



**HAL**  
open science

# Organisation spatiale de LFA-1 à la synapse immunologique des lymphocytes T cytotoxiques : approches de microscopie de super-résolution

Raïssa Houmadi

► **To cite this version:**

Raïssa Houmadi. Organisation spatiale de LFA-1 à la synapse immunologique des lymphocytes T cytotoxiques : approches de microscopie de super-résolution. Immunologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30239 . tel-01922403

**HAL Id: tel-01922403**

**<https://theses.hal.science/tel-01922403v1>**

Submitted on 14 Nov 2018

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

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



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**

**Raïssa Houmadi**

**le** mercredi 4 octobre 2017

**Titre :**

Organisation spatiale de LFA-1 à la synapse immunologique des lymphocytes T  
cytotoxiques : approches de microscopie de super-résolution

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Immunologie

**Unité de recherche :**

UMR INSERM U1043, Centre de physiopathologie de Toulouse-Purpan

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Docteur Loïc Dupré

Docteur Sophie Allart

**Jury :**

Professeur Denis Hudrisier, Président du jury

Docteur Claire Hivroz, Rapporteur

Docteur Marie-Pierre Valignat, Rapporteur

Docteur Lydia Danglot, Rapporteur

Docteur Loïc Dupré, Directeur de thèse

Docteur Sophie Allart, Co-directrice de thèse

## Sommaire

Remerciements .....	- 3 -
Abréviations .....	- 6 -
Introduction.....	- 15 -
I. Approches de microscopie .....	- 16 -
A. La microscopie, un outil d'agrandissement dans le prolongement de l'œil humain.....	- 16 -
1. De la loupe au premier microscope composé de lentilles de Van Leeuwenhoek et Hooke .	- 16 -
2. Le microscope optique de base.....	- 17 -
3. Le principe de la résolution selon de la loi d'Abbe.....	- 19 -
B. Imagerie de super-résolution optique de fluorescence.....	- 19 -
1. Principes et limites de la microscopie optique de fluorescence .....	- 20 -
2. Développement des techniques de microscopie de super-résolution .....	- 28 -
3. Applications des techniques de super-résolution .....	- 36 -
II. Rôle de l'intégrine LFA-1 dans les lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	- 38 -
A. Les intégrines des leucocytes.....	- 38 -
B. LFA-1 est une molécule importante dans la naissance des lymphocytes T .....	- 39 -
1. Du progéniteur lymphoïde commun à un lymphocyte T spécifique : étape sous le contrôle de LFA-1.....	- 40 -
2. Expression du pré-TCR.....	- 41 -
3. Education des thymocytes DP TCR <sup>+</sup> .....	- 41 -
C. Différenciation des thymocytes en lymphocytes T CD4 ou CD8.....	- 42 -
1. L'activation des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> : naissance de cellules tueuses professionnelles cytotoxiques .....	- 43 -
2. Activation des lymphocytes T CD4 : coopération cellulaire avec les lymphocytes T CD8.....	- 44 -
D. La molécule d'adhésion de LFA-1 : un système clef-serrure de choix contrôlé vers un ancrage de qualité.....	- 46 -
1. Description de LFA-1 .....	- 46 -
2. ICAM-1 : le principal ligand de LFA-1.....	- 49 -
3. Activation de LFA-1 : interaction LFA-1/ICAM-1 .....	- 50 -
E. Le remodelage du cytosquelette d'actine : un réarrangement bien contrôlé .....	- 55 -
1. Du monomère d'actine au filament d'actine .....	- 56 -
2. Le branchement des filaments d'actine sous le contrôle du complexe Arp2 /3.....	- 58 -
3. La protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) .....	- 59 -
F. Ancrage de LFA-1 au cytosquelette d'actine .....	- 62 -
III. LFA-1 contrôle la formation et la stabilité de la synapse cytotoxique .....	- 64 -
A. La formation de la synapse immunologique : le TCR circonscrit par LFA-1 .....	- 64 -

B. La synapse immunologique : orchestration d'un réarrangement spatial à trois temps contrôlé par le remodelage du cytosquelette d'actine.....	- 65 -
IV. Le rôle de LFA-1 dans l'activité de cytotoxicité des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> cytotoxiques .....	- 66 -
A. La déficience de l'adhésion des leucocytes entraîne une inhibition de la cytotoxicité .....	- 67 -
B. Libération des granules lytiques.....	- 68 -
C. Nécessité du remodelage du cytosquelette d'actine et de l'adhésion de LFA-1 dans la libération des granules lytiques .....	- 68 -
Méthodes .....	- 71 -
Mise en place des techniques d'imagerie de super-résolution .....	- 74 -
I. La technique du BaLM .....	- 76 -
A. Stratégie expérimentale et mise en place du BaLM .....	- 77 -
B. LFA-1 de conformation fermée s'organise en clusters de plusieurs centaines de nanomètres de diamètre au plan équatorial des lymphocytes T.....	- 80 -
C. Conclusions et limites.....	- 82 -
II. La technique du dSTORM .....	- 83 -
A. Stratégie expérimentale.....	- 84 -
B. Conclusion et limites .....	- 89 -
III. La technique du PALM.....	- 90 -
A. Stratégie expérimentale.....	- 91 -
B. Conclusion et limites .....	- 92 -
IV. dSTORM multicouleur .....	- 92 -
A. Conclusion et limites .....	- 95 -
V. La technique du SIM multicouleur .....	- 95 -
VI. Méthodes quantitatives d'analyse des clusters de molécules.....	- 96 -
Résultats .....	- 98 -
Résultats expérimentaux.....	- 146 -
Discussion .....	- 164 -
I. LFA-1 s'organise en nano-clusters à la surface des lymphocytes T.....	- 165 -
II. La protéine WASP contrôle l'organisation de la ceinture de nano-clusters de LFA-1.....	- 167 -
III. La ceinture de nano-clusters de LFA-1 confine les granules lytiques à la surface des CTL .....	- 168 -
Perspectives .....	- 170 -
I. Organisation de LFA-1 dans un contexte de motilité .....	- 171 -
II. Organisation de LFA-1 versus les récepteurs aux chimiokines .....	- 172 -
III. Organisation des protéines d'ancrage au cytosquelette d'actine sous LFA-1 active.....	- 174 -
IV. Méthodes d'analyse et estimation des tailles des nano-clusters de LFA-1 .....	- 175 -
Annexes .....	- 177 -
Bibliographie .....	- 240 -

## Remerciements

Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidée dans la réalisation de ce projet de thèse à commencer par mon directeur de thèse Docteur Loïc Dupré et ma co-directrice Docteur Sophie Allart pour leur disponibilité et leurs conseils. Cette thèse s'est déroulée à travers une collaboration entre le plateau d'imagerie dont la responsable est le Docteur Sophie Allart et l'équipe du Professeur Salvatore Valitutti, envers qui je suis sincèrement reconnaissante pour son soutien, son humanité et ses conseils très judicieux. Le président et les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à mes travaux de thèse en acceptant de les évaluer. Je remercie également le conseil départemental de Mayotte qui a financé mes trois années de thèse en m'octroyant une allocation de poursuite d'études.

Si la réalisation de projet de thèse a été possible, c'est grâce à l'accueil chaleureux, l'aide et la disponibilité des membres de l'équipe du professeur Valitutti et du plateau d'imagerie du CPTP à commencer par Sabina Müller, j'ai énormément apprécié nos échanges, ton aide et surtout ton soutien moral, Marie-pierre Puisségur-Lay et Liza Filali qui sont pour moi des fées au grand cœur en plus d'aimer les lysosomes, Delphine Guipouy : collaborer avec toi a été un plaisir, merci pour ta bonne humeur et les discussions fructueuses, Javier Rey-Barroso mon meilleur ami et collègue toujours de bons conseils, Yoan Eliasse pour qui l'automatisation n'a pas de secret et toujours prêt à conseiller en matière de programmation, Romain Jugelé avec qui les échanges philosophiques étaient très passionnants, Pauline Gonnord : d'une méthodologie implacable et de conseils très avisés, Laurène Pfajfer , Alice Munaretto notre très jeune maman et pour qui la cytométrie n'a plus de secret , Yolla German jeune thésarde à qui je souhaite une bonne chance pour la suite, Eric Espinosa, Cécile Demeur Manon Costa, Astrid Canivet la professionnelle des macros, Danièle Daviaud qui prend plaisir à aider dès qu'elle peut.

Je ne peux pas oublier de remercier les filles de la cytométrie. Fatima L'Faqihi-Olive, Valérie Duplan-Eche et Anne-Laure Iscache, les collaborateurs physiciens Nicolas Destainville et Julie Cornet, les autres membres du centre CPTP : Mélanie Souyris, José Enrique Méjia, qui m'ont beaucoup aidée pour caractériser mon plasmide, Lucette Pelletier qui a été ma marraine de thèse, Yannick Degboe, le plateau d'imagerie de l'I2MC : Frédérique Gaits et Madjid Zanoun et enfin le plateau d'Imagoseine : Orestis Faklaris.

Je n'oublie pas de remercier tous ceux que j'ai délaissés toutes ces années pour mener jusqu'au bout cette thèse. Tout d'abord mes proches maman et papa qui même à 10 000 km continuent à me soutenir tant bien que mal, Niya et Mays mes « moina mbuzi » adorés, Loubna et Haïrou les autres « moina mbuzi ». Ensuite, de Roanne à Mayotte en passant par la Réunion, Cathy Forestier, qui a su me redonner l'énergie suffisante pour aller jusqu'au bout, deux semaines avant la remise de mon manuscrit, Anne-Marie et Charles Delaye qui m'ont accueilli il y a 10 ans, sans le collier de fleurs, mais avec la chaleur de leur sourire, Eolia, Nati et Mouinate qui ont enrichi mes souvenirs de rires, pleurs et cris, Mohamed pour son enthousiasme, Christèle Zagula, Marie Anne et Bernard, Moncef qui est toujours prêt à encourager et remotiver quand il faut, Toibrane et Emeline qui sont toujours là en cas de besoin. Depuis la Polynésie, Danielle Hartmann qui a eu la gentillesse de corriger mon manuscrit. Du Mexique à la Guyane, Brenda (Brendita) qui ne manque pas une occasion pour me souhaiter une bonne journée et Roxane (queredita) pour ses conseils avisés. Enfin d'ici et d'ailleurs Mylène, Caroline (Carcoura), Smita, Olivia et Noussayir.

Je ne peux finir sans citer ceci, extrait du TAO : « Celui qui se dresse sur la pointe des pieds n'est pas stable. Celui qui se précipite en avant ne va pas loin. Celui qui essaie de briller ternit sa propre lumière. Celui qui se définit ne peut pas savoir qui il est réellement. Celui qui exerce son pouvoir sur les autres se prive de son véritable pouvoir. Celui qui s'attache à son œuvre ne

crée rien de durable. Si tu veux être en accord avec le Tao fais simplement ton travail, puis lâche prise ». Lao-tseu

## Abréviations

ADP	Adenosine Diphosphate
Arp2:	Actin-related-protein2
Arp3:	Actin-related-protein3
ARPC:	actin related protein 2/3 complex
ATP:	Adénosine Triphosphate
BaLM	Bleaching/blinking assisted Localization Microscopy
CALDAG-	Calcium and diacylglycerol-regulated
GEF1	Guanine nucleotide exchange factors
CD	Cluster differentiation
CDc-42:	Cell division cycle42
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigènes
DAG	diacylglycerol-regulated
dSTORM	direct Stochastical reconstruction Microscopy
FERM	4.1 protein ezrin/radixin/moesin
FRET:	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GBD	GTPase-binding domain
GEFs	Guanine nucleotide Exchange Factor
GTP	Guanosine 5' Triphosphate
ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule-1
IL	InterLeukine
LAD	Leucocyte Adhesion Deficiency
LCK	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

LFA-1	Lymphocytes Function-associated Antigen-1
LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1
Mac-1	Macrophage-1 antigen
mDia1:	mouse Diaphanous 1
MTOC	MicroTubule Organizing Center
NFP:	Nucleating promoting factor
NK	Natural Killer
N-WASP	Neural-WASP
PALM:	Photoactivation Localization Microscopy
PIP2	Phosphatidylinositol (4, 5) biphosphate
PLC	Phospholipase C
PMT	Photomultiplier
Rap1	Ras-related protein 1
RapL	Rap1-binding protein
RhoA	Ras homologous member A
SDF-alpha	Stromal cell-derived factor 1
SHD:	SCAR homology domain
SIM:	structured illumination
SKAP-55	SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa
SLP-76	Src kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa
SMAC	Supra Molecular Activation Cluster
STED:	Stimulated emission depletion microscopy
STORM	Stochastic reconstruction Microscopy
TCR	T Cell Receptor
TGF	facteur de croissance transformant

Th	T Helper cells
TIRF:	total internal reflection fluorescence
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
WAS	Wiskott-Aldrich Syndrome
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE	WASP-family verprolin homologue
WHD	WASP homology domain
WIP	WASP Interacting Protein

## Listes des figures

**Figure 1:** Principe de la fluorescence à l'échelle atomique

**Figure 2:** Diagramme de Jablonski

**Figure 3:** Le décalage de Stokes

**Figure 4:** Principe de la microscopie confocale

**Figure 5:** Représentation de la tache d'Airy

**Figure 6:** Schéma représentant les principes des approches de microscopie de super-résolution SIM et STED

**Figure 7:** Détection des molécules individuelles et reconstruction d'une image BaLM.

**Figure 8:** Principes du dSTORM et du PALM

**Figure 9:** Comparaison d'une même cellule COS-7 exprimant la protéine lysosomale transmembranaire CD63 marquée avec une protéine photoactivable: PA-FP kaede TIRF (A) et PALM

**Figure 10:** Schéma de la différenciation des lymphocytes T

**Figure 11:** Les différentes sous-unités de LFA-1

**Figure 12:** Les différentes conformations de la molécule de LFA-1, révélées par microscopie de transmission électronique

**Figure13:** La signalisation Inside-out sous le TCR et Via les récepteurs aux chimiokines

**Figure14:** Représentation des différents acteurs de la polymérisation des monomères d'actine

**Figure 15:** Schéma représentant une cellule en migration et les deux types de structures du cytosquelette d'actine caractérisant une cellule polarisée en migration

**Figure 16:** La morphologie d'un filament d'actine ramifié et du complexe Arp2/3

**Figure 17:** Schéma de la protéine WASP sous ses deux conformations

**Figure 18 :** Les différentes étapes de maturation de la synapse immunologique

**Figure19:** Représentation schématique du principe de la microscopie de BaLM

**Figure 20 :** Visualisation de LFA-1 dans les cellules Jurkat par l'approche du BaLM

**Figure 21:** Diagramme de Jablonski représentant les états d'oscillation des molécules fluorescentes en dSTORM

**Figure 22 :** Visualisation de l' $\alpha$ -tubuline dans des lignées cellulaires HFF

**Figure 23:** Topologie de LFA-1 de conformation fermée à la synapse des lymphocytes T primaires humains

**Figure 24:** Structure du chromophore de la Dendra-2

**Figure 25:**Schéma représentant les sites de liaisons des anticorps utilisés pour notre étude

**Figure 26:** Distribution de LFA-1 dans les lymphocytes T primaires de donneurs normaux et de patients WAS

### **Liste des tableaux**

**Tableau 1:** Propriétés de fluorescence de certaines molécules de la famille des Alexa Fluor et des carbocyanines

**Tableau 2:** Comparatif des tailles de clusters obtenues avec la technique du BaLM en regard de la microscopie confocale

**Tableau 3:** Caractéristiques des fluorophores excitables dans le rouge lointain

# Organisation spatiale de LFA-1 à la synapse immunologique des lymphocytes T cytotoxiques : approches de microscopie de super-résolution.

## Résumé en français

LFA-1 (Lymphocyte Function Associated antigen-1) est une intégrine centrale dans la fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> car elle permet la formation de la synapse immunologique avec les cellules cibles. La régulation de cette interaction cellulaire est contrôlée par la qualité de l'engagement de LFA-1 avec son ligand ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule-1). Un support clef au contrôle spatio-temporel de l'activation de LFA-1 est le cytosquelette d'actine corticale dans lequel est ancré LFA-1 par son domaine intracellulaire. Comment LFA-1 est organisée à la synapse immunologique et comment la coordination entre LFA-1 et cytosquelette d'actine s'opère de manière précise au sein des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques sont des questions non résolues.

Le but de ce projet de thèse a été d'étudier l'organisation précise de la distribution de LFA-1 à la synapse immunologique en relation avec l'actine corticale sous-jacente au contact entre lymphocytes T cytotoxiques et les cellules présentatrices d'antigènes. Pour ce faire, des approches de microscopies de super-résolution SIM (Structured Illumination Microscopy), dSTORM (direct STochastic Optical Reconstruction Microscopy) et TIRF (Total Internal Reflexion Fluorescence microscopy) ont été développées. Elles ont été appliquées à des lymphocytes T humains non transformés dérivés de contrôles sains et de patients atteints d'une immunodéficience congénitale, le Syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), caractérisé par un défaut de remodelage du cytosquelette d'actine à la synapse immunologique.

L'emploi de l'approche de dSTORM en mode TIRF nous a permis de révéler que dans sa conformation activée, LFA-1 forme à la synapse une ceinture radiale composée de centaines de

nano-clusters. L'intégrité du cytosquelette d'actine et notamment la protéine WASP s'avèrent importantes pour la formation de la ceinture de nano-clusters de LFA-1, comme le montre le défaut de formation de cette ceinture dans les lymphocytes de patients WAS. L'approche de SIM multi-couleur nous a permis de révéler le rôle de la ceinture de LFA-1 dans le confinement des granules lytiques. Par comparaison de marquages avec des anticorps spécifiques de différentes conformations de LFA-1, notre travail montre également que l'activation de LFA-1 s'opère de manière digitale, dans le sens où les nano-clusters fonctionnent comme des unités au sein desquelles l'activation de LFA-1 suit une loi du tout ou rien.

En conclusion, ce travail de thèse démontre l'intérêt des approches de microscopie de super-résolution pour révéler des mécanismes clés de l'activation des lymphocytes T et pour appréhender la nature des défauts à l'origine de dérèglements pathologiques de la fonction de ces cellules.

# Spatial organization of LFA-1 at the immunological synapse of cytotoxic T lymphocytes: super-resolution microscopy approaches.

## **Abstract**

LFA-1 (Lymphocyte Function Associated antigen-1) is a central integrin in the function of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes since it allows the formation of the immunological synapse with target cells. The regulation of this cellular interaction is controlled by the quality of the engagement of LFA-1 with its ligand, ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule-1). A key support for the spatio-temporal control of LFA-1 activation is the cortical actin cytoskeleton in which LFA-1 is anchored by its intracellular domain. How LFA-1 is organized at the immunological synapse and how the coordination between LFA-1 and actin cytoskeleton operates accurately within cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are unresolved issues.

The aim of this thesis project was to study the precise organization of the LFA-1 distribution at the immunological synapse in relation to the cortical actin underlying the contact between cytotoxic T lymphocytes and target cells. For this purpose, super-resolution microscopy approaches, including SIM (Structured Illumination Microscopy), dSTORM (direct STochastic Optical Reconstruction Microscopy) and TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence microscopy) were developed. They were applied to untransformed human T lymphocytes derived from healthy donors and patients with a congenital immunodeficiency, the Wiskott-Aldrich Syndrome (WAS), characterized by actin cytoskeleton remodeling defects at the synapse.

The use of the dSTORM approach revealed that activated LFA-1 forms a radial belt composed of hundreds of nanoclusters. The assembly of this belt depends on the integrity of the actin cytoskeleton, as shown by the impairment of this structure in the T lymphocytes derived from

the WAS patients. The multi-color SIM approach allowed us to investigate the role of the LFA-1 belt in the confinement of lytic granules. Furthermore, the combination of staining with antibodies specific of LFA-1 conformation states shows that LFA-1 activation is a digital process, whereby nanoclusters operate as units in which LFA-1 activation follows an on / off rule.

In conclusion, this PhD work exemplifies the great asset of super-resolution microscopy approaches to reveal key activation mechanisms in T lymphocytes and explore the nature of the defects causing pathological dysregulation of the function of these cells.

## Introduction

## I. Approches de microscopie

### A. La microscopie, un outil d'agrandissement dans le prolongement de l'œil humain

#### 1. De la loupe au premier microscope composé de lentilles de Van Leeuwenhoek et Hooke

L'évolution de l'homme a toujours coïncidé avec la nécessité de comprendre l'infiniment petit. En effet si certaines choses (objets, être vivants) paraissent suffisamment grandes pour être perceptibles à l'œil nu, pour une grande majorité d'entre elles, l'œil humain est incapable de les percevoir. Aussi performant qu'il puisse être, l'œil humain ne peut voir au-delà d'une certaine taille. Pour un œil normal d'être humain le plus petit objet capable d'être vu est d'environ 100  $\mu\text{m}$  (diamètre d'un cheveu) lorsque celui-ci est situé à une distance de 25 cm de l'œil. Par conséquent, certains êtres, de très petite taille, comme les bactéries (0.1 à 10  $\mu\text{m}$ ) ne sont pas visibles à l'œil nu. Malheureusement, ces êtres invisibles sont à l'origine de maladies ou infections. Pour les mettre en évidence et comprendre leur fonctionnement, il a fallu élaborer une instrumentation capable de projeter vers l'œil des images agrandies. Des découvertes archéologiques montrent que l'utilisation de certains matériaux (l'émeraude, sphères de verre dans l'eau...) comme loupes remonte au XII<sup>ème</sup> siècle avant JC. Cependant l'emploi du microscope composé de lentille ne date que du XVII<sup>ème</sup> siècle. Si des hésitations persistent sur l'invention du microscope, l'utilisation du microscope à des fins de biologie est généralement attribuée au hollandais Antoni Van Leeuwenhoek et au britannique Robert Hooke. Les travaux de ces derniers ont permis de mettre en évidence des êtres vivants de petite taille telle que les bactéries (initialement nommées « animalcules »).

## 2. Le microscope optique de base

Le microscope est donc un instrument permettant de voir des objets de très petite taille par agrandissement grâce à sa composition d'une ou de multiples lentilles. Dans tout microscope les éléments suivants sont indispensables : une source lumineuse, une ou plusieurs lentilles, un échantillon et un détecteur du signal.

### a- La nature de la lumière

La lumière provenant de la source est formée d'une onde électromagnétique et de particules appelées photons (hypothèse de Broglie). Une onde électromagnétique est une onde sinusoïdale constituée d'une composante électrique et d'une composante magnétique perpendiculaires mais ayant la même direction de propagation. L'unité spatiale caractérisant cette onde est la longueur d'onde qui correspond à la distance (en mètre) séparant deux pics. Les photons sont des particules sans masse qui ne peuvent être caractérisées que par leur énergie liée à la longueur d'onde. Il existe deux types d'illumination : le premier est le cas où la lumière illumine directement l'échantillon et l'observation se fait par transmission, c'est la lumière transmise. Le deuxième type est le cas où la lumière est réfléchiée par un miroir avant d'illuminer l'échantillon et l'observation se fait par transmission, c'est la lumière réfléchiée.

### b- Agrandissement de l'image par des lentilles optiques

La lumière qui traverse le microscope passe à travers des lentilles convergentes qui permettent d'agrandir l'image. Le pouvoir d'agrandissement des lentilles est caractérisé par son grossissement. Les rayons parallèles à l'axe optique ressortent de la lentille en convergeant vers le point focal, si et seulement si la lentille est sphérique.

### c- Un échantillon

L'objet d'intérêt doit être placé sur un support qui lui est dédié de manière à ce qu'il puisse être illuminé. Un objet biologique peut être observé sans préparation particulière. Toutefois l'objet doit être capable de laisser passer la lumière au travers de sa structure.

### d- Un détecteur

Dans le contexte d'un microscope optique simple c'est notre œil qui nous permet de voir l'image de l'objet d'intérêt. Le point de l'image forme un point dans notre œil. Les rayons provenant de l'oculaire doivent être parallèles. Puis ils vont être focalisés par le cristallin afin de s'imprimer sur la rétine. De nos jours le détecteur le plus couramment utilisé est la caméra ce qui permet ainsi de pouvoir enregistrer des images. Pour la détection du signal en microscopie de fluorescence et en particulier en microscopie de super-résolution, on utilise des caméras EMCCD ou sCMOS. La caméra EMCCD est utilisée pour sa haute sensibilité à détecter les molécules individuelles. En effet le rapport entre le nombre de photons qui frappe la caméra et le nombre de photons incidents est proche de 90%. C'est ce qu'on appelle l'efficacité quantique de la caméra. Pour la caméra sCMOS son avantage réside sur la vitesse d'acquisition qui est très élevée. Son efficacité quantique est d'environ 70%. Dans notre étude nous avons utilisé une caméra EMCCD avec l'avantage de pouvoir détecter des signaux faibles de fluorescence. Cette caractéristique s'avère utile dans la détection des molécules individuelles qui ont souvent de faibles signaux.

Cependant pour avoir une bonne détection il convient de prendre en compte les bruits qui peuvent parasiter le signal. On dénombre trois sources potentielles de bruits différentes : le bruit généré par la caméra (bruit noir), le bruit dû à l'amplification électronique du signal (bruit de lecture) et le bruit lié à la nature aléatoire de la lumière (bruit photonique).

### 3. Le principe de la résolution selon de la loi d'Abbe

Presque deux siècles plus tard, le microscope de Van Leeuwenhoek et Hooke évolua grâce aux travaux réalisés par Ernest Abbe. Ses travaux constituent jusqu'à nos jours les fondements de la microscopie optique. En effet il démontra en 1873, par la formule qui porte son nom que la diffraction de la lumière provenant de l'échantillon et passant par les lentilles des objectifs limitait la taille des plus petits objets que l'on peut voir avec une telle instrumentation, à savoir, 200nm. Cette limite de taille dépend de la longueur d'onde de la lumière ( $\lambda$ ) utilisée pour illuminer l'échantillon, de l'indice de réfraction ( $\eta$ ) du milieu de propagation de la lumière et de l'angle de réfraction de la lumière ( $\sin \alpha$ ). La formule d'Abbe :

$$d = \frac{\lambda}{\eta \sin \alpha}$$

Plus d'un siècle après la formulation de cette loi les avancées technologiques n'ont eu de cesse d'outrepasser cette limite et d'aller toujours vers l'infiniment petit dans le but d'étudier des structures ou des phénomènes biologiques et physiques infiniment petits.

### B. Imagerie de super-résolution optique de fluorescence

La microscopie optique a, depuis toujours, représenté un outil très privilégié dans la biologie cellulaire. Elle permet non seulement l'étude sur des structures vivantes mais aussi sur des structures fixées. L'utilisation de marqueurs spécifiques permet l'observation de petites structures de l'ordre du nanomètre. De plus, la variété de biomarqueurs fluorescents constitue un large choix de marqueurs non invasifs permettant la conservation des structures biologiques. Cependant la taille des structures étudiées à l'aide de la microscopie conventionnelle reste relativement grande comparée à la taille réelle de certaines structures biologiques. En effet des structures biologiques de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres ont pu être révélées et étudiées, grâce à la microscopie électronique. Comme abordé précédemment, la

taille du plus petit objet capable d'être vu à l'aide d'un microscope optique dépend de la longueur d'onde de la lumière et de l'objectif utilisé. La limite de la résolution s'explique par la diffraction de la lumière. A partir des années 2000, des approches dites de super-résolution ont commencé à voir le jour. La microscopie STED<sup>1,2</sup>, la microscopie par illumination structurée (SIM)<sup>3,4</sup> et la microscopie de localisation de précision<sup>5-9</sup> sont des techniques d'imagerie qui permettent actuellement de franchir la barrière de diffraction et d'étudier des structures ou molécules à l'échelle nanométrique. Le sous-chapitre que nous allons développer ci-dessous est composé de deux grandes parties. Dans la première partie nous faisons un rappel sur les généralités de la microscopie optique de fluorescence, le principe, l'utilisation et les limites. Dans la deuxième partie nous discutons du développement des techniques de super-résolution, leurs principes, leurs utilisations et leurs limites.

## 1. Principes et limites de la microscopie optique de fluorescence

### a- Les caractéristiques de la fluorescence

#### i- La fluorescence

La fluorescence est un événement caractérisé par l'émission de photons après absorption de la lumière par un objet (Figure 1). Le phénomène d'absorption a lieu lorsque dans un atome un électron capte (absorbe) l'énergie d'un photon. En absorbant cette énergie l'électron passe d'un niveau d'énergie stable (de faible énergie = niveau fondamental) à un niveau d'énergie plus

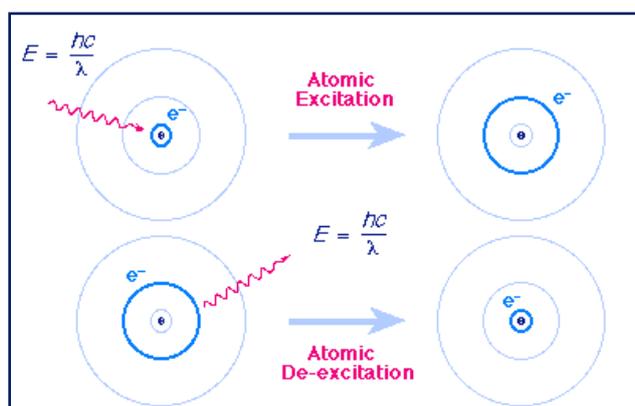


Figure 1: Principe de la fluorescence à l'échelle atomique. Représentation du déplacement des électrons dans leurs orbitales après absorption d'énergie et après libération de cette énergie. "The Bohr Model of the Atom"

Source: <http://www2.ucdsb.on.ca/tiss/stretton/chem1/elecon5.html>

élevé. L'électron change alors d'orbitale atomique en passant du niveau fondamental ( $S_0$ ) au niveau excité ( $S_1$ ). Cependant, l'état excité n'étant pas un niveau stable, l'électron va vite libérer l'énergie captée. C'est ce que l'on appelle l'émission, présentée au travers du diagramme de Jablonski (Figure 2).

Ainsi l'émission est le phénomène qui se produit lorsque l'électron quitte l'état excité pour retourner à l'état fondamental en libérant l'énergie emmagasinée. Le retour entre l'état excité ( $S_1$ ) et l'état fondamental ( $S_0$ ) n'est pas direct (diagramme de Jablonski). Une fois à l'état excité, un phénomène appelé la relaxation radiative conduit à une libération de chaleur. Cette libération de chaleur constitue une perte d'énergie qui fait passer l'électron du niveau  $S_1$  à un niveau d'excitation légèrement inférieure, le niveau  $S_1'$ . A partir du niveau  $S_1'$  l'électron revient à l'état fondamental  $S_0$  en émettant l'énergie restante. Ce processus de perte d'énergie par conversion interne entraîne un autre phénomène très connu en fluorescence : le décalage de Stokes (Stokes shift).

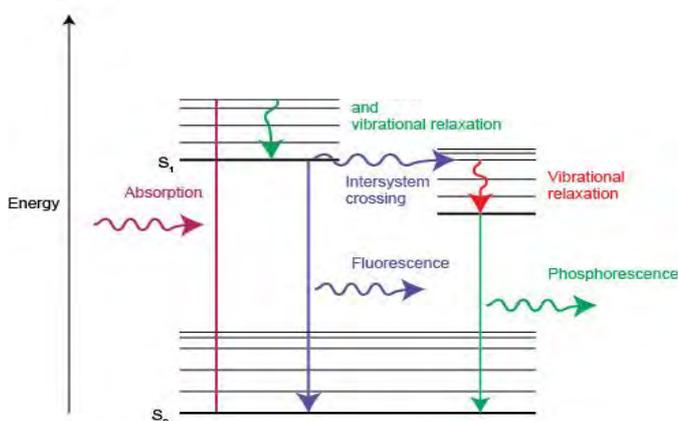


Figure 2: Diagramme de Jablonski

Source : <http://nptel.ac.in/courses/102103044/module2/lec6/1.html>

## ii- Le décalage de Stokes

Il se caractérise par une énergie d'absorption plus haute que l'énergie d'émission. Par inversion la longueur d'onde d'absorption est plus petite que la longueur d'émission. Par conséquent le pic du spectre d'émission est décalé vers les longueurs d'ondes plus grandes.

---

## Petit rappel historique

---

Stokes est le premier à avoir noté le phénomène de fluorescence (Figure 3). Il aurait utilisé la lumière qui passait au travers d'une vitre colorée en violet pour filtrer la lumière du soleil et illuminer un récipient qui contenait de la quinine mélangée à l'eau. Cette vitre teintée en violet transmettait sélectivement une lumière en dessous de 400nm. La lumière violette était ensuite absorbée par la quinine. Il aurait ensuite disposé un verre jaune de vin blanc sur le trajet de la lumière qui passait au travers du récipient. La lumière incidente qui arrivait à l'œil était alors bleue, proche de 450 nm et provenait de la fluorescence de la quinine (Lakowicz book<sup>10</sup>).

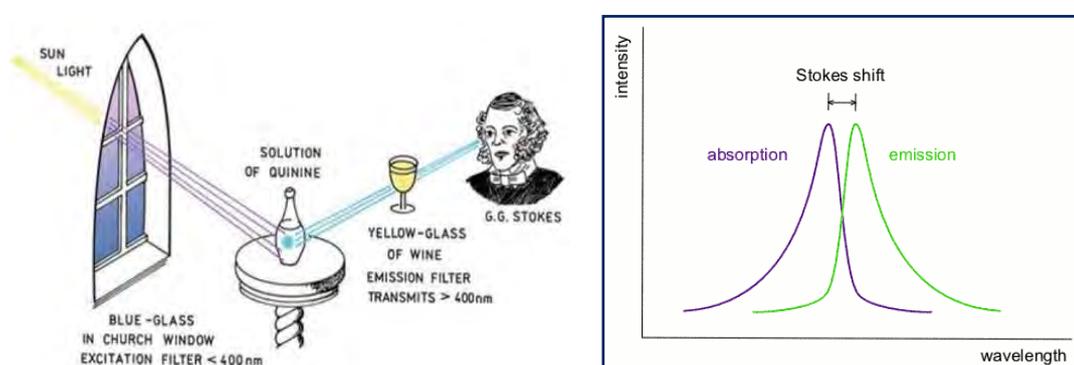


Figure 3 : Le décalage de Stokes (Lakowicz book<sup>10</sup> and [http://wikipedia.qwika.com/en2pt/Stokes\\_shift](http://wikipedia.qwika.com/en2pt/Stokes_shift))

---

### iii- Les propriétés de la fluorescence

La lumière émise est caractérisée par trois propriétés majeures : le rendement quantique, la durée de vie de la fluorescence et le coefficient d'extinction.

- Le rendement quantique

Le rendement quantique est le rapport entre le nombre de photons absorbés et le nombre de photons émis. Il détermine l'efficacité d'une molécule fluorescente et est propre à chaque fluorophore. Les molécules fluorescentes ont des rendements quantiques compris entre 0,1 et 1. Plus ce rendement est proche de 1 meilleure est l'efficacité de l'émission.

$$\varphi = \frac{N_{\text{absorbés}}}{N_{\text{émis}}}$$

- La durée de vie de fluorescence

La durée de vie correspond au temps moyen que va passer une molécule à l'état excité avant de revenir à l'état basal. Les durées de vie de fluorescence des molécules sont généralement de l'ordre de la dizaine de nanosecondes.

- Le coefficient d'extinction  $\epsilon$

Le coefficient d'absorption représente la probabilité qu'une molécule absorbe un photon. Plus il est grand, plus l'intensité de la fluorescence sera grande pour une intensité d'excitation et un rendement quantique identique.

#### b- Les molécules de fluorescence

Pour révéler les structures biologiques il faut des marqueurs spécifiques capables de reconnaître des sites localisés sur ces structures et dotés d'une capacité à émettre de la fluorescence après excitation. En microscopie optique on utilise généralement deux stratégies de marquages : soit une immunochimie soit une fusion de protéines fluorescentes. Parmi les molécules fluorescentes, il existe des protéines avec une fluorescence naturelle ou intrinsèque dont l'origine provient des acides aminés aromatiques présents dans ces protéines ou des cofacteurs d'enzymes. Une autre catégorie de molécules fluorescentes est dite extrinsèque car elles ne possèdent pas une capacité de fluorescence naturelle. Dans ce cas, un marquage est requis avec des sondes (chromophores) qui ne sont excitables qu'avec des longueurs d'ondes plus élevées que celles requises pour les fluorophores naturels.

De nos jours les marqueurs employés sont le plus souvent des fluorophores organiques, des protéines fluorescentes ou bien des nano-cristaux (quantum dots)<sup>11</sup>. Dans le cadre de mes

travaux de thèse je vais me focaliser uniquement sur les fluorophores organiques et les protéines fluorescentes.

### i- Fluorophores organiques

Ces sont des marqueurs de très petite taille. Ils sont issus d'une synthèse chimique et possèdent de nombreuses doubles liaisons alternées. Pour que ces marqueurs puissent être utilisés en biologie ils sont très souvent couplés à des anticorps spécifiques par liaisons covalentes. L'utilisation de ses marqueurs permet une excitation et une émission dans une gamme de spectres très larges encadrant les limites extrêmes du visible (bleu profond) au rouge lointain, voire au-delà. Ces marqueurs sont relativement brillants et peuvent être éteints par un processus de photoblanchiment. Quelques-uns de ses marqueurs sont cités dans le tableau 1.

Fluorophores	Excitation (nm)	Emission (nm)	$\epsilon$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	Rendement quantique
Alexa Fluor 488	495	519	71,000	0.92
Alexa Fluor 568	578	603	91,300	0.69
Alexa Fluor 647	650	665	239,000	0.33
Cy3	550	570	150,000	0.15
Cy5	649	670	250,000	0.28

Tableau 1: Propriétés de fluorescence de certaines molécules de la famille des Alexa Fluor et des carbocyanines. Adapté de Dempsey et al. 2011<sup>12</sup>

### ii- Protéines fluorescentes

Ce sont des protéines ayant la propriété d'émettre une fluorescence naturellement. Elles peuvent être produites génétiquement dans une cellule. En effet le gène de la protéine fluorescente peut être fusionné in vitro au gène de la protéine d'intérêt. Le gène recombinant est ensuite introduit dans les cellules. Ces cellules vont ensuite synthétiser la protéine de fusion qui sera alors fluorescente. La plus connue et la première des protéines naturellement fluorescentes est la GFP (Green Fluorescent Protein) issue de la méduse *Aequorea victoria*<sup>13</sup>. Il existe plusieurs variantes

de cette protéine. Cette protéine a la particularité de ne pas être spécifique d'une espèce ; elle est relativement stable ; elle ne nécessite pas de substrat ; elle peut être fusionnée à de multiples protéines d'intérêt.

### c- La microscopie de fluorescence

La microscopie de fluorescence constitue l'une des techniques majoritairement employées en biologie cellulaire pour identifier la localisation des protéines.

#### i- Les principes de la microscopie de fluorescence

La microscopie de fluorescence est une technique basée sur la détection de la fluorescence provenant d'un marqueur fluorescent après excitation, comme expliqué précédemment. Pour ce faire il est nécessaire d'avoir une source lumineuse de forte intensité ou bien un laser pour parvenir à exciter le fluorophore. La lumière provenant de la source lumineuse rencontre un premier filtre (filtre d'excitation) qui laisse passer uniquement la longueur d'onde d'excitation. Puis elle est réfléchi à la surface d'un miroir dichroïque avant d'illuminer l'échantillon. La lumière d'émission provenant de l'échantillon rencontre à nouveau le miroir dichroïque en passant au travers de celui-ci avant de traverser le filtre d'émission et de heurter le détecteur. Dans le cas d'une microscopie à champ large, le signal récolté par le détecteur provient du plan focal mais aussi de part et d'autre de ce plan. Le pouvoir résolutif de ce type de microscopie est limité à 250nm en latéral et à 600nm en profondeur selon la théorie d'Ernest Abbe. L'invention de la microscopie confocale par Adrian Minsky en 1953<sup>14</sup> a été une révolution majeure en microscopie de fluorescence. Elle a permis un gain de 30% de la résolution optique latérale comparée à la microscopie de champ large. Cette microscopie consiste à éliminer tout signal provenant des plans en dehors du plan focal par l'utilisation d'un sténopé ou « pinhole » (« trou

d'épingle »). Ce pinhole est situé avant le détecteur et sur le plan foyer optique de l'objectif et permet d'atteindre une résolution de 170nm en latéral et 500nm en profondeur (Figure 4).

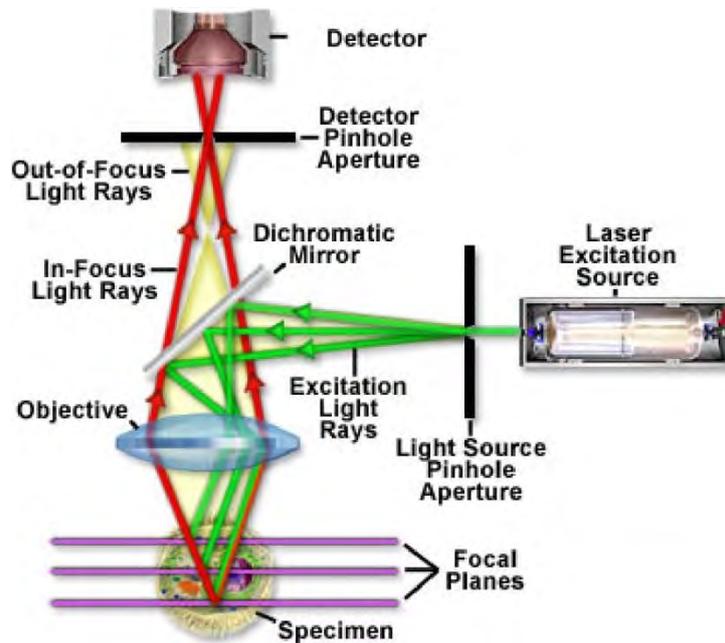


Figure 4: Principe de la microscopie confocale (Basil et al 2013)<sup>237</sup>.

ii- Les limites de la résolution optique par la diffraction:

#### *Le critère de Rayleigh*

La résolution est donnée par la PSF (Point Spread Function) dans le plan x-z, y-z et x-y. La PSF est une fonction d'étalement de point. Elle est définie dans trois dimensions (x-z, x-y et y-z) ce qui donne donc un volume. Sur un axe latéral, en 2D la PSF n'est pas un point mais une tache avec des disques concentriques (tache d'Airy). En 2D la PSF peut être rapprochée à la fonction gaussienne<sup>15</sup> suivante :

$$PSF(x, y) = \frac{I_0}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2}{2\sigma^2}\right)$$

Où  $I_0$  est l'intensité maximale,  $(x_0, y_0)$  représentent les coordonnées du centre et  $\sigma$  est l'écart-type.

La tache d'Airy décrit le meilleur point de lumière focalisée qu'une lentille parfaite peut donner avec une ouverture circulaire. En revanche ce meilleur point de lumière est limité par la diffraction puisque le disque d'Airy sera le meilleur spot qu'on obtiendra dans la limite de la diffraction de la lumière. On ne pourra pas collecter des images au-delà de la limite de la résolution du microscope. Deux disques d'Airy non distincts montrent une incapacité à pouvoir discriminer deux points rapprochés dans une image. Par contre deux disques parfaitement distincts donnent la résolution de l'image (Figure 5).

La résolution est la distance à laquelle deux points voisins peuvent être distingués individuellement. Selon le critère de Rayleigh, la résolution correspond à la distance entre les deux pics de disques d'Airy séparés par le premier minimum. Dans un milieu donné la résolution dépend de l'indice de réfraction de ce milieu et un disque d'Airy doit contenir un seul et unique point.

La formule pour déterminer la résolution d'un système optique est la suivante :

$$r(x, y) = 0.61 \frac{\lambda}{\eta \sin \alpha}$$

$\theta$  est l'angle qui va donner le premier minimum ;  $\alpha = \frac{\theta}{2}$  correspond à l'angle de diffraction ;  $\eta$  est l'indice de réfraction ;  $\lambda$  est la longueur d'onde d'excitation ;  $r$  est la résolution.

L'angle qui va donner le premier minimum à partir de l'ouverture est mesuré à partir de la direction de la lumière entrante et est donné par l'approximation suivante si on est dans l'air :

$$\sin \theta = 1,22 \frac{\lambda}{d}$$

$\theta$  est l'angle qui va donner le premier minimum ;  $d$  est le diamètre du disque d'Airy ;  $\lambda$  est la longueur d'onde d'excitation.

Dans le cas de la microscopie conventionnelle, la résolution est fixe et dépend de la longueur d'onde utilisée. Cependant des techniques ont été développées récemment pour dépasser cette limite et obtenir des meilleures résolutions pouvant atteindre l'échelle moléculaire.

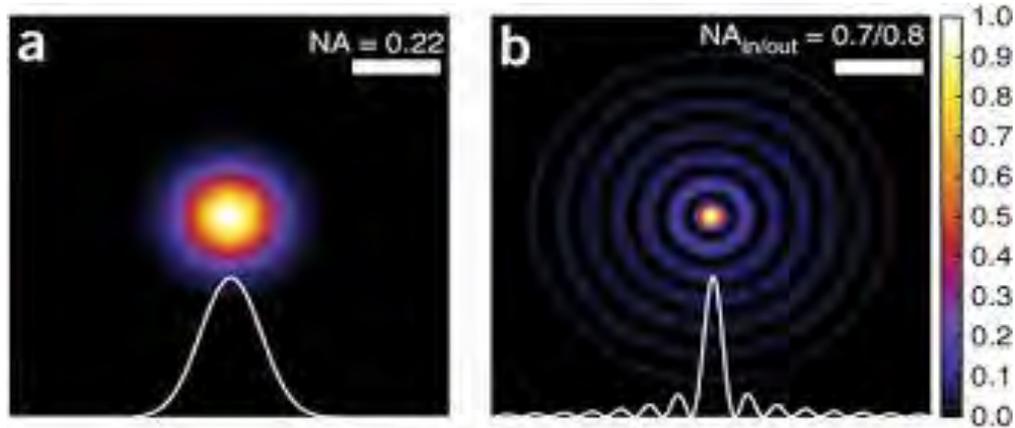


Figure 5: Représentation de la tache d'Airy  
<https://www.nature.com/nmeth/journal/v14/n4/full/nmeth.4224.html>

## 2. Développement des techniques de microscopie de super-résolution

La microscopie conventionnelle reste un outil de choix concernant l'étude des structures biologiques à l'échelle de la centaine de nanomètres. Elle reste, en revanche, limitée lorsqu'on veut étudier avec précision des structures à l'échelle moléculaire et macromoléculaire du fait de la diffraction. Dans un souci de pouvoir s'affranchir de cette barrière de diffraction et améliorer la précision de localisation, au début des années 2000, des techniques dites de super-résolution commencent à voir le jour. C'est le début d'une ère nouvelle qui permet de distinguer des structures au-delà de la résolution optique des microscopies photoniques. Théoriquement, elles permettent de distinguer deux fluorophores situés à une distance plus petite que 250nm pour la microscopie de champ large ou 170nm pour la microscopie confocale.

## a- La microscopie de STED

Le STED (Stimulated Emission Depletion) consiste à exciter l'échantillon avec le laser d'excitation puis à superposer l'émission de fluorescence simultanément avec un laser de déplétion qui va balayer l'échantillon afin d'éliminer la fluorescence à la périphérie de manière à former un « doughnut » avec une réminiscence de la fluorescence uniquement au centre du « doughnut ». Cette technique permet d'atteindre 50 nm de résolution latérale en moyenne, en réduisant la largeur de la PSF (Figure 6B). Bien que proposée dès 1994 par Hell et ses collègues<sup>2</sup>, cette technique commence à avoir un véritable succès qu'à partir des années 2000<sup>1,16</sup>. Quelques années plus tard la technique est étendue aux trois dimensions multicolores<sup>17</sup>.

Cette technique a ensuite évolué avec l'ajout du gain de la résolution dans les trois dimensions<sup>18,19</sup>. Le STED 3D permet de créer un « doughnut » dans l'axe latéral mais aussi dans l'axe axial donnant une meilleure résolution latérale et axiale comparée à une microscopie confocale conventionnelle. La résolution attendue avec le STED 3D est de 50nm en latéral et 130nm en axial. Cette résolution peut être améliorée théoriquement car elle dépend de la puissance de la déplétion.

## b- La microscopie à illumination structurée

Dans l'approche de microscopie à illumination structurée, la trajectoire de la lumière est similaire à celle de la microscopie de fluorescence à champ large. Une grille optique capable de mouvements est employée, créant des lignes parallèles qui sont projetées sur l'échantillon dans les directions latérale (xy) et axiale (z). Les images sont acquises pendant que les grilles sont en mouvement le long de l'axe des x par translation. Ensuite une rotation de la grille optique le long de l'axe y est appliquée avec des angles prédéterminés pour obtenir une amélioration isotropique de la résolution (Figure 6A). Des franges de Moiré sont créées par les

motifs de la grille et le signal provenant de l'échantillon. Ces franges sont ensuite transmises de l'objectif vers la caméra. Les images qui en résultent sont ensuite transférées dans l'espace de Fourier, ce qui va permettre la reconstruction des structures d'origine en enlevant les motifs de la grille optique des franges de Moiré, étant donné que ceux-ci constituent la partie connue dans le mélange, l'inconnue étant la structure de l'échantillon<sup>3,4</sup>. Pour obtenir une amélioration de la résolution en profondeur, la projection de la grille est également structurée le long de l'axe z. La section de résolution optique en profondeur est ainsi améliorée de deux fois, comparée à celle obtenue en microscopie à fluorescence conventionnelle. Ainsi les résolutions théoriques atteintes sont aux alentours de 120nm en latéral et 250nm en profondeur, en fonction de la longueur d'onde employée<sup>20</sup>.

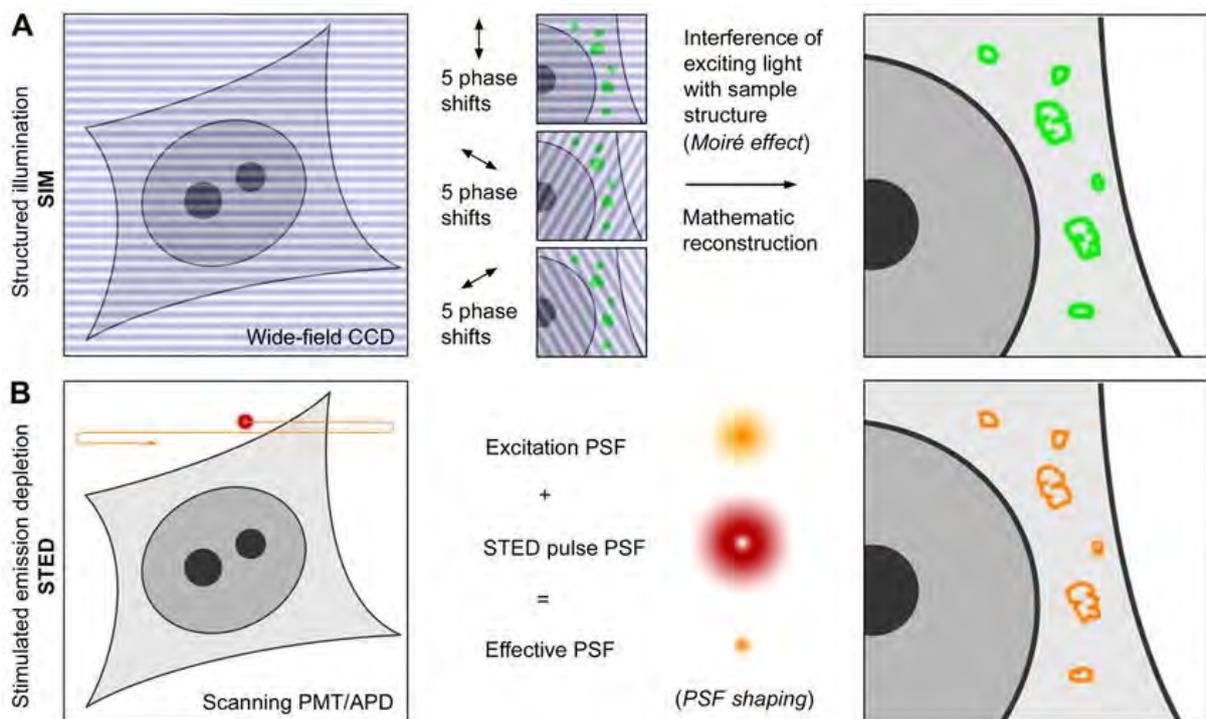


Figure 6 : Schéma représentant les principes des approches de microscopie de super-résolution SIM et STED<sup>21</sup>. (A) Principe de la microscopie d'illumination structurée. Le panel de gauche représente une image avec les motifs appliqués lors de l'acquisition. Le panel central montre les trois rotations de la grille et l'étape de reconstruction mathématique. Le panel de droite représente le schéma d'une image reconstruite en SIM. (B) Principe de la microscopie de STED. Le panel de gauche représente le balayage de l'échantillon par le laser à l'étape d'acquisition. Le panel central montre la forme de la PSF lorsque l'échantillon est illuminé simultanément avec le laser d'excitation et le laser de déplétion. Le panel de droite représente le schéma d'une image STED. (Schermelleh 2010)<sup>21</sup>

## c- La microscopie de localisation de molécules individuelles

### i- Le principe de la microscopie de BaLM

En 2004 une nouvelle technique de super-résolution appelée imagerie de molécule individuelle de haute résolution par photoblanchiment (« Single-molecule High-Resolution Imaging with photobleaching (SHRImP) ») a été mise en application par Gordon et ses collaborateurs. L'approche du SHRImP utilise les propriétés de photoblanchiment de sondes fluorescentes pour mesurer la distance entre deux sondes fluorescentes attachées aux deux extrémités d'une molécule d'ADN. Au cours de l'acquisition les sondes vont disparaître irréversiblement par photoblanchiment. Les molécules disparues vont être localisées avec une précision de 5nm et une distance de séparation des sondes de 10 à 20nm<sup>22</sup>.

Basée sur le principe de photoblanchiment, SHRImP a servi de base au développement de l'approche du BaLM en 2011. La microscopie de BaLM (Bleaching/blinking associated Localization Microscopy) est basée sur la localisation des molécules fluorescentes qui disparaissent par photoblanchiment<sup>7,23</sup>. Elle utilise les propriétés intrinsèques que possèdent la plupart des sondes fluorescentes communes (protéines fluorescentes ou fluorophores synthétiques couplés aux anticorps) à photoblanchir ou à apparaître par intermittence (photoblinking). Lors d'une acquisition BaLM une dizaine de milliers d'images est acquise en utilisant un microscope conventionnel (champ large, confocal ou TIRFM). Ensuite, chaque image est soustraite de l'image précédente afin d'obtenir les molécules individuelles. Ainsi, au fur et à mesure que l'intensité du signal disparaît au cours du temps, dans la pile d'images acquises, on isole individuellement chaque événement de photoblanchiment. A partir de la pile d'images contenant les points isolés, une image de plus haute résolution est reconstruite. Dans l'exemple montré dans la figure ci-dessous, les auteurs ont utilisé des cellules COS-7 dans lesquelles ils ont marqué l'alpha tubuline avec un anticorps couplé à l'Alexa Fluor 488 pour révéler les microtubules. Pour l'acquisition des images ils ont utilisé une camera EMCCD,

associée à des grossissements secondaires pour avoir une taille de pixel de 61nm. Pour démontrer que le BaLM fonctionne ils partent d'une image diffractée des microtubules (Figure 7A) et en zoomant dans une région de cette image (Figure 7B) on note clairement la limite à distinguer deux filaments lorsqu'ils sont très proches. Le panel C représente des molécules provenant d'une soustraction d'image pour détecter les intensités des points qui ont disparu (photoblanchiment)/apparu (photo-clignotement). Les intensités les plus fortes ont été définies comme les molécules individuelles si leur rayon était inférieur à 2,5 fois la déviation standard de la PSF de base (Figure 7E). Dans les panels D et F les graphiques représentent respectivement le nombre de photons émis et la précision de localisation obtenue après ajustement des PSF par une fonction gaussienne. Rappelons que ces deux paramètres sont très importants pour améliorer la résolution. Pour obtenir une image BaLM toutes les images de localisations (Figure 7G) ont été empilées pour former une image (Figure 7H). Enfin, le gain de résolution a été mis évidence en traçant une ligne localisée au même endroit sur l'image diffractée et sur l'image BaLM. Sur le graphique représentant l'intensité en fonction de la distance on peut clairement observer que la structure visualisée comme un seul filament dans l'image diffractée, correspond en réalité à deux filaments bien individualisés dans l'image BaLM<sup>7</sup>.

Ici les auteurs obtiennent bien un gain de résolution avec le BaLM puisqu'ils mettent en évidence des structures faisant une soixantaine de nanomètres, sachant qu'avec des approches d'imagerie conventionnelle nous sommes limités à 250 nm.

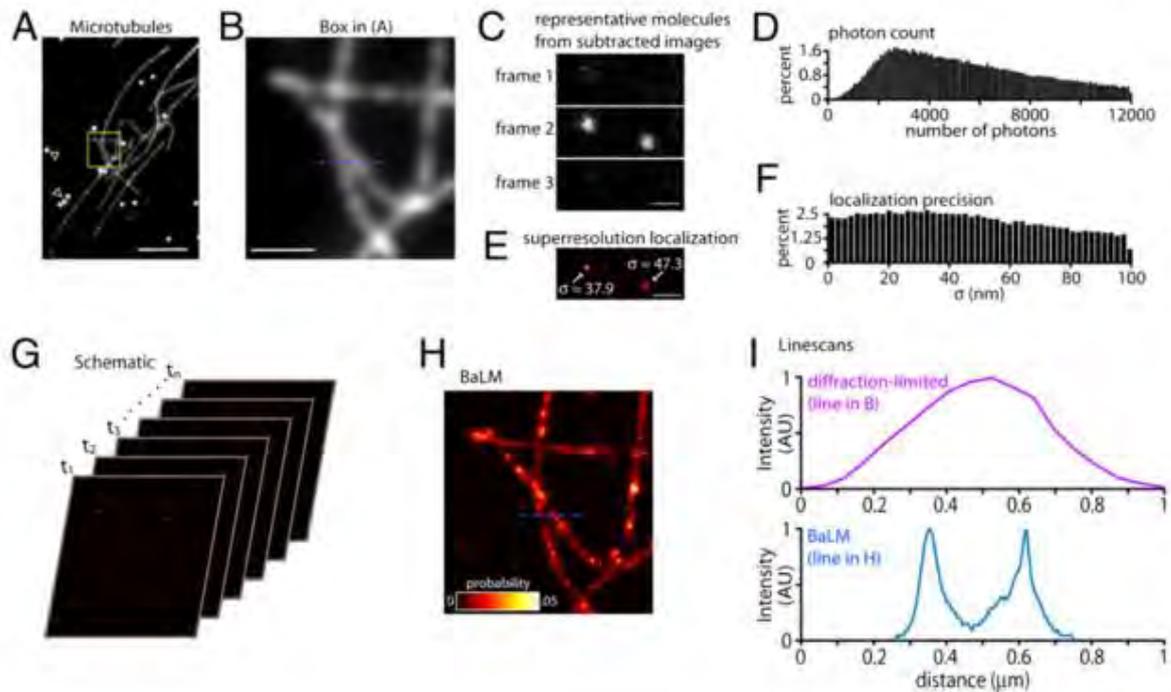


Figure 7 : Détection des molécules individuelles et reconstruction d'une image BaLM. (A) Image de microtubules limitée par la diffraction en TIRF par l'emploi d'anticorps secondaires couplés à l'Alexa Fluor 488. Les têtes de flèches montrent des billes utilisées pour le réaligement des images. (B) Image agrandie de la zone encadrée en jaune dans (A). (C) Trois images consécutives représentatives des séries d'images de soustraction de deux molécules avant et après photoblanchiment/photo-clignotement. (D) La distribution du nombre de photons émis par les molécules individuelles ( $n=15$  microtubules). (E) La localisation des deux molécules apparaissant dans l'image du milieu dans (C). (F) La distribution des localisations de précision des molécules détectées en BaLM. (G) Démonstration schématique montrant comment les molécules localisées à partir d'images différentes sont additionnées pour obtenir la reconstruction d'une image BaLM. (H) Représente la reconstruction d'une image BaLM des microtubules montrés en (B). (I) Représentation de l'intensité (normalisée à 1) à partir d'une ligne tracée sur l'image diffractée en (B) (tracé violet sur le graphique) et sur la reconstruction BaLM en H (tracé bleu sur le graphique). Barre d'échelle A :  $5 \mu\text{m}$ , B :  $1 \mu\text{m}$  C et E :  $0,6 \mu\text{m}$  (Burnett et al.2011)<sup>7</sup>.

## ii- Le principe de la microscopie de dSTORM

C'est en 2006 que Rust et ses collaborateurs ont développé le STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy). L'approche du STORM utilise des molécules fluorescentes synthétiques, telles que les Alexa Fluor et les Carbocyanines, couplées à des anticorps. Ces molécules sont employées par paire composée d'un activateur et d'un récepteur. Initialement la paire utilisée était la Cy3 ( $\lambda_{\text{exc}}:532$ ) comme activateur et la Cy5 ( $\lambda_{\text{exc}}:633$ ) comme récepteur. On illumine avec le laser permettant l'excitation de l'activateur et l'émission de l'activateur

permet l'excitation du récepteur. Une oscillation se produit entre l'émission de l'activateur et l'excitation du récepteur pendant plusieurs cycles<sup>8</sup>. L'approche du dSTORM (direct STORM) utilise une sonde fluorescente simple couplée à des anticorps et est basée sur la propriété que possèdent certaines sondes fluorescentes à osciller entre un état noir et un état d'émission de fluorescence<sup>6,9,24-29</sup>. Les molécules fluorescentes passent dans un état appelé Triplet correspondant à un état métastable de non fluorescence<sup>30</sup>. Le passage dans l'état Triplet nécessite une très forte puissance de laser de l'ordre du kilowatt par cm<sup>2</sup> et est facilité par la présence d'une faible quantité d'oxygène (Figure 8A). Cette capacité à permuter d'un état à un autre entraîne l'apparition de clignotements des molécules lorsqu'elles sont illuminées avec une très grande fréquence d'images par millisecondes. Plusieurs dizaines de milliers d'images des événements de clignotement sont acquises puis le centre de masse de chaque point apparaissant est localisé et consigné sous forme de coordonnées (x,y). Une même molécule fluorescente apparaît plusieurs fois au cours de l'acquisition avant de disparaître définitivement par photoblanchiment.

### iii- Le principe de la microscopie de PALM

L'approche du PALM (PhotoActivable Localization Microscopy)<sup>5</sup> a aussi été développée en 2006 par Betzig et ses collaborateurs et en parallèle par Hess et ses collaborateurs. La microscopie de PALM consiste à faire exprimer une protéine fluorescente. Cette protéine a pour particularité de pouvoir être photoactivée de manière séquentielle sur l'échantillon. Puis chaque centre de masse des molécules est localisé de manière individuelle et la PSF est affinée suivant une courbe gaussienne. Enfin une image avec une meilleure résolution est reconstruite (Figure 8B). Théoriquement, la localisation de chaque molécule peut se faire avec une précision de localisation pouvant aller en dessous de 10nm.

Cette approche est similaire au dSTORM. La seule différence réside dans l'utilisation de protéines ayant des propriétés de photoactivation ou de photoconversion. Le terme photoactivation désigne le passage d'une molécule d'un état de non-fluorescence à un état de fluorescence et la photoconversion est le passage d'une longueur d'onde d'émission de fluorescence à une autre.

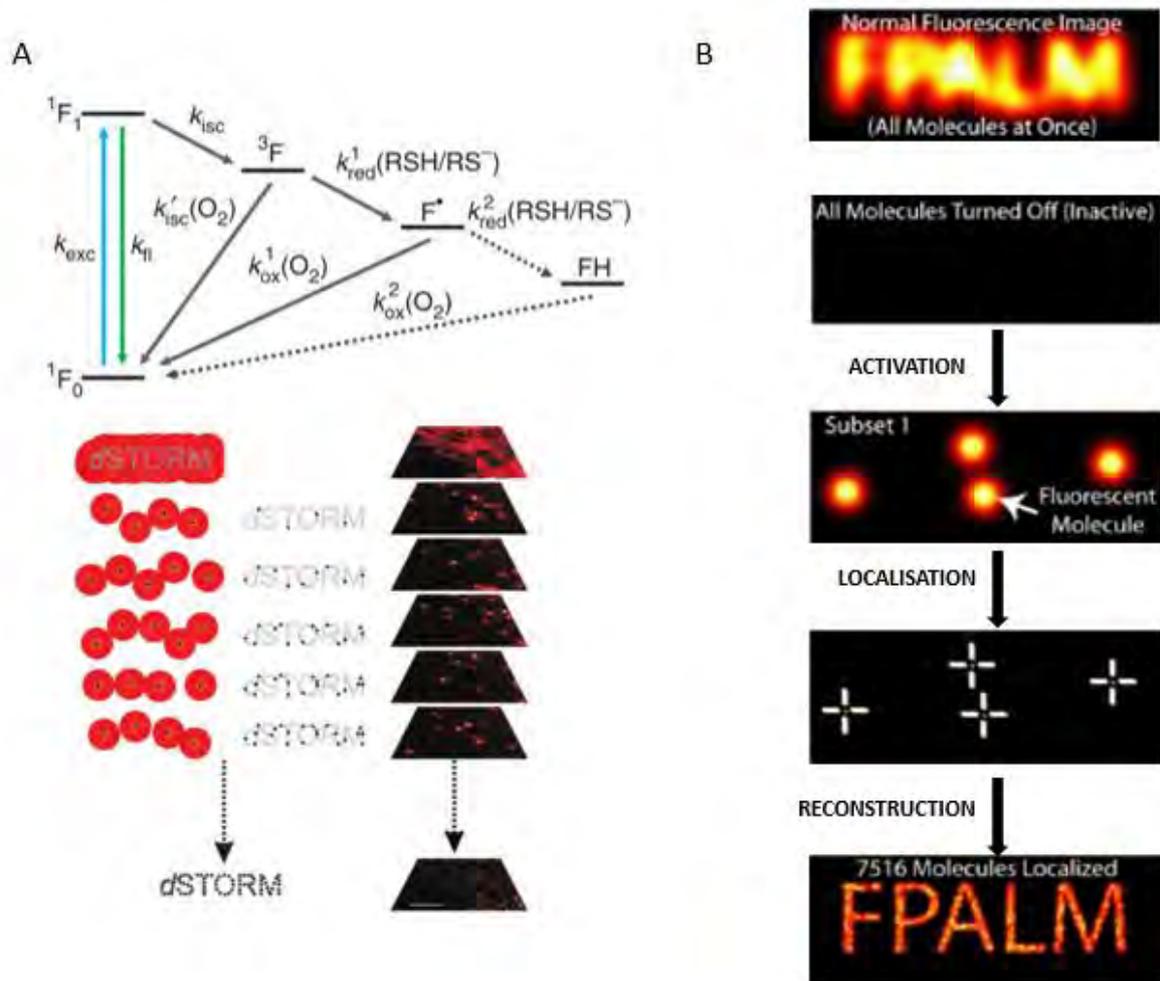


Figure 8: Principes du dSTORM et du PALM<sup>25</sup>. (A) Diagramme de Jablonski et principe d'acquisition du dSTORM (Van de Linde et al, 2011<sup>25</sup>). (B) Principe d'acquisition du PALM (Betzig et al, 2006)<sup>5</sup>.

### 3. Applications des techniques de super-résolution

Bien que très récentes, les techniques de super-résolution ont permis de comprendre de nombreux phénomènes biologiques dont la localisation et l'organisation de certaines protéines mais aussi la structure de certains organelles cytoplasmiques (Figure 9). Des techniques comme le SIM et le STED ont permis l'étude de structures comme le noyau et les pores nucléaires<sup>31</sup>. La très grande précision de localisation du PALM et du dSTORM a permis d'étudier l'organisation de certains organelles comme les lysosomes<sup>5</sup> ou des composés du complexe d'adhésion comme la Vinculin et l'alpha-actinine<sup>32</sup>. Le PALM/dSTORM possède un avantage considérable par rapport aux autres techniques de super-résolution (SIM et STED). Il s'agit de la possibilité de réaliser une illumination TIRF (Total Internal Reflexion Fluorescence) qui permet d'imager à la membrane des cellules et sur une épaisseur très fine (jusqu'à 200nm de profondeur). Ce mode d'illumination est basé sur l'inclinaison du laser d'excitation jusqu'à atteindre un angle critique, qui conduit à la création d'ondes évanescentes. Ainsi l'excitation des molécules se limitera à l'épaisseur de ces ondes d'évanescence<sup>33</sup>. Dans le domaine qui nous intéresse, l'immunologie, l'emploi des techniques de super-résolution commence à prendre place avec l'étude de l'organisation de certaines protéines membranaires comme le TCR à la synapse immunologique<sup>34</sup>. Cette étude à laquelle nous faisons référence, montre par une approche de microscopie de dSTORM que le TCR est organisé en clusters de taille nanométrique au centre de la synapse immunologique lorsque les lymphocytes T sont activés. Les précisions apportées par cette étude sur l'organisation et l'activation du TCR sont très importantes et nous ont permis de nous interroger sur l'organisation d'autres récepteurs à la synapse immunologique. En effet l'organisation précise d'autres récepteurs tels que les molécules d'adhésion à la synapse immunologique, dans le cadre des cellules T cytotoxiques, reste à étudier. Les approches de super-résolution constituent donc des outils forts intéressants pour l'étude en détails de ces molécules.

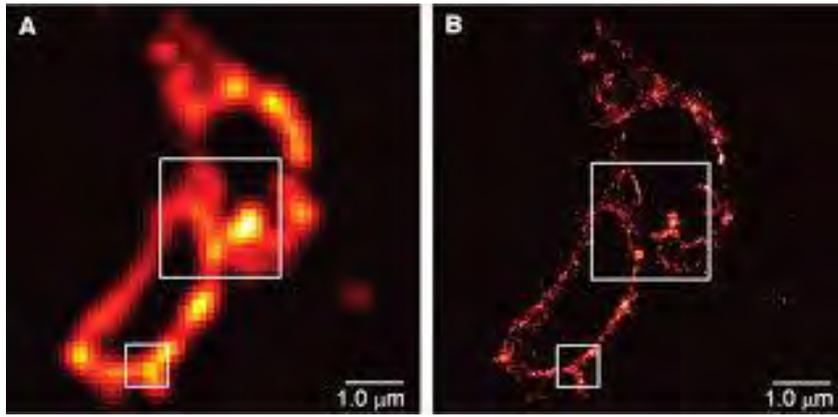


Figure 9: Comparaison d'une même cellule COS-7 exprimant la protéine lysosomale transmembranaire CD63 marquée par une protéine photoactivable : PA-FP kaede TIRF (A) et PALM (B) (Betzig et al.2006)<sup>5</sup>.

## **II. Rôle de l'intégrine LFA-1** dans les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

### **A. Les intégrines des leucocytes**

Il existe trois grandes familles d'intégrines connues dans les leucocytes : LFA-1, Mac-1 et P150, 95<sup>35-37</sup>. Ce sont des protéines d'adhésion majeures qui permettent aux leucocytes de s'accrocher sur les cellules endothéliales et de migrer au travers. Elles ont été identifiées à l'aide d'anticorps monoclonaux particuliers reconnaissant des classes particulières de leucocytes chez l'homme et chez la souris. Elles sont connues comme étant cruciales dans l'efficacité de la lutte contre les infections et leur absence privilégie les infections récurrentes. En effet les intégrines des leucocytes sont primordiales pour le recrutement des cellules immunitaires du sang vers les sites d'infections et pour la formation du contact avec les cellules présentatrices d'antigènes<sup>38,39</sup>. Mac-1 connue encore sous le nom d'OKM1 ou Mo-1 est exprimée majoritairement à la surface des macrophages, des cellules tueuses naturelles (NK : Natural Killer), des monocytes et des granulocytes, mais pas dans les lymphocytes T<sup>40</sup>. LFA-1 (CD11a/CD18 ou TA-1<sup>41</sup>) est requise pour les activités fonctionnelles et la migration des lymphocytes T et des NK<sup>40,42</sup>. LFA-1 et Mac-1 ont une distribution cellulaire distincte et n'ont pas de réaction croisée<sup>43</sup>. Il existe aussi d'autres intégrines appelées VLA et sont généralement exprimées dans les lymphocytes. Elles apparaissent tardivement après l'activation des lymphocytes (very late after activation). On dénombre jusqu'à 5 VLA différentes<sup>44</sup>. Dans le cadre de cette thèse uniquement LFA-1 a été étudiée. Dans les chapitres et paragraphes qui suivent nous nous focalisons donc sur LFA-1, sur son rôle dans les lymphocytes T et sur pourquoi elle est particulièrement importante dans les lymphocytes cytotoxiques. Un encart présentant les autres LFA précède le début du prochain paragraphe.

---

## Leukocyte Function-Associated

---

Les autres Leukocyte Function-Associated antigen<sup>35,42,45</sup>

Il existe trois LFA connues : LFA-1, LFA-2 et LFA-3. LFA-2 et LFA-3 semblent être spécifiques aux fonctions des lymphocytes T. LFA-3 ou CD58 est exprimée à la surface des cellules présentatrices d'antigènes ou à la surface des macrophages. Elle se lie à son ligand CD2 exprimée sur les lymphocytes T et sur les cellules tueuses naturelles (NK). D'autre part les anticorps anti-LFA-1 et anti-LFA-2 inhiberaient les activités des leucocytes en se liant aux cellules effectrices tandis que les anticorps anti-LFA-3 se lieraient aux cellules cibles pour inhiber la fonction cytotoxique. Ainsi les autres LFA sont requises pour la liaison avec les cellules cibles mais ne sont pas toutes exprimées dans les cellules effectrices. Cependant l'inhibition seule de la protéine LFA-1 suffit à induire des défauts fonctionnels dans les cellules<sup>46</sup>.

---

### B. LFA-1 est une molécule importante dans la naissance des lymphocytes T

Le rôle du système immunitaire est de défendre notre organisme contre l'intrusion de corps étrangers. Ce processus se fait grâce à la capacité des cellules immunitaires à distinguer le soi du non-soi. Dans la réponse immunitaire trois types de cellules sont connus comme participant activement à l'élimination des pathogènes: les lymphocytes, les cellules NK et les macrophages. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux lymphocytes T cytotoxiques, impliqués particulièrement dans la réponse immunitaire adaptative. Cette réponse contrairement à la réponse innée est plus spécifique et plus efficace dans l'élimination des cellules infectées (virus, bactéries ou parasites) ou tumorales. En effet ces cellules sont capables de reconnaître de

manière spécifique des antigènes grâce à leur TCR (T Cell Receptor). Environ 95% des lymphocytes T expriment un TCR composé d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ , les autres exprimant une chaîne  $\gamma$  et une chaîne  $\delta$ . Dans le cadre de notre étude nous décrirons seulement les lymphocytes T exprimant le TCR $_{\alpha\beta}$ . Il est important de noter que les lymphocytes T résultent d'un processus de différenciation et de maturation à partir de progéniteurs lymphoïdes. Toutes ces étapes vont avoir lieu dans le thymus<sup>47</sup> et requiert l'expression de LFA-1<sup>48</sup>. Nous allons brièvement décrire ce processus car il nous sera important pour comprendre en quoi les lymphocytes T sont des cellules essentielles dans notre système immunitaire.

### 1. Du progéniteur lymphoïde commun à un lymphocyte T spécifique : étape sous le contrôle de LFA-1

Les lymphocytes T dérivent de progéniteurs lymphoïdes communs et sont caractérisés par le TCR et son corécepteur CD3 (Cluster of Differentiation 3) en association avec deux autres corécepteurs CD4 ou CD8. En effet le complexe TCR/CD3 est propre aux lymphocytes T et permet une reconnaissance des peptides antigéniques spécifiques présentés par le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité). Ce mécanisme de reconnaissance est important et assure une réaction spécifique des lymphocytes T contre les peptides du non-soi et minimise la réaction contre des peptides du soi.

#### a- Entrée des progéniteurs lymphoïdes dans le thymus

Les progéniteurs lymphoïdes quittent la moelle osseuse pour aller vers le thymus via la circulation sanguine grâce au chimiotactisme. Ils vont entrer dans le thymus par extravasation à travers les vaisseaux sanguins situés proche des zones cortico-médullaires thymiques<sup>49</sup>. Ce processus est sous le contrôle de certaines chimiokines capables d'activer les intégrines à la surface des cellules lymphoïdes (LFA-1, les intégrines  $\alpha_4$ ) afin de permettre l'accrochage puis l'extravasation au niveau des cellules endothéliales qui expriment leur ligand (ICAM-1 et V-

CAM-1)<sup>37,49-51</sup>. Les thymocytes au sein du thymus vont migrer d'une région à une autre du thymus afin d'y subir les différentes stades de différenciation et l'engagement vers la lignée lymphocytaire T est stimulé par le récepteur Notch1. En effet l'environnement constitué par les cellules stromales thymiques est propice au développement des lymphocytes T en favorisant la prolifération et l'acquisition de certains marqueurs (CD3) et interleukines (IL-7). A ce stade les progéniteurs sont dits doubles négatifs. Autrement dit, ils ne possèdent ni CD4 ni CD8 (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>). Ensuite, dès que la prolifération est terminée, les thymocytes sont capables d'exprimer les gènes RAG1 et RAG2 nécessaires au réarrangement des gènes codant les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR<sup>47,49,52</sup>.

## 2. Expression du pré-TCR

A partir des progéniteurs doubles négatifs il va y avoir un réarrangement de l'ADN au niveau des locus codant la chaîne  $\beta$  car produit en premier. Puis la chaîne  $\beta$  s'associe à pT $\alpha$  (chaîne  $\alpha$  de substitution) et avec CD3 pour former le pré-TCR. Cette association conduit à la prolifération de thymocytes double positifs (DP) pré-TCR<sup>+</sup>, c'est-à-dire qu'ils possèdent un préTCR<sup>+</sup>, et sont CD8<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. Le réarrangement génétique du locus de la chaîne  $\alpha$  du TCR se fait au stade DP et les cellules expriment ainsi le TCR néosynthétisé<sup>53</sup>.

## 3. Education des thymocytes DP TCR<sup>+</sup>

Une fois le TCR exprimé à la membrane des cellules celui-ci va subir un contrôle de qualité à travers deux sélections : positive et négative. Elles ont pour but de garder les TCR capables de reconnaître un antigène présenté par les CMH de l'individu (sélection positive) puis d'éliminer les TCR ayant une très forte affinité avec les antigènes du soi (sélection négative).

## C. Différenciation des thymocytes en lymphocytes T CD4 ou CD8

Le réarrangement génétique conduisant à l'expression du TCR a pour but de produire des lymphocytes T possédant des TCR différents. Cependant, ces TCR doivent répondre à certaines exigences, à savoir : 1) être capables de transmettre un signal au lymphocyte ; 2) pouvoir reconnaître les molécules du CMH de l'organisme qui leur présentent les antigènes ; 3) ne pas être spécifiques des composants du soi.

Tous les thymocytes qui satisfont ces conditions vont être sélectionnés positivement, les autres subissent une mort par apoptose (Figure 10). Par conséquent, les thymocytes DP vont perdre un marqueur et devenir des simples positives (SP) CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. La reconnaissance du TCR des molécules de classe I ou II du CMH est déterminante dans la conservation de l'un ou l'autre marqueur (CD8 ou CD4). Les lymphocytes CD8<sup>+</sup> reconnaissent généralement des molécules présentées par le CMH de classe I et les lymphocytes CD4<sup>+</sup> reconnaissent CMH de classe II<sup>54,55</sup> (Figure 10). Les lymphocytes T ainsi différenciés vont sortir du thymus pour aller se loger dans les organes lymphoïdes primaires. Toutefois, cette sortie nécessite, en plus de la molécule d'adhésion LFA-1, un remodelage actif du cytosquelette d'actine<sup>56</sup>.

En effet une protéine de la famille des Formins : mDia1 habituellement connues pour participer à la nucléation du cytosquelette d'actine est impliquée dans le trafic des lymphocytes T. Une étude menée en 2007 montre que l'absence de la protéine mDia1 induit une diminution des lymphocytes T puisque les cellules mDia1 déficientes perdaient la capacité de nucléation de l'actine, de polarisation, de migration et d'une réponse immunitaire efficace<sup>56</sup>.

Une autre protéine impliquée dans la régulation de la polymérisation de l'actine, la Coronin 1A a été reportée comme primordiale dans la migration des thymocytes et des lymphocytes T. Elle est impliquée dans l'inhibition du complexe Arp2/3 en charge de la polymérisation de l'actine.

Une déficience de cette protéine régulatrice entraîne une diminution de la migration et une augmentation de la mort cellulaire car l'actine est hyper-polymérisée<sup>57,58</sup>.

Nous verrons dans les chapitres suivants les protéines qui sont impliquées dans le remodelage de la structure d'actine.

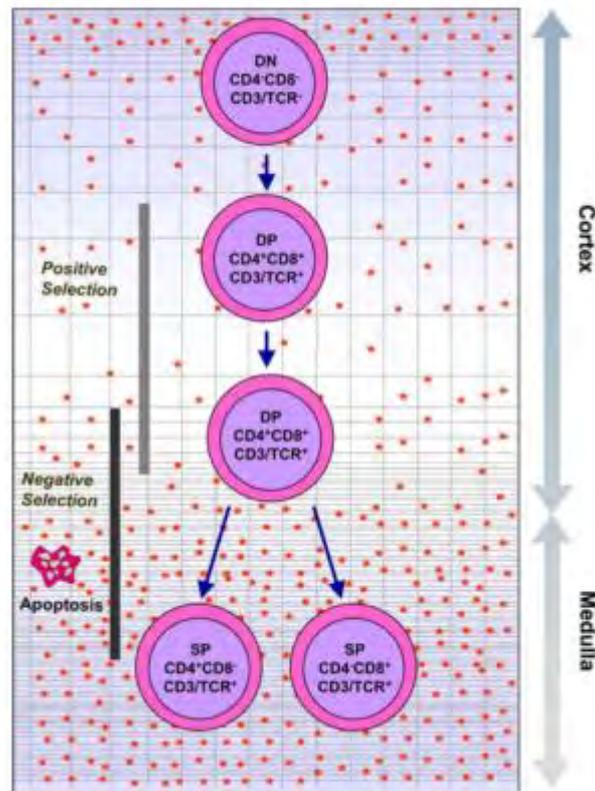


Figure 10: Schéma de la différenciation des lymphocytes T (Savino 2006)<sup>55</sup>

### 1. L'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>: naissance de cellules tueuses professionnelles cytotoxiques

Nous venons juste de voir que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont des lymphocytes T qui expriment un corécepteur CD8 en plus du complexe TCR/CD3 suite aux différentes étapes de sélection opérées dans le thymus. Ces lymphocytes T sont dits naïfs car n'ayant jamais rencontré d'antigènes et circulent dans les organes lymphoïdes périphériques et dans le sang. Ils sont capables de reconnaître des peptides antigéniques présentés par le CMH de classe I d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA). Lorsque le lymphocyte T CD8<sup>+</sup> naïf rencontre un

peptide antigénique présenté à la surface d'une CPA, il ralentit sa course et s'arrête. L'activation du TCR induit la formation d'un contact très ferme, médié par LFA-1, entre le lymphocyte T CD8<sup>+</sup> et la CPA. La zone de contact constitue une structure particulière appelée la synapse immunologique<sup>59-61</sup>. Une prolifération clonale rapide et une différenciation effectrice s'opèrent, suite à l'activation. Sous les 4 à 5 jours qui suivent, les cellules clonales se chargent en granules cytotoxiques spécifiques contenant de la perforine et des granzymes<sup>62</sup>. En effet une étude réalisée en 1997 nous montre que les CD8<sup>+</sup> effecteurs expriment un taux plus élevé des gènes codant pour la perforine et le granzyme B mais aussi pour le ligand FasL, transformant ainsi les CD8<sup>+</sup>, en CD8<sup>+</sup> cytotoxiques spécifiques et hautement chargés<sup>63</sup>. Une autre étude réalisée en 2011 a d'ailleurs montré qu'à la synapse immunologique le chargement des granules lytiques (perforine, granzymes A et B) se faisait progressivement à l'intérieur des lysosomes LAMP1<sup>+</sup><sup>64</sup>. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> deviennent ainsi des CTL (cytotoxic T lymphocytes) c'est à dire des cellules armées de la réponse immunitaire adaptative capables d'éliminer toute cellule infectée ou tumorale.

Nous discuterons plus en détail du rôle de la synapse cytotoxique dans le chapitre III.

## 2. Activation des lymphocytes T CD4 : coopération cellulaire avec les lymphocytes T CD8

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs sont capables d'activer les lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes B et les macrophages d'où le nom de lymphocytes Th (Lymphocytes T CD4<sup>+</sup> helper ou T auxiliaires). Ils ont pour fonction d'activer les autres lymphocytes en sécrétant des substances solubles appelées cytokines.

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs sont capables de reconnaître des peptides du CMH II d'une CPA via son TCR. Le contact formé entre les deux cellules constitue la synapse immunologique et aboutit à l'activation du lymphocyte T CD4<sup>+</sup> naïf. Le lymphocyte activé va ensuite se multiplier

et donner des clones composés de plusieurs milliers de cellules identiques. Ces clones expriment au niveau de leur membrane le récepteur à l'IL-2. La production de l'IL-2 fait suite à l'activation du lymphocyte. L'IL-2 est nécessaire pour l'entrée dans le cycle cellulaire et la multiplication des lymphocytes T clonaux. Le signal transduit, induit l'expression de nouvelles protéines qui attribuent de nouvelles fonctions au lymphocyte T CD4<sup>+</sup>. Ce dernier se différencie en cellule effectrice. Cette différenciation est sous le contrôle de la nature du signal fournit par les cytokines sécrétées par la CPA et conduit à l'émergence de lymphocytes T effecteurs de type Th1, Th2, Th17.

Les lymphocytes Th1 sont produits pour répondre contre des micro-organismes intracellulaires. Leur différenciation est modulée par les cytokines IL-12 et IFN- $\gamma$  (Interféron  $\gamma$ ). Les lymphocytes Th2 sont produits lors de réponse humorale en réponse aux micro-organismes extracellulaires comme les vers. Leur différenciation est induite par l'IL-4<sup>65</sup>. Les lymphocytes Th17 sont produits en réponse aux agressions des muqueuses par les bactéries ou champignons. Leur différenciation est modulée par les cytokines IL-6, TGF- $\beta$  (facteur de croissance transformant), IL-23 et IL-21.

La reconnaissance des peptides antigéniques présentés par le CMH est primordiale dans la capacité des CTL à éliminer les cellules infectées ou tumorales. La formation d'un conjugué entre CTL et CPA est la conséquence de l'activation du TCR. Néanmoins, il arrive que la réponse immunitaire échoue soit par élimination des cellules saines du soi: réponse auto-immune, soit par la difficulté à éliminer des cellules infectées ou tumorales: immunodéficiences. Dans ces travaux de thèse nous allons voir comment la qualité d'activation d'une molécule d'adhésion cellulaire contrôle la qualité d'élimination des cellules cibles dans le cadre d'un syndrome d'immunodéficiences appelé le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS).

## D. La molécule d'adhésion de LFA-1 : un système clef-serrure de choix contrôlé vers un ancrage de qualité

Dans notre étude nous avons mis le focus sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. De nombreux travaux datant des années 80 nous révèlent que LFA-1 est étroitement impliquée dans la réponse immunitaire et que son absence conduit à des infections bactériennes récurrentes chez des patients LFA-1 déficients<sup>66-68</sup>. Son expression à la surface des cellules est requise pour le développement des progéniteurs lymphoïdes, le recrutement des leucocytes vers les sites d'inflammation, l'entrée et la sortie dans les ganglions lymphatiques, la migration et l'élimination des cellules infectées<sup>61</sup>. Le maintien intact de la molécule de LFA-1 a été étudiée comme étant primordial dans le homing, dans la réponse allergique<sup>69</sup> et dans la sortie des lymphocytes T des ganglions lymphatiques<sup>70</sup>. Nous allons voir dans les paragraphes qui suivent comment se présente la molécule de LFA-1, comment elle interagit dans le contexte de la formation de la synapse mais aussi quelles sont les signaux de transduction nécessaires à son activité.

### 1. Description de LFA-1

LFA-1 est une molécule d'adhésion impliquée dans l'adhérence ferme des cellules. Elle est exprimée à la surface des leucocytes et dans la plupart des cellules des tissus lymphoïdes<sup>71</sup>. Elle a été décrite comme s'exprimant majoritairement dans les lymphocytes T et B mais avec une expression 3,5 fois plus élevée dans les lymphocytes T<sup>72</sup>.

En tant que protéine transmembranaire, LFA-1 est constituée d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique ce qui lui permet une communication avec l'environnement extracellulaire et intracellulaire<sup>73</sup>. C'est une molécule formée d'une association hétérodimérique entre deux sous-unités CD11a ( $\alpha$ L) et CD18 ( $\beta$ 2)<sup>40,74</sup>.

La distinction de LFA-1 des autres intégrines réside sur la similarité entre les sous unités. Les intégrines des leucocytes sont dans leur majorité des intégrines  $\beta 2$  c'est-à-dire qu'elles portent toutes une sous-unité  $\beta$  identique. Par contre leur sous-unité  $\alpha$  est différente d'une intégrine à l'autre<sup>40,43,71</sup>. Nous allons voir en quoi cette distinction est importante ainsi que le rôle de chaque sous-unité de LFA-1.

#### a- La sous-unité $\alpha L$ ou CD11a

LFA-1 se distingue des autres intégrines par sa sous-unité  $\alpha$ . Celle-ci est composée de trois domaines distincts : extracellulaire, transmembranaire et intracytoplasmique.

**La partie extracellulaire** de la sous-unité  $\alpha$  possède un site de liaison aux cations divalents appelé MIDAS (metal ion-dependent adhesion site)<sup>75-78</sup>. MIDAS est un site localisé au I domaine pouvant loger des cations  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ . La présence de cations dans ce site est suffisante pour induire un changement de conformation de LFA-1 favorisant la liaison avec son ligand. Donc la liaison de cations au site MIDAS régule l'interaction entre LFA-1 et son ligand. C'est la raison pour laquelle, la plupart des inhibiteurs allostériques ou anticorps bloquant la liaison entre LFA-1 et son ligand visent essentiellement le site MIDAS<sup>79,80</sup>. Naturellement, on peut se demander si en plus d'être important pour la liaison au ligand, le I domaine serait crucial à l'expression de la sous-unité  $\alpha L$ . Une étude a démontré que l'absence du I domaine n'a pas d'effet sur l'expression de la sous-unité alpha, par contre elle restreint toute liaison avec un ligand<sup>81</sup>. Une autre question serait comment LFA-1 se partage le I domaine entre ICAM-1 et les autres ICAMs. Autrement dit, est-ce qu'ils lient tous le même site du I domaine. Il a été reporté que chaque I domaine possédait un site différent pour chaque ligand. Bien que les sites dans le I domaine se chevauchent, ils se distinguent les uns des autres. De ce fait, même si les différents ligands sont stimulés par les mêmes conditions, LFA-1 les lie sélectivement<sup>82-84</sup>.

Enfin une récente étude montre que le I domaine existerait sous trois états (conformations) qui vont réguler le processus de liaison pour la fonction physiologique de LFA-1<sup>85</sup>.

**Le domaine intracytoplasmique** de  $\alpha$ L est composé d'une séquence d'acides aminés hautement conservée, KXGFFKR (lysine-x-glycine-phenylalanine-phenylalanine-lysine-arginine)<sup>86</sup>. Cette séquence est très importante dans la stabilité de l'adhésion car elle est requise dans la séparation entre la sous-unité  $\alpha$ L et la sous-unité  $\beta$ 2 lorsque LFA-1 est activée<sup>87-90</sup>. En effet, le changement de conformation lors de l'activation de LFA-1 provoque une séparation des sous-unités  $\alpha$ L et  $\beta$ 2 à leur portion intracytoplasmique<sup>91</sup>. Plus clairement KXGFFKR se lie à la calréticuline, une protéine de 60kDa. Cette liaison permet de stabiliser l'adhésion. Le défaut de calréticuline a été démontré comme inhibant la liaison des cellules<sup>89,92-94</sup>. Finalement, bien qu'importante pour l'adhésion, la partie intracytoplasmique de CD11a n'est pas nécessaire pour l'interaction de l'intégrine avec le cytosquelette d'actine. Seule la sous-unité  $\beta$ 2 interagit avec les protéines du cytosquelette d'actine mais cela n'empêche pas la nécessité d'avoir la sous-unité  $\alpha$ L intacte pour avoir une bonne adhésion.

#### b- La sous-unité $\beta$ 2 ou CD18

La sous-unité  $\beta$ 2 de LFA-1 est constituée d'un domaine extracellulaire, transmembranaire et intracytoplasmique.

**La région extracellulaire** de la sous-unité  $\beta$ 2 possède elle aussi un site de liaison aux cations divalents, MIDAS<sup>95</sup>. Des mutations sur la sous-unité  $\beta$ 2 entraînent une perte partielle ou complète dans l'association avec la sous-unité  $\alpha$ .

**La portion intracytoplasmique** est constituée d'un motif NPXY/F qui interagit avec le cytosquelette d'actine via de nombreuses protéines d'adhésions<sup>91,92</sup>. Le rôle de cette sous-unité a été mis en évidence chez des patients présentant un défaut d'adhérence des leucocytes. Les auteurs de cette étude ont montré que l'absence de la sous-unité  $\beta$ 2 était à l'origine de ces

défauts d'adhérence<sup>96</sup>. On peut donc en déduire l'importance de la liaison avec les partenaires intracytoplasmiques dans l'adhérence des cellules immunitaires.

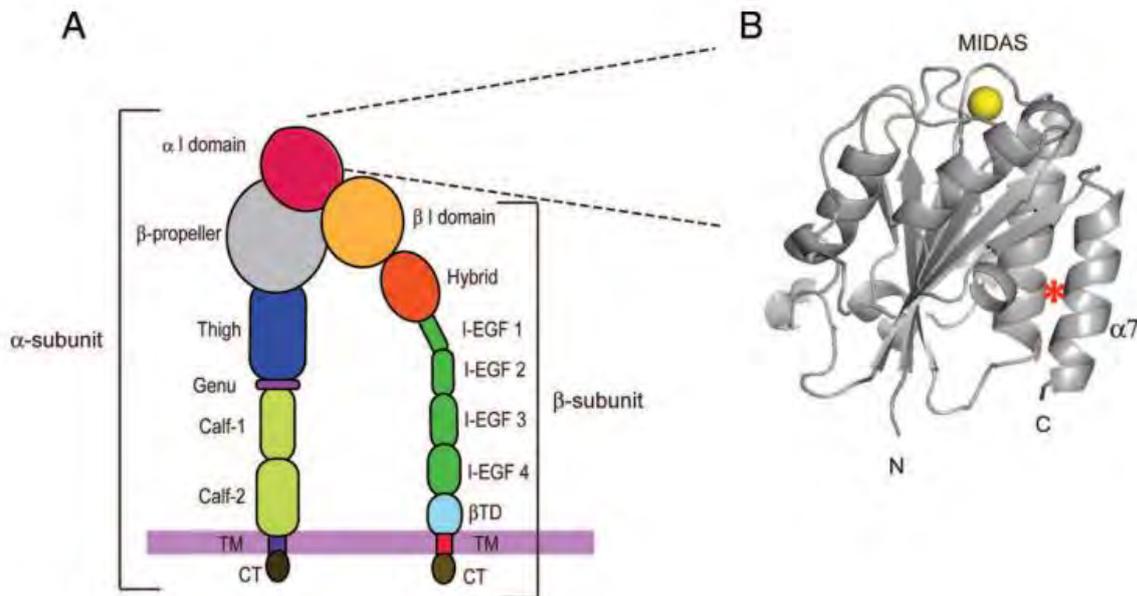


Figure 11: Les différentes sous-unités de LFA-1. (A) les différents domaines des sous-unités alpha et beta. La barre violette verticale représente la membrane plasmique. (B) Une vue de côté de la structure du I domaine de LFA-1. Un ion de  $Mg^{2+}$  dans le MIDAS est représenté par une sphère jaune (Yuki et al.2010)<sup>97</sup>

## 2. ICAM-1 : le principal ligand de LFA-1

LFA-1 peut se lier à différents ligands par les nombreux sites présents au I domaine: ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, ICAM-5 et JAM-1 dans les contextes de migration et de synapse immunologique<sup>82,98-101</sup>. Dans le cadre de cette thèse seule l'interaction LFA-1 et ICAM-1 a été étudiée, les caractéristiques des autres ICAM ne seront donc pas décrites.

ICAM-1 (CD54) est une glycoprotéine transmembranaire. Elle est exprimée à la surface des leucocytes et des cellules endothéliales. C'est le ligand requis pour LFA-1 lors de l'interaction entre les cellules immunitaires et leurs partenaires cellulaires (cellules endothéliales, cellules dendritiques ou cellules présentatrices d'antigènes...) ou entre les cellules immunitaires et les tissus environnants<sup>102-106</sup>. Des études ont montré que l'emploi de drogues ou d'anticorps

(TS1/22) qui se lie au I domaine (domaine contenant le site de liaison d'ICAM-1) inhibait la liaison avec LFA-1. En conséquence la liaison des lymphocytes T était modifiée<sup>107</sup>.

Le contact entre les cellules immunitaires sera décrit dans le chapitre qui suit.

Comme nous venons de le voir, le maintien de l'intégrité des sous-unités de LFA-1 est primordial pour la liaison au ligand et le site MIDAS joue un rôle très important dans cette liaison. Cependant le résultat d'une adhérence ne se résume pas à la simple liaison entre LFA-1 et ICAM-1 mais requiert un lien physique avec des partenaires intracytoplasmiques. De nombreuses études antérieures ont reporté l'importance de ces partenaires intracytoplasmiques dans ce qu'on appelle, des zones d'adhésion focales dans les cellules COS. Grâce à la microscopie de super-résolution on sait maintenant comment sont organisées la plupart des protéines qui interagissent avec les intégrines<sup>108</sup>. En revanche, les études de LFA-1 et de ses partenaires intracytoplasmiques avec les mêmes précisions dans les lymphocytes T restent à définir.

### 3. Activation de LFA-1 : interaction LFA-1/ICAM-1

Les leucocytes circulant dans le sang ont leurs intégrines LFA-1 inactives, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas liées à leurs ligands. La liaison des récepteurs aux chimiokines induit l'activation des intégrines. Ce mécanisme entraîne un ralentissement puis un arrêt des leucocytes lors de l'interaction avec les cellules de l'endothélium, leur permettant ainsi, de le traverser et de rejoindre un site d'inflammation.

L'activation de LFA-1 est caractérisée par l'affinité avec son ligand ICAM-1 et par l'avidité. L'affinité peut être définie comme la capacité d'un ligand à se fixer au récepteur en fonction du nombre de molécules présentes. Cette association est déterminée par la vitesse de fixation des ligands aux récepteurs et dépend de la concentration. Toutes les cellules n'expriment pas le

même nombre de LFA-1. Une étude menée en 2014 par Chakraborty et ses collègues par la technique de FRET dans une solution, a permis de déterminer la concentration d'ICAM pour lier 50% des LFA-1 (constante de dissociation). Les auteurs ont utilisé une protéine recombinante LFA-1 conjuguée à l'Alexa Fluor 488 en tant que donneur et un hICAM-1-D1-D2-Fc conjugué à l'Alexa Fluor 555 en tant qu'accepteur dans une solution. Le FRET a lieu lorsque LFA-1 et ICAM-1 sont liés. La constante de dissociation mesurée est de  $17.9361 \pm 34 \text{ nM}^{109}$ , autrement dit, c'est la concentration en ICAM-1 requise pour lier 50% des LFA-1 présentes dans la solution. L'autre terme caractérisant l'activation de LFA-1 est l'avidité. C'est un phénomène induit par une agrégation des molécules de LFA-1, augmentant ainsi, la probabilité d'interaction entre ICAM-1 et LFA-1 et par là même la force de l'adhésion<sup>82,110,111</sup>. L'affinité de cette liaison varie en fonction de l'état d'ouverture de la molécule de LFA-1. Trois états principaux de conformation ont été décrits: état d'affinité faible, intermédiaire et haute. Lorsque l'intégrine est inactive, elle est repliée sur elle-même ce qui rend l'accès au I domaine difficile et réduit ainsi la possibilité de fixation du ligand (panel de gauche, Figure 12). La forme intermédiaire étendue représente une affinité intermédiaire avec le ligand (panel du milieu, Figure 12). Enfin, la forme étendue ouverte correspond à une forme de haute affinité avec le ligand (panel de droite, Figure 12). Ces différents états de conformation de LFA-1 peuvent être révélés par l'emploi d'anticorps capables de reconnaître spécifiquement chaque forme comme indiqué sur le Figure 12 (mAb HI111, mAb KIM127, mAb 24, respectivement)<sup>80,99,112-118</sup>.

Dans ce paragraphe nous nous sommes efforcés de décrire ce qui caractérise l'état d'activation de LFA-1. Hors il serait très important de comprendre quels stimuli présents dans l'organisme sont capables de moduler l'activation de la molécule de LFA-1. Deux processus de signalisation ont été décrits comme voies d'induction de changement de conformation de LFA-1: la signalisation Inside-out et la signalisation Outside-In.

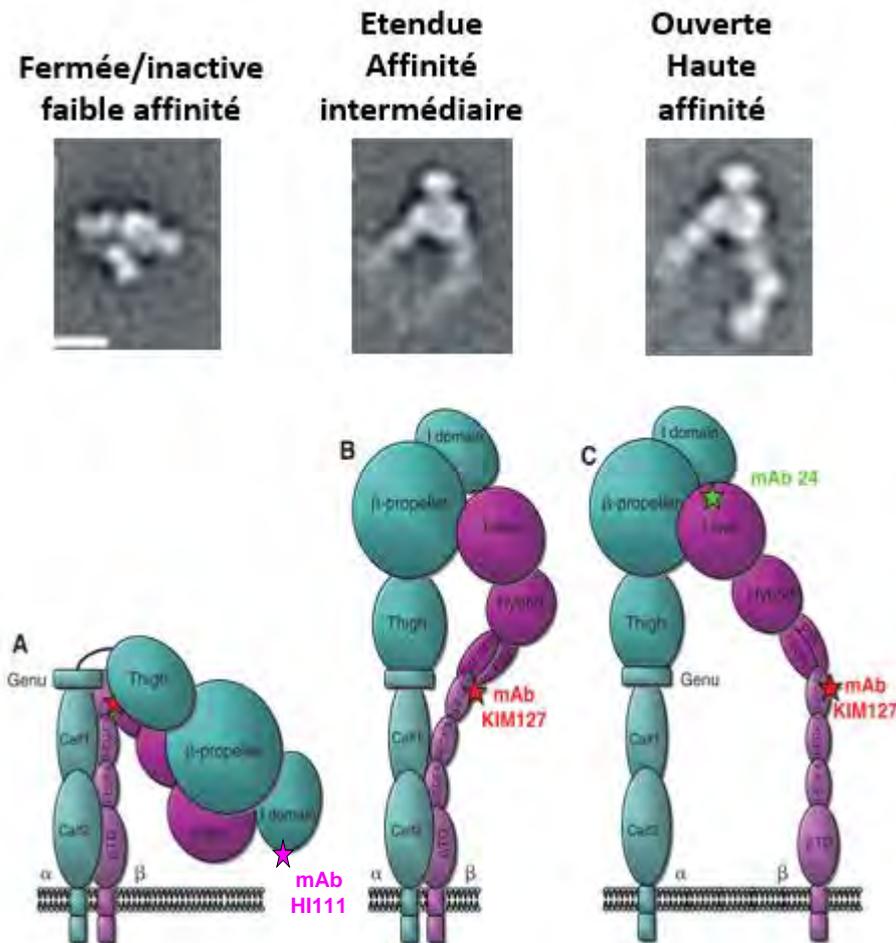


Figure 12: Les différentes conformations de la molécule de LFA-1, révélées par microscopie de transmission électronique (Adapté de Nishida et al.2006 et Evans et al.2009)<sup>112,193</sup>.

#### a- Inside-out signalling

Dans ce processus d'activation, les signaux qui modulent l'activité de LFA-1 sont intracellulaires. Ces signaux transmis de l'intérieur de la cellule résultent de la stimulation ou de l'activation d'autres récepteurs (TCR ou récepteurs aux chimiokines). La cascade de signalisation en aval de ces récepteurs activés induit le recrutement de protéines de signalisation et de protéines associées au cytosquelette d'actine à la portion intracytoplasmique des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de LFA-1<sup>119</sup>. La signalisation « inside-out » est soit induite par des chimiokines, des cytokines, ou des agents chemoattractants pour initier une migration ou une transmigration,

soit enclenchée par les événements qui s'opèrent lors de la formation de la synapse par l'intermédiaire du TCR<sup>120-122</sup>. Ces deux signaux, bien que différents aboutissent au même résultat, à savoir l'activation de LFA-1. On peut donc se demander si les événements déclenchés en aval pour chaque voie de signalisation et leur degré d'activation de LFA-1 sont comparables. Effectivement, comme illustré sur le schéma de la Figure 13, l'activation via le complexe TCR/CD3 par liaison du TCR au CMH induit le recrutement de la protéine kinase Src qui active, à son tour, LCK par phosphorylation. L'activation de LCK favorise le recrutement de la protéine ZAP-70 vers le complexe TCR/CD3. Son interaction avec LAT active la protéine SLP-76 via la PLC- $\gamma_1$  (phospholipase C). La PLC- $\gamma_1$  est impliquée dans la génération du  $Ca^{2+}$  et de DAG nécessaires à l'activation des protéines GEFs requises pour l'activation de Rap1<sup>123-125</sup>. En conséquence la PLC a été reportée comme étant très importante pour l'activation de LFA-1 lors de la formation de synapse via le TCR<sup>123</sup> à travers Rap1. En effet l'activation de SLP-76 la rend capable de se lier à deux types de protéines et de former deux complexes distincts. Ces complexes ont pour rôle d'activer deux voies de signalisation ayant pour but l'activation du remodelage du cytosquelette d'actine via la protéine WASP (montrée en vert, Figure 13) ou VASP (montrée en rouge, Figure 13) et l'activation de LFA-1 via RapL. Dans la voie qui relie à l'activation de LFA-1, SLP-76 interagit avec ADAP pour activer SKAP-55. Cette activation a pour conséquence l'activation des RapGTPases Rap1 et Rap2 par CALDAG-GEF1 à la membrane de la cellule, conduisant ainsi au recrutement de RapL à la portion intracellulaire de  $\alpha L$ . Cette cascade de signalisation est à l'origine du recrutement des molécules associées aux protéines d'adhésion comme la Kindelin-3 et la Talin (montrées en bleu, Figure 13). Ces dernières interagissent avec la portion intracellulaire de la sous-unité  $\beta 2$ . Les signaux transmis entre les molécules recrutées sous la sous-unité  $\beta 2$  et le cytosquelette d'actine vont induire un changement de conformation de LFA-1. De nombreuses études réalisées par le passé ont reporté que parmi toutes les molécules du complexe d'adhésion la Talin est la molécule qui se lie

physiquement à la sous-unité  $\beta 2$ . En réalité, la Talin possède une tête composée d'un domaine FERM qui interagit directement avec  $\beta 2$ . La queue de la Talin représente la portion qui interagit avec le cytosquelette d'actine. Autrement dit un enrichissement en Talin s'effectue directement sous l'intégrine sous sa conformation de haute-affinité<sup>117,126-128</sup>.

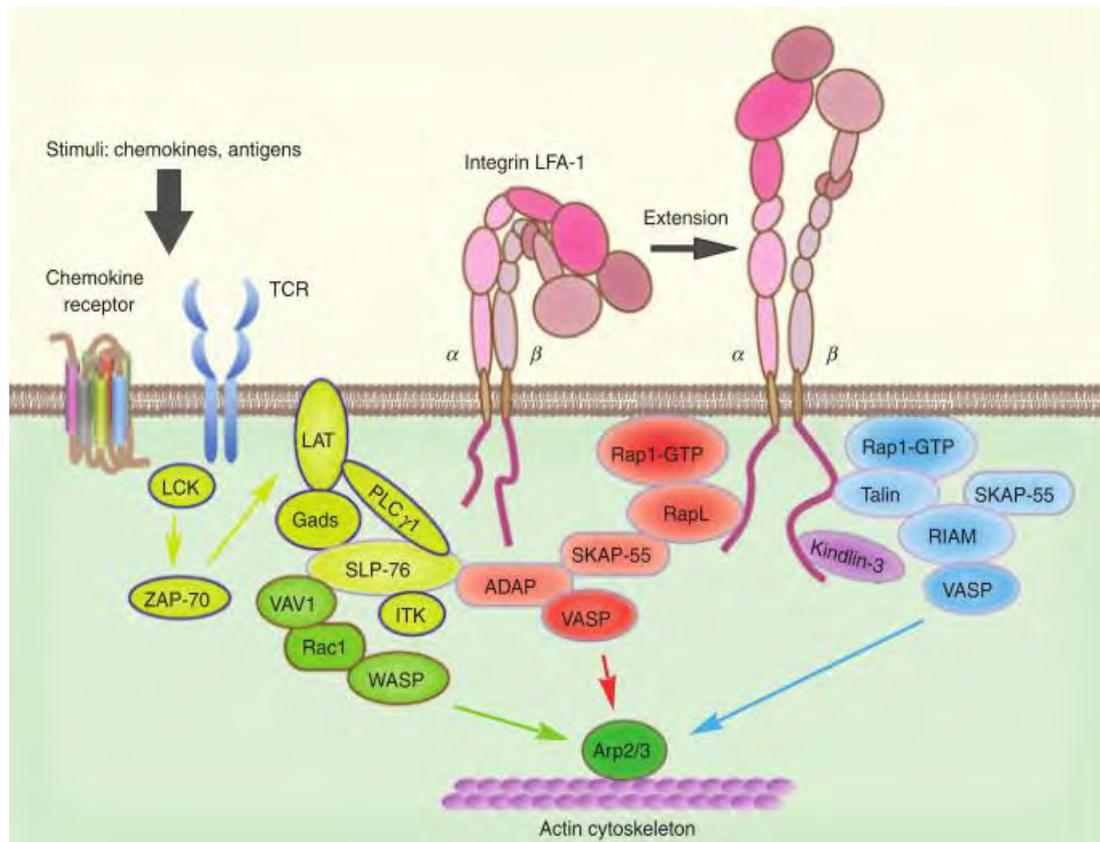


Figure 13: La signalisation Inside-out sous le TCR et via les récepteurs aux chimiokines (zhang et al.2012)<sup>125</sup>.

Les récepteurs aux chimiokines sont connus comme capables d'activer d'autres phospholipase C (PLC) impliquées dans la génération du  $\text{Ca}^{2+}$  et de DAG nécessaires à l'activation des protéines GEFs requises pour l'activation de Rap1<sup>123,124</sup>. En effet l'étude réalisée en 2004 par Katagiri et ses collaborateurs a montré qu'une déficience en PLC- $\gamma 1$  dans les cellules Jurkat, conduisait à une diminution de l'activation de Rap1 sous le TCR et de l'adhésion avec ICAM-1. En revanche l'activation de Rap1 et de l'adhésion induit par la chimiokine SDF- $\alpha$  étaient maintenues intactes<sup>123</sup>.

On pourrait se référer à d'autres études menées par différentes équipes qui ont montré que l'absence de RapL induisait un défaut d'adhésion en réponse aux chimiokines, de homing et de migration<sup>129-131</sup>, ce qui démontre l'importance de RapL dans l'adhésion médiée par LFA-1.

En résumé, lors de la formation de la synapse c'est la signalisation inside-out qui est utilisée suite à la liaison du TCR au CMH. Dans le cadre de ma thèse, la formation de la synapse sur des lamelles de verre utilise cette condition par activation du complexe TCR/CD3 par l'emploi d'anticorps anti-CD3 (OKT3).

#### b- Outside-in signalling

Dans ce deuxième cas de processus d'activation, c'est la liaison de LFA-1 à ICAM-1 qui entraîne des signaux provoquant une augmentation des forces d'adhésion et de l'avidité. Ces signaux peuvent être initiés à l'aide d'anticorps spécifiques qui augmentent la liaison de LFA-1 à son ligand ICAM-1 par reconnaissance d'un épitope sur le I domaine de la sous-unité  $\alpha$ L<sup>80,112,132</sup>. Ils peuvent également être déclenchés par l'ajout de cations divalents comme le  $Mg^{2+}$  qui se lie au site MIDAS de la portion extracellulaire de LFA-1<sup>132,133</sup>.

### E. Le remodelage du cytosquelette d'actine : un réarrangement bien contrôlé

Le cytosquelette d'actine est une structure responsable de la morphologie, du déplacement et de l'adhésion des cellules<sup>134</sup>. Le remodelage du cytosquelette d'actine est essentiel pour la migration et la formation de la synapse des lymphocytes T<sup>135</sup>.

## 1. Du monomère d'actine au filament d'actine

Le cytosquelette d'actine représente un réseau filamenteux, constitué de monomères d'actine (= actine globulaire = actine G). Le filament d'actine est formé par un assemblage des monomères entre eux. C'est un processus très dynamique, caractérisé par un assemblage et désassemblage d'une extrémité à l'autre du filament. (Figure 14a).

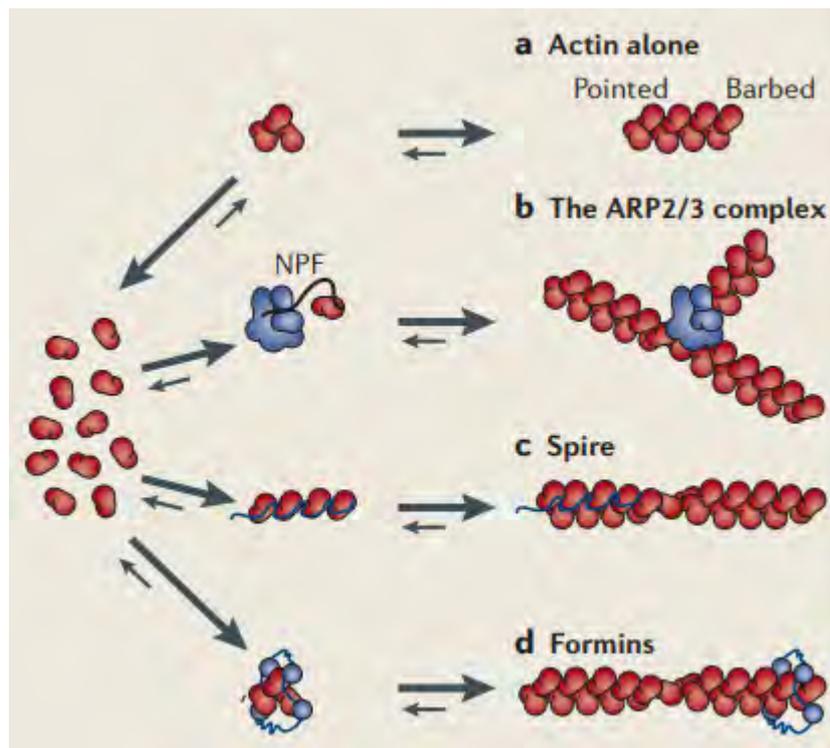


Figure 14: Représentation des différents acteurs de la polymérisation des monomères d'actine (Goley et Welch 2006)<sup>140</sup>.

La cinétique de l'assemblage des monomères d'actine en filament dépend de la nucléation, qui consiste à former un dimère puis un trimère d'actine. La formation du trimère permet l'enclenchement de l'assemblage rapide des monomères dans le processus d'élongation en fonction de la concentration de monomères disponible<sup>134,136</sup>. Cette étape d'assemblage est appelée polymérisation et permet de former un filament d'actine d'environ 7nm de diamètre.

La polymérisation des monomères d'actine aux extrémités des filaments est suivie d'une hydrolyse de l'ATP liée aux sous-unités d'actine à l'intérieur des filaments à une vitesse de  $0,3 \text{ s}^{-1}$  et de la dissociation du phosphate à une vitesse de  $0,002 \text{ s}^{-1}$ <sup>136</sup>. Cette étape constitue l'étape spontanée et dépend aussi de la concentration en cations ( $\text{Mg}^{2+}$ ). Pour allonger davantage le filament d'actine, les Formins interagissent avec le bout barbu et permettent l'ajout de monomères (Figure 14d). D'autres nucléateurs sont impliqués dans ce processus de polymérisation comme Spire pour l'assemblage des monomères en filaments ou Arp2/3 qui réunit des filaments entre eux. Dans les lymphocytes, les Formins ont été bien étudiées et l'une d'elle, la mDia1 a été reportée comme étant impliquée dans la réponse aux chimiokines<sup>56</sup>.

Cependant nous savons par de nombreuses études et observations incluant la revue dans Frontiers de Dupré et al. (Voir dans les annexes) que les lymphocytes T en migration adoptent une morphologie particulière, caractérisée par une polarisation définie par un remodelage différent de l'actine selon la zone de la cellule (Figure 15). Le cytosquelette d'actine est extrêmement dynamique et se remodèle perpétuellement pour permettre la motilité des lymphocytes<sup>137</sup>. Au front migratoire, la polymérisation de l'actine et la ramification des filaments fournissent un moteur pour le mouvement cellulaire en repoussant la membrane plasmique. Le schéma représenté ci-dessous (Figure 15) illustre un lamellipode caractérisé par un maillage dense en actine branchée tandis que les bords et l'uropode sont caractérisés par des réseaux de filaments d'actine parallèles<sup>136-138</sup>. On peut donc se demander quel processus contrôle le remodelage du cytosquelette d'actine et que se passe-t-il au niveau de la synapse immunologique.

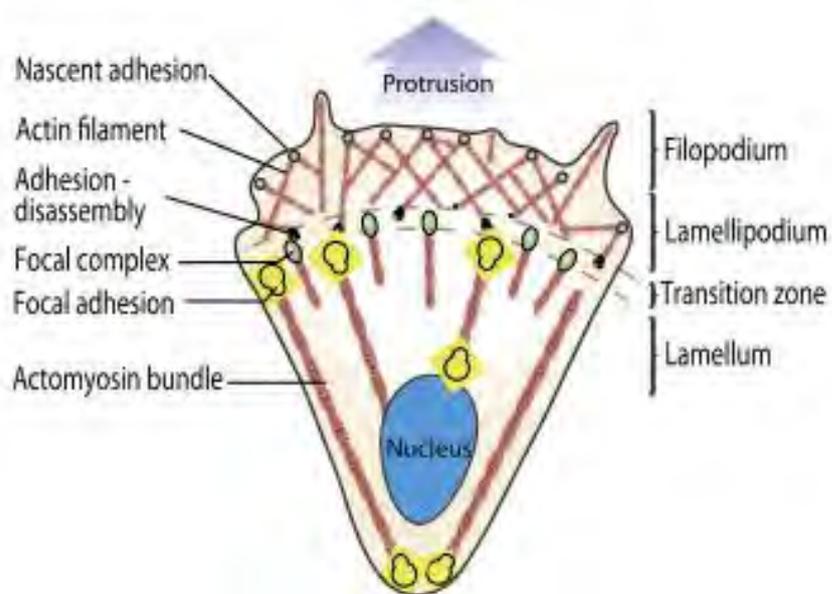


Figure 15: Schéma représentant une cellule en migration et les deux types de structures du cytosquelette d'actine caractérisant une cellule polarisée en migration (Klotzsch et al.2015)<sup>138</sup>

## 2. Le branchement des filaments d'actine sous le contrôle du complexe Arp2 /3

Le complexe Arp2/3 (Actin-related-protein 2/3) est connu comme l'un des nucléateurs capable de réunir les filaments d'actine et de former des réseaux ramifiés (les autres étant les protéines de la famille des Spires)<sup>134,139</sup>. Sur la Figure 16 une image de microscopie électronique montre une ramification de deux filaments d'actine branchés l'un sur l'autre. Il a été reporté que les filaments étaient branchés en Y en formant un angle de 70° et réunis par Arp2/3<sup>134</sup> (Figure 16). A droite de l'image est représenté le complexe des protéines Arp2/3 et les sous-unités des complexes ARPC 1 à 5. Dans les lymphocytes Arp2/3 a été décrit comme ayant un rôle majeur dans la ramification du cytosquelette d'actine<sup>140</sup>.

En réalité, l'activation du complexe Arp 2/3 est contrôlée par les protéines régulatrices du cytosquelette d'actine: les protéines de la famille WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein)

comprenant la protéine WASP et N-WASP et les protéines de la famille WAVE (WAS-Verprolin)<sup>141</sup>.

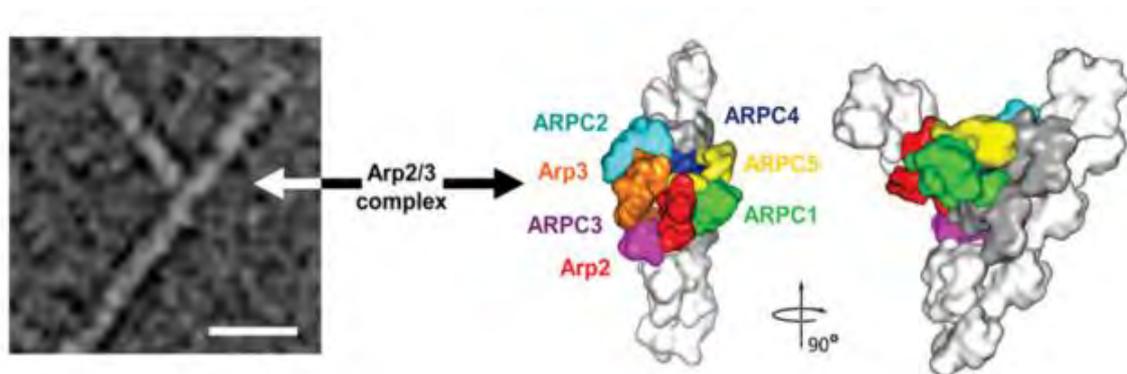


Figure 16: La morphologie d'un filament d'actine ramifié et du complexe Arp2/3 (Campellone et al.2010)<sup>134</sup>

WASP est exprimée dans les cellules hématopoïétiques, N-WASP en revanche est majoritairement exprimée dans les neurones (neuronal-WASP)<sup>142</sup>. Les protéines de la famille WAVE comprennent WAVE1, 2 et 3, seule WAVE2 est exprimée dans les lymphocytes chez l'homme<sup>143</sup>.

Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes intéressés à la protéine WASP impliquée dans une immunodéficiência sévère.

### 3. La protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP)

C'est une protéine de 502 acides aminés codée par le gène *WAS* localisé sur le chromosome X<sup>144</sup>. Ce gène a été identifié pour la première fois en 1987. Les mutations différentes sur ce gène conduisent au syndrome de Wiskott-Aldrich<sup>145</sup>. Cette protéine est requise pour de nombreuses fonctions liées à l'activité des cellules hématopoïétiques, notamment la migration et la formation de la synapse immunologique<sup>146-150</sup>. La protéine WASP est constituée de cinq domaines et se présente sous deux formes : une forme auto-inhibée et une forme activée. La forme auto-inhibée se caractérise par un repliement de la protéine sur elle-même par une

association physique du domaine de liaison de GTPases (GBD) (Figure 17 panel du haut) et du domaine C-terminal de WASP VCA (Verprolin homology Central and Acidic domain).

L'activation de la protéine WASP est permise, grâce à la phosphorylation du résidu Tyrosine dans le domaine GBD qui déstabilise la conformation auto-inhibée en permettant la liaison de Cdc42 au domaine GBD. Cette modification de conformation a pour conséquence de libérer le domaine VCA. Le domaine VCA libéré interagit avec le complexe Arp2/3 pour activer l'assemblage des monomères d'actine en filament et induire la protrusion, la mobilité ou le changement de forme<sup>146,147,151,152</sup> (Figure 17 panel du bas).

Au domaine WH1, situé à la partie N-terminal de la protéine WASP, se lie la protéine WIP (WASP-Interacting Protein)<sup>153-155</sup> (Figure 17). Cette liaison a pour but de stabiliser la protéine WASP en empêchant sa dégradation par les protéasomes ou par la calpaïne<sup>156,157</sup>. En effet dans des cellules T de souris WIP-déficientes le niveau d'expression de la protéine WASP était dramatiquement réduite bien que le niveau des ARN messagers de WASP soit comparable à celui trouvé dans des cellules T sauvages<sup>156,158</sup>. Cette observation a été confirmée chez l'homme, avec un patient présentant un niveau de protéine WASP indétectable dans le cadre d'une déficience en WIP. L'introduction de la protéine WIP dans les cellules T de ce patient a permis de restaurer la protéine WIP<sup>159</sup>. Une étude menée en 2013 par Watanabe et ses collaborateurs montrait que l'engagement du TCR/CD3 entraînait la dégradation d'une fraction de la protéine WASP (5% environs) dans les cellules T afin de réguler l'assemblage des filaments d'actine WASP dépendant sous le TCR<sup>160</sup>.

L'interaction de WIP avec WASP est très importante dans la localisation de WASP dans les zones de polymérisation intense d'actine comme les podosomes dans les cellules dendritiques et dans des plaquettes. Cette polymérisation est caractérisée par une augmentation des ramifications des filaments d'actine<sup>161,162</sup>. A la synapse immunologique, la polymérisation de l'actine survient lors l'activation du TCR qui, par une cascade de signalisation, induit le

recrutement et l'activation de WASP et Cdc42 à la synapse. Une protéine de la famille des kinases Tec, Itk (interleukin-2-inducible T-cell kinase) a été reportée comme contrôlant l'activation de WASP à la synapse immunologique puisqu'une déficience de la protéine Itk n'empêche pas le recrutement de WASP à la synapse par contre, WASP reste inactive<sup>163</sup>. Une autre étude menée par Sims et ses collaborateurs en 2007 montre que dans des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves déficientes en WASP, les cellules montrent une formation normale de la synapse initiale. En revanche, elles sont incapables de reformer une synapse après la rupture de sa symétrie. La synapse fait l'objet d'une déstabilisation et d'une rupture périodiques de sa symétrie exercées sous le control de PKC $\theta$  et inhibées par la protéine WASP. Le phénomène de déstabilisation périodique contrôlée a pour but de favoriser l'activation des cellules T et la sécrétion de IL-2<sup>164,165</sup>. Dans le cas de la cytotoxicité il a été démontré, dans une étude antérieure, que les cellules T CD8<sup>+</sup> ont une efficacité de lyse réduite. Cette réduction s'explique par une réduction de la quantité de granules lytiques polarisés vers la synapse face à une cellule B de lymphome<sup>149</sup>.

Nous savons que la cellule en migration adopte différents types de réarrangement selon la partie de la cellule<sup>134,136</sup>. Dans le sous chapitre ci-dessus il est mentionné que l'activation de la molécule de LFA-1 à la synapse induisait une interaction à la partie intracytoplasmique, de sa sous-unité  $\beta 2$  avec des protéines connues comme se liant au cytosquelette d'actine<sup>127</sup>. Cette interaction a pour conséquence d'induire la polymérisation de l'actine. On peut donc se

demander quel pourrait être le rôle de WASP dans le remodelage du cytosquelette d'actine lors de l'activation de la molécule de LFA-1 à la synapse immunologique.

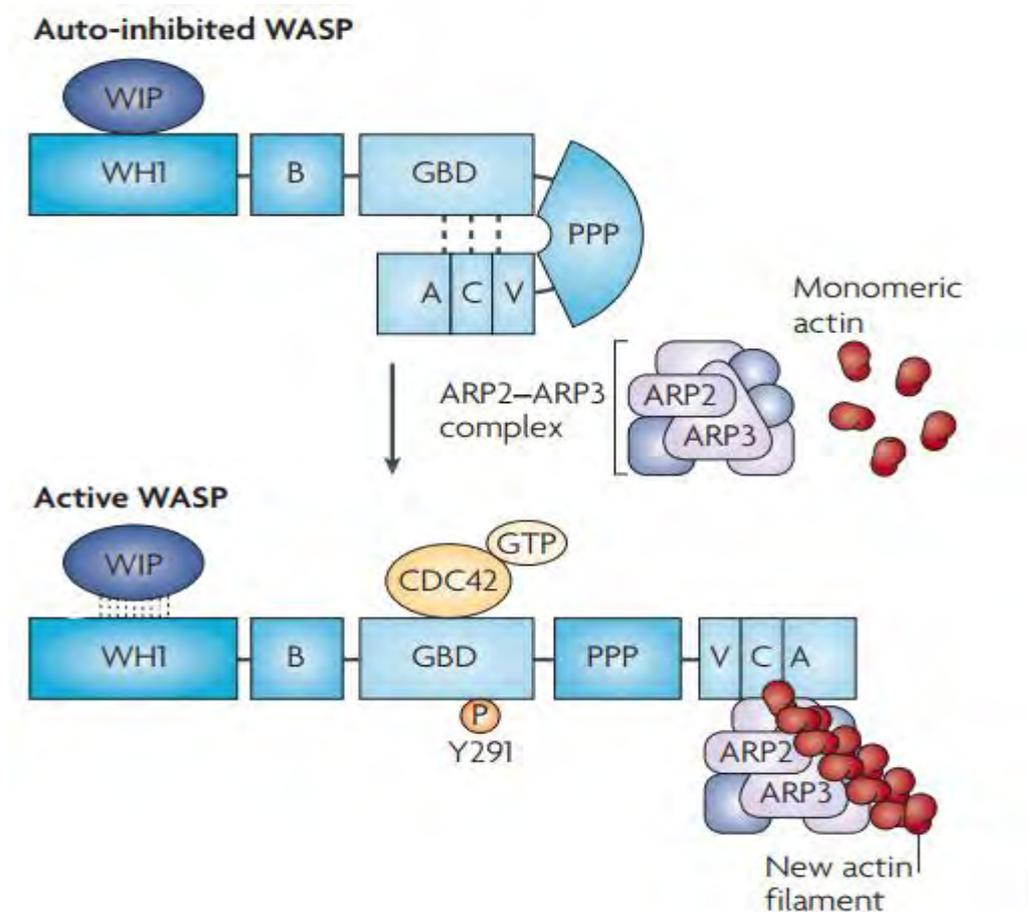


Figure 17: Schéma de la protéine WASP sous ses deux conformations (Thrasher et Burns 2010)<sup>146</sup>

## F. Ancrage de LFA-1 au cytosquelette d'actine

L'avidité de LFA-1 est la conséquence directe de l'interaction avec une haute affinité de LFA-1 avec ICAM-1 et est définie par la formation de clusters de conformation ouverte de LFA-1 à la surface de la cellule. Deux études menées en 2004 et 2006 par deux équipes de recherche distinctes, montrent que les molécules de LFA-1 non activées se distribuent aléatoirement à la surface des cellules. En revanche, dès qu'elles se lient à ICAM-1, un regroupement des molécules en micro-clusters plus petits puis plus gros s'opère<sup>166,167</sup> et la polymérisation de

l'actine permet de stabiliser et d'augmenter l'avidité de l'intégrine LFA-1 lors de la signalisation bidirectionnelle. La perturbation du cytosquelette d'actine par des drogues a montré une réduction non négligeable de l'avidité de LFA-1 dans des cellules K562 (lignée cellulaire humaine immortalisée)<sup>166</sup>. Une autre étude plus récente réalisée par Ishibashi et ses collaborateurs en 2015<sup>168</sup> montre que ce regroupement en clusters nécessite des forces générées par le cytosquelette d'actine et est régulé par des signaux bidirectionnels<sup>112,169</sup>.

Dans notre projet d'étude, nous avons entrepris l'étude du rôle du réarrangement du cytosquelette d'actine dans l'activation de LFA-1 à la synapse immunologique. Pour ce faire nous avons choisi un modèle naturel de déficience de la protéine WASP : le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS).

---

#### Le syndrome de Wiskott-Aldrich

---

Le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) est une maladie génétique rare causée par des mutations diverses du gène *WAS*, localisé sur le chromosome X qui entraînent une réduction ou une absence de l'expression de la protéine WASP dans les cellules hématopoïétiques<sup>151,170</sup>. Ce syndrome a été découvert pour la première fois par le pédiatre Alfred Wiskott en 1937 puis décrit par Robert Aldrich en 1954. L'absence de cette protéine se caractérise donc par une fonction défectueuse des cellules immunitaires<sup>149,171</sup> ayant pour conséquence le développement d'un syndrome d'immunodéficience primaire qui affecte 1 à 10 sur 1 000 000 de naissances et concerne des individus de sexe masculin. WAS est caractérisé par une immunodéficience, de l'eczéma et une diminution du nombre et de la taille des plaquettes sanguines<sup>146,172</sup>.

---

### III. LFA-1 contrôle la formation et la stabilité de la synapse cytotoxique

Le succès d'une réponse immunitaire réside sur la capacité des cellules immunitaires à reconnaître la présence d'un antigène, à migrer vers les sites d'inflammation et à pouvoir former des contacts avec les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Cette reconnaissance requiert au préalable l'activation des lymphocytes T via la formation de la synapse entre un lymphocyte T et une CPA après reconnaissance de l'antigène<sup>37,173,174</sup>.

#### A. La formation de la synapse immunologique : le TCR circonscrit par LFA-1

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, lors de la réponse immunitaire adaptative, certaines cellules immunitaires telles que les lymphocytes B ou les cellules dendritiques sont capables de se lier directement à l'antigène grâce à l'expression à la surface de ces cellules d'immunoglobulines capables de reconnaître les antigènes et de s'y lier par la partie Fc. La reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T se fait via le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité). Le CMH sert surtout à la reconnaissance des peptides antigéniques soit endogènes (cytoplasmique) soit exogènes. Il existe donc deux CMH différents : le CMH-I est monomérique et reconnaît majoritairement les peptides endogènes et le CMH-II est dimérique et reconnaît majoritairement des peptides exogènes<sup>122,175,176</sup>. Ces CMH sont nécessaires pour la présentation des peptides antigéniques à la surface de la cellule présentatrice de l'antigène (CPA) afin d'induire l'activation des lymphocytes T par contact. Dans ce contexte, l'interaction LFA-1/ICAM-1 est nécessaire pour la formation de la synapse immunologique.

## B. La synapse immunologique : orchestration d'un réarrangement spatial à trois temps contrôlé par le remodelage du cytosquelette d'actine

La synapse immunologique représente une structure très complexe faisant intervenir de nombreux récepteurs et corécepteurs. La rencontre entre un lymphocyte T et une CPA entraîne des changements tant morphologiques que fonctionnelles et moléculaires. Ces changements s'opèrent dans un espace restreint qu'est la synapse immunologique et dans des temps très courts pour certains événements. Une réorganisation spatio-temporelle a lieu après contact entre la CPA et la cellule immunitaire formant des zones bien distinctes et caractérisées par la présence de certaines molécules. La synapse est dite mature lorsqu'on distingue un regroupement central de clusters (micro-clusters) du récepteur des cellules T (TCR) entouré par un anneau de clusters de LFA-1<sup>177-180</sup>. Au centre de la synapse le cSMAC (central Supramolecular Activation Clusters), est enrichi en clusters de TCR et suivi d'une zone périphérique enrichie en clusters de LFA-1 activée, le pSMAC (peripheral Supramolecular Activation Clusters) et plus à l'extérieur se trouve le dSMAC (distal Supramolecular Activation Clusters)<sup>181</sup> (Figure 18). Cette répartition spatio-temporelle est très active (dynamique) et est orchestrée par la dynamique de l'acto-myosine. Le flux centripète de l'actine entraîne vers le pSMAC LFA-1 activée et ancrée au cytosquelette<sup>178,182,183</sup>. Il a été effectivement démontré que le cytosquelette d'actine était essentiel au maintien de l'organisation du ring de LFA-1 à synapse immunologique<sup>178</sup>.

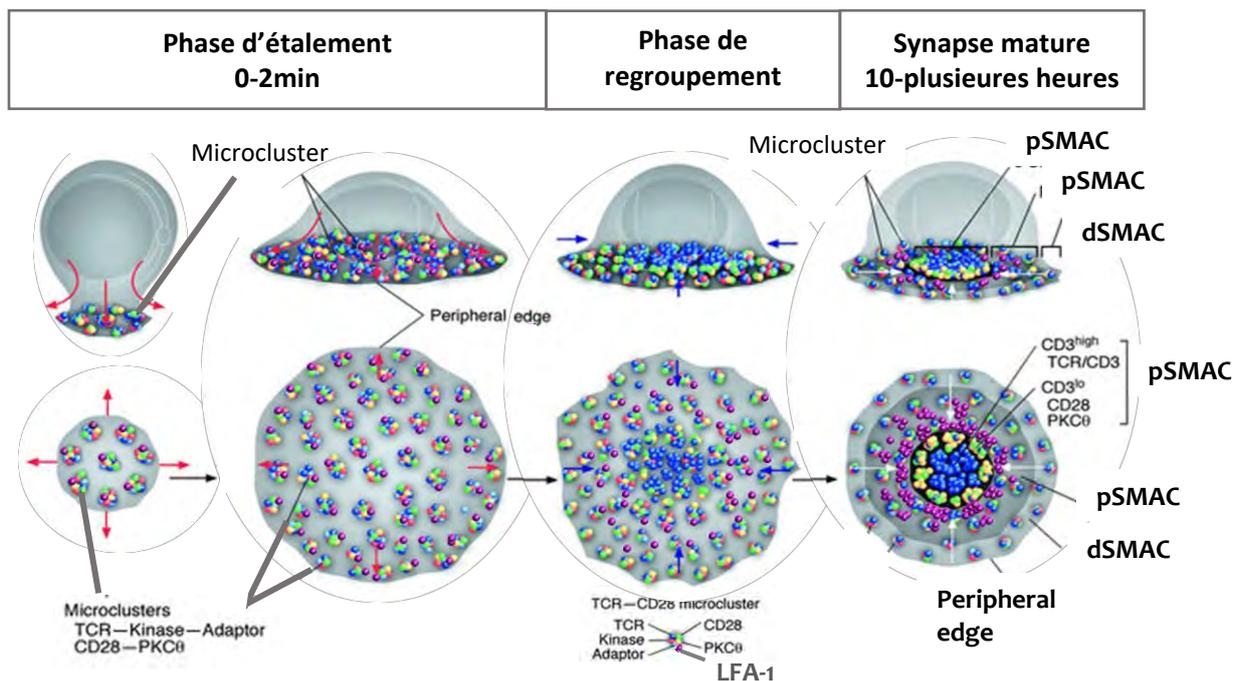


Figure 18 : Les différentes étapes de maturation de la synapse immunologique (adapté de yokosuka et Saito 2009)<sup>172</sup>.

#### IV. Le rôle de LFA-1 dans l'activité de cytotoxicité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques

LFA-1 est une molécule essentielle pour la formation et la stabilité de la synapse immunologique. Néanmoins, ce contact seul ne suffit pas pour une réponse immunologique efficace.

L'efficacité d'une réponse immunitaire s'évalue par la capacité des cellules immunitaires à éradiquer les cellules contaminées. Cette éradication se fait à travers deux processus, le premier est la phagocytose menée par les macrophages (système immunitaire inné), le deuxième est l'activité de cytotoxicité, menée par les cellules NK et par des lymphocytes T dites cytotoxiques. Ces cellules particulières sont capables de produire des molécules toxiques pour lyser les cellules infectées après reconnaissance de la présence d'antigènes. Ces molécules sont de deux natures et entraînent la lyse (une rupture membranaire) de la CPA : la perforine capable de créer des pores dans la membrane de la CPA et les granzymes, des protéases à serine, capables de pénétrer dans la CPA via les pores créés par la perforine pour lyser la CPA.

## A. La déficience de l'adhésion des leucocytes entraîne une inhibition de la cytotoxicité

L'activation de LFA-1 a été reconnue comme étant essentielle pour la libération de ces molécules lytiques ( la dégranulation) en réponse à une signalisation inside-out<sup>184</sup>. Il existe une maladie génétique, rare appelée LAD-I (Leucocytes Adhesion Deficiency) dans laquelle une déficience des intégrines des leucocytes a permis de mettre en évidence l'importance des intégrines dans les fonctions des leucocytes telle que l'activité cytotoxique<sup>67</sup>. Cette déficience s'expliquerait par l'absence de la sous-unité beta<sup>185</sup> qui est dégradée aussitôt qu'elle est produite<sup>96</sup>. LFA-1 a été identifiée à l'aide d'anticorps anti-LFA-1 qui bloquaient l'activité de cytolyse médiée par les cellules NK et l'activité cytotoxique médiée par les lymphocytes T. Ces anticorps bloquent la prolifération de ces deux types de cellules<sup>42</sup>. LFA-1 joue un rôle crucial dans l'étape d'adhésion lors de la reconnaissance de l'antigène par le CTL requise pour l'élimination de la cellule cible. Il a été démontré dans les années 80 qu'une déficience de LFA-1 et de OKM1 entraînait des infections récurrentes<sup>186</sup> et que le blocage de l'intégrine LFA-1 par l'emploi d'anticorps inhibe la lyse médiée par les CTL<sup>38</sup>. En effet, les anticorps anti-LFA-1 ou anti Lyt-2,3 bloquent de façon très spécifique la lyse par inhibition des premières étapes de la lyse, à savoir, la formation d'une adhésion ferme, magnésium dépendent, entre le CTL et la cellule cible. Si ces anticorps étaient rajoutés à la fin de l'adhésion dépendante du magnésium, ils étaient capables d'inhiber la lyse initiée. En revanche, s'ils étaient rajoutés 5 minutes après l'initiation de l'étape Calcium dépendent (lethal hit stage), ils étaient sans effet sur la lyse. Le blocage de LFA-1 par des anticorps inhibe l'activité de lyse tout en soutenant la sécrétion de l'interleukine 2<sup>187</sup>. Les anticorps employés contre LFA-1 inhibent également l'activité de killing des cellules NK. La réduction de l'activité cytotoxique se traduit par un nombre de cibles tuées inférieur au nombre de cibles tuées par des cellules NK non-inhibées<sup>61</sup>.

## B. Libération des granules lytiques

L'étude réalisée en 2011 par Sanchez-Ruiz et ses collaborateurs montre que la formation de la synapse cytotoxique se fait par une libération de vésicules marquées par LAMP1 et contenant la perforine et les granzymes A et B<sup>64</sup>. Nous savons aussi, par des études récentes, que les granules lytiques sont acheminés à la synapse par une polarisation du MTOC et que cette étape nécessite une déplétion de l'actine vers la zone de libération de granules lytiques<sup>188,189</sup>. A l'aide de la microscopie de super-résolution STED, il a aussi été reporté que les granules lytiques étaient libérés dans les régions peu denses en actine, dans les cellules NK.

Ces données démontrent l'importance du remodelage du cytosquelette d'actine dans la libération des granules. De plus, au niveau de la synapse immunologique, l'actine corticale est essentiellement représentée par un maillage dense d'actine branchée formant un lamellipode circulaire et localisé sur le pourtour de la périphérie synaptique. Par contre au centre de la synapse on observe un maillage de filaments d'actine plus relâché<sup>190</sup> ce qui expliquerait le passage facilité des granules lytiques au niveau de la synapse immunologique. Ces observations nous ont été reportées grâce à l'utilisation de la microscopie de super-résolution (SIM) dans des modèles de cellules NK. Une récente étude publiée en août 2017 reporte que la sécrétion de granules lytiques est suivie d'un recouvrement de l'actine corticale à la synapse, permettant aux CTL de limiter la sécrétion et de préserver ainsi leur capacité à effectuer de multiples lyses<sup>191</sup>.

## C. Nécessité du remodelage du cytosquelette d'actine et de l'adhésion de LFA-1 dans la libération des granules lytiques

Des études ont reporté que les cellules de patients WASP déficiente étaient marquées par un défaut de cytotoxicité bien que la formation de la synapse et la polarisation du MTOC avaient lieu. Face à des cellules cibles, les cellules WASP déficiente éliminaient moins de cibles que

les cellules exprimant WASP, malgré la formation de conjugués. Récemment, au niveau de la synapse immunologique, une étude a montré que les granules lytiques étaient sécrétées dans une zone très proche des régions où des forces mécaniques s'exerçaient<sup>192</sup>. Des CTLs étalées sur des micropilliers imprégnés de H2-K<sup>b</sup>-OVA et d'ICAM-1, étaient capables de dégranuler proches des zones de déflexion des micropilliers (zones d'application des forces mécaniques). On peut donc se demander quel lien pourrait exister entre le défaut du remodelage du cytosquelette d'actine, LFA-1 et la sécrétion des granules lytiques.

# Objectif

---

Nous avons développé dans l'introduction l'état actuel des connaissances sur l'intégrine LFA-1 et plus particulièrement son rôle essentiel dans la conjugaison entre les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules cibles pour former la synapse immunologique. Nous avons également présenté la participation du cytosquelette d'actine dans la formation d'un anneau de LFA-1 entourant les clusters de TCR et dans la libération des granules lytiques au centre de la synapse. Cependant nous possédons très peu d'information en ce qui concerne l'organisation fine de LFA-1 à l'aire synaptique.

L'objectif de ce projet de thèse a consisté à appliquer pour la première fois des approches de microscopie de super-résolution pour étudier l'organisation précise de LFA-1 à l'aire synaptique des lymphocytes T.

Pour réaliser cette étude, nous avons combiné des approches de super-résolution (dSTORM et SIM) pour élucider la distribution de LFA-1 (à l'échelle nanométrique et cellulaire) et ses états conformationnels à la synapse de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques humains non transformés.

Dans un second temps, nous avons voulu comprendre par quel mécanisme la déficience en WASP, une des protéines régulatrices du remodelage du cytosquelette d'actine, affectait l'activation de LFA-1 et son organisation à la synapse immunologique. Enfin, nous avons cherché à comprendre dans quelle mesure les défauts dans la fonction cytotoxique observée en l'absence de WASP pouvaient s'expliquer par un défaut d'organisation de la molécule de LFA-1 à l'échelle cellulaire et nanométrique.

## Méthodes

## Les modèles cellulaires

Dans ce projet de thèse nous avons utilisé différents modèles cellulaires, des lignées pour la mise en place de nos approches d'imagerie, puis des lymphocytes T primaires pour l'application de ces approches une fois leur développement validé.

### Les cellules Jurkat

Les cellules Jurkat sont une lignée de lymphocytes humains immortalisés. Cette lignée exprime LFA-1 et est capable de répondre à une stimulation par ICAM-1± anticorps anti CD3. Elles sont cultivées dans du RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 glutamax (Gibco) complété avec 10% FCS (PAA), 100µg/ml de pénicilline/streptomycine, 10mM de HEPES, 0.1mM de MEM d'acides aminés non essentiels et 1mM de pyruvate de sodium (Invitrogen).

### Les cellules HFF (Human Foreskin Fibroblasts) : fibroblastes du prépuce humain

Les cellules HFF représentent une lignée cellulaire issue de la peau du prépuce humain de deux individus mâles. Ces cellules sont capables d'une croissance importante et surtout elles adhèrent au verre. Les cellules HFF ont été cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco) complété avec 10% FCS (PAA), 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine, 10mM de HEPES, 0.1mM de MEM d'acides aminés non essentiels et 1mM de pyruvate de sodium (Invitrogen).

### Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> humains cytotoxiques (CTLs)

Nous avons utilisé des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> humains cytotoxiques (CTL) non transformés issus de donneurs sains ainsi que de patients atteints d'une immunodéficience congénitale, le Syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS). WAS constitue un modèle naturel dans lequel le cytosquelette d'actine présente des défauts de remodelage. En effet, dans cette pathologie, des

mutations entraînent une perte d'expression de la protéine WASP qui intervient dans le remodelage du cytosquelette d'actine au sein des cellules hématopoïétiques<sup>171</sup>.

Les lignées de cellules T CD8<sup>+</sup> non transformées ont été générées à partir d'échantillons de sang de donneurs sains (HD) et de patients WAS. Les PBMC ont été isolées par centrifugation à gradient de densité sur un gradient de Ficoll (PAA). Les cellules T CD8<sup>+</sup> ont été isolées par sélection négative (Stem Cell) selon les instructions du fabricant, avec une pureté supérieure à 95%. Les cellules T CD8<sup>+</sup> ont été cultivées dans du RPMI 1640 glutamax (Gibco) additionné de 5% de sérum humain (PAA), de 100µg/ml de pénicilline/streptomycine, 10mM de HEPES, 0,1mM de MEM, acides aminés non essentiels et 1mM de pyruvate de sodium (Invitrogen). Les cellules ont été stimulées toutes les 2 semaines en présence de 1x10<sup>6</sup>/ml de PBMC allogéniques irradiées et de cellules JY transformées par EBV irradiées à 1x10<sup>5</sup>/ml avec 1µg/ml de PHA, 100UI/ml de rhIL-2 et 5ng/ml de rhIL-15.

### Le marquage cellulaire

Les cellules ont été déposées sur des lamelles circulaires 1.5H (18 mm de diamètre) revêtues de ICAM-1/Fc recombinant (4µg/ml) (R&D Systems, USA) avec ou sans anticorps anti-CD3 (10µg/ml) ou Poly-L-Lysine pendant une nuit à 4 ° C. Les cellules ont été lavées dans du milieu RPMI 5% Human Serum puis marquées avec un anticorps mAbA24 ou un anticorps mAbHI111 (5µg/ml) pour révéler respectivement les conformations de LFA-1 ouverte et fermée. Les cellules ont été immédiatement transférées sur les lamelles pour 10 min à 37 ° C. Elles ont été fixées avec du paraformaldéhyde à 4% pendant 10 min à 37 ° C, lavées avec du PBS à 3% de BSA, HEPES à 10mM et perméabilisées avec du PBS à 3% de BSA 10mM HEPES 0,1% saponine pendant 15 min à 4 ° C. Elles ont ensuite été incubées avec IgG1-AF674 anti-souris et phalloïdine-AF488, pendant 1 h à température ambiante.

Mise en place des techniques

**d'imagerie de super**-résolution

Nous rappelons que des études antérieures nous ont permis de comprendre des mécanismes importants quant à l'organisation de LFA-1 à la surface des cellules immunitaires. Tout d'abord, les travaux de Kim et ses collaborateurs qui ont montré que l'activation de LFA-1 entraînait une augmentation de l'avidité. Autrement dit, un regroupement des molécules de LFA-1 en micro-clusters révélés par FRET<sup>166</sup>. En 2006 deux travaux majeurs nous ont apporté plus de précision en ce qui concerne la taille des clusters de LFA-1 (100-150nm de diamètre) et la taille d'une molécule individuelle sous sa conformation de haute-affinité (13nm de largeur et 25nm en longueur) à l'aide de la microscopie électronique<sup>193</sup>.

Comme nous venons de l'aborder dans l'introduction, les approches de microscopie de fluorescence de super-résolution permettent d'atteindre des résolutions théoriquement suffisantes pour satisfaire notre étude. Pour y parvenir il faut s'affranchir de la barrière de diffraction, faute de quoi, on ne peut voir en détail des objets en dessous de 250nm. Ces techniques sont disponibles soit par l'achat de systèmes commerciaux entièrement équipés pour la réalisation de ces approches soit par un développement maison sur un système existant dont l'utilisation première n'est pas la super-résolution. Nous avons choisi la deuxième option car les systèmes existants sur notre site pouvaient être équipés pour la mise en place de certaines approches de super-résolution. Cette deuxième alternative présente deux avantages : un coût faible comparé à l'achat d'un système de super-résolution et la multifonctionnalité du système. Dans ce contexte, nous avons consacré la première année de thèse au développement de techniques de microscopie de fluorescence qui nous permettraient de nous affranchir de la diffraction et d'apprécier ainsi les tailles des clusters voire de la molécule individuelle de LFA-1. Parmi les techniques que nous avons mises en place, certaines présentaient des limites et des contraintes difficiles à surmonter car chronophage ou nécessitant des équipements très lourds et coûteux. Pour chaque technique, nous détaillerons le principe, la stratégie de mise en place, les résultats obtenus (exploitables ou non), les conclusions et les limites.

Comme dit précédemment, il nous a, tout d'abord, fallu réfléchir à une technique qui pourrait être mise en place pour notre étude avec le matériel disponible. Nous avons pensé en premier lieu à la mise en place du BaLM et du dSTORM dans le but d'améliorer la visualisation de la molécule de LFA-1 à la surface des lymphocytes T. Dans un second temps, pour visualiser le lien avec le cytosquelette d'actine et avec une meilleure résolution nous avons compris que plusieurs stratégies étaient envisageables, le BaLM multicolore, le dSTORM multicolore, la combinaison PALM/dSTORM et enfin le SIM multicolore. Les paragraphes qui suivent vont détailler ces méthodes avec leurs avantages et leurs limites afin de mieux comprendre pourquoi nous avons opté pour certaines techniques plutôt que d'autres.

## I. La technique du BaLM

Pour rappel, l'approche du BaLM utilise les propriétés intrinsèques que possèdent la plupart des sondes fluorescentes communes (protéines fluorescentes ou fluorophores synthétiques couplés aux anticorps) à photoblanchir ou à apparaître par intermittence (photoblinking). Lors d'une acquisition BaLM une dizaine de milliers d'images est acquise en utilisant un microscope conventionnel (champ large, confocal ou TIRFM). Ensuite, chaque image est soustraite de l'image précédente afin d'obtenir les molécules individuelles présentes sur l'image « Frame 1 » mais ayant disparues sur l'image « Frame 2 » (en référence au schéma de la Figure 19). Ainsi au fur et à mesure que l'intensité du signal disparaît au cours du temps dans la pile d'images acquises, on isole individuellement chaque événement de photoblanchiment. Une image avec une plus haute résolution est reconstruite en additionnant les images des points isolés.

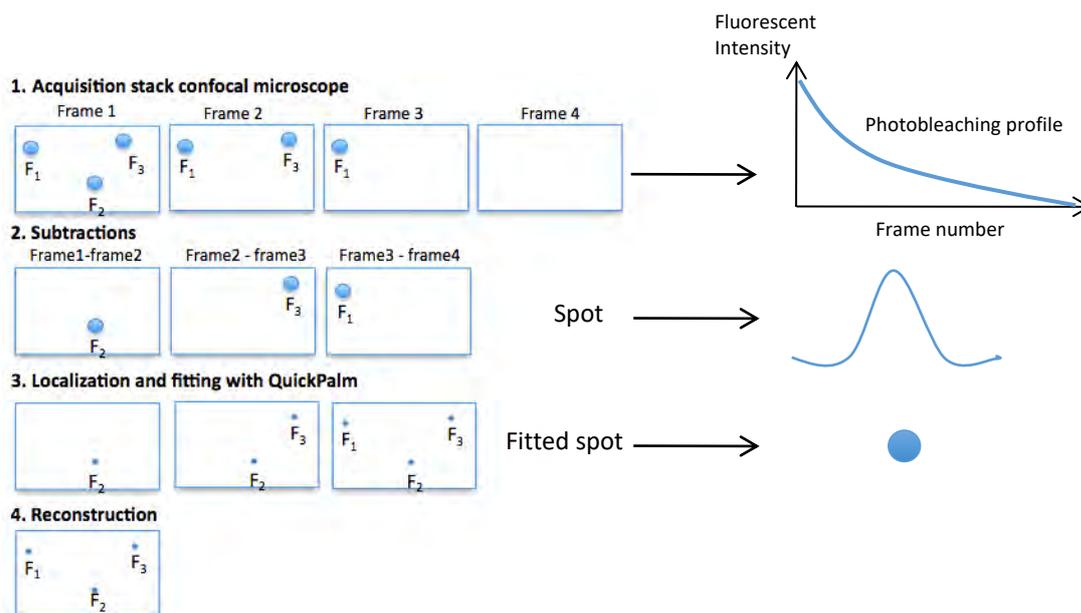


Figure 19: Représentation schématique du principe de la microscopie de BaLM. (1) Acquisition des piles d'images nommées Frame 1 à Frame 4 en utilisant un microscope confocal. A droite la courbe montrant la disparition de l'intensité du signal par photoblanchiment.

## A. Stratégie expérimentale et mise en place du BaLM

Avec une résolution théorique d'environ 50nm, le BaLM ne nous permet pas d'atteindre l'échelle de la molécule unique de LFA-1 mais est suffisamment résolue pour pouvoir étudier les clusters de LFA-1 puisque ces derniers ont un diamètre moyen de 100 à 150 nm. Nous nous sommes fixés comme objectif de développer l'approche du BaLM pour résoudre la taille des clusters de LFA-1. L'approche du BaLM a été appliquée sur une lignée de lymphocytes T humains appelées Jurkat, afin de mettre au point la technique. L'utilisation de cette lignée nous a permis d'économiser des cellules primaires précieuses et difficiles à faire pousser en culture. Les expériences sur les cellules Jurkat ont été menées dans des conditions où seule la conformation fermée de LFA-1 a été révélée à l'aide d'un anticorps spécifique (mAb HI111). A noter que les cellules que nous utilisons ne sont pas capables d'adhérer fermement au verre

de la lamelle et pour étudier la conformation non activée de LFA-1, l'environnement des cellules doit être dépourvu de toute substance capable d'activer LFA-1 ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ...). Néanmoins, pour qu'il reste des cellules sur la lamelle sans ancrage physique nous avons imprégné la surface des lamelles de poly-L-lysine. Ce peptide est formé de plusieurs lysines chargées positivement et permet une interaction électrostatique avec les groupements chargés négativement à la surface des cellules. Ensuite, pour permettre le photoblanchiment des molécules fluorescentes nous avons dû sélectionner un milieu de montage qui soit adéquat pour un photoblanchiment étalé dans le temps. Plus précisément il nous fallait un milieu de montage qui permette de ralentir le photoblanchiment, de manière à ce que la perte de fluorescence ne soit pas trop rapide d'une image à l'autre de peur de perdre des informations. Pour cette raison, nous avons commencé par un milieu de montage couramment utilisé qui est le DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane). Cependant, nous nous sommes rendu compte que le photoblanchiment était trop rapide et que les cellules se décrochaient et sortaient du champ d'acquisition. Le DABCO est un milieu de montage liquide plus ou moins visqueux qui ne polymérise pas et tend à entraîner le décrochage des cellules non adhérentes. Compte tenu de ces soucis, nous avons opté pour le ProLong Gold (ThermoFisher) qui nous affranchit, à la fois du problème de décollement des cellules car il polymérise et à la fois ralentit le phénomène de photoblanchiment jusqu'à 71% pour le fluorophore que nous avons utilisé, l'Alexa Fluor 568.

Les avantages du BaLM sont : l'emploi de fluorophores conventionnels et l'utilisation d'un microscope conventionnel (confocal, champ large ou TIRF). Pour notre étude le système utilisé pour l'acquisition des images BaLM est un microscope confocal TCS SP8 de Leica Microsystems muni d'un objectif 63x (oil immersion) inversé avec une ouverture numérique de 1.4. Les lasers intégrés vont de 405nm à 638nm. Le système est équipé de différents types de détecteurs : un tube photomultiplicateur (PMT) et des détecteurs hybrides. Pour cette approche nous avons utilisé un détecteur hybride car beaucoup plus sensible qu'un tube

photomultiplicateur. Les images ont été reconstruites avec QuickPALM et analysées avec le logiciel ImageJ.

Dans le développement de cette technique nous avons rencontré quatre difficultés majeures.

La première étant le décollement des cellules rendant donc l'acquisition impossible. Ce problème a été résolu en utilisant un milieu de montage polymérisant: le ProLong-Gold.

Le deuxième problème rencontré était la dérive dans l'axe z pendant l'acquisition car il n'y a pas de système de mise au point automatique de maintien de focus sur le Leica SP8. Cette dérive est un souci important car en changeant de plan en z on n'a pas les mêmes informations d'un plan à un autre. On perd donc la structure de départ. Dans le but de nous affranchir de cette difficulté, un module de logiciel appelé "Live Data Mode" d'abord prêté par Leica, puis acheté a été utilisé.

Le troisième problème a été le faible photoblanchiment dans le milieu ProLong-Gold en raison de la faible intensité de laser utilisée. Pour obtenir un meilleur taux de photoblanchiment des molécules, nous avons donc dû augmenter le temps d'acquisition qui était supérieur à 1 h. Par conséquent plus le temps d'acquisition était long plus les données générées étaient lourdes allant jusqu'à 30 giga-octets (pour une acquisition).

La quatrième difficulté était liée à la génération de données de plusieurs dizaines de giga-octets, entraînant des temps d'analyse extrêmement longs. Pour exemple, la soustraction des images prenait plus de 10 min. Ensuite, la détection et l'ajustement gaussien pouvait prendre jusqu'à 45 min en utilisant le plugin de détection de particules : QuickPALM. Afin de contourner ce problème, le fichier initial a été découpé en plusieurs fichiers représentant chacun une région d'intérêt de taille plus petite, ce qui a permis de diviser le temps d'analyse par deux. Enfin, grâce à l'utilisation de billes fluorescentes les images ont pu être recalées lorsqu'une dérive en xy était notée.

## B. LFA-1 de conformation fermée s'organise en clusters de plusieurs centaines de nanomètres de diamètre au plan équatorial des lymphocytes T

Les résultats obtenus avec le BaLM ont permis de caractériser les clusters de LFA-1 dans les cellules Jurkat sur un plan équatorial au-delà de la résolution optique des approches d'imagerie de fluorescence conventionnelles (Figure 20). Sur la figure ci-dessous, le panel du haut à gauche montre l'image de transmission en DIC. L'image confocale nous montre une image des groupes de molécules non activées de LFA-1 sur le plan équatorial de la cellule. Sur le haut de la cellule on peut noter un regroupement de clusters de LFA-1 que nous sommes incapables de distinguer individuellement (Figure 20A). Par contre l'image BaLM nous permet de distinguer des clusters de taille plus petite et le regroupement de clusters de LFA-1 qui apparaissait sur l'image confocale se distingue comme étant plusieurs clusters séparés les uns des autres (Figure 20B). L'acquisition de 16730 images a été nécessaire pour obtenir l'image BaLM ci-dessous. L'image de gauche représente la superposition entre l'image confocale et l'image BaLM. En traçant une ligne sur la région où on note le regroupement de clusters de LFA-1, on peut clairement observer que la largeur à mi-hauteur dans l'image BaLM est trois fois plus petite que celle de l'image en microscopie confocale (Figure 20C et E). Sur la courbe de suivi de la disparition de l'intensité du signal (Figure 20D) on note bien un photoblanchiment, mais qui n'est pas total. On constate sur cette expérience que l'approche BaLM nous permet d'atteindre des gains de résolution d'un facteur 3 par rapport à la microscopie confocale.

Cependant notre expérience n'est pas optimale car nous perdons des informations du fait de la persistance de certaines molécules fluorescentes.

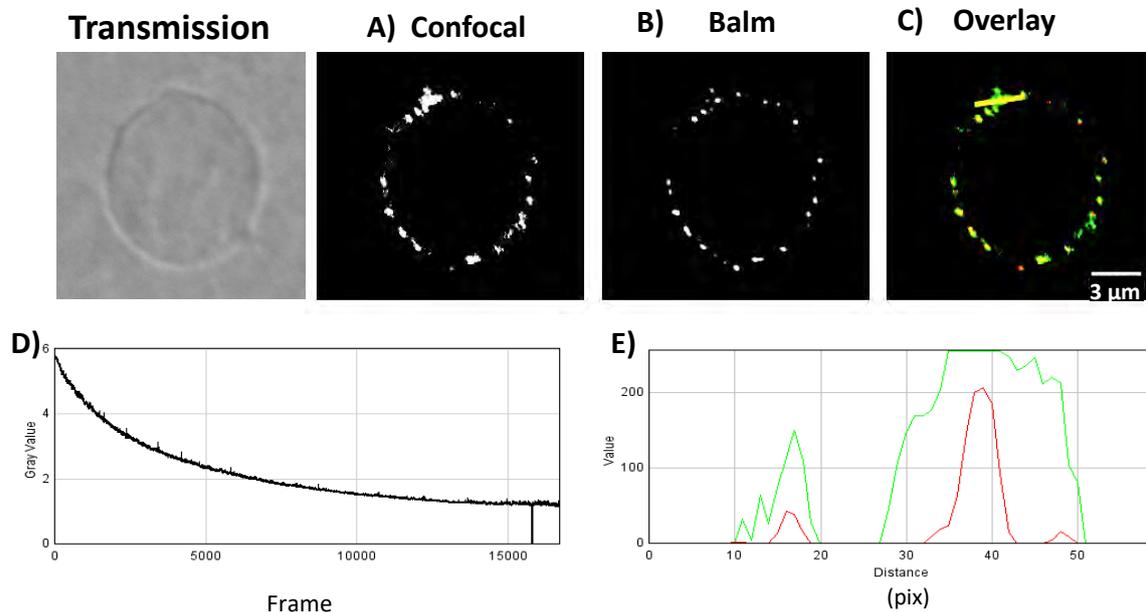


Figure 20 : Visualisation de LFA-1 fermée dans les cellules Jurkat par l'approche du BaLM. Les cellules ont été marquées avec un anticorps primaire anti LFA-1 totale: HI111 et révélée par un anticorps secondaire anti-IGg1 couplé à l'Alexa Fluor 568. Les lames ont été montées dans du Prolong-Gold. Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal SP8 avec une puissance laser à 2%, un zoom de 2,35, le gain du détecteur hybride à 70% et dans un format optimal (1024x1024). L'acquisition a duré plus de 12h avec 16730 images acquises. Les plugins d'imageJ stack T-fonction et Quick-PALM ont été utilisés pour la soustraction et la reconstruction. Les images correspondent au (A) l'image confocale, (B) la reconstruction BaLM et (C) l'overlay. (D) montre le profil du photobleaching tout au long de l'acquisition des images. (E) montre le plot profile de la portion de la surface cellulaire correspondant à la ligne tracée sur l'overlay (C).

Sur la base des acquisitions BaLM, nous avons estimé la taille des clusters de LFA-1. Pour cela nous avons procédé à une analyse de particules avec le logiciel ImageJ après un seuillage dans le but d'obtenir le diamètre le plus long (Ferret diameter) en nanomètre de chaque cluster de LFA-1. Les résultats ont été regroupés dans le tableau ci-dessous (Tableau 2) pour les 9 expériences BaLM réalisées (une cellule Jurkat à chaque fois). La taille moyenne estimée des clusters de LFA-1 est égale à 323 nm avec un écart-type moyen de 164 nm. En comparaison, la taille moyenne des clusters de LFA-1 estimée pour les images confocales correspondantes

est de 728 nm. Ce résultat suggère que l'approche BaLM a permis un gain moyen de résolution d'environ 2,25. En se concentrant sur les plus petites structures (voir Tableau 2, valeurs de taille minimale), le diamètre de cluster de LFA-1 le plus petit identifié est de 84,96 nm. En comparaison avec les images confocales respectives la taille minimale est de 291 nm. L'approche du BaLM a permis un gain de résolution d'environ 3.4 pour les petites structures. La valeur de la taille minimale dans ce tableau montre la reproductibilité dans l'approche BaLM et cela pourrait avoir deux sens. La première signification est que la taille moyenne minimale des nano-clusters de LFA-1 ne peut pas être moins de 84,96nm et entraîne une limitation de l'approche BaLM. La deuxième signification suggère que l'approche BaLM (que nous avons développée), sa limite de résolution est de 84,96 nm.

Experiments	Mean size ((nm)	Standard deviation	Minimum size	Maximum size	Number of clusters
BaLM 1	311.45	157.48	85.03	685.54	27
BaLM 2	326.94	142.81	85.01	726.38	52
BaLM 3	391.60	157.35	84.86	782.32	93
BaLM 4	401.09	233.69	84.94	1035.86	22
BaLM 5	413.5	267.53	85.0	1334.4	34
BaLM 6	189.74	130.38	84.86	483.75	27
BaLM 7	379.4	181.42	85.0	933.1	60
BaLM 8	233.80	107.37	85.01	517.08	119
BaLM 9	259.58	103.52	84.96	627.17	60
Conf 1	429	387.47	284	1908.0	31
Conf 2	810.3	1335.83	108.0	8731.0	32
Conf 3	346.1	625.44	385.0	5064.0	17
Conf 4	662.2	3159.0	495.0	5114.0	8
Conf 5	537.0	894.24	108.0	4589.0	30
Conf 6	677.9	729.31	217.0	4242.0	46
Conf 7	1285.8	2163.7	276.0	7682.0	18
Conf 8	887.4	527.44	364.0	2094.0	37
Conf 9	860.0	617.67	383.0	5215.0	83

Tableau 2 : Comparatif des tailles de clusters obtenues avec la technique du BaLM en regard de la microscopie confocale

### C. Conclusions et limites

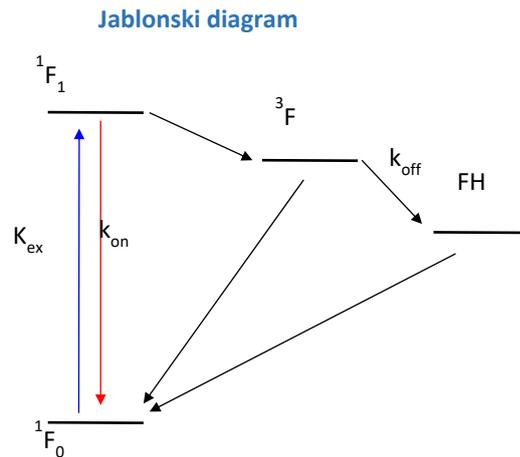
Bien que le BaLM semble être la plus simple des approches de super-résolution qui nous permettent d'apprécier l'organisation en clusters des molécules de LFA-1, les défis sont

nombreux pour réussir à réaliser une expérience BaLM remplissant toutes les conditions requises pour nos échantillons. Entre autres parmi les difficultés liées à cette approche, nous avons pu observer que LFA-1 de conformation fermée sans stimulation ICAM-1 ou TCR, était organisée en nano-clusters de quelques centaines de nanomètres de diamètre à la surface de cellules Jurkat non stimulées. Nous sommes parvenus à atteindre une résolution suffisante pour apprécier individuellement les nano-clusters de LFA-1 avec une résolution qui est trois fois meilleure comparée à la microscopie confocale. En revanche, plusieurs soucis non-négligeables restent à régler comme le mouvement axial lors des acquisitions, le temps d'acquisition et de reconstruction qui sont très longs et la génération de données très lourdes nécessitant des quantités importantes d'espace de stockage. Pour ces raisons nous avons abandonné l'extension de la technique en multicolore et sommes passés à la mise en place d'autres approches plus adaptées.

## II. La technique du dSTORM

Pour rappel, le dSTORM (direct STochastic Optical Reconstruction Microscopy) consiste à faire clignoter des molécules fluorescentes de manière stochastique (blinking), après les avoir fait passer dans un état de non fluorescence appelé état noir (dark state), grâce à un tampon particulier contenant un réducteur <sup>24</sup>. En effet le dSTORM est basé sur les propriétés de clignotement de certaines sondes fluorescentes et leur capacité à photo-commuter réversiblement à partir d'un état de fluorescence (en rouge sur le schéma, F, Figure 21) avec un taux de transfert de photons  $k_{on}$  vers un état noir stable (FH) avec un taux de transfert de photons  $k_{off}$  (diagramme de Jablonski, Figure 21). Le transfert vers un état noir et le photo-clignotement sont contrôlés par la puissance du laser et la composition du tampon de montage de l'échantillon. Le passage à l'état noir nécessite un tampon avec une propriété redox. Il contient un réducteur appelé MEA pour  $\beta$ -mercaptoéthylamine et des piègeurs d'oxygène - Glox (Glucose, glucose oxydase et catalase). Les avantages de cette technique sont: l'utilisation de

certaines sondes fluorescentes communes et le gain en résolution permettant d'obtenir des résolutions à l'échelle de la molécule unique. Comme l'approche du BaLM ne permettait pas d'atteindre une résolution satisfaisante pour distinguer des molécules individuelles, nous avons entrepris de développer l'approche du dSTORM afin d'établir la distribution de la molécule de LFA-1 à la surface des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.



*Figure 21: Diagramme de Jablonski représentant les états d'oscillation des molécules fluorescentes en dSTORM*

## A. Stratégie expérimentale

Pour mieux visualiser les molécules de LFA-1 avec une résolution qui se rapproche de celle de la molécule unique, nous avons choisi de développer le dSTORM puisque la résolution latérale théorique est de 10 à 20nm et la précision de localisation est inférieure à 10nm. Pour commencer, nous avons appliqué cette approche sur des lignées cellulaires qui sont adhérentes au verre, les fibroblastes HFF. L'étalement des cellules permet de bien distinguer les cytosquelettes d'actine et de tubuline. Les filaments d'actine et les microtubules constituent des structures idéales pour estimer la résolution de notre approche de dSTORM car leurs tailles sont connues. L'épaisseur d'un filament d'actine est d'environ 7 à 10nm et celle d'un filament de microtubule est d'environ 25nm. Pour la mise en place de notre approche nous avons utilisé des

lamelles en verre sur lesquelles des cellules HFF ont été déposées, nous les avons laissées s'étaler puis marquées avec l'anticorps anti-tubuline alpha afin de révéler les microtubules. Comme anticorps secondaire, nous avons utilisé un anti-IgG1 couplé à l'Alexa Fluor 647. Le choix de l'Alexa Fluor 647 est basé sur le nombre important du « duty cycle »<sup>12</sup>. Le système utilisé pour l'acquisition des images dSTORM est un Nikon TI-E muni d'un objectif 100x (oil immersion) inversé avec une ouverture numérique de 1.4. Les lasers intégrés vont de 405nm à 663nm. Le setup est équipé de deux caméras Evolve EMCCD et d'une caméra sCMOS. Pour cette approche nous avons utilisé une EMCCD qui permet de recueillir plus de photons par pixel grâce à une taille de pixel plus grande (16µm/pixel) et un meilleur rapport signal sur bruit. Pour réaliser nos expériences nous avons testé quatre tampons de montage différents: Vectashield-H1000, MEA-glox-catalase, NPG-DABCO et GSSH. Nous nous sommes finalement rendu compte comme expliqué dans les travaux de Dempsey (Tableau 3) que le MEA-glox-catalase était le tampon le plus adapté pour la mise en place de notre approche. Les images ont ensuite été reconstruites avec le module WaveTracer<sup>194</sup> et analysées par les logiciels MetaMorph et QuickPALM d'ImageJ pour une comparaison.

Dye	Excitation Maximum (nm)	Emission Maximum (nm)	Extinction ( $M^{-1} cm^{-1}$ )	Quantum Yield	Detected Photons Per Cycle		Equilibrium Duty Cycle		Survival Fraction (400 s)		# Switching Cycles (Mean)	
					MEA	$\beta$ ME	MEA	$\beta$ ME	MEA	$\beta$ ME	MEA	$\beta$ ME
Alexa 647	650	665	239,000	0.33	3,823	5,202	0.0005	0.0012	0.83	0.73	14	26
Cy5	649	670	250,000	0.28	4,254	5,873	0.0004	0.0007	0.75	0.83	10	17
Atto 647	645	669	120,000	0.2	1,526	944	0.0021	0.0016	0.46	0.84	10	24
Red-absorbing Atto 647N	644	669	150,000	0.65	3,254	4,433	0.0012	0.0035	0.24	0.65	9	39
Dyomics 654	654	675	220,000	-	3,653	3,014	0.0011	0.0018	0.79	0.64	20	19
Atto 655	663	684	125,000	0.3	1,105	657	0.0006	0.0011	0.65	0.78	17	22
Atto 680	680	700	125,000	0.3	1,656	987	0.0019	0.0024	0.65	0.91	8	27

Tableau 3: Caractéristiques des fluorophores excitables dans le rouge lointain. (Dempsey et al. 2011)<sup>12</sup>

Pour la mise en place de l'approche du dSTORM nous avons donc utilisé des fibroblastes HFF sur lesquels nous avons marqué avec des anticorps l'alpha-tubuline pour révéler les microtubules. Les HFF sont des cellules qui adhèrent à la lamelle directement. Sur la figure ci-dessous les panels du haut représentent l'image des microtubules en microscopie de champ large et les panels du bas l'image de microscopie de dSTORM. Sur l'image de microscopie de champ large en vert (image diffractée) on peut constater à travers le zoom fait dans une région d'intérêt peu dense en microtubules que les structures sont floues. Par contre sur l'image dSTORM en rouge feu (panel du bas, Figure 22) les structures sont plus fines et apparaissent nettement. Pour cette acquisition un nombre de 20 000 images a été acquis et la reconstruction a été faite avec une taille de pixel de 10nm. En faisant un zoom dans la même région d'intérêt que dans l'image diffractée, on arrive à distinguer les filaments de tubulines et surtout là où ils apparaissaient comme un seul filament on dénombre plusieurs filaments les uns à côté des autres. En traçant une ligne sur une région correspondant à la même structure dans les deux images, on se rend compte que la largeur à mi-hauteur dans l'image dSTORM (graphique du bas, Figure 22) est huit fois plus petite que la largeur à mi-hauteur dans l'image de microscopie de champ large. Cette observation signifie que l'épaisseur des microtubules sur l'image dSTORM est d'environ 50nm comparé à 400nm en microscopie de champ large. Sachant que l'étude des microtubules a révélé que les filaments mesurent 25 nm d'épaisseur<sup>195</sup>, notre résultat se rapproche de cette taille puisque dans notre étude nous avons utilisé des anticorps primaires

et secondaires dont l'encombrement stérique augmente l'épaisseur apparente des microtubules.

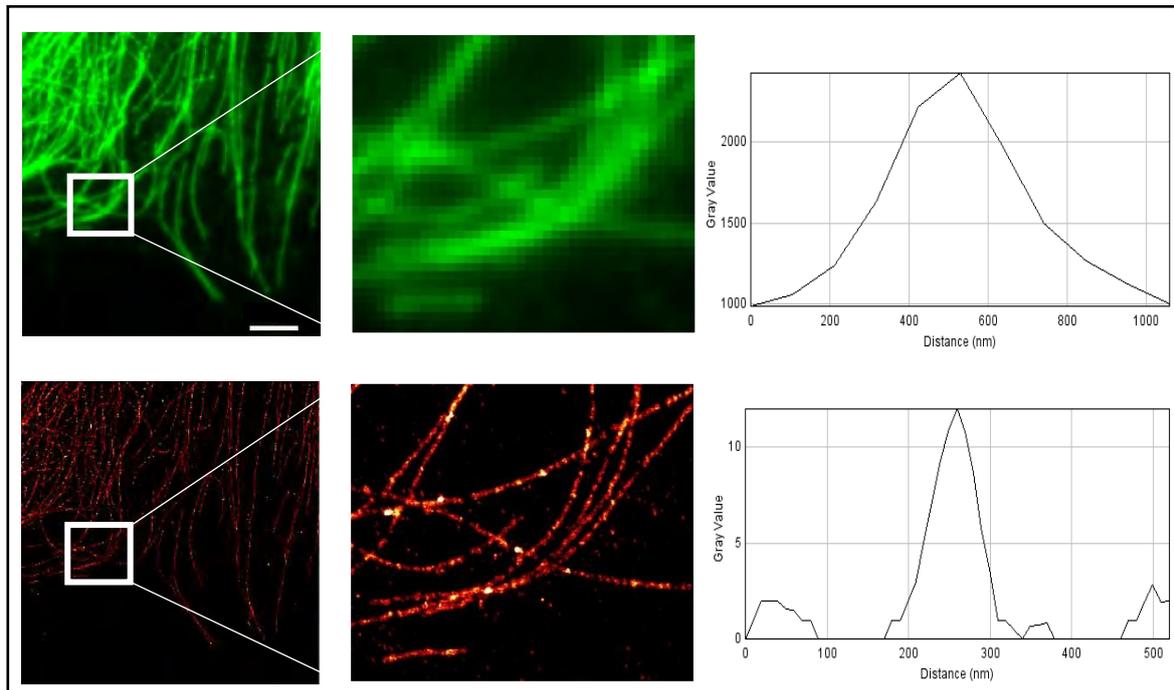
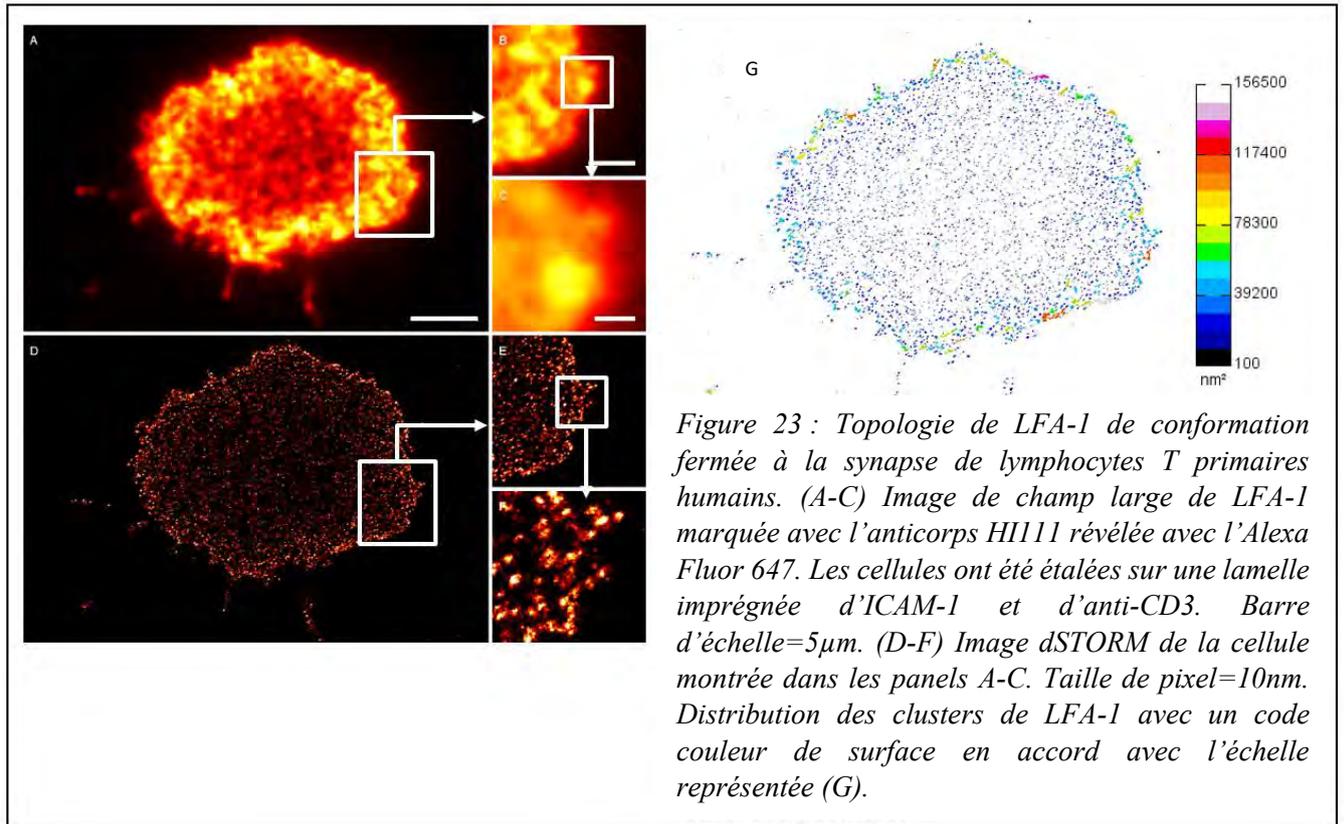


Figure 22 Visualisation de l' $\alpha$ -tubuline dans des lignées cellulaires HFF. (A-B) Image de fluorescence en Wild field du réseau de microtubule (anticorps anti- $\alpha$ -tubuline) marqué à l'Alexa Fluor 647 dans les HFF, étalées sur une lamelle de verre. Barre d'échelle=5 $\mu$ m. (D-F) Image dSTORM du réseau montré dans les panels A-B. Taille de pixel=10nm. (E) Plot profile sur un filament de microtubule montré dans le panel (A). FWHM=400nm. (F) plot profile sur un filament de microtubule montré dans le panel (C). FWHM=50nm.

Par la suite, nous avons appliqué l'approche du dSTORM aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> primaires pour étudier l'organisation des clusters de LFA-1 à leur surface suite à un étalement sur un coating combinant ICAM-1 et anti-CD3 pour induire la formation de la synapse. Les expériences ont été menées dans les conditions où seule la conformation de LFA-1 a été marquée avec HI111 en anticorps primaires et révélée par un anticorps secondaire anti-IgG1 couplé à l'Alexa Fluor 647. Les lamelles ont été montées dans un tampon ne contenant que du MEA car parmi tous les tampons testés c'est celui qui a montré un blinking et un passage à l'état noir optimum. A partir de ce point, toutes les acquisitions dSTORM ont été réalisées avec du MEA seul. Un nombre de 20 000 images a été acquis. La reconstruction a été faite avec une taille de pixel de 10nm. Les résultats ont permis d'établir la topologie des clusters de LFA-1

fermée et de déterminer leur taille et leur nombre. Les panels du haut de la figure ci-dessous (Figure 23) représentent une image diffractée prise en microscopie de champ large d'une cellule étalée de façon radiale formant la synapse immunologique (Figure 23A-C). En révélant la conformation fermée de la molécule de LFA-1, on note une distribution avec une intensité du signal plus forte à la périphérie de la cellule et moyennement faible vers l'intérieur de la cellule (Figure 23A). Des zooms sur des régions d'intérêt nous permettent de nous rendre compte qu'avec la microscopie de champ large on n'est pas capable de distinguer les clusters de LFA-1 du fait de la diffraction (Figure 23B-C). En effet nous ne distinguons qu'une grande et très intense structure diffractée. En revanche sur les panels du bas (Figure 23D-F) on distingue une distribution de petites structures à la surface de la cellule avec un regroupement plus intense formant une sorte de ligne peu épaisse à la périphérie de la cellule (Figure 23D). Le zoom intermédiaire (Figure 23E) nous permet de distinguer des structures ponctiformes. Par contre le zoom le plus grand (Figure 23F) nous permet de distinguer des clusters de molécules, ce qui nous porte à dire que le dSTORM que nous avons mis en place est suffisamment résolu pour nous permettre d'apprécier la taille des clusters de LFA-1. Le panel G nous permet de discriminer les clusters de LFA-1 selon un code couleur correspond à des tailles données en  $\text{nm}^2$  (la surface des clusters). Nous sommes capables de distinguer des tailles allant du magenta (environs  $120000 \text{ nm}^2$ ) à la périphérie cellulaire jusqu'au bleu (supérieur à  $100 \text{ nm}^2$ ) au centre de la cellule.



## B. Conclusion et limites

L'approche du dSTORM que nous avons mise en place nous permet d'atteindre des résolutions qui sont 8 fois meilleures que la microscopie de champ large comme mesurées précédemment sur les images dSTORM de la tubuline. De plus, elle permet d'apprécier les nano-clusters de LFA-1 à la surface des lymphocytes T primaires. Toutefois, il nous manque des outils dédiés à l'analyse des clusters moléculaires dans notre expérience pour mieux apprécier et définir la présence de clusters de LFA-1.

De plus, dans notre acquisition nous avons utilisé une illumination en champ large ce qui veut dire que le bruit de fond diffusé est très important. En d'autres termes, le signal que nous récupérons provient de plusieurs plans de notre cellule. Par ailleurs des artéfacts liés à la densité

des marquages, à la perméabilisation ou à la fixation sont possibles<sup>196</sup>. Il faut donc être vigilant à la préparation des échantillons comme à l'acquisition et à la reconstruction.

### III. La technique du PALM

Ainsi que nous l'avons rappelé en introduction, la localisation et l'efficacité d'activation de la molécule de LFA-1 est en étroite relation avec le cytosquelette d'actine<sup>178</sup>. Nous avons donc cherché à comprendre comment ces deux structures pouvaient interagir au niveau de la synapse immunologique. Pour ce faire, nous avons souhaité développer l'approche du PALM pour visualiser les filaments d'actine en combinaison du dSTORM afin de visualiser les molécules de LFA-1.

Le PALM (PhotoActivable Localization Microscopy) consiste à faire exprimer une protéine fluorescente capable d'être photoconvertie d'une longueur d'onde à une autre par photoconversion de manière stochastique<sup>5</sup>. Dans notre étude nous avons utilisé une protéine photoconvertible appelée la Dendra-2 dérivée de la GFP<sup>197</sup>. Cette protéine habituellement excitée à la même longueur d'onde que la GFP, est capable de passer d'une émission de fluorescence dans le vert à une émission dans le rouge. Le passage d'un état à un autre nécessite l'utilisation d'un laser d'activation 405 par une faible illumination. Le laser d'activation induit des modifications chimiques qui sont responsables des variations spectrales<sup>198</sup>

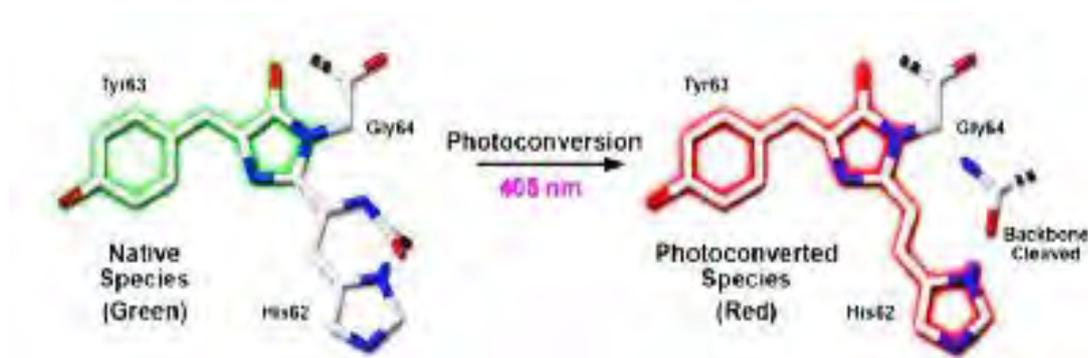


Figure 24: Structure du chromophore de la Dendra-2. (Shaner et al.2007)<sup>199</sup>

## A. Stratégie expérimentale

Afin d'obtenir une description encore plus fine du cytosquelette d'actine nous souhaitons faire exprimer une protéine fluorescente la Dendra-2, fusionnée avec un peptide capable de se lier à l'actine : Lifeact<sup>200</sup> qui est couramment utilisé pour la visualisation de l'actine. L'expression d'une protéine fluorescente plutôt que l'emploi des anticorps nous permet d'être plus précis notamment dans la quantification des molécules uniques. La protéine photoconvertible dendra-2 émet dans le vert (507nm) avant la photoconversion puis dans le rouge (573 nm) après la photoconversion.

Après amplification et purification du plasmide contenant la fusion Dendra-2 / Lifeact, nous avons procédé à la transfection de fibroblastes HFF avec de la lipofectamine comme agent transfectant. Peu de cellules ont été transfectées. Nous avons, ensuite, décidé d'appliquer la transfection sur des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> primaires fraîchement purifiés du sang de donneurs sains. Le plasmide a été introduit dans ces cellules par électroporation, en utilisant le nucléofacteur AMAXA. Cette dernière étape nous a permis de réaliser des expériences de migration des lymphocytes T en réponse à un gradient de chimiokine afin d'étudier le remodelage du cytosquelette d'actine, la vitesse de migration et la morphologie cellulaire. Ces expériences ont fait l'objet d'une revue dans *Frontiers*<sup>137</sup> jointe en annexe. Par la suite nous avons dû comparer le produit de fixation adéquat pour nos cellules. Dans notre étude nous avons opté pour le paraformaldéhyde à 4%. Le milieu de montage utilisé est le même que celui du dSTORM. Pour notre étude nous avons voulu dans un premier temps mettre en place le PALM sur notre plateforme en utilisant le même système d'imagerie que celui utilisé pour le dSTORM. L'illumination de l'échantillon avec le laser 488 nm excite la Dendra-2 dans le vert, l'ajout du laser d'activation 405 nm induit une photoconversion. Simultanément l'illumination de la même protéine avec le laser 561 nm entraîne une émission dans le rouge. Malheureusement les

lasers que nous possédons ne sont pas assez puissants pour réaliser la photoconversion des molécules de manière stochastique.

## B. Conclusion et limites

L'équipement que nous possédons manque de puissance au niveau du laser 561 nm, pour réaliser correctement la photoconversion stochastique. Un temps d'optimisation plus long que prévu est nécessaire. En conséquence, cette méthode ne sera pas optimisée pendant les trois années de thèse.

## IV. dSTORM multicolore

Ensuite nous nous sommes demandés s'il ne serait pas plus intéressant d'étendre le dSTORM en deux ou trois couleurs pour mieux répondre aux questions suivantes :

- la distribution de la molécule de LFA-1 à la synapse immunologique,
- l'organisation de cette molécule en lien avec l'architecture du cytosquelette d'actine
- la distribution des molécules de LFA-1 selon leur conformation fermée ou activée à la synapse.

Dans un premier temps nous avons souhaité visualiser l'organisation des différentes conformations de LFA-1 à la surface des lymphocytes T en lien avec le cytosquelette d'actine. Nous avons envisagé la mise en place du dSTORM deux couleurs afin de pouvoir étudier avec précision les molécules de LFA-1 dans les cellules normales et dans les cellules déficientes en WASP provenant de patients WAS. Nous avons commencé par le dSTORM deux couleurs pour l'étude de l'organisation de la conformation fermée et activée de LFA-1, l'objectif étant de visualiser avec précision la localisation et la distribution des molécules en fonction de leurs conformations.

En parallèle de la combinaison du dSTORM avec le PALM, nous avons profité de l'installation d'un système d'acquisition ELYRA-PS (Zeiss) sur la plateforme d'imagerie du site de Ranguel (partenaire de notre plateforme) pour mettre en place une approche dSTORM deux couleurs. Ce système est dédié et construit pour la super-résolution. Par conséquent la puissance des lasers est plus élevée et adéquate pour une utilisation dans les approches de super-résolution comme le dSTORM et le PALM. Théoriquement, il est possible de mettre en place une approche dSTORM multicolore avec ce nouvel équipement. Cependant, il faut employer une seule et même solution tampon qui permette la permutation entre l'état noir et l'état de fluorescence pour les différentes molécules de fluorescence utilisées. Nous avons d'abord commencé avec le tampon utilisé pour le dSTORM une couleur en gardant les mêmes concentrations et le même pH.

Dans notre étude nous avons utilisé, comme modèle cellulaire, des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> étalés sur des lamelles imprégnées d'ICAM-1 et d'anticorps anti-CD3 pour former la synapse immunologique. Pour révéler la conformation fermée de LFA-1 nous avons utilisé l'anticorps HI111 couplé à l'Alexa Fluor 488 (en vert) et l'anticorps A24 couplé à l'Alexa Fluor 647 (en rouge) pour révéler la conformation de haute affinité. Sur la Figure 25, le schéma illustre les différents sites de liaison des anticorps employés au cours dans ce projet. L'anticorps HI111 se lie au  $\alpha$ L domaine empêchant l'ouverture de la molécule (en violet). L'anticorps A24 se lie au I domaine  $\beta$ , accessible seulement sous la conformation ouverte de la molécule (m24 en vert). L'anticorps TS2/4 permet de révéler toutes les conformations de LFA-1 et Kim127 (qui ne sera

jamais utilisé dans ce projet) permet de révéler les conformations d'affinité intermédiaire et de haute affinité.

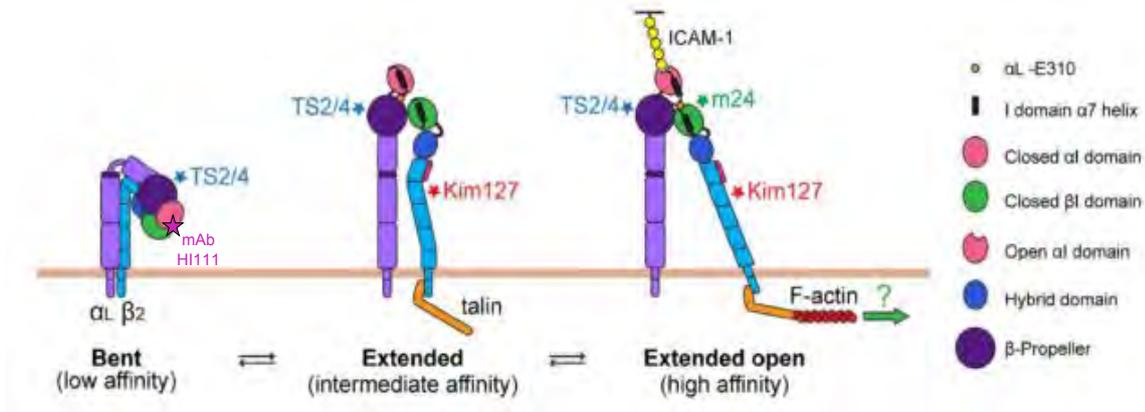


Figure 25: Schéma représentant les sites de liaisons des anticorps utilisés pour notre étude (Comrie et al. 2015)<sup>178</sup>

Dans la Figure 26, le panel du haut représente un lymphocyte T CD8<sup>+</sup> provenant d'un donneur normal. 20 000 images ont été acquises et la taille des pixels des images reconstruites est de 20 nm. Le premier cadran en haut à gauche représente une image en transmission de la cellule sur laquelle on peut voir la cellule étalée avec un lamellipode autour de ce qui représente le noyau. En premier lieu, on note que la distribution de LFA-1 des deux conformations en nano-clusters forme un anneau à la surface de la synapse. En zoomant sur l'image de superposition des deux conformations, on s'aperçoit que les nano-clusters de LFA-1 de conformation fermée (vert) se distinguent des nano-clusters de LFA-1 de haute-affinité (rouge). Nous observons au voisinage des clusters rapprochés, une zone de recouvrement partiel (apparaissant en jaune). En outre, il est intéressant de noter que dans le cas des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de patients WAS, la cellule n'est pas entourée par une structure de type lamellipode et LFA-1 est organisée en nano-clusters mais ces nano-clusters ne sont pas regroupés en anneau. De plus les bords de la cellule sont marqués par des regroupements de nano-clusters moléculaires formant des bords francs. Enfin

les nano-clusters des différentes conformations sont bien séparés. On observe soit du vert soit du rouge mais avec très peu de zones de contact. Nous pouvons donc en déduire que les nano-clusters de LFA-1 fermée sont distincts des nano-clusters de LFA-1 de haute-affinité.

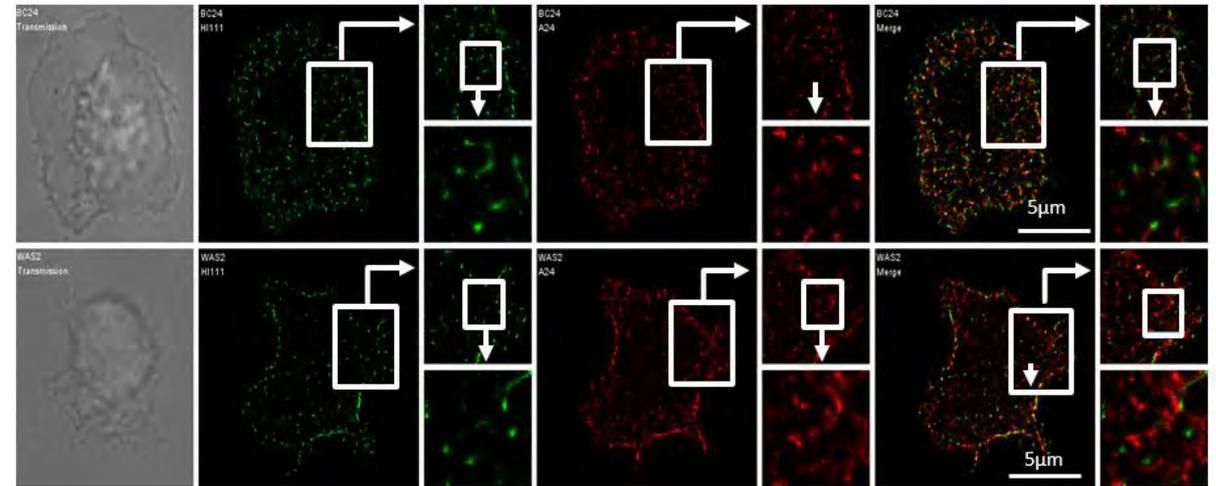


Figure 26 : Distribution de LFA-1 dans les lymphocytes T primaires de donneurs normaux et de patients WAS. Image de la distribution de LFA-1 non-activée et activée en double dSTORM. Taille de pixel=20nm

## A. Conclusion et limites

LFA-1 s'organise en clusters formant un anneau (ceinture) à l'échelle cellulaire et les conformations fermée et ouverte constituent des clusters distincts. Toutefois, avec le dSTORM deux couleurs, nous notons des traînées (en forme de comète) qui nous laisseraient penser que nos images dSTORM avec le fluorophore Alexa Fluor 488 ne sont pas optimales et que notre fluorophore photoblanchit après acquisition de l'Alexa Fluor 647.

## V. La technique du SIM multicouleur

Pour les raisons évoquées ci-dessus la combinaison du dSTORM avec le PALM ou le double dSTORM sont des techniques qui permettraient d'atteindre des précisions de localisation très intéressantes et en adéquation avec notre étude. Cependant, face aux difficultés rencontrées, nous avons souhaité mettre en place l'approche de la microscopie à illumination structurée

(SIM) en plusieurs couleurs pour avancer plus rapidement dans notre projet. Tous les résultats obtenus avec cette approche ont fait l'objet de deux articles, l'un est joint dans les résultats ; l'autre est joint en annexe.

## **VI. Méthodes quantitatives d'analyse des clusters** de molécules

Avec le développement de la microscopie de localisation de molécules uniques, des outils d'analyse permettant de travailler sur des points de localisation ont vu le jour. Ces outils consistent à utiliser les coordonnées (x,y) des centres de masse de chaque molécule détectée afin d'être très précis sur les objets analysés. Ils sont basés sur des fonctions mathématiques connues depuis de longue date. La plus utilisée dans notre domaine étant la fonction de K-Ripley. La fonction de K-Ripley est basée sur la recherche du plus proche voisin, à savoir la distance qui sépare un point de son voisin<sup>201</sup>. Ces méthodes permettent une estimation qualitative de la taille des domaines lorsqu'il s'agit d'amas. Nous pouvons par exemple citer les travaux menés sur les clusters de Lck kinase ou du TCR qui ont inspirés notre démarche. Grâce à ses travaux nous savons actuellement que le TCR est organisé en nano-clusters à la synapse immunologique<sup>34,202,203</sup>. Dans le cadre de notre étude nous avons voulu évaluer deux méthodes : une méthode d'analyse des images TIFF et une méthode d'analyse des point de localisation.

La première méthode développée consiste à analyser les clusters à travers le logiciel d'ImageJ (Image processing and analysis in Java). Cette analyse est basée sur les images TIFF de reconstruction. Après binarisation des images, on procède ensuite à la détection des objets. Les plus petits objets correspondent à un pixel et les plus gros sont représentés par des pixels en continuité. Cette méthode permet d'accéder au nombre de nano-clusters, à leur taille, à leur forme et à bien d'autres paramètres.

La deuxième méthode est basée sur les coordonnées des points de localisation et sur la densité de ces points. Cette méthode a été introduite en 1992 par Ester et s'appelle DBSCAN (Density Based Spatial Clustering of Applications with Noise). Dans notre étude nous avons implémenté le code dans R (URL <http://www.R-project.org/>). L'algorithme prend en compte un rayon maximum autour d'un point appelé epsilon (Eps) et un minimum de points formant un cluster appelé MinPts (points minimums). A partir de ces critères, des points sont considérés comme un cluster si la distance qui sépare un point d'un autre de part et d'autre est inférieure ou égale à Eps et si le MinPts est atteint ou dépassé. Les points éloignés par une distance supérieure à Eps de part et d'autre sont considérés comme étant des points isolés, donc du bruit. Cette méthode nous permet d'accéder au nombre de clusters, à la taille de chaque cluster, au nombre de molécules isolés et au nombre de localisations dans chaque cluster.

## Résultats

## La protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich contrôle **l'organisation de la ceinture de LFA-1** activé à la synapse lytique

Le but de notre projet a été d'étudier l'organisation précise de la distribution de LFA-1 à la synapse immunologique des lymphocytes T cytotoxiques en relation avec l'actine corticale sous-jacente. Le modèle d'étude est composé de lymphocytes T humains normaux non transformés et de lymphocytes T de patients atteints d'une immunodéficience congénitale, le Syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), dans lequel le cytosquelette d'actine présente des défauts de remodelage.

Par l'emploi de l'approche de microscopie de dSTORM nous avons montré que LFA-1 activée forme une ceinture radiale composée de centaines de nano-clusters et que le maintien de la structure de l'actine était important pour la formation de cette ceinture. En effet, à la synapse immunologique des cellules de patients WASP déficients, la ceinture de LFA-1 n'était pas complète et la densité des nano-clusters était réduite. Puis nous avons utilisé l'approche de SIM multicolore qui nous a permis de révéler que la ceinture de LFA-1 était importante pour le confinement des granules lytiques.

Finalement nos résultats indiquent que la protéine WASP est très importante pour la distribution spatiale de LFA-1 et pour l'efficacité lytique opérée par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Ce travail a fait l'objet de la rédaction d'un article qui est présenté ci-dessous dans la version du 29 Mai 2017 soumis au journal Cell Reports.

# 1       **The Wiskott-Aldrich syndrome protein controls the** 2                   **LFA-1 nanocluster belt at the lytic synapse**

3  
4   **Raïssa Houmadi, MSc,<sup>1,2,3,\*</sup> Delphine Guipouy, MSc,<sup>1,2,3,4,\*</sup> Javier Rey-Barroso, PhD,<sup>1,2,3</sup>**  
5   **Zilton Vasconcelos, PhD,<sup>5</sup> Julie Cornet, BSc,<sup>2,6</sup> Manoel Manghi, PhD,<sup>2,6</sup>**  
6   **Nicolas Destainville, PhD,<sup>2,6</sup> Salvatore Valitutti, MD, PhD,<sup>1,2,3,7</sup> Sophie Allart, PhD,<sup>1,2,3</sup> and**  
7   **Loïc Dupré, PhD<sup>1,2,3,8,9,#</sup>**

8  
9   <sup>1</sup>INSERM, UMR 1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, 31300 Toulouse, France

10   <sup>2</sup>Université Toulouse III Paul-Sabatier, 31062 Toulouse, France

11   <sup>3</sup>CNRS, UMR 5282, 31300 Toulouse, France

12   <sup>4</sup>TxCell, Allée de la Nertière, Valbonne Sophia-Antipolis, France

13   <sup>5</sup>Fernandes Figueira Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

14   <sup>6</sup>CNRS, UMR 5152, Institut de Recherche sur les Systèmes Atomiques et Moléculaires Complexes,  
15       Laboratoire de Physique Théorique, Toulouse, France

16   <sup>7</sup>Department of Pathology, Institut Universitaire du Cancer-Oncopole de Toulouse, Toulouse France

17   <sup>8</sup>Ludwig Boltzmann Institute for Rare and Undiagnosed Diseases, Vienna, Austria

18   <sup>9</sup>CeMM Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria

19  
20   \*RH and DG contributed equally to the study

21  
22   #Correspondence:

23   Loïc Dupré, INSERM UMR 1043 - CPTP, Purpan University Hospital,

24   1 place du Dr Baylac, 31300 Toulouse, France

25   e-mail: loic.dupre@inserm.fr

1

**26 Summary**

27 T lymphocyte cytotoxicity relies on a synaptic ring of LFA-1, which permits polarized delivery of  
28 lytic granules. How LFA-1 organization is controlled by underlying actin cytoskeleton dynamics  
29 is poorly understood. We here explored the contribution of the actin cytoskeleton regulator WASP  
30 to the topography of LFA-1 using a combination of microscopy modalities. We uncover that the  
31 reduced cytotoxicity of Wiskott-Aldrich syndrome patient-derived CD8<sup>+</sup> T lymphocytes lacking  
32 WASP is associated to reduced LFA-1 activation, unstable synapse and delayed lethal hit. At the  
33 nanometric scale, WASP constrains high-affinity LFA-1 into dense nanoclusters located in actin  
34 meshwork interstices. At the cellular scale, WASP is required for the assembly of a radial belt  
35 composed of hundreds LFA-1 nanoclusters and for lytic granule docking within this belt. Our study  
36 unravels the nanoscale topography of LFA-1 at the lytic synapse and identifies WASP as a  
37 molecule controlling individual LFA-1 cluster density and LFA-1 nanocluster belt integrity.

38

39

40

41

42

43

**44 Key words**

45 Wiskott-Aldrich syndrome protein, cytotoxic T lymphocytes, immunological synapse, actin  
46 cytoskeleton, LFA-1, lytic granules, super-resolution microscopy

**47 Highlights**

- 48 ● High-affinity LFA-1 is organized into a nanocluster belt at the CD8<sup>+</sup> T cell synapse
- 49 ● LFA-1 nanoclusters locate in the interstices of the actin cytoskeleton meshwork
- 50 ● WASP controls LFA-1 organization into individual nanoclusters and cluster belt

51

**52 eTOC Blurb**

53 A hallmark of the synapse between cytotoxic T cells and target cells is the assembly of a LFA-1  
54 ring. Using super-resolution microscopy approaches, Houmadi et al. report that the LFA-1 ring is  
55 composed of nanoclusters embedded in the actin cytoskeleton and identify the pivotal role of  
56 WASP in LFA-1 topography.

57

**58 Abbreviations**

59 CTL: Cytotoxic T Lymphocytes, dSTORM: direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy,  
60 gMFI: geometric Mean Fluorescence Intensity, LFA-1: Lymphocyte Function-associated Antigen  
61 1, SIM: Structured illumination microscopy, TIRFM: Total Internal Reflection Fluorescence  
62 Microscopy, WAS: Wiskott-Aldrich Syndrome, WASP: Wiskott-Aldrich Syndrome Protein

63

**64 Introduction**

65 The integrin LFA-1 was initially identified in a screen of antibodies that blocked the lytic activity  
66 of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes (CTL) (Davignon et al., 1981). In these cells, LFA-1 is required  
67 both for the conjugation with antigen-presenting cells and for the confined delivery of cytotoxic  
68 molecules. Indeed, CTL lytic granules are delivered in a secretory domain lying between the center  
69 of the synapse enriched in signaling molecules and a peripheral ring of LFA-1 (Stinchcombe et al.,  
70 2001). In agreement with the requirement to confine lytic granule delivery with high fidelity, CD8<sup>+</sup>  
71 T cells have been shown to form fivefold more LFA-1 ring junctions than CD4<sup>+</sup> T cells (Somersalo  
72 et al., 2004). In the context of the T cell immunological synapse, LFA-1 clusters accumulate over  
73 time at the inner side of the lamellar actin network to form a peripheral ring (Yi et al., 2012;  
74 Anikeeva et al., 2005). The lateral force provided by the actin retrograde flow has been  
75 hypothesized to drive integrin activation by separating  $\alpha$ - and  $\beta$ -integrin cytoplasmic tails (Zhu et  
76 al., 2008). In accordance, LFA-1 under the extended conformation localizes to the synapse outer  
77 ring, while the open conformation is enriched in a more central ring (Comrie et al., 2015). Initial  
78 analysis of LFA-1 topography at the surface of T cells has provided the view that LFA-1 activation  
79 results from the assembly of micrometer-scale domains (Kaizuka et al., 2007). However, recent  
80 super-resolution microscopy approaches have revealed that LFA-1 rather assembles into  
81 nanometer-scale clusters (Baumgart et al., 2016; Murugesan et al., 2016). The mechanisms that  
82 control the organization of LFA-1 into a ring-like structure and that confine LFA-1 into  
83 nanoclusters remain to be elucidated.

84 In this work, we tested the hypothesis that the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) might  
85 be a major player in the control of LFA-1 activation and organization in CTL. WASP is a  
86 hematopoietic-specific actin cytoskeleton regulator that sets immunological synapse stability and

87 TCR activation threshold in CD4<sup>+</sup> T cells (Calvez et al., 2011; Dupré et al., 2002; Sims et al.,  
88 2007). Whether it controls the stability of the lytic synapse and whether this might explain its  
89 reported role in CTL killing activity (De Meester et al., 2010; Lang et al., 2013) remain unexplored.  
90 To test the role of WASP in lytic synapse organization, we investigated actin cytoskeleton  
91 ultrastructure and dynamics together with LFA-1 topography in patient-derived WASP-deficient  
92 CTL, using a combination of microscopy tools, including the super-resolution approaches  
93 dSTORM (Heilemann et al., 2008; van de Linde et al., 2011) and SIM (Gustafsson, 2000). Our  
94 data show that the inefficacy of target cell killing by WAS CTL is linked to a reduced LFA-1  
95 activation, non-radial spreading of the lytic synapse and delayed lethal hit delivery. These defects  
96 can be explained by the additional finding that open-conformation LFA-1 nanoclusters are confined  
97 into actin meshwork interstices and that such clusters display reduced density in WASP-deficient  
98 CTL. At the cellular scale, WAS CTL display defects in LFA-1 cluster belt assembly and lytic  
99 granule positioning. In conclusion, our study unravels the mechanisms by which WASP controls  
100 CD8<sup>+</sup> T cell cytotoxic activity and provides fundamental knowledge on the nanoscale topography  
101 of LFA-1.

## 102 **Results**

### 103 **Decreased killing potential is associated to reduced LFA-1 activation in WAS CD8<sup>+</sup> T cells**

104 The mechanism underlying the reduced ability of CD8<sup>+</sup> T cells from WAS patients to kill target  
105 cells (De Meester et al., 2010) has not been elucidated. We here reasoned that the role of WASP in  
106 stabilizing the synapse of CD4<sup>+</sup> T cells (Calvez et al., 2011; Sims et al., 2007) might apply to CD8<sup>+</sup>  
107 T cells and that such role would be mediated through LFA-1. The polyclonal CD8<sup>+</sup> T cells  
108 expanded from WAS patients expressed normal levels of lytic molecules (**Fig S1A-C**), but as  
109 expected failed to express WASP (**Fig 1A** and **Fig S1D**). The ability of WAS CTL to rapidly  
110 eliminate P815 target cells, as well as to sustain prolonged killing activity was reduced (**Fig 1B**  
111 and **Fig S1E**). We then tested whether WASP might regulate CTL cytotoxicity via LFA-1, by  
112 measuring the expression of total and open LFA-1 conformations by flow cytometry (Theorell et  
113 al., 2011). The CTL from the healthy donors and the WAS patients expressed basally comparable  
114 levels of total LFA-1 (**Fig 1C**). They expressed similar levels of LFA-1 under the open  
115 conformation when facing uncoated target cells. However, upon encounter with the anti-CD3 Ab-  
116 coated target cells, the WASP-deficient CTL displayed a reduced capacity to up-regulate active  
117 LFA-1 (**Fig 1D**). We then sought to explore whether this reduced LFA-1 activation would be  
118 mirrored by abnormal dynamics of CTL to target cell contacts in the context of killing. Real-time  
119 imaging of CTL and anti-CD3 Ab coated target cell mixtures shows that although WASP-deficient  
120 CTL were highly motile and able to encounter target cells, killing efficiency was reduced as  
121 compared to that of control CTL (**Fig 1E** and **Movie 1-2**). The reduced ability of WAS CTL to kill  
122 targets over time (**Fig 1F**) was explained by an increased delay between initial contact and lethal  
123 hit delivery (**Fig 1G**). Together, these results strongly suggest that the reduced efficiency of WAS

124 CTL to eliminated target cells is linked to reduced LFA-1 activation leading to a delayed lethal hit  
125 delivery.

126

127 **Actin cytoskeleton dynamics is associated to non-radial spreading in WAS CD8<sup>+</sup> T cells**

128 Although WASP-deficiency has been reported to distort synapse morphology in primary human T  
129 cells (Calvez et al., 2011), its effect on actin dynamics at the immunological synapse remains to be  
130 characterized. For this purpose, we used the cell-permeant SiR-actin dye (Lukinavicius et al., 2014)  
131 to record F-actin dynamics by TIRFM, which allows to focus on the cell portion that lays at the  
132 immediate contact with the ICAM-1/anti-CD3 coated surface. As shown in a representative healthy  
133 donor CD8<sup>+</sup> T cell, spreading occurred within 2 to 3 min and was characterized by a surrounding  
134 lamellipodium, shown in the transmitted images (**Fig S2A**) and a dense actin meshwork (**Fig 2A**).  
135 This network was not uniform since areas of reduced actin density were present towards the center  
136 of the synapse, while small actin patches were distributed all over the contact surface. Although  
137 the F-actin meshwork was highly dynamical at the synaptic plane the cell shape did not evolve  
138 beyond 3 min. In contrast, the WAS CTL displayed a reduced spreading area and lobular  
139 morphology, characterized by nascent lamellipodia on different sides of the cell (**Fig S2B**). The  
140 WAS cell displayed a variable actin density along the considered observation time. Intermittently,  
141 areas of high intensity fluorescence were observed in the middle of the synapse, out of which actin  
142 cables appeared to emerge (**Fig 2B**). The time course of the aspect ratio (AR) indicated that HD  
143 cells rapidly assembled a circular synapse with an AR value evolving from 1.6 to 1 during the first  
144 minute (**Fig 2C**). However WAS CTL were unable to spread radially as confirmed by AR  
145 variations ranging from 1.5 to 1.8 along the acquisition. The mean AR of 9 HD and 19 WAS cells  
146 confirmed the non-circular morphology of WAS T cell synapses (**Fig 2D**). In conclusion, the

147 TIRFM study of F-actin dynamics in WAS CTL reveals a major defect in actin meshwork  
148 organization combined with the inability to spread radially and to establish a stable synapse.

149

150 **Biased distribution of LFA-1 clusters in WAS T cells**

151 We implemented a SIM approach to precisely locate active LFA-1 at the CTL synapse and  
152 elucidate how it interacts with the actin cytoskeleton meshwork. We also applied this approach to  
153 WAS CTL to understand which precise actin cytoskeleton aberrations might explain the LFA-1  
154 activation defects identified in these cells. The normal CTL depicted in **Fig 3A** displayed an  
155 extended synaptic spreading with F-actin being enriched both at the periphery, as a thin  
156 lamellipodium, and within patches located towards the inner parts of the synapse. Active LFA-1  
157 distributed as very distinct clusters organized into a belt-like structure lying inwards to the external  
158 F-actin area. Active LFA-1 clusters appeared to be positioned in the interstices of the actin  
159 cytoskeleton meshwork. This applied to both the actin-rich area corresponding to the LFA-1 ring  
160 and to the actin poor areas towards the synapse center (**Fig 3A**, zooms on the right panels). Sections  
161 along the z axis showed that the inner part of LFA-1 clusters localized to thin interstices of reduced  
162 F-actin density (**Fig 3A**, central lower panels), suggesting that LFA-1 nanoclusters are confined  
163 into the alveoli of the actin cytoskeleton meshwork. Parallel examination of a WAS CTL (**Fig 3B**)  
164 revealed that it spread over a reduced area. Although a very rich actin cytoskeleton meshwork  
165 composed of highly branched and spiky structures had assembled at the WAS T cell periphery, the  
166 synapse center was almost devoid of detectable actin structures. In this cell, active LFA-1 could be  
167 detected but they failed to assemble into a belt. At the ultrastructure level, the most external LFA-  
168 1 clusters were positioned in the interstices of the very dense actin cytoskeleton meshwork, while  
169 LFA-1 clusters localizing towards the synapse center appeared to not be connected to actin  
170 filaments and to distribute less evenly than in the control cell (**Fig 3B**, zooms on the right panels).

8

171 Sections along the z axis of the WAS CTL confirmed both the asymmetry of the LFA-1 ring and  
172 the biased distribution of LFA-1 clusters in relationship with the actin meshwork (**Fig 3B**, central  
173 lower panels). The partial decorrelation of active LFA-1 clusters from the areas of enriched actin  
174 density and the asymmetry of the WAS CTL was highlighted by an analysis of LFA-1 and F-actin  
175 intensity profiles within cell quadrants. In control cells, active LFA-1 was highly enriched at 8  $\mu\text{m}$   
176 from the cell center with a slight inner shift as compared to the peripheral F-actin rich area (**Fig**  
177 **3C**). In those cells, LFA-1 distributed evenly among the areas enriched in F-actin (IN) those devoid  
178 of F-actin (OUT) (see Methods) (**Fig 3D**). This distribution is probably attributable to the fact that  
179 although LFA-1 clusters are enriched in the inner side of the actin-rich lamellipodium, they locate  
180 in the interstices of the actin meshwork. In contrast to the control cells, the WAS CTL failed to  
181 display active LFA-1 peripheral enrichment (**Fig 3E**). The analysis of LFA-1 distribution according  
182 to F-actin intensity confirmed the biased distribution of the LFA-1 clusters towards areas devoid  
183 of detectable F-actin in the WAS CTL (**Fig 3F**). Together, our data provide the first  
184 characterization of the nanoscale topography of LFA-1 at the immunological synapse. They reveal  
185 that active LFA-1 distributes into hundreds of nanoclusters embedded into the actin cytoskeleton  
186 meshwork. They further indicate that the WASP-dependent actin meshwork organization is  
187 required to maintain a synaptic belt of active LFA-1 nanoclusters.

188

#### 189 **WASP controls LFA-1 organization and activation at the cellular and nanometric scales**

190 Beyond the abnormal LFA-1 nanocluster distribution characterized in the WAS CTL by SIM, we  
191 sought to apply dSTORM to quantify whether the reduced LFA-1 activation in WAS CTL might  
192 be related to a reduced number or density of individual LFA-1 clusters. As observed above by  
193 TIRFM and SIM, WAS CD8<sup>+</sup> T cells were able to spread, although in a less radial manner than  
194 control T cells (**Fig 4A-B**, left panels). In particular, the typical ring of active LFA-1 clusters was

195 disrupted in numerous WAS CTL and those clusters appeared to distribute more centrally (**Fig 4A-**  
196 **B** and **Fig S3A-B**). At the nanometric scale, active LFA-1 in control CTL appeared to distribute  
197 almost exclusively into dense clusters (**Fig 4A**, second row of panels), in agreement with the SIM  
198 observations. This was confirmed by the DBSCAN analysis (Ester et al., 1996) on two  
199 representative ROI within the LFA-1 ring (**Fig 4A**, third row of panels). In WAS CTL, although  
200 active LFA-1 assembled into clusters, the compactness and distribution of those clusters appeared  
201 to be affected (**Fig 4B**, second row of panels). Indeed, the DBSCAN analysis on two representative  
202 ROI within the preserved section of the LFA-1 ring shows that active LFA-1 clusters in WAS CTL  
203 were less dense and less clearly delineated than those in control CTL (**Fig 4B**, third row of panels).  
204 Independently from its organization into clusters, the intensity of LFA-1 was measured along the  
205 LFA-1 ring. The WAS CTL harbored regions of poor to undetectable LFA-1 intensity (**Fig 4C**),  
206 highlighting the fact that it did not assemble a complete ring. To further characterize the LFA-1  
207 activation defect associated to WASP deficiency, a number of cluster parameters were analyzed in  
208 representative ROI of the cluster ring. Although the distribution of the areas of active LFA-1  
209 clusters was comparable in WAS and control CTL (**Fig 4D**), both the surface density of active  
210 LFA-1 cluster (**Fig 4E**) as well as their localization point density (**Fig 4F**) were reduced in the  
211 WAS T cells. In addition, the proportion of localization points belonging to clusters was  
212 significantly reduced in the WAS T cells as compared to the control T cells (**Fig 4G**). A further  
213 analysis applied to representative cells confirmed the reduction of cluster density at the synaptic  
214 belt in WAS T cells (**Fig S3C-E**). Together these data indicate that the reduced ability of WASP  
215 deficient CD8<sup>+</sup> T cells to activate LFA-1 corresponds, at the cellular scale, to an incomplete  
216 assembly or stabilization of the LFA-1 ring and, at the nanometric scale, to reduced numbers of  
217 active cluster and reduced LFA-1 molecule density within those clusters.

218

**219 WASP-dependent LFA-1 cluster belt structure is required to confine lytic granules**

220 By controlling the integrity of the LFA-1 cluster belt, WASP might be required for the correct  
221 positioning of lytic granules. We therefore inspected CTL by a 3D-SIM analysis restricted to a  
222 thickness of 550 nm from the cell surface in order to focus on the lytic granules that were the most  
223 proximal to the synaptic area. In control CTL, lytic granule localized towards the inner layer of the  
224 high-affinity LFA-1 ring, at the edge of the actin rich area (**Fig S4A-B**). They were detected at a  
225 close vicinity to active LFA-1 clusters in interstices of the actin cytoskeleton meshwork suggesting  
226 that active LFA-1 clusters might control lytic granule docking at local sites of tight adhesion with  
227 the target cell. This approach was then applied to 11 control CTL and 12 WAS CTL. While the  
228 control CTL adopted a synapse morphology characterized by a radial spreading, an outer ring of  
229 F-actin and an inner ring of high-affinity LFA-1, the WAS CTL displayed either radial synapse,  
230 distorted synapse or elongated synapse (kinapse) morphologies (**Fig 5A**). This is in agreement with  
231 our live microscopy data and previous reports on WASP-deficient CD4<sup>+</sup> T cells (Calvez et al.,  
232 2011; Lafouresse et al., 2012; Sims et al., 2007). The compilation of the control cells (see Methods)  
233 yielded a very clear topological picture composed by a thick peripheral ring of actin meshwork,  
234 followed by a partially overlapping belt of active LFA-1 clusters and by lytic granules dispersed  
235 within the confinement of the LFA-1 cluster belt (**Fig 5B**). Taking into account the morphological  
236 heterogeneity of WAS CTL, images were compiled separately, according to the 3 identified  
237 morphological categories (**Fig 5A**). WAS CTL forming synapses displayed a radial polarity similar  
238 to that observed in control cells, with correct confinement of the lytic granules within the LFA-1  
239 cluster belt (**Fig 5B**). Differently, the cells with distorted synapses failed to reveal a clear radial  
240 organization and the lytic granules localized over the contact planes without any apparent  
241 localization bias. The cells forming a kinapse revealed a clear longitudinal polarization, with a wide  
242 actin-rich edge, a central LFA-1-rich area and dispersed lytic granules. To assess the lytic granule

243 confinement function of the active LFA-1 cluster belt, the positions of individual perforin dots  
244 were overlaid on the LFA-1 mask and their distances to the edge of the LFA-1 masks were  
245 calculated (**Fig 5C-D**). In the cells assembling a radial LFA-1 cluster belt, most detected perforin  
246 dots were positioned on the LFA-1 cluster belt, at a mean distance of 3  $\mu\text{m}$  from the outer edge of  
247 this belt (**Fig 5D**). In WASP-deficient T cells adopting distorted synapse or kinapse morphologies,  
248 an increased proportion of perforin dots were positioned away from the LFA-1 belt (**Fig 5C**) or  
249 very close to its outer edge (**Fig 5D**). The comparison of the WAS-related morphologies is  
250 suggestive of an interplay between actin cytoskeleton organization, LFA-1 cluster distribution and  
251 lytic granule polarization. We next aimed at examining by 3D-SIM the assembly of the LFA-1  
252 cluster belt and lytic granule positioning using anti-CD3 mAb coated P815 cells. Control CTL  
253 forming a synapse with target cells displayed a flattened contact area enriched in F-actin (**Fig 5E**).  
254 The en-face view is in line with our observations on stimulatory surfaces. It shows a ring of active  
255 LFA-1 lying inwards from the F-actin rich area and the docking of lytic granules within the inner  
256 confines of the high-affinity LFA-1 ring. Although WAS CTL formed conjugates with the anti-  
257 CD3 mAb coated P815 cells, their morphology displayed notable aberrations (**Fig 5E**), including  
258 a cell surface devoid of microvilli, in line with an early EM study (Kenney et al., 1986), the  
259 presence of lateral F-actin-rich protrusions and a non-symmetrical morphology. In the selected cell,  
260 active LFA-1 clusters were reduced in numbers and failed to form a ring. The few lytic granules  
261 detected in the synapse plane displayed a very peripheral distribution. Together, these observations  
262 confirm the role of WASP in assembling the high-affinity LFA-1 cluster belt at the CTL synapse.  
263 The WASP-deficiency model further indicates that the LFA-1 cluster belt controls the confined  
264 delivery of lytic granules.

**265 Discussion**

266 In this study, we set to explore the precise topography of LFA-1 at the immunological synapse of  
267 WAS patient-derived CD8<sup>+</sup> T cells. A unique combination of advanced microscopy modalities  
268 allowed us not only to identify a defect in LFA-1 activation underlying the reduced cytotoxic  
269 activity of these cells, but also to produce fundamental knowledge about the interplay between  
270 actin cytoskeleton meshwork organization, LFA-1 activation and lytic granule docking.

271

272 Since the initial description of the immunological synapse, the distribution of LFA-1 as a peripheral  
273 ring has been a hallmark of this structure (Grakoui et al., 1999; Monks et al., 1998). It is however  
274 only recently that the conformational state of LFA-1 at the immunological synapse has been  
275 unraveled with the use of conformation-specific antibodies (Comrie et al., 2015). Still, the precise  
276 topography of LFA-1 remained to be established. In agreement with a previous report in Jurkat  
277 cells (Kaizuka et al., 2007), we observed by TIRFM that upon synapse assembly, primary human  
278 CD8<sup>+</sup> T cells appear to aggregate LFA-1 into microdomains. However, the 2 super-resolution  
279 microscopy approaches used in our study highlight that the structures appearing as microdomains  
280 correspond to areas densely populated by well-individualized nanoclusters. The diameter of the  
281 LFA-1 clusters detected here in T lymphocytes is approximately 100 nm, which is comparable to  
282 that measured by TEM at the surface of monocytes (Cambi et al., 2006). We report that LFA-1  
283 clusters in the open conformation were concentrated into a belt-like structure, in line with the LFA-  
284 1 ring described previously (Comrie et al., 2015; Kaizuka et al., 2007). High-affinity LFA-1  
285 molecules are expected to bind tightly the actin cytoskeleton (Cairo et al., 2006) to permit a tensile  
286 force-driven activation mechanism (Nordenfelt et al., 2016). In line with such central role of the  
287 actin cytoskeleton in the control of LFA-1 activation and distribution, our radial analysis of LFA-

288 1 and F-actin intensities showed that closed LFA-1 clusters overlapped with the peripheral actin  
289 ring, while open LFA-1 laid in the inner layer of peripheral actin ring. More unexpectedly however,  
290 our 2D analysis revealed that the LFA-1 clusters were positioned into the interstices of the outer  
291 layer of the actin cytoskeleton meshwork. Our 3D imaging approach further revealed that the  
292 innermost sections of the LFA-1 clusters stood on a deeper layer of the actin cytoskeleton. Our  
293 analysis therefore posits the question of how LFA-1 clusters are coupled to the actin cytoskeleton.  
294 We favor the hypothesis that the most superficial layer of the actin cytoskeleton might provide a  
295 physical meshwork to laterally constrain LFA-1 nanoclusters, while the underlying layer might  
296 provide a site for physical coupling and force transmission via Talin-1 and Kindlin-3 (Evans et al.,  
297 2009).

298

299 In accordance with this hypothesis, deficiency of the actin regulator WASP was found to affect  
300 both the molecular density of individual active clusters as well as their number. Interestingly,  
301 WASP is also involved in the assembly of F-actin foci beneath TCR microclusters to facilitate  
302 PLC $\gamma$ 1 activation and calcium flux (Kumari et al., 2015). This suggests that distinct F-actin  
303 microarchitectures are associated to TCR and LFA-1 nanoclusters to sustain their specific  
304 activation patterns. Indeed, the use of micropatterns has revealed different actin cytoskeleton  
305 dynamics associated to the TCR and LFA-1 (Tabdanov et al., 2015). Importantly, we identified  
306 here WASP as a key protein to control the assembly of the circular belt of high-affinity LFA-1  
307 clusters at the CTL synapse, which allowed us to investigate the role of this structure in controlling  
308 the cytotoxic activity. Our data indicate that while WASP appears to regulate the confinement and  
309 activation of LFA-1 clusters at the nanometric scale, it also controls their distribution at the cellular  
310 scale. It is probable that defective confinement of the LFA-1 nanoclusters leads to the different

311 distribution patterns observed in the WAS CTL. Cytotoxic T cells assemble a LFA-1/talin ring  
312 junction through which lytic granules are secreted (Somersalo et al., 2004; Stinchcombe et al.,  
313 2001). Lytic granules have initially been proposed to release their contents by fusing with an actin-  
314 free secretory domain located towards the synapse center (Ritter et al., 2015; Stinchcombe et al.,  
315 2001; Stinchcombe et al., 2006). However, in our experiments with healthy donor CTL, lytic  
316 granules appeared to preferentially dock at the vicinity of high-affinity LFA-1 clusters in the inner  
317 side of the LFA-1 cluster belt associated to a relatively dense actin meshwork. This is in agreement  
318 with the recent finding that lytic granule secretion, visualized with a fluorescent probe, occurs in  
319 an intermediate domain of the synapse corresponding to the region of strongest force exertion (Basu  
320 et al., 2016). In conjunction with this mechanism, actin meshwork relaxation might be required for  
321 lytic granule exocytosis as described in NK cells (Brown et al., 2011; Rak et al., 2011). Taken  
322 together, these observations suggest that lytic granules would be preferentially secreted in the inner  
323 side of the LFA-1 cluster belt providing optimal local forces to control both secretion and target  
324 cell interaction. We argue that the reduced lytic activity of WAS CTL is primarily due to a reduced  
325 LFA-1 activation and symmetry. Indeed, we previously reported that both conjugate formation and  
326 LAMP-1 exposure are not affected by WASP deficiency (Calvez et al., 2011; De Meester et al.,  
327 2010). Similarly, the reduction of CTL cytolytic activity induced by LFA-1 with Fab fragments  
328 was not associated to granule release inhibition, but to non-polarized delivery (Anikeeva et al.,  
329 2005). In a physiological setting, the ability to dissolve and reform the adhesion ring would be  
330 required for CTL to execute multiple killing. Accordingly, our data point to an amplification of the  
331 WASP-associated killing defect in long-term assays, in which multiple killing is favored  
332 (Vasconcelos et al., 2015).

333

334 In conclusion, our study provides the first characterization of LFA-1 nanoscale topography at the  
335 human T cell synapse. It provides insight into the activation of LFA-1 at the nanoscale and into its  
336 interaction with the underlying actin cytoskeleton meshwork. It further identifies WASP as a key  
337 protein to control the LFA-1 cluster belt that confines lytic granule secretion.

**338 Experimental procedures****339 Patients and cells**

340 Blood samples from WAS patients and healthy donors were obtained following standard ethical  
341 procedures (Helsinki protocol) and as per French Bioethics law and with the approval of the local  
342 ethics committee. PBMC were isolated by density gradient centrifugation over a Ficoll gradient  
343 (PAA). CD8<sup>+</sup> T cells were isolated by negative selection according to the manufacturer's  
344 instructions (Stem Cell). T cells were cultured in RPMI 1640 glutamax (Gibco) supplemented with  
345 5% human serum (PAA) and stimulated every 2 weeks with irradiated PBMC and EBV-  
346 transformed JY cells in the presence of 1 µg/ml PHA, 100 IU/ml rhIL-2 and 5 ng/ml rhIL-15. WAS  
347 CTL were derived from the W2 patient described previously (Trifari et al., 2006), as well as patients  
348 WAS1 (De Meester et al., 2010) and WAS4 (Marangoni et al., 2007). The lack of WASP  
349 expression in the patient-derived CD8<sup>+</sup> T cells was confirmed by Western blotting as previously  
350 reported (Trifari et al., 2006). GFP-expressing P815 cells were generated by lentiviral transduction  
351 and cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 10% FCS (PAA).

352

**353 Flow cytometry**

354 CTL were stained with anti-CD8-FITC mAb and anti-CD4-PE mAb for 20 min at 4°C, Fixed with  
355 3% paraformaldehyde (PFA) and permeabilized with PBS 3% BSA 0.1% saponin. Intracellular  
356 staining of with anti-WASP 5A5 mAb was followed by PE-labeled secondary Ab. Granzyme B  
357 and perforin staining were performed with FITC-labeled mAb and AF647-labeled mAb (dG9).  
358 LFA-1 expression was revealed with mAb for total (TS2/4) or open conformations (a24). To  
359 measure LFA-1 activation, CTL were incubated with GFP-expressing target cells previously  
360 coated with anti-CD3 mAb (OKT3, eBioscience). Unlabeled a24 mAb was added at 2.5 µg/ml

361 during a 1-hour incubation at 37°C. Cells were fixed with 3% PFA and the bound a24 mAb was  
362 revealed with AF647-labeled secondary Ab. Antibodies were purchased from BD Pharmingen.  
363 Data were acquired on the BD FACSCalibur cytometer and analyzed with FlowJo software.

364

#### 365 **Cytotoxic assays**

366 For the flow cytometry-based assessment of CTL cytotoxic activity, GFP-expressing P815 target  
367 cells and CTL were prepared as described for LFA-1 activation. Cells were pelleted for 1 min at  
368 1500 rpm and incubated at 37°C/5%CO<sub>2</sub> from 4 to 24 h. Aphidicolin (Sigma) was used at 0.1 µg/ml  
369 during the duration of the assay to block target cell proliferation. Residual alive target cell  
370 acquisition and quantification were made as described previously<sup>1</sup>. All data were acquired on a BD  
371 FACSCalibur cytometer and analyzed using FlowJo software.

372 For the microscopy-based assessment of CTL cytotoxic activity, 8-well IBIDI chambers were  
373 coated with 10 µg/ml of fibronectin (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37°C/5% CO<sub>2</sub>. CTL were pre-stained  
374 with CellTracker green CMFDA dye (Invitrogen) for 30 min at 37°C/5% CO<sub>2</sub> and then transferred  
375 to an IBIDI chamber together with P815 cells pre-coated with anti-CD3 mAb as described for LFA-  
376 1 activation. A 200 µM concentration of PI was added in the medium and present during the  
377 acquisition on a Leica SP8 confocal microscope equipped with a chamber set at 37°C/5% CO<sub>2</sub>.

378

379

#### 380 **TIRFM**

381 1.5-glass of 8-well chamber Labteck were coated overnight with both recombinant ICAM-1/Fc  
382 chimera (4 µg/ml) (R&D Systems, USA) and anti-CD3 mAb (10 µg/ml) at 4°C. Cells were stained  
383 with 2 µM of SiR-actin for 1 h at 37°C before transferring onto Labteck. Acquisitions were  
384 performed by TIRFM illumination integrated within an iLas2 system (Roper, France) incorporated

18

385 within an inverted motorized microscope (Nikon Ti, Japan) equipped with a Plan-Apo 100x  
386 1.45NA objective and a perfect focus system. Live samples were imaged at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>.  
387 Images were acquired at 1.26-1.29 sec per frame for 10 min using Metamorph software (Molecular  
388 Devices, USA). The emitted photons were collected with a 512x512 EM-CCD camera (Evolve,  
389 Photometrics, USA).

390

#### 391 **dSTORM**

392 1.5H circular coverslips were coated overnight with recombinant ICAM-1/Fc chimera and anti-  
393 CD3 mAb at 4°C. AF647-labeled a24 mAb was added to CTL during their attachment to the  
394 coverslips. After 10 min at 37°C, cells were fixed with 4% PFA. Acquisition was performed by  
395 TIRFM illumination on the system described above. Images were acquired at RT in a solution  
396 containing Cysteamine (Sigma, USA) and glucose oxidase (Sigma, USA) as oxygen scavenger.  
397 The AF647 fluorescence was converted into a dark state using a 640 nm laser. Upon obtaining the  
398 adequate density of blinking events per frame, 20.000 frames were acquired at 50-100 Hz. Images  
399 were reconstructed online using the WaveTracer module<sup>2</sup> integrated into Metamorph (20 nm pixel  
400 size). The minimal surface of a LFA-1 cluster was set as twice the mean surface of the events  
401 detected outside the cells resulting in a value of 0.0055 μm<sup>2</sup>. On that basis, we used the DBSCAN  
402 algorithm to identify clusters in zoomed insets measuring 1.6 μm x 1.6 μm. The cluster detection  
403 was set as a minimum of 3 points within a radius of 20-40 nm (epsilon). Shape and area were  
404 extracted with ggplot2 and factoextra in R software. We wrote a C++ algorithm to determine the  
405 size of clusters in nm. Whole-cell cluster counts were measured using ImageJ with an intensity-  
406 based threshold. The ImageJ particle detection approach was validated by comparison to DBSCAN  
407 in test ROIs.

408

409 **SIM**

410 The staining procedure was comparable to that used for dSTORM with the following combination:  
411 AF568-labeled a24 mAb, phalloidin-AF647 and where indicated, anti-perforin mAb revealed with  
412 a AF488-labeled secondary Ab. For conjugates, CTL and P815 cells were seeded in U-bottom 96-  
413 well with AF-568-labeled a24 mAb then were transferred onto Poly-L-Lysine coated 1.5H-  
414 coverslips for 10 min at 37°C. Fixation and permeabilization were executed as before and F-actin  
415 and perforin were stained by phalloidin-AF488 and AF647-labeled anti-perforin mAbs for 1 h at  
416 RT. Coverslips were mounted in Vectashield H-1000 (Vector lab, USA). 3D-SIM images were  
417 acquired with a Zeiss ELYRA PS1 SR-SIM equipped with a Plan-Apo 63x/1.40NA oil DIC  
418 immersion objective using a sCMOS camera (Hamamatsu) and a 1.60x tube lens. A multicolor  
419 image was obtained with the 488 nm, 561 nm and 642 nm laser excitations, using respectively the  
420 28  $\mu\text{m}$ , 32  $\mu\text{m}$  and 42  $\mu\text{m}$  optical grids, which were rotated to three pre-aligned angles and  
421 translated to 5 positions per angle. The different channels were aligned using the PSF from  
422 multicolor beads. The lateral pixel size was 65 nm in the acquired images and 32 nm in the  
423 reconstructed images. The 3D-SIM images were reconstructed with the Zeiss ZEN software and  
424 further verified with SIMcheck (Image J, plugin). 3D-SIM images of 550-nm thickness were  
425 analyzed by ImageJ. Thresholds were performed on F-actin and a24 intensity to transform them  
426 into two masks, then number of a24 clusters in and out of the F-actin mask were extracted and  
427 reported to the surface area of the mask. Individual cells were normalized according to each cell  
428 area before compilation. LFA-1 ring mask was determined by a Gaussian blur and an intensity  
429 threshold. The closest distance of each perforin granule to the outer border of the ring was drawn  
430 manually and reported to the radius of the compiled cell.

431

432 **Statistical analysis**

20

433 Statistical analyses were performed using GraphPad software. Statistical significance was  
434 determined by performing two-tailed non-parametric paired Mann-Whitney or unpaired Wilcoxon  
435 t tests. Graphs show mean values +/-SEM. Resulting P values are indicated as follows: ns P>0.05;  
436 \* 0.01<P<0.05; \*\* 0.001<P<0.01; \*\*\* P<0.001 \*\*\*\* P<0.0001.  
437

**438 Author contributions**

439 R.H. performed the super-resolution microscopy experiments, analyzed the results and contributed  
440 to the manuscript preparation; D.G. performed the functional assays, analyzed the results and  
441 contributed to the manuscript preparation; J.R.-B. performed data analysis. Z.W. performed the  
442 initial characterization of LFA-1 activation at the CTL synapse; J.C., M.M. contributed to data  
443 analysis; N.D. contributed to data analysis and to manuscript editing. S.V. discussed data and ideas  
444 and edited the manuscript. S.A. contributed to the design of the study, supervised super-resolution  
445 microscopy experiments, analyzed data and contributed to the manuscript preparation; L.D.  
446 designed the research, supervised the experimental and analytical work and wrote the paper.

447

**448 Acknowledgments**

449 We wish to thank Astrid Canivet and Daniele Daviaud from the CPTP microscopy platform, as  
450 well as Fatima-Ezzahra L'Faqihi-Olive, Valérie Duplan-Eche and Anne-Laure Iscache from the  
451 CPTP cytometry platform. We are grateful for the support and advice of Frédérique Gaits-Iacovoni  
452 and Madjid Zanoun from the Cellular Imaging Facility Rangueil-I2MC/TRI platform. We wish to  
453 thank Nancy Hogg for generously providing the a24 antibody. We are grateful to Johannes Huppa,  
454 René Platzter, Jean-Baptiste Sibarita, Kaan Boztug, Sabina Müller, Liza Filali, Laurène Pfajfer,  
455 Yolla German, Marie-Pierre Puissegur, Fanny Lafouresse and Rana Mansour for technical advices  
456 and discussion. This work was supported by the Brazilian post-doctoral programs from CAPES  
457 (6486/10-0) and CNPq (237654/2012-1). This work also benefited from funding from the  
458 Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (grant EML2012090493), the Institut National du  
459 Cancer (Grant INCa 2012-054), the CNRS (Mission pour l'Interdisciplinarité, AAP Inter-Instituts)  
460 and the Agence Nationale de la Recherche (Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer). The

461 funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation  
462 of the manuscript. Conflicts of interest: none.

463 **References**

- 464 Anikeeva, N., Somersalo, K., Sims, T.N., Thomas, V.K., Dustin, M.L., and Sykulev, Y. (2005).  
465 Distinct role of lymphocyte function-associated antigen-1 in mediating effective cytolytic activity  
466 by cytotoxic T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*  
467 *of America* *102*, 6437-6442.
- 468 Basu, R., Whitlock, B.M., Husson, J., Le Floch, A., Jin, W., Olyer-Yaniv, A., Dotiwala, F.,  
469 Giannone, G., Hivroz, C., Biais, N., *et al.* (2016). Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to  
470 Potentiate Target Cell Killing. *Cell* *165*, 100-110.
- 471 Baumgart, F., Arnold, A.M., Leskovaar, K., Staszek, K., Folser, M., Weghuber, J., Stockinger, H.,  
472 and Schutz, G.J. (2016). Varying label density allows artifact-free analysis of membrane-protein  
473 nanoclusters. *Nat Methods* *13*, 661-664.
- 474 Brown, A.C., Oddos, S., Dobbie, I.M., Alakoskela, J.M., Parton, R.M., Eissmann, P., Neil, M.A.,  
475 Dunsby, C., French, P.M., Davis, I., *et al.* (2011). Remodelling of cortical actin where lytic  
476 granules dock at natural killer cell immune synapses revealed by super-resolution microscopy.  
477 *PLoS biology* *9*, e1001152.
- 478 Cairo, C.W., Mirchev, R., and Golan, D.E. (2006). Cytoskeletal regulation couples LFA-1  
479 conformational changes to receptor lateral mobility and clustering. *Immunity* *25*, 297-308.
- 480 Calvez, R., Lafouresse, F., De Meester, J., Galy, A., Valitutti, S., and Dupré, L. (2011). The  
481 Wiskott-Aldrich syndrome protein permits assembly of a focused immunological synapse enabling  
482 sustained T-cell receptor signaling. *Haematologica* *96*, 1415-1423.
- 483 Cambi, A., Joosten, B., Koopman, M., de Lange, F., Beeren, I., Torensma, R., Fransen, J.A.,  
484 Garcia-Parajo, M., van Leeuwen, F.N., and Figdor, C.G. (2006). Organization of the integrin LFA-  
485 1 in nanoclusters regulates its activity. *Molecular biology of the cell* *17*, 4270-4281.
- 486 Comrie, W.A., Babich, A., and Burkhardt, J.K. (2015). F-actin flow drives affinity maturation and  
487 spatial organization of LFA-1 at the immunological synapse. *The Journal of cell biology* *208*, 475-  
488 491.
- 489 Davignon, D., Martz, E., Reynolds, T., Kurzinger, K., and Springer, T.A. (1981). Lymphocyte  
490 function-associated antigen 1 (LFA-1): a surface antigen distinct from Lyt-2,3 that participates in  
491 T lymphocyte-mediated killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*  
492 *States of America* *78*, 4535-4539.
- 493 De Meester, J., Calvez, R., Valitutti, S., and Dupre, L. (2010). The Wiskott-Aldrich syndrome  
494 protein regulates CTL cytotoxicity and is required for efficient killing of B cell lymphoma targets.  
495 *Journal of leukocyte biology* *88*, 1031-1040.
- 496 Dupré, L., Aiuti, A., Trifari, S., Martino, S., Saracco, P., Bordignon, C., and Roncarolo, M.-G.  
497 (2002). Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological  
498 synapse formation. *Immunity* *17*, 157-166.
- 499 Ester, M., Kriegel, H.-P., Sander, J., and Xu, X. (1996). A density-based algorithm for discovering  
500 clusters in large spatial databases with noise. *Knowledge, Discovery and Data Mining, Proceedings*  
501 *96*, 226-231.

- 502 Evans, R., Patzak, I., Svensson, L., De Filippo, K., Jones, K., McDowall, A., and Hogg, N. (2009).  
503 Integrins in immunity. *J Cell Sci* 122, 215-225.
- 504 Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L.  
505 (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*  
506 285, 221-227.
- 507 Gustafsson, M.G. (2000). Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured  
508 illumination microscopy. *J Microsc* 198, 82-87.
- 509 Heilemann, M., van de Linde, S., Schuttpelz, M., Kasper, R., Seefeldt, B., Mukherjee, A.,  
510 Tinnefeld, P., and Sauer, M. (2008). Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with  
511 conventional fluorescent probes. *Angew Chem Int Ed Engl* 47, 6172-6176.
- 512 Kaizuka, Y., Douglass, A.D., Varma, R., Dustin, M.L., and Vale, R.D. (2007). Mechanisms for  
513 segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in  
514 Jurkat T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*  
515 104, 20296-20301.
- 516 Kenney, D., Cairns, L., Remold-O'Donnell, E., Peterson, J., Rosen, F.S., and Parkman, R. (1986).  
517 Morphological abnormalities in the lymphocytes of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome.  
518 *Blood* 68, 1329-1332.
- 519 Kumari, S., Depoil, D., Martinelli, R., Judokusumo, E., Carmona, G., Gertler, F.B., Kam, L.C.,  
520 Carman, C.V., Burkhardt, J.K., Irvine, D.J., *et al.* (2015). Actin foci facilitate activation of the  
521 phospholipase C-gamma in primary T lymphocytes via the WASP pathway. *eLife* 4.
- 522 Lafouresse, F., Cotta-de-Almeida, V., Malet-Engra, G., Galy, A., Valitutti, S., and Dupre, L.  
523 (2012). Wiskott-Aldrich syndrome protein controls antigen-presenting cell-driven CD4+ T-cell  
524 motility by regulating adhesion to intercellular adhesion molecule-1. *Immunology* 137, 183-196.
- 525 Lang, P.A., Shaabani, N., Borkens, S., Honke, N., Scheu, S., Booth, S., Brenner, D., Meryk, A.,  
526 Barthuber, C., Recher, M., *et al.* (2013). Reduced type I interferon production by dendritic cells  
527 and weakened antiviral immunity in patients with Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency.  
528 *The Journal of allergy and clinical immunology* 131, 815-824.
- 529 Lukinavicius, G., Reymond, L., D'Este, E., Masharina, A., Gottfert, F., Ta, H., Guther, A.,  
530 Fournier, M., Rizzo, S., Waldmann, H., *et al.* (2014). Fluorogenic probes for live-cell imaging of  
531 the cytoskeleton. *Nat Methods* 11, 731-733.
- 532 Marangoni, F., Trifari, S., Scaramuzza, S., Panaroni, C., Martino, S., Notarangelo, L.D., Baz, Z.,  
533 Metin, A., Cattaneo, F., Villa, A., *et al.* (2007). WASP regulates suppressor activity of human and  
534 murine CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) natural regulatory T cells. *The Journal of experimental*  
535 *medicine* 204, 369-380.
- 536 Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional  
537 segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.
- 538 Murugesan, S., Hong, J., Yi, J., Li, D., Beach, J.R., Shao, L., Meinhardt, J., Madison, G., Wu, X.,  
539 Betzig, E., *et al.* (2016). Formin-generated actomyosin arcs propel T cell receptor microcluster  
540 movement at the immune synapse. *The Journal of cell biology* 215, 383-399.
- 541 Nordenfelt, P., Elliott, H.L., and Springer, T.A. (2016). Coordinated integrin activation by actin-  
542 dependent force during T-cell migration. *Nature communications* 7, 13119.

- 543 Rak, G.D., Mace, E.M., Banerjee, P.P., Svitkina, T., and Orange, J.S. (2011). Natural killer cell  
544 lytic granule secretion occurs through a pervasive actin network at the immune synapse. *PLoS*  
545 *biology* *9*, e1001151.
- 546 Ritter, A.T., Asano, Y., Stinchcombe, J.C., Dieckmann, N.M., Chen, B.C., Gawden-Bone, C., van  
547 Engelenburg, S., Legant, W., Gao, L., Davidson, M.W., *et al.* (2015). Actin depletion initiates  
548 events leading to granule secretion at the immunological synapse. *Immunity* *42*, 864-876.
- 549 Sims, T.N., Soos, T.J., Xenias, H.S., Dubin-Thaler, B., Hofman, J.M., Waite, J.C., Cameron, T.O.,  
550 Thomas, V.K., Varma, R., Wiggins, C.H., *et al.* (2007). Opposing effects of PKC $\theta$  and WASP  
551 on symmetry breaking and relocation of the immunological synapse. *Cell* *129*, 773-785.
- 552 Somersalo, K., Anikeeva, N., Sims, T.N., Thomas, V.K., Strong, R.K., Spies, T., Lebedeva, T.,  
553 Sykulev, Y., and Dustin, M.L. (2004). Cytotoxic T lymphocytes form an antigen-independent ring  
554 junction. *The Journal of clinical investigation* *113*, 49-57.
- 555 Stinchcombe, J.C., Bossi, G., Booth, S., and Griffiths, G.M. (2001). The immunological synapse  
556 of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* *15*, 751-761.
- 557 Stinchcombe, J.C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S., and Griffiths, G.M. (2006). Centrosome  
558 polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* *443*, 462-465.
- 559 Tabdanov, E., Gondarenko, S., Kumari, S., Liapis, A., Dustin, M.L., Sheetz, M.P., Kam, L.C., and  
560 Iskratsch, T. (2015). Micropatterning of TCR and LFA-1 ligands reveals complementary effects  
561 on cytoskeleton mechanics in T cells. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to*  
562 *macro* *7*, 1272-1284.
- 563 Theorell, J., Schlums, H., Chiang, S.C., Huang, T.Y., Tattermusch, A., Wood, S.M., and Bryceson,  
564 Y.T. (2011). Sensitive and viable quantification of inside-out signals for LFA-1 activation in  
565 human cytotoxic lymphocytes by flow cytometry. *Journal of immunological methods* *366*, 106-  
566 118.
- 567 Trifari, S., Sitia, G., Aiuti, A., Scaramuzza, S., Marangoni, F., Guidotti, L.G., Martino, S., Saracco,  
568 P., Notarangelo, L.D., Roncarolo, M.G., *et al.* (2006). Defective Th1 cytokine gene transcription  
569 in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients. *Journal of immunology* *177*,  
570 7451-7461.
- 571 van de Linde, S., Loschberger, A., Klein, T., Heidbreder, M., Wolter, S., Heilemann, M., and Sauer,  
572 M. (2011). Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes.  
573 *Nat Protoc* *6*, 991-1009.
- 574 Vasconcelos, Z., Muller, S., Guipouy, D., Yu, W., Christophe, C., Gadat, S., Valitutti, S., and  
575 Dupre, L. (2015). Individual Human Cytotoxic T Lymphocytes Exhibit Intraclonal Heterogeneity  
576 during Sustained Killing. *Cell reports* *11*, 1474-1485.
- 577 Yi, J., Wu, X.S., Crites, T., and Hammer, J.A., 3rd (2012). Actin retrograde flow and actomyosin  
578 II arc contraction drive receptor cluster dynamics at the immunological synapse in Jurkat T cells.  
579 *Molecular biology of the cell* *23*, 834-852.
- 580 Zhu, J., Luo, B.H., Xiao, T., Zhang, C., Nishida, N., and Springer, T.A. (2008). Structure of a  
581 complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by  
582 applied forces. *Molecular cell* *32*, 849-861.
- 583

584 **Figure legends**585 **Figure 1. Defective killing by WASP-deficient CD8<sup>+</sup> T cells is associated with reduced LFA-**  
586 **1 activation.**

587 (A) Western blot analysis of WASP expression in CTL from a healthy donor (HD) and a WAS  
588 patient (WAS). (B) Number of residual alive target cells after 4 and 24 hours of a redirected killing  
589 assay at a 2:1 E:T ratio against P815 cells pre-coated with the indicated concentrations of anti-CD3  
590 Ab. Dotted bars represent the reference number of target cells (mean +/- SEM of 3 independent  
591 experiments). (C) Total LFA-1 expression (TS2/4 Ab) in primary CTL from 4 HD and 3 WAS  
592 patients. (D) CTL were co-incubated during 60 minutes with P815 cells and analyzed for  
593 expression of high-affinity LFA-1 (a24 Ab). (E) Anti-CD3 Ab pre-coated target cells were seeded  
594 in the presence of HD or WAS CTL (green) at a 2:1 E:T ratio. PI (red) was used to track lethal hit  
595 delivery. (F) Number of PI-positive target cells along time. (G) Time delay between the contact of  
596 target cells with a CTL and PI entry. Statistical significances were obtained with two-tailed Mann-  
597 Whitney non-parametric t-tests. ns  $P > 0.05$ ; \*  $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*  $0.001 < P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*  
598  $P < 0.0001$ . See also Figure S1, Movie 1 and Movie 2.

599

600 **Figure 2. Abnormal synapse shape and F-actin dynamics in WAS CD8<sup>+</sup> T cells.**

601 (A) TIRFM imaging of F-actin dynamics at the contact of a representative healthy donor (HD)  
602 CTL adhering to an ICAM-1/anti-CD3 coated surface. (B) TIRFM imaging of a representative  
603 WAS patient CTL as described in A. (C) Time course of the aspect ratio measured for 6 HD and 6  
604 WAS CD8<sup>+</sup> T cells adhering to an ICAM-1/anti-CD3 coated surface. (D) Mean aspect ratio of the  
605 cells analyzed in (C). Statistical significances were obtained with a two-tailed Mann-Whitney non-  
606 parametric t-test. \*\*  $0.001 < P < 0.01$ . See also Figure S2.

607 **Figure 3. Open-conformation LFA-1 distributes as nanoclusters into actin meshwork**  
608 **interstices.**

609 (A) Basal section of SIM imaging of a representative cell from a healthy donor (HD) adhering to  
610 ICAM-1/anti-CD3 coated surface. In middle panels, an overlay of the two colors (xy) is represented  
611 with orthogonal views (xz). Right panels represent different zooms. Scale bars are set to 5, 2, 1 and  
612 0.2  $\mu\text{m}$  for whole cell images, intermediary zoom, orthogonal views and zoomed insets,  
613 respectively. (B) Basal section of SIM imaging of a representative cell from a WAS patient as  
614 described in A. (C) 90°-radial profile angle of open LFA-1 and F-actin, from the center to the  
615 periphery, of the HD CTL. Intensities were normalized based on the maximum intensity. (D) Open  
616 LFA-1 cluster density in (“rich”) or out (“poor”) the F-actin mask for HD CTL. (E) 90°-radial  
617 profile angle of open LFA-1 and F-actin, like in (C) for the WAS CTL. (F) Open LFA-1 density  
618 in the “rich” F-actin versus “poor” F-actin area for WAS CTL. Statistical significances were  
619 obtained with a two-tailed Wilcoxon paired test. ns  $P>0.05$ ; \*\*  $0.001<P<0.01$ .

620

621 **Figure 4. LFA-1 nanoclusters are relaxed and hypodense in WASP-deficient CD8<sup>+</sup> T cells.**

622 (A) Open-conformation LFA-1 staining in a representative healthy donor (HD) CTL spreading on  
623 ICAM-1/anti-CD3 Ab. From left to right, TIRFM image and dSTORM reconstruction, then 2 ROIs  
624 with the corresponding DBSCAN detection of clusters. Scale bars: 5  $\mu\text{m}$  (whole cell) and 0.2  $\mu\text{m}$   
625 (ROI). (B) Open-conformation LFA-1 staining (a24 Ab) in a representative WAS patient CTL as  
626 described in A. (C) Open-conformation LFA-1 intensity profile along the LFA-1 ring. Intensities  
627 and distances were normalized based on the respective maximum values for each cell. (D) Open  
628 LFA-1 cluster area distribution within 2 ROI per cell in control versus WAS CTL. (E) Surface  
629 density of open LFA-1 clusters within 2 ROIs per cell in control versus WAS CTL. Mean is  
630 represented in red. (F) Localization point density within 2 ROIs per cell in control versus WAS

28

631 CTL. **(G)** Number of localization points detected as part of clusters (IN) or out of the clusters  
632 (OUT), within 2 ROIs per cell, in control versus WAS CTL. Statistical significances were obtained  
633 with two-tailed Mann-Whitney non-parametric t-tests. ns  $P>0.05$ ; \*  $0.01<P<0.05$ ; \*\*  
634  $0.001<P<0.01$ ; \*\*\*\*  $P<0.0001$ . See also Figure S3.

635

636 **Figure 5. Defects of LFA-1 cluster belt assembly and lytic granule positioning in WASP-**  
637 **deficient CD8<sup>+</sup> T cells.**

638 **(A)** Compilation of SIM images of HD and WAS CTL. WAS cells were split into “radial”,  
639 “distorted” and “kinapse” categories, according to morphological parameters. **(B)** Open LFA-1  
640 mask corresponding to images shown in A, overlaid with a distance map of individual perforin dots  
641 to the outer border of LFA-1 mask and the outline of the F-actin. **(C)** Percentage of perforin dots  
642 detected outside of LFA-1 mask outer border. **(D)** Distance of all perforin dots to LFA-1 mask  
643 outer border reported to the radius distance of the corresponding compiled cell. **(E)** SIM imaging  
644 of a representative control and a WAS CTL in contact with a target cell pre-coated with anti-CD3  
645 Ab. Bottom panels represent the synaptic area in contact with the target cell. Statistical  
646 significances were obtained with two-tailed Mann-Whitney non-parametric t-test. ns  $P>0.05$ ; \*  
647  $0.01<P<0.05$ ; \*\*  $0.001<P<0.01$ ; \*\*\*\*  $P<0.0001$ . See also Figure S4.

**Figure 1**

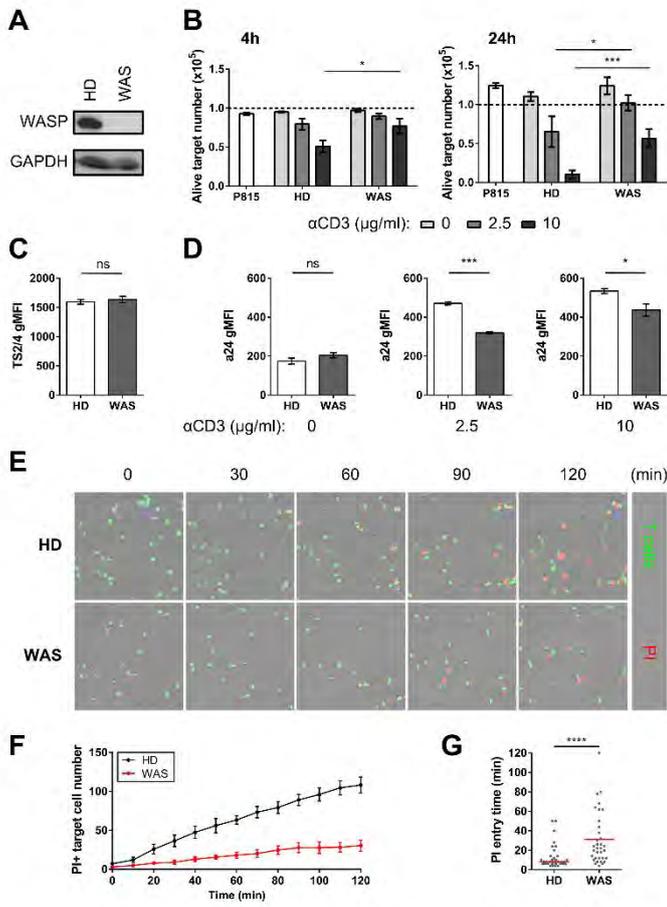
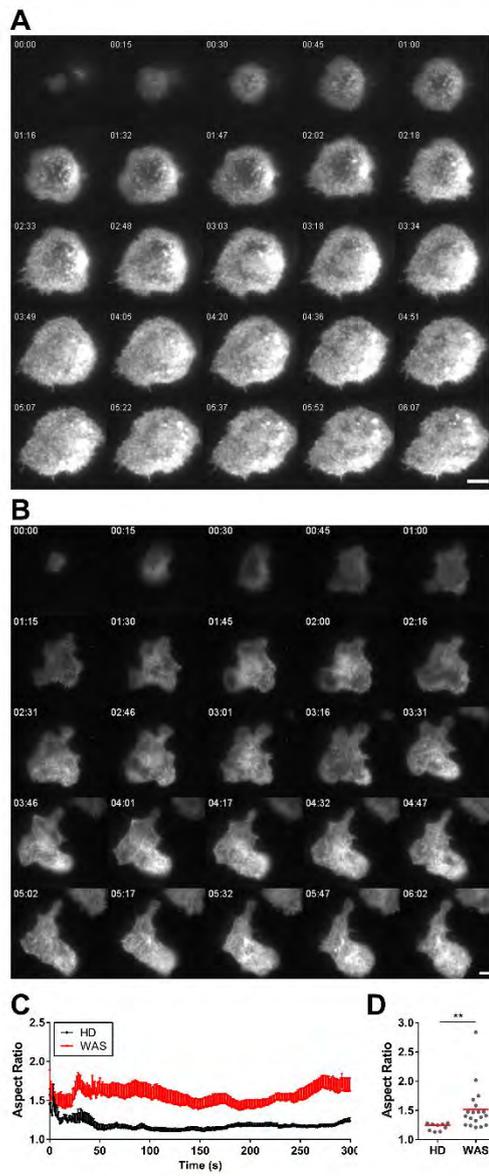
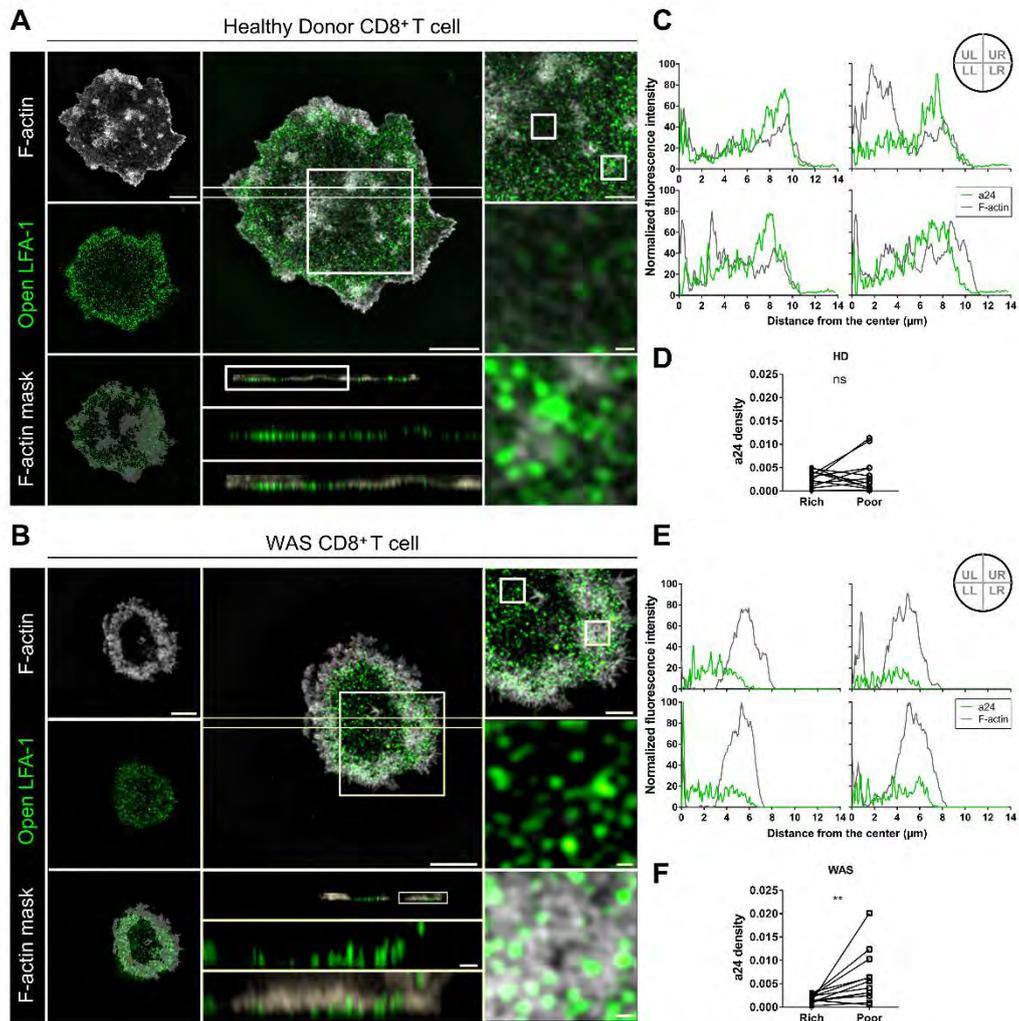


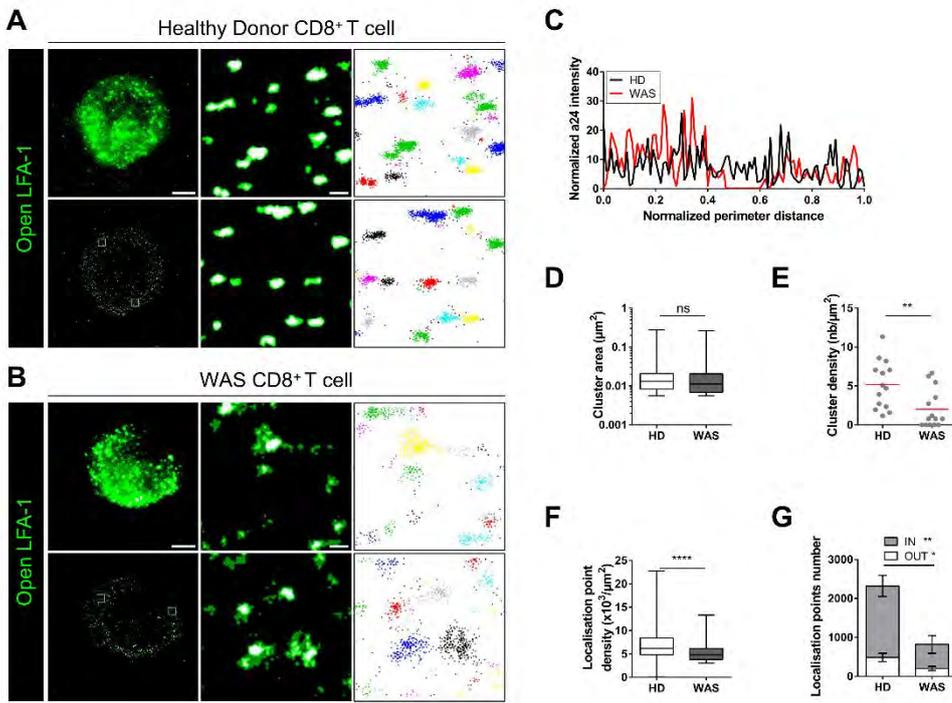
Figure 2



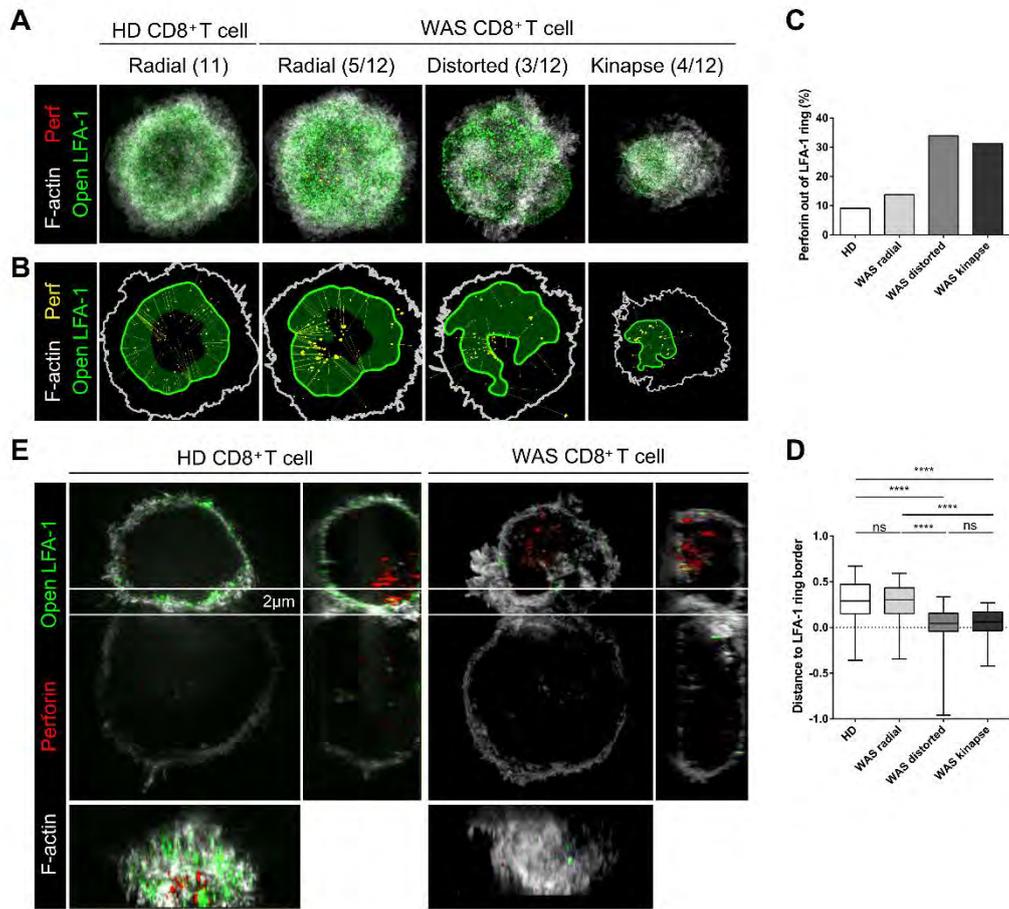
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



## 8 **Figure legends**

### 9 **Figure S1. Phenotypic characterization of WASP-deficient CD8<sup>+</sup> T cells**

10 (A) Flow cytometry analysis of the surface markers CD4 and CD8 in untransformed CD8<sup>+</sup> T cell  
11 lines generated from healthy donors (HD1 to 4) and WAS patients (WAS1, WAS2 and WAS4).  
12 WAS1 patient carries an exchange of nucleotides A>C at position 1509 leading to the deletion of  
13 the STOP codon of the WAS gene. WAS2 and WAS4 patients carry deletions (484-485del AG and  
14 570del T respectively). (B) Flow cytometry analysis of the lytic molecules perforin and granzyme  
15 B. (C) The geomean fluorescence intensity of both lytic molecules was analyzed with a Mann-  
16 Whitney statistical test between all HD and all WAS CD8<sup>+</sup> T cells. (D) Parallel analysis of WASP  
17 expression by flow cytometry. Bolded numbers indicate the geomean fluorescence intensity of  
18 WASP and light grey histograms correspond to the isotype control. (E) Flow cytometry  
19 measurement of the absolute number of residual alive target cells after 4 and 24 hours of a  
20 redirected killing assay at a 2:1 E:T ratio against P815 cells pre-coated with different doses of an  
21 anti-CD3 antibody. Doted bars represent the reference number of target cells plated at the  
22 beginning of the assay.

23

### 24 **Figure S2. Abnormal synapse shape in WAS CD8<sup>+</sup> T cells**

25 (A) Transmitted light imaging of F-actin dynamics at the contact of a representative healthy donor  
26 (HD) CTL adhering to an ICAM-1/anti-CD3 coated surface. Scale bar is set to 5µm. (B)  
27 Transmitted light imaging of a representative WAS patient CTL as described in A.

28

### 29 **Figure S3. LFA-1 activation abnormalities in WASP-deficient CD8<sup>+</sup> T cells**

2

30 (A) TIRFM image of open LFA-1 in normal CTL adhering to ICAM-1/anti-CD3 (top-panels) and  
31 dSTORM reconstruction of open LFA-1 in human primary CD8<sup>+</sup> T cells (down-panels) of 3  
32 representative cells. (B) Open LFA-1 in WAS CTL, as described in A, of 3 representative cells.  
33 (C) 22 ROIs in dSTORM reconstruction image of open LFA-1 for normal (left) and WAS (right)  
34 CD8<sup>+</sup> T cells. (*Left*) Numbers 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14 and 15 are on LFA-1 ring and  
35 numbers 7, 8, 16, 17, 18, 19, 20, 21 and 22 are in the center of LFA-1 ring. (*Right*) Numbers 1-12  
36 are on LFA-1 ring and numbers 13-22 are in the center of LFA-1 ring. (D) Cluster area, number  
37 and localization point density in each open LFA-1 clusters for all ROIs shown in C (mean +/-SEM  
38 is represented in red). Where indicated, statistical significances were obtained with two-tailed  
39 Mann-Whitney non-parametric t-tests. ns P>0.05; \* 0.01<P<0.05; \*\* 0.001<P<0.01; \*\*\* P<0.001.  
40 (E) Comparison of all ROIs by category. Statistical significances were obtained with an unpaired  
41 and non-parametric Kruskal-Wallis test.

42

43 **Figure S4. Positioning of lytic granules in relationship with LFA-1 clusters and the actin**  
44 **cytoskeleton meshwork in WASP-deficient CD8<sup>+</sup> T cells**

45 (A) SIM imaging showing the basal section (550 nm) of a representative control CTL (HD)  
46 adhering to ICAM-1/anti-CD3 coated surface. Left panels represent the F-actin, open LFA-1, and  
47 perforin. In the middle panels, an overlay of the three colors (xy) is represented with orthogonal  
48 views (xz). Right panels represent an intermediary zoom then two secondary zooms. Scale bars are  
49 set to 5, 2, 1 and 0.2  $\mu$ m for whole cell images, intermediary zoom, orthogonal views and zoomed  
50 insets respectively. (B) 90<sup>o</sup>-radial profile angle of open LFA-1, F-actin and perforin, from the  
51 center to the periphery, of the control CTL shown in A. Intensities were normalized based on the  
52 maximum intensity of each color. (C) SIM imaging showing the basal section (550 nm) of a  
53 representative WAS CD8<sup>+</sup> T cell adhering to ICAM-1/anti-CD3 coated surface. Panels are

3

54 positioned as described in A. **(D)** 90°-radial profile angle of open LFA-1, F-actin and perforin,  
55 from the center to the periphery, of the WAS CD8<sup>+</sup> T cell shown in B. Intensities were normalized  
56 based on the maximum intensity of each color.

57

58 **Figure S5. LFA-1 activation according to morphological types in WAS CD8<sup>+</sup> T cells**

59 **(A)** SIM imaging showing the basal section (550 nm) of all control CTL (HD) adhering to ICAM-  
60 1/anti-CD3 coated surface (left) and all WAS CTL corresponding with the 3 categories (right). The  
61 3 categories are “radial”, “distorted” and “kinaptic” cells (as shown in figure 8). **(B)** Analysis of  
62 the number and density of open LFA-1 clusters in each category.

63

64 **Movie 1.**

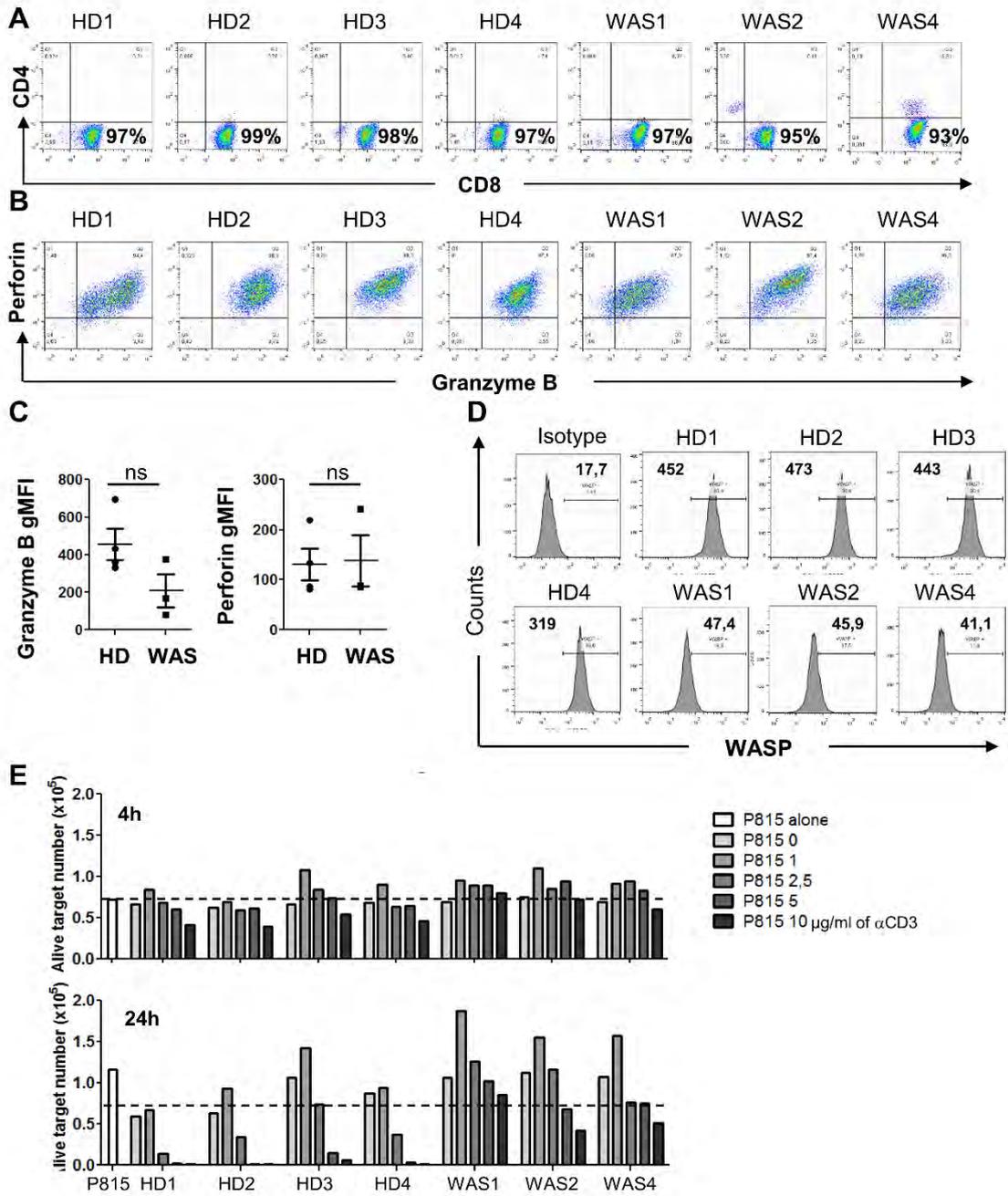
65 Healthy donor CTL (green) encountering anti-CD3 mAb coated P815 cells in presence of  
66 propidium iodide (PI) at a 2:1 E:T ratio.

67

68 **Movie 2.**

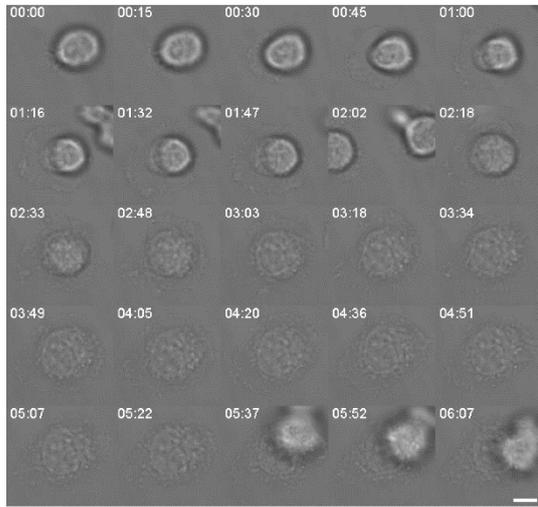
69 WAS CTL (green) encountering anti-CD3 mAb coated P815 cells in presence of propidium iodide  
70 (PI) at a 2:1 E:T ratio.

**Figure S1**



**Figure S2**

**A**



**B**

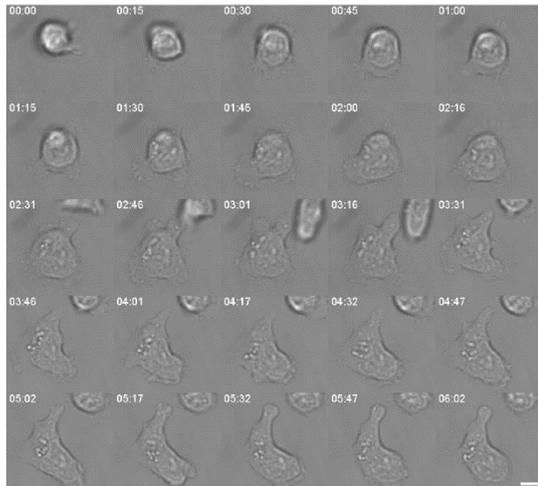
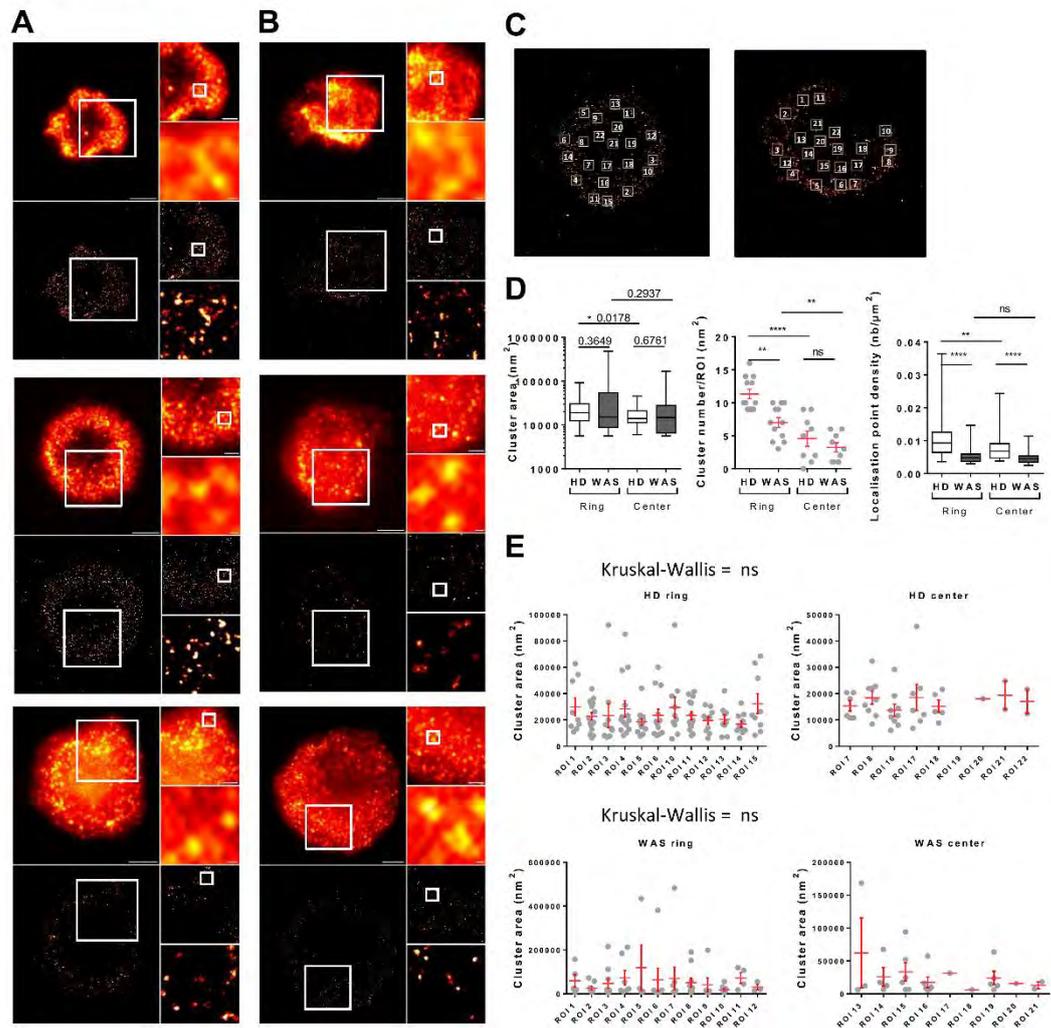
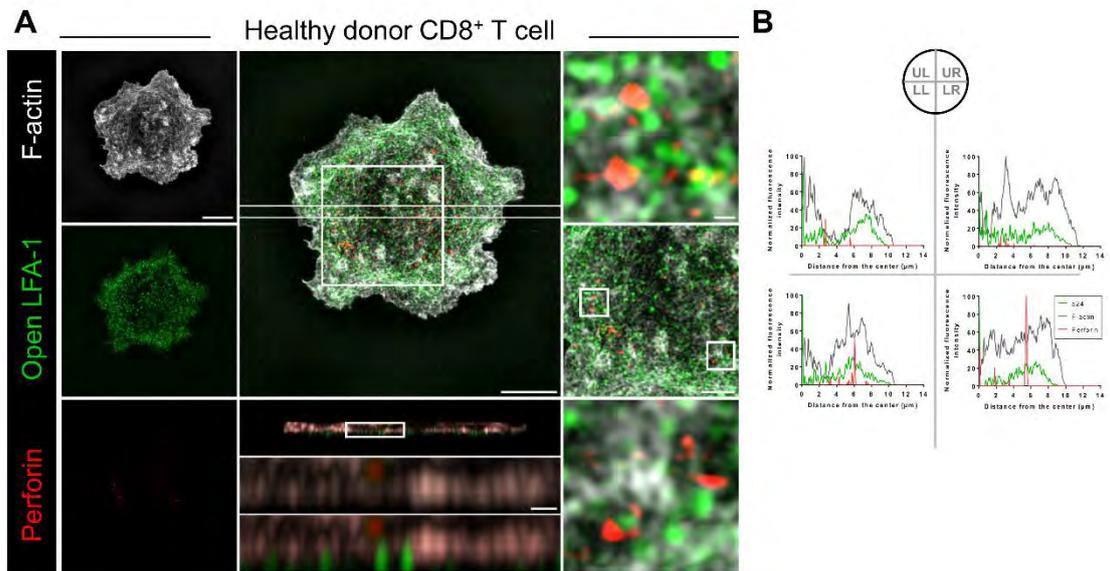


Figure S3

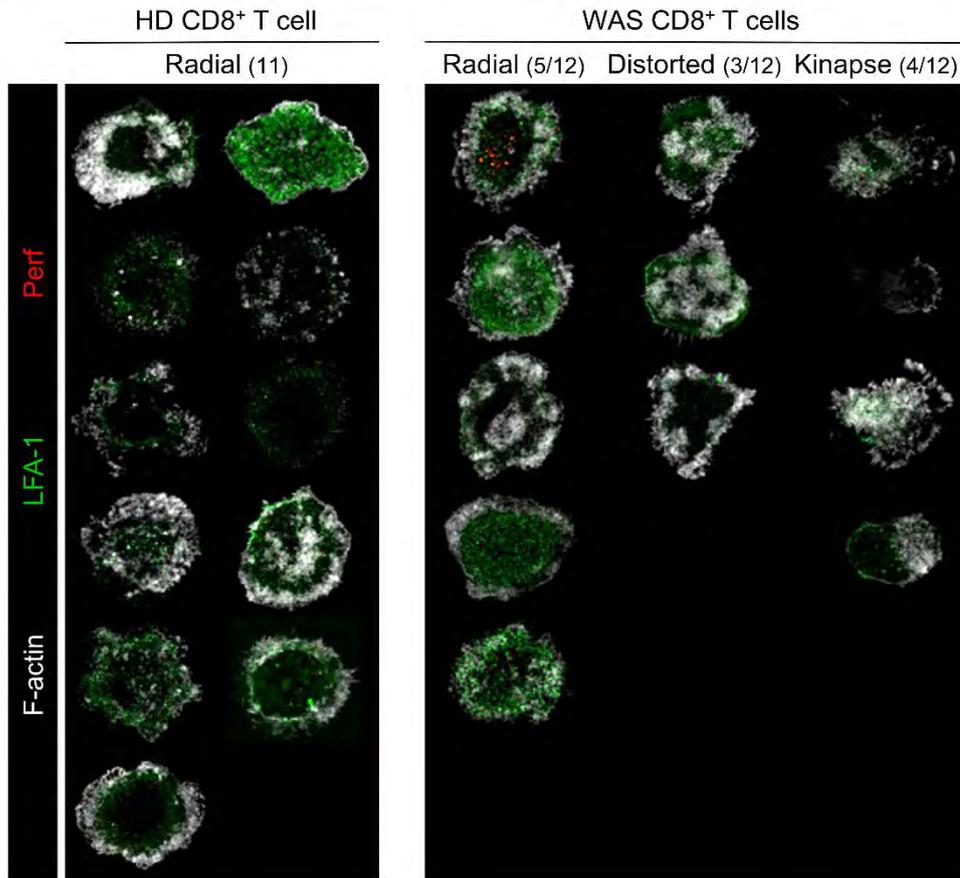


**Figure S4**

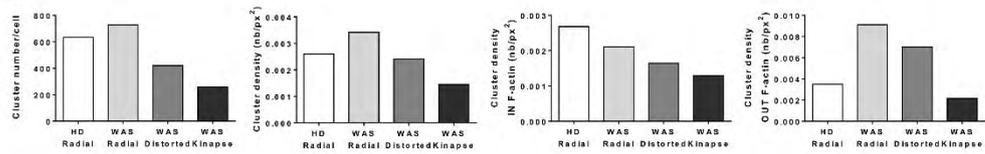


**Figure S5**

**A**



**B**



Les nano-clusters de LFA-1 subissent une activation digitale et se localisent dans les interstices du maillage du cytosquelette d'actine à la synapse des lymphocytes T

## Résumé

L'étude suivante fait partie des résultats préliminaires obtenus au cours de cette thèse et devrait être complétée par d'autres expériences.

Comme démontré dans l'article précédent LFA-1 est une intégrine qui s'organise en nano-clusters de taille nanométrique à la synapse immunologique. Ces nano-clusters, une fois activés, se rassemblent à la synapse en formant un anneau qui permet le confinement des granules lytiques. Dans cette même étude nous avons identifié la protéine régulatrice de l'actine WASP comme protéine clé pour contrôler l'activation et la densité des nano-clusters de LFA-1. Nous avons également démontré que la protéine WASP stabilise l'anneau d'adhésion de LFA-1 et garantit une libération confinée des granules lytiques.

Cependant nous possédons peu d'informations concernant le mode d'activation des nano-clusters de LFA-1 et comment se lient-ils au cytosquelette d'actine.

Pour tenter de répondre à ces questions nous avons mis en place une étude sur des clones de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> humains étalés sur des lamelles de verre imprégnées d'ICAM-1 ± anticorps anti-CD3 et imagés grâce aux approches de microscopie de super-résolution citées précédemment.

## Introduction

Les intégrines sont des molécules capables d'intégrer les signaux biochimiques et biomécaniques de l'environnement et de les transmettre à la cellule par l'ancrage de leur queue intracytoplasmique au cytosquelette d'actine<sup>204</sup>. C'est ainsi que les intégrines régulent l'adhérence à la matrice extracellulaire et aux cellules partenaires. Dans le cas particulier des lymphocytes T, l'intégrine LFA-1 permet la conjugaison de lymphocytes T avec des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et l'adhérence aux cellules endothéliales et tissulaires. Par conséquent, la molécule de LFA-1 a d'abord été identifiée à l'aide d'anticorps qui bloquait l'activité lytique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques<sup>38</sup>. La signalisation bidirectionnelle de l'intégrine s'effectue par un changement de conformation associé à une séparation des domaines cytoplasmiques  $\alpha$ L et  $\beta$ 2. Les signaux permettant ces changements peuvent être extracellulaires et/ou intracellulaires<sup>90</sup>. Les changements de conformations<sup>90</sup> de LFA-1 sont associés à la maturation de l'affinité du ligand requise pour une adhérence ferme<sup>205</sup>. Il a été reporté que les lymphocytes T pouvaient moduler leur adhérence médiée par LFA-1 en ajustant l'équilibre entre un groupe de récepteurs mobiles et un groupe de récepteurs confinés suite à l'interaction avec le cytosquelette d'actine<sup>206</sup>. À la synapse immunologique des lymphocytes T, les nano-clusters de LFA-1 s'accumulent au cours du temps sur le côté interne du réseau d'actine lamellipodiale pour former un anneau périphérique<sup>207</sup>. L'engagement actif de LFA-1 est nécessaire pour son recrutement à la surface de contact des CTL et pour la formation de l'anneau à la jonction externe<sup>208</sup>. Le flux rétrograde de l'actine fournit les forces latérales nécessaires à l'activation de LFA-1 en séparant les queues cytoplasmiques de l'intégrine,  $\alpha$ L et  $\beta$ 2<sup>183</sup>. Suivant ce raisonnement, Il a été démontré que LFA-1 sous la conformation étendue intermédiaire se localise dans l'anneau périphérique de la synapse, tandis que la conformation ouverte est enrichie dans un anneau plus central<sup>178</sup>. Dans les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, l'adhésion médiée par LFA-1 est centrale pour limiter la libération des molécules cytotoxiques.

Il est connu que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> forment cinq fois plus d'anneau que les cellules T CD4<sup>+</sup><sup>209</sup>.

Dans la première étude nous avons vu comment l'activation de LFA-1 est contrôlée à l'échelle synaptique. L'examen de la topologie nanométrique de LFA-1 nous a permis d'estimer la densité et la taille des nano-clusters de LFA-1 activée. Enfin la protéine régulatrice de la densification de l'actine WASP est requise pour un meilleur soutien de l'organisation des nano-clusters de LFA-1.

Cependant il nous manque des détails importants sur comment les nano-clusters de LFA-1 interagissent avec le maillage de l'actine. Ces détails pourraient nous aider à comprendre comment la dynamique du cytosquelette d'actine contrôle l'activation de la molécule de LFA-1. Nous avons abordé ces questions en utilisant une combinaison d'approches de microscopie de super-résolution comprenant du dSTORM<sup>24</sup> et du SIM<sup>3</sup>, appliquée à la synapse immunologique des CTL.

## Résumé des résultats expérimentaux

Dans cette étude nous montrons que l'activation conformationnelle de l'intégrine LFA-1 repose sur le regroupement des clusters de molécules de LFA-1 et sur leur l'ancrage au cytosquelette d'actine. La façon dont ces processus sont régulés au niveau de l'ultrastructure du cytosquelette d'actine, dans le contexte de la synapse des lymphocytes T, reste à explorer. En appliquant une combinaison d'approches de microscopie de super-résolution aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques primaires (CTL), nous révélons que LFA-1 se distribue dans des clusters de taille nanométrique positionnés dans les interstices étroits du maillage du cytosquelette d'actine. Nous montrons également que l'activation de LFA-1 fonctionne via le passage d'une fraction des nano-clusters à la conformation de haute affinité sans modification de la taille ou du positionnement par rapport à l'ultrastructure du cytosquelette d'actine. En conclusion, notre étude révèle que l'adhésion médiée par LFA-1 dans les CTL repose sur l'anneau de nano-clusters de LFA-1, qui sont confinés dans les interstices du maillage de l'actine et opérant comme des unités fonctionnelles d'un processus d'activation digitale.

En d'autres termes, nos données montrent que LFA-1 se distribue principalement à la surface des CTL humains primaires en formant des nano-clusters, dont la taille ne varie pas lors de l'assemblage de la synapse, piloté par le TCR. L'activation de LFA-1 dans l'anneau synaptique se produit par un processus de tout ou rien dans les clusters de LFA-1 individuels de conformation fermée. A savoir, un cluster bascule individuellement dans une conformation de haute affinité et on ne note, à priori, pas de mélanges de molécules de différentes conformations dans un cluster. Enfin, malgré l'ancrage direct aux filaments d'actine sous-corticale, les nano-clusters de LFA-1 sont également positionnés dans les interstices étroits du maillage du cytosquelette d'actine.

## Résultats expérimentaux

LFA-1 se distribue en nano-clusters à la surface des cellules T indépendamment de l'activation du TCR

Dans un premier temps nous avons cherché à estimer la taille des clusters de LFA-1 dans un clone de lymphocyte T CD8<sup>+</sup> et à évaluer si cette taille variait dans les conditions de migration et de formation de la synapse immunologique. Pour y répondre nous avons utilisé l'approche du dSTORM basée sur une illumination TIRF.

Cette approche a été utilisée pour caractériser la distribution à l'échelle nanométrique de LFA-1 à la surface des cellules T CD8<sup>+</sup> humaines non transformées interagissant avec ICAM-1 seul (Figure 1A) ou avec ICAM-1 plus l'anticorps anti-CD3 (Figure 1B) pour induire, respectivement, une migration et un assemblage de la synapse immunologique. L'anticorps TS2/4 a été utilisé pour révéler la distribution de LFA-1 indépendamment de sa conformation. Lors de l'adhésion à la lamelle imprégnée d'ICAM-1, les cellules T CD8<sup>+</sup> ont adopté la morphologie typique des cellules en migration avec un lamellipode au front migratoire et un uropode, qui sont facilement identifiables. L'image TIRF d'une cellule représentative montre une répartition inégale de LFA-1 sur la majeure partie de la surface des cellules T allongées sur ICAM-1, avec un enrichissement local à l'uropode et au milieu du corps cellulaire (Figure 1A, panel de gauche, voir Figure S1A pour les cellules supplémentaires). De manière distincte, lors de l'adhérence à la surface imprégnée d'ICAM-1/anti-CD3, les cellules T CD8<sup>+</sup> s'étalent en assemblant une structure lamellipodiale circulaire, typique de l'organisation de la synapse immunologique. Comme prévu dans cette condition<sup>178</sup>, LFA-1 détectée par le TIRF se répartit principalement dans une structure annulaire correspondant à la partie interne du lamellipodium circulaire (Figure 1B, panel de gauche, voir Figure S1B pour les cellules supplémentaires). Pour ensuite évaluer la distribution de LFA-1 à l'échelle nanométrique, l'imagerie dSTORM basée sur une illumination TIRF a été appliquée aux mêmes cellules. Dans la cellule étalée sur ICAM-

1, LFA-1 semble se distribuer dans un réseau dense de clusters de petite taille (Figure 1A, première ligne, panels 2-4). Pour identifier de manière impartiale les clusters de LFA-1, l'algorithme spatial DBSCAN (Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise) a été appliqué à la zone sélectionnée et agrandie (Figure 1A, panel 5). Cette analyse de détection des clusters indique que la plupart des événements de détection appartiennent à des clusters de LFA-1 individuels.

Avant d'extraire des statistiques relatives à la taille et à la densité d'un cluster, nous avons appliqué un filtre basé sur un signal de fond récupéré à partir de la surface entourant les cellules (voir les matériels et méthodes, joints ci-après). Compte tenu de cette limite, la moyenne géométrique des surfaces des clusters de LFA-1 a été estimée à  $0,0085 \mu\text{m}^2$  (Figure 1C) ce qui correspond à un diamètre d'environ 100 nm. De la même manière que les cellules allongées sur ICAM-1, les cellules formant des synapses sur ICAM-1/anti-CD3 rassemblent les molécules de LFA-1 en clusters de petite taille avec une moyenne géométrique estimée à  $0,0087 \mu\text{m}^2$  (Figure 1C). Ces données montrent que la molécule de LFA-1 s'organise en nano-clusters avec des tailles de surfaces comparables à l'échelle nanométrique, malgré la différence morphologique entre les cellules étalées sur ICAM-1 et celles étalées sur ICAM-1/anti-CD3 et la différence de distribution de LFA-1 à l'échelle cellulaire. Ensuite, nous avons voulu estimer le nombre de nano-clusters de LFA-1 présent sur l'ensemble de la surface de contact des cellules avec les deux surfaces de stimulation. Pour ce faire, une approche de détection de particules utilisant ImageJ (voir dans la partie méthodes quantitatives d'analyse des clusters et dans les matériels et méthodes de ces résultats) a été préférée à l'algorithme de DBSCAN. En effet, comme mentionné précédemment dans la partie méthode, DBSCAN n'est pas adapté pour analyser de grandes surfaces contenant des densités et des bords variables. Le nombre total de nano-clusters de LFA-1 présents à la surface cellulaire a été estimé à  $2274 \pm 581,2$  par cellule (moyenne  $\pm$  SEM de 5 cellules) sur ICAM-1 et à  $2000 \pm 995,1$  par cellule (moyenne  $\pm$  SEM de 4 cellules)

sur ICAM-1/anti-CD3 (Figure 1D). Puis, comme les surfaces d'étalement des cellules considérées étaient variables, nous avons pensé qu'il était judicieux d'estimer également la densité des nano-clusters de LFA-1. En moyenne, les cellules sur ICAM-1 affichent une densité de 7,5 +/- 2,7 nano-clusters par  $\mu\text{m}^2$ , tandis que les cellules sur ICAM-1 / anti-CD3 affichent une densité de 6,3 +/- 2,7 nano-clusters par  $\mu\text{m}^2$  (Figure 1E).

L'ensemble de ces données révèlent la topologie de LFA-1 dans les lymphocytes T à l'échelle nanométrique lors de la migration et de l'assemblage de la synapse immunologique. Dans les deux conditions, les molécules de LFA-1 sont organisées en surfaces denses d'environ 2000 nano-nano-clusters de 100 nm de diamètre. Bien que la stimulation du TCR induise une redistribution des nano-clusters de LFA-1 en un anneau synaptique, il ne semble pas qu'il y ait un recrutement de nano-clusters ou de molécules supplémentaires pouvant modifier leur taille moyenne.

Une proportion limitée nano-clusters contient des molécules de LFA-1 de haute affinité à la synapse immunologique

Dans un second temps nous avons cherché à évaluer comment l'activation conformationnelle de LFA-1, à la synapse immunologique, pouvait se rapporter à sa topologie à l'échelle nanométrique. Pour y parvenir nous avons utilisé des cellules T CD8<sup>+</sup> étalées sur ICAM-1/anti-CD3, puis marquées séparément avec des anticorps reconnaissant LFA-1 soit sous sa conformation fermée (HI111) soit sous sa conformation ouverte (a24). En accord avec les récentes données d'imagerie confocale publiées par Comrie et ses collaborateurs<sup>178</sup>, LFA-1 dans les deux conformations s'organise principalement en anneau à la synapse immunologique (Figure 2A-B, panels de gauche, voir également la Figure S2A-B). Au-delà de la distribution à l'échelle de la cellule, l'imagerie dSTORM basée sur une illumination TIRF révèle que LFA-1 sous les deux conformations est distribuée en clusters à l'échelle nanométrique (Figure 2A-B,

panels centraux). Il est important de noter que ces images indiquent qu'une grande proportion de molécules de LFA-1 fermée et activée semble s'organiser en nano-clusters. Pour identifier précisément les nano-clusters de LFA-1 sous les conformations active et non active, nous avons appliqué une analyse de DBSCAN (Figure 2A-B, panels de droite) sur la base des coordonnées de localisation des molécules. Cette analyse confirme que la plupart des événements de détection appartiennent à des nano-clusters individuels. En outre, elle nous montre que l'assemblage en nano-clusters des deux conformations de LFA-1 est très similaire, ce qui indique que l'activation conformationnelle de LFA-1 se produit dans des nano-clusters sans modifications de la taille et de la densité. Ce résultat est tout de même intéressant car si on se réfère aux précédentes études montrant que la molécule de LFA-1 non activée ne s'assemble pas en clusters, puisqu'elle n'est pas en connexion avec le cytosquelette d'actine, on ne devrait pas être en présence de nano-clusters dans le marquage avec HI111. Dans les perspectives nous verrons comment nous comptons compléter et vérifier ce résultat.

Ensuite les moyennes géométriques des surfaces des nano-clusters ont été estimées à 0,014 et 0,013  $\mu\text{m}^2$ , pour les nano-clusters contenant LFA-1 sous les conformations active et non active, respectivement (Figure 2C).

Cette analyse renforce la notion selon laquelle indépendamment de son statut conformationnel, LFA-1 se distribue en nano-clusters de taille finie. Les images de dSTORM et les analyses DBSCAN mettent également en évidence le fait que les nano-clusters contenant des molécules de LFA-1 activées sont éparpillés par rapport aux nano-clusters contenant des molécules de LFA-1 non activées. Ces observations suggèrent donc qu'une faible proportion de nano-clusters contenait des molécules de LFA-1 activées. Par la suite, nous avons appliqué sur la cellule entière une approche de détection de particules dans ImageJ, pour les mêmes raisons qui ont été évoquées plus haut. Un nombre moyen de nano-clusters de LFA-1 de 930,2 +/- 285,5 et 289,7 +/- 84,19 par cellule a été détecté, pour les nano-clusters contenant les conformations

fermée et ouverte, respectivement (Figure 2D). En conséquence, la densité des nano-clusters contenant la conformation de LFA-1 fermée était plus élevée ( $2.279 \pm 0.55$  nano-clusters par  $\mu\text{m}^2$ ) que celle des nano-clusters contenant la conformation de LFA-1 ouverte ( $0.7183 \pm 0.28$  nano-clusters par  $\mu\text{m}^2$ ) (Figure 2E). Par rapport aux 2000 LFA-1 nano-clusters détectés avec l'anticorps TS2/4 reconnaissant LFA-1 indépendamment de sa conformation (Figure 1) environ 50% des nano-clusters semblent contenir des molécules de LFA-1 sous sa conformation fermée. Par contre seulement 10% des nano-clusters semblent contenir des molécules de LFA-1 sous sa conformation ouverte. En conclusion, ces données indiquent que l'activation de la molécule de LFA-1 se produit dans une fraction de nano-clusters, au niveau interne de la synapse immunologique et que cette activation se fait sans modification détectable de la surface des nano-clusters moléculaires.

## LFA-1 se distribue en nano-clusters distincts selon son état de conformation

Dans un troisième temps nous avons cherché à comprendre si les molécules activées et fermées seraient associées en nano-clusters ou plutôt séparées en nano-clusters distincts. Pour y répondre, nous avons utilisé une approche de microscopie SIM multicolore afin de visualiser simultanément sur la même cellule les conformations de LFA-1 fermée et ouverte, après un marquage avec les anticorps HI111 et a24. Nous avons également marqué les cellules avec la phalloïdine dans le but de pouvoir étudier le positionnement des nano-clusters de LFA-1 en relation avec le maillage du cytosquelette d'actine (décrit dans la partie qui va suivre). Une épaisseur de 1100 nm à partir de la surface cellulaire a été choisie puisqu'elle a permis de recouvrir le cortex d'actine sous-jacent au plan synaptique pour la plupart des cellules examinées. En accord avec l'imagerie dSTORM, LFA-1 sous sa conformation fermée est distribuée sous forme d'un réseau dense de nano-clusters sur une grande surface recouvrant la cellule (Figure 3A, panel de gauche en haut et panel central). LFA-1 sous sa conformation

ouverte est également distribuée sous forme de nano-clusters, mais limitée principalement à une structure en anneau qui se chevauche au lamellipode circulaire (Figure 3A, panel de gauche au milieu et panel central).

Ensuite, nous avons appliqué une analyse de distribution radiale confirmant que les nano-clusters contenant LFA-1 sous sa conformation ouverte sont localisés dans une zone plus restreinte que les nano-clusters contenant LFA-1 sous sa conformation fermée (Figure 3B). Par rapport au dSTORM, l'approche du SIM nous a donné une estimation du nombre de nano-clusters plus élevée, avec 2334 +/- 202,4 nano-clusters contenant LFA-1 sous sa conformation fermée et 409,6 +/- 121,6 nano-clusters contenant LFA-1 sous sa conformation ouverte (Figure 3C). Cet écart pourrait être lié à l'épaisseur réduite de la partie cellulaire imagée avec l'approche du TIRF-dSTORM. Cependant, il est important de noter que la proportion relative des nano-clusters avec les deux conformations de LFA-1 reste comparable dans les deux approches. Très clairement, l'approche du SIM multicolore révèle qu'à l'échelle nanométrique, les conformations de LFA-1 fermée et ouverte se séparent en nano-clusters distincts (Figures 3A, panel central, panel de droite en haut et panel du milieu à droite). Cette observation a été confirmée par un coefficient de Mander très faible, indiquant l'absence de co-localisation entre les deux conformations de LFA-1 (Figure 3D).

Nos résultats semblent révéler que l'activation de LFA-1 est limitée à une fraction de nano-clusters dans laquelle la plupart des molécules passent à la conformation active indiquant ainsi que LFA-1 subit un processus d'activation de tout ou rien, par lequel les nano-clusters fonctionnent comme des unités opérationnelles.

Les nano-clusters de LFA-1 se localisent dans les interstices du maillage du cytosquelette d'actine

Dans un quatrième temps nous avons cherché à comprendre comment les nano-clusters de LFA-1 interagissaient avec le cytosquelette d'actine.

En effet un élément structurel clé dans la régulation de l'activation de LFA-1 est le cytosquelette d'actine. La notion actuelle est que l'activation de LFA-1 à la synapse immunologique est concomitante à un ancrage au cytosquelette d'actine. Pour mieux comprendre ce processus, nous avons profité de notre configuration SIM pour visualiser en parallèle les nano-clusters de LFA-1 (sous ses conformations fermée et ouverte) et le maillage du cytosquelette d'actine sous-jacent. Le cytosquelette d'actine est organisé comme un maillage de haute densité dans le lamellipode circulaire, alors qu'il présente une densité réduite vers le centre de la synapse immunologique (Figure 3A, panel du bas à gauche et panel central, voir également la Figure S3 pour des exemples supplémentaires). Des alvéoles plus larges dépourvues de filaments d'actine sont présentes au centre de la synapse immunologique, ainsi que des petits foyers denses dispersés. Pour évaluer la répartition relative de LFA-1 et de l'actine filamenteuse à l'échelle des cellules, un profil d'intensité radial a été réalisé suite à la normalisation des longueurs de rayon individuel de chaque marquage (Figure 3C). Ce profil indique que la conformation de LFA-1 fermée se chevauche avec l'actine filamenteuse, couvrant toute la zone synaptique et enrichie en périphérie de la synapse immunologique ( $8\mu\text{m}$  du centre). La localisation de la conformation de LFA-1 ouverte est plus confinée et est principalement détectée dans une région correspondant au côté interne de l'anneau de l'actine filamenteuse ( $6\mu\text{m}$  du centre). Il est important de noter que l'inspection des zones agrandies des images SIM révèle que tous les nano-clusters de conformation ouverte de LFA-1 et les nano-clusters de conformation fermée de LFA-1 ne sont pas directement ancrés aux filaments d'actine. Cette observation est valable même dans l'anneau périphérique présentant des densités enrichies à la fois des nano-clusters de LFA-1 et d'actine (Figure 3A, panel du bas à droite). Paradoxalement, les nano-clusters composés des deux conformations de LFA-1 sont positionnés dans les interstices minces du maillage du cytosquelette d'actine (Figure 3A, panel inférieur de droite).

Cette observation a été confirmée par le faible coefficient de Mander indiquant que tous les nano-clusters de LFA-1 ne se sont pas localisés avec les fibres d'actine (Figure 3D). Pour mieux évaluer la répartition locale des nano-clusters de LFA-1 par rapport au maillage du cytosquelette d'actine, nous avons profité de l'approche 3D-SIM pour produire des sections orthogonales de 1100 nm d'épaisseur (Figure 3A, panels intermédiaires). Comme prévu, le long de l'axe z, les nano-clusters de LFA-1 ont d'abord été détectés vers la lamelle, suivie du cytosquelette d'actine sous-jacent. La partie interne des nano-clusters de LFA-1 semble se resserrer dans des zones confinées de densité réduite d'actine filamenteuse, ce qui suggère que la partie intracellulaire des nano-clusters de LFA-1 est confinée dans les alvéoles minces du maillage du cytosquelette d'actine. Ensemble, ces données révèlent qu'à l'échelle cellulaire, les nano-clusters de LFA-1 se répartissent préférentiellement dans les zones de densité de maillage d'actine élevée mais aussi que les nano-clusters de LFA-1 se localisent dans les interstices du maillage du cytosquelette d'actine à l'échelle nanométrique.

Ces résultats font l'objet de résultats préliminaires qui suscitent de nombreuses questions quant à l'organisation en clusters de ces molécules de LFA-1.

**Figure 1.**

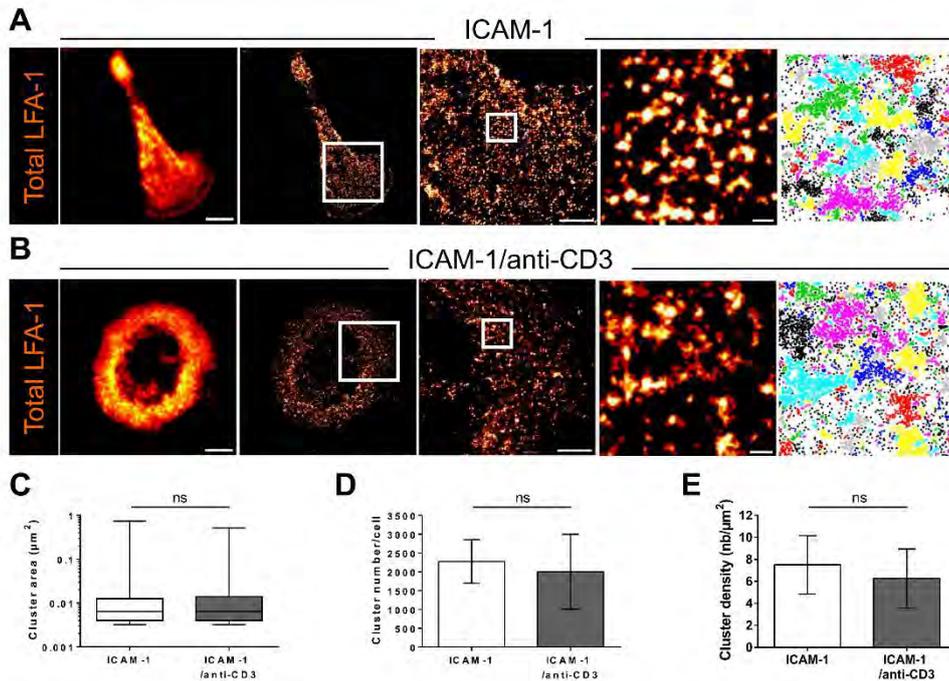


Figure 1. Topologie de LFA-1 à l'échelle nanoscopique dans des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> humains primaires lors de la motilité et de l'assemblage de la synapse immunologique. (A) Marquage de LFA-1 total (TS2/4 Ab) dans des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> déposés sur ICAM-1. En partant de la gauche vers la droite: l'image TIRFM, l'image de reconstruction du dSTORM, zoom primaire (mid-body), zoom secondaire (ROI) et la détection des agrégats dans la ROI avec l'outil DBSCAN. Barres d'échelle 5, 2 et 0,2 $\mu$ m respectivement. (B) Marquage de LFA-1 total (TS2/4 Ab) dans des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> déposés sur ICAM-1/anti-CD3 Abs. En partant de la gauche vers la droite: l'image TIRFM, l'image de reconstruction du dSTORM, zoom primaire (mid-body), zoom secondaire (ROI) et la détection des agrégats dans la ROI avec l'outil DBSCAN. Barres d'échelle 5, 2 et 0,2 $\mu$ m respectivement. (C) Distribution de taille de LFA-1 total sur de l'ICAM-1 et ICAM-1/anti-CD3 dans la ROI (n=242 agrégats pour la condition avec ICAM-1 et n=238 agrégats ICAM-1/anti-CD3). (D) Nombres de LFA-1 total sur ICAM-1 and ICAM-1/anti-CD3 dans la cellule entière (moyenne +/- SEM, n=5 and n=4 cellules for ICAM-1 and ICAM-1/antiCD3, respectivement). (E) Densité des agrégats de LFA-1 total sur ICAM-1 et ICAM-1/anti-CD3 dans la cellule entière (moyenne +/- SEM, n=5 and n=4 cellules pour ICAM-1 and ICAM-1/antiCD3, respectivement). Dans ces conditions, les significations statistiques ont été obtenues avec des t-test non paramétriques de Mann-Whitney. Les P values resultants sont : ns  $P > 0.05$ ; \*  $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*  $0.001 < P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

**Figure 2.**

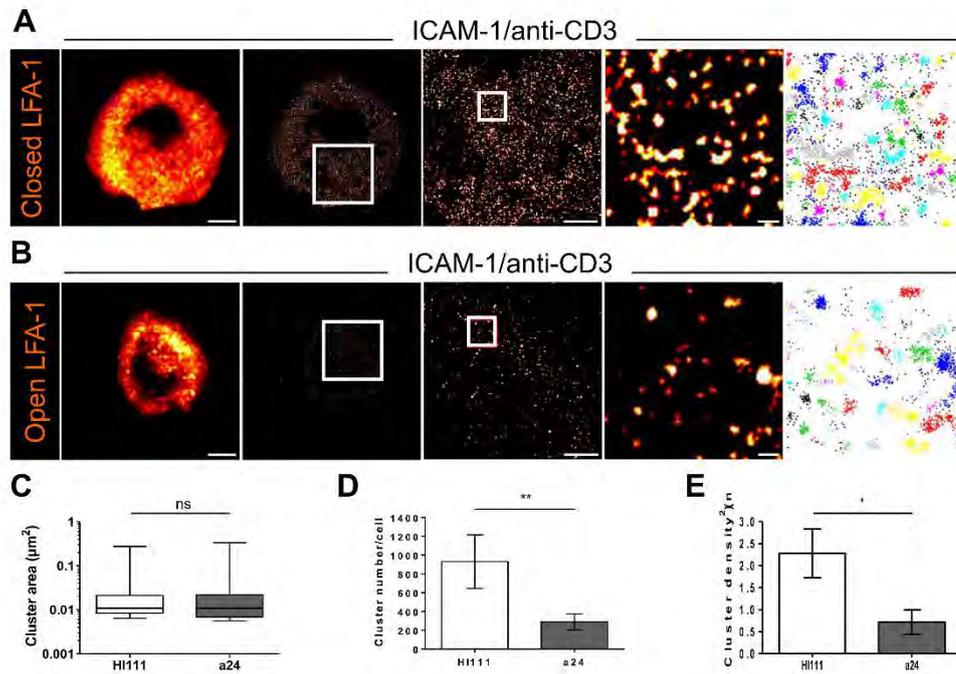


Figure 2. Activation de LFA-1 à l'échelle nanoscopique à la synapse immunologique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> humains primaires. (A) Marquage de la conformation fermée de LFA-1 (HI111 Ab) dans des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> humains primaires déposés sur ICAM-1/anti-CD3 Abs. En partant de la gauche vers la droite: l'image TIRFM, l'image de reconstruction du dSTORM, zoom primaire (mid-body), zoom secondaire (ROI) et la détection des agrégats dans la ROI avec l'outil DBSCAN. Barres d'échelle 5, 2 et 0,2 $\mu\text{m}$  respectivement. (B) Marquage de la conformation ouverte de LFA-1 (a24 Ab) dans des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> humains primaires déposés sur ICAM-1/anti-CD3 Abs. En partant de la gauche vers la droite: l'image TIRFM, l'image de reconstruction du dSTORM, zoom primaire (mid-body), zoom secondaire (ROI) et la détection des agrégats dans la ROI avec l'outil DBSCAN. Barres d'échelle 5, 2 et 0,2 $\mu\text{m}$  respectivement. (C) Distribution des tailles d'agrégats des conformations fermée et ouverte de LFA-1 dans les ROI. (D) Nombres d'agrégats de LFA-1 de conformation fermée et ouverte dans la cellule (moyenne  $\pm$  SEM, n=6 et n=6 cellules pour HI111 et pour a24, respectivement). (E) la densité des agrégats des conformations ouvertes et fermée de LFA-1 dans la cellule entière (moyenne  $\pm$  SEM, n=6 et n=6 cellules pour HI111 et pour a24, respectivement). Dans ces conditions, les significations statistiques ont été obtenues avec des t-test non paramétriques de Mann-Whitney. Les P values resultants sont: ns  $P > 0.05$ ; \*  $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*  $0.001 < P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

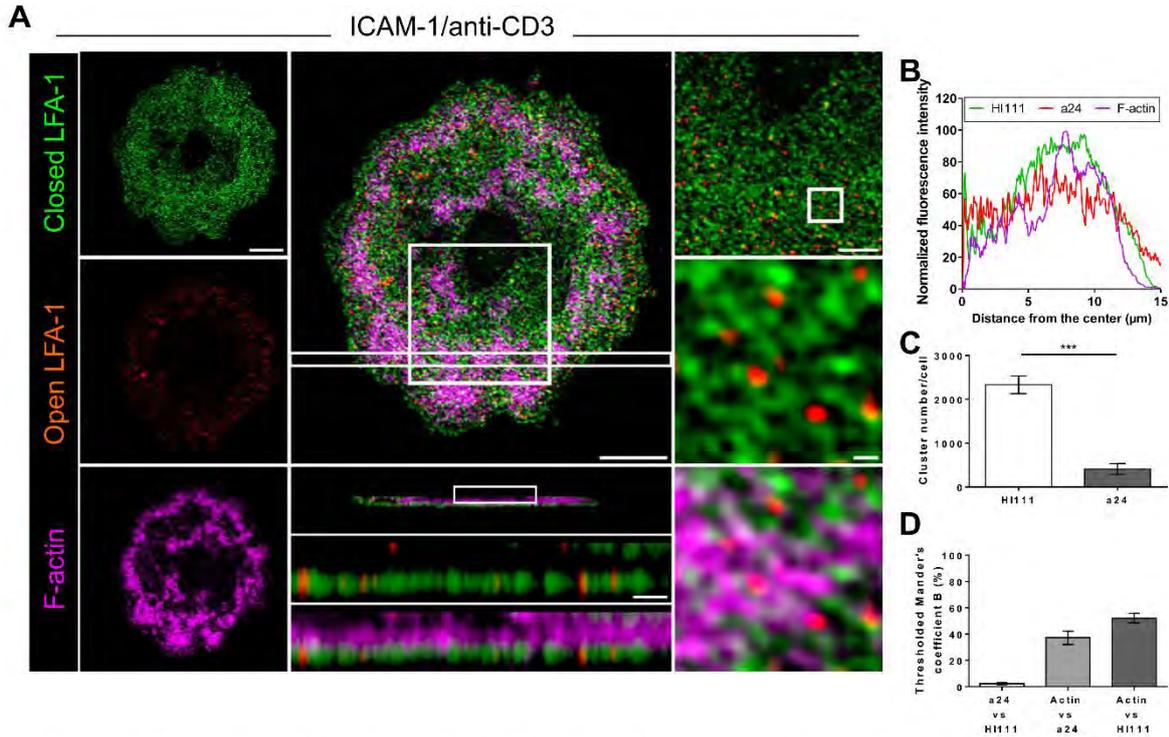


Figure 3. Interaction des agrégats de conformations fermée et ouverte de LFA-1 avec le maillage du cytosquelette d'actine à la synapse des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. (A) Imagerie SIM montrant la section basale (1100 nm) d'une cellule T CD8 primaire humaine représentative adhérant à ICAM-1 / anti-CD3. Les panels de gauche représentent dans l'ordre F-actine, LFA-1 fermée et LFA-1 ouverte. Les panels du milieu montrent une superposition des trois couleurs (xy), en dessous sont représentées des vues orthogonales (xz) montrant l'ancrage des agrégats de LFA-1 dans le maillage du cytosquelette d'actine (vue orthogonale de la cellule entière, zoom sur la vue orthogonale sans ou avec F-actine). Les panels de droite représentent les conformations LFA-1 fermée et ouverte à la périphérie de la cellule dans un zoom intermédiaire et dans un zoom secondaire avec la F-actine. Barres d'échelle: 5, 2 et 0,2  $\mu\text{m}$  selon le zoom. (B) Profil radial de 360 ° de l'image représentative en trois couleurs du centre vers la périphérie. (C) Nombre d'agrégats de conformations LFA-1 fermée et ouverte dans la cellule entière (moyenne  $\pm$  SEM pour  $n = 7$  et  $n = 7$  cellules pour HI111 et a24 respectivement). (D) Analyse de co-localisation des images 3D (section de 1100 nm) de LFA-1 fermée, LFA-1 ouverte et F-actine (moyenne  $\pm$  SEM,  $n = 8$ ). Dans ces conditions, les significations statistiques ont été obtenues avec des *t*-tests non paramétriques de Mann-Whitney. Les valeurs *P* résultants sont: ns  $P > 0,05$ ; \*  $0,01 < P < 0,05$ ; \*\*  $0,001 < P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$

Figure S1.

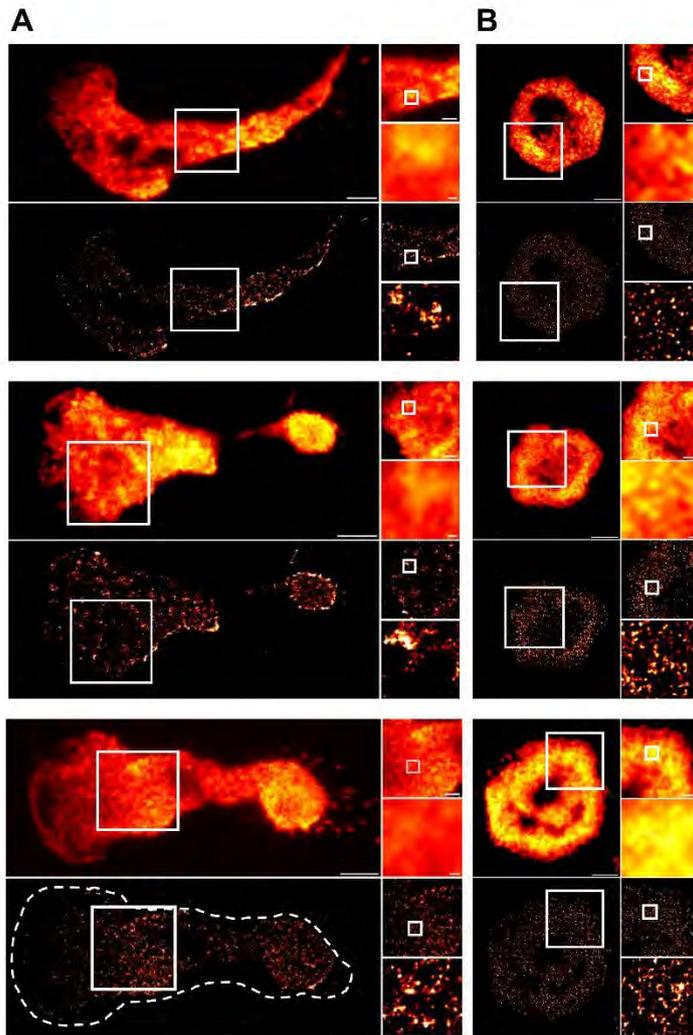


Figure S1. Topologie de LFA-1 à l'échelle nanoscopique dans des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> humains primaires lors de la motilité et de l'assemblage de la synapse immunologique – Exemples de cellules additionnelles.

(A) Image TIRFM de LFA-1 total dans des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> humains primaires déposés sur ICAM-1 (panel du haut) et l'image de reconstruction du dSTORM (panel du dessous). Ces images montrent trois cellules représentatives de LFA-1 total dans la condition d'étalement des cellules sur ICAM-1. (B) Image TIRFM de LFA-1 total dans des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> humains primaires déposés sur ICAM-1/anti-CD3 (panel du dessus) et l'image de reconstruction du dSTORM (panel du dessous). Ces images montrent trois cellules représentatives de LFA-1 total dans la condition d'étalement des cellules sur ICAM-1/anti-CD3.

Barres d'échelle 5, 2 et 0,2  $\mu\text{m}$  selon le zoom.

Figure S2.

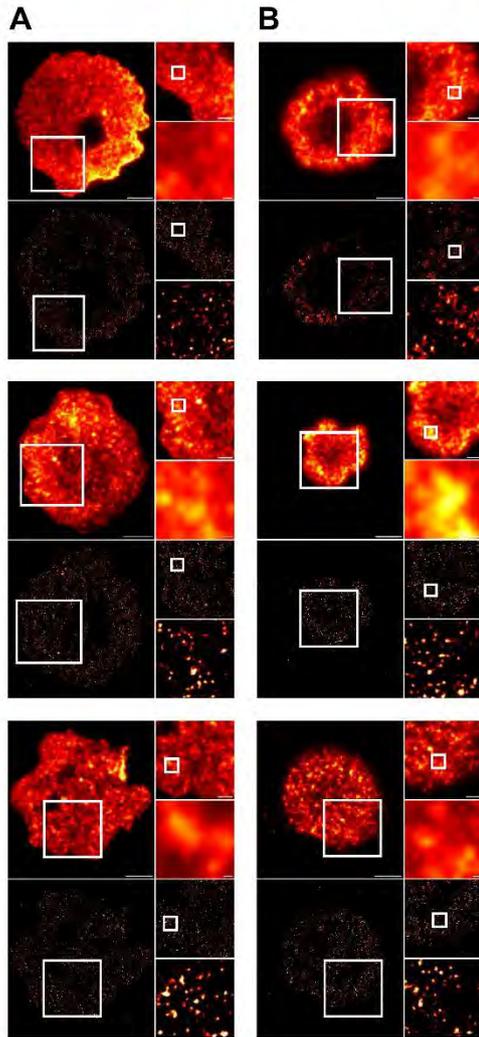


Figure S2. Activation de LFA-1 à l'échelle nanoscopique à la synapse immunologique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> humains primaires – Exemples de cellules additionnelles.

(A) Image TIRFM de LFA-1 de conformation fermée dans des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> humains primaires déposés sur ICAM-1/anti-CD3 (panel du haut) et l'image de reconstruction du dSTORM (panel du dessous). Ces images montrent trois cellules représentatives de LFA-1 de conformation fermée à la synapse immunologique. (B) Image TIRFM de LFA-1 de conformation ouverte dans des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> humains primaires déposés sur ICAM-1/anti-CD3 (panel du dessus) et l'image de reconstruction du dSTORM (panel du dessous). Ces images montrent trois cellules représentatives de LFA-1 de conformation ouverte à la synapse immunologique. Barres d'échelle 5, 2 et 0,2 $\mu$ m selon le zoom.

Figure S3.

A

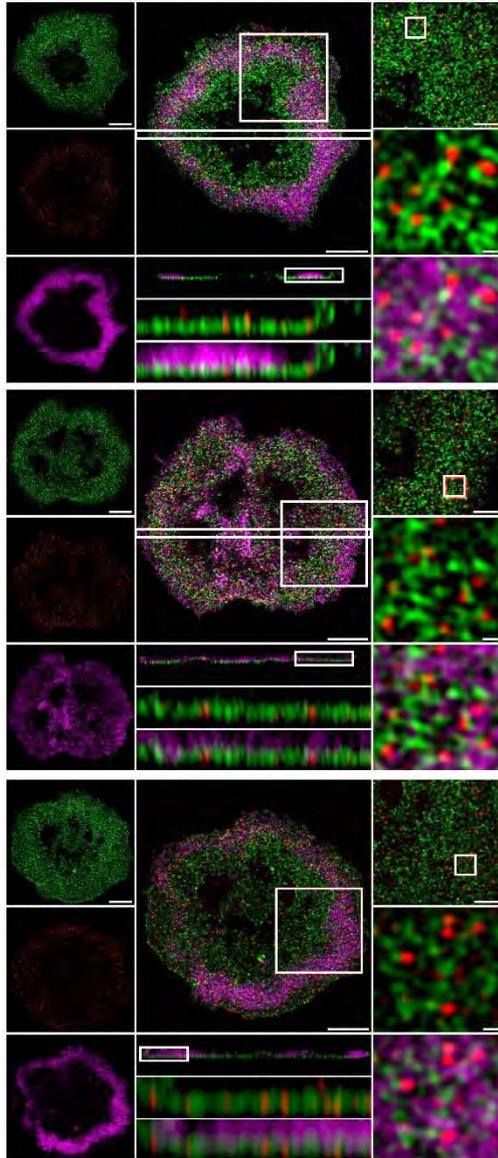


Figure S3. Interaction des agrégats de conformations fermée et ouverte de LFA-1 avec le maillage du cytosquelette d'actine à la synapse des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.

(A) Imagerie SIM montrant la section basale (1100 nm) de cellules T CD8<sup>+</sup> humaines primaires représentatives adhérant à ICAM-1 / anti-CD3. Les panels de gauche représentent dans l'ordre F-actine, LFA-1 fermée et LFA-1 ouverte. Les panels du milieu montrent une superposition des trois couleurs (xy), en dessous sont représentées des vues orthogonales (xz) montrant l'ancrage des agrégats de LFA-1 dans le maillage du cytosquelette d'actine (vue orthogonale de la cellule entière, zoom sur la vue orthogonale sans ou avec F-actine). Les panels de droite représentent les conformations LFA-1 fermée et ouverte à la périphérie des cellules dans un zoom intermédiaire et dans un zoom secondaire avec la F-actine. Barres d'échelle: 5, 2 et 0,2  $\mu\text{m}$  selon le zoom.

## Matériels et méthodes

### **Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>**

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> non transformés ont été générés à partir d'échantillons de sang de donneurs sains. Les PBMC ont été isolées par centrifugation à gradient de densité sur un gradient de Ficoll (PAA). Les cellules T CD8<sup>+</sup> ont été isolées par sélection négative (Stem Cell) selon les instructions du fabricant, avec une pureté supérieure à 95%. Les cellules T CD8<sup>+</sup> ont été cultivées dans du RPMI 1640 glutamax (Gibco) avec 5% de sérum humain (PAA), 100µg/ml de pénicilline/streptomycine, 10mM de Hepes, 0,1mM d'acides aminés non essentiels et 1mM de pyruvate de sodium (Invitrogen). Les cellules ont été stimulées toutes les 2 semaines en présence de 1x10<sup>6</sup>/ml de PBMC allogéniques irradiées et de cellules JY transformées par EBV irradiées à 1x10<sup>5</sup>/ml avec 1µg/ml de PHA, 100UI/ml de rhIL-2 et 5ng/ml de rhIL-15.

### **Le marquage cellulaire : dSTORM**

Les cellules ont été déposées sur des lamelles circulaires 1.5H (18 mm de diamètre) imprégnées d'ICAM-1/Fc recombinant (4µg/ml) (R&D Systems, USA) avec ou sans anticorps anti-CD3 (10µg/ml) pendant une nuit à 4 ° C. Les cellules ont été lavées dans du milieu RPMI 5% Human Serum puis marquées avec l'anticorps A24 ou l'anticorps HI111 pour révéler respectivement les conformations de LFA-1 ouverte et fermée. Les cellules ont été immédiatement transférées sur les lamelles pour 10 min à 37 ° C. Les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde à 4% pendant 10 min à 37 ° C, lavées avec du PBS à 3% de BSA, HEPES à 10mM et perméabilisées avec du PBS à 3% de BSA 10mM HEPES 0,1% saponine pendant 15 min à température ambiante. Elles ont ensuite été incubées avec IgG1-AF674 anti-souris et phalloïdine-AF488, pendant 1 h à température ambiante. Pour révéler LFA-1 indépendamment de sa conformation, les cellules ont été incubées avec l'anticorps TS2 / 4 avant l'étape de perméabilisation. Cet anticorps a été révélé avec IgG1 anti-souris marqué avec AF647.

### **Le marquage cellulaire : SIM**

Les cellules ont été étalées sur des lamelles circulaires 1,5H (diamètre 18 mm) revêtues d'ICAM-1 (4µg/ml) et d'anti-CD3 (10µg/ml) pendant une nuit à 4 ° C. Les cellules ont d'abord été lavées dans du milieu RPMI 5% Human Serum puis pour révéler la conformation de haute affinité de LFA-1, nous avons ajouté l'anticorps A24 marqué directement avec AF568 (1/100) ou l'anticorps HI111 marqué directement avec AF647 (1/100). Les cellules ont été immédiatement transférées sur les lamelles pendant 10 minutes à 37 ° C. Les cellules ont été

fixées avec du paraformaldéhyde à 4% pendant 10 minutes à 37 ° C, lavées avec du PBS à 3% de BSA et 10mM de HEPES et perméabilisées avec du PBS à 3% de BSA 10mM de HEPES à 0,1% saponine pendant 15 minutes à température ambiante. Elles ont ensuite été incubées avec de la phalloïdine-AF647 (1/40) pour révéler le cytosquelette d'actine, pendant 1 heure à température ambiante. Les lamelles ont été montées dans du Vectashield H-1000 (Vector lab, USA).

### **Le dSTORM**

L'approche du dSTORM a été réalisée en utilisant une illumination TIRF intégrée dans un système iLas2 (Roper, France). Ce système a été incorporé dans un microscope motorisé inversé (Nikon Ti, Japon) équipé d'un objectif Plan-Apo 100x 1,45NA (immersion dans l'huile) et d'un système de maintien du focus. Des échantillons fixés ont été imagés à température ambiante dans une solution contenant des agents réducteurs (cystéamine) et des capteurs d'oxygène (glucose oxydase). D'abord la fluorescence de l'Alexa Fluor 647 a été convertie à l'état noir en utilisant un laser 640nm (400mW). Après avoir obtenu la densité souhaitée de molécule unique par image, 20 000 images ont été acquises à 50-100 Hz. Ensuite, la densité de fluorescence de molécules apparaissant par image a été contrôlée en utilisant le laser 405 nm. Les puissances du laser 640 nm et du 405 nm ont été ajustées pendant l'acquisition afin de maintenir une densité optimale de molécules fluorescentes stochastiques. La fluorescence a été ensuite collectée à l'aide d'une caméra sensible 512x512 EM-CCD (Evolve, Photometrics, USA). L'acquisition a été faite sous le logiciel Metamorph (Molecular Devices, USA) en mode streaming à 50-100Hz (10-20ms de temps d'exposition) dans une zone égale ou supérieure à 200x200 pixels comme région d'intérêt. Les images ont été reconstruites en direct en utilisant le module WaveTracer intégré dans le logiciel Metamorph

### **Le SIM**

Dans notre étude, des images 3D-SIM ont été acquises avec un ELYRA PS1 SR-SIM de chez Zeiss équipé d'un objectif DIC Plan-Apo 63x / 1.40 à immersion dans l'huile, utilisant une caméra sCMOS (Hamamatsu) et une lentille 1.60x. Une image SR-SIM multicolore (canaux vert, rouge et rouge lointain) a été obtenue avec les lasers 488nm, 561nm et 642nm, en utilisant respectivement les grilles optiques de 28µm, 32µm et 42µm. Les grilles ont été tournées dans trois angles pré-alignés. A chaque rotation, la grille subit cinq translations pour collecter des images avec cinq phases. Pour avoir une pile d'images en z des cellules T, l'intervalle entre les plans axiaux était de 110nm et cela sur une épaisseur totale de 10µm (non montrée sur les

figures). Le gain et la puissance du laser ont été maintenus constants, cependant la puissance du laser a été ajustée pour avoir une qualité d'image optimisée. La taille de pixel latérale était de 65nm dans les images acquises et de 32nm dans les images reconstruites. Les images 3D-SIM ont été reconstruites avec le logiciel ZEN (Carl Zeiss, Iéna, Allemagne). Les différents canaux ont été alignés en utilisant des PSF à partir de billes multicolores et les problèmes communs liés à cette approche ont été vérifiés avec SIMcheck (Image J, plugin).

### **La Procédure d'analyse des clusters**

La surface minimale d'un cluster de LFA-1 a été fixée à deux fois la surface moyenne des événements détectés à l'extérieur des cellules, Nous l'avons calculé pour chaque anticorps anti-LFA-1, ce qui donne une valeur de  $0,003\mu\text{m}^2$  pour TS2 / 4, une valeur de  $0,0055\mu\text{m}^2$  pour a24 et une valeur de  $0,0064\mu\text{m}^2$  pour HI111. Sur cette base, nous avons utilisé l'algorithme de regroupement spatial des applications avec bruit (DBSCAN) basé sur la densité des points pour identifier les clusters dans une région d'intérêt. L'algorithme a été réalisé sur des régions de  $1,6\mu\text{m} \times 1,6\mu\text{m}$  dans chaque cellule. Un rayon minimum de 20 à 40nm a été assigné comme epsilon et une détection de points minimums par cluster a été limitée à 3. Les voisins avec un minimum de 3 points localisés sur cette distance ont été considérés comme faisant partie d'un cluster. Les clusters identifiés ont ensuite été affichés avec le nombre de localisations à l'intérieur de chaque. Les points isolés identifiés ont été représentés par le chiffre zéro. Nous avons utilisé le package ggplot2 et factoextra dans R pour construire la forme des clusters. Ensuite, nous avons exporté un tableau avec les coordonnées de délimitation de chaque cluster. Nous avons ensuite écrit un algorithme en C++ pour déterminer le nombre de pixels par cluster. La taille des pixels a été fixée à 20nm. C'est ainsi que la taille des clusters a été définie.

Le nombre de clusters pour chaque cellule entière a été estimé en utilisant le logiciel ImageJ. Un seuil basé sur l'intensité de 1 a été appliqué pour sélectionner les clusters. Le nombre de clusters a été estimé en utilisant l'approche de détection de particules, avec la surface minimale d'un cluster de LFA-1 fixée à deux fois la surface moyenne des événements détectés à l'extérieur des cellules, donnant une valeur de  $0,0032\mu\text{m}^2$ . Une validation croisée de cette approche de détection de particules dans ImageJ et DBSCAN a été faite, donnant les mêmes résultats dans une ROI donnée. Nous avons ensuite étudié le nombre total de clusters de LFA-1 présents au contact des deux surfaces de simulation. Pour ce faire, une approche de détection de particules a été préférée à DBSCAN, qui fonctionne bien sur une ROI limitée, mais moins bien sur une grande ROI avec des densités variables.

## **Les analyses statistiques**

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad (Prism). La signification statistique entre les ensembles de données a été déterminée en effectuant des tests de Mann-Whitney non appariés et non paramétriques. Les graphiques montrent les valeurs moyennes et les barres d'erreur représentent le SEM. Dans l'analyse statistique,  $P > 0,05$  est indiqué comme non significatif (ns), tandis que les valeurs statistiquement significatives sont indiquées par des astérisques comme suit: \*  $0,01 < P < 0,05$ ; \*\*  $0,001 < P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$

## **Analyse de la distribution radiale**

Pour évaluer la distribution radiale des conformations F-actine et LFA-1, 10 plans z ont été considérés, ce qui correspond à une épaisseur de  $1,1 \mu\text{m}$ . La projection d'intensité maximale des 10 plans a été appliquée et les canaux ont été séparés. Le plugin de transformation polaire d'ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/polar-transformer.html>) a été utilisé pour convertir les images en coordonnées polaires. Il suppose que l'image polaire utilise la valeur des y pour représenter l'angle (thêta) et la valeur des x pour le rayon (distance par rapport au centre de la cellule). Le plugin a été appliqué pour 360 degrés. Les dimensions des images sortant du plugin sont de 685 pixels ( $22,057 \mu\text{m}$ ) pour la largeur, ce qui correspond au plus grand rayon entre les coins des images et le centre des images et 360 pour le haut correspondant à la valeur de  $360^\circ$ .

## **Analyse de co-localisation de deux couleurs**

Des études de co-localisation 3D sur des images 3D-SIM ont été réalisées avec Imaris Software 8.2 (Bitplane, Suisse). Le coefficient de chevauchement de Manders M2 a été calculé pour chaque couple, défini comme le rapport des intensités additionnées des pixels du canal pour lequel les intensités de l'autre canal étaient supérieures à zéro par rapport à l'intensité totale dans le canal. Par conséquent, M2 est un bon indicateur de la proportion du signal qui coïncide avec un signal dans l'autre canal sur son intensité totale.

## Discussion

## **I. LFA-1 s'organise en nano-clusters** à la surface des lymphocytes T

Depuis la description initiale de la synapse immunologique, la distribution de LFA-1 comme anneau périphérique a été la caractéristique principale de cette structure<sup>210,211</sup>. Toutefois, ce n'est que récemment, que l'état conformationnel de LFA-1 à la synapse immunologique a été décelé à l'aide d'anticorps spécifiques à la conformation<sup>178</sup>. Pourtant la topologie précise de LFA-1 restait à déterminer. En accord avec une étude précédente sur des cellules Jurkat<sup>212</sup>, nous avons observé par microscopie TIRF que, lors de l'assemblage de la synapse immunologique, les cellules T CD8<sup>+</sup> primaires semblent agréger LFA-1 en microdomaines. Cependant, les deux approches de microscopie de super résolution utilisées dans notre étude, soulignent que les structures de LFA-1 apparaissent comme des microdomaines correspondant à des zones densément peuplées par des nano-clusters bien individualisés. Nous avons reporté que LFA-1 se distribue en nano-clusters moléculaires d'un diamètre moyen de 100nm à l'interface entre les cellules T CD8<sup>+</sup> humaines primaires et la surface de stimulation. La taille des nano-clusters de LFA-1 mesurée, dans ce projet d'étude, dans les lymphocytes T est comparable à celle mesurée par TEM à la surface des monocytes<sup>167</sup>.

Malgré l'emploi de concentrations élevées d'ICAM-1 et d'anticorps anti-CD3 dans nos expériences, seule une faible proportion de nano-clusters de LFA-1 bascule sous la conformation de haute affinité. Il est important de noter que le marquage de LFA-1 dans les cellules vivantes a été limité à 10 min, l'acquisition des images s'est donc faite dans une fenêtre de temps restreinte sachant que nous sommes en présence d'un processus probablement très dynamique<sup>213</sup>. Nos données ont révélé que LFA-1 est principalement organisée en nano-clusters, indépendamment de son état d'activation. Ces résultats sont conformes aux observations antérieures selon lesquelles LFA-1 forme des nano-clusters sur les monocytes indépendamment de la liaison au ligand<sup>214</sup>. La découverte que les molécules de LFA-1 fermées

et activées constituent des nano-clusters distincts suggère que ces structures fonctionnent comme des unités fonctionnelles affichant un processus d'activation digitale, de sorte que le basculement conformationnel corresponde au basculement de la plupart des molécules composant un groupe de nano-clusters individuel. Dans une étude publiée en 2016, il a été démontré que le TCR forme des nano-clusters d'environ 100nm de diamètre<sup>34</sup>. En accord avec la distribution à l'échelle microscopique récemment décrite de LFA-1<sup>178</sup>, nous avons observé que LFA-1 sous sa conformation fermée était enrichie dans un anneau correspondant approximativement à la région pSMAC, alors que la conformation ouverte était concentrée dans un second anneau plus central. Il a été établi que la distribution concentrique de LFA-1 et son activation conformationnelle reposaient sur un flux centripète de F-actine<sup>178,212</sup>. En conséquence, les molécules de LFA-1 à haute affinité lient étroitement le cytosquelette d'actine<sup>206</sup> pour permettre un mécanisme d'activation entraîné par la force de traction<sup>215</sup>. Conformément au rôle central du cytosquelette d'actine dans le contrôle de l'activation et la distribution de LFA-1, notre analyse radiale des intensités de LFA-1 et F-actine a montré que les nano-clusters de LFA-1 fermés se chevauchaient avec l'anneau d'actine périphérique, alors que les nano-clusters de LFA-1 ouverts se déposaient dans la couche interne de l'anneau d'actine périphérique. Plus intéressant, notre analyse en 2D à l'échelle nanométrique a révélé que les nano-clusters de LFA-1 sont placés dans les interstices de la couche externe du maillage du cytosquelette d'actine. Notre approche d'imagerie 3D a aussi révélé des nano-clusters de LFA-1 se trouvant sur une couche plus profonde du cytosquelette d'actine. Notre analyse pose la question de savoir comment les nano-clusters de LFA-1 sont liés au cytosquelette d'actine.

## **II. La protéine WASP contrôle l'organisation de la**

### ceinture de nano-clusters de LFA-1

Nous privilégions l'hypothèse selon laquelle la couche la plus superficielle du cytosquelette d'actine pourrait fournir un maillage physique pour contraindre latéralement les nano-clusters de LFA-1, tandis que la couche sous-jacente pourrait fournir un site pour le couplage physique et la transmission de force via Talin-1 et Kindlin-3<sup>112</sup>. Cette double interaction correspond aux exigences du maintien d'unités adhésives de taille finie indépendamment de leur état d'activation et de leur signalisation associée à l'activation tout ou rien. Conformément à cette hypothèse, la déficience du régulateur d'actine WASP a eu une incidence sur la densité moléculaire des nano-clusters de LFA-1 actifs, individuels ainsi que sur leur nombre. WASP est également impliquée dans l'assemblage des foyers de F-actine sous les microgroupes de TCR pour faciliter l'activation de la PLC $\gamma$ 1 et du flux de calcium<sup>216</sup>. Cette observation suggère que des microarchitectures de F-actine distinctes sont associées aux nano-clusters de TCR et de LFA-1 pour maintenir leurs modèles d'activation spécifiques. En effet, l'utilisation de micropatterns a révélé différentes dynamiques de cytosquelette d'actine, associées au TCR et à LFA-1<sup>217</sup>. Seul bémol, les nano-clusters de LFA-1 paraissent plus allongés le long de l'axe z. Compte tenu de la limite de la résolution de notre approche de microscopie de SIM en profondeur, environ 300nm<sup>20</sup>, qui ne nous affranchit pas totalement de la diffraction en profondeur.

Tout compte fait, nous avons identifié WASP comme une protéine clé pour contrôler l'assemblage d'une ceinture circulaire de nano-clusters de LFA-1 de haute affinité à la synapse CTL, ce qui nous a permis d'étudier le rôle de cette structure dans le contrôle de l'activité cytotoxique.

### III. La ceinture de nano-clusters de LFA-1 confine les granules lytiques à la surface des CTL

Nos données indiquent que si WASP semble réguler le confinement et l'activation des nano-clusters de LFA-1 à l'échelle nanométrique, elle contrôle également leur distribution à l'échelle cellulaire. Il est probable que le défaut du confinement des nano-clusters de LFA-1 entraîne les différents modes de distribution observés dans les lymphocytes T WAS CD8<sup>+</sup>. Les cellules T cytotoxiques assemblent un anneau de LFA-1/Talin à travers lequel les granules lytiques sont sécrétés<sup>209,218</sup>. Il a tout d'abord été proposé que les granules lytiques libéraient leur contenu en fusionnant avec un domaine de sécrétion sans actine situé vers le centre de synapse<sup>188,189,218</sup>. Cependant, dans nos expériences avec des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de donneurs sains, les granules lytiques semblent préférentiellement être délivrés à proximité des nano-clusters de LFA-1 de haute affinité au versant interne de la ceinture de nano-clusters de LFA-1 associée à un maillage d'actine relativement dense. Cette observation est en accord avec la découverte récente que la sécrétion de granules lytiques, visualisée avec une sonde fluorescente, se produit dans un domaine intermédiaire de la synapse proche de la région où s'exercent les forces de traction les plus fortes<sup>192</sup>. Conjointement, à ce mécanisme, le relâchement du maillage de l'actine pourrait être nécessaire pour l'exocytose des granules lytiques comme décrit dans les cellules NK<sup>190</sup>. L'ensemble de ces observations suggèrent que les granules lytiques sont sécrétés préférentiellement au versant interne de la ceinture de nano-clusters de LFA-1, ce qui fournit des forces locales optimales pour contrôler à la fois la sécrétion et l'interaction des cellules cibles. Nous soutenons que l'activité lytique réduite des CTL de WAS est principalement due à une activation et à une symétrie de LFA-1 réduite. En effet, des études précédentes réalisées dans notre laboratoire, ont mis en évidence que la formation de la synapse et l'exposition au LAMP-1 ne sont pas affectées par une absence de WASP<sup>149,219</sup>. De même, la réduction de l'activité cytolytique de CTL induite par la LFA-1 avec des fragments Fab n'est pas associée à

l'inhibition de la libération des granules mais à une sécrétion non polarisée<sup>208</sup>. Dans un contexte physiologique, la capacité à rompre et à reformer l'anneau d'adhésion formé par les nano-clusters de LFA-1 serait nécessaire pour que le CTL exécute des lyses multiples. En conséquence, ces données indiquent une amplification du défaut de lyse associé à WASP dans des essais à long terme, dans lesquels des lyses multiples sont favorisées<sup>220</sup>.

En conclusion, notre étude fournit une nouvelle caractérisation de la topologie précise de LFA-1 à l'échelle nanométrique à la synapse des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> humains non transformés. Elle donne un aperçu de l'activation de LFA-1 à l'échelle nanométrique et de son interaction avec le maillage du cytosquelette de l'actine sous-jacente. Elle identifie WASP comme une protéine clé pour contrôler la ceinture de nano-clusters de LFA-1 qui limite la sécrétion des granules lytiques.

Perspectives

## I. Organisation de LFA-1 dans un contexte de motilité

Comme nous l'avons vu dans l'introduction la molécule d'adhésion LFA-1 est requise lors de la migration des leucocytes. En effet un dysfonctionnement dans la sous-unité beta de l'intégrine est associé à une déficience de l'adhésion des leucocytes de type I (LAD-1). Cette déficience entraîne un défaut d'adhésion et de migration vers le site d'inflammation auquel se rajoutent des infections cutanées<sup>125,221,222</sup>. Dans l'étude menée par Smith et ses collaborateurs en 2005, des lymphocytes T ont été déposés sur une monocouche de cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVECs), exprimant ICAM-1 à leur surface. Les lymphocytes T en contact avec les cellules HUVECs, adaptent une morphologie de migration, en présence de MgCl<sub>2</sub>, caractérisée par le lamellipode au niveau du front migratoire et par l'uropode. Les cellules T en migration montrent une distribution hétérogène de la molécule activée de LFA-1, qui est concentrée très faiblement au lamellipode et très enrichie à l'uropode. Les zones d'enrichissement de LFA-1 activée correspondent aux zones d'enrichissement d'ICAM-1 et coïncident avec des zones d'adhésion focales montrées par IRM<sup>126,223</sup>. Nous savons que lors de la migration la distribution des groupes de molécules de LFA-1 est différente de celle induite par l'activation du TCR lors de la formation de la synapse immunologique<sup>178</sup>. Cependant on ne connaît pas avec précision comment est organisée LFA-1 activée au sein des différentes zones des lymphocytes T en migration ni la taille des clusters formés par les molécules de LFA-1. Il serait donc intéressant d'étudier en détail l'organisation de la molécule de LFA-1 activée lors de la migration des lymphocytes T par des approches d'imagerie de super-résolution. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus nous montrent que la taille moyenne des clusters de LFA-1 toute conformation confondue ne varie pas sous l'activation du TCR. C'est pourquoi nous pensons que le réarrangement circulaire de la cellule pour former la synapse ne contribue pas nécessairement à une augmentation des groupes de molécules de LFA-1. Ces résultats ont été observés sur des cellules déposées sur des lamelles pré-imprégnées d'ICAM-1 en présence

ou non d'anti-CD3. On pourrait se demander si le fait d'utiliser des substances directement déposées sur du verre contribuerait à la réduction de la dynamique des structures pour former des groupes de molécules plus importants. En effet, bien que le mélange des substances soit homogène on ignore si le recouvrement des molécules sur le verre est homogène et si la dynamique et les forces nécessaires à la formation des clusters de molécules de LFA-1 sont satisfaisantes. Nous savons par d'autres études que les forces requises pour l'activation adéquate des intégrines doivent être bidirectionnelles<sup>85,224-226</sup>. Ce qui nous imposera d'aller valider notre étude sur des lymphocytes en contact avec d'autres cellules comme les cellules HUVECs par exemple.

## II. Organisation de LFA-1 versus les récepteurs aux chimiokines

Au cours de la maturation des précurseurs des lymphocytes B et T les cellules matures vont pouvoir migrer vers les lieux appropriés comme les ganglions lymphatiques, le thymus et la rate. Les chimiokines sont des molécules clés contrôlant le trafic des lymphocytes<sup>227</sup>. En effet ces molécules sont sécrétées dans le but de recruter des lymphocytes vers les lieux d'inflammation. Une fois sécrétées elles vont induire un arrêt rapide des lymphocytes qui sont retenus sur l'endothélium vasculaire. Les chimiokines provoquent une augmentation de la mobilité latérale de LFA-1 et une augmentation de l'affinité de LFA-1 avec son ligand ICAM-1 exprimé à la surface des cellules endothéliales<sup>120,228</sup>. Une étude réalisée en 1999 montre que les chimiokines régulent l'avidité de LFA-1 ou Mac-1 via la portion cytoplasmique de la sous-unité alpha de LFA-1<sup>229</sup>.

La réponse aux chimiokines induit une migration caractérisée par la polarisation de la cellule formée par le lamellipode au front migratoire et à l'uropode. Des études antérieures ont montré qu'in vitro les cellules qui migrent par chimiotactisme utilisent la molécule d'adhésion LFA-1

en interaction avec son ligand pour migrer et la distribution de LFA-1 dépend de son état d'activation. Les molécules de très haute affinité sont localisées au « mid-body » tandis que les molécules d'affinité intermédiaire sont plus enrichies au niveau du front de migration<sup>117</sup>. Une autre étude suggère qu'un récepteur à la chimiokine CXCR4 est recruté au niveau du pSMAC et que son absence détériore la formation de la synapse immunologique. A l'altération de la formation de la synapse se rajoute une perte d'activation des lymphocytes T<sup>230</sup>. Cependant nous ignorons comment sont localisés les récepteurs aux chimiokines par rapport à la distribution de LFA-1. D'autant plus qu'une étude de 2007 publiée dans *nature immunology* démontre que la chimiokine CCL21 immobilisée sur le support induit une polarisation et une migration de la cellule. En revanche la liaison de LFA-1 à son ligand n'est pas stable et les molécules de LFA-1 sont plus enrichies au front de migration<sup>231</sup>. Cette donnée suggère que CCL21 induirait d'avantage une conformation intermédiaire de LFA-1 plutôt qu'une conformation de haute affinité. Une autre étude a démontré que CCR7 le récepteur au CCL21 n'était pas enrichi à la synapse et était plutôt exclu, contrairement au CXCR4<sup>232</sup>. C'est pourquoi il serait intéressant d'aller étudier la distribution relative des récepteurs CCR7 et CXCR4 et des molécules de LFA-1 activée en réponse aux chimiokines ou à la synapse.

Pour pouvoir étudier l'organisation des récepteurs aux chimiokines et la distribution de LFA-1, nous pourrions imaginer un marquage dans lequel nous révélerons les récepteurs aux chimiokines (CCR7 et CXCR4), LFA-1 activée et la F-actine en condition de formation de la synapse et en condition de migration en réponse à une chimiokine.

### III. Organisation des protéines **d'ancrage au cytosquelette d'actine sous LFA-1** active

L'activation de LFA-1 induit un recrutement de nombreuses molécules au versant intracytoplasmique de la molécule. L'alpha-actinine est connue pour se lier majoritairement à la forme intermédiaire de LFA-1<sup>117</sup>. Une autre molécule la kindelin-3 a été étudiée comme jouant un rôle majeur dans l'adhésion via LFA-1 et qu'un défaut de cette protéine est à l'origine de l'absence du recrutement des leucocytes vers les sites d'inflammation. Une autre étude montre que l'absence de la kindelin-3 déstabilise la liaison des lymphocytes T aux cellules dendritiques<sup>233</sup>. La Talin est la molécule qui fait le lien physiquement entre le cytosquelette d'actine et la molécule de LFA-1 activée. En effet sous sa conformation activée on retrouve une accumulation de la Talin qui coïncide avec une accumulation d'ICAM-1 au « mid body » de la cellule<sup>126,127</sup>. Cependant dans nos études il nous manque le marquage de la Talin par exemple pour confirmer l'activation de LFA-1. La Paxillin est une autre molécule recrutée sous LFA-1 activée, sa phosphorylation joue un rôle central dans la régulation de l'activité de l'intégrine LFA-1 et dans la migration des lymphocytes<sup>234</sup>.

Il serait donc intéressant d'aller vérifier le recrutement de ces molécules à l'aide d'anticorps pour s'assurer de la bonne activation de LFA-1. Des expériences visant à répondre à une partie de cette question sont d'ailleurs en cours. L'idée serait de répondre si à la synapse immunologique les nano-clusters de LFA-1 activés correspondent bien à une association avec la Talin. Pour cela nous procéderons à un marquage permettant de distinguer les têtes de Talin (interagissant avec la sous-unité beta), LFA-1 activée et la F-actine. Nous utiliserons l'approche du SIM pour avoir une meilleure résolution dans notre étude et une étude simultanée de différentes structures grâce à l'aspect multicolore du SIM. Nous n'avons pas les résultats au

moment de l'écriture de ce manuscrit mais nous espérons les obtenir d'ici la soutenance de la thèse.

#### **IV. Méthodes d'analyse** et estimation des tailles des nano-clusters de LFA-1

Plusieurs études nous ont montré grâce à la microscopie de super-résolution ou FRET que LFA-1 est une molécule qui s'organise en clusters par une augmentation de l'avidité de la conformation de haute-affinité. Pour soutenir nos propos nous nous appuyons sur les travaux effectués par Kim et ses collaborateurs en 2004<sup>166</sup>, Cambi et ses collaborateurs en 2006<sup>167</sup> par microscopie d'électronique et sur des travaux très récents réalisés par microscopie de super-résolution de fluorescence, dSTORM sur des lymphocytes T murins en situation de migration. Ces derniers travaux ont été publiés en 2016 et nous montrent qu'effectivement LFA-1 s'organise en nano-clusters et que l'augmentation de la taille de ces nano-clusters est contrôlée par la protéine tyrosine phosphatase non-récepteur de type 22 ou PTPN22. Elles nous montrent également que PTPN22 est un inhibiteur de la signalisation de LFA-1 et est co-localisée au niveau du front de migration avec LFA-1 suggérant donc qu'au niveau du lamellipode LFA-1 associée à PTPN22 ne s'organise pas en nano-clusters<sup>235</sup>. Si on se réfère aux travaux de Stanley et ses collaborateurs PTPN22 serait donc majoritairement associée à LFA-1 d'affinité intermédiaire<sup>117</sup>. Cependant pour réussir à déterminer la présence ou non de nano-clusters moléculaires et pour mieux caractériser leur taille, leur densité, leur morphologie, le nombre de molécules par cluster les outils de traitement d'images que nous utilisons tous les jours ne suffisent pas car trop biaisés. En effet la plus petite unité d'une image est le pixel ou voxel. Chaque pixel est rempli par une valeur en niveau de gris qui est liée au nombre de photons détectés. Dans le cas des approches de microscopie de localisation des molécules unique dans un pixel ce n'est pas le signal d'une molécule qui y est contenu et tout comme évoqué plus haut

une molécule détectée n'aura pas qu'un centre de masse. Bien évidemment cela dépend de la taille du pixel utilisée et de la précision de localisation. Toujours est-il que pour travailler avec des molécules individuelles nous avons besoin de représenter les centres de masse de chaque molécule détectée individuellement dans un espace et de déterminer la formation ou non de clusters. Pour cela il existe des outils qui permettent d'identifier des groupes de molécules. La méthode la plus couramment utilisée est basée sur la recherche du plus proche voisin en utilisant une fonction mathématique, la fonction de K-Ripley et s'appelle DBSCAN (Density-based spatial clustering of applications with noise).

Les principales limites rencontrées par DBSCAN sont multiples. Nous prendrons en exemple une limitation de la zone à étudier car DBSCAN est incapable de prendre en charge la variation des densités de molécules, ce qui nous limite à travailler dans des petites régions qui ne couvrent pas toute la surface de la cellule et qui doivent être bien choisies. Une autre limite est sans doute le fait que cette méthode ne prend pas en compte les apparitions multiple d'une molécule dans une zone recouverte par un rayon d'une dizaine de nanomètres. Nous sommes obligés d'appliquer un filtre de taille par la suite pour exclure les molécules que nous considérons comme individuelles mais comptées comme un cluster par DBSCAN. Du fait de ces limites nous souhaitons développer ou améliorer un algorithme qui prendrait en compte ces différentes limites. Pour cela nous envisageons d'exploiter une autre fonction mathématique appelée : fonction de distribution radiale  $g(r)$  qui n'est autre que la dérivée de la fonction de K-Ripley. Cette fonction permet de décrire la variation de la densité des molécules lorsqu'on s'éloigne d'une molécule prise en référence<sup>236</sup>. Cette dernière permet en théorie de gérer des densités hétérogènes. L'exploitation de nos données avec cette fonction fait l'objet d'une collaboration en cours avec le laboratoire de physique théorique au LPT-IRSAMC à Toulouse.

## Annexes



## T Lymphocyte Migration: An Action Movie Starring the Actin and Associated Actors

Loïc Dupré<sup>1,2,3\*</sup>, Raïssa Houmadi<sup>1,2,3</sup>, Catherine Tang<sup>1,2,3,4</sup> and Javier Rey-Barroso<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR 1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France, <sup>2</sup>Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France, <sup>3</sup>CNRS, UMR 5282, Toulouse, France, <sup>4</sup>Master BIOTIN, Université Montpellier I, Montpellier, France

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Bernard Malissen,  
Centre d'Immunologie de Marseille  
Luminy, France

#### Reviewed by:

Cosima T. Baldari,  
University of Siena, Italy  
Sìvia Deaglio,  
University of Turin, Italy

#### \*Correspondence:

Loïc Dupré  
loic.dupre@inserm.fr

#### Specialty section:

This article was submitted to  
T Cell Biology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 10 August 2015

Accepted: 02 November 2015

Published: 18 November 2015

#### Citation:

Dupré L, Houmadi R, Tang C and  
Rey-Barroso J (2015) T Lymphocyte  
Migration: An Action Movie Starring  
the Actin and Associated Actors.  
*Front. Immunol.* 6:586.  
doi: 10.3389/fimmu.2015.00586

The actin cytoskeleton is composed of a dynamic filament meshwork that builds the architecture of the cell to sustain its fundamental properties. This physical structure is characterized by a continuous remodeling, which allows cells to accomplish complex motility steps such as directed migration, crossing of biological barriers, and interaction with other cells. T lymphocytes excel in these motility steps to ensure their immune surveillance duties. In particular, actin cytoskeleton remodeling is a key to facilitate the journey of T lymphocytes through distinct tissue environments and to tune their stop and go behavior during the scanning of antigen-presenting cells. The molecular mechanisms controlling actin cytoskeleton remodeling during T lymphocyte motility have been only partially unraveled, since the function of many actin regulators has not yet been assessed in these cells. Our review aims to integrate the current knowledge into a comprehensive picture of how the actin cytoskeleton drives T lymphocyte migration. We will present the molecular actors that control actin cytoskeleton remodeling, as well as their role in the different T lymphocyte motile steps. We will also highlight which challenges remain to be addressed experimentally and which approaches appear promising to tackle them.

**Keywords:** T lymphocytes, migration, actin cytoskeleton

### INTRODUCTION

Cell motility relies on the remodeling of cell shape, a process which is highly controlled both in time and space to allow cell polarization and coordination of movement in response to extracellular cues (1). The integration of motility signals into coordinated cell shape remodeling is ensured by the actin cytoskeleton. The building block of the actin cytoskeleton is the globular actin, which polymerizes into filament networks of various complexity depending on the levels of actin filament branching and crosslinking (2). Actin networks that undergo rapid and dynamic remodeling provide the physical basis for the emission of diverse types of protrusions that allow complex motility tasks such as environment probing, cell body translation, and invasion through natural tissue barriers. *Via* its anchorage to cell surface receptors allowing attachment to the cell substratum and its association with molecular motor proteins such as myosins, the actin cytoskeleton sustains mechano-sensing and mechano-transduction, allowing the cell to both sense the physical constraints of its environment and assemble force generating protrusions that ultimately lead to cell body translation (3).

In most migrating cells, the front or leading edge is made of a thin and widely spread structure called the lamellipodium. It is composed of highly branched actin fibers that compose a dense

meshwork. The lamellipodium undergoes periodical contractions that are coupled to a retrograde actin flow (4). The cell leading edge is also characterized by the presence of thin longitudinal protrusions of various lengths called filopodia that carry out an exploratory function (5). Parallel bundles of cross-linked actin fibers are the structural basis for filopodia. These protrusions can either be embedded within the lamellipodium or be emitted independently from it. Cells such as immune cells and tumor cells that have the capacity to cross tissue barriers made of dense extracellular matrix (ECM) networks assemble invadopodia or related structures that can locally digest the ECM to allow cell invasion. In some cells such as lymphocytes, the leading edge structure can be a pseudopodium, which is a more bulky protrusion than the lamellipodium since it is filled with cytoplasm. Behind the cell leading edge, the shape of the cell body is maintained by the actin cortex, a thin network of actin fibers localized beneath the cell membrane. Alternative motility strategies, not depending on the assembly of a lamellipodium, can be ensured by the formation of membrane blebs as a result of hydrostatic pressure from within the cell and local relaxation of cortical actin (6). The cell rear or trailing edge is generally characterized by actin filament bundles coupled to myosin. This allows the sliding of actin fibers that generate cell tension driving the cell body and cell rear forward. Importantly, each cell type is endowed with specific motility characteristics, which are reflected by different abilities to remodel the actin cytoskeleton to support the assembly of protrusions.

In this context, lymphocytes are classified as cells exhibiting amoeboid motility. Indeed, their motility characteristics are comparable to those described in the *Dictyostelium discoideum* amoeba. The morphology of migrating lymphocytes is characterized by the emission of actin-rich pseudopodia, blebs, and a highly contractile trailing edge referred to as the uropod. The amoeboid motility of lymphocytes [reviewed in Ref. (7)] is further characterized by weak adhesion to the substratum and little or no ECM proteolysis. The motility of lymphocytes is intimately related to their function as immune sentinels and effectors. Indeed, lymphocytes can migrate extremely rapidly, adapt their motility strategies to cross different tissue barriers, and orient their migration in response to various chemotactic factors. In addition, the motility behavior of lymphocytes tunes the quality of their interaction with antigen-presenting cells (APC). How the specific features of lymphocyte migration are controlled by the underlying actin cytoskeleton is only partially elucidated. The objective of this review is to cover the current knowledge on how specific molecular aspects of actin cytoskeleton remodeling contribute to T lymphocyte motility characteristics. We also aim at pointing to the unsolved questions and to the approaches that could help unraveling them.

## ACTIN CYTOSKELETON DYNAMICS IN MIGRATING T LYMPHOCYTES

### Overview of T Lymphocyte Motility

T lymphocytes are among the cells displaying the highest exploratory behavior. They are able to migrate all around the body and to explore most tissues. Beyond those large-scale displacements,

T lymphocytes continuously scan their local environment in a manner favoring recognition of specific antigens at the surface of APC. Motility is therefore an inherent property of T lymphocytes that guarantees optimal and timely recognition of foreign antigens as well as local activity at the site of the antigenic challenge. The development of intravital two-photon microscopy has permitted the investigation of T lymphocyte motility directly in tissues (8). This motility can be assimilated to a search behavior that has been characterized as a Brownian random walk (9) or a Lévy walk (10). T lymphocyte motility is known to be driven by local factors such as the architecture of the stromal network (11) and chemokines (12). The encounter with APC modifies the dynamic behavior of the T lymphocytes since the recognition of the cognate antigen by the TCR halts migration (13–15). Even if many environmental cues modulate T lymphocyte motility, many T lymphocyte motility features appear to be cell intrinsic. Indeed, the speed as well as the stop and go behavior of T lymphocytes is comparable under *in vivo* and *in vitro* conditions lacking stromal network and chemokines (16). In addition, T cells autonomously regulate their ability to turn while migrating, a key parameter for the efficiency of the meandering search of rare antigens (17).

### T Lymphocyte Motility Parameters

To describe and understand more precisely the motility behaviors of T lymphocytes, it is crucial to define parameters and to verify that they are measured appropriately (18). In this chapter, we will provide an overview of the parameters pertaining to speed, direction, and cell shape that are being used to characterize and compare motility patterns of T lymphocytes both *in vitro* and *in vivo*.

Although T lymphocytes are very rapid cells, their speed is far from being constant. To measure the speed of lymphocytes is not a straightforward task since not all considered lymphocytes might migrate during the window of observation, and because a key feature of T lymphocyte motility is the alternation of running and pausing phases. A first basic point is therefore to consider the proportion of actively migrating lymphocytes within a population of interest. It has been long established that upon isolation from human blood, only a portion of lymphocytes display spontaneously a motile behavior (19). Transwell assays performed to measure the ability of T lymphocytes to migrate toward a chemokine consistently show that not all cells migrate, even if they express apparently homogeneous levels of the corresponding chemokine receptor. What distinguishes the motile versus non-motile fractions of lymphocytes is currently unknown. However, the activation state might be related to the propensity to migrate, since lymphocyte stimulation with mitogens can result in a majority of lymphocytes to acquire a motility behavior (20).

To appreciate the alternation of running and pausing phases, it is important to image T lymphocytes over sufficient periods of time. In 3D collagen lattices, T lymphocytes display periods of highly directional migration alternating with frequent turns (21). Under these conditions, the mean velocity of human unstimulated lymphocytes is approximately 7  $\mu\text{m}/\text{min}$  (excluding non-migrating cells and periods of pausing), with half of the cells migrating. Following stimulation with Concanavalin A, the proportion of migrating cells increased to 80% without

any change in the velocity. Can T lymphocyte velocity be tuned? In addition to the well-established role of chemokines in driving directional migration, chemokine might exert a chemokinetic role. During CD8<sup>+</sup> T cell infiltration of the murine brain in the context of *Toxoplasma* infection, CXCL10 increased the velocity of T lymphocytes and their ability to find infected target cells, without modifying the walk pattern (10). T lymphocyte velocity also seems to be increased during (dendritic cell) DC scanning (22). Indeed, T lymphocytes migrate within the paracortex of lymph nodes at a high speed (10–15  $\mu\text{m}/\text{min}$  on average) (23, 24). In comparison, naive T lymphocyte locomotion in the subcapsular region was reported to be 38% slower and had higher turning angles and arrest coefficients than naive T lymphocytes in the deep paracortex (25). Is T lymphocyte velocity dependent on their phenotype? Memory T lymphocytes were shown to move faster during CCL21-driven chemokinesis when compared to naive T lymphocytes (26). The higher motility characteristics of memory T lymphocytes were associated with an increased propensity to attach to the substratum. In addition, T regulatory cells exhibit higher cell motility properties (basal and across barriers) than the non-T regulatory cell counterparts (27).

The random walk trajectories that T lymphocytes follow are influenced both by the architecture of the reticular network and by interactions between cells. This is particularly true during scanning of lymphoid organs, as T lymphocyte motility is halted upon TCR-dependent antigen recognition at the surface of APC (28). Indeed, a key aspect of the motility of T lymphocytes is the stop and go behavior directed by the encounter with APC and in particular DC (24). The parameter usually used to assess this behavior is the arrest coefficient, which corresponds to the proportion of time in which a T cell does not move (threshold  $<2 \mu\text{m}$ ). The arrest coefficient is generally low when T cells are not engaged in stable contacts with DC, with a baseline mean arrest coefficient value around 0.35 (29). In the presence of antigen, the mean arrest coefficient is increased to 0.5 and above. Interestingly, T regulatory cell inhibitory activity can be mediated through preventing the arrest of effector T cells. Indeed, in a murine model of experimental autoimmune encephalomyelitis, the absence of T regulatory cells significantly decreased the speed and increased arrest (0.70) of specific CD4<sup>+</sup> T cells in the presence of auto-antigen (30).

The exploratory behavior of T lymphocytes is usually appreciated by calculating the confinement ratio, which is defined as the ratio of the distance between the initial and the final positions of a cell to the total distance covered by that cell. In a murine model of subcutaneous thymoma, the exploratory behavior of cytotoxic T lymphocytes was more restrained in the antigen-bearing tumors (confinement ratio of 0.4), compared with tumor that did not present specific antigens (confinement ratio of 0.6) (31). This parameter also revealed that cytotoxic T lymphocytes resumed motility following tumor cell killing. This shows that motility parameters evolve as a T cell response is developing.

Another aspect useful to appreciate T lymphocyte motility is the study of the turnings. A couple of studies focusing on *in vitro* T cell tracking have reported that periods of turning coincide with a slower motility (26, 32). The assessment of turnings via an angle analysis is useful to assess whether cells tend to be attracted

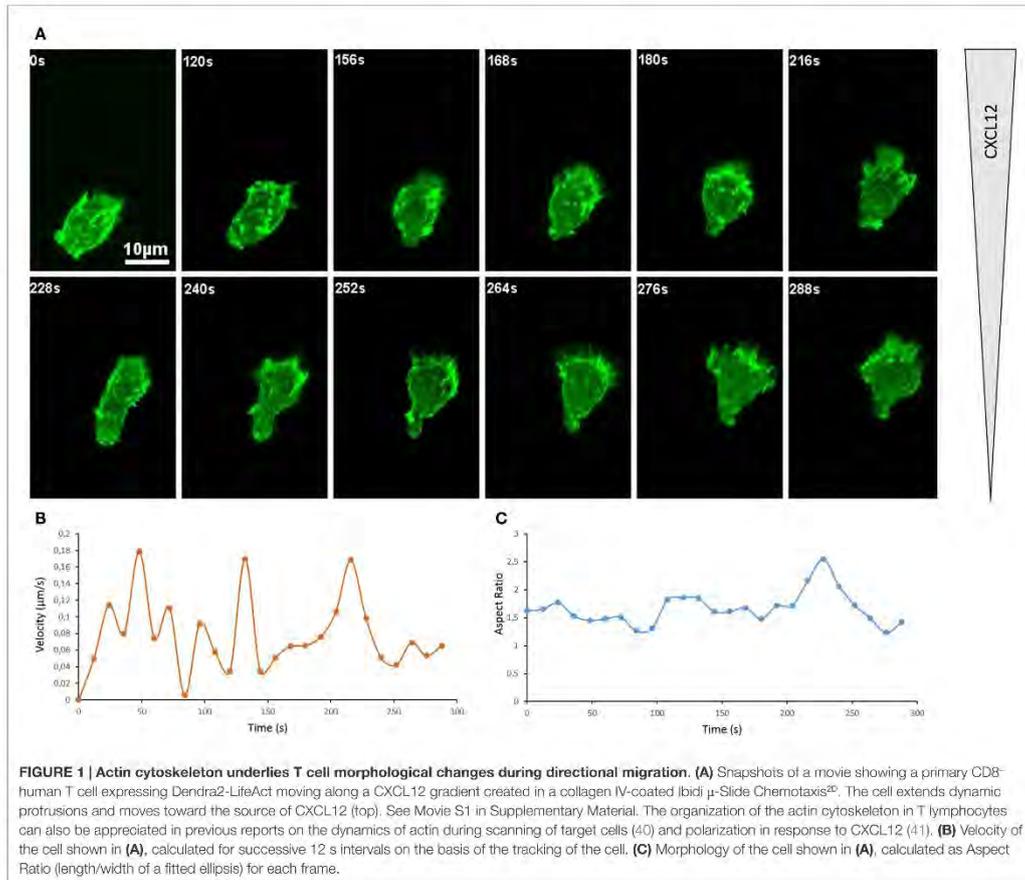
toward preferential positions or cellular partners. This has helped to show that naive CD8<sup>+</sup> T cells are attracted to sites of CD4<sup>+</sup> T cell–dendritic cell interactions (33). Additionally, the measurement of the angle between the directions of travel of T cells as a function of the distance between each other revealed the presence of dynamic microstreams of naive T cells in lymph nodes (34).

The shape of T lymphocytes is also an important parameter to assess their motility behavior. As we will see in details below, the shape of T lymphocytes is constantly remodeled as they migrate due to a combination of protrusive and contractile activities. In addition, cell shape can be informative about the physical interaction of T lymphocytes with tissue structures. For example, during tumor infiltration, cytotoxic T lymphocytes were shown to frequently move along blood vessels. In doing so, they adopted a particularly elongated morphology, which was assessed by calculating an elongation index (ratio between the length and the width of the cell) (31).

### Actin Cytoskeleton and Shape Remodeling Driving T Lymphocyte Migration

As for any motile cell, actin cytoskeleton remodeling plays a central role in T lymphocyte motility (35). Beyond the classical rules of cell motility mediated by a dynamical actin cytoskeleton, we will consider here what is specific about T lymphocytes. A migrating T lymphocyte harbors a highly dynamical leading edge, a contractile central region and an adhesive uropod. It undergoes periodical leading edge extension, central region traction, and uropod retraction. It ensues an amoeba-like motility behavior (36). As observed for *D. discoideum* amoebas, lymphocytes migrate in a cyclic fashion characterized by peaks of high velocity interrupted by pausing periods (37). Velocity peaks correlate with pseudopod extension and pauses correlate with both pseudopod contraction and generally rounder cell morphology (32).

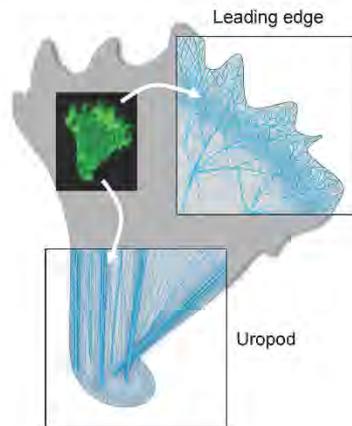
A widely used approach to visualize actin cytoskeleton dynamics in living cells is to use a fluorescently tagged actin or fluorescently tagged LifeAct, a short peptide that binds polymerized actin filaments (38). With the scope to image the actin cytoskeleton of a primary T lymphocyte, we have electroporated Dendra2-LifeAct in CD8<sup>+</sup> T lymphocytes purified from human peripheral blood. These cells were then exposed to a CXCL12 gradient generated in a chemotaxis microchamber. As depicted in **Figure 1A**, at most of the snapshots, the cell is clearly polarized pointing toward the source of CXCL12 (see also Movie S1 in Supplementary Material). The leading edge is enriched in actin and is under constant remodeling. Intense ruffling occurs at this site. Consequently, an unstable actin-rich structure is assembled, which takes the shape of a pseudopodium for most of the time. When T lymphocytes are studied on 2D surfaces like it is the case on these images, the leading edge might also transiently adopt a structure approaching that of a lamellipodium (time frames 264 and 276 s). In the case of our short movie, while the primary T lymphocyte is constantly remodeling its shape, it manages to move along a very directional path. When plotting the displacement of the centroid of the cell (Movie S1 in Supplementary Material), we appreciate that the cell is moving toward higher concentration of CXCL12 (top) with some oscillations of direction. A useful



way to measure the directionality of a cell along a linear gradient of known orientation is to calculate the forward migration index, which is defined as the ratio between the cell displacement length along the gradient axis and the track length (39). This calculation yields a value of +0.76 for the lymphocyte depicted here, which indicates a relatively straight and directed path. For theoretical comparison, a cell that would migrate along a perfect line perpendicularly to the gradient would yield a value of +1, while a cell that would move but not progress along the gradient axis would yield a value of 0. Interestingly, when measured over 12 s intervals, the velocity of the primary lymphocyte along its path is highly variable (**Figure 1B**). Indeed, it varies from 0.01 to 0.35  $\mu\text{m/s}$ . Over the 288 s of the registration, the T lymphocyte migrates at a mean velocity of 0.16  $\mu\text{m/s}$  or 9.6  $\mu\text{m/min}$ . This is compatible with velocities recorded by two-photon microscopy in tissues. Roughly, it corresponds to the estimation that a lymphocyte migrates at a speed of one body length per minute. In

parallel, the general morphology of the cell is changing as well, as it can be appreciated by plotting the Aspect Ratio (length/width of a fitted ellipsis) over time (**Figure 1C**).

Let us now consider more in details the type of actin remodeling at work in the lymphocyte as it migrates directionally. For that purpose, we show in **Figure 2** a schematic representation of the organization of the actin cytoskeleton filaments both at the leading edge and the uropod of the lymphocyte studied in **Figure 1**. This representation shall only be considered as a model since the ultrastructure of the actin cytoskeleton network has not yet been characterized in details in lymphocytes. At the leading edge, the polymerization and branching of actin filaments provide an engine for cell movement that pushes forward the cell membrane. The represented structure is inspired from that of a lamellipodium structured by a branched actin meshwork. At the trailing edge, the T cell uropod is structured by a network of parallel actin bundles that that serve as a basis for contractile



**FIGURE 2 | Actin cytoskeleton organization at the two poles of a migrating T cell.** Schematic representations of the ultrastructure of the actin cytoskeleton networks at the leading and trailing edges of the migrating T cell shown in **Figure 1**. At the leading edge, the T cell that migrates on a 2D surface emits a protrusion that alternates between a lamellipodium and a pseudopodium. It contains a very dynamical and highly branched actin meshwork. At the trailing edge, the T cell uropod is made of a network of parallel actin bundles that can slide along each other to generate contractile forces.

forces. Note that a thin layer of actin, called the cortical actin, coats the inner side of the plasma membrane. This actin pool is important for cell shape maintenance and changes. The rest of the cell probably contains a 3D network of crosslinked filaments interspersed with contractile bundles.

The simplified setting employed here to visualize actin cytoskeleton and cell shape remodeling in primary T lymphocytes illustrates the inherent nature of motility in these cells. Beyond the dynamic structures described above, it is important to stress that motile T lymphocytes can assemble additional actin-rich structures depending on the stimulatory context. Indeed, those cells have developed distinct migratory strategies, in particular as they need to cross the endothelial barriers, as they migrate through dense tissue environments and as they search for antigens.

The control of T lymphocyte motility is a key to the multistep process of extravasation from the blood stream into tissues. The mechanisms of tethering, rolling, firm adhesion, and transendothelial migration have been well described (42). Interestingly, upon interaction with endothelial cells, T lymphocytes crawl with an amoeboid motility. The shear stress exerted by flowing blood is contributing to the formation of LFA-1-dependent adhesions (43). T lymphocytes orient their migration against fluid flow as they interact with the inner surface of blood vessels (44). A recent study suggests that upstream flow mechanotaxis may only rely on a passive self-steering mechanism, whereby the uropod would serve as a microscopic wind vane (45). In particular, lymphocytes have been shown to extend dynamic protrusions during

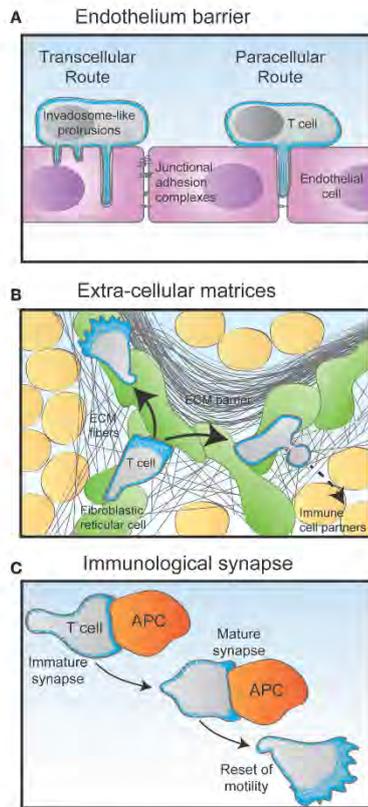
transendothelial migration (**Figure 3A**). These actin-rich exploratory structures have been characterized as either podosomes or filopodia, depending on the lymphocyte activation state (43, 46). They appear to allow lymphocytes to scan endothelial cells and to identify areas favorable for transcellular diapedesis. The nature of the endothelium may also determine different requirements from the T lymphocyte side. This is revealed by the role of uropod contractility in transendothelial migration to reach the lymph node but not the bone marrow (47).

The scanning behavior of T lymphocytes is evident as they migrate through both lymphoid and peripheral tissues. In these complex 3D environments, packed with multiple cell types embedded in ECM structures of different composition, porosity, and elasticity, T lymphocytes appear to not require functional integrins to migration (48). Instead, they use the force of actin-network expansion, which promotes protrusion of the leading edge. Contractions delivered by the actomyosin network allow the squeezing of the T lymphocyte through narrow gaps (**Figure 3B**).

Another key event in the T lymphocyte life cycle is the repeated encounters with antigen-presenting cells (**Figure 3C**). The immunological synapses formed at the interface between T lymphocytes and APC are crucial sites for setting the duration, strength, and quality of the antigen stimulation. These dynamic structures can form in the context of both a relative arrest of migration and an ongoing scanning of the APC surface (49). They rely on actin cytoskeleton remodeling for initial assembly as well as for controlling dynamical molecular events (50, 51). Indeed, via a centripetal flow, the actin cytoskeleton provides a framework for signaling cluster movement (52). A newly added facet of actin cytoskeleton remodeling at the immunological synapse is the assembly of actin dots at the site of TCR engagement. Such dots are formed *de novo* as a result of TCR engagement and allow amplification of distal signaling events required for optimal T lymphocyte activation (53). The most detailed view of actin remodeling at the T cell synapse has been provided recently by the use of 4D super-resolution microscopy (40). The use of lattice light-sheet microscopy allowed to image dynamic actin in 3D at a high speed. What it unravels is that lamellipodial membrane protrusions form the initial contact with the target cell. Within approximately 1 min, the contact site flattens and actin gets depleted from the center of the contact area. This remodeling is associated with a rearward flow of actin filaments. Such remodeling allows MTOC docking and lytic granule delivery in the case of cytotoxic T lymphocytes.

## MOLECULAR CONTROL OF ACTIN CYTOSKELETON REMODELING IN T LYMPHOCYTES

We have seen above that actin cytoskeleton remodeling is an essential component of the numerous dynamic processes involved in T lymphocyte motility. We will now review the molecular machinery that allows for actin remodeling, with a focus on the molecules whose function has been elucidated in T lymphocytes. For clarity, **Table 1** provides a list of the molecules described throughout the text and depicted in the figures.



**FIGURE 3 | Migratory challenges faced by T cells during their journey through the organism.** (A) The crossing of the endothelium barrier follows steps of T cell tethering and rolling on the luminal surface of the endothelial cells. The combination of chemokines and adhesion molecules triggers firm adhesion to the endothelial surface via the emission of filopodia-like protrusions. Depending on their activation state, T cells then either use the transcellular route by emitting invadopodia-like protrusions that go across the entire endothelial cell body, or the paracellular by squeezing through the junction between two adjacent endothelial cells. (B) Following the crossing of the endothelial barrier and underlying basal membrane, T cells undergo interstitial migration through the tissue they have entered in. Using an amoeboid mode of motility, they crawl and squeeze along and through extracellular matrix (ECM) fibers of various nature. In the lymph node cortex, T cells preferentially migrate along a network of fibroblastic reticular cells decorated with chemokines. (C) During the scanning of antigen-presenting cells (APC), T cells make multiple encounters of various duration and quality. Some contacts may last only a few minutes in the form of an immature immunological synapse. Upon recognition of an APC bearing specific antigens, the T cell stops migrating to assemble a long-lasting immunological synapse. In addition to controlling the interaction between the T cell and the APC, the dynamical actin cytoskeleton serves as a physical platform for numerous signaling events that take place at the immunological synapse to activate the T cell. After a few hours, the activated T cell detaches from its APC partner and regains its motility behavior.

## Basic Regulation of Actin Assembly

The thermodynamics of actin filament assembly and turnover have been extensively studied as recently reviewed in Ref. (2). The building block is the actin monomer, which can form dimers and trimers. If a critical local concentration of free ATP-bound actin monomers is available, a double-stranded helical and polar filament is assembled (Figure 4A). The two ends of an actin filament are distinct. The barbed end (plus end) is more dynamic than the pointed end (minus end) since it elongates 10 times faster. The spontaneous assembly of actin filaments is kept under control by profilin, which inhibits the formation of actin oligomers. The function of this essential protein has not specifically been addressed in the context of T lymphocyte biology. Actin filaments tend to be capped by capping proteins, which stabilizes actin filament length by preventing both actin monomer association and dissociation at the filament barbed end. In T lymphocytes, over-expression of the capping protein gelsolin inhibits their spreading on plate-bound anti-CD3 antibodies (81). However, the role of gelsolin in the context of T lymphocyte motility has not been investigated so far. A requirement to further enhance actin polymerization is the uncapping or severing of the capped actin filaments. Cofilin is severing actin at the pointed end to provide free barbed ends that can serve as a template for further actin polymerization (Figure 4A). Under conditions not favorable to polymerization, the action of cofilin will on the opposite lead to a depolymerization of filaments. In T lymphocytes, the modulation of cofilin activity has been shown to occur downstream of costimulatory molecules (62).

## Actin Filament Elongation, Branching and Stabilization

The build-up of high-order actin cytoskeleton networks relies on actin-binding proteins that promote and organize actin nucleation and therefore filament assembly. Such proteins are actin nucleation factors such as formins and Arp2/3, as well as upstream promoting factors such as the WASP and WAVE family proteins.

Formins are actin nucleators that interact with the barbed end of actin filaments to further elongate them (Figure 4A). This activity leads to the elaboration of an unbranched actin network. Formins studied so far in T lymphocytes include mDia1, FMNL1, and INF2. Via its actin polymerization activity, mDia1 is involved in T cell chemotaxis as well as TCR-driven proliferation (87–89). Interestingly, formins are also important regulators of microtubule cytoskeleton orientation in T cells, such as during the formation of the immunological synapse (80, 85, 125). By the way, an interesting area of research will be to unravel the dynamic connections between the actin and tubulin cytoskeletons, which are most probably involved in key steps of T lymphocyte motility and activation.

Alternatively to the assembly of novel filaments or the elongation of existing ones, polymerization can take a different form. Indeed, the Arp2/3 complex branches new actin filaments to pre-existing filaments with an angle of 70° (Figure 4B). This activity is crucial in that it leads to the elaboration of a branched

**TABLE 1 | Molecular actors contributing to actin cytoskeleton remodeling in T lymphocytes.**

Protein	Gene	Function	Associated immune-related disease	Reference
α-actinin	<i>ACTN1</i>	Actin crosslinking	ACTN1-related thrombocytopenia	(54, 55)
Arp2	<i>ACTR2</i>	Actin branching	n.r.	(2, 50)
Arp3	<i>ACTR3</i>	Actin branching	n.r.	(2, 50)
Cathepsin X	<i>CTSZ</i>	Uropod detachment	n.r.	(56, 57)
Cdc42	<i>CDC42</i>	Filopodia assembly	n.r.	(58)
CIP4	<i>TRIP10</i>	Membrane curvature, WASP activation	n.r.	(59–61)
Cofilin	<i>CFL1</i>	Filament disassembly	n.r.	(62)
Coronin1A	<i>CORO1A</i>	Arp 2/3 inhibition	Moderate to severe combined immunodeficiency	(63–65)
DOCK2	<i>DOCK2</i>	Rac1 activation	Primary immunodeficiency with early-onset invasive infections	(66, 67)
DOCK8	<i>DOCK8</i>	Cdc42 and Rac1 activation	Primary immunodeficiency with impaired cellular and humoral immunity	(68–70)
Drébrin	<i>DBN1</i>	Actin bundling, microtubule interaction	n.r.	(71–73)
Ezrin	<i>EZR</i>	Actin-transmembrane proteins crosslinking	n.r.	(74–76)
Filamin A	<i>FLNA</i>	Actin crosslinking	n.r.	(77–79)
Formin-like 1	<i>FMNL1</i>	Filament elongation	n.r.	(80)
Gelsolin	<i>GSN</i>	Filament capping	n.r.	(81)
HS1	<i>YWHAQ</i>	Branching stabilization	n.r.	(82–84)
INF2	<i>INF2</i>	Filament elongation	n.r.	(85)
Kindlin3	<i>FERMT3</i>	Actin-integrins interplay	Autosomal recessive leukocyte adhesion deficiency syndrome-III (LAD-III)	(86)
L-plastin	<i>LCP1</i>	Actin bundling	n.r.	(41)
mDia1	<i>DIAPH1</i>	Filament elongation	n.r.	(87–89)
MLCK	<i>MYLK</i>	Actomyosin contraction	n.r.	(90)
Moesin	<i>MSN</i>	Actin-transmembrane proteins crosslinking	n.r.	(76)
Mst1	<i>STK4</i>	Chemokine receptor-integrins interplay	T cell immunodeficiency	(91–93)
Myo1g	<i>MYO1G</i>	Actin contraction	n.r.	(17)
Myo1A	<i>MYH9</i>	Actomyosin contraction	n.r.	(90, 94–98)
Paxillin	<i>PXN</i>	Actin-integrins interplay	n.r.	(99–101)
PI3K	<sup>a</sup>	PI(3,4,5)P3 generation	n.r.	(66, 102, 103)
Profilin	<i>PFN2</i>	Actin polymerization	n.r.	(104, 105)
Rac1	<i>RAC1</i>	Actin branching (lamellipodia)	n.r.	(59)
Rap1	<i>RAP1A</i>	Chemokine receptor-integrins interplay	n.r.	(106–110)
RapL	<i>RASSF5</i>	Chemokine receptor-integrins interplay	n.r.	(91, 106)
RhoA	<i>RHOA</i>	Actomyosin contraction	n.r.	(111)
Rock	<i>ROCK1</i>	Actomyosin contraction	n.r.	(90)
Sharpin	<i>SHARPIN</i>	Actin-integrins interplay	n.r.	(112)
srGAP2	<i>SFGAP2</i>	membrane curvature, mDia1 inhibition	n.r.	(113)
Talin	<i>TLN1</i>	Actin-integrins interplay	n.r.	(114)
Vinculin	<i>VCL</i>	Actin-integrins interplay	n.r.	(115)
WASH	<i>WASH1</i>	Arp 2/3 activation	n.r.	(116)
WASP	<i>WAS</i>	Arp 2/3 activation	Wiskott–Aldrich syndrome	(53, 117–119)
WAVE2	<i>WASF2</i>	Arp 2/3 activation	n.r.	(115, 120, 121)
WIP	<i>WIPF1</i>	WASP activation	Primary immunodeficiency resembling the Wiskott–Aldrich syndrome	(122–124)

n.r., not reported.

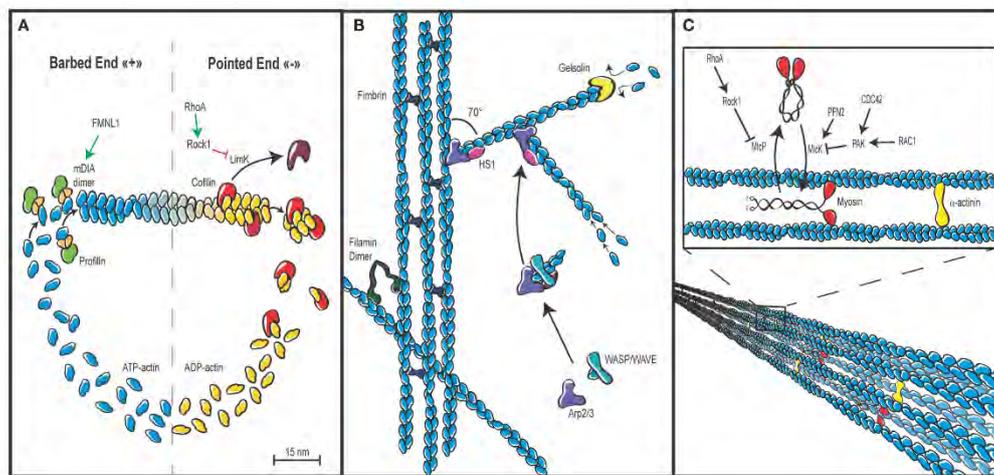
<sup>a</sup>For a list of the many genes encoding the various PI3K subunits and isoforms, see Ref. (102).

actin network. The activation of Arp2/3 is under the control of the WASP family and the WAVE family.

WASP is a well-studied actin regulator in hematopoietic cells, including T lymphocytes, because its deficiency is the cause of the Wiskott–Aldrich syndrome, a rare primary immunodeficiency. The lack of WASP results in abnormalities of T cell homing *in vivo* (126). Whether this is the consequence of reduced chemotaxis (117), transendothelial migration (46), or interstitial migration still needs to be clarified. In addition, WASP appears as a key regulator of immunological synapse stability (118, 119) and

signaling by bridging both LFA-1 (16) and the TCR (53) to the actin cytoskeleton. WASH is a WASP family member that regulates Arp2/3-dependent endosomal trafficking processes. In T lymphocytes, it controls the recycling to the membrane of key receptors including the TCR, CD28, LFA-1, and GLUT1 (116). How its deficiency impacts on T lymphocyte migration remains to be studied.

WAVE2 is the main WAVE family member expressed in T lymphocytes. It is activated by Rac1 downstream the TCR as a multi-protein complex. It is required for the spreading of the



**FIGURE 4 | Actin cytoskeleton architecture.** (A) Actin cytoskeleton dynamics rely in part on the tightly controlled cycle of polymerization and depolymerization, also known as treadmilling. ATP-bound actin is added to the fast growing barbed end of filaments via the combined action of profilin, which prevents self-nucleation of actin monomers and actin-nucleating proteins such as the formin FMLN1 or WASP-family proteins, both of which are under the control of RhoGTPases. Depolymerization is promoted by cofilin, which stimulates dissociation of ADP-bound actin at the pointed end of filaments. The rate of cofilin-mediated depolymerization can be controlled by Rho via Rock and LIMK. (B) In addition to be elongated by formins, actin filaments can build networks in multiple ways. Actin bundles or cables with parallel or anti-parallel orientation of actin filaments are assembled by cross-linking proteins such as fimbrin. Actin filaments can also be cross-linked in a non-parallel fashion via filamin to create a gelled network. Branched networks are promoted by the Arp2/3 complex that initiates nucleation of branched filaments on the side of existing ones. This activity is driven by WASP-family proteins and stabilized by HS-1. An additional important regulation of actin cytoskeleton networks is mediated by capping proteins such as gelsolin, which bind the plus end of actin filaments to prevent monomer exchange. (C) Actin filaments not only generate forces while they elongate. They also generate the cell contractile forces via the intercalation of the molecular motor myosin between parallel actin filaments, which results in filament sliding. Such process is regulated by the control of the myosin light chain phosphatase and kinase activities, as well as by the degree of actin cross-linking via  $\alpha$ -actinin.

lamellipodium, conjugate formation, actin accumulation at the immunological synapse, and  $\text{Ca}^{2+}$  entry from the extracellular medium (120). Upon TCR stimulation, WAVE2 interacts with vinculin and talin (activities of which are defined in the Section “Actin-Integrins Interplay”), thereby promoting the inside-out signaling that leads to the conformational activation of integrins (115, 121). Such activities place WAVE2 as a prominent actin regulator of the mobility and activation of T lymphocytes.

The WASP-interacting protein (WIP) was initially described as a chaperone protein for WASP. However, T lymphocyte defects are more pronounced in WIP-deficient patients and mice as compared to their WASP-deficient counterparts. Indeed, WIP deficiency is associated with a disruption of the actin cytoskeleton network and defective chemotaxis (122, 123). This can be explained by the fact that WIP stabilizes actin filaments independently of its binding to WASP. This property of WIP was recently found to be critical for the integrity of the actin cytoskeleton in T cells and for their migration into tissues (124).

HS1 is the hematopoietic homolog of cortactin. It binds WASP, promotes weakly the activity of the Arp2/3 complex, and stabilizes branched actin filaments (Figure 4B). In the absence of HS1, T lymphocytes display unstable lamellipodia, as well as reduced

$\text{Ca}^{2+}$  influx and TCR-driven proliferation (82–84). The exact role of HS1 in the regulation of cytoskeleton dynamics in the context of T cell polarity and motility remains to be elucidated.

Another regulator of the Arp2/3 complex expressed in T lymphocytes is Coronin-1A (63–65). Mutations in the encoding gene are the cause of a primary immunodeficiency. Coronin-1A associates with and inhibits the Arp2/3 complex. As a homotrimer, it binds both the actin and the plasma membrane to link extracellular signals to the actin cytoskeleton. It is required to control the actin cytoskeleton remodeling driving T lymphocyte trafficking, in particular, the egress from the thymus.

### Actin Filament Crosslinking and Myosin-Driven Contraction

A pleiotropic cross-linker of actin filaments is the protein  $\alpha$ -actinin (Figure 4C). In lymphocytes, it was initially reported to control receptor aggregation (54). Interestingly, in migrating T lymphocytes, it bridges intermediate-affinity LFA-1 to the actin cytoskeleton at the leading edge. This activity controls the attachment of the leading edge, and therefore, both cell spreading and migration (55).

Filamins are dimeric actin-binding proteins that differently from  $\alpha$ -actinin, crosslink actin filaments in a non-parallel fashion (Figure 4B). They also play an important role as scaffolding proteins since they link intracellular signaling molecules to the actin cytoskeleton and to cell membrane receptors. In T lymphocytes, filamin A stabilizes the inactive/low affinity conformation of integrins and mediates the outside-in signaling via a cross-linking to the actin cytoskeleton. Consequently, filamin A regulates T lymphocyte motility (77). At the immunological synapse, filamin A colocalizes with PKC $\theta$  to favor TCR/CD28-driven activation (78). It also mediates the costimulatory signal of CD28 by permitting its recruitment to lipid rafts (79).

Another level of actin filament assembly is controlled by actin-bundling proteins that favor the association of multiple actin filaments in a parallel fashion, resulting in the formation of cable-like structures. T lymphocytes express the actin-bundling protein L-plastin, which localizes to the leading edge in response to CXCR4 stimulation and regulates polarity and migration (41). Interestingly, L-plastin expression in lymphocytes is restricted to malignant lymphocytes from Sézary syndrome patients, in which it regulates chemotaxis (127). This observation suggests that abnormal T lymphocytes may hijack actin cytoskeleton regulators to acquire specific motility properties.

As highlighted above, the dynamic interconnections between the actin and tubulin cytoskeletons are probably key events in the organization and tuning of lymphocyte polarity and mobility. Drebrin is an actin-microtubule coupling protein that possesses a cryptic actin bundling activity. It colocalizes with the chemokine receptor CXCR4 and F-actin at the periphery of the immunological synapse (71). It also plays a role in the regulation of extracellular calcium influx (72). In the context of HIV infection, it acts as a negative regulator of virus entry and virus-mediated cell fusion (73).

As mentioned in the previous chapters, the association of actin bundles with the molecular motor protein myosin produces contractile forces that are essential to regulate leading edge dynamics, cell body contractions, and uropod retraction. Myosins belong to very large family that has not yet been very much investigated in hematopoietic cells (128). They form heteromeric complexes by the association of heavy and light chains. Myosins form anti-symmetrical mini-filaments that, once incorporated within an actin network, provoke actin filament gliding, and thus local contraction and tension. The activity of the class II myosin MyoIIA (or Mhc9) in T lymphocyte migration is controlled by integrin and chemokine receptor-induced signals. Active forms of the upstream regulators Myosin Light Chain Kinase (MLCK) and ROCK are also present during lymphocyte migration. These kinases phosphorylate myosin regulatory light chains at distinct locations: MLCK is active at the leading edge to control adhesion and extension of the lamellipodium, while ROCK is involved in the retraction of the uropod (90). During the crossing of the endothelial barrier, MyoIIA facilitates T lymphocyte migration by squeezing the rigid nucleus through the endothelial junctions (94). T lymphocytes can rapidly switch between an adhesion-dependent sliding motility and an amoeboid walking motility that depends on MyoIIA (95). In addition to the density of integrin ligand, T lymphocytes can adapt their motility mode to

the degree of environmental confinement (96). The immunological synapse is the site of an actin retrograde flow combined with actomyosin II contractions. Those contractions are generated by concentric actomyosin II arcs/rings at the periphery of the immunological synapse (97). These highly dynamic events are involved in the inward movement of TCR microclusters, a key process in the integration of antigenic signals by the T lymphocyte. T lymphocytes also express the class I myosin MyoI $\alpha$ . In a recent study, murine T lymphocytes genetically deleted for MyoI $\alpha$  were reported to have global reduction in membrane tension (17). However, their homeostatic tissue distribution and responsiveness to TCR stimulation were normal. The abnormality of MyoI $\alpha$ -deficient T lymphocytes resides in the fact that they moved faster and straighter. As a consequence, these cells scanned their environment too quickly for an optimal detection of rare antigens.

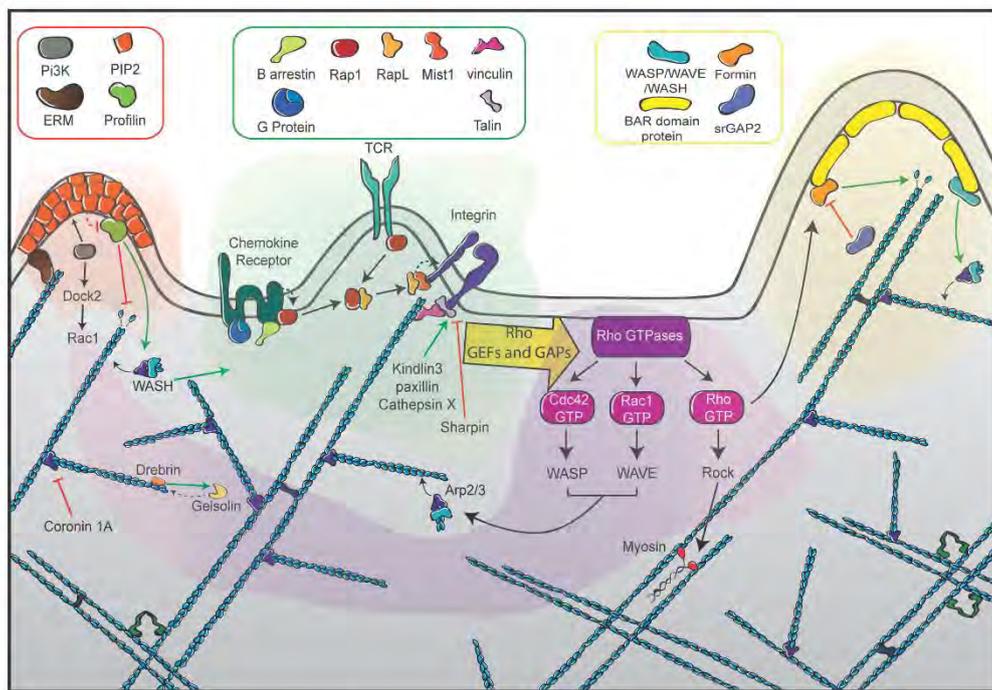
## ACTIN CYTOSKELETON INTERACTION WITH RECEPTORS DRIVING T LYMPHOCYTE MIGRATION

As anticipated in the previous chapters, the multiple facets of actin cytoskeleton remodeling that drive T lymphocyte migration need to be highly coordinated in time and space in response to extracellular cues. As illustrated in Figure 5, we will discuss herein the privileged relationships that the actin cytoskeleton maintains with the main surface receptors controlling T lymphocyte motility: integrins, chemokine receptors, and the TCR.

### Actin-Integrins Interplay

The integrin repertoire expressed by T lymphocytes and the molecular activation of integrins are tightly regulated phenomena that dictate the homing of these cells. In migrating T lymphocytes, the anchorage of integrins to the actin cytoskeleton is going to give a "fulcrum" to exert traction forces. Indeed, mature adhesions serve as an anchor to exert pulling forces through the contraction of actin bundles. The connection the actin cytoskeleton is also key in regulating the assembly and disassembly of integrin mediated adhesions. The interaction between integrins and the actin cytoskeleton is not direct and requires the participation of several proteins.

In the nascent adhesions associated with the leading edge of migrating lymphocytes, the action of talin is considered key to drive integrin activation (129). Upon chemokine-dependent signaling, the leukocyte specific talin-1 binds to LFA-1  $\beta$ 2 cytoplasmic tail (114) in a PIP2-dependent way (130), inducing integrin switch to an open conformation of high affinity. Ligand binding and talin connection with the cortical actin will stabilize this high-affinity conformation and strengthen the cell-matrix adhesion (114). This integrin-actin molecular bridge will be reinforced by kindlin-3 binding to the integrin  $\beta$  chain (86) and regulated by multiple cytoplasmic interactors such as the adhesion scaffold protein paxillin. Paxillin associates to the intracytoplasmic tail of  $\beta$ -integrin and interacts with many of its regulators such as vinculin. Paxillin activity controls adhesion assembly and turnover, thereby driving LFA-1-dependent



**FIGURE 5 | The different facets of actin cytoskeleton remodeling in migrating T cells.** Represented at the center of the scheme (green zone) are the dominant receptors in the control of T cell motility. They include chemokine receptors, the TCR and integrins such as LFA-1, each being interconnected with the actin cytoskeleton with specific sets of signaling molecules. Ligand-mediated triggering of these receptors leads to the activation of the RhoGTPases Rac, Rho, and Cdc42 via GEFs and GAPs (purple zone). Such activation is highly controlled in time and space to orchestrate the assembly of distinct actin networks. Rac activates the WAVE complex, leading to Arp2/3-mediated actin polymerization at the leading edge to form a branched actin network. Cdc42 also favors membrane extension by activating the Arp2/3 complex via WASP. In addition to its major role at the uropod, Rho plays a dual role at the leading edge by promoting actin filament elongation via the formin mDia and by favoring membrane retraction via myosin activation. The left side of the scheme depicts the role of ERM proteins as anchors of the actin cytoskeleton in the plasma membrane (orange zone). The right side of the scheme illustrates the role of BAR-domain proteins as molecular links to guarantee local coordination of membrane curvature and actin polymerization (yellow zone). The actin meshwork is represented as blue filaments that are intertwined with the different signaling areas.

T lymphocyte spreading and motility (99, 100). In the context of T lymphocyte migration across the endothelium, paxillin is involved in VLA-4 adhesiveness to low density VCAM-1 under shear stress conditions (101).

Vinculin is a physical interactor linking the cytoplasmic tail of integrins to the actin cytoskeleton. In leukocytes, it has been mainly studied in the context of immunological synapse assembly, where it is recruited by the Cdc42 effector WAVE2 (115, 121) and appears crucial to maintain a stable contact (131). Vinculin may also be playing important roles in lymphocyte chemotaxis that would merit dedicated studies.

One step further along the integrin-actin connection, the actin crosslinking protein  $\alpha$ -actinin is also considered an important component of the “molecular clutch” that establishes

new adhesions (132). At the cell leading edge of T lymphocytes,  $\alpha$ -actinin interacts physically with the  $\beta$ 2 chain of the LFA-1 open conformation and is required for directional migration (55). The sequential cleavage of the  $\beta$ 2 cytoplasmic tail by cathepsin X promotes interaction with both  $\alpha$ -actinin and talin, thereby modulating LFA-1 affinity toward the high-affinity conformation (56, 57).

Probably as important as the leading edge protrusion, the less studied uropod contraction is a key process during extravasation and tissue migration. It is a site of integrin detachment. ROCK1 (90) and MyoIIA heavy chain (98) drive uropod retraction and favor integrin recycling. LFA-1 detachment is promoted by sharpin binding to the  $\alpha$ L chain, which antagonizes the open conformation (112).

### Actin-Motility Receptors Interplay

The expression of chemokine receptors is tightly regulated in T lymphocytes and varies as a function of maturation and functional subset (133). This receptor family belongs to the seven-transmembrane domain protein superfamily called G protein-coupled receptors (GPCRs) and includes 18 genes, divided in CXCR, CCR, XCR, and CXCR subfamilies (134). Upon chemokine binding, chemokine receptors change their conformation, transmitting their signal via the activation of G protein heterotrimers, composed of the  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  subunits. This results in GTP loading of the  $G\alpha$  subunit. G protein activation stimulates phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ) isoforms, Ser/Thr-kinases, phosphatidylinositol 3-kinase- $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ), and c-Src-related non-receptor tyrosine kinases (135).

Upon stimulation, most chemokine receptors undergo a desensitization process that includes phosphorylation of their Ser/Thr residues located in the C-terminal region by GPCR kinases (GRKs). This abrogates G protein coupling, promotes binding of  $\beta$ -arrestins, and ultimately induces endocytosis of the chemokine-bound receptor (136). Alternatively, GRKs may phosphorylate ligand-free (non-engaged) chemokine receptors, which also prevents G protein coupling. These processes favor redistribution of receptors to assist T lymphocytes in sensing changes in local concentrations of chemokines (134).

Key signaling proteins integrate the interplay between chemokine receptors, integrins, and cytoskeleton dynamics. Rap GTPases are crucial in promoting adhesion in response to chemokine or antigen stimuli. In T lymphocytes, chemokine stimulation leads to Rap1 activation that binds and activates RapL, which acts as an adaptor and activator of the kinase Mst1. The RapL/Mst1 complex has the ability to bind either to  $\beta 1$  or  $\beta 2$  integrins and induces their conformational activation (106). Furthermore, results obtained with primary T cells show that Rap1 activation favors LFA-1 transport to the leading edge in vesicles also containing the RapL/Mst1 complex (91). In humans, Mst1 deficiency is associated with a severe naive T cell lymphopenia (92), in agreement with the role of this kinase in thymic egress as observed in the corresponding murine model (93). Rap1 activation is driven by several GEFs, such as CALDAG-GEF1 and the CRKL/C3G complex (107, 108). Homozygous mutations in the gene encoding CalDAG-GEF1 have been reported in patients with a form of leukocyte adhesion deficiency (LAD-III). In these patients, T lymphocytes display defects in LFA-1 activation, in particular following CXCL12 stimulation (109). Many actin-related proteins are involved in the activation and transport of these proteins to the membrane. Phospholipase C promotes the delivery of Rap1 vesicles to the leading edge (110) and activates CALDAG-GEF1 through  $Ca^{2+}$  and diacylglycerol (DAG) generation (107). On the other hand, WAVE2, Arp2/3, and ABL are required for the transport of the CRKL/C3G complex to the membrane (121).

### Actin-Antigen Receptor Interplay

In addition to LFA-1, the TCR and its associated signalosome require the actin cytoskeleton and remodel it (137). As we will see in this chapter, the main impact of TCR signaling on T lymphocyte motility is the delivery of a stop signal to assemble

the immunological synapse. The actin cytoskeleton provides a mechanical platform for TCR signaling at the immunological synapse. The first evidence for this cross-talk came from an early study that used a fractionation approach showed anchorage of cell surface expressed  $\zeta$  chain of the TCR/CD3 complex to the cytoskeleton in resting T cells (138). Over the last 10 years, it has become clear that the TCR and signaling modules are distributed as microclusters. At the immunological synapse, these microclusters follow centripetal motion driven by a combination of actin flow and actomyosin contraction (52, 139–142).

An important function of TCR signaling is to promote the conformational activation of LFA-1 (143). In this context, how both receptors interact in modulating the remodeling of the actin cytoskeleton was unclear. Using a micropatterning approach, a recent study established that the TCR stimulates actin network extension downstream of LFA-1. This generates the cytoskeletal tensions necessary to mechanical sensing and T cell spreading (144).

The amplitude and quality of an antigen-specific T cell response depends on the scanning behavior, and in particular the sampling time that T cells spend in contact with APC. Recognition of cognate antigens through the TCR transmits a stop signal that leads to reduced motility and prolonged contact with the APC (13). The combination of LFA-1 triggering through ICAM-1 and TCR with MHC molecules presenting cognate antigens is sufficient to arrest T cell motility. An initial wave of  $[Ca^{2+}]_i$  is required for the stop signal (145). In addition, the  $[Ca^{2+}]_i$  signaling pattern regulates the shape and stability of T lymphocyte contacts with APC (146). The stopping of T lymphocytes upon APC encounter is also dependent on myosin II (147). Strikingly, during this phase of arrest, T lymphocytes undergo an extensive reorganization of their membrane, cytoskeleton and even internal organelles. As a result, the interface is segregated into a central cluster of antigen receptors and a peripheral ring of adhesion molecules, building up the so-called immunological synapse (148, 149).

Interestingly, a continuum from the asymmetric leading edge of the migrating lymphocyte to the axisymmetric periphery of the immunological synapse of the APC-engaged lymphocyte has been proposed on the basis of the distribution of key molecules (28). Although apparently very distinct, the structural organizations supporting the motile polarized cell and the cell establishing a synapse could then switch easily. Such mechanism would facilitate the successive encounter of multiple APC. Along these lines, live recording rather than imaging of fixed samples reveals that immunological synapse can be motile. Such synapses, termed kinapse, are characterized by a moving adhesive junction and a leading lamellipodium (150, 151). Therefore, synapses should be seen as dynamic and flexible structures that can accommodate T lymphocyte displacement at the surface of the APC. Indeed, time-lapse total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy has been used to show that TCR signaling can occur while the synaptic contact is undergoing translation (152). In this context, collapse of the leading edge was followed by an inward flow of TCR microclusters toward a region impoverished in filamentous actin, as observed in prototypical concentric synapses (40). A recent

study combining intravital two-photon microscopy and migration along micro-channels revealed that the kinapse versus synapse behavior of T cells depends on the affinity of the antigen. Interestingly, stimulation with only high-affinity antigen is able to evoke for full arrest, which is mediated via Arp2/3-dependent actin remodeling (153). The requirement for this pathway in stabilizing the immunological synapse is in agreement with our previous observation that T lymphocytes from Wiskott–Aldrich syndrome patients displayed reduced actin polymerization at the immunological synapse and that these cells were abnormally elongated and motile at the contact with APC (119, 154). Accordingly, a study using lipid bilayers showed that WASP promotes immunological synapse symmetry to counteract PKC- $\theta$ -mediated immunological synapse destabilization (118). Together, this identifies the WASP-Arp2/3 pathway as central in setting the kinapse versus synapse behavior.

Chemokines have been proposed to modulate the TCR-driven arrest of T lymphocytes. CCL21 has been shown to increase LFA-1 responsiveness to TCR stop signals (155). T lymphocytes migrating on immobilized CCL21 and CXCL12 cluster LFA-1 at the leading edge, which is then primed for activation via the TCR-driven inside-out signal. On the opposite, chemokines that bind CXCR3 and CCR7 have been shown with Transwell assays to override the TCR-mediated stop signal (156, 157). *In vivo*, chemokines may therefore tune the encounters between T lymphocytes and APC by attracting T lymphocytes, favoring arrest and eventually promoting detachment.

Additionally, different surface receptors can modulate the scanning behavior of T lymphocytes as they encounter APC, by tuning the Stop signal. The co-receptor CTLA4 overrides the TCR-mediated stop signal by increasing T-cell motility, thereby inhibiting T-cell activation (158). Anti-CTLA-4 Abs have been tested to activate T cell immunity under numerous preclinical and clinical settings (159, 160). Another inhibitory receptor expressed at the surface of T lymphocytes, PD-1 can modulate the stop signal. Indeed, in a murine model of diabetes, the blockade of PD-1 or PD-L1 in pancreatic islets abrogated peripheral tolerance by favoring the stop signal, which resulted in prolonged interactions with the APC and enhanced T lymphocyte response (161).

*In vivo*, the effect of TCR signaling on the motility behavior has been well characterized in naïve T lymphocytes encountering antigen presented by dendritic cells in lymph nodes. Three successive steps have been characterized: (1) transient serial encounters, (2) stable contacts leading to full T lymphocyte activation, and (3) high motility and rapid proliferation (24). Therefore, during an immune response, the motility behavior of T lymphocytes is changing dramatically. Interestingly, within the same tissue, the motility behavior of T lymphocytes might be heterogeneous. Time-lapse video recording by two-photon microscopy revealed distinct behaviors, from rapid single-cell migration along random paths to collective behaviors as highly dynamic T cell swarms or stable T cell clusters (23, 162). This latter observation might correspond to the phenomenon of homotypic clustering, which is secondary to the encounter with dendritic cells and results in the formation of T cell-T cell synapses that allow concerted activation via cytokine sharing (163).

## ACTIN CYTOSKELETON INTERACTIONS WITH THE PLASMA MEMBRANE

The plasma membrane is the interphase between the cytoplasm and the extracellular environment and the physical support of the cell receptors that sense extracellular cues. As such, it is a key element to consider in the context of T lymphocyte motility. There is a compartmentalized interplay between the plasma membrane and the actin cytoskeleton [for a general review, see Ref. (164)]. At the molecular level, this interplay includes lipid components such as phosphoinositides and the RhoGTPases as master controllers of actin-regulatory proteins. In addition, there is a physical interplay via membrane-associated proteins that can anchor the actin cytoskeleton (ERM proteins) or that concomitantly govern actin dynamics and membrane curvature (BAR domain-containing proteins).

### Phosphoinositides

The role of phosphoinositides in the regulation of actin dynamics has been studied in many cell types including T lymphocytes. The triggering of most of the chemokine receptors expressed by T lymphocytes is accompanied by a robust activation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (102). This leads to the accumulation of PI(3,4,5)P<sub>3</sub> at the leading edge (103). In contrast, at the rear of the cell, membrane phosphoinositide levels contribute to cell detachment since the hydrolysis of PI(3,4,5)P<sub>3</sub> by PTEN hampers the protrusive activity. Combination of both processes establishes a guidance axis in the cell. More precisely, chemokine receptors and the TCR activate PI3K that catalyzes the phosphoinositide conversion to PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, which allows the activation of the Rac activator DOCK2 at the plasma membrane. PI3K inhibition affects the *in vivo* motility of T lymphocytes with effects on migration speed (103) and directionality (66). DOCK2 deficiency is also affecting T lymphocyte motility, as recently identified in a cohort of immunodeficient patients carrying DOCK2 mutations. T lymphocytes from these patients were found to be defective in actin polymerization and directional motility in response to chemokines (67). Importantly, changes of local concentrations of phosphoinositides may modify the relative prevalence of specific actin structures such as branched or unbranched networks. This can in part be mediated by the propensity of PI(4,5)P<sub>2</sub> to inhibit profilin activity (104, 105). How such regulation applies to the context of T lymphocyte motility remains to be explored. The distribution of phosphoinositides is also tightly regulated at the immunological synapse (40), but this aspect is beyond the scope of the present review.

### RhoGTPases

RhoGTPases are master controllers of cell polarity and shape by regulating protrusive and contractile activities downstream a number of receptors. RhoGTPases belong to the Ras superfamily, cycle between inactive GDP-bound and active GTP-bound forms, which activate effectors (165). This cycle is dynamically controlled by two groups of proteins called GTPase Activation Proteins (GAPs) and guanine exchange factors (GEFs) that respectively promote inactive and active forms (58). A further level of GTPase activity regulation is exerted by guanine

dissociation inhibitors (GDIs), which act by sequestering the RhoGTPases in the cytosol, preventing their interaction with GEFs and effectors. Post-translational modifications such as phosphorylation or palmitoylation fine-tune the activity of these molecules (166).

Rac1 and Rac2, whose functions usually overlap, are considered the main actin polymerization controllers, exerting their role mainly at the leading edge, where they activate WAVE and Arp2/3 to generate protrusions enriched in branched actin. In T lymphocytes, Rac1/Rac2 activation will be mainly under the control of DOCK2 and Vav1 GEFs, both of which are activated under chemokine receptors and the TCR (58).

At the back of the cell, RhoA is described as the key molecule controlling uropod contraction. RhoA activates ROCK, which binds and phosphorylates the Myosin Light Chain, thereby inducing the contraction of actomyosin bundles. By governing uropod detachment, this pathway is central for T cell chemotaxis (111). Although a front-back cell polarity is established through Rac1 and RhoA, RhoA activity is also present at the leading edge, where two of its main effectors are thought to be MLCK and mDia1 (90). This might generate an internal polarity of Rho actions depending on the local presence of its effectors.

Cdc42 controls the assembly, collapse and reorientation of cell polarity, which are determinant steps in the chemotaxis of T lymphocytes. This RhoGTPase promotes the generation of filopodia, which sense the environment and prepare the assembly of the lamellipodium. In T lymphocytes, Cdc42 stimulates WASP activity, which promotes Arp2/3-dependent actin branching. Cdc42 is activated downstream of chemokine receptors through different GEFs, including DOCK8, which deficiency causes a combined immunodeficiency (68, 69). DOCK8 appears to activate Cdc42 specifically at the cell leading edge. Defective expression of DOCK8 causes a T cell migration defect in confined spaces, with a phenotype of abnormally elongated cells associated to cell death by fragmentation (70). In addition, by interacting with the polarity complex Par, Cdc42 plays a key role in polarizing several organelles including the Golgi apparatus, the nucleus and the MTOC (106).

A remarkable work has been done in dissection the role of the main RhoGTPases. Still, the promiscuity with which RhoGTPases interact with effectors and regulators, the modulation of their activity depending on their location as well as the existence of yet poorly characterized family members, remain questions to be addressed. In that respect, the use of dedicated biosensors and optogenetic tools appears promising.

### BAR Domain-Containing Proteins

Interplay between plasma membrane and cytoskeleton goes beyond signaling connections. Indeed, there is a concerted regulation of the physical properties of both elements. This is mostly controlled by a heterogeneous group of BAR domain-containing proteins that have the ability to promote and respond to membrane curvature changes (167). In addition, some of those proteins can also recruit and modulate different actin

regulators. For example, the protein srGAP2 binds and inhibits the formin FMNL1 (113). The protein CIP4 appears to play the role of a switch between actin elongation and branching activities. Indeed, it activates Arp2/3 complex through interaction with WASP, while inhibiting the formin mDia1 (59). The importance of F-BAR proteins in lymphoid cell migration has been illustrated recently in tumoral lymphocytes, where CIP4 regulates lamellipodia assembly and orientation along chemokine gradients (60). CIP4-deficient T lymphocytes display defective adhesion to VCAM1 and ICAM1 present at the surface of endothelial cells. Consequently, CIP4-deficient T cells display impaired transendothelial migration (61).

### ERM Proteins

The ezrin, radixin, moesin (ERM) family is composed by cytoplasmic proteins with the capability to bind simultaneously to the actin cytoskeleton and to the cytoplasmic tails of different transmembrane proteins such as integrins, antigen receptors and chemokine receptors (168). ERM proteins are key for T lymphocyte migration, as their over-activation or silencing induces defects in  $\beta 1$  integrin-dependent cell adhesion, TCR response, transmigration, and lymph node homing *in vivo* (74–76). ERM proteins switch from a folded to an unfolded active conformation depending mainly on the phosphorylation state of a threonine residue located in their actin-binding domain. ERM protein phosphorylation state is highly controlled in lymphocytes by kinases such as ROCK, GPCR kinase 2, or PKCs (169, 170). Chemokine stimulation induces dephosphorylation of ERM proteins and resorption of surface microvilli (171). ERM proteins are particularly active at the rear of migrating lymphocytes, where they coordinate contraction and retraction of the uropod (172). This polarized activity is coordinated by RhoGTPases since the presence of a constitutive active RhoA induces a hyper-phosphorylation of ERM proteins and protrusion stabilization, whereas the over-activation of Cdc42 or Rac1 evokes a dephosphorylation of ERM proteins and protrusion disappearance (173).

### CONCLUDING REMARKS

The actin cytoskeleton provides a fascinating mechanical framework that endows T lymphocytes with an autonomous motility program. Importantly, the many connections between the actin cytoskeleton and the membrane, receptors, and signaling modules allow an integration of environmental cues so that T lymphocytes adapt their motility behavior. Such tunable motility supports the main missions of T lymphocytes: immuno-surveillance (timely recognition of foreign antigens) and immune defense (mounting of adapted immune responses against pathogens).

Beyond the many facets of actin cytoskeleton remodeling reported in this review, key fundamental questions remain open. To fully appreciate the role of specific actin regulators and better characterize the actin networks elaborated in precise cellular locations, we need more detailed analysis of the actin cytoskeleton microarchitecture. For this purpose, novel methods to visualize actin polymerization combined with super-resolution microscopy approaches appear promising (40, 53, 174). An important challenge is that we need to

achieve adequate temporal resolution in the imaging of motile lymphocytes, as the characteristic timescales of lymphocyte migration and actin dynamics are very short. For example, actin filament barbed ends have been shown to assemble at a rate of 3,000 subunits/s (2). This implies that an actin filament can reach length scales equivalent to the diameter of a lymphocyte (10  $\mu\text{m}$ ) in  $<2$  s. An additional difficulty is to assess very fine regulation of motility due to cell-to-cell asynchrony within a population, for example if one wishes to study relative timing of GTPase activation within protrusions. This requires single-cell analysis. Cell-to-cell asynchrony could then be solved by computational alignment.

We should be able to learn more from cell shape dynamics, in association with membrane curvature and protrusion dynamics. Existing approaches useful to study the evolution of cell shape, such as kymographs (175) or edge velocity maps (176), have not yet been applied to lymphocyte populations migrating over different substrates. It will also be important to better understand which molecular regulation tunes actin-related biophysical properties to generate tensions and forces. Along this line, the mapping of contractile forces using pillar arrays has recently been applied to T lymphocytes (177). The field also needs to develop integrated approaches that can combine molecular and biomechanical data together with motility parameters. Along this line, a recently developed MATLAB-based toolset called TIAM

allows for integration of data such as area of attachment to the underlying substrate, cell polarity and fluorescence intensity from two fluorescence channels (26).

Finally, the part of the review dedicated to the actin cytoskeleton regulators studied in T lymphocytes reveals that the function of many proteins remains to be characterized in these cells. Screening approaches combined to high-content automated imaging would accelerate our discovery of novel molecules controlling specific aspects of actin cytoskeleton remodeling during T lymphocyte migration. This knowledge could then be exploited to identify targets for the tuning of T lymphocyte activation in the context of infection, auto-immunity and cancer.

## ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank S. Allart from the INSERM UMR1043 imaging facility. This work received support from the French "Agence Nationale de la Recherche" (ANR-13-BSV1-0031 to LD), RH is recipient of a PhD fellowship from the "Conseil Général de Mayotte."

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2015.00586>

## REFERENCES

- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* (2003) **302**:1704–9. doi:10.1126/science.1092053
- Blanchain L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev* (2014) **94**:235–63. doi:10.1152/physrev.00018.2013
- Gardel ML, Schneider IC, Aratyn-Schaus Y, Waterman CM. Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2010) **26**:315–33. doi:10.1146/annurev.cellbio.011209.122036
- Giannone G, Dubin-Ihaler BJ, Dobreiner HG, Kieffer N, Bresnick AR, Sheets MP. Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell* (2004) **116**:431–43. doi:10.1016/S0092-8674(04)00058-3
- Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2008) **9**:446–54. doi:10.1038/nrm2406
- Charras G, Paluch E. Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2008) **9**:730–6. doi:10.1038/nrm2453
- Krummel MF, Friedman RS, Jacobelli J. Modes and mechanisms of T cell motility: roles for confinement and Myosin-IIA. *Curr Opin Cell Biol* (2014) **30**:9–16. doi:10.1016/j.cob.2014.05.003
- Germain RN, Robey EA, Cahalan MD. A decade of imaging cellular motility and interaction dynamics in the immune system. *Science* (2012) **336**:1676–81. doi:10.1126/science.1221063
- Miller MJ, Wei SH, Cahalan MD, Parker I. Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) **100**:2604–9. doi:10.1073/pnas.2628040100
- Harris TH, Banigan EJ, Christian DA, Konradi C, Tait Wojno ED, Norose K, et al. Generalized Levy walks and the role of chemokines in migration of effector CD8+ T cells. *Nature* (2012) **486**:545–8. doi:10.1038/nature11098
- Bajenoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N, et al. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* (2006) **25**:989–1001. doi:10.1016/j.immuni.2006.10.011
- Hugues S, Scholer A, Boissonnas A, Nussbaum A, Combadiere C, Amigorena S, et al. Dynamic imaging of chemokine-dependent CD8+ T cell help for CD8+ T cell responses. *Nat Immunol* (2007) **8**:921–30. doi:10.1038/nri1495
- Dustin ML, Bromley SK, Kan Z, Peterson DA, Unanue ER. Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) **94**:3909–13. doi:10.1073/pnas.94.8.3909
- Stoll S, Delon J, Brotz TM, Germain RN. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* (2002) **296**:1873–6. doi:10.1126/science.1071065
- Bouso P, Robey E. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat Immunol* (2003) **4**:579–85. doi:10.1038/nri928
- Lafouresse F, Cotta-de-Almeida V, Malet-Engra G, Galy A, Valitutti S, Dupré L. Wiskott-Aldrich syndrome protein controls antigen-presenting cell-driven CD4+ T-cell motility by regulating adhesion to intercellular adhesion molecule-1. *Immunology* (2012) **137**:183–96. doi:10.1111/j.1365-2567.2012.03620.x
- Gerard A, Patino-Lopez G, Beemiller P, Nambiar R, Ben-Aissa K, Liu Y, et al. Detection of rare antigen-presenting cells through T cell-intrinsic meandering motility, mediated by Myo1g. *Cell* (2014) **158**:492–505. doi:10.1016/j.cell.2014.05.044
- Beltman JB, Maree AF, de Boer RJ. Analysing immune cell migration. *Nat Rev Immunol* (2009) **9**:789–98. doi:10.1038/nri2638
- McCutcheon M. Studies on the locomotion of leucocytes. III. The normal rate of locomotion of human lymphocytes in vitro. *Am J Physiol* (1924) **69**:279.
- Wilkinson PC. The locomotor capacity of human lymphocytes and its enhancement by cell growth. *Immunology* (1986) **57**:281–9.
- Niggemann B, Maaser K, Lu H, Kroczeck R, Zanker KS, Friedl P. Locomotory phenotypes of human tumor cell lines and T lymphocytes in a three-dimensional collagen lattice. *Cancer Lett* (1997) **118**:173–80. doi:10.1016/S0304-3835(97)00328-5
- Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) **105**:10113–8. doi:10.1073/pnas.0711106105
- Miller MJ, Wei SH, Parker I, Cahalan MD. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* (2002) **296**:1869–73. doi:10.1126/science.1070051
- Mempel TR, Henrickson SE, Von Andrian UH. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* (2004) **427**:154–9. doi:10.1038/nature02238

25. Huang JH, Cardenas-Navia LI, Caldwell CC, Plumb TJ, Radu CG, Rocha PN, et al. Requirements for T lymphocyte migration in explanted lymph nodes. *J Immunol* (2007) **178**:7747–55. doi:10.4049/jimmunol.178.12.7747
26. Mayya V, Neiswanger W, Medina R, Wiggins CH, Dustin ML. Integrative analysis of T cell motility from multi-channel microscopy data using TIAM. *J Immunol Methods* (2015) **416**:84–93. doi:10.1016/j.jim.2014.11.004
27. Schneider-Hohendorf T, Sienner MP, Weidenfeller C, Zozulya AI, Simon OJ, Schwab N, et al. Regulatory T cells exhibit enhanced migratory characteristics, a feature impaired in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* (2010) **40**:3581–90. doi:10.1002/eji.201040558
28. Dustin ML. Stop and go traffic to tune T cell responses. *Immunity* (2004) **21**:305–14. doi:10.1016/j.immuni.2004.08.016
29. Shalghar G, Lindquist RJ, Skokos D, Dudziak D, Huang JH, Nussenzeig MC, et al. Stable T cell-dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity in vivo. *Nat Immunol* (2005) **6**:707–14. doi:10.1038/ni1210
30. Tadokoro CE, Shalghar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, et al. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med* (2006) **203**:505–11. doi:10.1084/jem.20050783
31. Boissonnas A, Feller I, Zeelenberg IS, Hugues S, Amigorena S. In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *J Exp Med* (2007) **204**:345–56. doi:10.1084/jem.20061890
32. Sylvester A, Shutt D, Wessels D, Stapleton JT, Stites J, Kennedy RC, et al. T cells and HIV-induced T cell syncytia exhibit the same motility cycle. *J Leukoc Biol* (1995) **57**:643–50.
33. Castellino F, Huang AY, Altan-Bonnet G, Stoll S, Scheinecker C, Germain RN. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* (2006) **440**:890–5. doi:10.1038/nature04651
34. Beltman JB, Maree AF, Lynch JN, Miller MJ, de Boer RJ. Lymph node topology dictates T cell migration behavior. *J Exp Med* (2007) **204**:771–80. doi:10.1084/jem.20061278
35. Serrador JM, Nieto M, Sanchez-Madrid F. Cytoskeletal rearrangement during migration and activation of T lymphocytes. *Trends Cell Biol* (1999) **9**:228–33. doi:10.1016/S0962-8924(99)01553-6
36. Friedl P, Weigel B. Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol* (2008) **9**:960–9. doi:10.1038/ni.1212
37. Murray J, Vawter-Hugart H, Voss E, Soll DR. Three-dimensional motility cycle in leukocytes. *Cell Motil Cytoskeleton* (1992) **22**:211–23. doi:10.1002/cm.970220308
38. Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bista M, et al. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* (2008) **5**:605–7. doi:10.1038/nmeth.1220
39. Mallet-Engra G, Yu W, Oldani A, Rey-Barroso J, Gov NS, Scita G, et al. Collective cell motility promotes chemotactic prowess and resistance to chemorepulsion. *Curr Biol* (2015) **25**:242–50. doi:10.1016/j.cub.2014.11.030
40. Ritter AT, Asano Y, Stinchcombe JC, Dieckmann NM, Chen BC, Gawden-Bone C, et al. Actin depletion initiates events leading to granule secretion at the immunological synapse. *Immunity* (2015) **42**:864–76. doi:10.1016/j.immuni.2015.04.013
41. Freeley M, O'Dowd F, Paul T, Kashanin D, Davies A, Kelleher D, et al. L-plastin regulates polarization and migration in chemokine-stimulated human T lymphocytes. *J Immunol* (2012) **188**:6357–70. doi:10.4049/jimmunol.1103242
42. Nourshargh S, Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* (2014) **41**:694–707. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.008
43. Shulman Z, Shinder V, Klein E, Grabovsky V, Yeager O, Geron E, et al. Lymphocyte crawling and transendothelial migration require chemokine triggering of high-affinity LFA-1 integrin. *Immunity* (2009) **30**:384–96. doi:10.1016/j.immuni.2008.12.020
44. Bartholomaeus I, Kawakami N, Odoardi F, Schlager C, Miljkovic D, Ellwart JW, et al. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* (2009) **462**:94–8. doi:10.1038/nature08478
45. Valignat MP, Negre P, Cadra S, Lelouch AC, Gallet F, Henon S, et al. Lymphocytes can self-steer passively with wind vane uropods. *Nat Commun* (2014) **5**:5213. doi:10.1038/ncomms6213
46. Carman CV, Sage PT, Sciuto TF, de la Fuente MA, Geha RS, Ochs HD, et al. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity* (2007) **26**:784–97. doi:10.1016/j.immuni.2007.04.015
47. Soriano SF, Hons M, Schumann K, Kumar V, Dennier TJ, Lyck R, et al. In vivo analysis of uropod function during physiological T cell trafficking. *J Immunol* (2011) **187**:2356–64. doi:10.4049/jimmunol.1100935
48. Woolf E, Grigorova I, Sagiv A, Grabovsky V, Feigelson SW, Shulman Z, et al. Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces. *Nat Immunol* (2007) **8**:1076–85. doi:10.1038/ni1499
49. Dustin ML. Hunter to gatherer and back: immunological synapses and kinapses as variations on the theme of amoeboid locomotion. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2008) **24**:577–96. doi:10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175226
50. Burkhardt JK, Carrizosa E, Shaffer MH. The actin cytoskeleton in T cell activation. *Annu Rev Immunol* (2008) **26**:233–59. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090347
51. Valitutti S, Dessing M, Aktories K, Gallati H, Lanzavecchia A. Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J Exp Med* (1995) **181**:577–84. doi:10.1084/jem.181.2.577
52. Campi G, Varma R, Dustin ML. Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J Exp Med* (2005) **202**:1031–6. doi:10.1084/jem.20051182
53. Kumari S, Depoil D, Martinelli R, Judokusumo F, Carmona G, Gerlier FR, et al. Actin foci facilitate activation of the phospholipase C-gamma in primary T lymphocytes via the WASP pathway. *Elife* (2015) **4**:e04953. doi:10.7554/eLife.04953
54. Hoessli D, Rungger-Brandle E, Jockusch BM, Gabbiani G. Lymphocyte alpha-actinin. Relationship to cell membrane and co-capping with surface receptors. *J Cell Biol* (1980) **84**:305–14. doi:10.1083/jcb.84.2.305
55. Stanley P, Smith A, McDowall A, Nicol A, Zicha D, Hogg N. Intermediate-affinity LFA-1 binds alpha-actinin-1 to control migration at the leading edge of the T cell. *EMBO J* (2008) **27**:62–75. doi:10.1038/sj.emboj.7601959
56. Jevnikar Z, Obermajer N, Kos J, LFA-1 fine-tuning by cathepsin X. *IUBMB Life* (2011) **63**:686–93. doi:10.1002/iub.505
57. Jevnikar Z, Obermajer N, Pecar-Fonovic U, Karaoglanovic-Carmona A, Kos J, Cathepsin X cleaves the beta2 cytoplasmic tail of LFA-1 inducing the intermediate affinity form of LFA-1 and alpha-actinin-1 binding. *Eur J Immunol* (2009) **39**:3217–27. doi:10.1002/eji.200939562
58. Tybulewicz VL, Henderson RB. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* (2009) **9**:630–44. doi:10.1038/nri2606
59. Yan S, Lv Z, Winterhoff M, Wenzl C, Zobel T, Faix J, et al. The F-BAR protein Cip4/Toca-1 antagonizes the formin Diaphanous in membrane stabilization and compartmentalization. *J Cell Sci* (2013) **126**:1796–805. doi:10.1242/jcs.118422
60. Mallet-Engra G, Viaud J, Ysebaert I, Farcé M, Lafouresse F, Laurent G, et al. CIP4 controls CCL19-driven cell steering and chemotaxis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* (2013) **73**:3412–24. doi:10.1158/0008-5472.CCR-12-3564
61. Koduru S, Kumar L, Massaad MJ, Ramesh N, Le Bras S, Ozcan E, et al. Cdc42 interacting protein 4 (CIP4) is essential for integrin-dependent T-cell trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) **107**:16252–6. doi:10.1073/pnas.1002747107
62. Wabnitz GH, Nebl G, Klemke M, Schroder AJ, Samstag Y. Phosphatidylinositol 3-kinase functions as a Ras effector in the signaling cascade that regulates dephosphorylation of the actin-remodeling protein cofilin after costimulation of untransformed human T lymphocytes. *J Immunol* (2006) **176**:1668–74. doi:10.4049/jimmunol.176.3.1668
63. Foger N, Rangell L, Danilenko DM, Chan AC. Requirement for coronin 1 in T lymphocyte trafficking and cellular homeostasis. *Science* (2006) **313**:839–42. doi:10.1126/science.1130563
64. Shiow LR, Roadcap DW, Paris K, Watson SR, Grigorova II, Lebet T, et al. The actin regulator coronin 1A is mutant in a thymic egress-deficient mouse strain and in a patient with severe combined immunodeficiency. *Nat Immunol* (2008) **9**:1307–15. doi:10.1038/ni.1662
65. Mugnier B, Nal B, Verthuy C, Boyer C, Lam D, Chasson L, et al. Coronin-1A links cytoskeleton dynamics to TCR alpha beta-induced cell signaling. *PLoS One* (2008) **3**:e3467. doi:10.1371/journal.pone.0003467

66. Nombela-Arrieta C, Mempel TR, Soriano SF, Mazo I, Wymann MP, Hirsch E, et al. A central role for DOCK2 during interstitial lymphocyte motility and sphingosine-1-phosphate-mediated egress. *J Exp Med* (2007) **204**:497–510. doi:10.1084/jem.20061780
67. Dobbs K, Dominguez Conde C, Zhang SY, Parolini S, Audry M, Chou J, et al. Inherited DOCK2 deficiency in patients with early-onset invasive infections. *N Engl J Med* (2015) **372**:2409–22. doi:10.1056/NEJMoa1413462
68. Zhang Q, Davis JC, Lamborn IT, Freeman AF, Jing H, Favreau AJ, et al. Combined immunodeficiency associated with DOCK8 mutations. *N Engl J Med* (2009) **361**:2046–55. doi:10.1056/NEJMoa0905506
69. Engelhardt KR, McGhee S, Winkler S, Sassi A, Woellner C, Lopez-Herrera G, et al. Large deletions and point mutations involving the dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) in the autosomal-recessive form of hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol* (2009) **124**:1289.e–302.e. doi:10.1016/j.jaci.2009.10.038
70. Zhang Q, Dove CG, Hor JJ, Murdock HM, Strauss-Albee DM, Garcia JA, et al. DOCK8 regulates lymphocyte shape integrity for skin antiviral immunity. *J Exp Med* (2014) **211**:2549–66. doi:10.1084/jem.20141307
71. Perez-Martinez M, Gordon-Alonso M, Cabrero JR, Barrero-Villar M, Rey M, Mittelbrunn M, et al. F-actin-binding protein drebrin regulates CXCR4 recruitment to the immune synapse. *J Cell Sci* (2010) **123**:1160–70. doi:10.1242/jcs.064238
72. Mercer JC, Qi Q, Mottram LF, Law M, Bruce D, Iyer A, et al. Chemico-genetic identification of drebrin as a regulator of calcium responses. *Int J Biochem Cell Biol* (2010) **42**:337–45. doi:10.1016/j.biocel.2009.11.019
73. Gordon-Alonso M, Rocha-Perugini V, Alvarez S, Ursa A, Izquierdo-Useros N, Martinez-Picado J, et al. Actin-binding protein drebrin regulates HIV-1-triggered actin polymerization and viral infection. *J Biol Chem* (2013) **288**:28382–97. doi:10.1074/jbc.M113.494906
74. Liu Y, Belkina NV, Park C, Nambiar R, Loughhead SM, Patino-Lopez G, et al. Constitutively active ezrin increases membrane tension, slows migration, and impedes endothelial transmigration of lymphocytes in vivo in mice. *Blood* (2012) **119**:445–53. doi:10.1182/blood-2011-07-368860
75. Lassere R, Charrin S, Cuche C, Danckaert A, Thouleuz M-L, de Chaumont F, et al. Ezrin tunes T-cell activation by controlling Dlg1 and microtubule positioning at the immunological synapse. *EMBO J* (2010) **29**:2301–14. doi:10.1038/emboj.2010.127
76. Chen EJH, Shaffer MH, Williamson FK, Huang Y, Burkhardt JK. Ezrin and moesin are required for efficient T cell adhesion and homing to lymphoid organs. *PLoS One* (2013) **8**:e52368. doi:10.1371/journal.pone.0052368
77. Calderwood DA, Huttenlocher A, Kiosses WB, Rose DM, Woodside DG, Schwartz MA, et al. Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nat Cell Biol* (2001) **3**:1060–8. doi:10.1038/ncb1201-1060
78. Hayashi K, Altman A. Filamin A is required for T cell activation mediated by protein kinase C-theta. *J Immunol* (2006) **177**:1721–8. doi:10.4049/jimmunol.177.3.1721
79. Tavano R, Contento RL, Baranda SJ, Soligo M, Tuosto L, Manes S, et al. CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse. *Nat Cell Biol* (2006) **8**:1270–6. doi:10.1038/ncb1492
80. Gomez TS, Kumar K, Medeiros RB, Shimizu Y, Leibson PJ, Billadeau DD. Formins regulate the actin-related protein 2/3 complex-independent polarization of the centrosome to the immunological synapse. *Immunity* (2007) **26**:177–90. doi:10.1016/j.immuni.2007.01.008
81. Morley SC, Sung J, Sun GP, Martelli MP, Bunnell SC, Bierer BE. Gelsolin overexpression alters actin dynamics and tyrosine phosphorylation of lipid raft-associated proteins in Jurkat T cells. *Mol Immunol* (2007) **44**:2459–80. doi:10.1016/j.molimm.2006.09.024
82. Taniuchi I, Kitamura D, Maekawa Y, Fukuda T, Kishi H, Watanabe T. Antigen-receptor induced clonal expansion and deletion of lymphocytes are impaired in mice lacking Hs1 protein, a substrate of the antigen-receptor-coupled tyrosine kinases. *EMBO J* (1995) **14**:3664–78.
83. Gomez TS, McCarny SD, Carrizosa E, Labno CM, Comiskey EO, Nolz JC, et al. Hs1 functions as an essential actin-regulatory adaptor protein at the immune synapse. *Immunity* (2006) **24**:741–52. doi:10.1016/j.immuni.2006.03.022
84. Carrizosa E, Gomez TS, Labno CM, Klos Dehning DA, Liu X, Freedman BD, et al. Hematopoietic lineage cell-specific protein 1 is recruited to the immunological synapse by IL-2-inducible T cell kinase and regulates phospholipase Cgamma 1 microcluster dynamics during T cell spreading. *J Immunol* (2009) **183**:7352–61. doi:10.4049/jimmunol.0900973
85. Andres-Delgado L, Anton OM, Bartolini F, Ruiz-Saenz A, Correas I, Gundersen GG, et al. INF2 promotes the formation of deetyrosinated microtubules necessary for centrosome reorientation in T cells. *J Cell Biol* (2012) **198**:1025–37. doi:10.1083/jcb.201202137
86. Svensson L, Howarth K, McDowall A, Patzak I, Evans R, Uszar S, et al. Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation. *Nat Med* (2009) **15**:306–12. doi:10.1038/nm.1931
87. Sakata D, Taniguchi H, Yasuda S, Adachi-Morishima A, Hamazaki Y, Nakayama R, et al. Impaired T lymphocyte trafficking in mice deficient in an actin-nucleating protein, mDia1. *J Exp Med* (2007) **204**:2031–8. doi:10.1084/jem.20062647
88. Eisenmann KM, West RA, Hildebrand D, Kitchen SM, Peng J, Sigler R, et al. T cell responses in mammalian diaphanous-related formin mDia1 knock-out mice. *J Biol Chem* (2007) **282**:25152–8. doi:10.1074/jbc.M703243200
89. Vicente-Manzanares M, Rey M, Perez-Martinez M, Yanez-Mo M, Sancho D, Cabrero JR, et al. The RhoA effector mDia is induced during T cell activation and regulates actin polymerization and cell migration in T lymphocytes. *J Immunol* (2003) **171**:1023–34. doi:10.4049/jimmunol.171.2.1023
90. Smith A, Bracke M, Leitinger B, Porter JC, Hogg N. LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment. *J Cell Sci* (2003) **116**:3123–33. doi:10.1242/jcs.00606
91. Katagiri K, Inamura M, Kinashi T. Spatiotemporal regulation of the kinase Mst1 by binding protein RAPL is critical for lymphocyte polarity and adhesion. *Nat Immunol* (2006) **7**:919–28. doi:10.1038/ni1374
92. Nehme NT, Pachlopnik Schmid J, Debeurme F, Andre-Schmutz I, Lim A, Nitschke P, et al. MST1 mutations in autosomal recessive primary immunodeficiency characterized by defective naive T-cell survival. *Blood* (2012) **119**:3458–68. doi:10.1182/blood-2011-09-378364
93. Dong Y, Du X, Ye J, Han M, Xu T, Zhuang Y, et al. A cell-intrinsic role for Mst1 in regulating thymocyte egress. *J Immunol* (2009) **183**:3865–72. doi:10.4049/jimmunol.0900678
94. Jacobelli J, Estin Matthews M, Chen S, Krummel MF. Activated T cell trans-endothelial migration relies on myosin-IIA contractility for squeezing the cell nucleus through endothelial cell barriers. *PLoS One* (2013) **8**:e75151. doi:10.1371/journal.pone.0075151
95. Jacobelli J, Bennett FC, Pandurangi P, Tooley AJ, Krummel MF. Myosin-IIA and ICAM-1 regulate the interchange between two distinct modes of T cell migration. *J Immunol* (2009) **182**:2041–50. doi:10.4049/jimmunol.0803267
96. Jacobelli J, Friedman RS, Conti MA, Lenton-Dumenil AM, Piel M, Sorensen CM, et al. Confinement-optimized three-dimensional T cell amoeboid motility is modulated via myosin IIA-regulated adhesions. *Nat Immunol* (2010) **11**:953–61. doi:10.1038/ni.1936
97. Yi J, Wu XS, Crites T, Hammer JA III. Actin retrograde flow and actomyosin II arc contraction drive receptor cluster dynamics at the immunological synapse in Jurkat T cells. *Mol Biol Cell* (2012) **23**:834–52. doi:10.1091/mbc.E11-08-0731
98. Morin NA, Oakes PW, Hyun Y-M, Lee D, Chin YE, Chin EY, et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mediates integrin LFA-1 de-adhesion during T lymphocyte migration. *J Exp Med* (2008) **205**:195–205. doi:10.1084/jem.20071543
99. Liu S, Thomas SM, Woodside DG, Rose DM, Kiosses WB, Pfaff M, et al. Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses. *Nature* (1999) **402**:676–81. doi:10.1038/45264
100. Rose DM, Liu S, Woodside DG, Han J, Schlaepfer DD, Ginsberg MH. Paxillin binding to the alpha 4 integrin subunit stimulates LFA-1 (integrin alpha L beta 2)-dependent T cell migration by augmenting the activation of focal adhesion kinase/proline-rich tyrosine kinase-2. *J Immunol* (2003) **170**:5912–8. doi:10.4049/jimmunol.170.12.5912
101. Manevich E, Grabovsky V, Feigelson SW, Alon R, Talin 1 and paxillin facilitate distinct steps in rapid VLA-4-mediated adhesion strengthening to vascular cell adhesion molecule 1. *J Biol Chem* (2007) **282**:25338–48. doi:10.1074/jbc.M70089200
102. Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol* (2003) **3**:317–30. doi:10.1038/nri1056

103. Matheu MR, Deane JA, Parker I, Fruman DA, Cahalan MD. Class IA phosphoinositide 3-kinase modulates basal lymphocyte motility in the lymph node. *J Immunol* (2007) **179**:2261–9. doi:10.4049/jimmunol.179.4.2261
104. Rotty JD, Wu C, Haynes EM, Suarez C, Winkelman JD, Johnson HE, et al. Profilin-1 serves as a gatekeeper for actin assembly by Arp2/3-dependent and -independent pathways. *Dev Cell* (2015) **32**:54–67. doi:10.1016/j.devcel.2014.10.026
105. Suarez C, Carroll RT, Burke TA, Christensen JR, Bestul AJ, Sees JA, et al. Profilin regulates F-actin network homeostasis by forming formin over Arp2/3 complex. *Dev Cell* (2015) **32**:43–53. doi:10.1016/j.devcel.2014.10.027
106. Gérard A, Mertens AEE, van der Kammen RA, Collard JG. The Par polarity complex regulates Rap1- and chemokine-induced T cell polarization. *J Cell Biol* (2007) **176**:863–75. doi:10.1083/jcb.200608161
107. Ghandour H, Cullere X, Alvarez A, Lusinskas FW, Mayadas TN. Essential role for Rap1 GTPase and its guanine exchange factor CalDAG-GEFI in LFA-1 but not VLA-4 integrin mediated human T-cell adhesion. *Blood* (2007) **110**:3682–90. doi:10.1182/blood-2007-03-077628
108. Kinashi T, Katagiri K. Regulation of lymphocyte adhesion and migration by the small GTPase Rap1 and its effector molecule, RAPL. *Immunol Lett* (2004) **93**:1–5. doi:10.1016/j.imlet.2004.02.008
109. Pasvol'sky R, Feigelson SW, Kilic SS, Simon AJ, Tal-Lapidot G, Grabovsky V, et al. A LAD-III syndrome is associated with defective expression of the Rap-1 activator CalDAG-GEFI in lymphocytes, neutrophils, and platelets. *J Exp Med* (2007) **204**:1571–82. doi:10.1084/jem.20070058
110. Mor A, Wynne JR, Ahearn JM, Dustin ML, Du G, Phillips MR. Phospholipase D1 regulates lymphocyte adhesion via upregulation of Rap1 at the plasma membrane. *Mol Cell Biol* (2009) **29**:3297–306. doi:10.1128/MCB.00366-09
111. Bardi G, Niggli V, Loetscher P. Rho kinase is required for CCR7-mediated polarization and chemotaxis of T lymphocytes. *FEBS Lett* (2003) **542**:79–83. doi:10.1016/S0014-5793(03)00351-X
112. Pouwels J, DeFranceschi N, Rantakari P, Auvinen K, Karikoski M, Mätilä E, et al. SHARPIN regulates uropod detachment in migrating lymphocytes. *Cell Rep* (2013) **5**:619–28. doi:10.1016/j.celrep.2013.10.011
113. Mason FM, Heimsath EG, Higgs HN, Soderling SH. Bi-modal regulation of a formin by srGAP2. *J Biol Chem* (2011) **286**:6577–86. doi:10.1074/jbc.M110.190397
114. Smith A, Carrasco YR, Stanley P, Kieffer N, Batista FD, Hogg N. A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. *J Cell Biol* (2005) **170**:141–51. doi:10.1083/jcb.200412032
115. Nolz JC, Medeiros RB, Mitchell JS, Zhu P, Freedman BD, Shimizu Y, et al. WAVE2 regulates high-affinity integrin binding by recruiting vinculin and talin to the immunological synapse. *Mol Cell Biol* (2007) **27**:5986–6000. doi:10.1128/MCB.00136-07
116. Piotrowski JT, Gomez TS, Schoon RA, Mangalam AK, Billadeau DD. WASH knockout T cells demonstrate defective receptor trafficking, proliferation, and effector function. *Mol Cell Biol* (2013) **33**:958–73. doi:10.1128/MCB.01288-12
117. Haddad E, Zugaza JL, Louache F, Debili N, Crouin C, Schwarz K, et al. The interaction between Cdc42 and WASP is required for SDF-1-induced T-lymphocyte chemotaxis. *Blood* (2001) **97**:33–8. doi:10.1182/blood.V97.1.33
118. Sims TN, Soos TJ, Xenias HS, Dubin-Thaler B, Hofman JM, Waite JC, et al. Opposing effects of PKC $\theta$  and WASp on symmetry breaking and relocation of the immunological synapse. *Cell* (2007) **129**:773–85. doi:10.1016/j.cell.2007.03.037
119. Calvez R, Lafouresse F, De Meester J, Galy A, Valitutti S, Dupré L. The Wiskott-Aldrich syndrome protein permits assembly of a focused immunological synapse enabling sustained T-cell receptor signaling. *Haematologica* (2011) **96**:1415–23. doi:10.3324/haematol.2011.040204
120. Nolz JC, Gomez TS, Zhu P, Li S, Medeiros RB, Shimizu Y, et al. The WAVE2 complex regulates actin cytoskeletal reorganization and CRAC-mediated calcium entry during T cell activation. *Curr Biol* (2006) **16**:24–34. doi:10.1016/j.cub.2005.11.036
121. Nolz JC, Nacusi LP, Segovis CM, Medeiros RB, Mitchell JS, Shimizu Y, et al. The WAVE2 complex regulates T cell receptor signaling to integrins via Abl and CrkL-C3G-mediated activation of Rap1. *J Cell Biol* (2008) **182**:1231–44. doi:10.1083/jcb.200801121
122. Lanzi G, Moratto D, Vairo D, Masneri S, Delmonte O, Paganini T, et al. A novel primary human immunodeficiency due to deficiency in the WASP-interacting protein WIP. *J Exp Med* (2012) **209**:29–34. doi:10.1084/jem.20110896
123. Gallego MD, de la Fuente MA, Anton IM, Snapper S, Fuhlbrigge R, Geha RS. WIP and WASP play complementary roles in T cell homing and chemotaxis to SDF-1 $\alpha$ . *Int Immunol* (2006) **18**:221–32. doi:10.1093/intimm/dxh310
124. Massaad MJ, Oyoshi MK, Kane J, Koduru S, Alcaide P, Nakamura F, et al. Binding of WIP to actin is essential for T cell actin cytoskeleton integrity and tissue homing. *Mol Cell Biol* (2014) **34**:4343–54. doi:10.1128/MCB.00533-14
125. Dong B, Zhang SS, Gao W, Su H, Chen J, Jin F, et al. Mammalian diaphanous-related formin 1 regulates GSK3 $\beta$ -dependent microtubule dynamics required for T cell migratory polarization. *PLoS One* (2013) **8**:e80500. doi:10.1371/journal.pone.0080500
126. Snapper SB, Meelu P, Nguyen D, Stockton BM, Bozza P, Alt FW, et al. WASP deficiency leads to global defects of directed leukocyte migration in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* (2005) **77**:993–8. doi:10.1189/jlb.0804444
127. Begue E, Jean-Louis F, Bagot M, Jauliac S, Cayuela JM, Laroche L, et al. Inducible expression and pathophysiologic functions of T-plastin in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* (2012) **120**:143–54. doi:10.1182/blood-2011-09-379156
128. Maravillas-Montero JL, Santos-Argumedo L. The myosin family: unconventional roles of actin-dependent molecular motors in immune cells. *J Leukoc Biol* (2012) **91**:35–46. doi:10.1189/jlb.0711335
129. Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, et al. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* (2003) **302**:103–6. doi:10.1126/science.1086652
130. Martel V, Racaud-Sultan C, Dupe S, Marie C, Paulhe F, Galmiche A, et al. Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J Biol Chem* (2001) **276**:21217–27. doi:10.1074/jbc.M102373200
131. Saez de Guinoa J, Barrio L, Carrasco YR. Vinculin arrests motile B cells by stabilizing integrin clustering at the immune synapse. *J Immunol* (2013) **191**(2):2742–51. doi:10.4049/jimmunol.1300684
132. Case LB, Waterman CM. Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nat Cell Biol* (2015) **17**:955–63. doi:10.1038/ncb3191
133. Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* (2000) **177**:134–40. doi:10.1034/j.1600-065X.2000.17717.x
134. Ebert LM, Schaefer P, Moser B. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol Immunol* (2005) **42**:799–809. doi:10.1016/j.molimm.2004.06.040
135. Loetscher P, Moser B, Baggiolini M. Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv Immunol* (2000) **74**:127–80. doi:10.1016/S0065-2776(08)60910-4
136. Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* (2001) **53**:1–24.
137. Beemiller P, Krummel MF. Mediation of T-cell activation by actin meshworks. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2010) **2**:a002444. doi:10.1101/cshperspect.a002444
138. Caplan S, Zeligler S, Wang L, Baniyash M. Cell-surface-expressed T-cell antigen-receptor zeta chain is associated with the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) **92**:4768–72. doi:10.1073/pnas.92.11.4768
139. Ilani T, Vasiliver-Shamis G, Vardhana S, Bretscher A, Dustin ML. T cell antigen receptor signaling and immunological synapse stability require myosin IIA. *Nat Immunol* (2009) **10**:531–9. doi:10.1038/ni.1723
140. Lillemeier BF, Pfeiffer JR, Surviladze Z, Wilson BS, Davis MM. Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) **103**:18992–7. doi:10.1073/pnas.060909103
141. Nguyen K, Sylvain NR, Bunnell SC. T cell costimulation via the integrin VLA-4 inhibits the actin-dependent centralization of signaling microclusters containing the adaptor SLP-76. *Immunity* (2008) **28**:810–21. doi:10.1016/j.immuni.2008.04.019
142. Varma R, Campi G, Yokosuka T, Saito T, Dustin ML. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central

- supramolecular activation cluster. *Immunity* (2006) 25:117–27. doi:10.1016/j.immuni.2006.04.010
143. Dustin ML, Springer TA. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* (1989) 341:619–24. doi:10.1038/341619a0
  144. Yabdanov E, Gondarenko S, Kumari S, Liapis A, Dustin ML, Sheetz MP, et al. Micropatterning of TCR and LFA-1 ligands reveals complementary effects on cytoskeleton mechanics in T cells. *Integr Biol (Camb)* (2015) 7(10):1272–84. doi:10.1039/c5ib00032g
  145. Negulescu PA, Krasieva TB, Khan A, Kerschbaum HH, Cahalan MD. Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity* (1996) 4:421–30. doi:10.1016/S1074-7613(00)80409-4
  146. Donnadieu E, Bismuth G, Trautmann A. Antigen recognition by helper T cells elicits a sequence of distinct changes of their shape and intracellular calcium. *Curr Biol* (1994) 4:584–95. doi:10.1016/S0960-9822(00)0130-5
  147. Jacobelli J, Chmura SA, Buxton DB, Davis MM, Krummel MF. A single class II myosin modulates T cell motility and stopping, but not synapse formation. *Nat Immunol* (2004) 5:531–8. doi:10.1038/ni1065
  148. Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* (1998) 395:82–6. doi:10.1038/25764
  149. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* (1999) 285:221–7. doi:10.1126/science.285.5425.221
  150. Azar GA, Lemaitre F, Robey EA, Bousoo P. Subcellular dynamics of T cell immunological synapses and kinapses in lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107:3675–80. doi:10.1073/pnas.0905901107
  151. Dustin ML. Cell adhesion molecules and actin cytoskeleton at immune synapses and kinapses. *Curr Opin Cell Biol* (2007) 19:529–33. doi:10.1016/j.ccb.2007.08.003
  152. Beemiller P, Jacobelli J, Krummel MF. Integration of the movement of signaling microclusters with cellular motility in immunological synapses. *Nat Immunol* (2012) 13:787–95. doi:10.1038/ni.2364
  153. Moreau HD, Lemaitre F, Garrod KR, Garcia Z, Lennon-Dumenil AM, Bousoo P. Signal strength regulates antigen-mediated T-cell deceleration by distinct mechanisms to promote local exploration or arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2015) 112:12151–6. doi:10.1073/pnas.1506654112
  154. Dupré L, Aiuti A, Trifari S, Martino S, Saracco P, Bordignon C, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity* (2002) 17:157–66. doi:10.1016/S1074-7613(02)00360-6
  155. Feigelson SW, Grabovsky V, Manevich-Mendelson E, Pasvolosky R, Shulman Z, Shinder V, et al. Kindlin-3 is required for the stabilization of TCR-stimulated LFA-1-ICAM-1 bonds critical for lymphocyte arrest and spreading on dendritic cells. *Blood* (2011) 117:7042–52. doi:10.1182/blood-2010-12-322859
  156. Viola A, Contento RL, Molon B. T cells and their partners: the chemokine dating agency. *Trends Immunol* (2006) 27:421–7. doi:10.1016/j.it.2006.07.004
  157. Bromley SK, Peterson DA, Gunn MD, Dustin ML. Cutting edge: hierarchy of chemokine receptor and TCR signals regulating T cell migration and proliferation. *J Immunol* (2000) 165:15–9. doi:10.4049/jimmunol.165.1.15
  158. Schneider H, Downey J, Smith A, Zinselmeyer BH, Rush C, Brewer JM, et al. Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science* (2006) 313:1972–5. doi:10.1126/science.1131078
  159. Ruocco MG, Pilones KA, Kawashima N, Cammer M, Huang J, Babb JS, et al. Suppressing T cell motility induced by anti-CTLA-4 monotherapy improves antitumor effects. *J Clin Invest* (2012) 122:3718–30. doi:10.1172/JCI61931
  160. Pentcheva-Hoang T, Simpson TR, Montalvo-Ortiz W, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade enhances antitumor immunity by stimulating melanoma-specific T-cell motility. *Cancer Immunol Res* (2014) 2:970–80. doi:10.1158/2326-6066.CCR-14-0104
  161. File BT, Paulsen KE, Fagar TN, Obu T, Wu J, Tang Q, et al. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat Immunol* (2009) 10:1185–92. doi:10.1038/ni.1790
  162. Wei SH, Parker I, Miller MJ, Cahalan MD. A stochastic view of lymphocyte motility and trafficking within the lymph node. *Immunol Rev* (2003) 195:136–59. doi:10.1034/j.1600-065X.2003.00076.x
  163. Gerard A, Khan O, Beemiller P, Oswald E, Hu J, Matloubian M, et al. Secondary T cell-T cell synaptic interactions drive the differentiation of protective CD8+ T cells. *Nat Immunol* (2013) 14:356–63. doi:10.1038/ni.2547
  164. Bezanilla M, Gladfelter AS, Kovar DR, Lee WL. Cytoskeletal dynamics: a view from the membrane. *J Cell Biol* (2015) 209:329–37. doi:10.1083/jcb.201502062
  165. Rougerie P, Delon J. Rho GTPases: masters of T lymphocyte migration and activation. *Immunol Lett* (2012) 142:1–13. doi:10.1016/j.imlet.2011.12.003
  166. Boulter E, Estrach S, Garcia-Mata R, Feral CC. Off the beaten paths: alternative and crosstalk regulation of Rho GTPases. *FASEB J* (2012) 26:469–79. doi:10.1096/fj.11-192252
  167. Aspenstrom P. Roles of F-BAR/PCH proteins in the regulation of membrane dynamics and actin reorganization. *Int Rev Cell Mol Biol* (2009) 272:1–31. doi:10.1016/S1937-6448(08)01601-8
  168. Parameswaran N, Gupta N. Re-defining ERM function in lymphocyte activation and migration. *Immunol Rev* (2013) 256:63–79. doi:10.1111/imr.12104
  169. Cant SH, Pitcher JA. G protein-coupled receptor Kinase 2-mediated phosphorylation of ezrin is required for G protein-coupled receptor-dependent reorganization of the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* (2005) 16:3088–99. doi:10.1091/mbc.E04-10-0877
  170. Matsui T, Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, Kaibuchi K, et al. Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol* (1998) 140:647–57. doi:10.1083/jcb.140.3.647
  171. Brown MJ, Nijhara R, Hallam JA, Gignac M, Yamada KM, Erlandsen SL, et al. Chemokine stimulation of human peripheral blood T lymphocytes induces rapid dephosphorylation of ERM proteins, which facilitates loss of microvilli and polarization. *Blood* (2003) 102:3890–9. doi:10.1182/blood-2002-12-3807
  172. Lee J-H, Katakai T, Hara T, Gonda H, Sugai M, Shimizu A. Roles of p-ERM and Rho-ROCK signaling in lymphocyte polarity and uropod formation. *J Cell Biol* (2004) 167:327–37. doi:10.1083/jcb.200403091
  173. del Pozo MA, Vicente-Manzanares M, Tejedor R, Serrador JM, Sanchez-Madrid F. Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *Eur J Immunol* (1999) 29:3609–20. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199911)29:113.0.CO;2-S
  174. D'Este E, Kamin D, Gottfert F, El-Hady A, Hell SW. STED nanoscopy reveals the ubiquity of subcortical cytoskeleton periodicity in living neurons. *Cell Rep* (2015) 10:1246–51. doi:10.1016/j.celrep.2015.02.007
  175. Driscoll MK, McCann C, Kopace R, Homan T, Fourkas JT, Parent C, et al. Cell shape dynamics: from waves to migration. *PLoS Comput Biol* (2012) 8:e1002392. doi:10.1371/journal.pcbi.1002392
  176. Barnhart EL, Lee KC, Keren K, Mogilner A, Theriot JA. An adhesion-dependent switch between mechanisms that determine motile cell shape. *PLoS Biol* (2011) 9:e1001059. doi:10.1371/journal.pbio.1001059
  177. Bashour KT, Gondarenko A, Chen H, Shen K, Liu X, Huse M, et al. CD28 and CD3 have complementary roles in T-cell traction forces. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111:2241–6. doi:10.1073/pnas.1315606111

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Dupré, Houmadi, Tang and Rey-Barrosa. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## **Annexe n°2 : Article**

### La déficience de la protéine WIP affecte sévèrement **l'architecture des lymphocytes humains lors de la migration et de l'assemblage de la synapse**

#### Résumé

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à la protéine interagissant avec la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) appelée (WIP). WIP est une protéine régulatrice clé de la dynamique de l'actine. Chez l'homme, les conséquences moléculaires de la déficience en WIP ont été étudiées chez un seul patient à ce jour, révélant une immunodéficience liée aux défauts de la motilité lymphocytaire et de l'activité cytotoxique des cellules NK. En étudiant en profondeur un nouveau patient déficient en WIP, nous avons cherché à explorer quelles altérations du cytosquelette d'actine sont à la base du dysfonctionnement des lymphocytes.

Ce patient porte une mutation homozygote WIPF1 qui entraîne une perte de WIP et de l'expression de la protéine WASP. Son mauvais état clinique, incluant une diarrhée sanglante et une infection systémique menaçante par le CMV, empêchait la transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques conditionnées. A la place, des transplantations séquentielles ont été réalisées avec les lymphocytes périphériques et les cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> de la mère HLA identique et ont donné lieu à une greffe de cellules T soutenue.

Par l'utilisation d'approches de microscopie à résolution temporelle et de super résolution nous avons étudié la dynamique et l'architecture du cytosquelette de l'actine lors du chimiotactisme et de l'assemblage de la synapse lytique. En effet lors du chimiotactisme, la protéine WIP se localise au niveau du lamellipode riche en actine et stabilise cette structure pour permettre le maintien de la direction, le long d'un gradient de chimiokine. Les cellules T CD8<sup>+</sup> déficientes

en WIP ont montré une activité cytotoxique fortement réduite, associée à un assemblage anormal de la synapse immunologique, caractérisé par un étalement non radial des cellules et des fibres d'actine longues. En conséquence, la protéine WIP se distribue en clusters qui ornent le maillage de l'actine à la périphérie de la synapse.

Enfin, l'état clinique sévère du patient déficient en WIP et les défauts des lymphocytes associés indiquent que WIP est une protéine essentielle de l'immunité humaine. En particulier, WIP contrôle l'ultrastructure et la dynamique du maillage de l'actine nécessaires pour assembler les protrusions lamellipodiales dans le contexte du chimiotactisme des lymphocytes et de la formation des synapses lytiques.

Dans cet article j'ai contribué à la réalisation des expériences d'approches de microscopie SIM dans la génération et l'analyse des données de la figure 7.

1 **WIP deficiency severely affects human lymphocyte**  
2 **architecture during migration and synapse assembly**

3  
4 Laurène Pfajfer, MSc,<sup>1,2,3,4\*</sup> Markus G. Seidel, MD,<sup>5\*</sup> Raïssa Houmadi, MSc,<sup>3,4</sup>  
5 Javier Rey-Barroso, PhD,<sup>3,4</sup> Tatjana Hirschmugl, MSc,<sup>1,2</sup> Elisabeth Salzer, MD PhD,<sup>1,2</sup>  
6 Inés María Antón, PhD,<sup>6,7</sup> Christian Urban, MD,<sup>5</sup> Wolfgang Schwinger, MD,<sup>5</sup>  
7 Loïc Dupré, PhD,<sup>1,2,3,4,#</sup> and Kaan Boztug, MD,<sup>1,2,8,9,#</sup>

8  
9 <sup>1</sup> Ludwig Boltzmann Institute for Rare and Undiagnosed Diseases, Vienna, Austria; <sup>2</sup> CeMM Research  
10 Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria; <sup>3</sup> INSERM,  
11 UMR1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France; <sup>4</sup> Université Toulouse III  
12 Paul-Sabatier, Toulouse, France; <sup>5</sup> Division of Pediatric Hematology-Oncology, Department of Pediatrics  
13 and Adolescent Medicine, Research Unit for Pediatric Hematology and Immunology, Medical University  
14 Graz, Austria; <sup>6</sup> Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Darwin 3, 28049 Madrid, Spain; <sup>7</sup> Centro  
15 de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), 28031 Madrid,  
16 Spain; <sup>8</sup> Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Medical University of Vienna, Vienna,  
17 Austria; <sup>9</sup> St. Anna Kinderspital and Children's Cancer Research Institute, Department of Pediatrics,  
18 Medical University of Vienna, Vienna, Austria

19  
20 \* These authors contributed equally to this work

21  
22 # These authors contributed equally to this work

23  
24 Correspondence:

25 Kaan Boztug, MD, Ludwig Boltzmann Institute for Rare and Undiagnosed Diseases, Lazarettgasse 14  
26 AKH BT 25.3, A-1090 Vienna, Austria. E-mail : [kaan.boztug@rud.lbg.ac.at](mailto:kaan.boztug@rud.lbg.ac.at) or Loïc Dupré, PhD, INSERM  
27 UMR1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, CHU Purpan, 1, place du Dr Baylac, 31300  
28 Toulouse, France. E-mail : [loic.dupre@inserm.fr](mailto:loic.dupre@inserm.fr)

29  
30 Word counts for text and abstract: Text, 3929 words ; Abstract, 247 words

31 Figure/table count: 7 figures (7 color figures) ; 1 table

32 Reference count: 46 references

33  
34 Scientific category: Immunobiology

**35 Key points**

- 36 ● We show for the first time that WIP controls actin cytoskeleton meshwork organization in  
37 the context of CD8<sup>+</sup> T cell-mediated cytotoxicity.
- 38 ● We report elimination of CMV and engraftment using sequential HLA-identical donor  
39 lymphocytes in a WIP-deficient life-threatened infant.

**40 Abstract**

41 The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-interacting protein (WIP) is a key regulator of  
42 actin dynamics. In humans, the molecular consequences of WIP deficiency have been  
43 investigated in a single patient to date, revealing immunodeficiency linked to defects in  
44 lymphocyte motility and NK-cell cytotoxic activity. By studying in-depth a novel WIP-deficient  
45 patient, we sought to explore which actin cytoskeleton alterations underlie lymphocyte  
46 dysfunction. The patient carried a novel *WIPF1* homozygous stopgain mutation leading to loss of  
47 WIP and WASP protein expression. His poor clinical condition including bloody diarrhea and  
48 life-threatening systemic CMV infection precluded conditioned allogeneic hematopoietic stem  
49 cell transplantation. Instead, peripheral lymphocytes and CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells from  
50 the HLA-identical mother were infused sequentially, yielding sustained T-cell engraftment. We  
51 here applied time-lapse and super-resolution microscopy approaches to study actin cytoskeleton  
52 dynamics and architecture during chemotaxis and lytic synapse assembly. In agreement with its  
53 role in chemotaxis, WIP localized to the actin-rich lamellipodium and stabilized this structure to  
54 allow directional persistence along a chemokine gradient. WIP-deficient CD8<sup>+</sup> T cells displayed  
55 severely reduced cytotoxic activity associated with abnormal immunological synapse assembly,  
56 characterized by non-radial cell spreading and long actin fibers. Accordingly, WIP distributed in  
57 clusters decorating the actin meshwork at the synapse periphery. The severe clinical course of the  
58 WIP-deficient patient and the associated lymphocyte defects point to WIP as an essential protein  
59 of human immunity. In particular, WIP controls actin meshwork ultrastructure and dynamics  
60 required to assemble lamellipodial protrusions in the context of lymphocyte chemotaxis and lytic  
61 synapse formation.

62

**63 Key words**

64 Lymphocytes, Chemotaxis, Cytotoxic activity, Wiskott-Aldrich Syndrome Protein-Interacting  
65 Protein, Actin meshwork organization.

66

**67 Abbreviations**

68 Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP); WASP-interacting protein (WIP); Primary  
69 immunodeficiency (PID); Next-generation sequencing (NGS).

70

**71 Introduction**

72 The actin cytoskeleton is a key structural component of cells, defining their shape and providing  
73 support for numerous dynamic processes<sup>1</sup>. Immune cells are particularly dependent on a finely  
74 tuned actin cytoskeleton because they are among the most motile cells of the organism and their  
75 function depends critically on their ability to establish highly dynamic cell-to-cell contacts. The  
76 key role of actin cytoskeleton dynamics in supporting immune cell function has been illustrated  
77 by the discovery of a number of primary immunodeficiencies (PIDs) caused by deficiency or  
78 molecular alteration of actin cytoskeleton remodeling proteins<sup>2</sup>, including WASP, WIP, RAC2,  
79 CD2BP1, DOCK2, DOCK8, RHOH, CORONIN-1A, MST1, MKL1, WDR1, MOESIN and  
80 RASGRP1<sup>3-18</sup>. Studies of these natural human mutations have pinpointed the critical importance  
81 of dynamic rearrangement of the actin cytoskeleton for numerous immune related functions, such  
82 as adhesion, podosome formation, migration, endocytosis, cytokine release, signaling,  
83 proliferation, immunological synapse formation or cytotoxic capacity<sup>4</sup>.

84 The Wiskott-Aldrich syndrome caused by WASP deficiency has been the prototype of an actin  
85 cytoskeleton defect. WASP expression is restricted to immune cells, in which it regulates Arp2/3-  
86 dependent actin branching, thereby controlling numerous dynamical aspects of immune cell  
87 biology<sup>19</sup>. A more recently identified PID-related actin regulator is the WASP-interacting protein  
88 (WIP)<sup>11,20</sup>. Biochemical studies carried on the first described patient revealed that a stop gain  
89 mutation in the *WIPF1* gene was leading not only to lack of WIP, but concomitantly also absence  
90 of WASP<sup>11</sup>. The WIP-deficient patient displayed lymphopenia and severe defects in T-cell  
91 proliferation, T-cell chemotaxis and NK-mediated cytotoxicity<sup>11</sup>. The loss of WASP expression  
92 in the context of WIP deficiency can be explained by the fact that WIP protects WASP from  
93 ubiquitination and its degradation by the proteasome and calpain<sup>21,22</sup>. However, there is growing

94 evidence that the function of WIP is not limited to protecting WASP from degradation; WIP  
95 indeed interacts with additional actin-related proteins such as cortactin, Nck and profilin<sup>123</sup>.  
96 Murine studies point to WIP as a master regulator of immune cell migration and cell-cell  
97 interactions since WIP-deficient dendritic cells fail to polarize actin, to form podosomes and to  
98 migrate<sup>22</sup>. *Wip*<sup>-/-</sup> mice display a T-cell homing defect due to a lack of response to CXCL12<sup>24</sup> and  
99 *Wip*<sup>-/-</sup> B cells fail to polarize and migrate along a CCL13 gradient<sup>25</sup>. Accordingly, murine T cells  
100 expressing a WIP mutant deleted for the actin-binding domain fail to polarize actin and to  
101 migrate in response to chemokines<sup>26</sup>. Furthermore, by regulating the subcortical actin filament  
102 network in T lymphocytes, WIP appears essential for immunological synapse formation<sup>27</sup>. In  
103 addition to those studies, exploration of actin dynamics and ultrastructure in human WIP-  
104 deficient leukocytes would provide insight into the patho-mechanisms associated to WIP  
105 deficiency.

106 Employing an NGS-based panel sequencing strategy reported previously<sup>28</sup>, we identify here a  
107 novel patient carrying a stop gain *WIPF1* mutation leading to the loss of WIP and WASP  
108 expression. Applying time-lapse and super-resolution microscopy approaches to WIP-deficient  
109 lymphocytes, we further characterize defects in actin dynamics and ultrastructure in the context  
110 of chemotaxis and cytotoxic activity. This study highlights the severity of WIP deficiency in  
111 humans and shows that WIP is a key regulator of actin meshwork ultrastructure and dynamics, in  
112 particular in the context of lymphocyte directional motility and immunological assembly.

113 **Methods**

114 A detailed description of the methods is available in the supplemental method section (available  
115 on the *Blood* Web site)

116

## 117 **Results**

### 118 **Clinical characteristics and management of the patient**

119 We report on a now 2-year-old Austrian patient from a Kurdish consanguineous family, who  
120 became symptomatic in his first month of life with bronchiolitis and viral pneumonia. His  
121 condition deteriorated at 3 months of age with pneumonitis, requiring admission to the intensive  
122 care unit (ICU) and mechanical ventilation. At that time, CMV was detected in all body fluids  
123 including plasma, urine and cerebrospinal fluid. Moderate intermittent thrombocytopenia (100-  
124 150 G/L) with a mean platelet volume of 8.0 fl was initially measured. Intermittent episodes of  
125 bloody diarrhea were noted, sometimes requiring platelet and red blood cell transfusions,  
126 suggesting inflammatory bowel disease or recurrent intussusceptions. The patient needed long-  
127 term invasive mechanical and non-invasive CPAP ventilation (25 and 94 days, respectively), and  
128 showed delayed psychomotor development despite absent signs of encephalitis in MRI or EEG.  
129 Hearing and neurological tests were normal. First immunological analyses at 4 months of age  
130 showed hypergammaglobulinemia, normal T- and B-cell numbers, increased relative proportion  
131 of TCR $\gamma\delta^+$  T cells (>50% of CD3 $^+$  T cells), low TRECs and borderline normal values for T-cell  
132 proliferation *in vitro* (**Table 1**). A follow-up immunological investigation showed markedly  
133 reduced CD4 $^+$  T cells, naïve T cells, and a decreased proliferative response towards PHA and  
134 ConA, but normal response towards CD3/CD28 (**Table 1**). Because his clinical situation was  
135 deemed too bad for a fully conditioned allogeneic hematopoietic stem cell transplantation  
136 (alloHSCT), sequential donor lymphocyte infusions with HLA-identical maternal blood were  
137 performed from his 10<sup>th</sup> month of life onwards, accompanied by sirolimus treatment during the  
138 first month (**Fig 1A**). A total of four donor lymphocyte infusions at increasing doses (from  
139  $1 \times 10^6$ /kg to max  $1 \times 10^7$ /kg CD3 $^+$  cells) and two peripheral stem cell donations ( $2 \times 10^7$ /kg CD34 $^+$

140 plus  $2 \times 10^7$ /kg CD3<sup>+</sup> cells) were given until his 13<sup>th</sup> month of life, leading to elimination of CMV  
141 from peripheral blood (from  $>10^4$ /mL to permanently negative tests), complete clinical  
142 stabilization regarding infections, and sustained T-cell engraftment of >60-70% donor chimerism  
143 (**Fig 1A**) until the latest follow-up at two years of age. We did not detect myeloid engraftment in  
144 peripheral blood (allogeneic CD33<sup>+</sup> cells: 0.7-3.9%). Shortly before the scheduled dismissal  
145 from ICU at 11 months of age, he developed volvulus and subtotal intestinal necrosis, making  
146 bowel resection necessary. From then on, although already weaned, he has been requiring total  
147 parenteral nutrition due to short bowel syndrome. Because of the development of severe  
148 thrombocytopenia, the patient has been requiring platelet support by thrombopoietin receptor  
149 agonist treatment and sporadic platelet infusions.

150

#### 151 ***WIPF1* gene mutation resulting in defective WIP and WASP expression**

152 Given the consanguineous background of the patient (**Fig. 1B**), we suspected a primary combined  
153 immunodeficiency and applied a NGS panel covering >250 known genes related to PID<sup>28,30</sup>. The  
154 patient carried a homozygous c343G>A point mutation in the *WIPF1* gene encoding WIP (**Fig**  
155 **1C**), resulting in a premature stop gain (c.G373A, p.R125X). When considering the structure of  
156 WIP, the mutation is located upstream of the cortactin binding domain (**Fig 1D**). To investigate  
157 the consequence of the validated mutation at the protein level, WIP expression was analyzed by  
158 Western blot in B-EBV cells from the patient. We did not detect expression of full-length WIP  
159 (**Fig 1E**) and also did not detect a shorter protein either, using an antibody recognizing the first  
160 ten amino acids of WIP (data not shown). In line with the role for WIP in stabilizing WASP  
161 expression<sup>22</sup>, we failed to detect WASP in the WIP-deficient B-EBV cells (**Fig 1E**). Together  
162 these data show that the identified *WIPF1* mutation is associated to a complete loss of both WIP

163 and WASP expression, which establishes this genetic alteration as the molecular disease etiology  
164 in this patient.

165

166 **Severe differentiation and activation abnormalities in lymphocyte subsets**

167 The consequence of WIP deficiency on lymphocyte differentiation in humans remains unclear.

168 The previously described patient displayed T-cell lymphopenia mainly affecting the CD8<sup>+</sup> T-cell

169 subset<sup>11</sup>, while *Wip*<sup>-/-</sup> mice harbored a modest reduction of thymocytes but normal total

170 lymphocyte counts in the periphery<sup>27</sup> at early age. Beyond 8 weeks of age, *Wip*<sup>-/-</sup> mice displayed

171 granulocytosis and severe lymphopenia<sup>33</sup>. In addition to the routine clinical phenotyping reported

172 in **Table 1**, we performed in-depth immunophenotyping of patient PBMCs focusing on the

173 differentiation status of lymphocyte populations. The patient had profound CD4<sup>+</sup> T-cell

174 lymphopenia (**Fig 2A**) and the few CD4<sup>+</sup> T cells were skewed towards an effector memory

175 phenotype (CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>-</sup>) (**Fig 2B**). CD8<sup>+</sup> T cells exhibited an exhausted effector memory

176 phenotype (CCR7<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>) (**Fig 2B**). PBMCs were devoid of naïve CD8<sup>+</sup> T cells, which

177 might result from reduced thymic activity. In agreement, the proportion of recent thymic

178 emigrant cells (CD31<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>) among the peripheral CD4<sup>+</sup> T cells was decreased (**Fig 2C**).

179 Low TREC numbers and thymus involution further corroborate the hypothesis of a defective

180 thymic development. Although CD19<sup>+</sup> B cells were detected in normal proportion (**Fig 2D**), the

181 non-switch memory B cells were reduced when compared to the control sample (**Fig 2E**). In sum,

182 the lymphocyte subsets of the patient display very severe differentiation and activation

183 abnormalities characterized by CD4<sup>+</sup> T-cell lymphopenia, lack of naïve CD8<sup>+</sup> T cells, and a high

184 proportion of activated B cells.

185

186

**187 Defective chemokine-driven actin polarization and migration in WIP-deficient T cells**

188 PHA blasts from the previously described WIP-deficient patient had illustrated impaired  
189 migration towards the chemokine CXCL10, related to decreased CXCR3 expression<sup>11</sup>. We sought  
190 to address whether WIP operates as an intrinsic regulator of chemotaxis in human T cells and B  
191 cells via its actin cytoskeleton remodeling function. Remarkably, the T cells expanded from the  
192 patient failed to migrate towards CCL19, whatever the concentration used (**Fig 3A**). This  
193 profound defect was associated to reduced CCR7 expression. These T cells displayed a severe  
194 migration defect towards CXCL12 (**Fig 3B**), while CXCR4 was expressed at almost normal  
195 levels, indicating that WIP intrinsically controls the chemotactic activity of T cells. We then  
196 explored whether impaired chemotaxis of the WIP-deficient T cells would be associated with  
197 defects in cell morphology and actin polarization. Non-stimulated healthy T cells displayed WIP  
198 and actin mostly at the membrane (**Fig 3C first row**). Upon CCL19 stimulation, they acquired an  
199 elongated polarized morphology characterized by a large leading edge and a narrow trailing edge  
200 (**Fig 3C third row**). WIP and F-actin colocalized at the cell cortex of non-activated healthy T  
201 cells and at the leading edge of CCL19-stimulated cells (**Fig 3D**). WIP-deficient T cells appeared  
202 larger than healthy T cells (**Suppl Fig 1**). In addition, they displayed reduced cortical actin but  
203 abnormal F-actin enrichment in the cytoplasm (**Fig 3D**). Upon chemokine stimulation, the patient  
204 T cells elongated and still appeared larger than the control T cells (**Fig 3D**). However, they failed  
205 to assemble actin-rich leading edges (**Fig 3C-D fourth row**). Therefore, in the absence of WIP, T  
206 cells are enlarged and fail to acquire a polarized shape and to polymerize actin at the leading edge  
207 in response to CCL19. This role of WIP is supported by its enrichment to the leading edge  
208 following chemokine-evoked polarization.  
209

**210 WIP controls B lymphocyte orientation and directional persistence along a CCL19 gradient**

211 To further investigate the intrinsic role of WIP in lymphocyte chemotaxis, its expression was  
212 knocked down with a shRNA-encoding lentiviral vector in the human B cell JY. This approach  
213 was highly efficient at inhibiting both WIP and WASP expression (**Fig 4A**). We also stably  
214 introduced a mCherry-tagged WIP construct in the B-EBV line derived from the patient (**Fig**  
215 **4A**). These cellular models were applied to dedicated migration chambers to record real-time cell  
216 migration<sup>34</sup>. In the absence of CCL19, the wildtype JY cells displayed limited motility, while  
217 they migrated along a CCL19 gradient in a very directional manner (**Fig 4B and Movie 1**). In  
218 contrast, the cells knocked-down for WIP failed to migrate towards the CCL19 source. In  
219 agreement, the WIP-deficient cells derived from the patient also failed to migrate towards  
220 CCL19. Clearly, restoration of WIP expression conferred to those cells the ability to migrate  
221 directionally (**Fig 4B**). The velocity of the B cells inhibited for WIP expression or naturally  
222 deficient for WIP was reduced as compared to wildtype cells or patient cells with restored WIP  
223 expression (**Fig 4C**). This indicates that WIP sets the speed of migrating B cells. Furthermore, the  
224 ability of the WIP-deficient B cells to preferentially migrate along the chemokine gradient was  
225 fully abrogated, as well as their ability to maintain a migratory direction as indicated by  
226 respectively the forward migration index and the directional persistence parameters (**Fig 4C**).  
227 Together, the data from the complementary models unequivocally identifies WIP as a central  
228 regulator of B-cell motility and orientation in chemokine gradients. To then further explore how  
229 WIP might control actin cytoskeleton dynamics in the context of lymphocyte chemotaxis, the  
230 wildtype and *WIP* knocked-down JY cells were transduced with a LifeAct-GFP encoding  
231 lentiviral vector. The wildtype JY cells expressed LifeAct-GFP at the level of the cell cortex and  
232 in thin dynamical protrusions including filopodia and pseudopodia (**Fig 4D**). Upon exposure to a  
233 CCL19 gradient, the wildtype JY cells polarized, forming a trailing uropod and a wide edge

234 facing the chemokine source (**Fig 4D** and **Movie 2**). In comparison, the *WIP* knocked-down JY  
235 cells exposed to the CCL19 gradient failed to display a persistent polarized morphology. The  
236 uropod could not be clearly identified and the cell emitted large filopodia and pseudopodia in  
237 various directions. Those observations highlight the requirement for WIP in sustaining a  
238 persistent actin-dependent lymphocyte polarity, which is required for chemokine-evoked  
239 directional motility.

240

#### 241 **Cytotoxic activity defect in WIP-deficient CD8<sup>+</sup> T lymphocytes**

242 Although a role of WIP in controlling the cytotoxic activity of NK cells has been established<sup>11,35</sup>,  
243 its contribution to CD8<sup>+</sup> T-cell-mediated cytotoxicity is unknown. Expanded patient CD8<sup>+</sup> T cells  
244 expressed perforin (**Fig 5A**), suggesting that they had developed into effector cytotoxic T  
245 lymphocytes (CTL). However, upon interaction with OKT3-coated P815, WIP-deficient CTL  
246 displayed reduced surface exposure of LAMP1, indicative of reduced lytic granule exocytosis  
247 (**Fig 5B**). To test whether this affected killing efficacy, we applied a cytometry-based redirected  
248 killing assay<sup>36</sup> using GFP-expressing P815 cells coated with anti-CD3-antibody as targets. Low  
249 CTL to target cell ratios were used to mimic physiological conditions and to investigate both  
250 early killing activity and sustained killing activity. Analysis of the number of residual viable  
251 target cells following interaction with CD8<sup>+</sup> T cells revealed a defective early killing activity in  
252 the WIP patient-derived CTL at all anti-CD3 antibody concentrations tested (**Fig 5C**). Prolonged  
253 interaction of patient CTL with target cells led to a limited reduction in the number of target cells,  
254 while control CTL fully eliminated the target cells under the same conditions. Those data clearly  
255 indicate that WIP-deficient CD8<sup>+</sup> T cells have a reduced capacity to secrete lytic granules and  
256 eliminate target cells.

257

258 **WIP-deficient CD8<sup>+</sup> T lymphocytes fail to assemble the immunological synapse**

259 The reduced cytotoxic activity of WIP-deficient CTL might result from a reduced ability to  
260 assemble the immunological synapse, a structure that highly depends on actin cytoskeleton  
261 dynamics. Confocal microscopy analysis showed that interaction with anti-CD3 antibody-coated  
262 target cells led to the assembly of an immunological synapse characterized by a flattened contact  
263 area highly enriched in polymerized actin (**Fig 6A**). WIP accumulated at the immunological  
264 synapse where it colocalized with F-actin. The capacity of control CTL to assemble an  
265 immunological synapse was further revealed by their ability to form conjugates with anti-CD3  
266 antibody-coated target cells (**Fig 6B**) and by the synapse length (**Fig 6C**). In contrast, WIP  
267 deficient CTL displayed aberrantly elongated shapes and actin-rich protrusions, both when  
268 encountering uncoated and anti-CD3 antibody-coated P815 cells (**Fig 6A**). In addition to their  
269 abnormal morphology, WIP-deficient CTL failed to display F-actin enrichment at the target cell  
270 contact area and inefficiently formed conjugates with the anti-CD3 antibody-coated P815 cells  
271 (**Fig 6B**). In agreement with their aberrant morphology, these cells formed contacts of  
272 heterogeneous length that did not increase in the presence of anti-CD3 antibody (**Fig 6C**). An  
273 abnormal morphology of WIP-deficient CTL was also observed in isolated cells interacting with  
274 poly-L-lysine or anti-CD3 antibody (**Suppl Fig 1**), confirming an intrinsic morphological defect  
275 in those cells. Together, these data strongly suggest that the severely reduced cytolytic potential  
276 of patient-derived CD8<sup>+</sup> T cells stems from the inability to assemble the immunological synapse  
277 in the absence of WIP. This notion is reinforced by the localization of WIP at this structure in the  
278 control CD8<sup>+</sup> T cells.

279

280

281

282 **WIP localizes along actin filaments and promotes assembly of a branched actin meshwork**  
283 Our findings highlight the key role played by WIP in sustaining lymphocyte actin-dependent  
284 shape integrity and remodeling required for directional motility and establishment of the  
285 immunological synapse upon target cell encounter. To explore how WIP might control actin  
286 cytoskeleton meshwork organization, we employed a structured illumination microscopy (SIM)  
287 approach. In control T cells, immunological synapse formation over ICAM-1/anti-CD3 antibody  
288 involved a wide radial spreading. The synapse periphery was composed of a ring of F-actin,  
289 consisting in a dense meshwork of short actin fibers oriented in various directions (**Fig 7A**). This  
290 is in line with the notion that the peripheral layer of the immunological synapse corresponds to a  
291 radial lamellipodial structure<sup>37</sup>. As expected, the central layers of the immunological synapse  
292 displayed an actin meshwork of reduced density. Furthermore, the animation showing the 3D  
293 organization of the cell clearly shows that a spherical cell body was maintained over the center of  
294 the flat synapse structure (**Movie 3**). In this context, WIP formed tiny patches at the synapse  
295 periphery and along the cell body cortex. The overlay of F-actin and WIP showed that WIP was  
296 distributed over cell areas of dense F-actin. In comparison, the T cells from the WIP-deficient  
297 patient displayed aberrant morphologies. Over poly-L-lysine, those cells abnormally spread as  
298 measured above by confocal microscopy. This spreading was accompanied by actin-rich  
299 pseudopodia and filopodia, which were not spontaneously assembled by normal cells. Over  
300 ICAM-1/anti-CD3 antibody, WIP-deficient T cells displayed an elongated morphology with  
301 irregular shapes, as observed above in the context of target-cell encounter. In zoomed areas of  
302 normal T cells, WIP was distributed as tiny patches that intermingled with actin filaments (**Fig**  
303 **7B**). This peculiar interaction of WIP with the actin meshwork applied both to the cortex of  
304 resting T cells and to the synapse periphery of activated T cells. Zoomed areas of the T cells from  
305 the patient interacting with poly-L-lysine or ICAM-1/anti-CD3 antibody revealed an aberrant

306 actin organization dominated by elongated filamentous structures (**Fig 7B**). Actin coherency  
307 values calculated for 20 regions-of-interest per condition clearly showed that WIP-deficient T  
308 cells, both over poly-L-lysine and ICAM-1/anti-CD3 antibody, harbored more actin structures  
309 oriented in one main direction (**Fig 7B**). These data reveal that WIP controls the organization of a  
310 dense and reticulated actin meshwork ultrastructure, which contributes to the integrity of the cell  
311 cortex and sustains synaptic lamellipodia assembly.

**312 Discussion**

313 In this study, we identified a novel PID patient carrying a stop gain *WIPF1* mutation leading to  
314 the loss of WIP. By expanding untransformed T cells and EBV-transformed B cells from the  
315 patient, we could explore actin cytoskeleton anomalies at morphological and ultrastructural  
316 levels. Our data reveal that WIP deficiency is associated with a failure to assemble the  
317 lamellipodium at the leading edge of migrating T and B cells and with defective formation of the  
318 immunological synapse of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells. Accordingly, chemotactic and cytotoxic  
319 activities of the patient's lymphocytes were severely impaired.

320 Our study reinforces the fact that WIP deficiency causes a severe immunodeficiency in humans.

321 As in the previous report<sup>11</sup>, the patient carried a homozygous stopgain mutation leading to  
322 undetectable levels of both WIP and WASP. The common features between the two patients  
323 include: associated WASP deficiency, failure to thrive, recurrent bacterial and viral infections,  
324 elevated proportions of NK cells, defective lymphocyte migration and a poor clinical status  
325 necessitating hematopoietic cell transplantation before 1 year of age. However, the present case  
326 did not display eczematous rash, nor oral ulcerations as described in the previous case. He  
327 displayed elevated CD8<sup>+</sup> T-cell counts while the previous patient manifested a profound CD8<sup>+</sup> T-  
328 cell lymphopenia. Such differences may be due to environmental factors including exposure to  
329 micro-organisms.

330 In the first reported WIP-deficient patient, a chemotaxis defect in response to CXCL10 associated  
331 to a decreased CXCR3 expression was reported<sup>11</sup>. We report here impaired migration towards  
332 CCL19 and CXCL12 and further characterize the role of WIP in the actin cytoskeleton  
333 remodeling required for the onset of directional motility along chemokine gradients.  
334 Interestingly, chemotaxis assays performed under the same conditions with WASP-deficient

335 patients failed to reveal defects<sup>38</sup>. This suggests that WIP controls chemotaxis in T cells mostly in  
336 a WASP-independent manner. This is further supported by the finding that T cells from mice  
337 expressing a WIP mutant that lacks the capacity to bind actin without affecting WASP levels  
338 display decreased cellular F-actin content, a disorganized actin cytoskeleton, impaired  
339 chemotaxis and *in vivo* homing<sup>26</sup>. Together, these data suggest that WIP controls lymphocyte  
340 motility independently from its WASP stabilization function, possibly via its capacity to bind  
341 actin directly and to interact with Nck and Cortactin<sup>39</sup>. Our data clearly establish that WIP locates  
342 to the chemokine-evoked actin-rich leading edge and is required for lamellipodia assembly.

343 A defect of NK-cell cytotoxicity has been reported in the previously described WIP-deficient  
344 patient<sup>11</sup>. Our data strongly suggest that in CD8<sup>+</sup> CTL, WIP is primarily involved in cell cortex  
345 stability and formation of stable conjugates with target cells, which is a prerequisite for lytic  
346 activity. In a previous report, WIP has been described to regulate NK-cell cytotoxic function by  
347 controlling lytic granule transport<sup>35</sup>. Whether WIP plays distinct roles in NK cells and CTL  
348 would require further investigation. Electron microscopy of activated T and B lymphocytes from  
349 WIP deficient mice revealed sparse actin filaments at the cell cortex<sup>27</sup>. Accordingly, we observed  
350 that some areas of the WIP-deficient human T-cell cortex harbored a low-density actin  
351 meshwork. More strikingly, actin filaments assembled into elongated structures at the cell  
352 periphery. Interestingly, our super-resolution microscopy analysis reveals that WIP is present as  
353 tiny clusters that are wrapped around actin filaments, both at the cell cortex of non-activated T  
354 cells or at the lamellipodia of activated T cells. These patches probably correspond to multi-  
355 molecular complexes containing WASP and DOCK8. Indeed, clusters of tagged WIP and WASP  
356 have been observed by FRET at the synapse of Jurkat cells<sup>40</sup> and WIP has recently been shown to  
357 bridge DOCK8 to WASP and actin during T-cell activation<sup>41</sup>.

358 It is also important to consider that WIP is not only expressed in the hematopoietic system, which  
359 might have consequences in WIP-deficient patients. WIP has been shown to interact with N-  
360 WASP<sup>42,43</sup>, in particular in neurons<sup>44</sup>. In these cells, it contributes to the regulation of neuritic  
361 elaborations and ramifications by controlling the phosphorylation of several kinases. Mental  
362 retardation has been reported in patients with overlapping deletions in a common region (2q31.1)  
363 including only the *WIPF1* gene<sup>45</sup>, however the patient studied here has not yet exhibited  
364 neurological abnormalities. Given the poor clinical condition of the patient with bowel disease  
365 and long-term mechanical ventilation for systemic CMV infection with pneumonitis, he was  
366 deemed too severely affected to undergo a myeloablatively conditioned alloHSCT. Our attempt  
367 to stabilize his clinical situation by infusing his HLA-identical mother's peripheral lymphocytes  
368 was successful insofar as CMV was controlled and a stable mixed chimerism could be  
369 established, eradicating his immunodeficiency at least until the latest follow-up. Facing the  
370 genetic diagnosis of WIP deficiency and ongoing need of thrombopoietin receptor agonist  
371 treatment, the indication for a regular alloHSCT still persists. Although preliminary, the observed  
372 effect of donor lymphocyte infusion treatment as bridging option before alloHSCT might prove  
373 feasible, especially in patients with combined immunodeficiencies from consanguineous  
374 backgrounds deemed "too bad to transplant". Hence, our observations support the benefit of  
375 alloHSCT to correct WIP deficiency, as reported recently<sup>20</sup>. Although WIP might control  
376 lymphocyte motility independently of WASP, some key aspects of the immune deficiency in our  
377 WIP-deficient patient are most probably related to the associated WASP deficiency. An  
378 alternative treatment option for WIP patients would be to employ proteasome inhibitors such as  
379 Bortezomib, MG321, Carfilzomib or Ixazomib with the objective to rescue WASP expression.  
380 We were however not successful at stabilizing WASP expression in the T cells from the patient  
381 (Suppl **Fig 2**), although such approach restored slightly WASP expression in WIP<sup>-/-</sup> murine

382 cells<sup>21</sup>. Because of substantial clinical improvement upon donor lymphocyte infusions, the  
383 possibility to clinically apply proteasome inhibition (*i.e.* as compassionate use) was not further  
384 investigated. The success of gene therapy for WAS<sup>46</sup> suggests that such approach should be  
385 applicable to WIP deficiency as well.

**386 Acknowledgments**

387 We are grateful to Gareth Jones for the mCherry-WIP encoding lentiviral construct. We thank  
388 Marion Gröger and Sabine Rauscher from the imaging core facility of the Medical University of  
389 Vienna and to Andreas Spittler from the flow cytometry core facility of the Medical University of  
390 Vienna. We wish to thank Sophie Allart from the CPTP microscopy platform (Toulouse) and  
391 Frédérique Gaits-Iacovoni from the Cellular Imaging Facility Ranguelil-I2MC/TRI platform  
392 (Toulouse). We thank Stefan Kubicek who provided us Bortezomib, Carfilzomib, MG132 and  
393 Ixazomib. We are grateful to Delphine Guipouy, Cecilia Domínguez Conde, Rico Chandra Ardy  
394 and Raúl Jiménez Heredia for technical advices and discussion. MGS was supported in part by  
395 the Styrian Children's Cancer Aid Fund (Steirische Kinderkrebshilfe). This work was supported  
396 by the Vienna Science and Technology Fund (WWTF-LS16-060 to KB and LD), the  
397 MINECO/FEDER (SAF2015-70368-R to Inés M. Antón) and the French National Agency for  
398 Research (ANR-13-BSV1-0031 to LD).

399

**400 Authorship**

401 Contribution: L.P., M.G.S., L.D. and K.B. designed the study; L.P., M.G.S., R.H., T.H., E.S. and  
402 L.D. collected data; L.P., M.G.S., R.H., J.R.B., T.H., E.S., I.A., L.D. and K.B. analyzed and  
403 interpreted data; L.P. performed statistical analysis; C.U., W.S., and M.G.S. cared for the patient;  
404 L.P., L.D. and K.B. wrote the manuscript with input from M.G.S.. All authors approved the final  
405 version of the manuscript.

406 Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

407 **References**

- 408 1. Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J. Actin dynamics, architecture, and  
409 mechanics in cell motility. *Physiol. Rev.* 2014;94(1):235–263.
- 410 2. Moulding DA, Record J, Malinova D, Thrasher AJ. Actin cytoskeletal defects in  
411 immunodeficiency. *Immunol. Rev.* 2013;256(1):282–299.
- 412 3. Ambruso DR, Knall C, Abell AN, et al. Human neutrophil immunodeficiency syndrome is  
413 associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000;97(9):4654–4659.
- 414 4. Burns SO, Zazafov A, Thrasher AJ. Primary immunodeficiencies due to abnormalities of the  
415 actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Hematol.* 2017;24(1):16–22.
- 416 5. Crequer A, Troeger A, Patin E, et al. Human RHOH deficiency causes T cell defects and  
417 susceptibility to EV-HPV infections. *J. Clin. Invest.* 2012;122(9):3239.
- 418 6. Derry JM, Ochs HD, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich  
419 syndrome. *Cell.* 1994;78(4):635–644.
- 420 7. Dobbs K, Domínguez Conde C, Zhang S-Y, et al. Inherited DOCK2 Deficiency in Patients  
421 with Early-Onset Invasive Infections. *N. Engl. J. Med.* 2015;372(25):2409–2422.
- 422 8. Engelhardt KR, McGhee S, Winkler S, et al. Large deletions and point mutations involving  
423 the dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) in the autosomal-recessive form of hyper-IgE  
424 syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009;124(6):1289–1302.e4.
- 425 9. Kuhns DB, Fink DL, Choi U, et al. Cytoskeletal abnormalities and neutrophil dysfunction in  
426 WDR1 deficiency. *Blood.* 2016;128(17):2135–2143.
- 427 10. Lagresle-Peyrou C, Luce S, Ouchani F, et al. X-linked primary immunodeficiency associated  
428 with hemizygous mutations in the moesin (MSN) gene. *J. Allergy Clin. Immunol.*  
429 2016;138(6):1681–1689.e8.
- 430 11. Lanzi G, Moratto D, Vairo D, et al. A novel primary human immunodeficiency due to  
431 deficiency in the WASP-interacting protein WIP. *J. Exp. Med.* 2012;209(1):29.
- 432 12. Nehme NT, Schmid JP, Debeurme F, et al. MST1 mutations in autosomal recessive primary  
433 immunodeficiency characterized by defective naive T-cell survival. *Blood.*  
434 2012;119(15):3458–3468.
- 435 13. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, et al. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on  
436 the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert  
437 Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J. Clin. Immunol.* 2015;35(8):696–726.
- 438 14. Record J, Malinova D, Zenner HL, et al. Immunodeficiency and severe susceptibility to  
439 bacterial infection associated with a loss-of-function homozygous mutation of MKL1. *Blood.*  
440 2015;126(13):1527–1535.
- 441 15. Salzer E, Cagdas D, Hons M, et al. RASGRP1 deficiency causes immunodeficiency with  
442 impaired cytoskeletal dynamics. *Nat. Immunol.* 2016;17(12):1352–1360.
- 443 16. Takenouchi T, Kosaki R, Niizuma T, Hata K, Kosaki K. Macrothrombocytopenia and  
444 developmental delay with a de novo CDC42 mutation: Yet another locus for  
445 thrombocytopenia and developmental delay. *Am. J. Med. Genet. A.* 2015;167(11):2822–2825.
- 446 17. Wise CA, Gillum JD, Seidman CE, et al. Mutations in CD2BP1 disrupt binding to PTP PEST  
447 and are responsible for PAPA syndrome, an autoinflammatory disorder. *Hum. Mol. Genet.*  
448 2002;11(8):961–969.
- 449 18. Zhang Q, Davis JC, Lamborn IT, et al. Combined Immunodeficiency Associated with  
450 DOCK8 Mutations. *N. Engl. J. Med.* 2009;361(21):2046–2055.

- 451 19. Cotta-de-Almeida V, Dupré L, Guipouy D, Vasconcelos Z. Signal Integration during T  
452 Lymphocyte Activation and Function: Lessons from the Wiskott–Aldrich Syndrome. *Front.*  
453 *Immunol.* 2015;6:.
- 454 20. Al-Mousa H, Hawwari A, Al-Ghonaïum A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation  
455 corrects WIP deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* .
- 456 21. Fuente MA de la, Sasahara Y, Calamito M, et al. WIP is a chaperone for Wiskott–Aldrich  
457 syndrome protein (WASP). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007;104(3):926–931.
- 458 22. Chou H-C, Antón IM, Holt MR, et al. WIP Regulates the Stability and Localization of WASP  
459 to Podosomes in Migrating Dendritic Cells. *Curr. Biol.* 2006;16(23):2337–2344.
- 460 23. Fried S, Matalon O, Noy E, Barda-Saad M. WIP: more than a WASp-interacting protein. *J.*  
461 *Leukoc. Biol.* 2014;96(5):713–727.
- 462 24. Gallego MD, Fuente MA de la, Anton IM, et al. WIP and WASP play complementary roles  
463 in T cell homing and chemotaxis to SDF-1 $\alpha$ . *Int. Immunol.* 2006;18(2):221–232.
- 464 25. Banon-Rodriguez I, Guinoa JS de, Bernardini A, et al. WIP Regulates Persistence of Cell  
465 Migration and Ruffle Formation in Both Mesenchymal and Amoeboid Modes of Motility.  
466 *PLOS ONE.* 2013;8(8):e70364.
- 467 26. Massaad MJ, Oyoshi MK, Kane J, et al. Binding of WIP to Actin Is Essential for T Cell  
468 Actin Cytoskeleton Integrity and Tissue Homing. *Mol. Cell. Biol.* 2014;34(23):4343–4354.
- 469 27. Antón IM, de la Fuente MA, Sims TN, et al. WIP Deficiency Reveals a Differential Role for  
470 WIP and the Actin Cytoskeleton in T and B Cell Activation. *Immunity.* 2002;16(2):193–204.
- 471 28. Erman B, Bilic I, Hirschmugl T, et al. Combined immunodeficiency with CD4 lymphopenia  
472 and sclerosing cholangitis caused by a novel loss-of-function mutation affecting IL21R.  
473 *Haematologica.* 2015;100(6):e216–e219.
- 474 29. Meester JD, Calvez R, Valitutti S, Dupré L. The Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates  
475 CTL cytotoxicity and is required for efficient killing of B cell lymphoma targets. *J. Leukoc.*  
476 *Biol.* 2010;88(5):1031–1040.
- 477 30. Boztug H, Hirschmugl T, Holter W, et al. NF- $\kappa$ B1 Haploinsufficiency Causing  
478 Immunodeficiency and EBV-Driven Lymphoproliferation. *J. Clin. Immunol.*  
479 2016;36(6):533–540.
- 480 31. Willmann KL, Klaver S, Doğu F, et al. Biallelic loss-of-function mutation in NIK causes a  
481 primary immunodeficiency with multifaceted aberrant lymphoid immunity. *Nat. Commun.*  
482 2014;5:5360.
- 483 32. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector  
484 achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotechnol.* 1997;15(9):871–875.
- 485 33. Curcio C, Pannellini T, Lanzardo S, et al. WIP null mice display a progressive  
486 immunological disorder that resembles Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Pathol.*  
487 2007;211(1):67–75.
- 488 34. Malet-Engra G, Viaud J, Ysebaert L, et al. CIP4 Controls CCL19-Driven Cell Steering and  
489 Chemotaxis in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Res.* 2013;73(11):3412–3424.
- 490 35. Krzewski K, Chen X, Strominger JL. WIP is essential for lytic granule polarization and NK  
491 cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008;105(7):2568–2573.
- 492 36. Vasconcelos Z, Müller S, Guipouy D, et al. Individual Human Cytotoxic T Lymphocytes  
493 Exhibit Intraclonal Heterogeneity during Sustained Killing. *Cell Rep.* 2015;11(9):1474–1485.
- 494 37. Dustin ML. Cell adhesion molecules and actin cytoskeleton at immune synapses and  
495 kinapses. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007;19(5):529–533.

- 496 38. Lafouresse F, Cotta-de-Almeida V, Malet-Engra G, et al. Wiskott–Aldrich syndrome protein  
497 controls antigen-presenting cell-driven CD4+ T-cell motility by regulating adhesion to  
498 intercellular adhesion molecule-1. *Immunology*. 2012;137(2):183–196.
- 499 39. Luo C, Pan H, Mines M, et al. CXCL12 Induces Tyrosine Phosphorylation of Cortactin,  
500 Which Plays a Role in CXC Chemokine Receptor 4-mediated Extracellular Signal-regulated  
501 Kinase Activation and Chemotaxis. *J. Biol. Chem*. 2006;281(40):30081–30093.
- 502 40. Fried S, Reicher B, Pauker MH, et al. Triple-Color FRET Analysis Reveals Conformational  
503 Changes in the WIP-WASp Actin-Regulating Complex. *Sci Signal*. 2014;7(331):ra60-ra60.
- 504 41. Janssen E, Tohme M, Hedayat M, et al. A DOCK8-WIP-WASp complex links T cell  
505 receptors to the actin cytoskeleton. *J. Clin. Invest*. 2016;126(10):3837–3851.
- 506 42. Antón IM, Jones GE, Wandosell F, Geha R, Ramesh N. WASP-interacting protein (WIP):  
507 working in polymerisation and much more. *Trends Cell Biol*. 2007;17(11):555–562.
- 508 43. Paunola E, Mattila PK, Lappalainen P. WH2 domain: a small, versatile adapter for actin  
509 monomers. *FEBS Lett*. 2002;513(1):92–97.
- 510 44. Franco-Villanueva A, Wandosell F, Antón IM. Neuritic complexity of hippocampal neurons  
511 depends on WIP-mediated mTORC1 and Abl family kinases activities. *Brain Behav*.  
512 2015;5(11):n/a-n/a.
- 513 45. Mitter D, Chiaie BD, Lüdecke H-J, et al. Genotype-phenotype correlation in eight new  
514 patients with a deletion encompassing 2q31.1. *Am. J. Med. Genet. A*. 2010;152A(5):1213–  
515 1224.
- 516 46. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. Lentivirus-based Gene Therapy of Hematopoietic  
517 Stem Cells in Wiskott-Aldrich Syndrome. *Science*. 2013;341(6148):1233151.
- 518

519 **Figure Legends**

520 **Figure 1. *WIPF1* mutation and consequence at the protein level.** (A) Immune reconstitution  
521 and plasma CMV load after repetitive HLA-identical maternal donor lymphocyte and stem cell  
522 infusions in a patient with WIP deficiency: sequential doses of donor lymphocyte infusions  
523 (DLI), taken from the peripheral blood of the patient's HLA-identical mother and calculated for a  
524 target number of CD3<sup>+</sup> T cells (from 1x10<sup>6</sup>/kg CD3<sup>+</sup> to max 1x10<sup>7</sup>/kg CD3<sup>+</sup> cells; white  
525 triangles) and peripheral stem cell donations (2x10<sup>7</sup>/kg CD34<sup>+</sup> plus 2x10<sup>7</sup>/kg CD3<sup>+</sup> cells; black  
526 triangles); plasma concentration of CMV nucleic acid (copies/mL plasma; dotted line, left y-  
527 axis); chimerism of maternal CD3<sup>+</sup> T cells is plotted as absolute number (per  $\mu$ l, solid line, left y-  
528 axis) and as proportion (%; grey shaded area, right y-axis) (B) Pedigree tree of the patient's  
529 family. (C) Electropherogram of Sanger sequencing depicting the homozygous c.343G>A  
530 mutation in *WIP* in the patient. (D) 2D structure of WIP showing its known domains (in colors),  
531 its interactors (name referred above) and the identified mutation. (E) Western blot analysis of  
532 WIP and WASP in lysates of B-EBV cells from 2 healthy donors, the WIP patient and a WAS  
533 patient. Data were confirmed in 3 independent experiments.

534

535 **Figure 2. Phenotyping of the patient PMBCs.** Frozen PBMCs from a healthy donor and the  
536 patient were thawed and immediately phenotyped using different antibody panels: (A) CD4, CD8;  
537 (B) CD45RA, CCR7; (C) CD31, CD45RA; (D) CD19, CD3; (E) CD27, IgD.

538

539 **Figure 3. Chemokine-evoked actin polarization and migration in WIP-deficient T cells.** A  
540 transwell assay was performed with 5x10<sup>4</sup> T cells in response to CCL19 (A), or CXCL12 (B)  
541 used at the indicated concentrations. In parallel, the expression of the corresponding chemokine

542 receptors, respectively CCR7 and CXCR4, was assessed. Histograms correspond to the mean +/-  
543 SD of triplicate values. Data represent one representative experiment out of three performed.  
544 \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (Student's t-test). (C) T cells were stimulated during 15 minutes  
545 with CCL19. Representative pictures of one control and one patient T cell, without stimulation or  
546 after CCL19 stimulation. (D) Intensity profiles of actin and WIP staining along the major cell  
547 axis.

548

549 **Figure 4. Role of WIP in sustaining B lymphocyte directional motility.** (A) Western blot  
550 analysis of WIP and WASP expression in JY cells, either untransduced, transduced with a  
551 scramble shRNA or a shRNA targeting *WIPF1* (left panels); Western blot analysis of WIP  
552 expression in B-EBV cells from the patient transduced with a mCherry-WIP encoding lentiviral  
553 vector (right panels). (B) Thirty-minute trajectories of the wildtype or shWIP JY cells, or EBV-  
554 transformed B cells from the patient untransduced or transduced with the mCherry-WIP encoding  
555 lentiviral vector upon exposure to a CCL19 gradient. (C) Motility parameters included velocity,  
556 directional persistence and forward migration index (FMI). They were extracted from the  
557 trajectory records of the indicated cells using the Ibidi chemotaxis tool. Data represent one  
558 representative experiment out of 2 performed. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (Student's t-test).  
559 (D) Time-lapse video recording of the LifeAct-GFP expressing JY wt or shWIP cells exposed or  
560 not to a CCL19 gradient.

561

562 **Figure 5. Cytotoxic activity of WIP-deficient CD8<sup>+</sup> T lymphocytes.** (A) Perforin  
563 quantification in patient CD8<sup>+</sup> T cells. (B) Evaluation of surface LAMP-1 expression on the  
564 patient CD8<sup>+</sup> T cells, in presence of P815 target cells coated with different concentration of

565 OKT3. (C) Assessment of CD8<sup>+</sup> T-cell cytotoxic activity by evaluation of the residual alive P815  
566 target cells after 4 or 24 h.

567

568 **Figure 6. Morphology and immunological synapse in WIP-deficient CD8<sup>+</sup> T lymphocytes.**

569 (A) Representative picture of the conjugates formation of control CD8<sup>+</sup> T cells or patient CD8<sup>+</sup> T  
570 cells forming conjugates with P815 cells coated or not with 10 µg of OKT3. Fixed conjugates  
571 were stained for F-actin, WIP and DAPI. (B) Quantification of the proportion of CD8<sup>+</sup> T cells  
572 engaged in conjugates with target cells coated or not with 10 µg of OKT3. (C) Length of the  
573 synapse formed between CD8<sup>+</sup> T cells and target cells under the indicated conditions.

574

575 **Figure 7. Actin meshwork ultrastructure in WIP-deficient CD8<sup>+</sup> T lymphocytes.** (A)

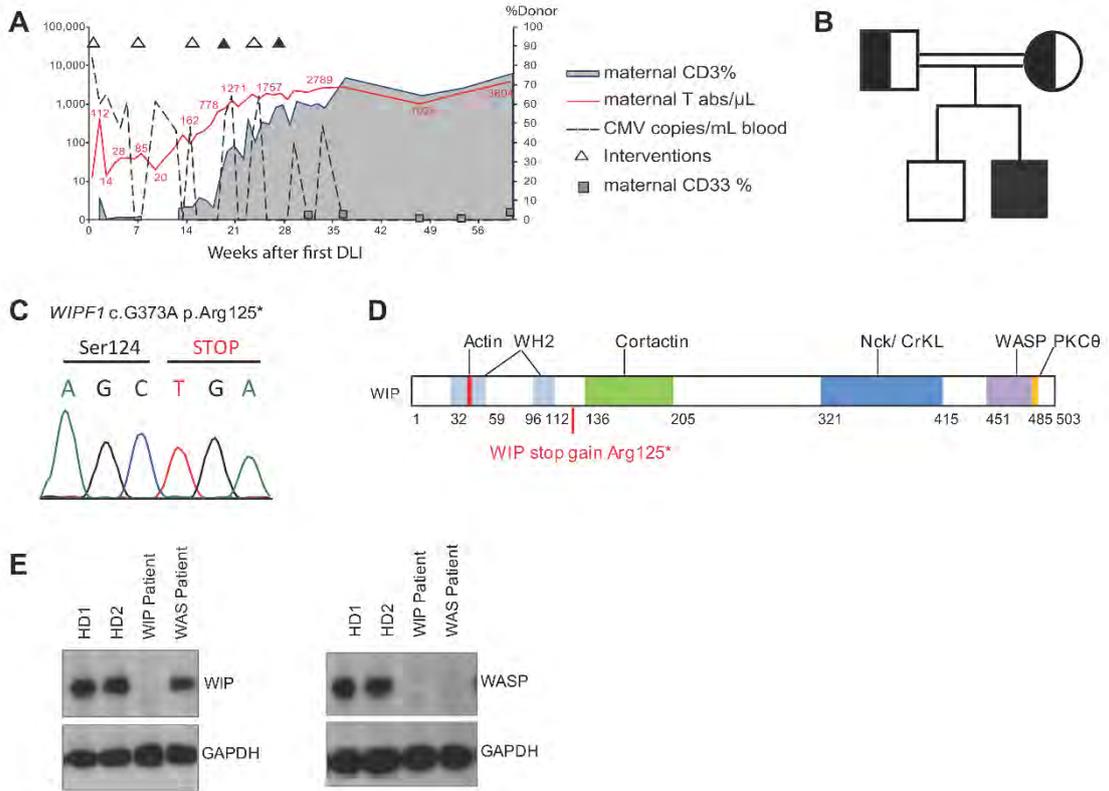
576 Reconstructed SIM images of control and patient CD8<sup>+</sup> T cells coated on poly-L-lysine (PLL) or  
577 ICAM-1/αCD3. Staining for F-actin and WIP is shown. (B) Regions-of-interest were selected in  
578 the representative cells to visualize more precisely actin meshwork architecture and WIP  
579 distribution. The lower panels represent the coherency analysis obtained with the OrientationJ  
580 plugin from ImageJ that depicts the propensity of fibers to follow one main direction in the  
581 considered region-of-interest. The quantification of actin fiber coherency shown on the right  
582 corresponds to the analysis of 20 regions-of-interest per condition.

583

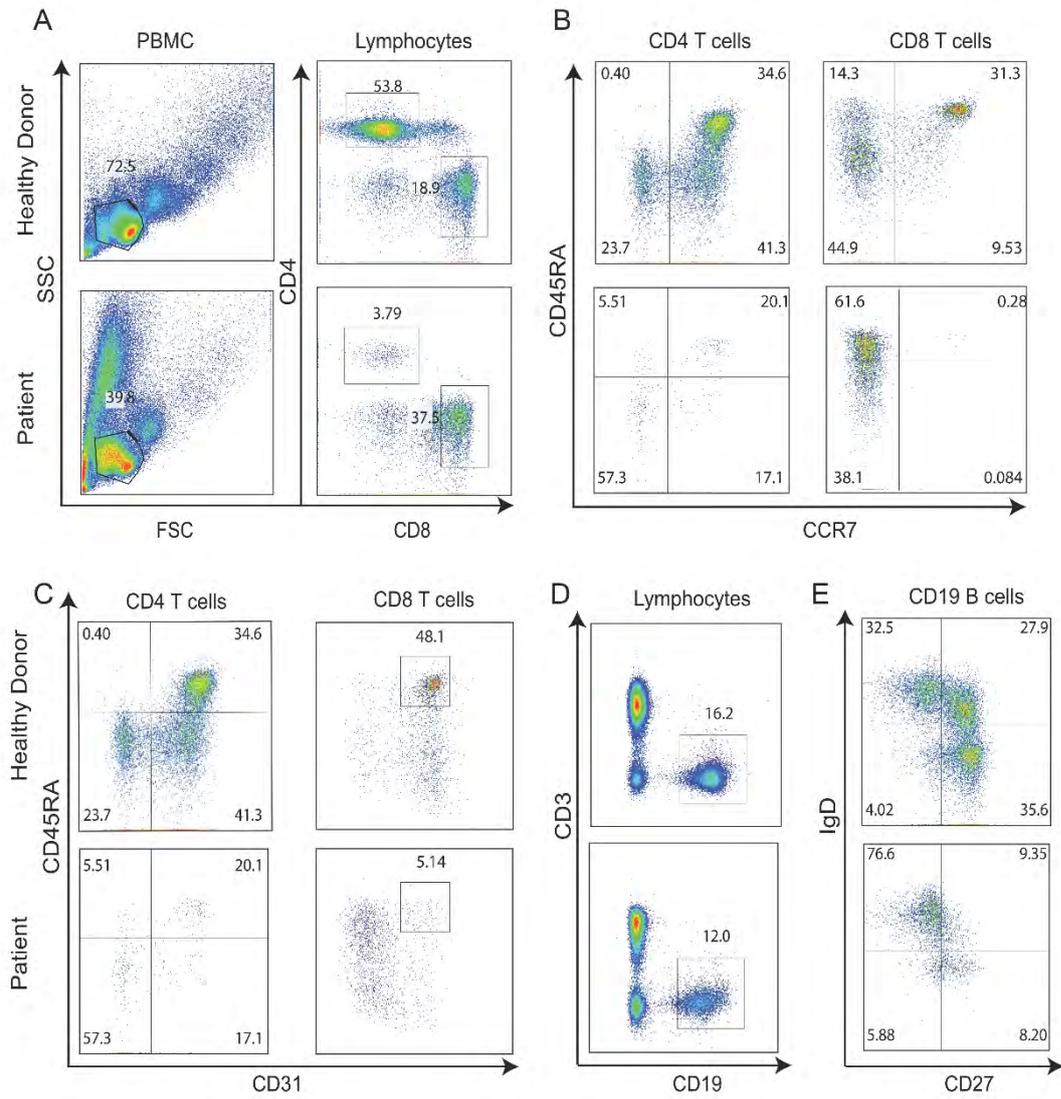
584 **Table 1. Immunological data of the WIP-deficient patient.**

585 Nd: not determined.

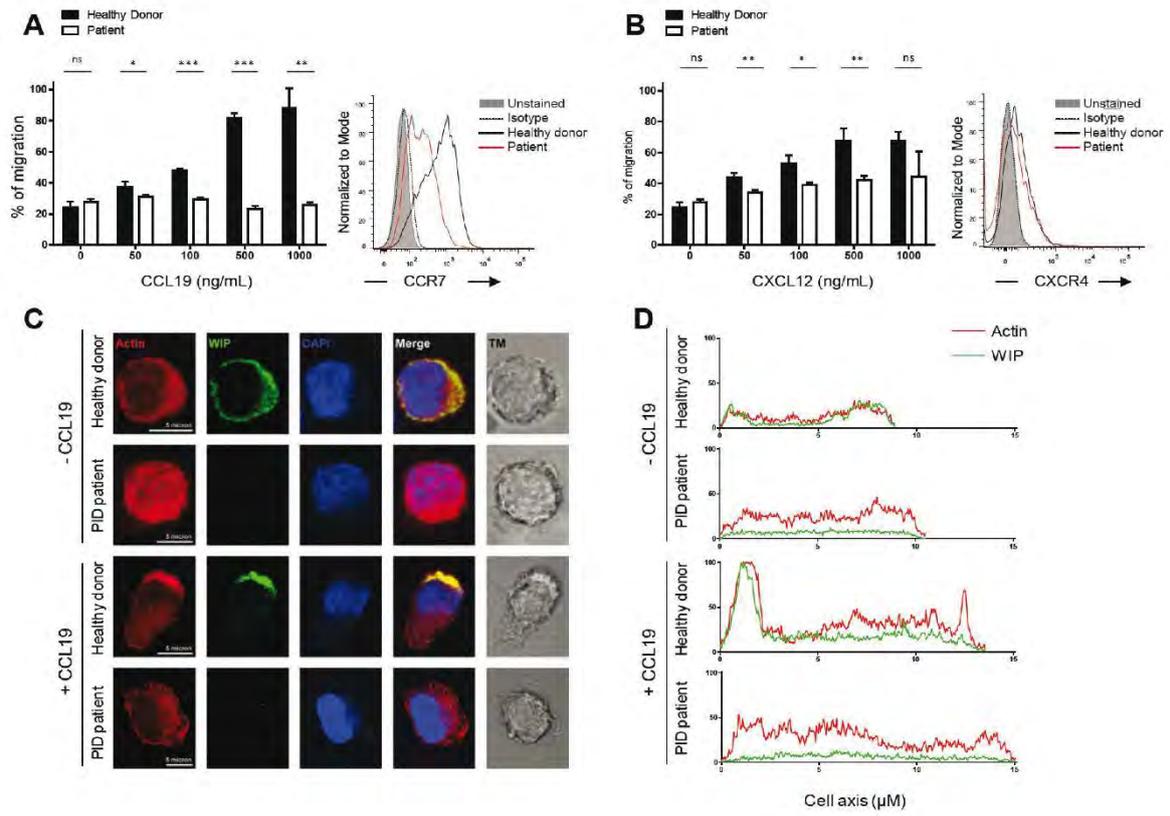
Pfajfer et al., Fig. 1



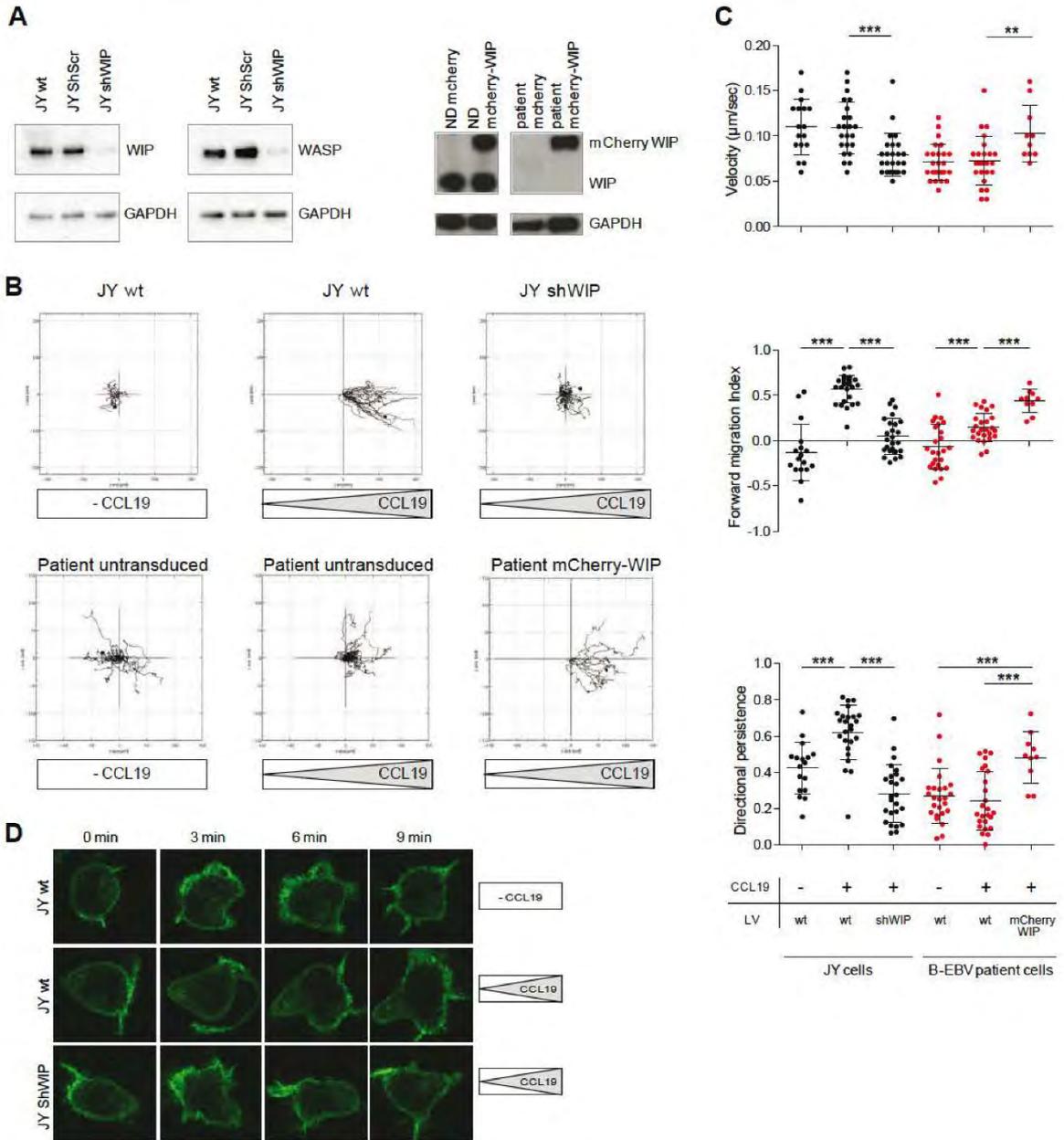
Pfajfer et al., Fig. 2



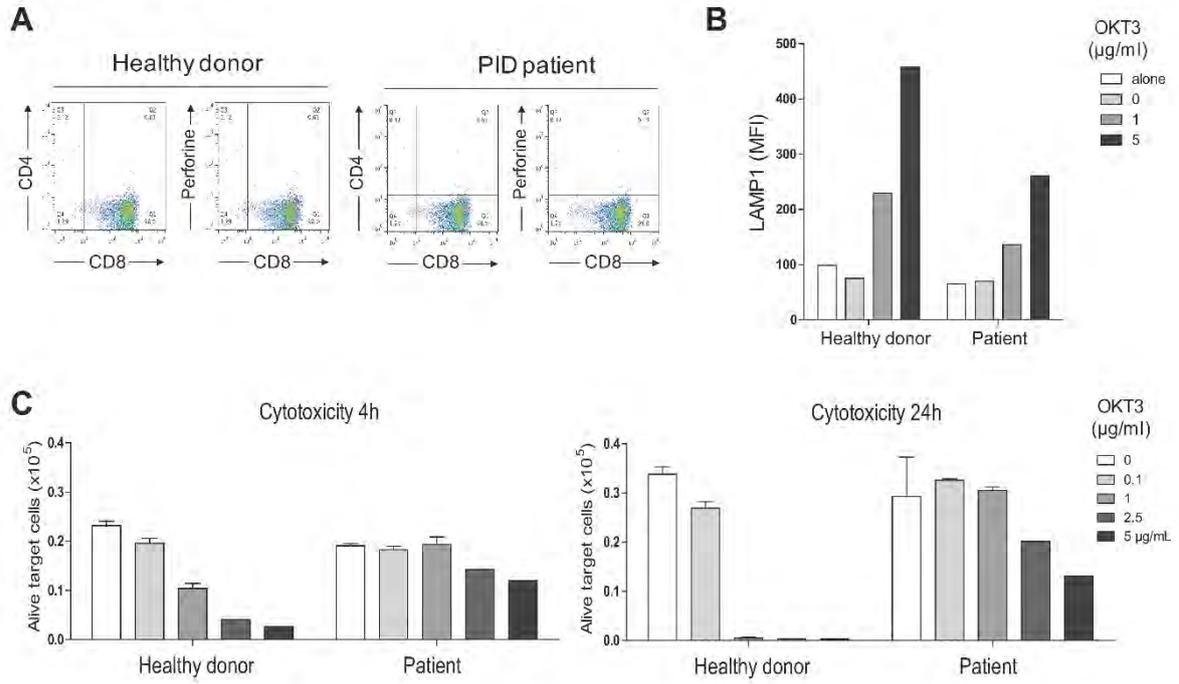
Pfajfer et al., Fig. 3



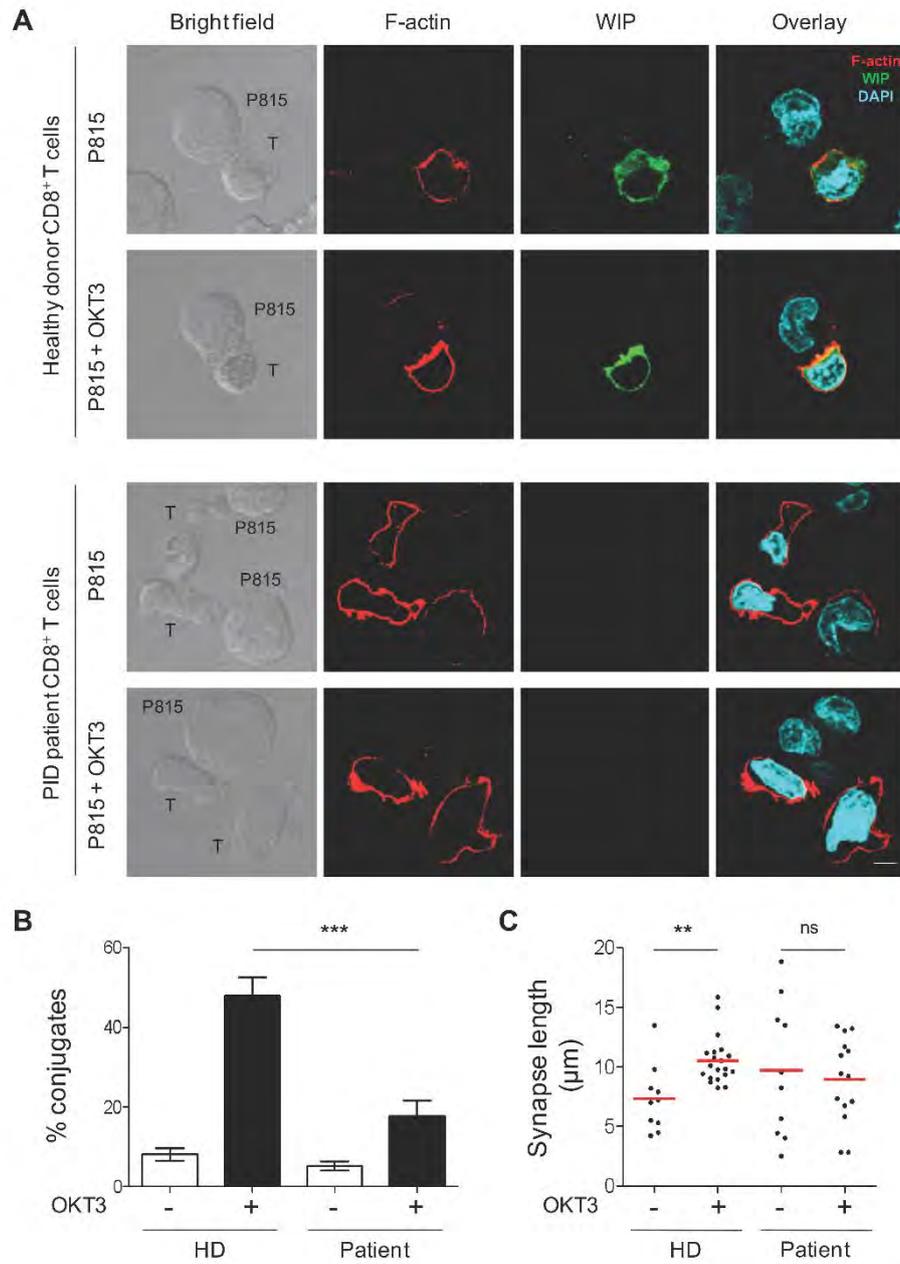
Pfajfer et al., Fig. 4



Pfajfer et al., Fig. 5

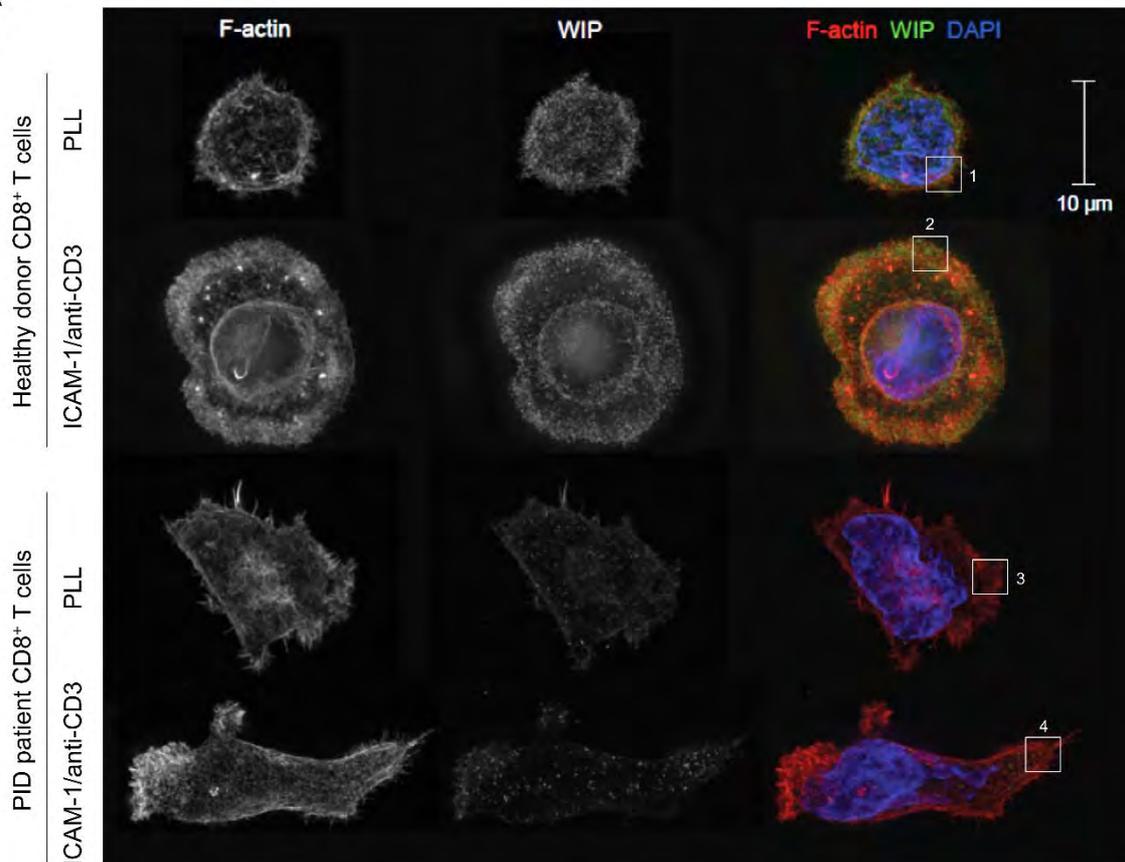


Pfajfer et al., Fig. 6

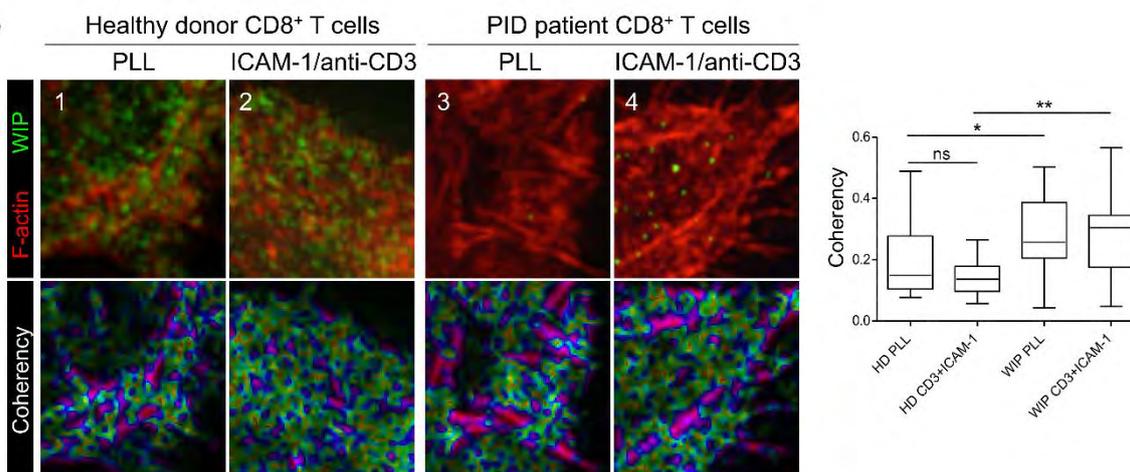


Pfajfer et al., Fig. 7

**A**



**B**



**WIP deficiency severely affects human lymphocyte  
architecture during migration and synapse assembly**

**SUPPLEMENTAL DATA CONTENT:**

- Supplemental methods
- Supplemental Figure 1
- Supplemental Figure 2

## **Supplemental Data**

### **Supplemental methods**

#### **Patient and cell lines**

The studies including immunologic diagnostic procedures and genetic analyses were performed in accordance with guidelines of good clinical practice, the current version of the Declaration of Helsinki, with written informed consent from the patient's legal representatives, and with approval from the appropriate Institutional Review Boards of Medical Universities of Graz and Vienna. Routine clinical data were obtained by retrospective chart review.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from the WIP patient and healthy donors were isolated by Ficoll gradient. T cells were obtained by stimulation of the PBMCs with irradiated PBMCs and EBV-immortalized B cells (B-EBV, JY cells), IL-2 (100 U/mL) and IL-15 (5 ng/mL) in RPMI medium containing 5% human serum. A B-EBV line was generated from the patient following PBMC infection with EBV particles. The WASP-deficient B-EBV line was derived from the WAS2 patient described previously<sup>29</sup>. WIP expression knock-down was obtained by transducing JY cells with a *WIPFI* shRNA-encoding lentiviral vector (Sigma Aldrich) followed by puromycin selection. The B-EBV cells from the patient and a healthy donor were transduced with a lentiviral vector encoding Lifeact-GFP (Ibidi) to visualize actin dynamics or encoding mCherry-WIP to rescue WIP expression<sup>25</sup>.

#### **Targeted Exome Sequencing**

Genomic DNA of patient was enriched using HaloPlex Target Enrichment System (Agilent Technologies Inc.) as previously described<sup>28,30</sup>. Exome sequencing was performed on Illumina HiSeq2000 (Illumina Inc.) Sequencer running on HiSeq Control Software (HCS) 1.4.8, Real time Analysis Software (RTA) 1.12.4.2. Variants with a minor allele frequency of

more than 0.01 were excluded and lists were further filtered for rare variants within the exons of the targeted genes. Primers of candidate variants were designed for PCR amplification and capillary sequencing, as previously described<sup>31</sup>.

### **Lentiviral vectors**

Lentiviral vectors were produced in HEK293T cells by co-transfecting the mCherry-WIP transfer vector<sup>25</sup>, the envelope plasmid pMD.2G and the packaging plasmid pCMVR8.91, as previously described<sup>32</sup>. Lentiviral particles were harvested 48 and 72 h post transfection, filtered and stored at -80 °C until use. B-EBV cells were spinoculated with a 1/5 dilution of the virus stock in the presence of polybrene.

### **Immunophenotyping**

The following antibodies were used to stain PBMCs: CD3-APC-H7, CD4-BV605, CD8-FITC, CD45RA-AF700, CD27-V450, CCR7-CF594, CD95-PeCy7, CD244-PE, CD19-PerCPCy5.5, IgD-FITC, CD27-V450, CD21-PE, CD38-PE-Cy7, IgM-APC, TCR $\nu$  $\beta$ 11-FITC, TCR $\nu$ 24-PE-Cy7, CD4-PE, CD8-V450, CD45RA-AF700, CCR7-BV421, CXCR4-PE-Cy5, CD31-APC from BD Biosciences and Beckman Coulter.

### **Western blotting**

B-EBV cell lysates were prepared using RIPA buffer, loaded on a 10% SDS-PAGE and transferred onto a polyvinylidene fluoride membrane. Proteins were detected using rabbit polyclonal anti-WIP antibody (H-224, 1/2000 dilution, Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal anti-WASP antibody (H-250, 1/2000 dilution, Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-WIP antibody (1G5, provided by Inés M. Antón, 1/1000 dilution) and mouse monoclonal anti-GAPDH antibody (1/2000 dilution, Santa Cruz Biotechnology). HRP-

coupled secondary antibodies were used at a dilution 1/30000 and developed with an ECL Kit.

### **Motility assay**

For transwell assays, T cells were resuspended in RPMI 0.5% BSA medium and  $5 \times 10^4$  cells were deposited on the filters of 5- $\mu$ m pore size 96-well transwell plates (Corning). CCL19 or CXCL12 (Peprotech) were added at the indicated concentrations to the lower chamber. After 4 h of incubation at 37°C, the transmigrating cells were collected, transferred into a U-bottom 96-well plate and counted with a Fortessa cytometer equipped with a plate sampler (BD Biosciences). The proportion of migrating cells was normalized to the initial input.

For real-time recoding of chemotaxis, the central channel of collagen coated chemotaxis 3D  $\mu$ -slides (IBIDI) were seeded with JY cells in RPMI 0.5% BSA medium. CCL19 was added in one of the 2 reservoirs to establish a 0 to 100 ng/mL gradient over the central channel. A Zeiss LSM780 confocal microscope was used to record cells within the central channel.

### **Proteasome inhibitors treatment**

EBV-transformed B cells from a normal donor or the WIP patient were harvested and resuspended at  $1 \times 10^6$  cells/mL in RPMI 10% FCS. The solutions containing the proteasome inhibitors Bortezomib, Carfilzomib, MG132 or Ixazomib were prepared at 2X concentration in RPMI 10% FCS. In a 24-well plate, 500  $\mu$ L of the cell suspensions were loaded together with 500  $\mu$ L of the 2X proteasome inhibitor solutions. After incubation for 8 h at 37°C, the cells were harvested to analyze WASP expression by Western blotting.

### **Cytotoxicity assay**

GFP-expressing P815 cells were preloaded with different concentrations of anti-CD3 monoclonal antibody (OKT3 clone, eBioscience) and pretreated with 0.2 µg/mL aphidicolin (Sigma Aldrich) to prevent their proliferation. Purified CD8<sup>+</sup> T cells (MagniSort Human CD8<sup>+</sup> T-cell Enrichment Kit, eBioscience) were incubated for 4 or 24 h with P815 cells at different ratios in a U-bottom 96-well plate. 7-AAD (BD pharmingen) was added to the cell suspensions prior to analysis on a Fortessa cytometer equipped with a plate sampler (BD Biosciences) to count absolute numbers of residual alive P815 cells.

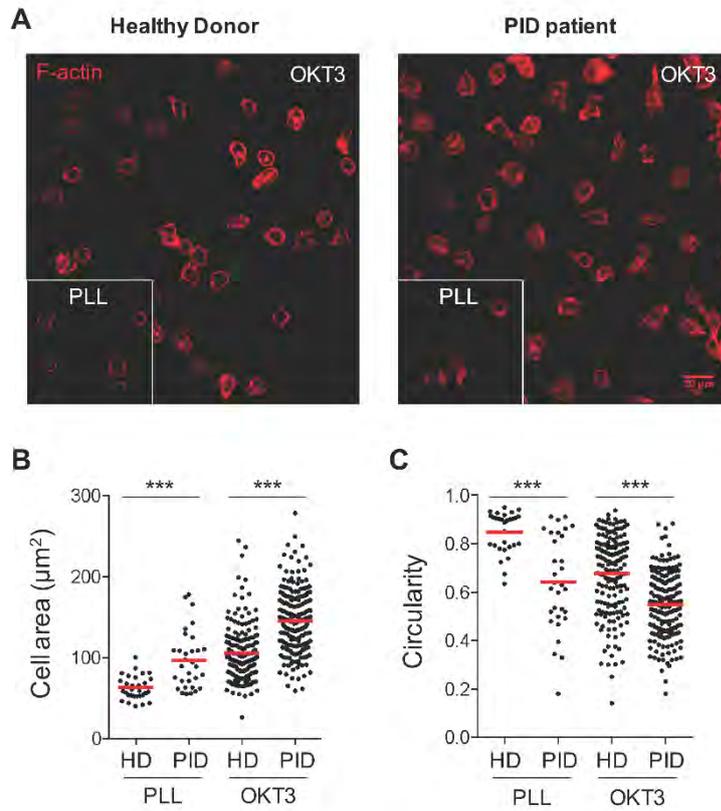
### **Microscopy**

For confocal microscopy, T cells were resuspended in RPMI 0.5% BSA, containing 100 µg/mL CCL19 and transferred onto poly-L-lysine coated slides. After 10 min of incubation at 37°C, T cells were fixed with 3% PFA and stained with Phalloidin-AF546 (Life Technology) and WIP rabbit polyclonal antibody (H-224, 1/100 dilution, Santa Cruz Biotechnology) in permeabilization buffer (eBioscience). Zenon α-rabbit AF488 IgG (1/200 dilution, Life Technology) was used to reveal the WIP staining. Slides were imaged with a Zeiss LSM700 confocal microscope and analyzed with the ImageJ software.

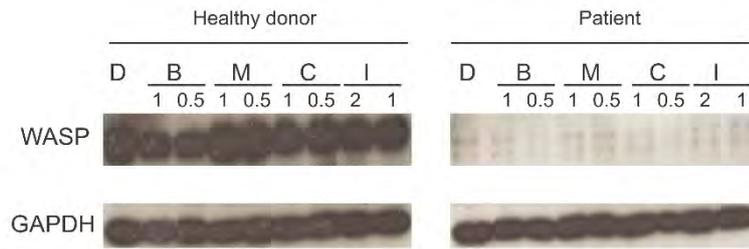
For structured illumination microscopy (SIM), CD8<sup>+</sup> T cells were seeded on 1.5H coverslips precoated with poly-L-lysine or a combination of 4 µg/ml recombinant ICAM-1/Fc chimera (R&D Systems) and 10 µg/ml OKT3. Cells were fixed with 4% PFA and stained in permeabilization buffer with Phalloidin-AF546 (1/40 dilution) and WIP rabbit polyclonal antibody (H-224, 1/100 dilution, Santa Cruz Biotechnology), followed by AF488-labelled α-rabbit antibody (dilution 1/200, Life Technology). Coverslips were mounted in Vectashield H-1000 (Vector lab). 3D-SIM images were acquired with a Zeiss Elyra PS1 SR-SIM equipped with a Plan-Apo 63x/1.40NA oil DIC immersion objective using a sCMOS camera

(Hamamatsu) and a 1.60x tube lens. We applied 488 nm and 561 nm laser excitations, using respectively 28  $\mu\text{m}$  and 32  $\mu\text{m}$  optical grids that were rotated to three pre-aligned angles and translated to five positions. Z-stack acquisitions were implemented with a step of 110 nm to cover a maximum of 10- $\mu\text{m}$  depth. The lateral pixel size was 65 nm in the acquired images and 32 nm in the reconstructed images. The 3D-SIM images were reconstructed with the Zeiss ZEN software and further verified with SIMcheck (Image J, plugin). Actin meshwork organization was analyzed with the coherency parameter from the OrientationJ plugin of ImageJ.

Supplemental Figures



**Figure S1. Spreading of WIP-deficient CD8+ T lymphocytes over anti-CD3 Ab.** (A) Low magnification confocal images of CD8+ T cells from the normal donor or the patient adhering to PLL or ICAM1/anti-CD3 coated slides, and then stained with phalloidin to visualize F-actin. (B) Quantification of the cell area of the normal donor or patient CD8+ T cells in PLL condition or in ICAM1/ $\alpha$ CD3 condition. (C) Evaluation of the cellular circularity of CD8+ T cells from normal donor or patient



**Figure S2. Proteasome inhibition in patient's cells.** Western Blot analysis of WASP in lysates of B-EBV cells from WIP patient or normal donor treated with DMSO vehicle (D), Bortezomib (B – 1  $\mu$ M or 0.5  $\mu$ M), MG132 (M – 1  $\mu$ M or 0.5  $\mu$ M), Carfilzomib (C – 1 nM or 0.5 nM) or Ixazomib (I – 2  $\mu$ M or 1  $\mu$ M) for 8 h

## Bibliographie

1. Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egener, A. & Hell, S. W. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8206–10 (2000).
2. Hell, S. W. & Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **19**, 780–2 (1994).
3. Gustafsson, M. G. Extended resolution fluorescence microscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 627–634 (1999).
4. Gustafsson, M. G. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.* **198**, 82–7 (2000).
5. Betzig, E. *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**, 1642–5 (2006).
6. Heilemann, M., van de Linde, S., Mukherjee, A. & Sauer, M. Super-resolution imaging with small organic fluorophores. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 6903–8 (2009).
7. Burnette, D. T., Sengupta, P., Dai, Y., Lippincott-Schwartz, J. & Kachar, B. Bleaching/blinking assisted localization microscopy for superresolution imaging using standard fluorescent molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 21081–6 (2011).
8. Rust, M. J., Bates, M. & Zhuang, X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* **3**, 793–5 (2006).
9. van de Linde, S., Sauer, M. & Heilemann, M. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging of proteins in the mitochondrial inner membrane with photoswitchable fluorophores. *J. Struct. Biol.* **164**, 250–4 (2008).

10. Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* (2006).  
doi:10.1117/1.2904580
11. Giepmans, B. N. G., Adams, S. R., Ellisman, M. H. & Tsien, R. Y. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**, 217–224 (2006).
12. Dempsey, G. T., Vaughan, J. C., Chen, K. H., Bates, M. & Zhuang, X. Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nat. Methods* **8**, 1027–1036 (2011).
13. SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H. & SAIGA, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**, 223–39 (1962).
14. Winston, P. H. Marvin L. Minsky (1927-2016). *Nature* **530**, 282 (2016).
15. Kubitscheck, U., Kückmann, O., Kues, T. & Peters, R. Imaging and Tracking of Single GFP Molecules in Solution. *Biophys. J.* **78**, 2170–2179 (2000).
16. Dyba, M., Jakobs, S. & Hell, S. W. Immunofluorescence stimulated emission depletion microscopy. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1303–4 (2003).
17. Donnert, G. *et al.* Two-color far-field fluorescence nanoscopy. *Biophys. J.* **92**, L67-9 (2007).
18. Punge, A. *et al.* 3D reconstruction of high-resolution STED microscope images. *Microsc. Res. Tech.* **71**, 644–650 (2008).
19. Han, K. Y. *et al.* Three-dimensional stimulated emission depletion microscopy of nitrogen-vacancy centers in diamond using continuous-wave light. *Nano Lett.* **9**, 3323–9 (2009).
20. Schermelleh, L. *et al.* Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. *Science* **320**, 1332–6 (2008).
21. Schermelleh, L., Heintzmann, R. & Leonhardt, H. A guide to super-resolution fluorescence

- microscopy. *J. Cell Biol.* **190**, 165–75 (2010).
22. Gordon, M. P., Ha, T. & Selvin, P. R. Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 6462–5 (2004).
  23. Millis, B. A., Burnette, D. T., Lippincott-Schwartz, J. & Kachar, B. Superresolution imaging with standard fluorescent probes. *Curr. Protoc. cell Biol.* **60**, Unit 21.8. (2013).
  24. Heilemann, M. *et al.* Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **47**, 6172–6 (2008).
  25. van de Linde, S. *et al.* Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat. Protoc.* **6**, 991–1009 (2011).
  26. Löschberger, A. *et al.* Super-resolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution. *J. Cell Sci.* **125**, 570–5 (2012).
  27. Lampe, A., Hauke, V., Sigrist, S. J., Heilemann, M. & Schmoranzler, J. Multi-colour direct STORM with red emitting carbocyanines. *Biol. Cell* **104**, 229–237 (2012).
  28. Wolter, S., Endesfelder, U., van de Linde, S., Heilemann, M. & Sauer, M. Measuring localization performance of super-resolution algorithms on very active samples. *Opt. Express* **19**, 7020–7033 (2011).
  29. Ehmman, N. *et al.* Quantitative super-resolution imaging of Bruchpilot distinguishes active zone states. *Nat. Commun.* **5**, 4650 (2014).
  30. Fölling, J. *et al.* Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nat. Methods* **5**, 943–5 (2008).
  31. Ronneberger, O. *et al.* Spatial quantitative analysis of fluorescently labeled nuclear structures: problems, methods, pitfalls. *Chromosome Res.* **16**, 523–62 (2008).

32. Shroff, H., White, H. & Betzig, E. Photoactivated localization microscopy (PALM) of adhesion complexes. *Curr. Protoc. cell Biol.* **Chapter 4**, Unit 4.21 (2008).
33. Axelrod, D., Thompson, N. L. & Burghardt, T. P. Total internal reflection fluorescent microscopy. *J. Microsc.* **129**, 19–28 (1983).
34. Pagoon, S. V *et al.* Functional role of T-cell receptor nanoclusters in signal initiation and antigen discrimination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E5454-63 (2016).
35. Sanchez-Madrid, F. *et al.* Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte-mediated cytotoxicity: LFA-1, LFA-2, and LFA-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 7489–93 (1982).
36. Lanier, L. L., Arnaout, M. A., Schwarting, R., Warner, N. L. & Ross, G. D. p150/95, Third member of the LFA-1/CR3 polypeptide family identified by anti-Leu M5 monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* **15**, 713–8 (1985).
37. Miller, B. A., Antognetti, G. & Springer, T. A. Identification of cell surface antigens present on murine hematopoietic stem cells. *J. Immunol.* **134**, 3286–90 (1985).
38. Davignon, D., Martz, E., Reynolds, T., Kürzinger, K. & Springer, T. a. Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1): a surface antigen distinct from Lyt-2,3 that participates in T lymphocyte-mediated killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 4535–9 (1981).
39. Davignon, D., Martz, E., Reynolds, T., Kürzinger, K. & Springer, T. A. Monoclonal antibody to a novel lymphocyte function-associated antigen (LFA-1): mechanism of blockade of T lymphocyte-mediated killing and effects on other T and B lymphocyte functions. *J. Immunol.* **127**, 590–5 (1981).
40. Sanchez-Madrid, F., Nagy, J. A., Robbins, E., Simon, P. & Springer, T. A. A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha-subunits and a common beta-subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150,95 molecule. *J. Exp. Med.* **158**, 1785–1803 (1983).

41. LeBien, T. W. & Kersey, J. H. A monoclonal antibody (TA-1) reactive with human T lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.* **125**, 2208–14 (1980).
42. Krensky, A. M. *et al.* The functional significance, distribution, and structure of LFA-1, LFA-2, and LFA-3: cell surface antigens associated with CTL-target interactions. *J. Immunol.* **131**, 611–6 (1983).
43. Sanchez-Madrid, F., Simon, P., Thompson, S. & Springer, T. A. Mapping of antigenic and functional epitopes on the alpha- and beta-subunits of two related mouse glycoproteins involved in cell interactions, LFA-1 and Mac-1. *J. Exp. Med.* **158**, 586–602 (1983).
44. Pischel, K. D., Bluestein, H. G. & Woods, V. L. Very late activation antigens (VLA) are human leukocyte-neuronal crossreactive cell surface antigens. *J. Exp. Med.* **164**, 393–406 (1986).
45. Gromkowski, S. H., Krensky, a M., Martz, E. & Burakoff, S. J. Functional distinctions between the LFA-1, LFA-2, and LFA-3 membrane proteins on human CTL are revealed with trypsin-pretreated target cells. *J. Immunol.* **134**, 244–9 (1985).
46. Haskard, D., Cavender, D., Beatty, P., Springer, T. & Ziff, M. T lymphocyte adhesion to endothelial cells: mechanisms demonstrated by anti-LFA-1 monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **137**, 2901–6 (1986).
47. Lind, E. F., Prockop, S. E., Porritt, H. E. & Petrie, H. T. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J. Exp. Med.* **194**, 127–34 (2001).
48. Campana, D., Sheridan, B., Tidman, N., Hoffbrand, A. V. & Janossy, G. Human leukocyte function-associated antigens on lympho-hemopoietic precursor cells. *Eur. J. Immunol.* **16**, 537–42 (1986).
49. Petrie, H. T. Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 859–66 (2003).

50. Hogg, N. *et al.* How T cells use LFA-1 to attach and migrate. *Immunol. Lett.* **92**, 51–54 (2004).
51. Bose, T. O., Colpitts, S. L., Pham, Q.-M., Puddington, L. & Lefrançois, L. CD11a is essential for normal development of hematopoietic intermediates. *J. Immunol.* **193**, 2863–72 (2014).
52. Halin, C., Mora, J. R., Sumen, C. & von Andrian, U. H. In vivo imaging of lymphocyte trafficking. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 581–603 (2005).
53. Mitnacht, R., Tacke, M. & Hünig, T. Expression of cell interaction molecules by immature rat thymocytes during passage through the CD4+8+ compartment: developmental regulation and induction by T cell receptor engagement of CD2, CD5, CD28, CD11a, CD44 and CD53. *Eur. J. Immunol.* **25**, 328–32 (1995).
54. Swain, S. L., Dialynas, D. P., Fitch, F. W. & English, M. Monoclonal antibody to L3T4 blocks the function of T cells specific for class 2 major histocompatibility complex antigens. *J. Immunol.* **132**, 1118–23 (1984).
55. Savino, W. The Thymus Is a Common Target Organ in Infectious Diseases. *PLoS Pathog.* **2**, e62 (2006).
56. Sakata, D. *et al.* Impaired T lymphocyte trafficking in mice deficient in an actin-nucleating protein, mDia1. *J. Exp. Med.* **204**, 2031–8 (2007).
57. Nal, B. *et al.* Coronin-1 expression in T lymphocytes: insights into protein function during T cell development and activation. *Int. Immunol.* **16**, 231–40 (2004).
58. Föger, N., Rangell, L., Danilenko, D. M. & Chan, A. C. Requirement for coronin 1 in T lymphocyte trafficking and cellular homeostasis. *Science* **313**, 839–42 (2006).
59. Hamann, A., Jablonski-Westrich, D. & Thiele, H. ???G. Contact interaction between lymphocytes is a general event following activation and is mediated by LFA-1. *Eur. J. Immunol.* **16**, 847–50 (1986).

60. Aoshi, T. *et al.* Bacterial entry to the splenic white pulp initiates antigen presentation to CD8+ T cells. *Immunity* **29**, 476–86 (2008).
61. Fischer, A. *et al.* Deficiency of the adhesive protein complex lymphocyte function antigen 1, complement receptor type 3, glycoprotein p150,95 in a girl with recurrent bacterial infections. Effects on phagocytic cells and lymphocyte functions. *J. Clin. Invest.* **76**, 2385–92 (1985).
62. de la Roche, M., Asano, Y. & Griffiths, G. M. Origins of the cytolytic synapse. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 421–32 (2016).
63. Hamann, D. *et al.* Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* **186**, 1407–18 (1997).
64. Sanchez-Ruiz, Y., Valitutti, S. & Dupre, L. Stepwise maturation of lytic granules during differentiation and activation of human CD8+ T lymphocytes. *PLoS One* **6**, e27057 (2011).
65. Grakoui, a, Donermeyer, D. L., Kanagawa, O., Murphy, K. M. & Allen, P. M. TCR-independent pathways mediate the effects of antigen dose and altered peptide ligands on Th cell polarization. *J. Immunol.* **162**, 1923–30 (1999).
66. Krensky, a M. *et al.* Heritable lymphocyte function-associated antigen-1 deficiency: abnormalities of cytotoxicity and proliferation associated with abnormal expression of LFA-1. *J. Immunol.* **135**, 3102–8 (1985).
67. Kohl, S., Loo, L. S., Schmalstieg, F. S. & Anderson, D. C. The genetic deficiency of leukocyte surface glycoprotein Mac-1, LFA-1, p150,95 in humans is associated with defective antibody-dependent cellular cytotoxicity in vitro and defective protection against herpes simplex virus infection in vivo. *J. Immunol.* **137**, 1688–94 (1986).
68. Kohl, S., Springer, T. A., Schmalstieg, F. C., Loo, L. S. & Anderson, D. C. Defective natural killer cytotoxicity and polymorphonuclear leukocyte antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with LFA-1/OKM-1 deficiency. *J. Immunol.* **133**, 2972–8 (1984).

69. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708–12 (1999).
70. Reichardt, P. *et al.* A role for LFA-1 in delaying T-lymphocyte egress from lymph nodes. *EMBO J.* **32**, 829–43 (2013).
71. Kürzinger, K. *et al.* A novel lymphocyte function-associated antigen (LFA-1): cellular distribution, quantitative expression, and structure. *J. Immunol.* **127**, 596–602 (1981).
72. Springer, T. A. *et al.* LFA-1 and L<sup>y</sup>t-2,3, molecules associated with T lymphocyte-mediated killing; and Mac-1, an LFA-1 homologue associated with complement receptor function. *Immunol. Rev.* **68**, 171–95 (1982).
73. Dustin, M. L., Bivona, T. G. & Philips, M. R. Membranes as messengers in T cell adhesion signaling. *Nat. Immunol.* **5**, 363–72 (2004).
74. Kürzinger, K. & Springer, T. A. Purification and structural characterization of LFA-1, a lymphocyte function-associated antigen, and Mac-1, a related macrophage differentiation antigen associated with the type three complement receptor. *J. Biol. Chem.* **257**, 12412–8 (1982).
75. Qu, A. & Leahy, D. J. Crystal structure of the I-domain from the CD11a/CD18 (LFA-1, alpha L beta 2) integrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 10277–81 (1995).
76. Craig, D., Gao, M., Schulten, K. & Vogel, V. Structural insights into how the MIDAS ion stabilizes integrin binding to an RGD peptide under force. *Structure* **12**, 2049–58 (2004).
77. Keizer, G. D. *et al.* Biochemical and functional characteristics of the human leukocyte membrane antigen family LFA-1, Mo-1 and p150,95. *Eur. J. Immunol.* **15**, 1142–8 (1985).
78. Lu, C., Ferzly, M., Takagi, J. & Springer, T. a. Epitope mapping of antibodies to the C-terminal

- region of the integrin beta 2 subunit reveals regions that become exposed upon receptor activation. *J. Immunol.* **166**, 5629–37 (2001).
79. Anderson, M. E., Tejo, B. a., Yakovleva, T. & Siahaan, T. J. Characterization of binding properties of ICAM-1 peptides to LFA-1: inhibitors of T-cell adhesion. *Chem. Biol. Drug Des.* **68**, 20–8 (2006).
80. Landis, R. C., Bennett, R. I. & Hogg, N. A novel LFA-1 activation epitope maps to the I domain. *J. Cell Biol.* **120**, 1519–27 (1993).
81. Leitinger, B. & Hogg, N. Effects of I domain deletion on the function of the beta2 integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *Mol. Biol. Cell* **11**, 677–90 (2000).
82. Binnerts, M. E. & van Kooyk, Y. How LFA-1 binds to different ligands. *Immunol. Today* **20**, 240–5 (1999).
83. Landis, R. C. *et al.* Involvement of the 'I' domain of LFA-1 in selective binding to ligands ICAM-1 and ICAM-3. *J. Cell Biol.* **126**, 529–37 (1994).
84. Ortlepp, S., Stephens, P. E., Hogg, N., Figdor, C. G. & Robinson, M. K. Antibodies that activate beta 2 integrins can generate different ligand binding states. *Eur. J. Immunol.* **25**, 637–43 (1995).
85. Kukic, P. *et al.* Structure and dynamics of the integrin LFA-1 I-domain in the inactive state underlie its inside-out/outside-in signaling and allosteric mechanisms. *Structure* **23**, 745–53 (2015).
86. Williams, M. J., Hughes, P. E., O'Toole, T. E. & Ginsberg, M. H. The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains. *Trends Cell Biol.* **4**, 109–12 (1994).
87. Ohkuro, M. & Hishinuma, I. The alpha integrin cytoplasmic motif KXGFFKR is essential for integrin-mediated leukocyte adhesion. *Int. J. Mol. Med.* **25**, 439–44 (2010).

88. Liu, C., Leclair, P., Yap, S. Q. & Lim, C. J. The membrane-proximal KXGFFKR motif of  $\alpha$ -integrin mediates chemoresistance. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 4334–45 (2013).
89. Coppelino, M., Leung-Hagesteijn, C., Dedhar, S. & Wilkins, J. Inducible interaction of integrin alpha 2 beta 1 with calreticulin. Dependence on the activation state of the integrin. *J. Biol. Chem.* **270**, 23132–8 (1995).
90. Kim, M., Carman, C. V & Springer, T. A. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* **301**, 1720–5 (2003).
91. Hu, P. & Luo, B. Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 transmembrane domain separation mediates bi-directional signaling across the plasma membrane. *PLoS One* **10**, e0116208 (2015).
92. Liu, S., Calderwood, D. A. & Ginsberg, M. H. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J. Cell Sci.* **113** ( Pt 2, 3563–71 (2000).
93. Rojiani, M. V, Finlay, B. B., Gray, V. & Dedhar, S. In vitro interaction of a polypeptide homologous to human Ro/SS-A antigen (calreticulin) with a highly conserved amino acid sequence in the cytoplasmic domain of integrin alpha subunits. *Biochemistry* **30**, 9859–66 (1991).
94. Leung-Hagesteijn, C. Y., Milankov, K., Michalak, M., Wilkins, J. & Dedhar, S. Cell attachment to extracellular matrix substrates is inhibited upon downregulation of expression of calreticulin, an intracellular integrin alpha-subunit-binding protein. *J. Cell Sci.* **107** ( Pt 3, 589–600 (1994).
95. Lee, J. O., Rieu, P., Arnaout, M. A. & Liddington, R. Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* **80**, 631–8 (1995).
96. Dimanche, M. ???T *et al.* LFA-1 beta-chain synthesis and degradation in patients with leukocyte-adhesive proteins deficiency. *Eur. J. Immunol.* **17**, 417–9 (1987).
97. Yuki, K., Astrof, N. S., Bracken, C., Soriano, S. G. & Shimaoka, M. Sevoflurane binds and

- allosterically blocks integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *Anesthesiology* **113**, 600–9 (2010).
98. Casasnovas, J. M., Springer, T. A., Liu, J. H., Harrison, S. C. & Wang, J. H. Crystal structure of ICAM-2 reveals a distinctive integrin recognition surface. *Nature* **387**, 312–5 (1997).
99. Song, G. *et al.* An atomic resolution view of ICAM recognition in a complex between the binding domains of ICAM-3 and integrin alphaLbeta2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3366–71 (2005).
100. Ostermann, G., Weber, K. S. C., Zerneck, A., Schröder, A. & Weber, C. JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat. Immunol.* **3**, 151–8 (2002).
101. Staunton, D. E., Dustin, M. L. & Springer, T. A. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* **339**, 61–4 (1989).
102. Marlin, S. D. & Springer, T. A. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* **51**, 813–9 (1987).
103. Rothlein, R., Dustin, M. L., Marlin, S. D. & Springer, T. a. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.* **137**, 1270–4 (1986).
104. Long, E. O. ICAM-1: getting a grip on leukocyte adhesion. *J. Immunol.* **186**, 5021–3 (2011).
105. Steiner, O. *et al.* Differential Roles for Endothelial ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in Shear-Resistant T Cell Arrest, Polarization, and Directed Crawling on Blood-Brain Barrier Endothelium. *J. Immunol.* **185**, 4846–4855 (2010).
106. Dustin, M. L. & Springer, T. A. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J. Cell Biol.* **107**, 321–31 (1988).

107. Yuki, K., Soriano, S. G. & Shimaoka, M. Sedative drug modulates T-cell and lymphocyte function-associated antigen-1 function. *Anesth. Analg.* **112**, 830–8 (2011).
108. Chamma, I., Rossier, O., Giannone, G., Thoumine, O. & Sainlos, M. Optimized labeling of membrane proteins for applications to super-resolution imaging in confined cellular environments using monomeric streptavidin. *Nat. Protoc.* **12**, 748–763 (2017).
109. Chakraborty, S. *et al.* FRET based quantification and screening technology platform for the interactions of leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *PLoS One* **9**, e102572 (2014).
110. Carman, C. V & Springer, T. A. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 547–56 (2003).
111. van Kooyk, Y. & Figdor, C. G. Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 542–7 (2000).
112. Evans, R. *et al.* Integrins in immunity. *J. Cell Sci.* **122**, 215–25 (2009).
113. Stewart, M., Thiel, M. & Hogg, N. Leukocyte integrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 690–6 (1995).
114. Hogg, N., Patzak, I. & Willenbrock, F. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 416–26 (2011).
115. Liu, X. *et al.* Endogenous tumor-reactive CD8<sup>+</sup> T cells are differentiated effector cells expressing high levels of CD11a and PD-1 but are unable to control tumor growth. *Oncoimmunology* **2**, e23972 (2013).
116. Traunecker, E. *et al.* Blocking of LFA-1 enhances expansion of Th17 cells induced by human CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup> nonclassical monocytes. *Eur. J. Immunol.* **45**, 1414–1425 (2015).
117. Stanley, P. *et al.* Intermediate-affinity LFA-1 binds alpha-actinin-1 to control migration at the leading edge of the T cell. *EMBO J.* **27**, 62–75 (2008).

118. Ma, Q. *et al.* Activation-induced conformational changes in the I domain region of lymphocyte function-associated antigen 1. *J. Biol. Chem.* **277**, 10638–41 (2002).
119. Peter, K. & O'Toole, T. E. Modulation of cell adhesion by changes in alpha L beta 2 (LFA-1, CD11a/CD18) cytoplasmic domain/cytoskeleton interaction. *J. Exp. Med.* **181**, 315–26 (1995).
120. Constantin, G. *et al.* Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* **13**, 759–69 (2000).
121. Lefort, C. T. *et al.* Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation. *Blood* **119**, 4275–82 (2012).
122. Springer, T. A. & Dustin, M. L. Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 107–15 (2012).
123. Katagiri, K., Shimonaka, M. & Kinashi, T. Rap1-mediated lymphocyte function-associated antigen-1 activation by the T cell antigen receptor is dependent on phospholipase C-gamma1. *J. Biol. Chem.* **279**, 11875–81 (2004).
124. Hogg, N., Patzak, I. & Willenbrock, F. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 416–26 (2011).
125. Zhang, Y. & Wang, H. Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology* **135**, 268–75 (2012).
126. Smith, A. *et al.* A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. *J. Cell Biol.* **170**, 141–51 (2005).
127. Moser, M., Legate, K. R., Zent, R. & Fässler, R. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* **324**, 895–9 (2009).
128. Hart, R., Stanley, P., Chakravarty, P. & Hogg, N. The kindlin 3 pleckstrin homology domain has

- an essential role in lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) integrin-mediated B cell adhesion and migration. *J. Biol. Chem.* **288**, 14852–14862 (2013).
129. Katagiri, K., Maeda, A., Shimonaka, M. & Kinashi, T. RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nat. Immunol.* **4**, 741–748 (2003).
130. Gérard, A., Mertens, A. E. E., van der Kammen, R. A. & Collard, J. G. The Par polarity complex regulates Rap1- and chemokine-induced T cell polarization. *J. Cell Biol.* **176**, 863–75 (2007).
131. Gomez, T. S. & Billadeau, D. D. T cell activation and the cytoskeleton: you can't have one without the other. *Adv. Immunol.* **97**, 1–64 (2008).
132. Shimaoka, M., Takagi, J. & Springer, T. A. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 485–516 (2002).
133. Dransfield, I., Cabañas, C., Craig, A. & Hogg, N. Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. *J. Cell Biol.* **116**, 219–26 (1992).
134. Campellone, K. G. & Welch, M. D. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 237–51 (2010).
135. Tomar, A. *et al.* Regulation of cell motility by tyrosine phosphorylated villin. *Mol. Biol. Cell* **15**, 4807–17 (2004).
136. Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C. & Plastino, J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol. Rev.* **94**, 235–63 (2014).
137. Dupré, L., Houmadi, R., Tang, C. & Rey-Barroso, J. T Lymphocyte Migration: An Action Movie Starring the Actin and Associated Actors. *Front. Immunol.* **6**, 586 (2015).
138. Klotzsch, E., Stiegler, J., Ben-Ishay, E. & Gaus, K. Do mechanical forces contribute to nanoscale membrane organisation in T cells? *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 822–9 (2015).

139. Chazeau, A. *et al.* Nanoscale segregation of actin nucleation and elongation factors determines dendritic spine protrusion. *EMBO J.* **33**, 2745–64 (2014).
140. Goley, E. D. & Welch, M. D. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 713–26 (2006).
141. Welch, M. D. & Way, M. Arp2/3-mediated actin-based motility: a tail of pathogen abuse. *Cell Host Microbe* **14**, 242–55 (2013).
142. Miki, H., Miura, K. & Takenawa, T. N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J.* **15**, 5326–35 (1996).
143. Nolz, J. C. *et al.* The WAVE2 complex regulates T cell receptor signaling to integrins via Abl- and CrkL-C3G-mediated activation of Rap1. *J. Cell Biol.* **182**, (2008).
144. Ochs, H. D. & Thrasher, A. J. The Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, 725–38; quiz 739 (2006).
145. Peacocke, M. & Siminovitch, K. A. Linkage of the Wiskott-Aldrich syndrome with polymorphic DNA sequences from the human X chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 3430–3 (1987).
146. Thrasher, A. J. & Burns, S. O. WASP: a key immunological multitasker. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 182–92 (2010).
147. Blundell, M. P. *et al.* Phosphorylation of WASp is a key regulator of activity and stability in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 15738–43 (2009).
148. Bouma, G. *et al.* Cytoskeletal remodeling mediated by WASp in dendritic cells is necessary for normal immune synapse formation and T-cell priming. *Blood* **118**, 2492–501 (2011).
149. De Meester, J., Calvez, R., Valitutti, S. & Dupré, L. The Wiskott-Aldrich syndrome protein

- regulates CTL cytotoxicity and is required for efficient killing of B cell lymphoma targets. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 1031–40 (2010).
150. Dupré, L. *et al.* Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity* **17**, 157–66 (2002).
151. Bouma, G., Burns, S. O. & Thrasher, A. J. Wiskott-Aldrich Syndrome: Immunodeficiency resulting from defective cell migration and impaired immunostimulatory activation. *Immunobiology* **214**, 778–90 (2009).
152. Ideses, Y., Brill-Karniely, Y., Haviv, L., Ben-Shaul, A. & Bernheim-Groswasser, A. Arp2/3 branched actin network mediates filopodia-like bundles formation in vitro. *PLoS One* **3**, e3297 (2008).
153. Ramesh, N., Antón, I. M., Hartwig, J. H. & Geha, R. S. WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 14671–6 (1997).
154. Gallego, M. D. *et al.* WIP and WASP play complementary roles in T cell homing and chemotaxis to SDF-1alpha. *Int. Immunol.* **18**, 221–32 (2006).
155. Fried, S. *et al.* Triple-color FRET analysis reveals conformational changes in the WIP-WASP actin-regulating complex. *Sci. Signal.* **7**, ra60 (2014).
156. de la Fuente, M. A. *et al.* WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 926–931 (2007).
157. Konno, A., Kirby, M., Anderson, S. A., Schwartzberg, P. L. & Candotti, F. The expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is dependent on WASP-interacting protein (WIP). *Int. Immunol.* **19**, 185–192 (2007).
158. Sasahara, Y. WASP-WIP complex in the molecular pathogenesis of Wiskott-Aldrich syndrome.

- Pediatr. Int.* **58**, 4–7 (2016).
159. Lanzi, G. *et al.* A novel primary human immunodeficiency due to deficiency in the WASP-interacting protein WIP. *J. Exp. Med.* **209**, 29–34 (2012).
160. Watanabe, Y. *et al.* T-cell receptor ligation causes Wiskott-Aldrich syndrome protein degradation and F-actin assembly downregulation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 648–655.e1 (2013).
161. Chou, H. *et al.* WIP regulates the stability and localization of WASP to podosomes in migrating dendritic cells. *Curr. Biol.* **16**, 2337–44 (2006).
162. Poulter, N. S. *et al.* Platelet actin nodules are podosome-like structures dependent on Wiskott-Aldrich syndrome protein and ARP2/3 complex. *Nat. Commun.* **6**, 7254 (2015).
163. Labno, C. M. *et al.* Itk functions to control actin polymerization at the immune synapse through localized activation of Cdc42 and WASP. *Curr. Biol.* **13**, 1619–1624 (2003).
164. Sims, T. N. *et al.* Opposing Effects of PKC $\zeta$  and WASp on Symmetry Breaking and Relocation of the Immunological Synapse. *Cell* **129**, 773–785 (2007).
165. Cannon, J. L. & Burkhardt, J. K. Differential roles for Wiskott-Aldrich syndrome protein in immune synapse formation and IL-2 production. *J. Immunol.* **173**, 1658–1662 (2004).
166. Kim, M., Carman, C. V., Yang, W., Salas, A. & Springer, T. A. The primacy of affinity over clustering in regulation of adhesiveness of the integrin  $\alpha_L\beta_2$ . *J. Cell Biol.* **167**, 1241–53 (2004).
167. Cambi, A. *et al.* Organization of the integrin LFA-1 in nanoclusters regulates its activity. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4270–81 (2006).
168. Ishibashi, M. *et al.* Integrin LFA-1 regulates cell adhesion via transient clutch formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **464**, 459–66 (2015).

169. Qin, J., Vinogradova, O. & Plow, E. F. Integrin bidirectional signaling: a molecular view. *PLoS Biol.* **2**, e169 (2004).
170. Blundell, M. P., Worth, A., Bouma, G. & Thrasher, A. J. The Wiskott-Aldrich syndrome: The actin cytoskeleton and immune cell function. *Dis. Markers* **29**, 157–75 (2010).
171. Westerberg, L. S. *et al.* Activating WASP mutations associated with X-linked neutropenia result in enhanced actin polymerization, altered cytoskeletal responses, and genomic instability in lymphocytes. *J Exp Med* **207**, 1145–1152 (2010).
172. Ochs, H. D., Filipovich, A. H., Veys, P., Cowan, M. J. & Kapoor, N. Wiskott-Aldrich Syndrome: Diagnosis, Clinical and Laboratory Manifestations, and Treatment. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **15**, 84–90 (2009).
173. Sanders, V. M., Snyder, J. M., Uhr, J. W. & Vitetta, E. S. Characterization of the physical interaction between antigen-specific B and T cells. *J. Immunol.* **137**, 2395–404 (1986).
174. Miller, a, Morse, H. C., Winkelstein, J. & Nathanson, N. The role of antibody in recovery from experimental rabies. I. Effect of depletion of B and T cells. *J. Immunol.* **121**, 321–326 (1978).
175. Alarcón, B., Mestre, D. & Martínez-Martín, N. The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering? *Immunology* **133**, 420–5 (2011).
176. Brossard, C. *et al.* Multifocal structure of the T cell - dendritic cell synapse. *Eur. J. Immunol.* **35**, 1741–53 (2005).
177. Monks, C. R., Freiberg, B. a, Kupfer, H., Sciaky, N. & Kupfer, a. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**, 82–86 (1998).
178. Comrie, W. a., Babich, A. & Burkhardt, J. K. F-actin flow drives affinity maturation and spatial organization of LFA-1 at the immunological synapse. *J. Cell Biol.* **208**, 475–91 (2015).
179. Hashimoto-Tane, A. *et al.* Micro-adhesion rings surrounding TCR microclusters are essential

- for T cell activation. *J. Exp. Med.* **213**, 1609–25 (2016).
180. Yokosuka, T. *et al.* Spatiotemporal Regulation of T Cell Costimulation by TCR-CD28 Microclusters and Protein Kinase C  $\beta$  Translocation. *Immunity* **29**, 589–601 (2008).
181. Yokosuka, T. & Saito, T. Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. *Immunol. Rev.* **229**, 27–40 (2009).
182. Comrie, W. A. & Burkhardt, J. K. Action and Traction: Cytoskeletal Control of Receptor Triggering at the Immunological Synapse. *Front. Immunol.* **7**, 68 (2016).
183. Zhu, J. *et al.* Structure of a Complete Integrin Ectodomain in a Physiologic Resting State and Activation and Deactivation by Applied Forces. *Mol. Cell* **32**, 849–861 (2008).
184. Theorell, J. *et al.* Sensitive and viable quantification of inside-out signals for LFA-1 activation in human cytotoxic lymphocytes by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **366**, 106–118 (2011).
185. Marlin, S. D., Morton, C. C., Anderson, D. C. & Springer, T. a. LFA-1 immunodeficiency disease. Definition of the genetic defect and chromosomal mapping of alpha and beta subunits of the lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) by complementation in hybrid cells. *J. Exp. Med.* **164**, 855–67 (1986).
186. Miedema, F. *et al.* Immunologic studies with LFA-1 and Mo1-deficient lymphocytes from a patient with recurrent bacterial infections. *J. Immunol.* **134**, 3075–3081 (1985).
187. Kaufmann, Y. & Berke, G. Monoclonal cytotoxic T lymphocyte hybridomas capable of specific killing activity, antigenic responsiveness, and inducible interleukin secretion. *J Immunol* **131**, 50–56 (1983).
188. Ritter, A. T. *et al.* Actin depletion initiates events leading to granule secretion at the immunological synapse. *Immunity* **42**, 864–76 (2015).
189. Stinchcombe, J. C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S. & Griffiths, G. M. Centrosome

- polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* **444**, 236–236 (2006).
190. Brown, A. C. N. *et al.* Remodelling of cortical actin where lytic granules dock at Natural Killer cell immune synapses revealed by super-resolution microscopy. *PLoS Biol.* **9**, (2011).
191. Ritter, A. T. *et al.* Cortical actin recovery at the immunological synapse leads to termination of lytic granule secretion in cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E6585–E6594 (2017).
192. Basu, R. *et al.* Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to Potentiate Target Cell Killing. *Cell* **165**, 100–110 (2016).
193. Nishida, N. *et al.* Activation of leukocyte beta2 integrins by conversion from bent to extended conformations. *Immunity* **25**, 583–94 (2006).
194. Kechkar, A., Nair, D., Heilemann, M., Choquet, D. & Sibarita, J. B. Real-Time Analysis and Visualization for Single-Molecule Based Super-Resolution Microscopy. *PLoS One* **8**, (2013).
195. Bates, M., Huang, B., Dempsey, G. T. & Zhuang, X. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science* **317**, (2007).
196. Whelan, D. R. & Bell, T. D. M. Image artifacts in Single Molecule Localization Microscopy: why optimization of sample preparation protocols matters. *Sci. Rep.* **5**, 7924 (2015).
197. Avilov, S. *et al.* In cellulo evaluation of phototransformation quantum yields in fluorescent proteins used as markers for single-molecule localization microscopy. *PLoS One* **9**, (2014).
198. Lukyanov, K. A., Chudakov, D. M., Lukyanov, S. & Verkhusha, V. V. Innovation: Photoactivatable fluorescent proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 885–91 (2005).
199. Shaner, N. C., Patterson, G. H. & Davidson, M. W. Advances in fluorescent protein technology. *J. Cell Sci.* **120**, 4247–60 (2007).

200. Ridley, A. J. Life at the leading edge. *Cell* **145**, 1012–1022 (2011).
201. Kiskowski, M. A., Hancock, J. F. & Kenworthy, A. K. On the use of Ripley's K-function and its derivatives to analyze domain size. *Biophys. J.* **97**, 1095–1103 (2009).
202. Rossy, J., Owen, D. M., Williamson, D. J., Yang, Z. & Gaus, K. Conformational states of the kinase Lck regulate clustering in early T cell signaling. *Nat. Immunol.* **14**, 82–89 (2012).
203. Owen, D. M. *et al.* PALM imaging and cluster analysis of protein heterogeneity at the cell surface. *J. Biophotonics* **3**, 446–454 (2010).
204. Kanchanawong, P. *et al.* Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* **468**, 580–584 (2010).
205. Shamri, R. *et al.* Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat. Immunol.* **6**, 497–506 (2005).
206. Cairo, C. W., Mirchev, R. & Golan, D. E. Cytoskeletal regulation couples LFA-1 conformational changes to receptor lateral mobility and clustering. *Immunity* **25**, 297–308 (2006).
207. Yi, J., Wu, X. S., Crites, T. & Hammer, J. A. Actin retrograde flow and actomyosin II arc contraction drive receptor cluster dynamics at the immunological synapse in Jurkat T cells. *Mol. Biol. Cell* **23**, 834–52 (2012).
208. Anikeeva, N. *et al.* Distinct role of lymphocyte function-associated antigen-1 in mediating effective cytolytic activity by cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 6437–42 (2005).
209. Somersalo, K. *et al.* Cytotoxic T lymphocytes form an antigen-independent ring junction. *J. Clin. Invest.* **113**, 49–57 (2004).
210. Monks, C. R. F., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N. & Kupfer, A. Pillars article: Three-

- dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*. 1998. 395: 82-86. *J. Immunol.* **194**, 4061–5 (1998).
211. Grakoui, a *et al.* The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221–7 (1999).
212. Kaizuka, Y., Douglass, A. D., Varma, R., Dustin, M. L. & Vale, R. D. Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 20296–20301 (2007).
213. Sarantos, M. R., Raychaudhuri, S., Lum, A. F. H., Staunton, D. E. & Simon, S. I. Leukocyte function-associated antigen 1-mediated adhesion stability is dynamically regulated through affinity and valency during bond formation with intercellular adhesion molecule-1. *J. Biol. Chem.* **280**, 28290–28298 (2005).
214. van Zanten, T. S. *et al.* Hotspots of GPI-anchored proteins and integrin nanoclusters function as nucleation sites for cell adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 18557–18562 (2009).
215. Nordenfelt, P., Elliott, H. L. & Springer, T. A. Coordinated integrin activation by actin-dependent force during T-cell migration. *Nat. Commun.* **7**, 13119 (2016).
216. Kumari, S. *et al.* Actin foci facilitate activation of the phospholipase C- $\gamma$  in primary T lymphocytes via the WASP pathway. *Elife* **4**, 1–31 (2015).
217. Tabdanov, E. *et al.* Micropatterning of TCR and LFA-1 ligands reveals complementary effects on cytoskeleton mechanics in T cells. *Integr. Biol. (Camb)*. **7**, 1272–84 (2015).
218. Stinchcombe, J. C., Bossi, G., Booth, S. & Griffiths, G. M. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* **15**, 751–761 (2001).
219. Calvez, R. *et al.* The wiskott-aldrich syndrome protein permits assembly of a focused immunological synapse enabling sustained T-cell receptor signaling. *Haematologica* **96**, 1415–

- 1423 (2011).
220. Vasconcelos, Z. *et al.* Individual Human Cytotoxic T Lymphocytes Exhibit Intraclonal Heterogeneity during Sustained Killing. *Cell Rep.* **11**, 1474–1485 (2015).
221. Fan, Z. & Ley, K. Leukocyte Adhesion Deficiency IV. Monocyte Integrin Activation Deficiency in Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **193**, 1075–7 (2016).
222. Kuijpers, T. W. *et al.* Leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1)/variant. A novel immunodeficiency syndrome characterized by dysfunctional beta2 integrins. *J. Clin. Invest.* **100**, 1725–33 (1997).
223. Smith, A. *et al.* The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration. *Immunol. Rev.* **218**, 135–146 (2007).
224. Bierer, B. E. & Burakoff, S. J. T cell adhesion molecules. *FASEB J.* **2**, 2584–90 (1988).
225. Serrador, J. M., Nieto, M. & Sánchez-Madrid, F. Cytoskeletal rearrangement during migration and activation of T lymphocytes. *Trends Cell Biol.* **9**, 228–292 (1999).
226. Wojcikiewicz, E. P., Abdulreda, M. H., Zhang, X. & Moy, V. T. Force spectroscopy of LFA-1 and its ligands, ICAM-1 and ICAM-2. *Biomacromolecules* **7**, 3188–95 (2006).
227. Del Pozo, M. A., Vicente-Manzanares, M., Tejedor, R., Serrador, J. M. & Sánchez-Madrid, F. Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3609–3620 (1999).
228. Bolomini-Vittori, M. *et al.* Regulation of conformer-specific activation of the integrin LFA-1 by a chemokine-triggered Rho signaling module. *Nat. Immunol.* **10**, 185–194 (2009).
229. Weber, K. S., Klickstein, L. B. & Weber, C. Specific activation of leukocyte beta2 integrins lymphocyte function-associated antigen-1 and Mac-1 by chemokines mediated by distinct pathways via the alpha subunit cytoplasmic domains. *Mol. Biol. Cell* **10**, 861–73 (1999).

230. Cascio, G. *et al.* CXCL12 Regulates through JAK1 and JAK2 Formation of Productive Immunological Synapses. *J. Immunol.* **194**, 5509–19 (2015).
231. Woolf, E. *et al.* Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces. *Nat. Immunol.* **8**, 1076–1085 (2007).
232. Molon, B. *et al.* T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat. Immunol.* **6**, 465–71 (2005).
233. Feigelson, S. W. *et al.* Kindlin-3 is required for the stabilization of TCR-stimulated LFA-1:ICAM-1 bonds critical for lymphocyte arrest and spreading on dendritic cells. *Blood* **117**, 7042–52 (2011).
234. Romanova, L. Y. & Mushinski, J. F. Central role of paxillin phosphorylation in regulation of LFA-1 integrins activity and lymphocyte migration. *Cell Adhes. Migr.* **5**, 457–462 (2011).
235. Burn, G. L. *et al.* Superresolution imaging of the cytoplasmic phosphatase PTPN22 links integrin-mediated T cell adhesion with autoimmunity. *Sci. Signal.* **9**, ra99 (2016).
236. Sengupta, P. *et al.* Probing protein heterogeneity in the plasma membrane using PALM and pair correlation analysis. *Nat. Methods* **8**, 969–975 (2011).
237. Basil, A. & Wassef, W. Confocal Endomicroscopy. in *Confocal Laser Microscopy - Principles and Applications in Medicine, Biology, and the Food Sciences* (InTech, 2013). doi:10.5772/55959

## **Organisation spatiale de LFA-1 à la synapse immunologique des lymphocytes T cytotoxiques : approches de microscopie de super-résolution.**

LFA-1 (Lymphocyte Function Associated antigen-1) est une intégrine centrale dans la fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> car elle permet la formation de la synapse immunologique avec les cellules cibles. La régulation de cette interaction cellulaire est contrôlée par la qualité de l'engagement de LFA-1 avec son ligand ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule-1). Un support clef au contrôle spatio-temporel de l'activation de LFA-1 est le cytosquelette d'actine corticale dans lequel est ancré LFA-1 par son domaine intracellulaire. Comment LFA-1 est organisée à la synapse immunologique et comment la coordination entre LFA-1 et cytosquelette d'actine s'opère de manière précise au sein des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques sont des questions non résolues. Le but de ce projet de thèse est d'étudier l'organisation précise de la distribution de LFA-1 à la synapse immunologique en relation avec l'actine corticale sous-jacente au contact entre lymphocytes T cytotoxiques et les cellules présentatrices d'antigènes. Pour ce faire, des approches de microscopies de super-résolution SIM (Structured Illumination Microscopy), dSTORM (direct STochastic Optical Reconstruction Microscopy) et TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence microscopy) ont été développées. Elles ont été appliquées à des lymphocytes T humains non transformés dérivés de contrôles sains et de patients atteints d'une immunodéficience congénitale, le Syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), caractérisé par un défaut de remodelage du cytosquelette d'actine à la synapse immunologique. L'emploi de l'approche de dSTORM en mode TIRF nous a permis de révéler que dans sa conformation activée, LFA-1 forme à la synapse une ceinture radiale composée de centaines de nano-clusters. L'intégrité du cytosquelette d'actine et notamment la protéine WASP s'avèrent importantes pour la formation de la ceinture de nano-clusters de LFA-1, comme le montre le défaut de formation de cette ceinture dans les lymphocytes de patients WAS. L'approche de SIM multi-couleur nous a permis de révéler le rôle de la ceinture de LFA-1 dans le confinement des granules lytiques. Par comparaison de marquages avec des anticorps spécifiques de différentes conformations de LFA-1, notre travail montre également que l'activation de LFA-1 s'opère de manière digitale, dans le sens où les nano-clusters fonctionnent comme des unités au sein desquelles l'activation de LFA-1 suit une loi du tout ou rien. En conclusion, ce travail de thèse démontre l'intérêt des approches de microscopie de super-résolution pour révéler des mécanismes clefs de l'activation des lymphocytes T et pour appréhender la nature des défauts à l'origine de dérèglements pathologiques de la fonction de ces cellules.

**Mots clés:** molécules d'adhésion, cytosquelette d'actine, microscopie de super-résolution, LFA-1, synapse immunologique

**Discipline:** Immunologie

---

## **Spatial organization of LFA-1 at the immunological synapse of cytotoxic T lymphocytes: super-resolution microscopy approaches.**

LFA-1 (Lymphocyte Function Associated antigen-1) is a central integrin in the function of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes since it allows the formation of the immunological synapse with target cells. The regulation of this cellular interaction is controlled by the quality of the engagement of LFA-1 with its ligand, ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule-1). A key support for the spatio-temporal control of LFA-1 activation is the cortical actin cytoskeleton in which LFA-1 is anchored by its intracellular domain. How LFA-1 is organized at the immunological synapse and how the coordination between LFA-1 and actin cytoskeleton operates accurately within cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are unresolved issues. The aim of this thesis project is to study the precise organization of the LFA-1 distribution at the immunological synapse in relation to the cortical actin underlying the contact between cytotoxic T lymphocytes and target cells. For this purpose, super-resolution microscopy approaches, including SIM (Structured Illumination Microscopy), dSTORM (direct STochastic Optical Reconstruction Microscopy) and TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence microscopy) were developed. They were applied to untransformed human T lymphocytes derived from healthy donors and patients with a congenital immunodeficiency, the Wiskott-Aldrich Syndrome (WAS), characterized by actin cytoskeleton remodeling defects at the synapse. The use of the dSTORM approach revealed that activated LFA-1 forms a radial belt composed of hundreds of nanoclusters. The assembly of this belt depends on the integrity of the actin cytoskeleton, as shown by the impairment of this structure in the T lymphocytes derived from the WAS patients. The multi-color SIM approach allowed us to investigate the role of the LFA-1 belt in the confinement of lytic granules. Furthermore, the combination of staining with antibodies specific of LFA-1 conformation states shows that LFA-1 activation is a digital process, whereby nanoclusters operate as units in which LFA-1 activation follows an on / off rule. In conclusion, this PhD work exemplifies the great asset of super-resolution microscopy approaches to reveal key activation mechanisms in T lymphocytes and explore the nature of the defects causing pathological dysregulation of the function of these cells.

**Key words:** Adhesion molecules, actin cytoskeleton, super-resolution microscopy, LFA-1, immunological synapse

**Discipline:** Immunology