. Cai, T.A. Fehniger, J. Song, L.I. Collins, D.R. Piwnica-Worms, and T.J. Ley. 2007. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*. 27:635-46.

Cappione, A., 3rd, J.H. Anolik, A. Pugh-Bernard, J. Barnard, P. Dutcher, G. Silverman, and I. Sanz. 2005. Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 115:3205-16.

Catalano, A. 2010. The neuroimmune semaphorin-3A reduces inflammation and progression of experimental autoimmune arthritis. *J Immunol.* 185:6373-83.

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.* 107:3321-9.

Caudy, A.A., S.T. Reddy, T. Chatila, J.P. Atkinson, and J.W. Verbsky. 2007. CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 119:482-7.

Chen, Z., A. Laurence, and J.J. O'Shea. 2007. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol.* 19:400-8.

Chtanova, T., S.G. Tangye, R. Newton, N. Frank, M.R. Hodge, M.S. Rolph, and C.R. Mackay. 2004. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol.* 173:68-78.

Colombo, M.P., and S. Piconese. 2007. Regulatory-T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 7:880-7.

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.* 31:1082-94.

Costa-Carvalho, B.T., M.I. de Moraes-Pinto, L.C. de Almeida, M.T. de Seixas Alves, R.P. Maia, R.L. de Souza, M. Barreto, L. Lourenco, A.M. Vicente, A. Coutinho, and M. Carneiro-Sampaio. 2008. A remarkable depletion of both naive CD4+ and CD8+ with high proportion of memory T cells in an IPEX infant with a FOXP3 mutation in the forkhead domain. *Scand J Immunol.* 68:85-91.

Czesnikiewicz-Guzik, M., W.W. Lee, D. Cui, Y. Hiruma, D.L. Lamar, Z.Z. Yang, J.G. Ouslander, C.M. Weyand, and J.J. Goronzy. 2008. T cell subset-specific susceptibility to aging. *Clin Immunol.* 127:107-18.

D'Cruz, L.M., and L. Klein. 2005. Development and function of agonist-induced CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol.* 6:1152-9.

Datta, S., and N. Sarvetnick. 2009. Lymphocyte proliferation in immune-mediated diseases. *Trends Immunol.* 30:430-8.

de Leval, L., D.S. Rickman, C. Thielen, A. Reynies, Y.L. Huang, G. Delsol, L. Lamant, K. Leroy, J. Briere, T. Molina, F. Berger, C. Gisselbrecht, L. Xerri, and P. Gaulard. 2007. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood.* 109:4952-63.

Dieckmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger, and G. Schuler. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med.* 193:1303-10.

Dooms, H., K. Wolslegel, P. Lin, and A.K. Abbas. 2007. Interleukin-2 enhances CD4⁺ T cell memory by promoting the generation of IL-7R alpha-expressing cells. *J Exp Med.* 204:547-57.

Dullaers, M., D. Li, Y. Xue, L. Ni, I. Gayet, R. Morita, H. Ueno, K.A. Palucka, J. Banchereau, and S. Oh. 2009. A T cell-dependent mechanism for the induction of human mucosal homing immunoglobulin A-secreting plasmablasts. *Immunity.* 30:120-9.

Duszczyszyn, D.A., J.L. Williams, H. Mason, Y. Lapierre, J. Antel, and D.G. Haegert. 2010. Thymic involution and proliferative T-cell responses in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 221:73-80.

Dzionic, A., A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D.W. Buck, and J. Schmitz. 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 165:6037-46.

Dzionic, 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.* 63:1133-48.

Ellis, L.M. 2006. The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther.* 5:1099-107.

Fazilleau, N., L. Mark, L.J. McHeyzer-Williams, and M.G. McHeyzer-Williams. 2009a. Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity.* 30:324-35.

Fazilleau, N., L.J. McHeyzer-Williams, H. Rosen, and M.G. McHeyzer-Williams. 2009b. The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat Immunol.* 10:375-84.

Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 9:669-76.

Fife, B.T., and J.A. Bluestone. 2008. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev.* 224:166-82.

Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 4:330-6.

Fontenot, J.D., J.P. Rasmussen, M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol.* 6:1142-51.

Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf, and M. Lipp. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell.* 99:23-33.

Fritzsching, B., N. Oberle, E. Pauly, R. Geffers, J. Buer, J. Poschl, P. Krammer, O. Linderkamp, and E. Suri-Payer. 2006. Naive regulatory T cells: a novel subpopulation defined by resistance toward CD95L-mediated cell death. *Blood*. 108:3371-8.

Fuchizawa, T., Y. Adachi, Y. Ito, H. Higashiyama, H. Kanegane, T. Futatani, I. Kobayashi, Y. Kamachi, T. Sakamoto, I. Tsuge, H. Tanaka, A.H. Banham, H.D. Ochs, and T. Miyawaki. 2007. Developmental changes of FOXP3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells and their impairment in patients with FOXP3 gene mutations. *Clin Immunol*. 125:237-46.

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*. 67:1451-60.

Gambineri, E., L. Perroni, L. Passerini, L. Bianchi, C. Doglioni, F. Meschi, R. Bonfanti, Y. Sznajer, A. Tommasini, A. Lawitschka, A. Junker, D. Dunstheimer, P.H. Heidemann, G. Cazzola, M. Cipolli, W. Friedrich, D. Janic, N. Azzi, E. Richmond, S. Vignola, A. Barabino, G. Chiumello, C. Azzari, M.G. Roncarolo, and R. Bacchetta. 2008. Clinical and molecular profile of a new series of patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome: inconsistent correlation between forkhead box protein 3 expression and disease severity. *J Allergy Clin Immunol*. 122:1105-1112 e1.

Garin, M.I., C.C. Chu, D. Golshayan, E. Cernuda-Morollon, R. Wait, and R.I. Lechler. 2007. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood*. 109:2058-65.

Geginat, J., A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2003. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*. 101:4260-6.

Geissmann, F., P. Revy, N. Brousse, Y. Lepelletier, C. Folli, A. Durandy, P. Chambon, and M. Dy. 2003. Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells. *J Exp Med.* 198:623-34.

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.* 80:6844-54.

Giovannetti, A., M. Pierdominici, F. Mazzetta, M. Marziali, C. Renzi, A.M. Mileo, M. De Felice, B. Mora, A. Esposito, R. Carello, A. Pizzuti, M.G. Paggi, R. Paganelli, W. Malorni, and F. Aiuti. 2007. Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *J Immunol.* 178:3932-43.

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.* 84:302-10.

Grammer, A.C., R. Slota, R. Fischer, H. Gur, H. Girschick, C. Yarboro, G.G. Illei, and P.E. Lipsky. 2003. Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions. *J Clin Invest.* 112:1506-20.

Grossman, W.J., J.W. Verbsky, B.L. Tollefsen, C. Kemper, J.P. Atkinson, and T.J. Ley. 2004. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood.* 104:2840-8.

Gu, C., E.R. Rodriguez, D.V. Reimert, T. Shu, B. Fritsch, 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.

Hansel, D.E., R.E. Wilentz, C.J. Yeo, R.D. Schulick, E. Montgomery, and A. Maitra. 2004. Expression of neuropilin-1 in high-grade dysplasia, invasive cancer, and metastases of the human gastrointestinal tract. *Am J Surg Pathol.* 28:347-56.

Hasan, N.M., M.A. Kendrick, N.R. Druckenbrod, M.K. Huelsmeyer, T.F. Warner, and M.J. MacDonald. 2010. Genetic association of the neuropilin-1 gene with type 1 diabetes in children: Neuropilin-1 expression in pancreatic islets. *Diabetes Res Clin Pract.* 87:e29-32.

Haynes, N.M., C.D. Allen, R. Lesley, K.M. Ansel, N. Killeen, and J.G. Cyster. 2007. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J Immunol.* 179:5099-108.

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

Hermann-Kleiter, N., and G. Baier. 2010. NFAT pulls the strings during CD4+ T helper cell effector functions. *Blood.* 115:2989-97.

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.

Ho, C.L., L.F. Sheu, and C.Y. Li. 2003. Immunohistochemical expression of angiogenic cytokines and their receptors in reactive benign lymph nodes and non-Hodgkin lymphoma. *Ann Diagn Pathol.* 7:1-8.

Hong, M.S., J.M. Dan, J.Y. Choi, and I. Kang. 2004. Age-associated changes in the frequency of naive, memory and effector CD8+ T cells. *Mech Ageing Dev.* 125:615-8.

Hsieh, S.H., N.W. Ying, M.H. Wu, W.F. Chiang, C.L. Hsu, T.Y. Wong, Y.T. Jin, T.M. Hong, and Y.L. Chen. 2008. Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene.* 27:3746-53.

Hu, H., I. Djuretic, M.S. Sundrud, and A. Rao. 2007. Transcriptional partners in regulatory T cells: Foxp3, Runx and NFAT. *Trends Immunol.* 28:329-32.

Hu, Y.L., D.P. Metz, J. Chung, G. Siu, and M. Zhang. 2009. B7RP-1 blockade ameliorates autoimmunity through regulation of follicular helper T cells. *J Immunol.* 182:1421-8.

Huang, C.T., C.J. Workman, D. Flies, X. Pan, A.L. Marson, G. Zhou, E.L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, H.I. Levitsky, J.D. Powell, D.M. Pardoll, C.G. Drake, and D.A. Vignali. 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 21:503-13.

Ito, T., S. Hanabuchi, Y.H. Wang, W.R. Park, K. Arima, L. Bover, F.X. Qin, M. Gilliet, and Y.J. Liu. 2008. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity.* 28:870-80.

Iwata, M., A. Hirakiyama, Y. Eshima, H. Kagechika, C. Kato, and S.Y. Song. 2004. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity.* 21:527-38.

Jackson, S.M., N. Harp, D. Patel, J. Wulf, E.D. Spaeth, U.K. Dike, J.A. James, and J.D. Capra. 2009. Key developmental transitions in human germinal center B cells are revealed by differential CD45RB expression. *Blood.* 113:3999-4007.

Jameson, S.C., and D. Masopust. 2009. Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches. *Immunity.* 31:859-71.

Jia, H., A. Bagherzadeh, B. Hartzoulakis, A. Jarvis, M. Lohr, S. Shaikh, R. Aqil, L. Cheng, M. Tickner, D. Esposito, R. Harris, P.C. Driscoll, D.L. Selwood, and I.C. Zachary. 2006. Characterization of a bicyclic peptide neuropilin-1 (NP-1) antagonist (EG3287) reveals importance of vascular endothelial growth factor exon 8 for NP-1 binding and role of NP-1 in KDR signaling. *J Biol Chem.* 281:13493-502.

Jones, K.S., C. Petrow-Sadowski, Y.K. Huang, D.C. Bertolette, and F.W. Ruscetti. 2008. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat Med.* 14:429-36.

Kalia, V., S. Sarkar, S. Subramaniam, W.N. Haining, K.A. Smith, and R. Ahmed. 2010. Prolonged interleukin-2 α expression on virus-specific CD8⁺ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity*. 32:91-103.

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*. 12:1380-9.

Karjalainen, K., D.E. Jaalouk, C.E. Bueso-Ramos, A.J. Zurita, A. Kuniyasu, B.L. Eckhardt, F.C. Marini, B. Lichtiger, S. O'Brien, H.M. Kantarjian, J.E. Cortes, E. Koivunen, W. Arap, and R. Pasqualini. 2010a. Targeting neuropilin-1 in human leukemia and lymphoma. *Blood*.

Karjalainen, K., D.E. Jaalouk, C.E. Bueso-Ramos, A.J. Zurita, A. Kuniyasu, B.L. Eckhardt, F.C. Marini, B. Lichtiger, S. O'Brien, H.M. Kantarjian, J.E. Cortes, E. Koivunen, W. Arap, and R. Pasqualini. 2010b. Targeting neuropilin-1 in human leukemia and lymphoma. *Blood*. 117:920-7.

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*. 126:4895-902.

Keino, H., T. Watanabe, Y. Sato, and A.A. Okada. 2010. Anti-inflammatory effect of retinoic acid on experimental autoimmune uveoretinitis. *Br J Ophthalmol*. 94:802-7.

Khattari, R., T. Cox, S.A. Yasayko, and F. Ramsdell. 2003. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol*. 4:337-42.

Kigel, B., A. Varshavsky, O. Kessler, and G. Neufeld. 2008. Successful inhibition of tumor development by specific class-3 semaphorins is associated with expression of appropriate semaphorin receptors by tumor cells. *PLoS One*. 3:e3287.

Kilpatrick, R.D., T. Rickabaugh, L.E. Hultin, P. Hultin, M.A. Hausner, R. Detels, J. Phair, and B.D. Jamieson. 2008. Homeostasis of the naive CD4⁺ T cell compartment during aging. *J Immunol.* 180:1499-507.

Kim, C.H., L.S. Rott, I. Clark-Lewis, D.J. Campbell, L. Wu, and E.C. Butcher. 2001. Subspecialization of CXCR5⁺ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5⁺ T cells. *J Exp Med.* 193:1373-81.

King, C. 2009. New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. *Nat Rev Immunol.* 9:757-66.

Kinoshita, K., B.S. Yoo, Y. Nozaki, M. Sugiyama, S. Ikoma, M. Ohno, M. Funauchi, and A. Kanamaru. 2003. Retinoic acid reduces autoimmune renal injury and increases survival in NZB/W F1 mice. *J Immunol.* 170:5793-8.

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.

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.* 121:4309-18.

Kohler, S., and A. Thiel. 2009. Life after the thymus: CD31⁺ and CD31⁻ human naive CD4⁺ T-cell subsets. *Blood.* 113:769-74.

Kohm, A.P., J.S. McMahon, J.R. Podojil, W.S. Begolka, M. DeGutes, D.J. Kasproicz, S.F. Ziegler, and S.D. Miller. 2006. Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *J Immunol.* 176:3301-5.

Kolodkin, A.L., D.V. Levensgood, E.G. Rowe, Y.T. Tai, R.J. Giger, and D.D. Ginty. 1997. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell.* 90:753-62.

Kolodkin, A.L., D.J. Matthes, and C.S. Goodman. 1993. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell*. 75:1389-99.

Kruger, R.P., J. Aurandt, and K.L. Guan. 2005. Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:789-800.

Ku, C.C., M. Murakami, A. Sakamoto, J. Kappler, and P. Marrack. 2000. Control of homeostasis of CD8⁺ memory T cells by opposing cytokines. *Science*. 288:675-8.

Latil, A., I. Bieche, S. Pesche, A. Valeri, G. Fournier, O. Cussenot, and R. Lidereau. 2000. VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms. *Int J Cancer*. 89:167-71.

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*. 36:1782-93.

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*. 104:5545-50.

Letourneau, S., C. Krieg, G. Pantaleo, and O. Boyman. 2009. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol*. 123:758-62.

Letourneau, S., E.M. van Leeuwen, C. Krieg, C. Martin, G. Pantaleo, J. Sprent, C.D. Surh, and O. Boyman. 2010. IL-2/anti-IL-2 antibody complexes show strong biological activity by avoiding interaction with IL-2 receptor alpha subunit CD25. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:2171-6.

Long, S.A., K. Cerosaletti, P.L. Bollyky, M. Tatum, H. Shilling, S. Zhang, Z.Y. Zhang, C. Pihoker, S. Sanda, C. Greenbaum, and J.H. Buckner. 2010. Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects. *Diabetes*. 59:407-15.

Lund, J.M., L. Hsing, T.T. Pham, and A.Y. Rudensky. 2008. Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science*. 320:1220-4.

Malek, T.R., and I. Castro. 2010. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity*. 33:153-65.

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*. 1153:20-8.

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

Miao, H.Q., S. Soker, L. Feiner, J.L. Alonso, J.A. Raper, and M. Klagsbrun. 1999. Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165. *J Cell Biol*. 146:233-42.

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*. 39:1466-71.

Mitchell, D.M., E.V. Ravkov, and M.A. Williams. 2010. Distinct roles for IL-2 and IL-15 in the differentiation and survival of CD8+ effector and memory T cells. *J Immunol*. 184:6719-30.

Miyara, M., Y. Yoshioka, A. Kitoh, T. Shima, K. Wing, A. Niwa, C. Parizot, C. Taflin, T. Heike, D. Valeyre, A. Mathian, T. Nakahata, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Z.

Amoura, G. Gorochov, and S. Sakaguchi. 2009. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 30:899-911.

Monti, P., M. Scirpoli, P. Maffi, N. Ghidoli, F. De Taddeo, F. Bertuzzi, L. Piemonti, M. Falcone, A. Secchi, and E. Bonifacio. 2008. Islet transplantation in patients with autoimmune diabetes induces homeostatic cytokines that expand autoreactive memory T cells. *J Clin Invest*. 118:1806-14.

Montolio, M., J. Messeguer, I. Masip, P. Gujjarro, 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.

Moraes-Vasconcelos, D., B.T. Costa-Carvalho, T.R. Torgerson, and H.D. Ochs. 2008. Primary immune deficiency disorders presenting as autoimmune diseases: IPEX and APECED. *J Clin Immunol*. 28 Suppl 1:S11-9.

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*. 111:2290-9.

Morita, R., N. Schmitt, S.E. Bentebibel, R. Ranganathan, L. Bourdery, G. Zurawski, E. Foucat, M. Dullaers, S. Oh, N. Sabzghabaei, E.M. Lavecchio, M. Punaro, V. Pascual, J. Banchereau, and H. Ueno. 2011. Human Blood CXCR5(+)CD4(+) T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. *Immunity*. 34:108-21.

Mucida, D., Y. Park, G. Kim, O. Turovskaya, I. Scott, M. Kronenberg, and H. Cheroutre. 2007. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*. 317:256-60.

Muller, M.W., N.A. Giese, J.M. Swiercz, G.O. Ceyhan, I. Esposito, U. Hinz, P. Buchler, T. Giese, M.W. Buchler, S. Offermanns, and H. Friess. 2007. Association of

axon guidance factor semaphorin 3A with poor outcome in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 121:2421-33.

Murga, M., O. Fernandez-Capetillo, and G. Tosato. 2005. Neuropilin-1 regulates attachment in human endothelial cells independently of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Blood*. 105:1992-9.

Nolting, J., C. Daniel, S. Reuter, C. Stuelten, P. Li, H. Sucov, B.G. Kim, J.J. Letterio, K. Kretschmer, H.J. Kim, and H. von Boehmer. 2009. Retinoic acid can enhance conversion of naive into regulatory T cells independently of secreted cytokines. *J Exp Med*. 206:2131-9.

Nozaki, Y., T. Yamagata, M. Sugiyama, S. Ikoma, K. Kinoshita, and M. Funauchi. 2006. Anti-inflammatory effect of all-trans-retinoic acid in inflammatory arthritis. *Clin Immunol*. 119:272-9.

O'Shea, J.J., and W.E. Paul. 2010. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*. 327:1098-102.

Obar, J.J., M.J. Molloy, E.R. Jellison, T.A. Stoklasek, W. Zhang, E.J. Usherwood, and L. Lefrancois. 2010. CD4+ T cell regulation of CD25 expression controls development of short-lived effector CD8+ T cells in primary and secondary responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:193-8.

Pan, Q., Y. Chantry, 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.

Pandiyani, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, and M.J. Lenardo. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 8:1353-62.

Pasterkamp, R.J., P.N. Anderson, and J. Verhaagen. 2001. Peripheral nerve injury fails to induce growth of lesioned ascending dorsal column axons into spinal cord scar tissue expressing the axon repellent Semaphorin3A. *Eur J Neurosci.* 13:457-71.

Pellet-Many, C., P. Frankel, H. Jia, and I. Zachary. 2008. Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochem J.* 411:211-26.

Pelletier, N., L.J. McHeyzer-Williams, K.A. Wong, E. Urich, N. Fazilleau, and M.G. McHeyzer-Williams. 2010. Plasma cells negatively regulate the follicular helper T cell program. *Nat Immunol.* 11:1110-8.

Perez de Lema, G., F.J. Lucio-Cazana, A. Molina, B. Luckow, H. Schmid, C. de Wit, V. Moreno-Manzano, B. Banas, F. Mampaso, and D. Schlondorff. 2004. Retinoic acid treatment protects MRL/lpr lupus mice from the development of glomerular disease. *Kidney Int.* 66:1018-28.

Pino-Lagos, K., M.J. Benson, and R.J. Noelle. 2008. Retinoic acid in the immune system. *Ann N Y Acad Sci.* 1143:170-87.

Pipkin, M.E., J.A. Sacks, F. Cruz-Guilloty, M.G. Lichtenheld, M.J. Bevan, and A. Rao. 2010. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity.* 32:79-90.

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

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.* 455:764-9.

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.* 36:1892-903.

- Reis e Sousa, C. 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol.* 6:476-83.
- Rufer, N., A. Zippelius, P. Batard, M.J. Pittet, I. Kurth, P. Corthesy, J.C. Cerottini, S. Leyvraz, E. Roosnek, M. Nabholz, and P. Romero. 2003. Ex vivo characterization of human CD8+ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. *Blood.* 102:1779-87.
- Sakaguchi, S., M. Miyara, C.M. Costantino, and D.A. Hafler. 2010. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 10:490-500.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 155:1151-64.
- Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 22:745-63.
- Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 2009. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol.* 39:2076-82.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 401:708-12.
- 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.* 28:402-13.
- Saurer, L., K.C. McCullough, and A. Summerfield. 2007. In vitro induction of mucosa-type dendritic cells by all-trans retinoic acid. *J Immunol.* 179:3504-14.

Schaerli, P., K. Willmann, A.B. Lang, M. Lipp, P. Loetscher, and B. Moser. 2000. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med.* 192:1553-62.

Schambach, F., M. Schupp, M.A. Lazar, and S.L. Reiner. 2007. Activation of retinoic acid receptor- α favours regulatory T cell induction at the expense of IL-17-secreting T helper cell differentiation. *Eur J Immunol.* 37:2396-9.

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.

Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S.I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher, and B. Fazekas de St Groth. 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med.* 203:1693-700.

Semba, R.D. 1994. Vitamin A, immunity, and infection. *Clin Infect Dis.* 19:489-99.

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

Setoguchi, R., S. Hori, T. Takahashi, and S. Sakaguchi. 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med.* 201:723-35.

Sharfe, N., H.K. Dadi, M. Shahar, and C.M. Roifman. 1997. Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:3168-71.

Sharma, R., L. Zheng, U.S. Deshmukh, W.N. Jarjour, S.S. Sung, S.M. Fu, and S.T. Ju. 2007. A regulatory T cell-dependent novel function of CD25 (IL-2Ralpha) controlling memory CD8(+) T cell homeostasis. *J Immunol.* 178:1251-5.

Shevach, E.M. 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 30:636-45.

Shimizu, M., Y. Murakami, F. Suto, and H. Fujisawa. 2000. Determination of cell adhesion sites of neuropilin-1. *J Cell Biol.* 148:1283-93.

Simpson, N., P.A. Gatenby, A. Wilson, S. Malik, D.A. Fulcher, S.G. Tangye, H. Manku, T.J. Vyse, G. Roncador, G.A. Huttley, C.C. Goodnow, C.G. Vinuesa, and M.C. Cook. 2010. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 62:234-44.

Soker, S., H. Fidder, G. Neufeld, and M. Klagsbrun. 1996. Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *J Biol Chem.* 271:5761-7.

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.* 92:735-45.

Solomon, B.D., C. Mueller, W.J. Chae, L.M. Alabanza, and M.S. Bynoe. 2011. Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

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.* 281:1515-8.

Strauss, L., C. Bergmann, and T.L. Whiteside. 2009. Human circulating CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells kill autologous CD8⁺ but not CD4⁺ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol.* 182:1469-80.

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.* 328:1031-5.

Suidan, G.L., J.W. Dickerson, Y. Chen, J.R. McDole, P. Tripathi, I. Pirko, K.B. Seroogy, and A.J. Johnson. 2010. CD8 T cell-initiated vascular endothelial growth factor expression promotes central nervous system vascular permeability under neuroinflammatory conditions. *J Immunol.* 184:1031-40.

Surh, C.D., and J. Sprent. 2008. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity.* 29:848-62.

Suzuki, K., M. Maruya, S. Kawamoto, K. Sitnik, H. Kitamura, W.W. Agace, and S. Fagarasan. 2010. The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity.* 33:71-83.

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.

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.

Tamagnone, L., S. Artigiani, H. Chen, Z. He, G.I. Ming, H. Song, A. Chedotal, M.L. Winberg, C.S. Goodman, M. Poo, M. Tessier-Lavigne, and P.M. Comoglio. 1999. Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell.* 99:71-80.

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.* 3:477-82.

Torres-Aguilar, H., M. Blank, L.J. Jara, and Y. Shoenfeld. 2010. Tolerogenic dendritic cells in autoimmune diseases: crucial players in induction and prevention of autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 10:8-17.

Tran, D.Q., H. Ramsey, and E.M. Shevach. 2007. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood.* 110:2983-90.

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

Valdembri, D., P.T. Caswell, K.I. Anderson, J.P. Schwarz, I. Konig, E. Astanina, F. Caccavari, J.C. Norman, M.J. Humphries, F. Bussolino, and G. Serini. 2009. Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates alpha5beta1 integrin traffic and function in endothelial cells. *PLoS Biol.* 7:e25.

Valmori, D., A. Merlo, N.E. Souleimanian, C.S. Hesdorffer, and M. Ayyoub. 2005. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *J Clin Invest.* 115:1953-62.

van Berkel, M.E., and M.A. Oosterwegel. 2006. CD28 and ICOS: similar or separate costimulators of T cells? *Immunol Lett.* 105:115-22.

Van Parijs, L., A. Biuckians, A. Ibragimov, F.W. Alt, D.M. Willerford, and A.K. Abbas. 1997. Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor. *J Immunol.* 158:3738-45.

Venken, K., N. Hellings, T. Broekmans, K. Hensen, J.L. Rummens, and P. Stinissen. 2008. Natural naive CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *J Immunol.* 180:6411-20.

Victoria, G.D., T.A. Schwickert, D.R. Fooksman, A.O. Kamphorst, M. Meyer-Hermann, M.L. Dustin, and M.C. Nussenzweig. 2010. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell.* 143:592-605.

Vinuesa, C.G., M.C. Cook, C. Angelucci, V. Athanasopoulos, L. Rui, K.M. Hill, D. Yu, H. Domasch, B. Whittle, T. Lambe, I.S. Roberts, R.R. Copley, J.I. Bell, R.J. Cornall, and C.C. Goodnow. 2005. A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature.* 435:452-8.

Vinuesa, C.G., M.A. Linterman, C.C. Goodnow, and K.L. Randall. 2010. T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. *Immunol Rev.* 237:72-89.

Volpe, E., N. Servant, R. Zollinger, S.I. Bogiatzi, P. Hupe, E. Barillot, and V. Soumelis. 2008. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol.* 9:650-7.

Walker, L.S., A. Gulbranson-Judge, S. Flynn, T. Brocker, C. Raykundalia, M. Goodall, R. Forster, M. Lipp, and P. Lane. 1999. Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers. *J Exp Med.* 190:1115-22.

Wiedermann, U., X.J. Chen, L. Enerback, L.A. Hanson, H. Kahu, and U.I. Dahlgren. 1996. Vitamin A deficiency increases inflammatory responses. *Scand J Immunol.* 44:578-84.

Willerford, D.M., J. Chen, J.A. Ferry, L. Davidson, A. Ma, and F.W. Alt. 1995. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity*. 3:521-30.

Williams, M.A., A.J. Tyznik, and M.J. Bevan. 2006. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature*. 441:890-3.

Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2008. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 322:271-5.

Wing, K., and S. Sakaguchi. 2010. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol*. 11:7-13.

Xiao, S., H. Jin, T. Korn, S.M. Liu, M. Oukka, B. Lim, and V.K. Kuchroo. 2008. Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. *J Immunol*. 181:2277-84.

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*. 128:2842-9.

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*. 20:413-20.

Yaron, A., P.H. Huang, H.J. Cheng, and M. Tessier-Lavigne. 2005. Differential requirement for Plexin-A3 and -A4 in mediating responses of sensory and sympathetic neurons to distinct class 3 Semaphorins. *Neuron*. 45:513-23.

Yu, A., and T.R. Malek. 2001. The proteasome regulates receptor-mediated endocytosis of interleukin-2. *J Biol Chem.* 276:381-5.

Yu, A., L. Zhu, N.H. Altman, and T.R. Malek. 2009a. A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells. *Immunity.* 30:204-17.

Yu, D., S. Rao, L.M. Tsai, S.K. Lee, Y. He, E.L. Sutcliffe, M. Srivastava, M. Linterman, L. Zheng, N. Simpson, J.I. Ellyard, I.A. Parish, C.S. Ma, Q.J. Li, C.R. Parish, C.R. Mackay, and C.G. Vinuesa. 2009b. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity.* 31:457-68.

Yu, D., A.H. Tan, X. Hu, V. Athanasopoulos, N. Simpson, D.G. Silva, A. Hutloff, K.M. Giles, P.J. Leedman, K.P. Lam, C.C. Goodnow, and C.G. Vinuesa. 2007. Roquin represses autoimmunity by limiting inducible T-cell co-stimulator messenger RNA. *Nature.* 450:299-303.

Yu, D., and C.G. Vinuesa. 2010. The elusive identity of T follicular helper cells. *Trends Immunol.* 31:377-83.

Zou, J.X., D.E. Rollison, D. Boulware, D.T. Chen, E.M. Sloand, L.V. Pfannes, J.J. Goronzy, F. Bai, J.S. Painter, S. Wei, D. Cosgrove, A.F. List, and P.K. Epling-Burnette. 2009. Altered naive and memory CD4⁺ T-cell homeostasis and immunosenescence characterize younger patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia.* 23:1288-96.

Zuber, J., M. Viguiere, F. Lemaitre, V. Senee, N. Patey, G. Elain, F. Geissmann, F. Fakhouri, L. Ferradini, C. Julier, and A. Bandeira. 2007. Severe FOXP3⁺ and naive T lymphopenia in a non-IPEX form of autoimmune enteropathy combined with an immunodeficiency. *Gastroenterology.* 132:1694-704.

Résumé

La neuropiline 1 (Nrp1) est une protéine transmembranaire impliquée dans la formation du système nerveux et dans l'angiogénèse, mais aussi dans le contrôle de la prolifération des lymphocytes T en immunologie. Cependant, peu d'études ont été réalisées chez l'homme pour déterminer dans quelle(s) situation(s) la Nrp1 est exprimée par les lymphocytes T. Nous montrons que la Nrp1 est spécifique de l'activité des lymphocytes T folliculaires helper (Tfh) au niveau des organes lymphoïdes secondaires et des lymphocytes T effecteurs, au niveau des sites d'inflammations périphériques, mais est absente à la surface des lymphocytes T régulateurs. Dans les deux cas, cette expression survient en fin d'activation et servirait de frein à une activation incontrôlée des lymphocytes T.

D'autre part, seuls deux cas de déficience en CD25, associés à des maladies auto-immunes, ont été décrits chez l'homme. Cependant, ces études n'ont pas abordé à quel niveau le CD25 intervient sur l'homéostasie des lymphocytes T. Nous complétons ces études par la présentation de trois nouveaux cas et montrons que le CD25 intervient activement dans le maintien des populations Treg naïves et effectrices, mais aussi dans celui des populations lymphocytaires effectrices mémoires.

Mots-clés: *neuropiline - récepteur alpha à l'IL-2 - lymphocyte T – homéostasie - lymphocyte T folliculaire auxiliaire - lymphocyte T régulateur.*

Abstract

“Neuropilin 1 and IL-2 receptor alpha (CD25): expression and implication in normal or pathologic human T cell homeostasis.”

Recent studies have shown the involvement of neuropilin 1 (Nrp1) in the control of T cell activation. However, few studies have been conducted in humans to determine when Nrp1 is expressed by T cells. Here we show that Nrp1 is expressed by effector T cells after engagement with antigen, either in secondary lymphoid organs for follicular helper T cells (Tfh) interacting with B cells, either in peripheral inflammation for effector memory T cells (TEM), but is not expressed by regulatory T cells. We conclude that this expression corresponds to a level of late activation in both cases and may control T cell activation.

The study in mice *il2ra*^{-/-} revealed a significant role of IL-2 receptor alpha (CD25) for the survival of Treg *in vivo*, but also for the differentiation of memory T cells. Only two cases of CD25 deficiency associated with autoimmune diseases have been described in humans. However, these studies do not assess at what level CD25 is involved in T cell homeostasis. Here we provide further insight of these studies by presenting three new cases of CD25 deficiency developing autoimmune diseases like IPEX. We show that CD25 plays an active role to maintain naive and effector Treg cell populations of, and effector memory T cell populations.

Keywords: *neuropilin - IL-2 receptor alpha - T cell – homeostasis - follicular helper T cell - regulatory T cell.*

Thèse préparée dans l'unité du CNRS UMR 8147 « Cytokines, hématopoïèse et réponse immune ». Hôpital Necker, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris.