



Rôle des récepteurs au S1P et de leur combinatoire dans la migration des lymphocytes T : chez l'homme et chez la souris

Antoinette Neyra

► To cite this version:

Antoinette Neyra. Rôle des récepteurs au S1P et de leur combinatoire dans la migration des lymphocytes T : chez l'homme et chez la souris. Immunologie. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1268 . tel-03884129

HAL Id: tel-03884129

<https://theses.hal.science/tel-03884129>

Submitted on 5 Dec 2022

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.



N° d'ordre NNT : 2020LYSE1268

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (ED BMIC)

Spécialité de doctorat : Immunologie
Discipline : Biologie

Soutenue publiquement le 04/12/2020, par :
Antoinette NEYRA

**ROLE DES RECEPTEURS AU S1P ET DE LEUR COMBINATOIRE
DANS LA MIGRATION DES LYMPHOCYTES T,
CHEZ L'HOMME ET CHEZ LA SOURIS.**

Devant le jury composé de :

Dr Karl BALABANIAN, Directeur de recherche, INSERM, Paris, Rapporteur
Dr Emmanuel DONNADIEU, Directeur de recherche, CNRS, Paris, Rapporteur

Dr Ana-Maria LENNON-DUMÉNIL, Directrice de recherche, INSERM, Paris, Examinatrice
Dr Jacqueline MARVEL, Directrice de recherche, CNRS, Lyon, Examinatrice
Pr Jean-François NICOLAS, PU-PH, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, Examineur

Dr Thierry WALZER, Directeur de recherche, INSERM, Lyon, Directeur de thèse



N° d'ordre NNT : 2020LYSE1268

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (ED BMIC)

Spécialité de doctorat : Immunologie

Discipline : Biologie

Soutenue publiquement le 04/12/2020, par :

Antoinette NEYRA

ROLE DES RECEPTEURS AU S1P ET DE LEUR COMBINATOIRE DANS LA MIGRATION DES LYMPHOCYTES T, CHEZ L'HOMME ET CHEZ LA SOURIS.

Devant le jury composé de :

Dr Karl BALABANIAN, Directeur de recherche, INSERM, Paris, Rapporteur
Dr Emmanuel DONNADIEU, Directeur de recherche, CNRS, Paris, Rapporteur

Dr Ana-Maria LENNON-DUMÉNIL, Directrice de recherche, INSERM, Paris, Examinatrice
Dr Jacqueline MARVEL, Directrice de recherche, CNRS, Lyon, Examinatrice
Pr Jean-François NICOLAS, PU-PH, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, Examineur

Dr Thierry WALZER, Directeur de recherche, INSERM, Lyon, Directeur de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Résumé en Français

Le sphingosine-1-phosphate (S1P) régule la sortie des lymphocytes T des organes lymphoïdes secondaires (OLS). Sa forte concentration dans le sang et la lymphe permet d'attirer les lymphocytes T hors des OLS, où la concentration en S1P est faible. Le S1P peut se lier à cinq récepteurs membranaires (S1PR1-5) exprimés en combinaisons variables par les différentes sous-populations de lymphocytes T. On connaît actuellement assez mal le rôle du S1P dans la recirculation lymphocytaire chez l'homme, ainsi que le rôle des combinaisons des S1PR dans ce contexte. **Nous souhaitons donc comprendre comment les récepteurs au S1P et leur combinaison régulent la migration des lymphocytes T.** Nous avons précédemment souligné l'existence d'un antagonisme entre S1PR1 et S1PR2 dans le contrôle de la sortie des lymphocytes T des OLS. Il a également été montré que, si S1PR1 était essentiel à la migration des lymphocytes T naïfs, les lymphocytes Natural Killer utilisaient préférentiellement S1PR5 pour sortir de la moelle osseuse et des OLS. De ce fait, ce projet de thèse se concentre sur deux axes : d'une part l'antagonisme fonctionnel entre S1PR1 et S1PR2, d'autre part la différence entre S1PR1 et S1PR5. Nous avons montré que la balance entre l'expression de S1PR1 et S1PR2 influençait fortement la réponse migratoire des Jurkat, S1PR1 réduisant la migration spontanée et augmentant la migration au S1P, et S1PR2 induisant l'effet inverse à faible dose de S1P. Nous avons également mis en évidence l'absence d'internalisation de S1PR5 par le S1P, à l'inverse de S1PR1 et S1PR2. Finalement, ces résultats soulignent des différences fonctionnelles entre les S1PR, qui permettent d'obtenir des réponses différentes à un même ligand.

Titre en Anglais

Role of S1P receptors and their combination in T cell migration, in human and mouse.

Résumé en Anglais

T cell exit from lymphoid organs is mediated by sphingosine-1-phosphate (S1P). S1P is produced at high concentration in blood and lymph and attracts T cells to promote their exit from primary or secondary lymphoid organs (PLO and SLO) wherein S1P concentration is low. S1P can bind to five G protein coupled receptors (S1PR1-5). Even though some of those receptors are already targeted in medical treatments such as multiple sclerosis, knowledge about S1P implication in human T cell trafficking as well as S1PR combination role in this context remain parcellar. Thus, **we want to decipher the role of S1PR and their combination in human T cell migration.** We previously highlighted the antagonism between S1PR1 and S1PR2 in the control of T cell egress from human SLO. Furthermore, contrary to S1PR1 requirement for naïve T cell migration, Natural Killer (NK) cells were shown to preferentially use S1PR5 to exit bone marrow and SLO. Therefore, this thesis project focuses on two axes : on one hand the functional antagonism between S1PR1 and S1PR2, on the other hand the differences between S1PR1 and S1PR5. The balance between S1PR1 and S1PR2 expression was

shown to impact Jurkat migratory response, with S1PR1 decreasing spontaneous migration and increasing migration towards S1P, and S1PR2 inducing the opposite effect at low concentrations of S1P. We also highlighted the inability of S1P to induced S1PR5 internalization, contrary to S1PR1 and S1PR2. Finally, these results underline functional differences between S1PR that lead to different cellular responses to the same ligand.

Discipline

Immunologie

Mots clés en Français

Lymphocyte T, migration, sphingosine-1-phosphate, récepteur au S1P.

Mots clés en Anglais

T cell, migration, sphingosine-1-phosphate, S1P receptor.

Intitulé et adresse du laboratoire

Équipe "Lymphocyte activation and signaling"

CIRI, INSERM U1111

21 Avenue Tony Garnier

69007 Lyon

REMERCIEMENTS

Aux membres de mon jury et de mon comité de suivi de thèse

Je remercie le Dr Karl Balabanian et le Dr Emmanuel Donnadieu d'avoir pris le temps de lire et de « rapporter » mon manuscrit, ainsi que le Dr Ana-Maria Lennon-Duménil, le Dr Jacqueline Marvel et le Pr Jean-François Nicolas d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je joins à ces remerciements le Dr Bruno Lucas et le Dr Bertrand Dubois qui, dans le cadre de mon comité de suivi de thèse, ont suivi l'évolution de ma thèse et m'ont apporté leurs conseils pour recadrer le projet et avancer de façon réaliste et concrète au cours de ces trois ans.

À mon directeur de thèse

Thierry, merci de m'avoir accordé ta confiance et d'avoir toujours cru en moi et en ce projet, surtout quand je remettais tout en question. J'ai énormément de chance d'avoir eu un directeur de thèse qui a su m'écouter et se rendre disponible. Merci pour ton dynamisme et pour tes idées, qui m'ont aidée à avancer et à en apprendre toujours davantage.

À la team Walzer

Un grand merci à toute la team pour cette ambiance de folie ! En intégrant la team Walzer, plus que des collègues, j'ai trouvé des amis. Le bureau du 5 et ses pauses café vont me manquer.

Anna, ma petite Anna. Ces quatre ans dans l'équipe Walzer n'auraient pas été les mêmes sans toi. Merci pour ton accueil et ton encadrement bienveillant lors de mon deuxième stage, pour toutes nos discussions dans le bureau quand on avait du mal à travailler, et merci pour ton aide technique tout au long de ce projet S1P, qui était le tien avant de devenir le mien. Tu as toujours su me reconforter dans les moments difficiles et te réjouir de mes réussites.

My PhD partners, Jiang & Marion, thanks for your support ! Jiang, I enjoyed spending the last four years with you. I am already missing all our talks and our badminton sessions. Have fun in the US, I hope we will soon meet again ! Marion, je me souviens encore du jour où tu es arrivée au labo. Après notre première discussion, Ommar m'a dit « elle, ça va devenir ta copine ! » et c'est bien ce qui s'est passé. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble, toutes mes blagues que tu as subies sans protester, les petites musiques d'ambiance dans le labo. Je te lègue ma place de thésarde aînée, prends bien soin des jeunes thésards et finis ta thèse en beauté !

Meine liebe Luise, I habe geschätzt, mit dir zu arbeiten. Vielen Dank für deine Hilfe bei diesem Projekt. I freue mich, dich in Frankfurt zu besuchen, wenn diese Covid19 Epidemie vorbei ist. Ich habe nicht vergessen : "Wenn man es nicht im Kopf hat, hat man es in den Beinen."

À tous les membres de la team Walzer, qui ont fait du labo un environnement de travail chaleureux et épanouissant. À Anne-Laure, merci pour tes précieux conseils en bio mol, qu'est-ce que j'aurais fait sans toi ! À Michelle, merci d'avoir réalisé tous ces clonages. À Sophie, pour nos longues et profondes discussions. À Aurore et aux filles du 2, Marie, Emilie, Yam, Laurie et Marine, qui sont parties avant moi mais avec qui j'ai passé de très bons moments au labo comme en dehors. J'espère que notre amitié continuera longtemps, même avec certain(e)s à l'autre bout du monde. À Antoine, Alex, Sébastien, Uzma, Marine et Magali. Kévin, Nicolas, Lucie, profitez à fond de ces années de thèse qui commencent (surtout de la première, après ça s'accélère !). Kévin, un grand merci pour nos longues discussions très productives de ces trois derniers mois, t'inquiète je dirai bien à Antoine que tu bosses dur sur tes analyses FlowJo ;p. Seb, merci de m'avoir accueillie dans le labo alors que, jeune stagiaire de M1, je découvrais le monde de la recherche.

Gaëlle, je te remercie ici parce que tu es presque une Walzer ;). Tu as la pièce culture pour toi toute seule maintenant, enjoy mais n'abuse pas des cinétiques ! Merci de t'être occupée de Smokey et Pinkie pendant nos absences (parce qu'il fallait bien s'aérer l'esprit loin du labo de temps en temps), et pour tous les dîners qu'on s'est organisés ! Je te souhaite beaucoup de bonheur avec ta petite famille, et une bonne fin de thèse, je sais que tu vas assurer.

Enfin, merci aux anciens et à tous les stagiaires qui ont contribué à la super ambiance de l'équipe pendant leur passage dans le labo.

À toutes les personnes impliquées de près ou de loin dans ce projet

Merci à Sébastien et Thibault pour votre disponibilité et vos conseils sur la plateforme de cytométrie. Je serais bien partie avec « mon » MACSQuant mais apparemment Marion est prête à prendre la relève pour s'occuper de lui après mon départ. Merci au personnel du PBES, en particulier Marie, David et Pierre, pour vous être occupés de mes souris. Merci également à Suzy pour tes précieux conseils lors du CRISPR/Cas9, et à Sophie et Victor pour les génotypages. Merci à Caroline de la plateforme de vectorologie pour toutes ces particules lentivirales qui m'ont bien servi. Merci à Emmanuel Bachy pour toutes les lignées T et B.

À mes amis

À mes Blebs d'amour, Cécile, Dounia et Soraya. Un énorme merci d'être des amies si précieuses sur lesquelles je peux compter en toutes circonstances, vous savez que c'est réciproque. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble, pour nos tours de table (ronde, s'il vous plaît !), nos encouragements mutuels pour avancer sur ce chemin de la thèse. Dounia et Soraya, merci de m'avoir fait tomber dans les K-dramas, maintenant même Ommar connaît PSJ, c'est dire si ça a occupé mes soirées ! Je vais enfin pouvoir regarder tous ceux que j'ai mis de côté ces dernières semaines. Cécile,

Dounia, courage pour la fin de vos thèses, vous allez vous en sortir en beauté (oui Dou, même toi ! Fighting !!).

À ma Comulette, merci d'être toujours là depuis la prépa (je me souviens encore de cette affreuse khôlle de physique ; sérieusement, qui s'intéresse à l'angle réalisé par la trajectoire d'une mouche rampant le long de la grande aiguille d'une horloge ? Sérieusement ??!) et de toujours m'accueillir si chaleureusement dans ton box.

Violette, merci pour nos longues discussions, ton écoute attentive et bienveillante, tes encouragements. Je suis sûre que tu réussiras à construire la voie qui te convient.

À Smokey et Pinkie

Parce que je suis libre de remercier qui je veux dans cette section, j'ai une pensée pour mes chats : mon seul contact « social » direct au début de la pandémie de Covid19, ils m'ont permis de survivre à la solitude du premier confinement et à la rédaction de mon manuscrit. Un merci tout particulier à Smokey qui m'a aidée à écrire ma thèse en s'allongeant régulièrement sur mon clavier. Si certaines parties de ce manuscrit sont incohérentes, ça doit être celles dont il s'est occupé.

À Ommar

Il paraît qu'on peut faire de belles rencontres dans ce labo ;). Je ne te remercierai jamais assez pour tout le soutien que tu m'as apporté tout au long de cette aventure. Merci d'avoir supporté mes doutes et mon stress, tu as toujours su trouver les mots pour me rassurer et me rebooster, même avec la distance (fichu coronavirus !). Ça n'a pas dû être facile tous les jours mais tu t'en es bien sorti ;). Merci pour tes conseils scientifiques (et powerpoint !), pour tes délicieux repas, pour les bouillottes et pour les infusions à la menthe. À tous ces beaux moments qu'on a vécus ensemble et à tous ceux qu'on vivra.

À ma famille

Enfin, un énorme et sincère merci à ma famille, qui m'a toujours soutenue dans tous mes choix. J'espère que la relecture de mon manuscrit n'a pas été trop difficile. Merci à mes chers frères et belles-sœurs pour ces discussions philosophiques dont vous seuls avez le secret, ces petits moments de bonheur, ces photos partagées et ces fous-rire (heureusement que Telegram existe !), un vrai soutien moral pendant ces trois ans de thèse. Maman, Papa, merci d'avoir toujours cru en moi, d'avoir su m'écouter, me rassurer, m'encourager. Je n'en serais pas là sans vous.

LISTE DES PUBLICATIONS

Article 1 :

Human Naive and Memory T Cells Display Opposite Migratory Responses to Sphingosine-1 Phosphate

Annabelle Drouillard, Antoinette Neyra, Anne-Laure Mathieu, Antoine Marçais, Mélanie Wencker, Jacqueline Marvel, Alexandre Belot and Thierry Walzer

The Journal of Immunology. 2018 ; 200:551-557
doi: 10.4049/jimmunol.1701278

Article 2 :

S1PR1 and S1PR2 regulate in opposite ways spontaneous and S1P-induced human T cell migration

Antoinette Neyra, Annabelle Drouillard, Luise Roser, Fabien Crauste, Anne-Laure Mathieu, Michelle Ainouze, Emmanuel Bachy, Laurent Genestier, Antoine Marçais and Thierry Walzer.

En préparation.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	15
LISTE DES TABLEAUX.....	16
LISTE DES ABREVIATIONS	17
AVANT-PROPOS	21
INTRODUCTION.....	23
I – Les lymphocytes T, cellules de l’immunité adaptative	23
1.1 Classification des lymphocytes T.....	23
1.1.1 Classification au sein des cellules lymphoïdes.....	23
1.1.2 Les différents types de lymphocytes T.....	24
1.2 Ontogenèse des lymphocytes T	27
1.2.1 Passage des pro-thymocytes de la moelle osseuse au thymus	27
1.2.2 Développement et maturation des lymphocytes T	30
1.3 Activation et fonctions des lymphocytes T.....	31
1.3.1 Activation des lymphocytes T naïfs.....	31
1.3.2 Génération de cellules mémoires.....	33
II – Le système S1P/S1PR, mécanisme clé dans la migration des lymphocytes T.....	35
2.1 Contrôle de la migration des lymphocytes T par les chimiokines.....	36
2.2 Le Sphingosine-1-Phosphate (S1P).....	39
2.2.1 Synthèse intracellulaire du S1P	40
2.2.2 Sécrétion du S1P dans le milieu extracellulaire	43
a) Origine du S1P dans le sang.....	43
b) Origine du S1P dans la lymphe	49
c) Origine du S1P dans les tissus	49
2.2.3 Création et maintien du gradient de concentration	50
2.3 Les récepteurs au S1P, acteurs de la migration lymphocytaire	52
2.3.1 S1PR1 (EDG-1/CD363/D1S3362/ECGF1)	53
2.3.2 S1PR2 (EDG-5/CTD-2369P2.2/GPCR13/DFNB68/H218/LPB2).....	55
2.3.3 S1PR3 (EDG-3/LPB3)	56
2.3.4 S1PR4 (EDG-6/LPC1/SLP4)	57
2.3.5 S1PR5 (EDG-8/LPB4/SPPR-1/SPPR-2/NRG-1)	58
2.4 Régulation des S1PR.....	59
2.4.1 Différentes combinaisons en fonction des types cellulaires	60
2.4.2 Régulation transcriptionnelle.....	60
2.4.3 Régulation post-traductionnelle : internalisation des S1PR.....	61
2.4.4 Régulation cyclique au cours de la recirculation des lymphocytes T	64
III - Circulation des lymphocytes T dans l’organisme	67
3.1 Distribution des lymphocytes T dans l’organisme	67
3.1.1 Chez l’homme	67
3.1.2 Chez la souris	68
3.2 Sortie du thymus	69
3.3 Entrée dans les OLS	72
3.3.1 Définition des OLS.....	74
3.3.2 Structure d’un OLS : exemple des ganglions.....	75

3.3.3	Extravasation et entrée par les HEV	76
a)	Capture et <i>rolling</i> des lymphocytes T le long des HEV	77
b)	Activation des intégrines par les chimiokines	78
c)	Adhésion forte aux cellules endothéliales <i>via</i> LFA-1/ICAM-1	79
d)	Extravasation des lymphocytes T à travers l'endothélium des HEV	79
3.3.4	Entrée par la lymphe afférente	80
a)	Intravasation des lymphocytes T des tissus non-lymphoïdes dans la lymphe afférente	81
b)	Entrée dans les ganglions par la lymphe afférente	82
3.4	Contrôle de la mobilité et de la localisation des lymphocytes T au sein des ganglions	84
3.4.1	Capacité migratoire des lymphocytes T dans les tissus	84
3.4.2	Une migration aléatoire pour scanner l'environnement	85
3.4.3	Contrôle de la mobilité basale par les chimiokines	85
3.4.4	Contrôle de la localisation par le S1P	87
3.5	Impact de l'activation des lymphocytes T sur leur rétention dans les ganglions	89
3.6	Sortie des OLS	92
3.6.1	La sortie des ganglions est dépendante de S1PR1 et du gradient de S1P	92
3.6.2	Dynamique de migration à travers les sinusoides	93
3.6.3	Signaux de rétention empêchant la sortie des ganglions	95
3.6.4	Sortie des autres OLS	95
3.7	Le système S1P/S1PR dans la migration des lymphocytes T en condition pathologique	96
3.7.1	La migration S1P des lymphocytes T en contexte infectieux	96
3.7.2	La migration au S1P des lymphocytes T en contexte tumoral	98
3.7.3	Utilisation du système S1P/S1PR dans les traitements médicaux	99
OBJECTIFS DE TRAVAIL		101
RESULTATS		103
I – Étude <i>ex vivo</i> du rôle des S1PR dans la migration des lymphocytes T humains		103
II – Étude <i>in vitro</i> de l'antagonisme entre S1PR1 et S1PR2 dans la migration lymphocytaire		115
2.1	Article 2	115
2.2	Résultats complémentaires à l'article 2	145
2.2.1	Génération d'un anticorps anti-S1PR2 humain	145
2.2.2	Conséquences <i>in vivo</i> de la perte de S1PR2	146
a)	Impact de la délétion S1PR2 sur la localisation des lymphocytes dans l'organisme	146
b)	Impact de la délétion S1PR2 sur la migration des lymphocytes T	147
III – Comparaison des rôles de S1PR1 et S1PR5 dans la migration lymphocytaire		149
3.1	Impact de l'environnement sur la migration médiée par S1PR1 ou S1PR5	149
3.2	Comparaison des séquences C-terminales de S1PR1 et S1PR5	151
3.3	Etude de la sensibilité de S1PR1 et S1PR5 au S1P	152
3.4	Migration au S1P médiée par S1PR1 et S1PR5	154
3.4.1	Impact de S1PR1 et S1PR5 sur la migration au S1P	154
3.4.2	Rôle du gradient de S1P dans la migration médiée par S1PR1 et S1PR5	156
3.4.3	Existe-t-il un effet additif entre S1PR1 et S1PR5 ?	159
3.5	Test de nouveaux modèles	160
3.6	Expression <i>in vivo</i> de S1PR5	161
MATÉRIEL ET MÉTHODES COMPLÉMENTAIRES		163
DISCUSSION ET CONCLUSION		167
I – Les Jurkat S1PR-FLAG : un modèle pratique mais imparfait		168

1.1	Avantages du modèle	169
1.2	Limites du modèle	169
1.2.1	Validité physiologique d'une étude <i>in vitro</i>	169
1.2.2	Des paramètres difficilement contrôlables.....	170
1.3	Modèle de chimiotaxie.....	171
II – S1PR1 et S1PR2, un rôle vraiment antagoniste ?		173
1.1	S1PR1 et S1PR2 sont internalisés par le S1P.....	173
1.2	Quel(s) rôle(s) jouent S1PR1 et S1PR2 dans la migration des Jurkat ?	174
1.2.1	Rôle individuel des récepteurs	174
1.2.2	Régulation de la migration par la balance entre S1PR1 et S1PR2	177
1.3	Impact d'une délétion S1PR2 <i>in vivo</i>	178
III – Comparaison entre S1PR1 et S1PR5		181
1.1	S1PR1 induit une migration plus forte que S1PR5.....	181
1.1.1	Rôle individuel des récepteurs	181
1.1.2	Impact d'un co-expression de S1PR1 et S1PR5	181
1.2	Une différence majeure : l'internalisation par le S1P	182
1.2.1	S1PR5 n'est pas internalisé par le S1P	182
1.2.2	La migration médiée par S1PR5 semble pourtant sensible au S1P extracellulaire.....	183
1.2.3	La désensibilisation n'est pas forcément suivie d'une internalisation	183
1.3	Expression <i>in vivo</i> de S1PR5	184
IV – Perspectives et conclusion		186
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		191

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Résumé schématique des principales connaissances concernant l'implication du système S1P/S1PR dans la circulation des lymphocytes T chez la souris.....	22
Figure 2 : Les lignées lymphoïdes innées et adaptatives chez la souris	24
Figure 3 : Les sous-types de lymphocytes T $\alpha\beta$ CD4+.....	25
Figure 4 : Induction de la cytotoxicité cellulaire par les LTc.....	26
Figure 5 : Migration transendothéliale des progéniteurs des lymphocytes T du sang vers le thymus.	28
Figure 6 : Développement des lymphocytes T dans le thymus.	29
Figure 7 : Activation des lymphocytes T.....	32
Figure 8 : Génération des lymphocytes T mémoires.....	33
Figure 9 : Trajet des lymphocytes T dans l'organisme.	35
Figure 10 : Structure moléculaire des chimiokines : exemple de CCL19.....	36
Figure 11 : Activation et régulation des RCPG.....	37
Figure 12 : Voies de signalisation activées par la fixation de CCL19 et CCL21 sur leur récepteur CCR7.	39
Figure 13 : Molécule de S1P	40
Figure 14 : Synthèse intracellulaire du S1P.	41
Figure 15 : Principales sources de S1P dans le sang.....	44
Figure 16 : Mécanismes d'export du S1P	46
Figure 17 : Origine du S1P dans la lymphe.	48
Figure 18 : Principales sources de S1P dans les tissus.....	50
Figure 19 : Phylogénie des S1PR.....	53
Figure 20 : Structure 3D de S1PR1.	54
Figure 21 : Voies de signalisation induites par les S1PR.....	56
Figure 22 : Expression ARNm des S1PR par les lymphocytes T, B et NK murins.	60
Figure 23 : Internalisation et dégradation ou recyclage de S1PR1.....	61
Figure 24 : Régulation de l'expression membranaire de S1PR1 par CD69.	63
Figure 25 : Régulation cyclique de l'expression membranaire de S1pr1 par les lymphocytes T murins.	65
Figure 26 : Recirculation des lymphocytes T naïfs et mémoires.	68
Figure 27 : Sortie des lymphocytes T matures du thymus chez la souris.	70
Figure 28 : Voies d'entrée et de sortie des ganglions lymphatiques.....	73
Figure 29 : Tissus et organes lymphatiques centraux et périphériques.	74
Figure 30 : Structure du ganglion lymphatique.....	75
Figure 31 : Migration transendothéliale à travers les HEV.....	77
Figure 32 : Les HEV retiennent les lymphocytes dans des poches formées par les cellules endothéliales.	80
Figure 33 : Migration amiboïde des lymphocytes T.	83
Figure 34 : Le S1P régule le positionnement des lymphocytes Tfh et B dans les follicules B et les centres germinatifs des ganglions.	88
Figure 35 : Contrôle de la rétention et de la sortie des ganglions par CCR7 et S1PR1...90	
Figure 36 : La sortie des lymphocytes T des ganglions dépend de S1PR1 et du gradient de S1P.....	93
Figure 37 : Effets antagonistes de S1PR1 et S1PR2 sur la migration des lymphocytes T humains.....	104

Figure 38 : Génération d'anticorps anti-S1PR2.	145
Figure 39 : Exemple de marquage par les anticorps anti-S1PR2 en phase de test.....	146
Figure 40 : Répartition des populations de lymphocytes dans les organes de souris S1PR2-KO.....	147
Figure 41 : Migration au S1P des lymphocytes T S1PR2-KO murins.....	148
Figure 42 : Migration au S1P des lymphocytes T et NK humains et murins.	150
Figure 43 : Comparaison des domaines intracellulaires 4 (correspondant à la queue C-ter) de S1PR1 et S1PR5.....	151
Figure 44 : Sensibilité de S1PR1 et S1PR5 à l'internalisation médiée par le S1P.....	153
Figure 45 : Rôle de S1PR1 et S1PR5 dans la migration S1P des Jurkat.	154
Figure 46 : Impact d'une surexpression de S1PR1 ou S1PR5 sur la migration S1P-indépendante des Jurkat.	155
Figure 47 : Impact du temps de privation de sérum sur la migration des Jurkat.	157
Figure 48 : Impact d'une pré-incubation au S1P sur la migration des Jurkat.	158
Figure 49 : Impact d'une co-expression de S1PR1 et S1PR5 sur la migration des Jurkat.	159
Figure 50 : Impact d'une surexpression de S1PR1 sur la migration des HuT78.	161
Figure 51 : Expression in vivo de S1PR5 dans une souris S1PR5-FLAG chimère.....	162
Figure 52 : Schéma expérimental des tests de chimiotaxie	164
Figure 53 : Externalisation de S1PR1-, S1PR2- et S1PR5-FLAG lors d'une privation de sérum, dans les CEM ou les Jurkat.	170
Figure 54 : Migration S1P des Jurkat WT, S1PR1-FLAG et S1PR2-FLAG à travers des cellules endothéliales HMEC-1.....	172
Figure 55 : Comparaison des domaines intracellulaires 4 (correspondant à la queue C-ter) de S1PR1 et S1PR2.....	174
Figure 56 : Schéma expérimental de transfert adoptif.	178
Figure 57 : Impact d'une surexpression de S1PR4 sur la migration S1P des Jurkat.	180

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Marqueurs phénotypiques des sous-populations de lymphocytes T chez l'homme et chez la souris.....	30
Tableau 2 : Récepteurs à chimiokines pour lesquels a été identifiée une fonction dans la migration des lymphocytes T.....	38
Tableau 3 : Enzymes impliquées dans le maintien des gradients de concentration de S1P.....	52
Tableau 4 : Caractéristiques moléculaires des S1PR.	53
Tableau 5 : Distribution des sous-populations de lymphocytes T chez l'homme.	68

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABCA1	<i>ATP-binding cassette A1</i>
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messager
BALT	<i>Bronchus-associated lymphoid tissue</i>
Cas9	<i>CRISPR-associated protein 9</i>
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand</i>
CCR	<i>CC- chemokine receptor</i>
CD	Cluster de différenciation
CD40L	CD40 ligand
CD62L	L-sélectine
ChIP	Immunoprécipitation de chromatine
CLP	<i>Common lymphoid progenitor</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CRTAM	<i>Class I-restricted T cell-associated molecule</i>
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CXCL	<i>CXC-motif ligand</i>
CXCR	<i>CXC-chemokine receptor</i>
DC	<i>Dendritic cell</i>
DN	Stade double-négatif
DOP	4-deoxypyridoxine
DP	Stade double-positif
DTE	1,4-dithioerythritol
Edg	<i>Endothelial differentiation gene</i>
ESAM	<i>Endothelial selective adhesion molecule</i>
FASL	<i>Fas Ligand</i>
FcεRI	Récepteur aux IgE
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDC	Cellules dendritiques folliculaires
FRC	<i>Fibroblastic reticular cell</i>
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
GDP	Guanosine diphosphate
GPIb	Glycoprotéine Ib
GRK2	<i>G-protein coupled receptor kinase-2</i>
GTP	Guanosine triphosphate
HDL	<i>High density lipoproteins</i>
HEV	<i>High endothelial venules</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
ILC	<i>Innate lymphoid cell</i>

IV	Intra-veineux
JAK	Janus kinase
JAM	<i>Junctional adhesion molecule</i>
KLF2	<i>Kruppel-like factor 2</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LC-MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
LCMV	Virus de la chorioméningite lymphocytaire
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LPA	<i>Lysophosphatidic acid</i>
LPP3	<i>Lipid phosphate phosphatase 3</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LTc	Lymphocyte T cytotoxique
MAdCAM-1	<i>Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1</i>
MALT	<i>Mucosal-associated lymphoid tissue</i>
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MN	<i>Macrophage mannose receptor</i>
Nect2	<i>Nectin-like molecule-2</i>
NEM	N-ethylmaleimide
NK	Lymphocyte Natural Killer
OLP	Organe lymphoïde primaire
OLS	Organe lymphoïde secondaire
OLT	Organe lymphoïde tertiaire
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	Protéine-kinase C
PLC	Phospholipase C
Plt	<i>Paucity of lymph node T cells</i>
PLVAP	<i>Plasmalemma vesicle-associated protein</i>
PNA _d	<i>Peripheral node addressing</i>
Poly(I:C)	Acide polyinosine polycytidylrique
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand 1</i>
PTX	Toxine pertussique
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
S1P	Sphingosine-1-Phosphate
S1PR	Sphingosine-1-Phosphate Receptor
SGPP	S1P phosphatase
SP	Stade simple-positif
SPHK1/2	Sphingosine kinases 1 et 2
SPNS2	<i>Sphingolipid transporter 2</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
SVF	Sérum de veau fœtal
T _{CM}	Lymphocyte T mémoire central
TCR	Récepteur des cellules T
T _{eff}	Lymphocyte T effecteur

T _{EM}	Lymphocyte T effecteur mémoire
Tfh	Lymphocyte T follicular helper
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	Lymphocyte T helper
THI	2-acetyl-4-tetrahydroxybutylimidazole
TIL	<i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Treg	Lymphocyte T régulateur
T _{RM}	Lymphocyte T mémoire résident
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VE-cadherin	<i>Vascular endothelial cadherin</i>
VE-PTP	<i>VE-receptor protein tyrosine phosphatase</i>
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i>

AVANT-PROPOS

Le système immunitaire est le mécanisme de défense de l'organisme contre les microorganismes pathogènes, les toxines de l'environnement et les cellules tumorales. Il se compose de deux systèmes interconnectés agissant à différents niveaux de l'infection : la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative. La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense de l'organisme et comprend à la fois des barrières mécaniques, chimiques et cellulaires. C'est une réaction rapide et aspécifique, qui prend en charge les pathogènes dès leur tentative de pénétration dans l'organisme. Si dans la plupart des cas, cette réponse immunitaire innée est suffisante pour éliminer les pathogènes rencontrés, il arrive que la mise en place d'une seconde ligne de défense soit nécessaire pour lutter efficacement contre l'infection. Cette seconde ligne de défense, appelée **réponse immunitaire adaptative**, est spécifique du pathogène et génère une mémoire immunitaire à long terme. Elle est portée par les lymphocytes T et B.

Les **lymphocytes T** orientent la réponse immunitaire adaptative en induisant soit une réponse humorale *via* la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes, soit une réponse cellulaire *via* la différenciation des lymphocytes T CD8+ en lymphocytes cytotoxiques (LTc). Le rôle des lymphocytes T dans l'immunité est crucial ; un défaut dans leur fonctionnement entraîne un déficit immunitaire sévère. L'une des caractéristiques essentielles à la fonction des lymphocytes T est leur **mobilité**. En effet, ces derniers circulent continuellement dans l'organisme, principalement en passant du sang aux tissus et des tissus au sang. En cas de signal danger, ils doivent se rendre sur le lieu de l'infection. De ce fait, la compréhension des mécanismes contrôlant la migration des lymphocytes T permet de mieux appréhender le fonctionnement de la réponse immunitaire adaptative.

La circulation des lymphocytes T au sein de l'organisme est contrôlée par différentes molécules dites **chimiotactiques**, c'est-à-dire qu'elles procurent un signal attractif et guident les cellules pour l'entrée et la sortie des organes spécialisés dans l'immunité, les organes lymphoïdes. Par exemple, les chimiokines CCL19 et CCL21 indiquent aux lymphocytes T du sang la présence d'un ganglion lymphatique. À l'inverse, le lipide **sphingosine-1-phosphate (S1P)** constitue un signal essentiel à leur sortie de cet organe.

Ces dernières années ont vu l'émergence de nouvelles connaissances concernant la compréhension du rôle du S1P dans la migration lymphocytaire chez la souris. Ce dernier attire les lymphocytes T hors des ganglions grâce à un signal médié par S1pr1, l'un des **cinq récepteurs du S1P (S1PR)**. Cependant, ces progrès sont freinés par le peu d'outils disponibles pour l'étude de ces récepteurs. De ce fait, certaines questions subsistent. En particulier, on ne sait pas si ce mécanisme est applicable à l'homme. De

plus, on en sait très peu sur les potentielles interactions entre les cinq S1PR et leur implication dans le processus de migration.

Ces travaux de thèse ont donc pour objectif de mieux comprendre **comment les récepteurs au S1P et leur combinatoire régulent la migration des lymphocytes T**, en particulier chez l'homme. Une première partie introductive permettra de présenter les principaux acteurs de cette étude, les lymphocytes T et le système S1P/S1PR, ainsi que de préciser l'implication de ce dernier dans le contexte de la circulation des lymphocytes T. Cette partie sera suivie d'une présentation des principaux résultats obtenus lors de ces trois ans de doctorat, qui seront ensuite discutés tout en proposant de nouvelles pistes d'étude.

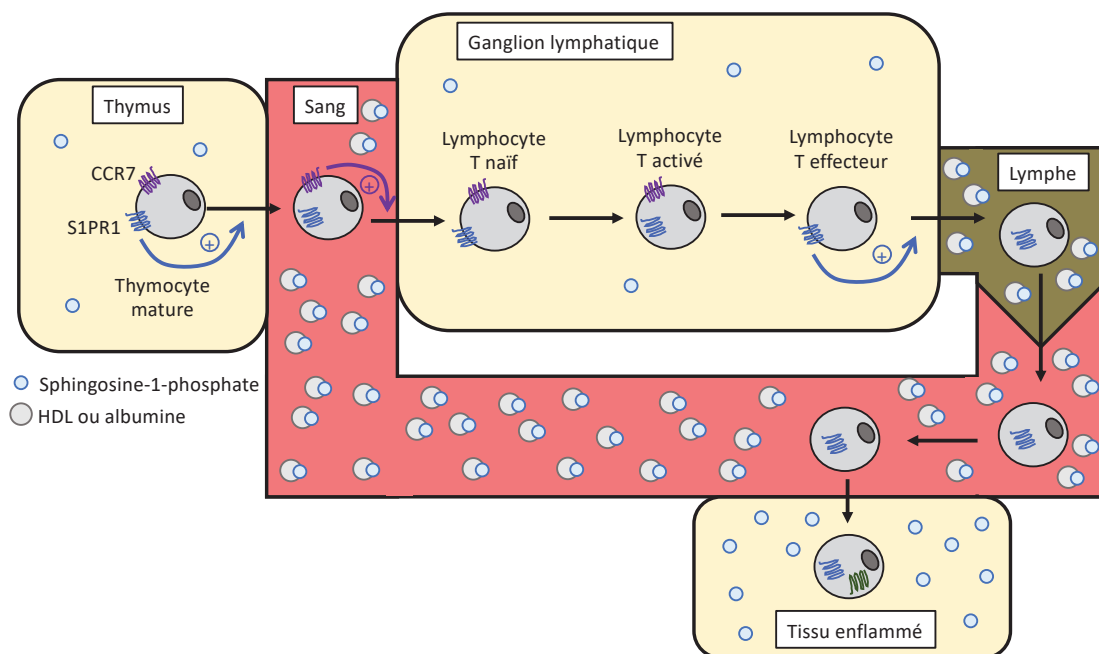


Figure 1 : Résumé schématique des principales connaissances concernant l'implication du système S1P/S1PR dans la circulation des lymphocytes T chez la souris.

INTRODUCTION

I – Les lymphocytes T, cellules de l'immunité adaptative

Les lymphocytes T sont des cellules hématopoïétiques impliquées dans l'immunosurveillance de l'organisme. Ils agissent par différents processus, comme l'activation de cellules immunitaires, la production de cytokines, ou encore l'induction de mort cellulaire par cytotoxicité. Ce sont des cellules hématopoïétiques exprimant à leur surface un récepteur des cellules T (TCR) de type $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$, capable de reconnaître des peptides présentés par les molécules du complexe d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou de classe II. La molécule du TCR est composée de deux chaînes codées par des gènes contenant de multiples segments (Schatz et al., 1992). Lors du développement des lymphocytes T, la recombinaison aléatoire entre ces segments permet la génération d'un grand répertoire de TCR pouvant reconnaître une multitude d'antigènes différents. Chaque lymphocyte T n'exprime qu'un seul type de TCR à sa surface, ce qui le rend spécifique d'un seul antigène. La reconnaissance d'un antigène étranger par le TCR *via* le complexe CMH-peptide induit l'activation des lymphocytes T.

Le TCR s'associe avec le cluster de différenciation (CD) 3 pour former le complexe TCR (Clevers et al., 1988; Klausner et al., 1990). Le CD3 est essentiel à la transduction de signaux à partir du TCR. Il est utilisé comme marqueur phénotypique des lymphocytes T. Les lymphocytes T expriment également à leur surface un co-récepteur, le CD4 ou le CD8, qui facilite et amplifie l'interaction entre les complexes TCR et CMH-peptide (Dembic et al., 1987; Gay et al., 1987). L'utilisation du CD4 et du CD8 comme marqueurs phénotypiques permet de différencier deux types de sous-population lymphocytaires, les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes T CD8+, que nous décrirons dans un paragraphe suivant.

1.1 Classification des lymphocytes T

Les lymphocytes T dérivent d'un progéniteur lymphoïde commun (CLP), lui-même généré à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH).

1.1.1 Classification au sein des cellules lymphoïdes

Le CLP est à l'origine de deux lignées lymphoïdes (Figure 2). Les cellules lymphoïdes innées (ILC) n'expriment pas de récepteur spécifique d'antigène. Elles sont divisées en trois sous-groupes : le groupe 1, dans lequel on retrouve ILC1 et les lymphocytes Natural Killer (NK), le groupe 2 avec les ILC2, et le groupe 3 avec les ILC3 (Spits et al., 2013; Vivier et al., 2018). La lignée lymphoïde adaptative est constituée des lymphocytes B et des lymphocytes T. Les lymphocytes B activés se différencient en

plasmocytes capables de sécréter des immunoglobulines (Ig) (Nutt et al., 2015). Les lymphocytes T peuvent être divisés en plusieurs sous-populations distinctes.

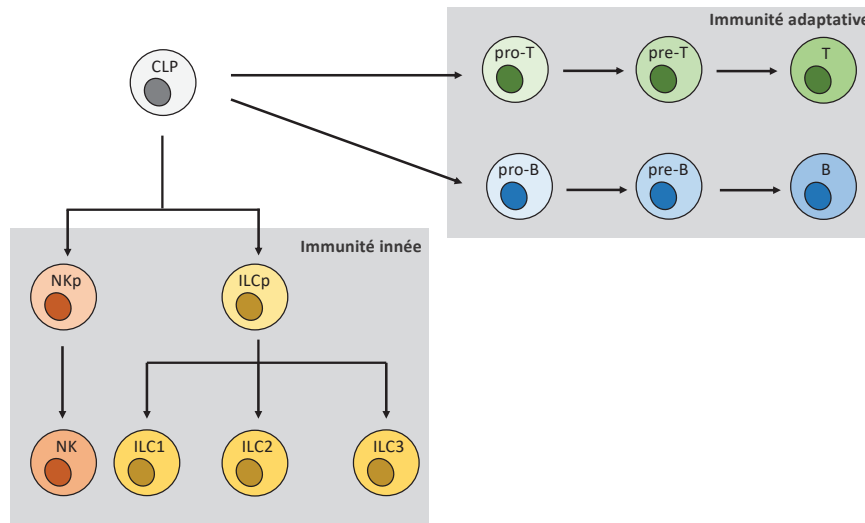


Figure 2 : Les lignées lymphoïdes innées et adaptatives chez la souris

Les lymphocytes des réponses innée et adaptative dérivent d'un progéniteur lymphoïde commun (CLP). La réception et l'expression de différents signaux spécifiques orientent la différenciation du CLP en lymphocyte T, B, Natural Killer (NK) ou en lymphocyte cytotoxique inné (ILC). Chez l'homme, l'existence d'un progéniteur commun aux ILC (ILCp) n'a pas été clairement définie. NKp : progéniteur des cellules Natural Killer.

(Adapté de Eberl et al., 2015)

1.1.2 Les différents types de lymphocytes T

On distingue plusieurs sous-populations de lymphocytes T. Les lymphocytes $T\alpha\beta$ expriment à leur surface un TCR de type $\alpha\beta$ et sont majoritaires parmi les lymphocytes T circulants. On les sépare en deux classes en fonction de leur expression de CD4 ou CD8. Les lymphocytes $T\gamma\delta$ ne représentent qu'environ 1-5% des lymphocytes T du sang. Enfin, les lymphocytes NKT présentent des caractéristiques communes aux lymphocytes T et aux lymphocytes NK.

- Les lymphocytes $T\alpha\beta$ CD4+

Les lymphocytes $T\alpha\beta$ CD4+ expriment à leur surface un TCR spécifique d'un complexe CMH de classe II-peptide. Ils sont capables d'activer d'autres cellules immunitaires *via* une interaction directe, en présentant à leur surface un complexe CMH de classe I-peptide, et/ou *via* la production de cytokines. Depuis leur découverte, différents types de lymphocytes T CD4+ ont pu être identifiés (Figure 3). Les lymphocytes T auxiliaires 1 (Th1 pour T helper 1) sont définis par la production d'interleukine (IL)-2 et d'interféron (IFN)- γ . Ils induisent la réponse cellulaire

adaptative par activation des lymphocytes T CD8+ et sont ainsi impliqués dans la réponse immunitaire contre les pathogènes intracellulaires (Del Prete et al., 1991; Itay et al., 2015; Mosmann et al., 1986). Les lymphocytes Th2 sécrètent de l'IL-4, IL-5 et IL-13. Ils induisent la réponse humorale en activant les lymphocytes B afin de lutter contre les parasites multicellulaires (Del Prete et al., 1991; Itay et al., 2015; Mosmann et al., 1986). Les lymphocytes Th9, producteurs d'IL-9, activent les mastocytes et les éosinophiles (Dardalhon et al., 2008; Tan and Gery, 2012; Veldhoen et al., 2008). Les lymphocytes Th17 produisent de l'IL-17 et agissent dans la réponse immunitaire contre les bactéries extracellulaires, les champignons et les pathogènes eucaryotes (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005). Les lymphocytes Th22 jouent un rôle dans la protection des barrières épithéliales des organes *via* la production d'IL-22 (Eyerich and Eyerich, 2015; Eyerich et al., 2009). Les lymphocytes T régulateurs (Treg) régulent la réponse immunitaire en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le transforming growth factor (TGF)- β (Dieckmann et al., 2001). Enfin, les lymphocytes T follicular helper (Tfh), localisés dans les follicules B des ganglions, produisent de l'IL-21 nécessaire à la maintenance et la maturation des lymphocytes B des centres germinaux (Crotty, 2014).

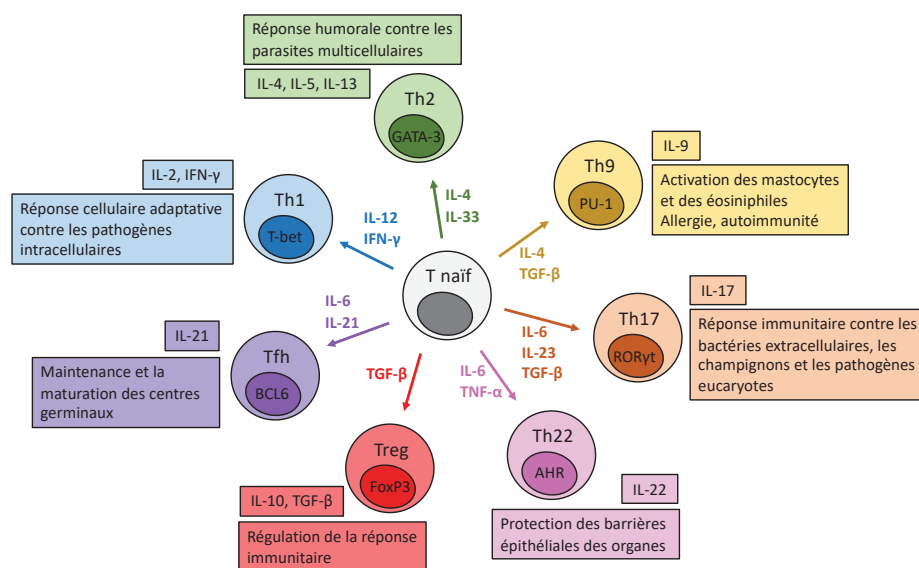


Figure 3 : Les sous-types de lymphocytes T $\alpha\beta$ CD4+

Les différents signaux cytokiniques reçus par les lymphocytes T CD4+ naïfs après stimulation antigénique orientent leur différenciation en lymphocytes T effecteurs. Ainsi, les voies de signalisation induites par les cytokines activent des facteurs de transcription spécifiques (indiqués ici dans le noyau des cellules) qui déclenchent la différenciation en un sous-type précis de lymphocyte T (indiqué ici dans le cytoplasme des cellules). Les sous-types de lymphocytes T CD4+ effecteurs produisent et sécrètent différentes cytokines et sont impliqués dans des réponses immunitaires variées.

(Adapté de Jiang and Dong, 2013)

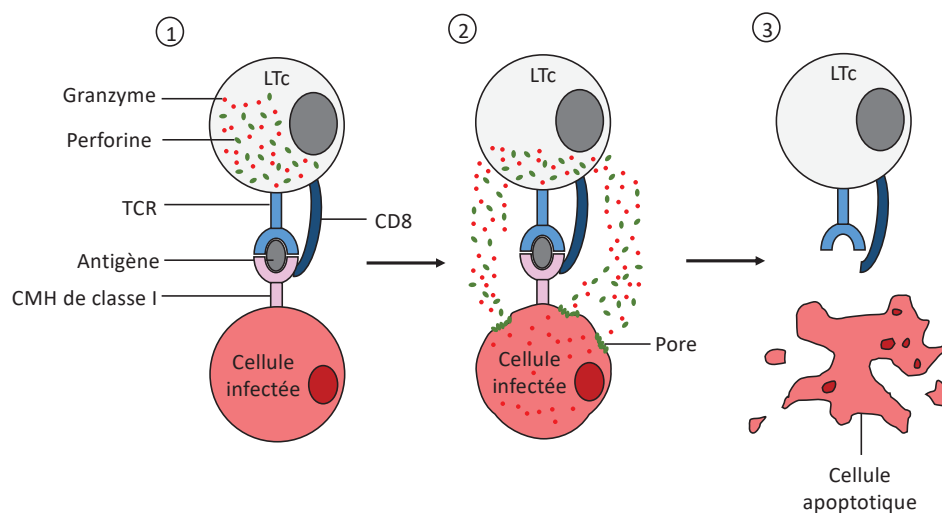


Figure 4 : Induction de la cytotoxicité cellulaire par les LTc.

(1) Le TCR du LTc reconnaît le complexe CMH de classe I-peptide présenté à la surface de la cellule infectée (ou tumorale). L'interaction formée entre le TCR et le complexe CMH-peptide est stabilisée par le CD8 du LTc. (2) Cette interaction déclenche le relargage de granules lytiques contenant des enzymes cytotoxiques par le LTc. Les perforines créent des pores dans la membrane de la cellule infectée, par lesquelles les granzymes pénètrent dans le cytosol. (3) Les granzymes déclenchent la mort par apoptose de la cellule cible. CMH : complexe majeur d'histocompatibilité ; LTc : lymphocyte T cytotoxique ; TCR : récepteur des cellules T.

- Les lymphocytes $T\alpha\beta$ CD8+

Les lymphocytes $T\alpha\beta$ CD8+ expriment à leur surface un TCR spécifique d'un complexe CMH de classe I-peptide. Une fois activés, ils se différencient en LTc capables de reconnaître les cellules infectées ou cancéreuses. Les LTc participent à la réponse immunitaire adaptative en induisant la lyse des cellules infectées ou tumorales par sécrétion de granules lytiques (perforine, granzyme) (Figure 4), en induisant la mort cellulaire programmée avec le système Fas /FasL, et en sécrétant les cytokines pro-inflammatoires $IFN\gamma$, $TNF\beta$ et $TNF\alpha$ (Andersen et al., 2006).

- Les lymphocytes $T\gamma\delta$

Également appelés lymphocytes T non conventionnels, les lymphocytes $T\gamma\delta$ sont fortement présents dans les tissus épithéliaux et reconnaissent des antigènes indépendamment du CMH. Ils interviennent dans les réponses immunitaires innée et adaptative *via* différents processus immunitaires (Fahl et al., 2014).

- Les lymphocytes NKT

Comme leur nom l'indique, les lymphocytes NKT présentent à la fois des marqueurs des lymphocytes T et NK. La plupart d'entre eux reconnaissent des

antigènes lipidiques et glycolipidiques présentés par la molécule CD1d. Activés, ils sécrètent des cytokines immunorégulatrices, l'IFN γ et l'IL-4, et agissent à la fois dans les réponses immunitaires innée et adaptative (Godfrey et al., 2000).

Nous nous intéressons ici aux lymphocytes T $\alpha\beta$ CD4+ ou CD8+, qui seront appelés lymphocytes T pour simplifier la lecture du texte.

1.2 Ontogenèse des lymphocytes T

Le développement des lymphocytes T est un processus complexe qui se déroule dans plusieurs compartiments. Les progéniteurs des lymphocytes T, appelés pro-thymocytes, migrent de la moelle osseuse jusqu'au thymus où ils se différencient en lymphocytes T matures naïfs. Ces lymphocytes T matures quittent ensuite le thymus pour rejoindre la circulation sanguine. Chez l'homme, contrairement à la souris, la thymopoïèse (génération de lymphocytes T matures dans le thymus) débute dès le stade fœtal, puis diminue avec l'âge, avec une réduction du tissu thymique qui est remplacé par du tissu adipeux (Steinmann, 1986).

1.2.1 Passage des pro-thymocytes de la moelle osseuse au thymus

Les pro-thymocytes (ou progéniteurs) sont produits dans la moelle osseuse à partir du CLP. Ils passent dans la circulation sanguine pour rejoindre le thymus, où a lieu leur différenciation en lymphocytes T matures. Le mécanisme et les acteurs moléculaires contrôlant leur sortie de la moelle osseuse restent à ce jour inconnus. Chez le rat et le poulet, il semblerait que les cellules épithéliales thymiques sécrètent une molécule chimiotactique, la thymotaxine, pour attirer les pro-thymocytes jusqu'au thymus (Imhof et al., 1988). Cependant, très peu d'études se sont intéressées à ce signal.

Les pro-thymocytes rejoignent le thymus par le sang. Ils y pénètrent au niveau de la jonction cortico-médullaire par un processus d'extravasation composé de plusieurs étapes. D'abord, le P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) exprimé par les progéniteurs s'attache à son ligand, la P-sélectine de la membrane des cellules endothéliales, ralentissant ainsi le déplacement des progéniteurs dans le flux sanguin (Scimone et al., 2006) (Figure 5 – (1)). Les cellules roulent le long de l'endothélium. L'interaction PSGL-1/P-sélectine, ainsi que celle entre la chimiokine C-C motif chemokine ligand (CCL) 25 et son récepteur C-C motif chemokine receptor (CCR) 9, induisent l'activation des intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha L\beta 2$ des progéniteurs (Figure 5 – (2)). Cela permet une adhésion forte avec les protéines vascular cell adhesion molecule (VCAM) et intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) des cellules endothéliales, qui stoppe totalement le mouvement migratoire des pro-thymocytes (Figure 5 – (3)). Les

pro-thymocytes traversent alors l'endothélium des vaisseaux sanguins par diapédèse et entrent dans la zone cortico-médullaire du thymus (Figure 5 – (4)).

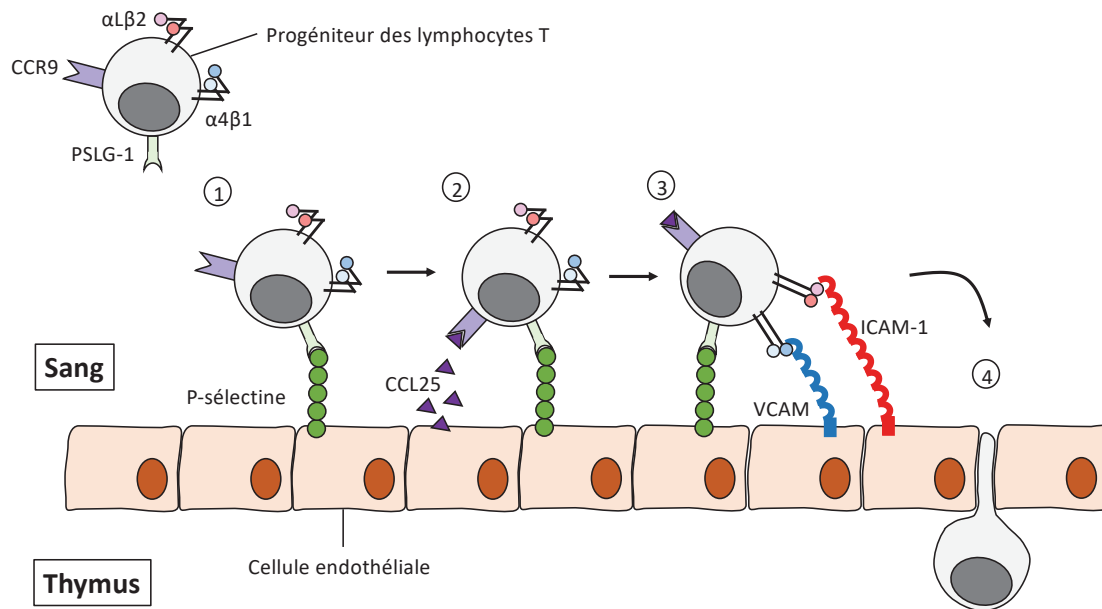


Figure 5 : Migration transendothéliale des progéniteurs des lymphocytes T du sang vers le thymus.

(1) *Rolling* : L'interaction entre le PSLG-1 des progéniteurs lymphocytes T et la P-sélectine des cellules endothéliales ralentit le mouvement des progéniteurs dans le sang. Les cellules roulent le long de l'endothélium. (2) *Activation* : La stimulation de CCR9 par fixation de son ligand la chimiokine CCL25 induit l'activation des intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha L\beta 2$ des progéniteurs. (3) *Adhésion forte* : Les intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha L\beta 2$ activées se fixent à VCAM et ICAM-1 respectivement. Ceci induit une adhésion forte des progéniteurs à l'endothélium vasculaire, qui stoppe totalement le déplacement des progéniteurs. (4) *Diapédèse* : Les progéniteurs des lymphocytes T traversent l'endothélium par diapédèse, de façon intracellulaire ou paracellulaire, et pénètrent ainsi dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire. CCL25 : C-C motif chemokine ligand 25 ; CCR9 : C-C motif chemokine receptor 9 ; ICAM-1 : intercellular adhesion molecule 1 ; PSLG-1 : P-selectin glycoprotein ligand 1 ; VCAM : vascular cell adhesion molecule.

(Adapté de Scimone et al., 2006)

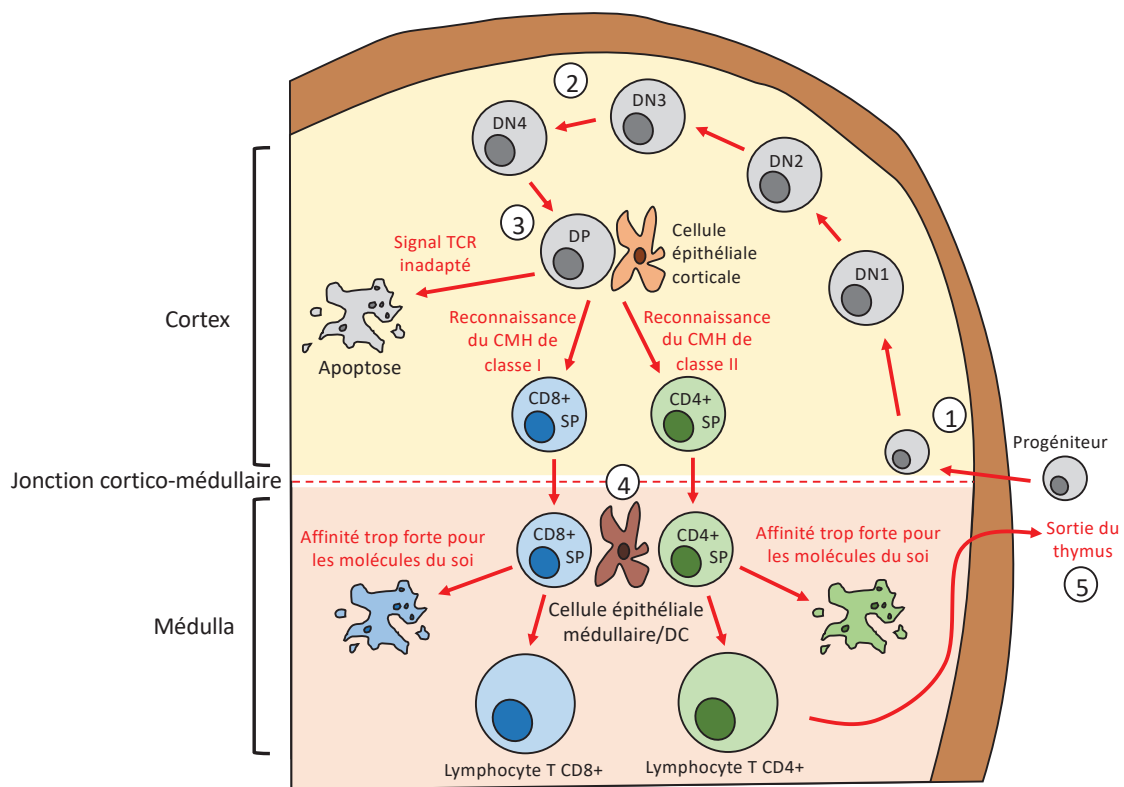


Figure 6 : Développement des lymphocytes T dans le thymus.

(1) Les progéniteurs des lymphocytes T entrent dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire. (2) À leur entrée, ils sont au stade double-négatif (DN), c'est à dire qu'ils n'expriment ni CD4, ni CD8. Tout en migrant vers la zone sous-capsulaire du thymus, les progéniteurs passent par quatre stades DN à l'issue desquels ils acquièrent l'expression de CD4 et de CD8. Ils sont alors au stade double-positif (DP). (3) Dans le cortex, les thymocytes DP subissent une sélection positive : les thymocytes dont le TCR ne reconnaît pas le complexe CMH-peptide à la surface des cellules épithéliales corticales sont éliminés par apoptose. Les thymocytes dont le TCR reconnaît le CMH de classe I perdent l'expression du CD4, et à l'inverse ceux dont le TCR reconnaît le CMH de classe II perdent l'expression du CD8 : c'est le stade simple positif (SP). (4) Les thymocytes SP passent ensuite dans la médulla où ils subissent la sélection négative : les thymocytes auto-réactifs, dont le TCR possède une affinité trop forte pour une ou plusieurs molécule(s) du soi, sont éliminés par apoptose. Les thymocytes restants deviennent alors des lymphocytes T naïfs matures, capables de reconnaître une molécule de CMH couplée à un antigène étranger mais incapable d'être activés en présence de molécules du soi. (5) Les lymphocytes T naïfs matures migrent vers la jonction cortico-médullaire du thymus d'où ils rejoignent la circulation sanguine. CMH : complexe majeur d'histocompatibilité.

(Adapté de Germain, 2002)

1.2.2 Développement et maturation des lymphocytes T

À leur entrée dans le thymus, les pro-thymocytes sont à un stade dit double-négatif (DN), c'est-à-dire qu'ils n'expriment ni CD4, ni CD8 à leur surface. Ils n'expriment pas non plus de CD3 ni de TCR. Après leur entrée dans le thymus (Figure 6 – (1)), les pro-thymocytes migrent de la zone cortico-médullaire vers la zone sous-capsulaire (Lind et al., 2001) (Figure 6 – (2)). En même temps, ils acquièrent progressivement l'expression d'un TCR $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$, puis du CD4 et du CD8 : c'est le stade double-positif (DP) (Zúñiga-Pflücker and Lenardo, 1996). On parle alors de thymocytes. Les TCR réarrangés sont capables de reconnaître une multitude d'antigènes, y compris des antigènes du soi. Pour cette raison, il est nécessaire de mettre en place un processus de sélection des thymocytes ne reconnaissant que les antigènes étrangers. Les cellules épithéliales corticales ou médullaires, les macrophages et les cellules dendritiques (DC) que l'on retrouve dans le thymus procurent un microenvironnement favorable à la différenciation des thymocytes. Ces cellules interagissent avec les thymocytes pour permettre les différentes étapes de sélection.

La sélection se fait au cours d'une migration des thymocytes du cortex à la médulla. Dans le cortex a lieu la sélection positive (Benoist and Mathis, 1989) (Figure 6 – (3)) : seuls les thymocytes dont le TCR reconnaît avec une faible affinité les molécules de CMH reçoivent un signal de survie (Marrack and Kappler, 1997). Dans ce contexte, les thymocytes sélectionnés perdent l'expression du CD4 ou du CD8, en fonction de la molécule de CMH reconnue par leur TCR. Ils sont alors au stade simple-positif (SP).

Enfin, la sélection négative a lieu dans la médulla (Figure 6 – (4)). Cette fois-ci, les thymocytes reconnaissant avec une forte affinité des molécules du soi présentées par les molécules de CMH sont éliminés, afin ne pas libérer de lymphocytes T auto-réactifs dans la circulation sanguine (Page et al., 1996).

SOUS-POPULATION	HOMME	SOURIS
T naïf	CD45RA+ CD45RO- CCR7+ CD62L+	Cd44- Ccr7+ Cd62l+
T_{CM}	CD45RA- CD45RO+ CCR7+ CD62L+	Cd44+ Ccr7+ Cd62l+
T_{EM}	CD45RA- CD45RO+ CCR7- CD62L-	Cd44+ Ccr7- Cd62l-
T_{RM}	CD45RA- CD45RO+ CD62L- CCR7- CD69+ CD103+/-	Cd44+ Cd62l- Ccr7- Cd69+ Cd103+/-

Table 1 : Marqueurs phénotypiques des sous-populations de lymphocytes T chez l'homme et chez la souris.

Les lymphocytes T matures quittent le thymus pour rejoindre le sang (Figure 6 – (5)). Le mécanisme contrôlant cette sortie sera décrit par la suite. Ils sont alors dans un état dit naïf, identifié par le phénotype CD45RA⁺ CD45RO⁻ CCR7⁺ CD62L⁺ chez l'homme, et CD44⁻ CCR7⁺ CD62L⁺ chez la souris (Table 1).

1.3 Activation et fonctions des lymphocytes T

Les lymphocytes T qui sortent du thymus sont à l'état naïf, c'est-à-dire qu'ils n'ont jamais rencontré l'antigène dont ils sont spécifiques. Pour pouvoir agir dans une réponse immunitaire, ils doivent être activés en recevant plusieurs signaux : la reconnaissance d'un antigène étranger par le TCR, l'engagement d'un signal de co-stimulation par une interaction récepteur-ligand, et la stimulation par des cytokines. Cette activation a lieu dans des organes spécialisés, les organes lymphoïdes secondaires (OLS), et est suivie par des étapes de différenciation et de prolifération des lymphocytes T. En l'absence du signal co-stimulateur, les lymphocytes T qui rencontrent leur antigène spécifique entrent en anergie et ne peuvent plus être activés.

1.3.1 Activation des lymphocytes T naïfs

En cas d'infection par un micro-organisme pathogène, les cellules présentatrices d'antigène (CPA), généralement des DC, phagocytent les antigènes étrangers en périphérie (ou dans les OLS) et les dégradent en peptides qu'elles présentent sur leurs CMH à leur arrivée dans les OLS. Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ présents dans l'OLS scannent les complexes CMH-peptides avec leur TCR. Si l'un d'eux reconnaît l'antigène, son complexe TCR se retrouve engagé avec le complexe CMH de type II-peptide de la CPA (Figure 7). C'est le premier signal d'activation. L'interaction est stabilisée par plusieurs molécules de surface dont le co-récepteur CD4 ou CD8. Elle est suivie par la liaison de la molécule de co-stimulation CD28 du lymphocyte T avec les protéines B7.1 (CD80) ou B7.2 (CD86) exprimées par la CPA. C'est le deuxième signal d'activation, qui induit la sécrétion d'IL-2 par le lymphocyte T (Schwarz, 1992). Un troisième signal est requis pour la polarisation des lymphocytes T activés, c'est un signal cytokinique. Celui-ci dépend du type de lymphocyte T nécessaire pour orienter la réponse immunitaire spécifique. Ainsi, un signal composé des cytokines IL-12 et IFN γ est nécessaire pour générer des lymphocytes Th1, IL-4 et IL-13 pour des lymphocytes Th2, IL-4 et TGF β pour des lymphocytes Th9, TGF β et IL-6 pour des lymphocytes Th17, IL-6 et tumor necrosis factor (TNF) α pour des lymphocytes Th22, TGF β pour des lymphocytes Treg, IL-6 et IL-21 pour des lymphocytes Tfh (Jiang and Dong, 2013), et enfin IL-12 et IFN α/β pour des LTc (Curtsinger et al., 1999, 2005). Ces trois signaux induisent l'activation des lymphocytes T naïfs, déclenchant leur prolifération et leur différenciation en lymphocytes T effecteurs. En plus de la CPA, l'activation des lymphocytes T CD8⁺

nécessite l'intervention des lymphocytes T CD4+. Ces derniers, une fois activés, expriment à leur surface le CD40 ligand (CD40L). En se fixant à son récepteur, le CD40 de la CPA, il conditionne cette dernière (« *licensing* ») qui devient capable d'activer les lymphocytes T CD8+ (Bennett et al., 1998).

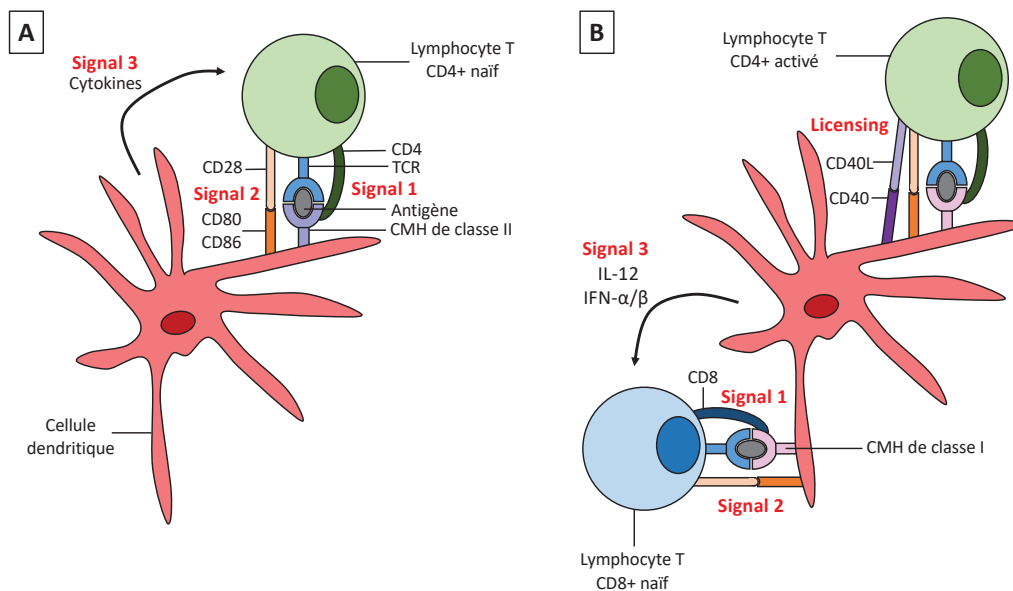


Figure 7 : Activation des lymphocytes T.

(A) L'activation des lymphocytes T CD4+ naïfs a lieu dans les OLS et nécessite trois signaux. Le signal 1 est produit par la reconnaissance par le TCR du complexe CMH de classe II-antigène dont il est spécifique, présenté par la CPA. L'interaction entre les deux complexes protéiques est stabilisée par le CD4 du lymphocyte T. Le signal 2 est induit par l'interaction entre CD28 et CD80 ou CD86. La polarisation par des cytokines constitue le signal 3. En cas d'absence d'un de ces trois signaux, le lymphocyte T devient anergique, c'est-à-dire incapable d'être activé. Ceci permet d'éviter l'activation de lymphocytes T auto-réactifs lorsqu'ils rencontrent la molécule du soi dont ils sont spécifiques lors de leur circulation dans l'organisme. (B) Une fois activés, les lymphocytes T CD4+ expriment à leur surface la molécule CD40L, qui se fixe au CD40 de la CPA. Celle-ci est alors conditionnée (c'est le « *licensing* ») pour activer les lymphocytes T CD8+. Le signal 1 est produit par l'interaction entre le TCR et le complexe CMH de classe I-antigène. Le signal 2 est l'interaction entre CD28 et CD80 ou CD86. Le signal 3 est induit par les cytokines IL-12 et IFN- α/β . Comme pour les lymphocytes T CD4+, l'absence du signal de co-stimulation rend le lymphocyte T anergique. CMH : complexe majeur d'histocompatibilité ; CPA : cellule présentatrice d'antigène ; IFN : interféron ; IL : interleukine ; OLS : organe lymphoïde secondaire ; TCR : récepteur des cellules T.

1.3.2 Génération de cellules mémoires

L'activation des lymphocytes T naïfs induit un processus de prolifération (phase d'expansion clonale) et de différenciation ayant lieu dans les OLS. Cette étape génère un grand nombre de lymphocytes T effecteurs qui sortent ensuite des OLS pour rejoindre les zones d'inflammation. A l'issue de cette réponse dite primaire, la majorité des lymphocytes T meurt (phase de contraction) et 5 à 20% d'entre eux persistent à long terme sous la forme de lymphocytes T mémoires (Kaech and Wherry, 2007) (Figure 8). Ces derniers peuvent être réactivés de façon facilitée s'ils rencontrent une nouvelle fois l'antigène dont ils sont spécifiques : c'est la réponse secondaire.

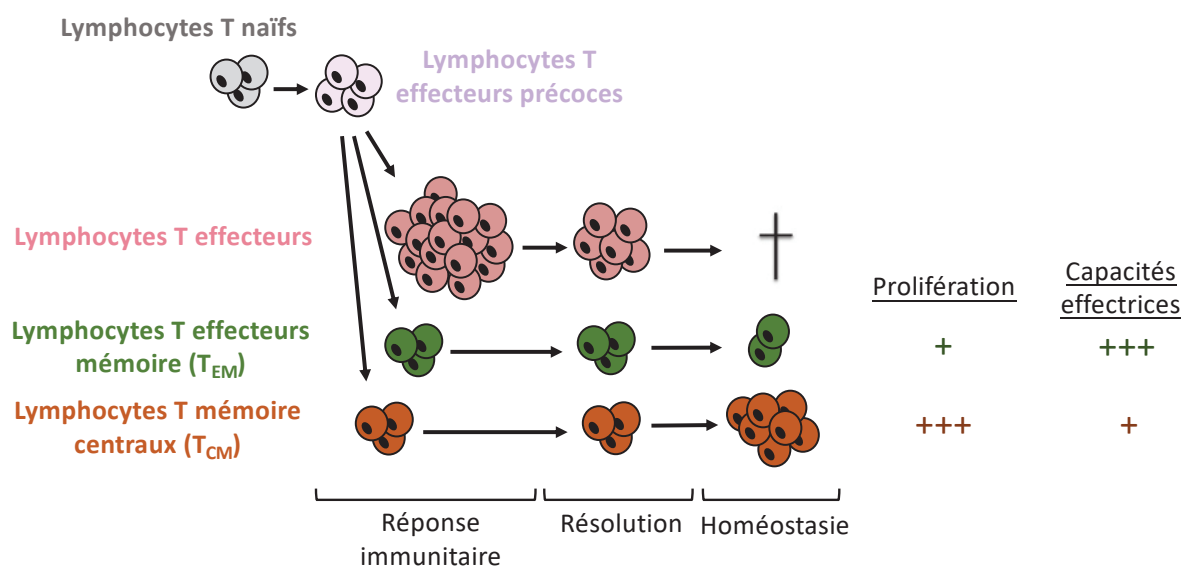


Figure 8 : Génération des lymphocytes T mémoires.

Lors de l'infection par un pathogène, les lymphocytes T naïfs rencontrent pour la première fois l'antigène dont ils sont spécifiques. Ils sont activés, prolifèrent et se différencient en lymphocytes T effecteurs qui se rendent sur le site de l'inflammation. C'est la réponse immunitaire primaire. Après résolution de l'inflammation, certains lymphocytes T activés persistent dans l'organisme en tant que lymphocytes T mémoires. Ces derniers ont une longue durée de vie et des capacités prolifératives et effectrices spécifiques. En cas de ré-infection par le même pathogène, ils peuvent être activés même en l'absence d'un des trois signaux d'activation, ce qui permet une réponse immunitaire adaptative rapide et efficace. C'est la réponse adaptative secondaire.

(Adapté de Obar and Lefrançois, 2010)

On distingue deux sous-populations principales de lymphocytes T mémoire : les lymphocytes T effecteurs mémoires (T_{EM}) CD45RA⁻ CD45RO⁺ CCR7⁻ CD62L⁻, et les lymphocytes T mémoires centraux (T_{CM}) CD45RA⁻ CD45RO⁺ CCR7⁺ CD62L⁺ (Sallusto et

al., 1999, 2004) (Table 1). Ces deux sous-populations ont des rôles complémentaires lors des réponses dites secondaires, les lymphocytes T_{CM} ayant de faibles capacités effectrices immédiates mais de fortes capacités prolifératives, tandis que les lymphocytes T_{EM} présentent des propriétés inverses (Sallusto et al., 1999, 2004). Chez la souris, les lymphocytes T_{EM} sont identifiés comme étant $Cd44^+ Ccr7^- Cd62l^-$ tandis que les lymphocytes T_{CM} sont $Cd44^+ Ccr7^+ Cd62l^+$ (Table 1).

Plus récemment, une troisième sous-population de lymphocytes T mémoires a été identifiée : les T mémoires résidents (T_{RM}). Comme les lymphocytes T_{EM} , ils sont $CD62L^- CCR7^-$, mais sont également $CD69^+ CD103^{+/-}$ (Table 1) (Schenkel and Masopust, 2014). Les lymphocytes T_{RM} résident exclusivement dans les tissus sans recirculer en périphérie. Ils permettent une réponse immunitaire rapide au niveau des interfaces et des muqueuses, et dans les tissus non-lymphoïdes. Le processus exact de génération des lymphocytes T_{RM} n'est pas encore bien compris, mais certaines études tendent à montrer que ce seraient des lymphocytes T effecteurs qui, après s'être rendus dans le tissu infecté, perdraient leur capacité à en sortir et deviendraient ainsi tissu-résidents (Hofmann and Pircher, 2011; Masopust et al., 2010).

L'activation des lymphocytes T lors de la réponse immunitaire a lieu dans les OLS. Cela implique que les lymphocytes T naïfs doivent, après leur maturation dans le thymus, rejoindre les OLS, puis en sortir pour se rendre sur le site de l'infection. Cette circulation est orchestrée par plusieurs cytokines et molécules chimiotactiques, dont le S1P, qui joue un rôle essentiel dans la sortie des lymphocytes T des OLS.

II – Le système S1P/S1PR, mécanisme clé dans la migration des lymphocytes T

Les lymphocytes T circulent continuellement entre le sang et les organes lymphoïdes pour identifier et éliminer d'éventuels pathogènes. Cette migration a lieu tout au long de leur vie : d'abord, les lymphocytes T naïfs sortent du thymus et patrouillent dans l'organisme (Figure 9). Ils se rendent d'OLS en OLS *via* la circulation sanguine pour scanner les antigènes présentés par les CPA. Cette étape nécessite leur déplacement à l'intérieur des OLS pour rejoindre des zones spécifiques. Si leur TCR reconnaît un complexe CMH-peptide, ils sont activés, prolifèrent, et se différencient en lymphocytes T effecteurs, qui migrent à nouveau dans le sang pour rejoindre le site infecté. Ensuite, les lymphocytes T mémoires persistent et continuent de patrouiller dans l'organisme. Cette circulation permanente entre les différents compartiments de l'organisme requiert un contrôle strict par différentes molécules chimiotactiques : les chimiokines et le S1P.

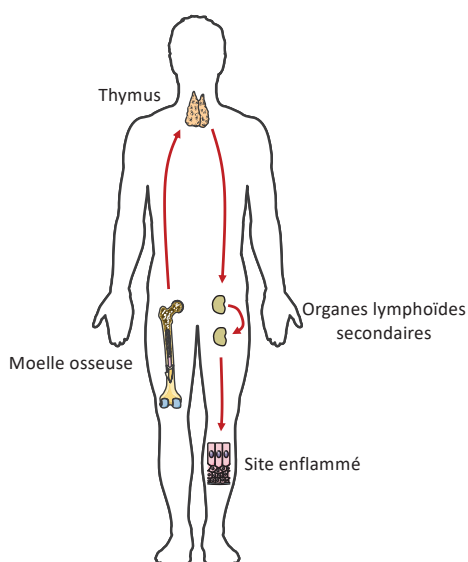


Figure 9 : Trajet des lymphocytes T dans l'organisme.

Au cours de leur vie, la plupart des lymphocytes T se déplacent en permanence dans l'organisme. Les cellules progénitrices des lymphocytes T sont produites dans la moelle osseuse. Elles rejoignent le thymus où elles se différencient en lymphocytes T naïfs. Les lymphocytes T naïfs gagnent la circulation sanguine et circulent continuellement entre le sang et les organes lymphoïdes secondaires (OLS), où ils scannent les complexes CMH-peptide à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA). S'ils rencontrent l'antigène dont leur TCR est spécifique, ils sont activés, prolifèrent et se différencient en lymphocytes T effecteurs. Ces derniers quittent ensuite les OLS *via* le sang pour rejoindre le site d'inflammation. Une fois l'inflammation résolue, les lymphocytes T mémoires qui persistent dans l'organisme continuent de circuler entre le sang, les tissus et les OLS.

2.1 Contrôle de la migration des lymphocytes T par les chimiokines

La migration des lymphocytes T entre sang ou lymphe et OLS n'est pas un processus passif. Elle est orchestrée par une famille de récepteurs dits « chimiotactiques » en coordination avec des molécules d'adhésion. Les récepteurs chimiotactiques les plus connus sont les récepteurs aux chimiokines. Les chimiokines sont des protéines de petite taille (8 à 12 kDa), présentant une structure tridimensionnelle conservée comprenant trois feuillets plissés β , une hélice α C-terminale, et des ponts disulfures entre des résidus cystéine (Clore and Gronenborn, 1995) (Figure 10). Elles sont sécrétées dans le milieu extracellulaire mais sont fréquemment liées à des protéoglycanes ou à des molécules de la matrice (Allen et al., 2007). Leurs récepteurs sont généralement des récepteurs couplés à des protéines G (RCPG), qui contrôlent les mouvements cellulaires.

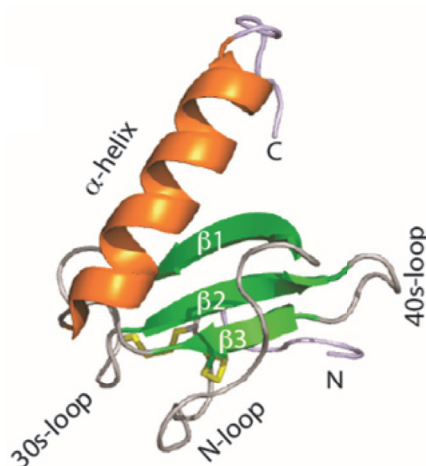


Figure 10 : Structure moléculaire des chimiokines : exemple de CCL19.

La structure tridimensionnelle de CCL19 correspond à la structure canonique des chimiokines, avec une boucle N-terminale flexible, trois feuillets β parallèles (en vert), une hélice α C-terminale (en orange), et des ponts disulfures entre des résidus cystéine (en jaune).

(Veldkamp et al., 2015)

Les RCPG sont des protéines à sept domaines transmembranaires localisées à la membrane plasmique des cellules (Weis and Kobilka, 2014). Leurs domaines extracellulaires reconnaissent un ou plusieurs ligands spécifiques, qui activent le récepteur en s'y fixant. La partie intracellulaire des RCPG est couplée à une protéine G composée de trois sous-unités (Figure 11A – (1)). A l'état inactif, la sous-unité α est associée à du guanosine diphosphate (GDP). La fixation du ligand induit un changement de conformation qui permet de remplacer le GDP par du guanosine triphosphate (GTP) et ainsi activer la protéine G (Figure 11A – (2)). La sous-unité α se dissocie alors des deux autres (Figure 11A – (3)) pour aller activer un effecteur

membranaire et la voie de signalisation sous-jacente (Figure 11A – (4)). Il existe plusieurs types de sous-unités α , ce qui permet aux RCPG de stimuler de nombreuses voies de signalisation différentes.

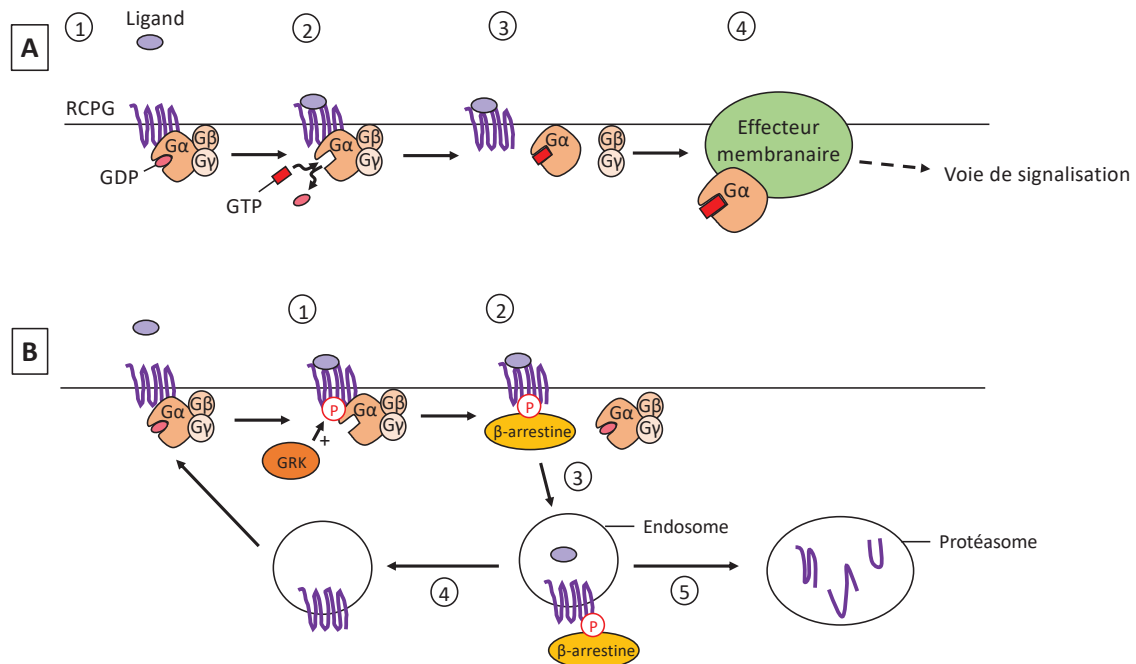


Figure 11 : Activation et régulation des RCPG.

(A) Activation des RCPG. (1) Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires. La partie intracellulaire des RCPG est couplée avec une protéine G trimérique composée des sous-unités α , β et γ . À l'état inactif, la sous-unité α est associée avec du GDP. (2) La fixation du ligand sur le domaine extracellulaire du RCPG induit un changement conformationnel de la sous-unité α . Le GDP est remplacé par du GTP. (3) La sous-unité α se dissocie des sous-unités β et γ . (4) La sous-unité α active un effecteur membranaire, ce qui induit une voie de signalisation intracellulaire. (B) Régulation des RCPG. (1) Lors d'une stimulation prolongée ou répétée du récepteur par son ligand, le domaine intracellulaire du récepteur peut être phosphorylé par une GRK. (2) La phosphorylation permet le recrutement des β -arrestines qui, en se fixant au récepteur, désensibilisent ce dernier en induisant son découplage de la protéine G trimérique. (3) Dans certains cas, le récepteur peut ensuite être internalisé. Le pH acide des endosomes dissocie le récepteur et son ligand. (4) Le récepteur est ensuite recyclé à la membrane, (5) ou dégradé par le protéasome. GDP : guanosine diphosphate ; GTP : guanosine triphosphate ; GRK : G-protein coupled receptor kinase.

Récepteur	Ligand	Expression	Fonction(s)	Références
CCR1	CCL3, CCL5, CCL7, CCL13, CCL14, CCL15, CCL23	Th1	Migration vers les voies respiratoires lors de l'asthme	Schaller et al, 2008
CCR2	CCL2	Treg	Migration vers les tumeurs	Loyher et al, 2016
CCR4	CCL17, CCL22	T CD4+ de la peau Th2 Th17 Treg	Migration vers la peau Migration vers les voies respiratoires lors de l'asthme Migration vers les tissus enflammés	Agace, 2006 Syrbe & Hamann, 1999 Acosta-Rodriguez et al, 2007 Lee et al, 2005
CCR5	CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL11, CCL14, CCL16	T CD8+ naïfs Th1 Certains Treg	Favorise la rencontre avec les DC dans les ganglions Migration vers les tissus enflammés	Castellino et al, 2006 Syrbe & Hamann, 1999 Yurchenko et al, 2006
CCR6	CCL20	Th17	Migration vers les tissus enflammés	Hirota et al, 2007
CCR7	CCL19, CCL21	T naïfs T _{CM} Certains Treg	Migration vers les ganglions à l'homéostasie Migration vers les ganglions à l'homéostasie	von Andrian & Mempel, 2003 Scimone et al, 2004 Lim et al, 2004
CCR8	CCL1	Th2 Treg Tyδ de la peau	Migration vers la peau Migration vers les sites d'inflammation allergique	Syrbe & Hamann, 1999 Lee et al, 2007 Ebert et al, 2006
CCR9	CCL25	T CD4+ et CD8+ des intestins	Migration vers la lamina propria et les GALT	Agace, 2006
CCR10	CCL27	T CD4+ et CD8+ de la peau	Migration vers la peau	Agace, 2006
CXCR1	CCL6, CCL8	LTc	Migration vers les tissus enflammés	Hess et al, 2004
CXCR3	CCL9-CCL11	Th1 LTc Th17 NKT Certains Treg	Migration vers les tissus enflammés Migration vers les ganglions et tissus enflammés Migration vers les tissus enflammés Migration vers les tissus enflammés	Syrbe & Hamann, 1999 Guarda et al, 2007 Acosta-Rodriguez et al, 2007 Thomas et al, 2003 Muller et al, 2007
CXCR4	CCL12	T _{CM}	Migration vers les ganglions à l'homéostasie	Scimone et al, 2004
CXCR5	CCL13	Tfh Certains Treg	Migration vers la limite les centres germinatifs	King et al, 2008 Lim et al, 2004
CXCR6	CXCL16	NKT	Migration vers les tissus	Germanov et al, 2008

Table 2 : Récepteurs à chimiokines pour lesquels a été identifiée une fonction dans la migration des lymphocytes T.

(Adapté de Bromley et al., 2008; Griffith et al., 2014)

Les récepteurs aux chimiokines interviennent dans la migration cellulaire, l'inflammation, la prolifération, l'angiogenèse ou encore l'hématopoïèse. Nombre d'entre eux ont été identifiés comme étant impliqués dans la migration des lymphocytes T (Table 2), en particulier CCR7 ou CXCR4 (Masopust and Schenkel, 2013). CCR7 est un RCPG exprimé par les lymphocytes T naïfs, T_{CM} et Treg (Förster et al., 2008; Sallusto et al., 1999). Il est essentiel au passage des lymphocytes T du sang vers les ganglions lymphatiques. CCL19 et CCL21, les ligands de CCR7, sont des chimiokines prédominantes dans l'immunité adaptative. Ce sont des chimiokines dites homéostatiques, c'est-à-dire qu'elles sont exprimées constitutivement, en opposition avec les chimiokines induites lors d'une inflammation (Zlotnik and Yoshie, 2012). Elles sont produites majoritairement par les cellules stromales des organes lymphoïdes, et également, pour CCL21, par les cellules endothéliales des tissus (Comerford et al., 2013). CCL19 et CCL21 interagissent avec CCR7 avec plus ou moins la même affinité (Yoshida et al., 1998). Elles induisent des voies de signalisation similaires mais pas totalement redondantes (Hauser and Legler, 2016; Sánchez-Sánchez et al., 2006). Par

exemple, CCL19 recrute plus fortement les β -arrestines, provoquant plus facilement l'internalisation de CCR7. En activant les protéines de la famille $G_{i/o}$ et $G_{12/13}$, CCL19 et CCL21 peuvent stimuler la prolifération *via* les mitogen-activated protein kinases (MAPK), la survie par la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT, ou encore la migration grâce à Rac1 et/ou la voie RHO/Rho-associated protein kinase (ROCK) (Figure 12). Grâce à cette signalisation, CCR7 est fortement impliqué dans la migration des lymphocytes T. En particulier, il contrôle leur entrée dans les ganglions (Förster et al., 1999; Gunn et al., 1999) ainsi que leur rétention (Pham et al., 2008). Ccl19 et Ccl21 régulent la vitesse de migration des lymphocytes T dans la zone T (Asperti-Boursin et al., 2007; Okada and Cyster, 2007; Worbs et al., 2007).

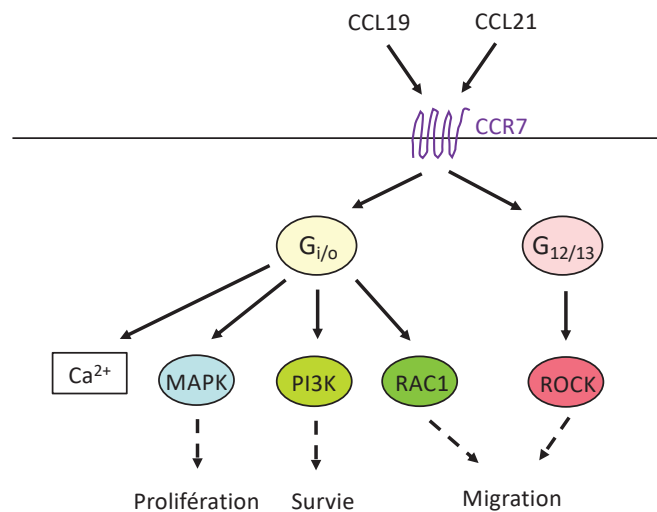


Figure 12 : Voies de signalisation activées par la fixation de CCL19 et CCL21 sur leur récepteur CCR7.

En se fixant sur leur récepteur CCR7, CCL19 et CCL21 peuvent activer les protéines $G_{i/o}$ ou $G_{12/13}$, induisant ainsi différentes voies de signalisation. MAPK : mitogen-activated protein kinases ; PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase ; ROCK : Rho-associated protein kinase

2.2 Le Sphingosine-1-Phosphate (S1P)

Le S1P est un lysophospholipide produit lors du métabolisme des sphingolipides (Figure 13). Il est synthétisé dans le cytoplasme des cellules et peut être sécrété dans le milieu extracellulaire, où il joue un rôle de signalisation dans divers processus cellulaires, tels que l'angiogenèse, la survie et la prolifération cellulaires, l'adhérence, ou encore la migration. Il est également impliqué dans certaines conditions physiopathologiques, comme l'inflammation, le cancer, ou les maladies autoimmunes, cardiovasculaires et dégénératives. Le S1P est donc une molécule clé dans le système immunitaire. En particulier, il joue un rôle crucial dans la circulation des lymphocytes T

dans l'organisme, car il est essentiel à leur sortie des OLS. La modification des niveaux de S1P dans les différents organes impacte considérablement le nombre de lymphocytes T dans le sang. De ce fait, il est important de comprendre quel est ce lipide et comment il interagit avec ses récepteurs.

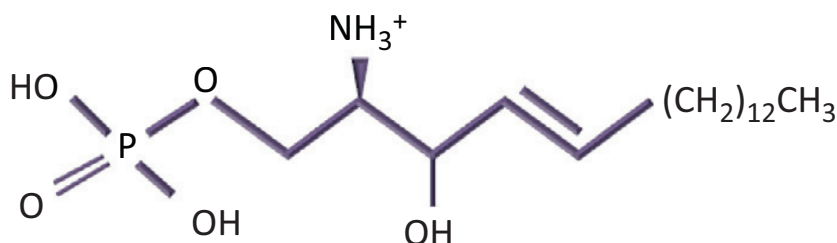


Figure 13 : Molécule de S1P

Le sphingosine-1-phosphate (S1P) est un phosphosphingolipide. C'est une molécule de sphingosine à laquelle est attaché un groupement phosphate en position 1.
(O'Sullivan and Dev, 2013)

2.2.1 Synthèse intracellulaire du S1P

Le S1P est produit par tous les types cellulaires au cours du métabolisme des sphingolipides. Sa synthèse est un processus complexe qui prend place dans différents compartiments et qui nécessite l'activité de nombreuses enzymes. Le métabolisme des sphingolipides débute avec une synthèse *de novo* de céramide et prend fin avec la dégradation définitive du S1P.

Le S1P a pour précurseur la sphingosine. Cette dernière est synthétisée à partir de la dégradation de la céramide par les céramidases, qui sont des enzymes ubiquitaires. La céramide est produite *de novo* par la serine palmytoil transferase, ou par hydrolyse de la sphingomyéline par la sphingomyelinase (Kitatani et al., 2008). Cinq céramidases ont été identifiées, en fonction de leur localisation cellulaire et du pH optimal à leur activité (Ferlinz et al., 2001; Mao et al., 2001; Tani et al., 2003; Xu et al., 2006). Ainsi, la céramide peut être hydrolysée en sphingosine dans les lysosomes, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique (RE), ou encore à la membrane plasmique, en fonction de la céramidase impliquée (Figure 14).

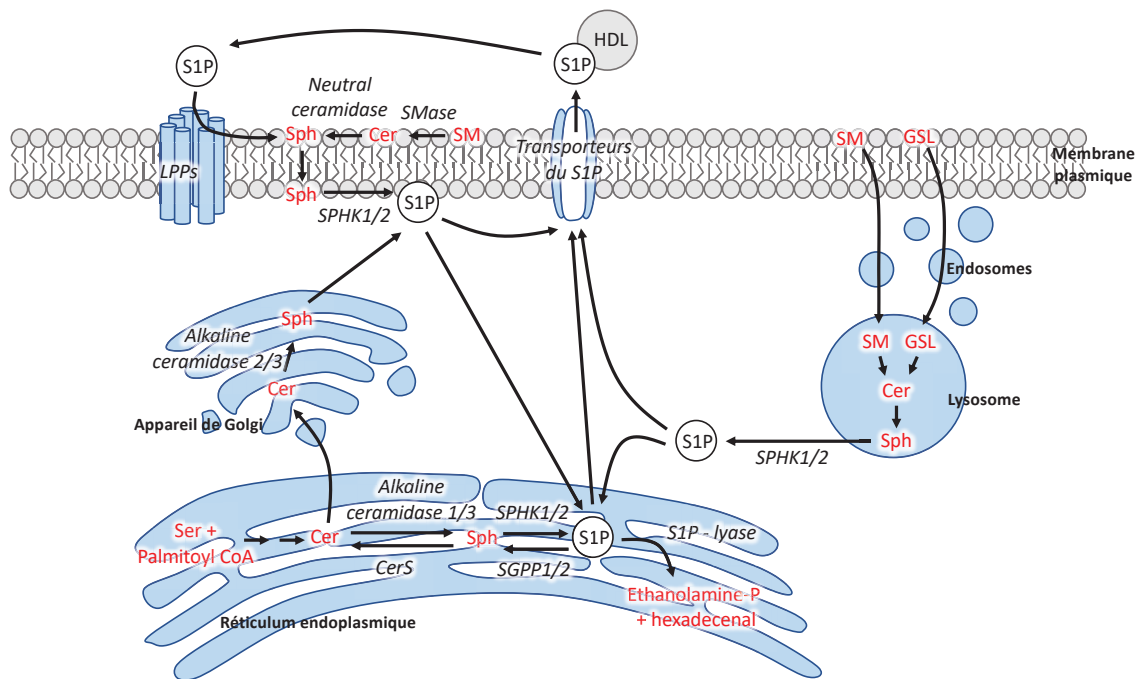


Figure 14 : Synthèse intracellulaire du S1P.

La synthèse intracellulaire du S1P prend place dans différents compartiments cellulaires et implique de nombreux acteurs protéiques. La céramide est générée *de novo* dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi, ou lors du catabolisme des sphingolipides et des sphingomyélines à la membrane plasmique et dans les lysosomes. La synthèse de la céramide est suivie de sa dégradation en sphingosine par les céramidases. Ces dernières existent en plusieurs isoformes spécifiques de certains organites. La sphingosine est phosphorylée en S1P par les SPHK1/2. La SPHK1 agit principalement à la membrane plasmique tandis que la SPHK2 prédomine dans le RE. Une fois synthétisé, le S1P est exporté dans le milieu extracellulaire par des transporteurs comme le sphingolipid transporter 2 (SPNS2), il est alors pris en charge par les HDL et l'albumine. Il peut également être dégradé, de façon réversible par déphosphorylation en sphingosine par la SGPP, ou de façon irréversible en phosphoethanolamine et en hexadecenal par la S1P-lyase. Le S1P du milieu extracellulaire peut être capté par les LPP de la membrane plasmique, qui le déphosphorylent en sphingosine. Celle-ci peut ensuite être rephosphorylée en S1P intracellulaire par la SPHK1. Cer : céramide ; CerS : céramide synthase ; CoA : coenzyme A ; Ethanolamine-P : phosphoethanolamine ; GSL : glycosphingolipides ; HDL : high density lipoprotein ; LPP : lipid phosphatase ; S1P : sphingosine-1-phosphate ; Ser : sérine ; SGPP : S1P phosphatase ; SM : sphingomyéline ; SMase : sphingomyélinase ; Sph : sphingosine ; SPHK : sphingosine-kinase.

(Adapté de Olivera et al., 2013)

La phosphorylation dépendante de l'ATP de la sphingosine par la sphingosine kinase (SPHK) donne le S1P (Figure 14). Il existe deux isoformes de SPHK. La SPHK1, présente

dans le cytoplasme et au niveau de la membrane plasmique (Delon et al., 2004; Jarman et al., 2010), synthétiserait le S1P sécrété dans les fluides circulants. En effet, les souris *Sphk1*^{-/-} présentent une forte diminution du S1P dans le sérum (Allende et al., 2004). On n'y observe pas de différence de S1P dans les tissus, où la concentration est déjà faible chez les souris *Sphk1*^{+/-}. La SPHK2, localisée dans plusieurs compartiments cellulaires dont le cytoplasme, le noyau et le RE (Igarashi et al., 2003; Maceyka et al., 2005), participerait plutôt au maintien des niveaux de S1P dans les tissus lymphoïdes. Le S1P capté depuis le sang est déphosphorylé puis rephosphorylé par la Sphk2 afin d'être redistribué dans les tissus (Sensken et al., 2010). Bien que les activités des Sphk1 et 2 semblent distinctes, elles ont un rôle au moins partiellement redondant, car seul le double knock-out (KO) est létal (Mizugishi et al., 2005).

Le niveau de S1P intracellulaire est contrôlé à la fois par sa synthèse et sa dégradation. Il peut être dégradé par deux voies différentes. La première est sa déphosphorylation réversible en sphingosine par les S1P phosphatases (SGPP) dans le RE (Le Stunff et al., 2002; Ogawa et al., 2003) (Figure 14). Deux SGPP ont été identifiées : la SGPP1, ubiquitaire, et la SGPP2, exprimée dans le cœur, les reins et les intestins (Johnson et al., 2003; Ogawa et al., 2003). Le S1P peut également être déphosphorylé à la membrane par les lipid phosphate phosphatases (LPP) 1, 2 et 3 (Long et al., 2008) (Figure 14). Ces phosphatases sont localisées à la membrane plasmique avec leur site actif à l'extérieur de la cellule, prêtes à agir sur les lipides qui entrent dans la cellule ou sur ceux qui sont sécrétés. La deuxième voie est sa dégradation irréversible en phosphoethanolamine et en hexadecenal par la S1P-lyase (Van Veldhoven and Mannaerts, 2000) (Figure 14). La S1P-lyase se localise dans le RE et est presque ubiquitaire, bien qu'on ne la retrouve pas dans les plaquettes ni les érythrocytes (Ikeda et al., 2004; Ito et al., 2007; Van Veldhoven et al., 2000; Yatomi et al., 1997a).

Le S1P synthétisé est généralement transporté à la membrane pour être sécrété dans le milieu extracellulaire (Figure 14). Son rôle en tant que molécule de signalisation extracellulaire est largement étudié. On en sait un peu moins sur son éventuelle action intracellulaire. Pourtant, le S1P présente des caractéristiques de second messenger intracellulaire (Olivera et al., 2013; Spiegel et al., 1996). Par exemple, la surexpression de la SPHK1, qui mène à une augmentation de la production de S1P intracellulaire, est associée à une inhibition de l'apoptose induite par la céramide, par le TNF α , ou encore par la molécule FAS (Olivera et al., 1999). Ainsi, la balance entre les niveaux de céramide, qui induit l'apoptose, et de S1P, qui stimule la survie, pourrait influencer la viabilité cellulaire suite à différents stimuli. La microinjection de S1P dans des fibroblastes augmente la synthèse d'ADN (Van Brocklyn et al., 1998) et stimule le relargage de calcium intracellulaire (Meyer zu Heringdorf et al., 1998), suggérant un rôle du S1P intracellulaire dans la prolifération et la signalisation dépendante du

calcium. Cependant, ces études sont à prendre avec précaution, car elles ont été réalisées *in vitro* en contrôlant le relargage de S1P dans le cytoplasme ; et on ne sait pas du tout si ces événements ont lieu *in vivo*.

2.2.2 Sécrétion du S1P dans le milieu extracellulaire

Le rôle du S1P en tant que molécule de signalisation extracellulaire est mieux documenté. Après sa synthèse, le S1P peut être sécrété dans le milieu environnant. On le retrouve à des concentrations variables dans les tissus, dans le sang et dans la lymphe. Puisque le S1P est une molécule lipophile, il ne peut pas circuler librement dans le sang et la lymphe et a besoin d'un transporteur pour être solubilisé. Deux tiers du S1P du plasma sont portés par les lipoprotéines de haute densité (HDL), fixés à l'apolipoprotéine M, et le reste est transporté par l'albumine et d'autres lipoprotéines (Christoffersen et al., 2011; Murata et al., 2000). Le transporteur dans les tissus interstitiels n'a pas encore été identifié. La prise en charge du S1P par les HDL ou l'albumine ne semble pas affecter son interaction avec ses ligands : la même quantité de S1P, seul ou dans le plasma, stimule de la même façon le relargage du calcium médié par S1PR1 (Bode et al., 2010).

Une expérience intéressante a révélé que le S1P du plasma et de la lymphe avait une origine différente (Pappu et al., 2007). Le double-KO *Sphk1*^{-/-} *Sphk2*^{-/-} est létal au stade embryonnaire, mais il est possible d'utiliser un KO inductible afin d'induire la double-déficiencia chez la souris adulte. Des souris *Sphk*-KO générées de cette manière (ne produisant donc pas de S1P) ont été irradiées afin de reconstituer leur moelle osseuse avec des cellules hématopoïétiques *Sphk1*^{+/+} *Sphk2*^{+/+}. Ce transfert adoptif génère la restauration des niveaux de S1P dans le sang, mais pas dans la lymphe, suggérant que, à l'inverse de la lymphe, le S1P du sang est sécrété par des cellules hématopoïétiques. Dans l'expérience inverse, où des souris *Sphk1*^{+/+} *Sphk2*^{+/+} irradiées ont reçu des cellules de moelle osseuse *Sphk*-KO, la lymphe conserve une concentration en S1P similaire à celle des souris contrôles, tandis que le S1P du sang diminue de 10% sans disparaître totalement. Ceci suggère que le plasma a également une source non-hématopoïétique de S1P. Les niveaux de S1P dans la lymphe et le sang sont donc maintenus par des sources différentes, principalement hématopoïétique mais aussi non-hématopoïétique pour le sang, et non-hématopoïétique, résistante aux radiations, pour la lymphe.

a) Origine du S1P dans le sang

Dans le plasma, le S1P a une demi-vie inférieure à 15 min, ce qui suggère un renouvellement rapide avec une source de sécrétion efficace (Venkataraman et al., 2008).

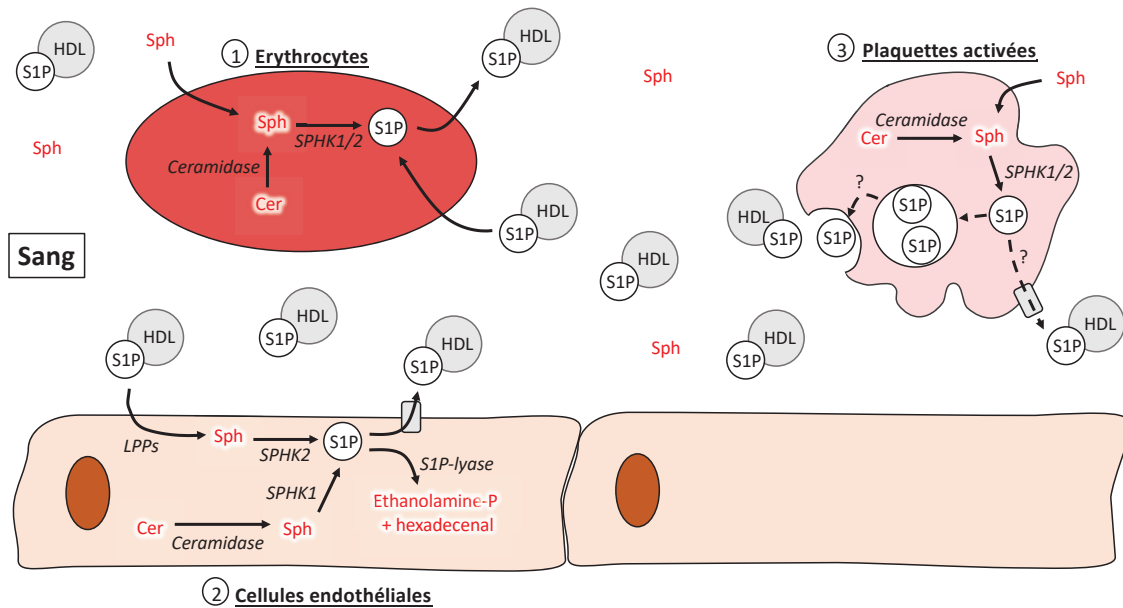


Figure 15 : Principales sources de S1P dans le sang.

Le S1P dans le sang est pris en charge par des transporteurs, les high density lipoproteins (HDL) ou l'albumine. (1) Les érythrocytes constituent la principale source de sphingosine-1-phosphate (S1P) du sang. Ils sont capables de générer de la sphingosine (Sph) ou de l'importer depuis le milieu extracellulaire, de la phosphoryler en S1P puis de la relarguer dans leur environnement. Ils peuvent aussi importer et stocker le S1P du plasma. Les érythrocytes ne possèdent pas les enzymes de dégradation du S1P. (2) Les cellules endothéliales sont la deuxième source la plus importante de S1P. Elles peuvent importer le S1P du sang, le déphosphoryler en Sph par les lipide-phosphate phosphatases (LPP), puis le rephosphoryler en S1P grâce à la sphingosine-kinase 2 (SPHK2). Les cellules endothéliales peuvent également générer de la Sph à partir de céramide (Cer), puis la phosphoryler en S1P grâce à la SPHK1. Le S1P ainsi généré est soit dégradé en éthanolamine-P et hexadecenal par la S1P-lyase, soit exporté dans le sang. (3) Les plaquettes non-activées constituent un stock important de S1P, mais ne participent pas à la maintenance des niveaux de S1P extracellulaire. En revanche, une fois activées, elles sécrètent du S1P dans le plasma selon un mécanisme encore peu compris. Le relargage du S1P pourrait être réalisé par l'exocytose de granules, ou par un transporteur protéique à la membrane des plaquettes.

(Adapté de Olivera et al., 2013)

• Les érythrocytes

Au cours de leur étude, R. Pappu et ses collègues ont identifié les érythrocytes comme une source importante de production de S1P (Pappu et al., 2007). Les globules

rouges présentent une forte activité SPHK (Yang et al., 1999) mais pas d'activité de dégradation du S1P (Ito et al., 2007), ce qui en fait un gros réservoir de S1P intracellulaire. En fait, au moins 50% du S1P du sang est stocké dans les érythrocytes (Ito et al., 2007). L'injection de globules rouges *Sphk1^{+/-} Sphk2^{+/-}* dans des souris *Sphk-KO*, de façon à représenter 20% des érythrocytes circulants, induit une augmentation du S1P dans le sang, mais pas dans la lymphe (Pappu et al., 2007). De plus, les patients anémiques présentent une diminution de la concentration en S1P plasmatique (Bode et al., 2010). Les érythrocytes représentent donc à la fois un réservoir majeur et une source de sécrétion de S1P dans le sang.

Les érythrocytes humains peuvent capter la sphingosine extracellulaire et la phosphoryler pour en faire du S1P (Ito et al., 2007; Yang et al., 1999) (Figure 15 – (1)). Cela a été montré *in vitro* en incubant des érythrocytes avec de la sphingosine. Dans les cinq premières minutes, celle-ci disparaît du milieu extracellulaire alors que sa concentration augmente dans le cytosol. En même temps, le S1P intracellulaire augmente, atteint un pic de concentration, puis diminue tandis que le S1P extracellulaire augmente. Les érythrocytes importent donc la sphingosine exogène, la convertissent en S1P puis la relarguent dans le milieu extracellulaire, en 30 à 90 min, sans stimulus extérieur. Les érythrocytes sont également capables d'absorber le S1P du milieu (Hänel et al., 2007) (Figure 15 – (1)). La balance absorption/relargage de S1P est régulée *in vivo*.

Par quel mécanisme les érythrocytes relarguent-ils le S1P dans leur environnement ? Une première étude a souligné l'absence de relargage de S1P dans un milieu sans plasma ou sans sérum (Hänel et al., 2007), et plus précisément sans albumine ou HDL (Bode et al., 2010). Le 1,4-dithioerythritol (DTE), un inhibiteur de la scramblase, diminue le relargage dans le milieu extérieur. A l'inverse, son enhancer N-ethylmaleimide (NEM) augmente le relargage. La scramblase est une protéine membranaire capable de transloquer les phospholipides entre les deux feuillettes de la bicouche lipidique de la membrane cellulaire. Ainsi, la translocation du S1P par la scramblase sur la couche externe de la membrane plasmique est essentielle au relargage du S1P par les érythrocytes. D'ailleurs, une analyse par microscopie confocale révèle que le S1P des globules rouges est principalement localisé à la membrane plasmique. On obtient ainsi un modèle dans lequel le S1P, transloqué à la membrane des érythrocytes, se fixe aux transporteurs du plasma qui le solubilisent dans le sang (Bode et al., 2010) (Figure 16A). Une étude suggère que le transporteur ATP-binding cassette A1 (*Abca1*) pourrait également participer au relargage du S1P dans le sang chez le rat (Kobayashi et al., 2009), bien que d'après un autre article l'inhibition des transporteurs ABC par la vanadate, un analogue du phosphate, n'aurait pas d'effet sur le relargage chez la souris (Bode et al., 2010). Les globules rouges semblent aussi capables d'échanger du S1P de cellule à cellule *in vitro*. En l'absence d'albumine et de HDL, le S1P-FITC passe rapidement des érythrocytes marqués aux érythrocytes non-marqués ou aux cellules HUVEC, une lignée de cellules endothéliales.

Les érythrocytes pourraient être capables de fournir du S1P aux cellules endothéliales avec lesquelles ils entrent en contact.

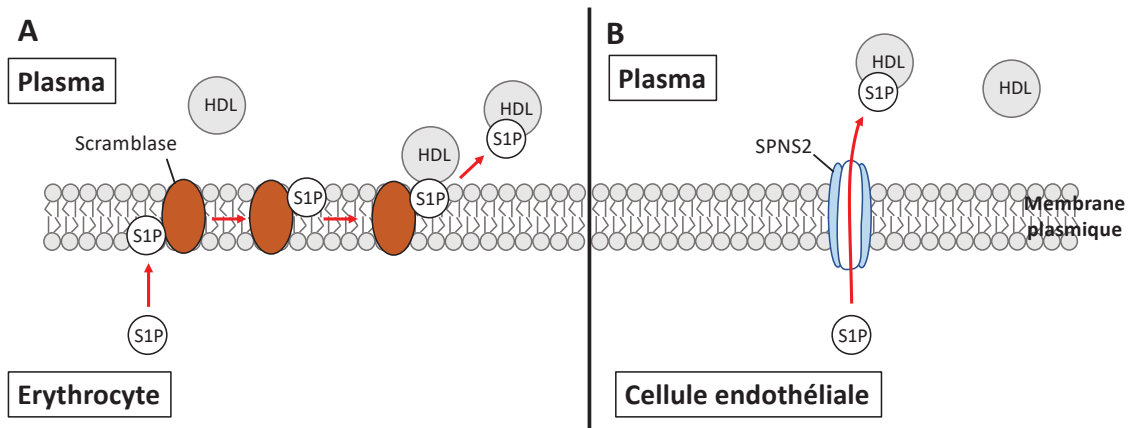


Figure 16 : Mécanismes d'export du S1P

Les mécanismes de sécrétion du S1P dans le milieu extracellulaire diffèrent en fonction des types cellulaires. Deux d'entre eux ont été identifiés. (A) Dans les érythrocytes, le S1P est transloqué par la scramblase de la face interne à la face externe de la membrane plasmique, où il est pris en charge par les HDL pour être transporté dans le plasma. (B) Dans les cellules endothéliales, le S1P est libéré dans le sang par SPNS2, un transporteur membranaire. HDL : high density lipoprotein ; S1P : sphingosine-1-phosphate ; SPNS2 : sphingolipid transporter 2.

(Adapté de Thuy et al., 2014)

• Les cellules endothéliales

Les expérimentations sur souris *Sphk*-KO mettent en évidence l'existence d'une source de S1P non-hématopoïétique pour le plasma, identifiée comme étant l'endothélium vasculaire (Fukuhara et al., 2012; Pappu et al., 2007; Venkataraman et al., 2008). Les cellules endothéliales présentent un fort métabolisme des sphingolipides avec une activité élevée des SPHK1/2 et de la S1P-lyase (Venkataraman et al., 2008). *In vitro*, les cellules hépatiques primaires sécrètent peu de S1P, alors que les lignées endothéliales en sécrètent beaucoup. Or, dans des souris *Sphk*-KO, l'induction adénovirale de la *Sphk1* par les cellules du foie (hépatiques et endothéliales) est suffisante pour restaurer en partie le S1P du sang. Ceci suggère que les cellules endothéliales hépatiques sont impliquées dans le maintien des niveaux de S1P plasmatique. *In vitro*, les forces de cisaillement auxquelles sont soumises les cellules endothéliales stimulent leur synthèse et leur sécrétion de S1P, qui sont accompagnées d'une diminution de l'ARNm des enzymes de dégradation. Ainsi, on a une augmentation du S1P intracellulaire suivi de son relargage dans le milieu extracellulaire (Venkataraman et al., 2008).

La sécrétion du S1P par les cellules endothéliales met en jeu un mécanisme différent des érythrocytes. Le sphingolipid transporter 2 (SPNS2) transporte le S1P hors des cellules (Hisano et al., 2011). Les souris *Spns2*-KO n'ont qu'une diminution partielle des niveaux de S1P plasmatique (de 54% à aucune diminution observée en fonction des études) (Fukuhara et al., 2012; Mendoza et al., 2012). Les érythrocytes *Spns2*^{-/-} relarguent normalement leur S1P dans le milieu, et le niveau de S1P du plasma n'est pas restauré par une greffe de moelle osseuse *Spns2*^{+/+} (Fukuhara et al., 2012). Les cellules hématopoïétiques qui contribuent aux niveaux de S1P du sang n'utilisent donc pas *Spns2*. En revanche, les cellules endothéliales vasculaires sécrètent le S1P *in vitro* de façon dépendante de *Spns2*. De ce fait, les cellules endothéliales participent probablement au maintien du niveau de S1P du plasma, en sécrétant ce dernier par le transporteur *Spns2* (Figure 16B).

Les cellules endothéliales, comme d'autres types cellulaires, sont capables de capter le S1P de l'environnement. Celui-ci est immédiatement déphosphorylé par les LPP, puis phosphorylé par la SPHK2, et enfin dégradé par la S1P-lyase (Sensken et al., 2010) (Figure 15 – (2)). On aurait ainsi un rôle distinct des SPHK1 et SPHK2 dans les cellules endothéliales, avec la SPHK1 responsable de la synthèse du S1P destiné à être libéré dans le milieu extracellulaire, et la SPHK2 participant à la dégradation du S1P exogène (Figure 15 – (2)).

• Les plaquettes

Comme les érythrocytes, les plaquettes, même non-activées, ont une forte activité SPHK mais pas de dégradation du S1P par la S1P-lyase, ce qui en fait un stock conséquent de S1P intracellulaire (Ito et al., 2007; Yatomi et al., 1997a). Elles peuvent importer la sphingosine du milieu et la phosphoryler rapidement en S1P (Tani et al., 2005; Yatomi et al., 1997a, 1997b) (Figure 15 – (3)). Cependant, à l'homéostasie, les plaquettes ne semblent pas participer à la mise en place du niveau de S1P plasmatique. En effet, dans les souris *Nf-e2*^{-/-}, déficientes en plaquettes, et dans les souris dont les plaquettes ont été éliminées avec un anticorps dirigé contre une glycoprotéine des plaquettes, la glycoprotéine Ib (Gpib), la concentration en S1P du plasma reste normale (Pappu et al., 2007; Venkataraman et al., 2008). De fait, contrairement aux érythrocytes qui libèrent du S1P en continu, les plaquettes ont besoin d'être activées pour sécréter du S1P. Leur stimulation par la thrombine d'une façon dépendante de la protéine-kinase C (Pkc) induit le relargage de S1P dans le milieu extracellulaire (Kobayashi et al., 2006; Yatomi et al., 1995). Le mécanisme mis en jeu n'est pas clairement défini. Une possibilité serait l'intervention d'un transporteur ABC, suivie de la prise en charge par l'albumine ou les HDL (Kobayashi et al., 2006) (Figure 15 – (3)). Une autre serait l'exocytose de granules contenant du S1P lors de l'activation des plaquettes (Jonnalagadda et al., 2014) (Figure 15 – (3)). Finalement, les plaquettes ne constituent pas une source importante de S1P dans le

sang à l'homéostasie. Cependant, l'ensemble de ces données suggère qu'en condition inflammatoire, les plaquettes pourraient augmenter la concentration de S1P dans le sang suite à certains stimuli. L'impact exact de cette fonction sur le système immunitaire n'est pas encore clair.

• Autres sources

D'autres cellules hématopoïétiques ont été identifiées comme sources potentielles de S1P extracellulaire. Par exemple, comme les érythrocytes, les neutrophiles et les lymphocytes peuvent internaliser la sphingosine du milieu, la phosphoryler, et libérer le S1P ainsi produit dans le milieu extracellulaire, sans stimulus extérieur (Yang et al., 1999). L'activation des mastocytes par stimulation du récepteur aux IgE (FcεRI) active la SPHK et mène par conséquent à la synthèse et la sécrétion de S1P (Jolly et al., 2004). Cependant, il n'a pas été démontré que ces cellules participaient à l'homéostasie des niveaux de S1P du sang.

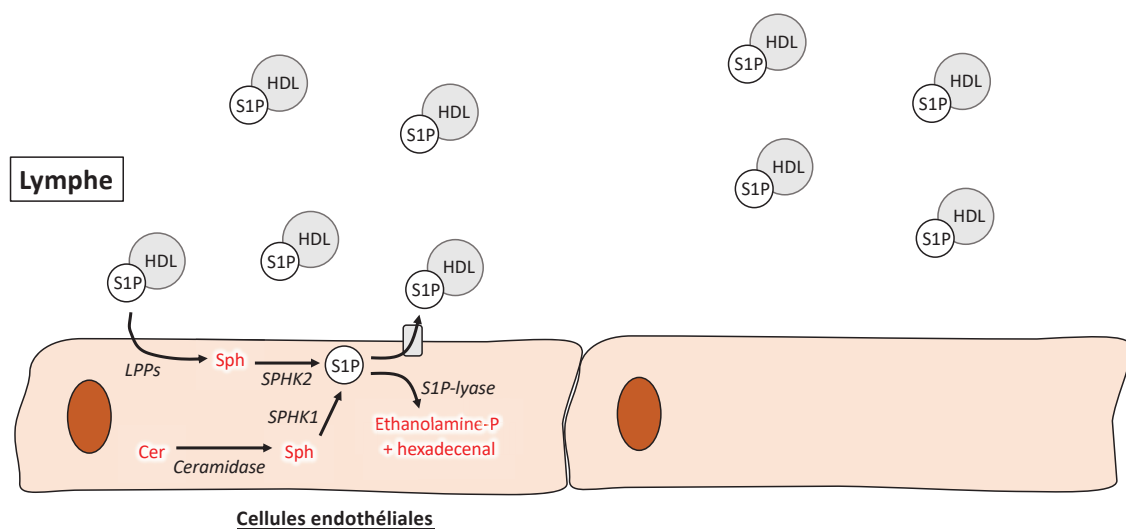


Figure 17 : Origine du S1P dans la lymphe.

Le sphingosine-1-phosphate (S1P) de la lymphe est généré par les cellules endothéliales. Ces dernières sont capables de capter le S1P de la lymphe, le déphosphoryler en sphingosine (Sph) avec les lipide-phosphate phosphatases (LPP), puis le rephosphoryler en S1P grâce à la sphingosine-kinase 2 (SPHK2). Les cellules endothéliales peuvent également générer de la sphingosine (Sph) à partir de céramide (Cer), puis la phosphoryler en S1P grâce à la SPHK1. Le S1P ainsi généré est soit dégradé en éthanolamine-P et hexadecenal par la S1P-lyase, soit exporté dans la lymphe, où il est pris en charge par un transporteur comme les high density lipoproteins (HDL) ou l'albumine.

(Adapté de Olivera et al., 2013)

b) Origine du S1P dans la lymphe

L'expérience de Pappu *et al* a montré l'origine non-hématopoïétique du S1P de la lymphe (Pappu et al., 2007). Les cellules endothéliales lymphatiques constituent cette source (Figure 17). Dans des souris *Sphk2*, l'expression de la *Sphk1* a été supprimée des cellules endothéliales lymphatiques par un système Cre-Lox. En conséquence, le S1P disparaît de la lymphe (Pham et al., 2010). On peut également observer une forte diminution du S1P de la lymphe dans les souris *Spns2*-KO (Mendoza et al., 2012), indiquant que les cellules endothéliales lymphatiques sécrètent le S1P dans la lymphe via le transporteur *Spns2* (Figure 16B).

c) Origine du S1P dans les tissus

• Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales constituent une barrière physique entre des compartiments avec différentes concentrations de S1P. Elles sont de ce fait placées idéalement pour contrôler les échanges de S1P entre les fluides et les tissus, et réguler le faible niveau de S1P tissulaire. Effectivement, le S1P dans les tissus est apporté en majorité par les cellules endothéliales. Celles-ci, comme nous l'avons vu précédemment, incorporent le S1P de l'environnement. Ce dernier est déphosphorylé par les LPP, puis re-phosphorylé par la SPHK2. Il est ensuite dégradé par la S1P-lyase pour diminuer la quantité de S1P. Le S1P restant est sécrété dans les tissus et les fluides (Sensken et al., 2010) (Figure 18 – (1)). Le relargage de S1P se ferait de façon dépendante de *Spns2*, comme pour le S1P du sang (Fukuhara et al., 2012). Une hypothèse suggère que l'export du S1P vers la face abluminale des vaisseaux sanguins permettrait de diriger les lymphocytes T vers le sang.

• Les péricytes du thymus

Les péricytes sont des cellules enroulées autour de l'endothélium des capillaires. Zachariah et Cyster ont montré qu'une délétion en *Sphk* dans les péricytes du thymus engendrait une diminution locale du niveau de S1P, associée à une rétention des lymphocytes T matures dans le thymus (Zachariah and Cyster, 2010). Les péricytes seraient responsables du maintien d'un niveau plus élevé de S1P à proximité des vaisseaux sanguins par rapport au reste du parenchyme thymique (Figure 18 – (2)), ce qui guiderait les lymphocytes T matures vers la circulation. Cette étude n'a été réalisée que dans le thymus et on ne sait pas si c'est le cas dans les autres organes lymphoïdes.

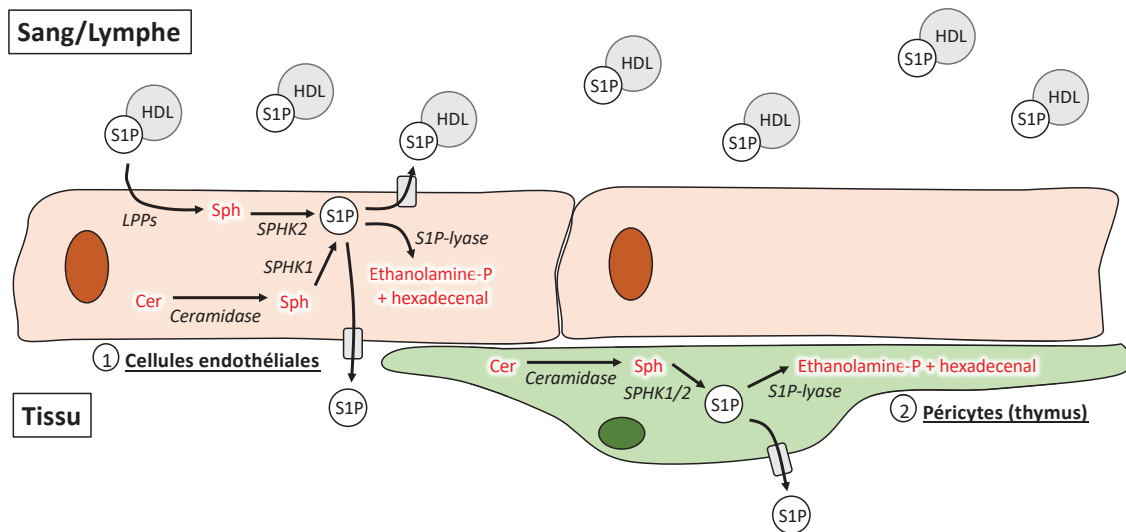


Figure 18 : Principales sources de S1P dans les tissus.

(1) Les cellules endothéliales sont capables de capter le S1P du milieu extracellulaire (sang, lymphe, tissu), le déphosphoryler en sphingosine (Sph) avec les lipide-phosphate phosphatases (LPP), puis le rephosphoryler en S1P grâce à la sphingosine-kinase 2 (SPHK2). Les cellules endothéliales peuvent également générer de la sphingosine (Sph) à partir de céramide (Cer), puis la phosphoryler en S1P grâce à la SPHK1. Le S1P ainsi généré est alors dégradé en éthanolamine-P et hexadecenal par la S1P-lyase. Une faible quantité du S1P restant est sécrétée dans les tissus. (2) Dans le thymus, les péricytes participeraient au maintien d'un niveau plus élevé de S1P à proximité des vaisseaux sanguins par rapport au reste du parenchyme. Ils synthétisent du S1P au niveau intracellulaire et le sécrètent dans le tissu.

(Adapté de Olivera et al., 2013)

2.2.3 Création et maintien du gradient de concentration

La quantification du S1P dans les différents compartiments de l'organisme présente un défi de taille. Contrairement aux protéines, il n'est pas envisageable d'utiliser un reporter fluorescent exprimé en même temps que le lipide, puisque ce dernier n'est pas synthétisé à partir d'une séquence codante d'ADN. De plus, le S1P est présent à la fois au niveau intra et extracellulaire, ce qui nécessite de différencier les deux origines possibles du S1P lors de la mesure. Au cours de ces dernières années, différents outils de mesure directe et indirecte ont été développés pour tenter de palier à ce problème. Certaines équipes ont d'abord décidé de mesurer la quantité de S1P extrait des tissus en le déphosphorylant puis rephosphorylant *in vitro*, afin d'incorporer un phosphate radioactif (Edsall and Spiegel, 1999). Cette technique pose un problème car elle ne mesure pas le S1P endogène. Des protocoles de chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse en tandem (LC-

MS/MS) ont également été développés (Lee et al., 2007; Wang et al., 2019). Récemment, le couplage avec une micro-dissection laser a même permis de préciser la distribution spatiale du S1P dans des sections de rate et de cerveau (Wang et al., 2019). Cette méthode reste difficilement accessible du fait du coût, de l'expertise et du matériel requis. D'autres équipes ont préféré se tourner vers des méthodes indirectes basées sur une propriété de S1PR1, qui est internalisé quand il entre en contact avec son ligand (Liu et al., 1999). Ainsi, des cellules ayant une forte expression de S1PR1 à leur surface reflètent un environnement pauvre en S1P, et inversement. Un autre problème se pose à ce niveau : celui de la mesure de S1PR1. Comme nous le verrons par la suite, S1PR1 est un récepteur de surface à sept domaines transmembranaires (Hanson et al., 2012). L'épitope extracellulaire étant peu accessible, il est difficile de générer des anticorps ciblant ce récepteur et la plupart de ceux présents dans le commerce ne sont pas fonctionnels. Des méthodes de détection alternatives existent. Ramos-Perez *et al.* utilisent des cellules exprimant à la fois la molécule reporter S1pr1-GFP et un autre S1pr1 mutant non internalisable, couplé à la RFP pour pouvoir rationaliser les mesures de GFP (Ramos-Perez et al., 2015).

Le S1P est faiblement exprimé dans les tissus parenchymateux (de l'ordre du nanomolaire chez la souris) (Schwab et al., 2005) (Table 3). À l'inverse, il est présent à forte concentration dans la lymphe (environ 100 nM chez la souris) et dans le plasma du sang (200-400 nM chez l'homme et jusqu'à 1 μ M chez la souris) (Murata et al., 2000; Pappu et al., 2007; Schwab et al., 2005; Yatomi et al., 1997a). Il existe donc un gradient de concentration de S1P entre les tissus et les fluides de l'organisme, qui comme nous le verrons dans la partie 3 est essentiel à la migration des lymphocytes T.

La distribution du S1P semble aussi finement régulée au sein des tissus. Par exemple, dans les ganglions, la concentration en S1P serait plus forte dans la médulla que dans la zone T (Fang et al., 2017), et faible dans les follicules B (Green et al., 2011). Ce gradient de concentration est contrôlé par Spns2 (Fang et al., 2017). Dans le cerveau, les niveaux de S1P varient entre les différentes sections de tissu (Wang et al., 2019). Dans la rate, deux études donnent des résultats opposés. L'une propose par LC-MS/MS que la concentration en S1P serait élevée dans la pulpe rouge et faible dans la pulpe blanche (Wang et al., 2019), alors que l'autre, utilisant un gène rapporteur S1pr1-GFP, suggère l'inverse (Ramos-Perez et al., 2015). Ce dernier résultat serait surprenant, étant donné que la pulpe rouge est très vascularisée, et soulève la question de la validité des différentes technologies mises au point pour quantifier la distribution du S1P dans l'organisme. Dans le premier cas, il n'est pas certain que le S1P mesuré soit uniquement extracellulaire. Dans le deuxième cas, la méthode de mesure est indirecte et peut facilement donner lieu à des biais. Dans tous les cas, une variation locale de la concentration en S1P permettrait de contrôler le positionnement des cellules dans les tissus.

Les niveaux élevés de S1P dans le sang et la lymphe sont régulés par l'activité de la Sphk1, qui génère du S1P prêt à être externalisé (Allende et al., 2004; Pham et al., 2010) (Table 3). Dans les tissus, la concentration faible de S1P est maintenue par l'élimination de celui-ci du milieu extracellulaire. Plusieurs enzymes de dégradation du S1P entrent en jeu, au niveau intracellulaire avec les Sgpp et la S1P-lyase, et au niveau extracellulaire avec les Lpp (Table 3). Comme nous l'avons vu en 3.1.1, le S1P intracellulaire peut être déphosphorylé ou dégradé par les SGPP et la S1P-lyase respectivement (Le Stunff et al., 2002; Ogawa et al., 2003). L'inhibition de la S1P-lyase par le 4-deoxypyridoxine (DOP) mène à une augmentation de la concentration de S1P dans les tissus (Schwab et al., 2005; Sensken et al., 2010), ce qui montre que son activité est essentielle au maintien des faibles niveaux de S1P dans les parenchymes. Les concentrations en S1P du thymus et de la rate sont augmentées dans les souris déficientes en *Lpp3* (Bréart et al., 2011; Ramos-Perez et al., 2015). L'expression de l'enzyme par les cellules endothéliales et épithéliales du thymus est nécessaire pour maintenir des niveaux faibles de S1P. *In vitro*, plusieurs types cellulaires (cellules hépatiques de rat, reins embryonnaires humains, lymphomes B, lymphomes T) sont capables de capter le S1P du milieu, le déphosphoryler à la membrane, puis l'internaliser. Si on inhibe les protéines phosphatases avec du sodium orthovanadate, le S1P n'est plus extrait du milieu (Peest et al., 2008). L'élimination du S1P des tissus pourrait donc potentiellement être réalisée par différentes cellules présentes dans l'environnement.

COMPARTIMENT	Niveaux de S1P	Enzymes impliquées dans le maintien de la concentration
Sang	Très élevés (200-1000 nM)	SphK → synthèse du S1P
Lymphe	Élevés (100 nM)	SphK → synthèse du S1P
Tissus	Faibles (quelques nM)	SGPP, LPP, S1P-lyase → dégradation du S1P

Table 3 : Enzymes impliquées dans le maintien des gradients de concentration de S1P.

2.3 Les récepteurs au S1P, acteurs de la migration lymphocytaire

Le S1P peut se lier de façon autocrine et paracrine à cinq récepteurs membranaires (S1PR1-5). Les gènes codant pour les S1PR appartiennent à la famille des endothelial differentiation genes (*EDG*), composée de huit RCPG qui fixent des phospholipides spécifiques (Chun et al., 2002). Parmi les *EDG*, on distingue deux sous-groupes. Le premier contient les *S1PR* : *EDG1* (*S1PR1*), *EDG5* (*S1PR2*), *EDG3* (*S1PR3*), *EDG6* (*S1PR4*) et *EDG8* (*S1PR5*) (Figure 19). Le deuxième sous-groupe comprend trois récepteurs à l'acide lysophosphatidique (LPA).

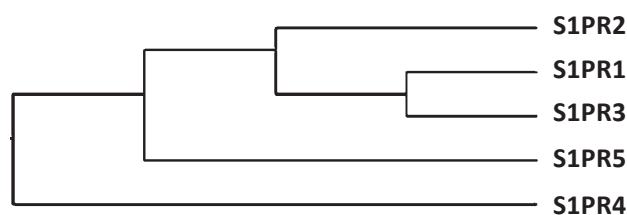


Figure 19 : Phylogénie des S1PR.

(Sanchez and Hla, 2004)

Les S1PR sont exprimés par de nombreux types cellulaires et impliqués dans divers processus tels que la migration, la survie, la différenciation, l'angiogenèse, le développement cardiovasculaire ou encore l'immunité. Nous nous intéresserons ici au rôle de ces récepteurs dans la migration des lymphocytes T. Nous verrons que S1PR1, S1PR3 et S1PR5 induisent la migration des lymphocytes en interagissant avec les protéines de la famille G_i , ce qui permet l'activation de RAC1 et la réorganisation du cytosquelette d'actine. A l'inverse, S1PR2 semble plutôt inhiber la migration en interagissant avec les protéines de la famille $G_{12/13}$ qui activent la voie de la GTP-ase RHO. Enfin, le rôle de S1PR4 dans la migration est assez controversé et les données actuelles ne permettent pas de conclure de façon claire à ce sujet.

RÉCEPTEUR	CHROMOSOME		SÉQUENCE CODANTE (pb)		TAILLE DE LA PROTÉINE (aa)		K_D = AFFINITÉ AU S1P (nM)	PHÉNOTYPE KO MURIN
	Homme	Souris	Homme	Souris	Homme	Souris		
S1PR1	1	3	1149	1149	382	382	8-20	Létal
S1PR2	19	9	1162	1159	353	352	16-27	Crises d'épilepsie entre 3 et 7 semaines dans 40% des cas
S1PR3	9	13	1137	1137	378	378	23-26	Pas de phénotype particulier reporté
S1PR4	19	10	1155	1161	384	386	12-63	Pas de phénotype particulier reporté
S1PR5	19	9	1197	1203	398	400	2-6	Diminution du nombre de lymphocytes NK et de monocytes Ly6c- circulants

Table 4 : Caractéristiques moléculaires des S1PR.

2.3.1 S1PR1 (EDG-1/CD363/D1S3362/ECGF1)

S1PR1 est le premier récepteur au S1P identifié et le mieux caractérisé à ce jour. Son gène est localisé sur le chromosome 1 humain et le chromosome 3 murin (Table 4). Il a une forte affinité pour le S1P, K_D = 8-20 nM (Kon et al., 1999; Lee et al., 1998; Sato et al., 2000). La caractérisation de sa structure tridimensionnelle a permis de visualiser la fixation des ligands sur le récepteur (Hanson et al., 2012) (Figure 20). Comme tous les RCPG, S1PR1 possède un domaine extracellulaire constitué de trois boucles et de la queue N-terminale. Cette dernière est repliée au sommet du récepteur et contribue aux interactions avec le ligand. En même temps, elle forme un

couvercle hélicoïdal qui limite l'accès à la poche de liaison. Les boucles extracellulaires, resserrées contre l'hélice N-terminale, limitent encore plus l'accès. Le ligand doit entrer latéralement dans la région transmembranaire du récepteur, en passant à travers la bicouche lipidique de la membrane plasmique. S1PR1 est exprimé dans de nombreux tissus (Ishii et al., 2001; Liu and Hla, 1997) et participe à diverses fonctions biologiques comme la différenciation cellulaire, la survie, l'angiogenèse, l'inflammation ou la migration. Le KO murin pour *S1pr1* étant létal (Liu et al., 2000), d'autres solutions ont dû être mises en place pour étudier le rôle de *S1pr1* *in vivo* : KO conditionnel, souris hétérozygotes *S1pr1*^{+/-}, ou transfert adoptif de cellules *S1pr1*^{-/-}.

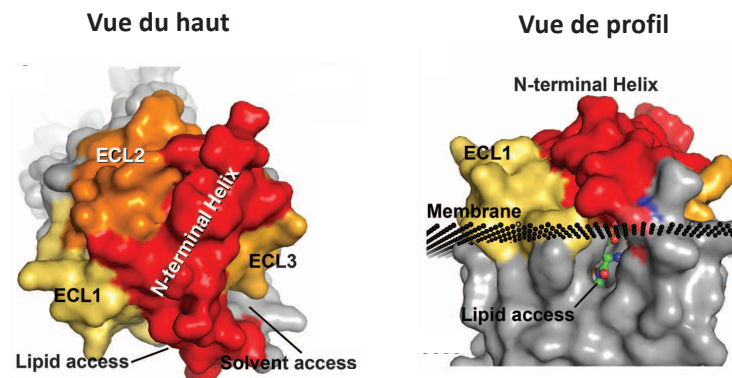


Figure 20 : Structure 3D de S1PR1.

S1PR1 est un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) avec sept domaines transmembranaires. Sa queue N-terminale extracellulaire est repliée en un couvercle hélicoïdal qui limite l'accès à la poche de liaison. Cette dernière est également masquée par les boucles extracellulaires assez resserrées. Le ligand doit entrer latéralement dans la région transmembranaire du récepteur, en passant à travers la bicouche lipidique de la membrane plasmique.

(Hanson et al., 2012)

Le rôle de S1PR1 dans la migration des cellules immunitaires a été beaucoup étudié. On sait ainsi qu'il induit par exemple la migration des macrophages (Weichand et al., 2013), des DC (Rathinasamy et al., 2010), des neutrophiles (Finley et al., 2013) ou encore des éosinophiles (Sugita et al., 2010). De plus, S1PR1 est essentiel à la circulation des lymphocytes T dans l'organisme. Il joue un rôle critique dans leur sortie du thymus et des OLS (Matloubian et al., 2004). La diminution de son expression est nécessaire pour permettre leur entrée dans les OLS (Arnon et al., 2011), leur rétention dans les ganglions après activation (Matloubian et al., 2004) et le positionnement des Tfh au niveau des follicules B (Weber et al., 2015). Il semble également que la régulation négative de *S1pr1* par Cd69 dans les lymphocytes T_{RM} permette leur résidence dans les tissus (Mackay et al., 2015). Pour réaliser son activité, S1PR1 interagit uniquement avec les protéines G possédant une sous-unité Gα_i (Windh et al., 1999) (Figure 21). Il peut ainsi stimuler les MAPK qui mènent à l'activation de RAC1 et

à la migration. Il peut aussi activer la phospholipase C (PLC) pour la mobilisation du calcium, diminuer l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) intracellulaire, et stimuler la voie PI3K/AKT (Lee et al., 1996; Morales-Ruiz et al., 2001; Okamoto et al., 1998).

2.3.2 S1PR2 (EDG-5/CTD-2369P2.2/GPCR13/DFNB68/H218/LPB2)

S1PR2 est localisé sur le chromosome 19 chez l'homme et 9 chez la souris (Table 4). Il fixe le S1P avec une affinité $K_D = 16-27$ nM (van Brocklyn et al., 1999; Kon et al., 1999; Sato et al., 2000). De par son expression ubiquitaire (Ishii et al., 2001; MacLennan et al., 1994), il est impliqué dans de nombreux processus comme la perméabilité des endothéliums, le métabolisme, ou encore les fonctions musculaires (Adada et al., 2013). Les souris déficientes pour *S1pr2* présentent un phénotype d'apparence normale à la naissance. Cependant, on observe jusqu'à 40% de mortalité entre les semaines 3 et 7 due à des crises d'épilepsie (Du et al., 2010; MacLennan et al., 2001; Moriyama et al., 2014). En effet, *S1pr2* joue un rôle essentiel dans le développement de l'excitabilité neuronale (MacLennan et al., 2001). Une mutation dans la séquence du gène entraîne la surdité chez l'homme et chez la souris (Kono et al., 2007; Santos-Cortez et al., 2016). S1PR2 a donc une fonction importante dans le développement neuronal. En revanche, aucune étude parue ne s'est intéressée à la distribution des lymphocytes dans les souris *S1pr2*-KO.

Pourtant, S1PR2 est un récepteur intéressant car contrairement à S1PR1, il inhibe la migration lymphocytaire. On retrouve plusieurs exemples dans la littérature : *in vivo*, la surexpression de *S1pr2* bloque les lymphocytes T dans les ganglions (Laidlaw et al., 2019). *S1pr2* retient les lymphocytes Tfh et B dans les centres germinatifs des ganglions (Green et al., 2011; Moriyama et al., 2014; Muppidi et al., 2014) et les lymphocytes $T\gamma\delta$ Ccr6+ dans le derme (Laidlaw et al., 2019). On suppose même que le récepteur a un rôle antagoniste à S1PR1, en se couplant aux protéines de la famille $G_{12/13}$ qui activent la voie RHO/ROCK et inhibent la protéine RAC activée par S1PR1 (Sugimoto et al., 2003; Takashima et al., 2008) (Figure 21). La protéine RHO induit la mise en place de fibres de stress et d'adhésions focales (Nobes and Hall, 1999; del Pozo et al., 1999). L'activation de la sous-unité $G\alpha_{13}$ pourrait se faire de façon ligand-indépendante, même si elle est augmentée en présence de S1P (Windh et al., 1999). Dans les lymphocytes B, la transduction de S1PR2 dans une lignée qui migre en réponse au S1P grâce à S1PR1 suffit à inhiber cette migration (Sic et al., 2014), mais l'antagonisme fonctionnel entre S1PR1 et S1PR2 dans la migration des lymphocytes T reste à démontrer. À l'inverse de la voie RHO/ROCK, S1PR2 peut aussi recruter la sous-unité $G\alpha_i$ et activer RAC1 (Lepley et al., 2005; Windh et al., 1999) (Figure 21). Enfin, il peut se coupler avec la sous-unité $G\alpha_q$ pour stimuler la voie du relargage de calcium intracellulaire (Kon et al., 1999) (Figure 21).

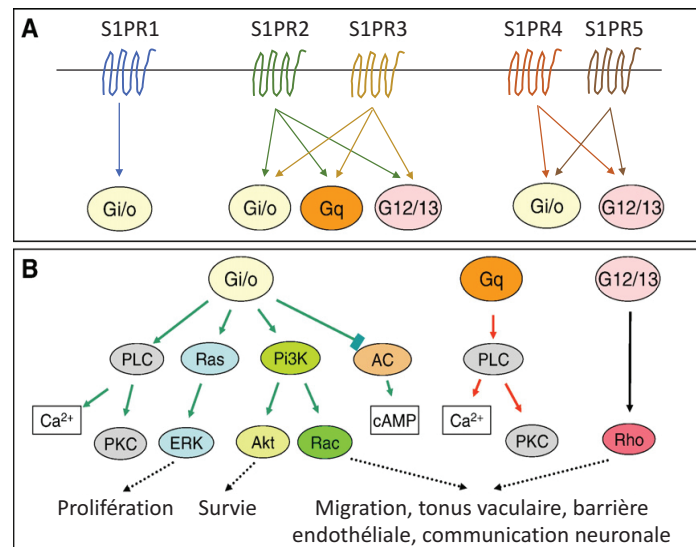


Figure 21 : Voies de signalisation induites par les S1PR.

Le S1P possède cinq récepteurs. Ces derniers sont couplés à différentes protéines G et peuvent de ce fait activer diverses voies de signalisation intracellulaires.

(Adapté de Brinkmann, 2007)

2.3.3 S1PR3 (EDG-3/LPB3)

Identifié en 1996, S1PR3 fixe le S1P avec une affinité $K_D = 23-26$ nM (van Brocklyn et al., 1999; Kon et al., 1999). Il est localisé sur le chromosome 9 humain, et le chromosome 13 murin (Table 4). Son expression est ubiquitaire et particulièrement élevée dans les tissus cardiaques (Ishii et al., 2001; Yamaguchi et al., 1996). S1PR3 régule de nombreuses fonctions cellulaires, comme la migration, la survie, la prolifération ou encore l'angiogenèse (An et al., 2000; Brinkmann, 2007). La souris *S1pr3*^{-/-} est viable et fertile avec un développement normal, et ne présente pas de phénotype particulier : S1pr3 n'est pas essentiel au développement embryonnaire (Ishii et al., 2001).

S1PR3 agit dans la migration de plusieurs types de cellules immunitaires et peut activer la voie de signalisation RHO en se couplant avec une protéine trimérique de la famille $G_{12/13}$, ou la voie MAPK/ERK en recrutant la sous-unité $G\alpha_i$ (An et al., 2000; Windh et al., 1999) (Figure 21). Les DC matures murines expriment des niveaux élevés d'ARNm et migrent en réponse au S1P grâce à S1pr3 (Maeda et al., 2007). S1pr3 induit également la migration des macrophages de souris *in vitro* (Keul et al., 2011). *In vivo*, dans un modèle murin d'athérosclérose, S1pr3 est responsable du recrutement des macrophages et des monocytes sur les sites de lésion. Des chimères générées par greffe de moelle osseuse ont montré que le récepteur agissait à la fois dans les macrophages et les monocytes, en les faisant migrer, et au niveau des cellules non-hématopoïétiques, pour induire le recrutement. S1pr3 est aussi impliqué dans la mobilité des leucocytes, et en particulier des lymphocytes B. Chez la souris, les

lymphocytes B immatures non-autoréactifs de la moelle osseuse migrent en réponse au S1P d'une façon dépendante de S1pr3 *in vitro* (Donovan et al., 2010). De plus, S1pr3 est nécessaire au positionnement des lymphocytes B transitionnels dans les sinusoides de la moelle osseuse, mais pas à leur sortie. De même, la migration *in vitro* des lymphocytes B de la rate et des ganglions dépend de S1pr3 (Girkontaite et al., 2004; Sinha et al., 2009), mais les lymphocytes B S1pr3^{-/-} transitent normalement dans les ganglions, ce qui montre que ce récepteur n'est pas indispensable à leur sortie (Nussbaum et al., 2015). Par microscopie intravitale, on peut voir que lors d'un traumatisme musculaire, S1pr3 est essentiel au roulement des leucocytes le long de l'endothélium musculaire (Nussbaum et al., 2015). Plus précisément, le récepteur induit la mobilisation de la P-sélectine nécessaire au *rolling*, en se couplant à une protéine G possédant une sous-unité Gα_q, qui active la Plcβ et le relargage de calcium intracellulaire (Ancellin and Hla, 1999) (Figure 21). S1pr3 n'est pas impliqué dans la circulation des lymphocytes T et NK.

2.3.4 S1PR4 (EDG-6/LPC1/SLP4)

En 2000, le S1P a été identifié pour la première fois comme ligand du S1PR4 avec une affinité K_D = 12-63 nM (Van Brocklyn et al., 2000; Yamazaki et al., 2000). S1PR4 est le moins connu des S1PR. Il est localisé sur le chromosome 19 chez l'homme, et le 10 chez la souris (Table 4). Dans les deux espèces, l'expression de S1PR4 est restreinte aux poumons et aux tissus lymphoïdes et hématopoïétiques (Gräler et al., 1998). Cette localisation a rapidement amené l'hypothèse que le récepteur jouerait un rôle important dans le système immunitaire.

La fonction de S1PR4 n'est pas encore bien comprise. *In vitro*, S1PR4 inhibe la prolifération des lymphocytes T stimulés avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Wang et al., 2005). Ce récepteur semble aussi impliqué dans la régulation de la sécrétion d'IL-4 et d'IL-10 (Wang et al., 2005). La stimulation de S1PR4 par le S1P *in vitro* induit la mobilisation du calcium intracellulaire (Yamazaki et al., 2000), et stimule la voie MAPK/ERK *via* le recrutement d'une protéine trimérique G associée à la sous-unité Gα_i (Long et al., 2010; Van Brocklyn et al., 2000) (Figure 21). S1pr4 est également capable d'activer la voie Rho/Rock en aval de la sous-unité Gα_{12/13} (Gräler et al., 2003; Matsuyuki et al., 2006) (Figure 21), induisant un réarrangement du cytosquelette dans les cellules CHO. Cette voie de signalisation suggère un rôle dans la mobilité cellulaire. Pourtant, le rôle potentiel de S1PR4 dans la migration des cellules immunitaires reste controversé. Dans une première étude, deux lignées T murines transduites pour exprimer S1pr4 ne migrent pas en réponse au S1P (Wang et al., 2005). Cependant, les lignées utilisées ici n'expriment aucun des S1pr à l'état basal, et on ne peut donc pas être sûr que ces cellules possèdent la machinerie cellulaire fonctionnelle pour induire une réponse migratoire au S1P. Dans une autre étude, les auteurs détectent dans ces mêmes lignées l'expression forte et constitutive de S1pr4, et une expression plus faible

de S1pr1 (Matsuyuki et al., 2006). Cette fois-ci, les cellules migrent en réponse au S1P, de façon dépendante de S1pr4. De même, la transfection de la lignée CHO avec *S1pr4* induit leur migration en réponse au S1P (Kohno et al., 2003). Néanmoins, ce sont des cellules ovariennes de hamster qui ne sont donc pas forcément représentatives du comportement d'une cellule lymphoïde. Enfin, la surexpression de S1PR4 dans des Jurkat augmente leur migration spontanée, mais celle-ci n'est pas augmentée en présence de S1P (Gräler et al., 2003). *In vivo*, une équipe suggère que l'expression de S1pr4 par les lymphocytes T est essentielle à leur passage vers la lymphe afférente (Xiong et al., 2019). Pourtant, les souris *S1pr4*^{-/-} n'ont aucun défaut de distribution lymphocytaire (Schulze et al., 2011). Par contre, les lymphocytes T *S1pr4*^{-/-} Cd4⁺ et Cd8⁺ migrent plus en réponse au S1P que les lymphocytes *S1pr4*^{+/+}, indiquant plutôt un rôle inhibiteur du récepteur. S1pr4 semble d'ailleurs impliqué dans la rétention des neutrophiles (Allende et al., 2011). En conclusion, les données disponibles à ce jour ne sont pas suffisamment claires pour déterminer le rôle de S1PR4 dans la migration des cellules immunitaires, en particulier des lymphocytes T. Une étude propose que S1pr4 formerait des hétérodimères avec S1pr1, mais cela n'a pas été vérifié *in vivo* (Matsuyuki et al., 2006). De plus, *in vitro*, S1PR4 seul n'induit pas la migration des lymphocytes B au S1P mais diminue leur migration médiée par S1PR1 (Sic et al., 2014). Ceci pourrait expliquer que l'on ne parvienne pas à identifier l'impact de S1PR4 dans la migration lorsqu'il est exprimé individuellement par les cellules.

2.3.5 S1PR5 (EDG-8/LPB4/SPPR-1/SPPR-2/NRG-1)

S1PR5 est le récepteur au S1P le plus récemment caractérisé. Localisé sur le chromosome 19 humain et 9 murin, il a une très forte affinité pour le S1P : $K_D = 2 - 6$ nM (Im et al., 2000a; Malek et al., 2001) (Table 4). Il est fortement exprimé dans le cerveau (Glickman et al., 1999; Im et al., 2000a), plus précisément dans les oligodendrocytes et les cellules endothéliales, où il participe à la formation et la quiescence de la barrière hémato-encéphalique (van Doorn et al., 2012; Jaillard et al., 2005). Son ARNm est également retrouvé dans la rate et dans les cellules immunitaires circulantes (Im et al., 2001), en particulier les lymphocytes NK. S1PR5 est impliqué dans la répression de la prolifération (Malek et al., 2001) et le contrôle de la mitose (Andrieu et al., 2017), mais aussi dans la migration cellulaire.

S1PR5 est essentiel à la migration des lymphocytes NK. Dans les souris déficientes pour *S1pr5*, on observe une altération de la distribution des lymphocytes NK, c'est-à-dire une diminution de leur pourcentage dans le sang, la rate et les poumons, et une augmentation dans la moelle osseuse et les ganglions, par rapport aux souris *S1pr5*^{+/+} (Walzer et al., 2007). La migration des lymphocytes NK *S1pr5*^{-/-} murins en réponse au S1P est altérée *ex vivo* et *in vivo*. De plus, les lymphocytes NK humains traités avec l'antagoniste de S1PR5 BIO-027223 ne migrent plus *ex vivo* (Drouillard et al., 2018a). Dans les souris *S1pr5*^{+/+}, les lymphocytes NK *S1pr5*^{-/-} injectés sont bloqués dans les

ganglions et la moelle osseuse (Jenne et al., 2009a; Walzer et al., 2007). S1pr5 est donc essentiel à la sortie des lymphocytes NK des OLS. De plus, dans les souris *Sphk-KO* (déficientes en S1P), les lymphocytes NK sont également bloqués dans la moelle osseuse, et leur nombre est diminué dans la lymphe et la rate (Jenne et al., 2009a). Ils ont donc besoin de l'engagement de S1pr5 médié par le S1P pour sortir. S1pr5 est aussi requis pour le recrutement des lymphocytes NK sur les sites d'inflammation (Walzer et al., 2007) et pour leur positionnement dans les ganglions (Fang et al., 2017). Contrairement à la sortie des lymphocytes T des OLS médiée par S1pr1, la sortie des lymphocytes NK des OLS et OLP est résistante au FTY720, un agoniste à effet inhibiteur de quatre des cinq S1PR (Gräler and Goetzl, 2004), ce qui signifie que S1pr5 n'est pas impacté de la même façon par l'agoniste et agit par des mécanismes différents de S1pr1 (Mayol et al., 2011). Il est possible que cette différence soit à l'origine de l'utilisation préférentielle de S1pr1 par les lymphocytes T et de S1pr5 par les lymphocytes NK. S1pr5 est également impliqué dans la migration des monocytes circulants Ly6c-, qui expriment des niveaux élevés de S1pr5 (Debien et al., 2013). Les souris *S1pr5-KO* présentent un nombre normal de monocytes Ly6c- dans la moelle osseuse mais une diminution de leur nombre en périphérie (sang et OLS). En particulier, les monocytes Ly6c- sont absents des sinusoides de la MO. S1pr5 n'est pas responsable de leur viabilité *in vitro*, et leur migration ne dépend pas du gradient de S1P. S1pr5 est donc responsable de la migration des monocytes Ly6c- du parenchyme aux sinusoides de la MO mais d'une façon non impactée par les gradients de S1P : soit d'une façon S1P-indépendante, avec un ligand non-identifié, soit par une activation constitutive. Il a en effet été montré que S1PR5 pouvait induire des voies de signalisation en l'absence de stimuli extérieur (Niedernberg et al., 2003). Comme S1PR4, S1PR5 peut se coupler à une protéine G associée à une sous-unité $G\alpha_i$ et activer par exemple la voie de la PI3K (Jaillard et al., 2005; Malek et al., 2001) (Figure 21). Il peut aussi recruter les sous-unités $G\alpha_{12/13}$ pour induire la voie RHO/ROCK (Figure 21). De façon intéressante, par cette voie, S1pr5 peut exercer une action inhibitrice de la migration, comme c'est le cas avec les progéniteurs des oligodendrocytes (Jaillard et al., 2005; Novgorodov et al., 2007).

2.4 Régulation des S1PR

Dans les lymphocytes T, les S1PR sont régulés à différents niveaux : au niveau transcriptionnel, pour contrôler leur expression aux stades de maturation adéquats ; au niveau post-traductionnel, pour réguler leur réponse au ligand ; et tout au long de leur circulation dans l'organisme, pour assurer leur transit dans les différents compartiments.

2.4.1 Différentes combinaisons en fonction des types cellulaires

Il existe cinq S1PR et ceux-ci ne sont pas exprimés de la même façon par tous les types de lymphocytes. Du fait de l'absence d'anticorps fonctionnel en cytométrie en flux disponible dans le commerce, la mesure de l'expression des récepteurs a été faite au niveau de l'ARNm. Ainsi, chez la souris, les lymphocytes NK les expriment tous sauf S1pr3, avec une très forte prédominance de S1pr5 (Walzer et al., 2007) (Figure 22). Dans les lymphocytes B, on détecte un fort niveau d'ARNm de S1pr1, et un niveau plus faible de S1pr3 et S1pr4. Enfin, les lymphocytes T expriment S1pr1, S1pr4, et S1pr2 à faible niveau. Ces différences sont cohérentes avec les comportements migratoires spécifiques de chaque sous-type de lymphocytes observés en réponse au S1P : les lymphocytes NK sortent des organes lymphoïdes grâce à S1pr5 (Walzer et al., 2007), le positionnement des lymphocytes B dans les sinusoides de la moelle osseuse dépend de S1pr3 et leur sortie de S1pr1 (Allende et al., 2010), et les lymphocytes T sortent des ganglions avec S1pr1 (Lo et al., 2005; Matloubian et al., 2004). Il convient cependant de garder à l'esprit que les mesures réalisées ici sont faites sur l'ARNm et peuvent différer de l'expression membranaire des récepteurs. Malheureusement, il n'est pas possible à ce jour de détecter les S1PR au niveau protéique.

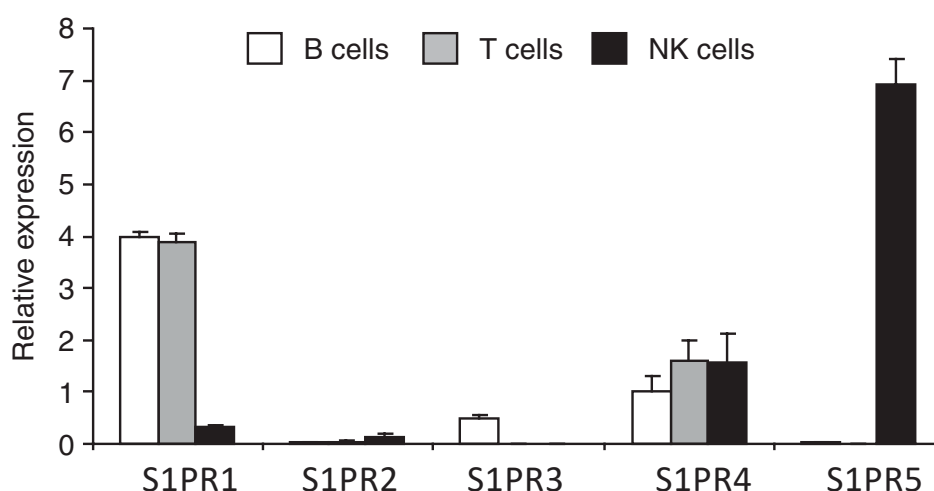


Figure 22 : Expression ARNm des S1pr par les lymphocytes T, B et NK murins.
(Walzer et al., 2007)

2.4.2 Régulation transcriptionnelle

S1pr1 est régulé positivement par le Kruppel-like factor 2 (Klf2), qui se fixe sur une région proximale du promoteur de *S1pr1* et active la transcription (Bai et al., 2007; Carlson et al., 2006). Sur le promoteur de *S1pr1*, on retrouve d'ailleurs un motif de liaison consensus de la famille des KLF (CACCC). Les lymphocytes T *Klf2*^{-/-} n'expriment

pas S1pr1 et sont incapables de rejoindre la circulation sanguine. L'expression transcriptionnelle de S1pr1 est également influencée par l'horloge circadienne (Druzd et al., 2017).

La transcription de *S1pr5* est promue par T-bet (Jenne et al., 2009a). Ce facteur de transcription est requis pour la maturation des lymphocytes NK et NKT (Townsend et al., 2004). Dans les souris Duane, qui ont une mutation sur le gène codant pour *T-bet*, l'expression en ARNm *S1pr5* des lymphocytes NK diminue de 30 fois par rapport aux contrôles (Jenne et al., 2009a). Les lymphocytes T CD8⁺ T_{EM} *T-bet*-KO perdent l'expression de S1pr5. De plus, une surexpression de T-bet dans la lignée WEHI-231 et dans les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ primaires suffit à induire l'expression de S1pr5. Par immunoprécipitation de chromatine (ChIP), on peut voir que T-bet interagit physiquement avec un site en 3' du gène codant pour S1pr5 (Jenne et al., 2009b), mais nos propres résultats suggèrent que c'est plutôt la région 5' qui serait régulée par T-bet (Zhang et al., en cours de publication).

2.4.3 Régulation post-traductionnelle : internalisation des S1PR

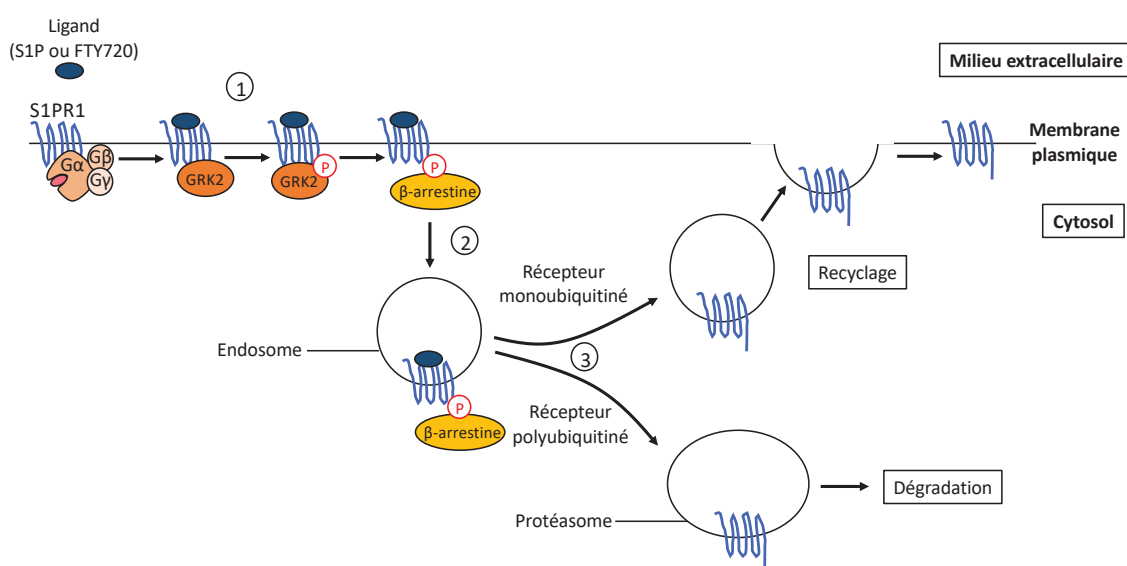


Figure 23 : Internalisation et dégradation ou recyclage de S1PR1.

(1) La fixation du ligand induit la phosphorylation du domaine C-terminal de S1PR1 par GRK2. (2) La phosphorylation du domaine C-terminal recrute les β-arrestines qui promeuvent l'internalisation du récepteur dans des vésicules endosomales. (3) Si S1PR1 est faiblement ubiquitiné, il est recyclé à la membrane plasmique. S'il est fortement ubiquitiné, il est dégradé par le protéasome.

Certains S1PR peuvent être internalisés quand ils sont en présence de leur ligand. C'est par exemple le cas de S1PR1 et S1PR4. Après incubation avec une forte dose de

S1P (1 μ M), S1PR4 est internalisé et son expression en surface diminue de 35%, d'une façon indépendante de G_i (Gräler et al., 2003). Un marquage après perméabilisation des cellules révèle le même niveau total de S1PR4 avec ou sans S1P : le récepteur est internalisé, mais pas dégradé.

S1PR1 est également internalisé lors de la fixation du S1P (Liu et al., 1999). La fixation du S1P induit la phosphorylation de S1PR1 par la G-protein coupled receptor kinase-2 (GRK2) (Watterson et al., 2002) (Figure 23 – (1)). La phosphorylation est rapide (20-60 sec) et a lieu au niveau d'un domaine riche en sérines de la queue C-terminale. Le remplacement de ces cinq sérines par des alanines non phosphorylables (*S1PR1^{SSA/SSA}*) n'inhibe pas la signalisation en aval du récepteur mais empêche son internalisation (Oo et al., 2007; Thangada et al., 2010). La phosphorylation permet le recrutement des β -arrestines, qui se fixent aux domaines phosphorylés. Ceci facilite l'endocytose des endosomes contenant le récepteur (Oo et al., 2007) (Figure 23 – (2)). En 15 min, S1PR1 se retrouve dans des vésicules périnucléaires, puis est recyclé à la membrane plasmique en 30 min à 2h (Liu et al., 1999; Oo et al., 2007). Le trafic se fait par voie endosomale. La destinée du récepteur internalisé est dictée par son degré d'ubiquitination (Figure 23 – (3)). Ainsi, le S1P induit une mono-ubiquitination ou une faible poly-ubiquitination, qui est suivie du recyclage de S1PR1 (Oo et al., 2007). En comparaison, la fixation de l'agoniste FTY720 stimule une forte poly-ubiquitination qui mène à la dégradation de S1PR1 par le protéasome. *In vivo*, l'internalisation de S1pr1 en présence de son ligand a une importance physiologique. Les lymphocytes T possédant uniquement *S1pr1^{SSA/SSA}* internalisent ce dernier moins vite et sont moins désensibilisés par le S1P ou le FTY720, ce qui retarde la lymphopénie périphérique produite par le FTY720 (Thangada et al., 2010). De même, les lymphocytes T déficients en *Grk2* ne diminuent par l'expression de leur S1pr1 membranaire dans le sang, ce qui inhibe leur migration vers les ganglions (Arnon et al., 2011).

L'internalisation de S1PR2 n'a pas été étudiée chez les mammifères. En revanche, chez le zebrafish, la mutation d'une arginine dans le motif DRY de la troisième hélice de *s1pr2* est à l'origine d'une perte de signal du récepteur (Burczyk et al., 2015). Celle-ci est en fait causée par l'internalisation constitutive de *s1pr2*, qui reste localisé en permanence dans des vésicules intracytoplasmiques. L'inhibition de *grk2* (homologue de la GRK2 des mammifères) ou de la β -arrestine 2 restaure l'expression en surface de *s1pr2*. Le *s1pr2* du zebrafish présente 62% d'homologie avec celui de l'homme (Mendelson et al., 2013). Ceci suggère que S1PR2 pourrait être désensibilisé et internalisé par un processus similaire à S1PR1, impliquant GRK2 et les β -arrestines.

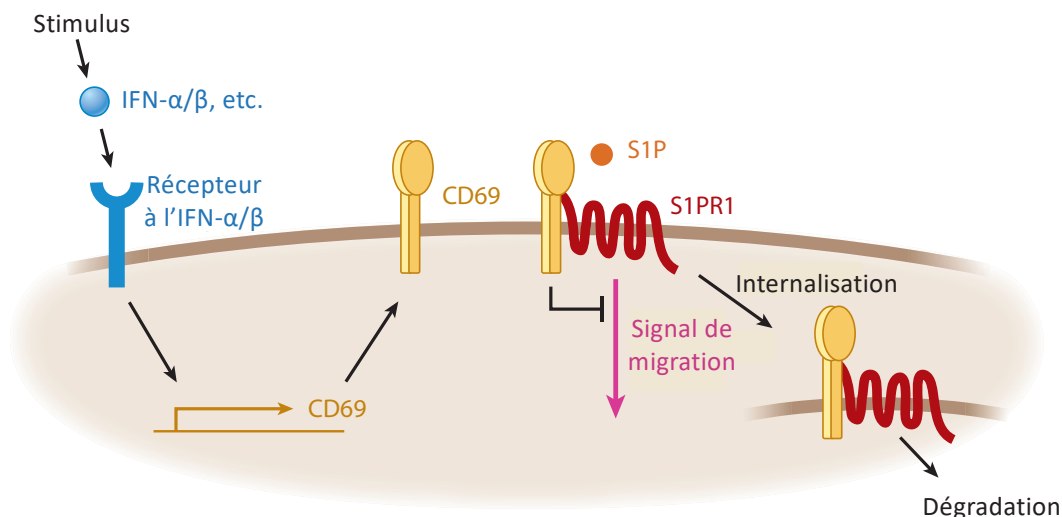


Figure 24 : Régulation de l'expression membranaire de S1PR1 par CD69.

L'exposition des lymphocytes à certains stimuli extrinsèques, comme les IFN de type I, est suivie de l'expression de CD69 à la membrane plasmique. Ce dernier s'associe à S1PR1 et induit son internalisation et sa dégradation, bloquant ainsi le signal de migration médié par le S1P. IFN : interféron ; S1P : sphingosine-1-phosphate, S1PR1 : S1P receptor 1.

(Cyster and Schwab, 2012)

Le S1PR1 en surface peut aussi être régulé par la lectine transmembranaire de type C CD69 (Figure 24). *In vitro*, l'expression de Cd69 suffit pour diminuer l'expression membranaire de S1pr1 (Bankovich et al., 2010). Les régions membranaires et transmembranaires proximales de Cd69 interagissent avec l'hélice membranaire 4 de S1pr1. Le domaine lectine facilite cette interaction. Le complexe ainsi formé régule négativement S1pr1 par internalisation (Bankovich et al., 2010; Shiow et al., 2006). Contrairement à l'internalisation induite par le ligand, l'internalisation médiée par Cd69 ne dépend ni du domaine C-terminal du récepteur, ni de la fixation du S1P, bien que cette dernière soit stabilisée par Cd69. Bankovich et ses collègues suggèrent que Cd69 induirait une conformation similaire à celle obtenue lors de la liaison du ligand, ce qui activerait l'internalisation et la dégradation de S1pr1. *In vivo*, l'expression de Cd69 est augmentée par certains stimuli immunitaires, comme l'Ifn-α/β induit par l'acide polyinosine polycytidylique (poly(I:C)) (Shiow et al., 2006). En cas d'infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), qui induit une forte réponse T, ou de stimulation avec du poly(I:C), les lymphocytes T *Cd69*^{-/-} sont moins retenus dans les OLS. Les lymphocytes *Cd69*^{+/+}, quant à eux, diminuent leur expression de S1pr1 consécutivement à la stimulation et y restent plus longtemps. À l'homéostasie, les lymphocytes T_{RM} perdent l'expression de Klf2 et augmentent Cd69, diminuant en conséquence l'expression de S1pr1 (Mackay et al., 2015; Skon et al., 2013). Cela participerait à leur rétention dans les tissus. La régulation négative du S1pr1 par Cd69

est donc importante pour la recirculation des lymphocytes T, à l'homéostasie comme en condition inflammatoire.

Cd69 ne se lie pas avec S1pr3 (Bankovich et al., 2010), ni avec S1pr5 (Jenne et al., 2009a). Par ailleurs, l'exposition de ce dernier au FTY720 ou au S1P ne réduit pas son expression de surface, contrairement à S1pr1. S1pr5 est donc moins sensible à l'internalisation induite par ses agonistes.

2.4.4 Régulation cyclique au cours de la recirculation des lymphocytes T

Le processus d'internalisation permet une régulation cyclique des niveaux de S1PR membranaires au cours de la recirculation entre le sang et la lymphe et les OLS. Cela a été montré chez la souris pour S1pr1. Lorsqu'on injecte en intra-veineux (IV) des lymphocytes T exprimant S1pr1-flag (afin de pouvoir détecter leur expression par FACS), l'expression de S1pr1 est fortement diminuée dans le sang au bout de 15 min (Lo et al., 2005). À 45 min, le S1pr1 membranaire a presque totalement disparu. 32h après injection, quand les lymphocytes transférés se sont répartis dans tous les organes, on peut voir que S1pr1 est toujours très faible dans le sang. À l'inverse, son expression est forte dans les ganglions et la rate, puis il est de nouveau diminué dans la lymphe. De plus, une fois dans les OLS, les lymphocytes T activés perdent leur expression en S1pr1, puis le ré-expriment au bout de trois jours pour sortir des OLS (Matloubian et al., 2004). *In vitro*, l'incubation de lymphocytes T de ganglions dans du plasma suffit à supprimer rapidement la présence de S1pr1 à la membrane plasmique (Lo et al., 2005). Ces observations n'ont encore jamais été validées chez l'homme.

Ainsi, chez la souris, S1pr1 est internalisé dans le sang où la concentration en S1P est élevée (Figure 25). Une fois dans les OLS, les lymphocytes T ré-acquièrent l'expression du récepteur. S'ils sont activés, l'expression de S1pr1 est diminuée pour augmenter leur temps de transit afin de proliférer et se différencier. La ré-externalisation de S1pr1 est suivie de leur sortie dans la lymphe, où la forte présence de S1P internalise à nouveau le récepteur. Ces variations contrôlent la recirculation des lymphocytes T et leur temps de transit dans les différents compartiments. Ce modèle n'a cependant pas été testé de façon approfondie, en particulier chez l'homme. Par ailleurs, il ne prend pas en compte les autres récepteurs comme S1pr2, S1pr4 qui sont pourtant exprimés à par les lymphocytes T (Jin et al., 2003; Walzer et al., 2007), et dont on ne connaît pas le comportement au cours de la circulation lymphocytaire.

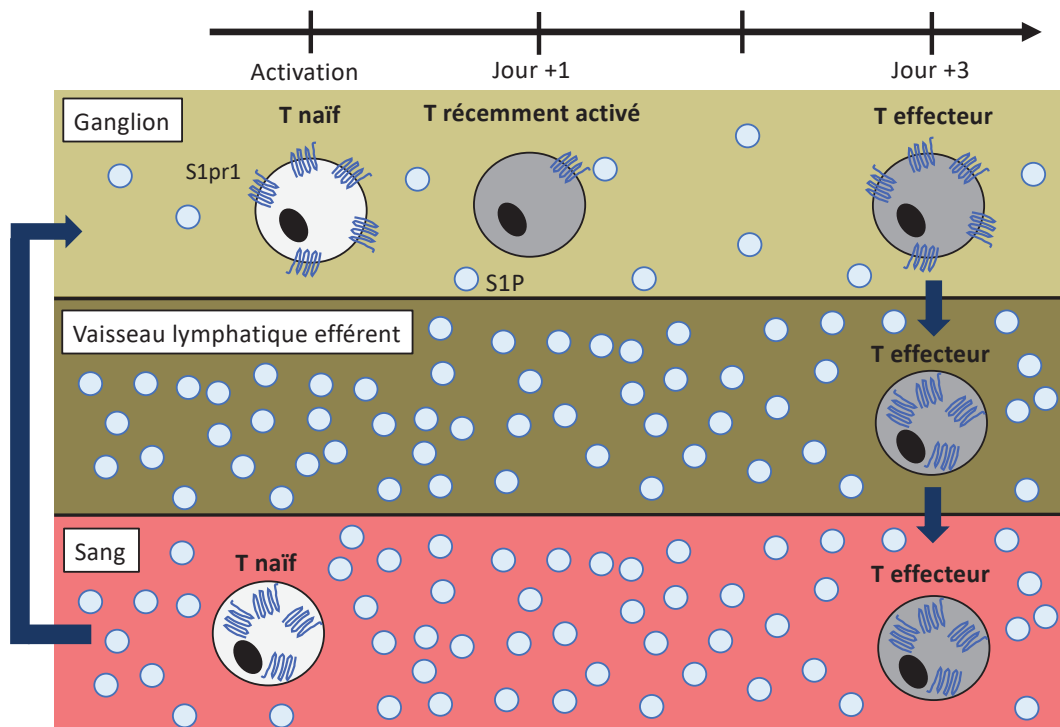


Figure 25 : Régulation cyclique de l'expression membranaire de S1pr1 par les lymphocytes T murins.

Les lymphocytes T naïfs activés dans le ganglion réduisent rapidement leur expression membranaire de S1pr1. Cette diminution pourrait favoriser leur rétention durant un temps suffisant pour permettre leur expansion clonale et leur différenciation en lymphocytes T effecteurs. Au bout de trois jours, les lymphocytes T effecteurs ré-acquièrent l'expression de S1pr1, qui est essentiel à leur sortie. Une fois dans la lymphe puis dans le sang, la forte concentration en S1P du milieu induit l'internalisation de S1pr1. L'expression de S1pr1 à la surface des lymphocytes est donc régulée de façon cyclique au cours de leur circulation entre les fluides et les tissus.

Le S1P et ses récepteurs, en particulier S1PR1, sont donc fortement impliqués dans la circulation des lymphocytes T dans l'organisme. Leur rôle n'est pas encore totalement bien compris, mais de nombreux arguments plaident pour le caractère essentiel de S1PR1 dans la sortie des OLS.

III - Circulation des lymphocytes T dans l'organisme

La migration des lymphocytes T entre les différents compartiments de l'organisme est contrôlée à toutes les étapes par plusieurs acteurs moléculaires présentés précédemment. Nous allons décrire plus précisément à quels niveaux interviennent les S1PR dans ce processus.

3.1 Distribution des lymphocytes T dans l'organisme

Les lymphocytes T constituent une population hétérogène avec des rôles spécifiques. Pour réaliser leur fonction immunitaire de façon efficace, chaque sous-population de lymphocyte T doit se trouver au bon endroit, au bon moment. De ce fait, on observe une diversité dans la localisation des différents types de lymphocytes T dans l'organisme, ces derniers se répartissant entre les tissus lymphoïdes, le sang et les organes non-lymphoïdes, en particulier les muqueuses comme le tube digestif ou les poumons. Cette distribution est maintenue par un trafic constant des lymphocytes T d'un compartiment à un autre.

3.1.1 Chez l'homme

Chez l'homme, environ 80% des lymphocytes T sont localisés dans les tissus lymphoïdes (Ganusov and De Boer, 2007). On en retrouve également une grande partie dans les muqueuses. Seuls 2-3% des lymphocytes T sont présents dans le sang circulant. De façon générale, on observe plus de lymphocytes T CD4+ que de lymphocytes T CD8+ dans le corps humain, sauf dans les intestins où ils sont présents en proportions équivalentes. De même, la comparaison des organes de plusieurs individus a montré que les lymphocytes T mémoires étaient prédominants chez l'adulte par rapport aux lymphocytes T naïfs, et que leur fréquence s'accroissait avec l'âge (Sathaliyawala et al., 2013; Saule et al., 2006). Les sous-populations de lymphocytes T CD4+ et CD8+ sont réparties de façon distincte dans l'organisme (Table 5). Ainsi, pour les CD4+, les lymphocytes T naïfs, T_{CM} et T_{EM} sont présents en proportions équivalentes dans le sang et les ganglions. Dans la rate et les poumons, on trouve principalement des lymphocytes T_{EM} et quelques lymphocytes T_{CM} . Les lymphocytes T_{EM} sont également prédominants dans les intestins, et on retrouve un pourcentage important de lymphocytes T_{CM} dans le colon. Concernant les lymphocytes T CD8+, on retrouve très peu de lymphocytes T_{CM} CD8+, même dans les ganglions. Les lymphocytes T CD8+ semblent donc persister dans l'organisme sous forme de lymphocytes T naïfs, T_{EM} et T effecteurs (T_{eff}). Contrairement aux lymphocytes T CD4+, les lymphocytes T CD8+ naïfs sont largement majoritaires dans le sang et les ganglions par rapport aux populations mémoires. Les lymphocytes T mémoires sont surtout

localisés dans les muqueuses et les lymphocytes T effecteurs quasiment uniquement dans la circulation sanguine.

COMPARTIMENT	CD4+	CD8+
Sang	T naïfs / T_{CM} / T_{EM}	T naïfs / T_{eff} (T_{EM})
Ganglions	T naïfs / T_{CM} / T_{EM}	T naïfs (T_{EM})
Rate	T_{EM} / T_{CM}	T_{EM}
Poumons	T_{EM} / T_{CM}	T_{EM}
Intestins	T_{EM} (T_{CM})	T_{EM}
Colon	T_{EM} / T_{CM}	T_{EM}

Table 5 : Distribution des sous-populations de lymphocytes T chez l'homme.
(D'après Sathaliyawala et al., 2013)

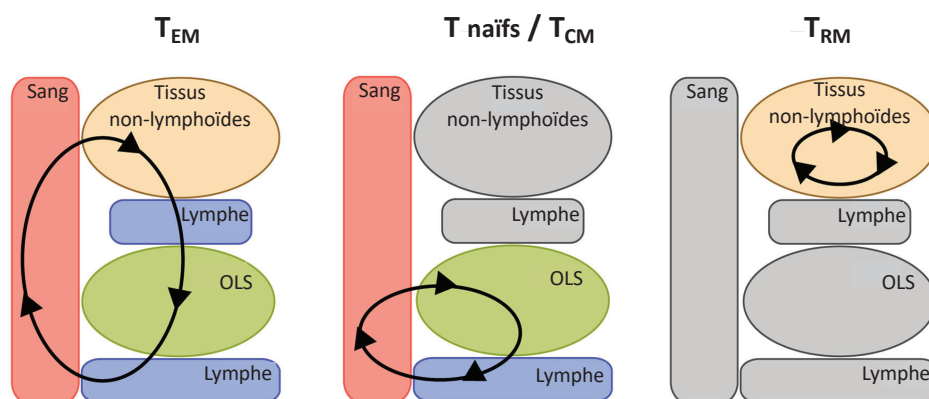


Figure 26 : Recirculation des lymphocytes T naifs et mémoires.

Le schéma de circulation des lymphocytes T varie en fonction des sous-populations. Ainsi, les lymphocytes T naifs et T_{CM} recirculent principalement entre les OLS et les fluides (sang et lymphe), tandis que les lymphocytes T_{EM} transitent également par les tissus non-lymphoïdes. Les lymphocytes T_{RM} quant à eux résident exclusivement dans les tissus non-lymphoïdes et ne recirculent pas dans le sang. T_{CM} : lymphocyte T mémoire central ; T_{EM} : lymphocyte T effecteur mémoire ; T_{RM} : lymphocyte T résident mémoire.

(Adapté de Rosato et al., 2017)

3.1.2 Chez la souris

Chez la souris, les profils de distribution des lymphocytes T semblent similaires à l'homme, même s'il est plus difficile de trouver des études rapportant les fréquences précises des sous-populations dans les différents organes. Plusieurs sous-populations

mémoires procurant une protection contre différents pathogènes ont été identifiées dans les muqueuses (Gebhardt et al., 2009; Hogan et al., 2001; Teijaro et al., 2011) et dans les tissus lymphoïdes (Bingaman et al., 2005), tandis que les cellules naïves sont principalement détectées dans les OLS et dans le sang (Sallusto et al., 1999; Soroosh et al., 2007).

Cette diversité de localisation nous donne un indice sur les schémas de circulation des différentes sous-populations de lymphocytes T. En effet, à l'exception des lymphocytes T_{RM} , les lymphocytes T ne restent pas exclusivement dans les organes dans lesquels ils ont été identifiés dans les études citées précédemment, mais circulent en permanence entre les différents compartiments (Figure 26). Les lymphocytes T naïfs et T_{CM} migrent exclusivement entre le sang et les OLS, tandis que les lymphocytes T_{EM} passent dans le sang, transitent par les organes non-lymphoïdes, puis rejoignent les OLS par la lymphe (Mackay et al., 1990; Rosato et al., 2017; Sallusto et al., 1999).

3.2 Sortie du thymus

Le thymus est connecté à la circulation sanguine par des artères et des veines qui arrivent et repartent principalement au niveau de la jonction cortico-médullaire. Il possède également des vaisseaux lymphatiques efférents. Différentes études suggèrent qu'une fois matures, les lymphocytes T sont capables de quitter le thymus à la fois par le sang et par la lymphe, sans qu'on n'ait pu à ce jour préciser si la migration se faisait préférentiellement par l'une des deux voies (Weinreich and Hogquist, 2008).

Au début des années 2000, on en savait encore très peu sur la manière dont les thymocytes quittent le thymus pour rejoindre les OLS. En essayant de comprendre ce processus, Yagi et ses collègues ont remarqué que le traitement de souris avec du FTY720, un immunosuppresseur synthétisé à partir d'une molécule fongique, diminuait drastiquement le nombre de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC). En particulier, les souris traitées présentent une réduction de 98% du nombre de lymphocytes T circulants comparé à celui observé dans les souris contrôles (Yagi et al., 2000). Cette diminution s'accompagne d'une augmentation du pourcentage de lymphocytes T SP matures dans le thymus, en particulier au niveau de la région médullaire. Les cellules accumulées dans cette région présentent certaines caractéristiques phénotypiques spécifiques des lymphocytes T naïfs circulants. En effet, le FTY720 induit l'augmentation de l'expression de Cd62l par les lymphocytes T SP matures. Cette molécule est essentielle à l'entrée des lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques et est exprimée par les lymphocytes T naïfs circulants. On observe d'autre part la perte de l'expression de certaines molécules comme Cd69, Cd44, Cd24, protéines exprimées par les thymocytes immatures mais perdues par les matures prêts à quitter le thymus. En présence de FTY720, on assiste donc à

l'accumulation dans le thymus de lymphocytes T potentiellement capables de circuler, mais bloqués avant leur sortie au niveau de la médulla.

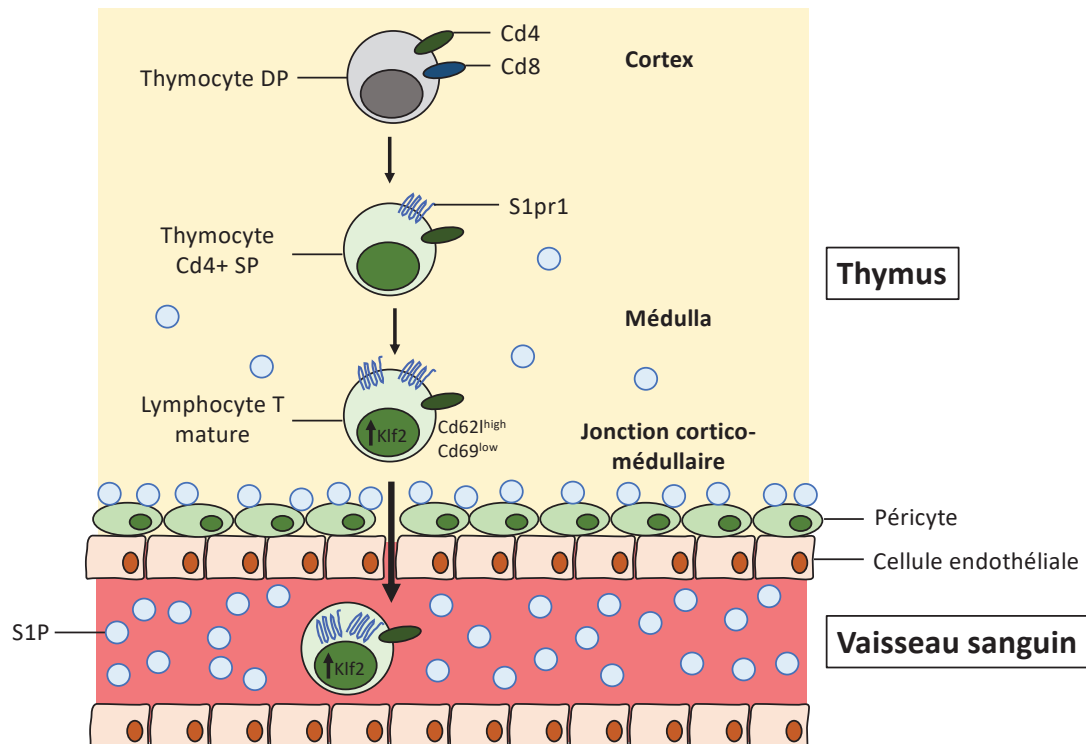


Figure 27 : Sortie des lymphocytes T matures du thymus chez la souris.

Au cours de leur maturation dans le thymus, les lymphocytes T acquièrent progressivement l'expression nucléaire du facteur de transcription Klf2, et en conséquence l'expression membranaire de S1pr1 et Cd62l. À l'inverse, l'expression de Cd69 est diminuée dans les lymphocytes T matures. L'acquisition de S1pr1 permet aux lymphocytes T matures de répondre au signal de migration induit par le S1P du sang, et ainsi de sortir du thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire. DP : stade double-positif ; Klf2 : Kruppel-like factor 2 ; S1P : sphingosine-1-phosphate ; S1pr1 : S1P récepteur 1 ; SP : stade simple-positif.

(Adapté de Kumar and Saba, 2015)

Ces constatations permettent d'orienter la suite des expérimentations pour mieux comprendre les mécanismes de sortie du thymus. En effet, le FTY720 se trouve être un agoniste à effet inhibiteur de tous les S1PR sauf S1PR2 (Gräler and Goetzl, 2004). En 2004, les équipes de J. Cyster et R. L. Proia ont montré que la sortie des lymphocytes T du thymus dépendait en fait du récepteur S1pr1. Des expériences de transfert adoptif ainsi que des KO conditionnels sur des souris ont permis de montrer de façon évidente que c'est bien l'expression intrinsèque de S1pr1 par les lymphocytes T qui permet leur sortie du thymus (Allende et al., 2004; Matloubian et al., 2004). Les souris dont les

lymphocytes T sont déficients pour *S1pr1* ne présentent quasiment pas de lymphocytes T en périphérie, en particulier dans le sang et la lymphe, mais aussi dans la rate et les ganglions lymphatiques, par rapport à des souris contrôles. Cette lymphopénie périphérique s'accompagne d'une accumulation de lymphocytes T matures dans le thymus, avec un nombre normal de lymphocytes T immatures.

On peut se demander si l'expression de S1PR1 par les thymocytes est spécifique des thymocytes matures, ou si S1PR1 est présent chez tous les thymocytes mais avec une action inhibée dans les plus immatures. La mesure de l'ARNm montre que l'expression de *S1pr1* augmente au cours du développement des lymphocytes T murins, devenant très forte juste avant leur sortie du thymus (Figure 27). En effet, on observe un niveau d'ARNm 50 fois plus élevé au stade DP qu'au stade SP, et 30 fois plus élevé entre le stade immature et mature des CD4⁺ SP (Matloubian et al., 2004). D'ailleurs, l'expression prématurée de *S1pr1* par des thymocytes immatures induit leur sortie précoce du thymus (Zachariah and Cyster, 2010). Les thymocytes expriment aussi *S1pr2* et *S1pr4* mais leur expression n'est pas modifiée en fonction du stade de maturation. Le récepteur *S1pr1* étant activé par son ligand S1P, on peut supposer que seuls les lymphocytes T matures du thymus, qui expriment *S1pr1*, réagissent au signal chimioattractif induit par le S1P de la lymphe et du sang. *In vitro*, les thymocytes matures murins et humains montrent une réponse migratoire au S1P plus forte que les thymocytes immatures (Allende et al., 2004; Matloubian et al., 2004; Resop et al., 2016). Cette migration se fait uniquement en présence d'un gradient de S1P. *In vivo*, on retrouve ce gradient naturel de S1P, avec une forte concentration de S1P dans le plasma du sang et faible concentration dans le thymus, où il est dégradé par la Lpp3 (Bréart et al., 2011). C'est ce gradient qui permet d'attirer les lymphocytes T matures hors du thymus.

L'expression de S1PR1 par les thymocytes est régulée de façon positive et négative. KLF2 est un facteur de transcription qui induit la transcription de *S1PR1* et *CD62L* (Bai et al., 2007). Comme *S1pr1*, l'expression de *Klf2* apparaît au cours du développement des thymocytes, induisant ainsi l'acquisition par les thymocytes matures des récepteurs nécessaires à leur sortie du thymus (Carlson et al., 2006; Kuo et al., 1997) (Figure 27). En opposition à *Klf2* et *S1pr1*, *Cd69* est exprimé de façon transitoire au cours de la maturation, et son expression disparaît dans les thymocytes les plus matures (Xing et al., 2016). Dans des souris exprimant *Cd69* de façon constitutive, les lymphocytes T matures s'accumulent dans la médulla, sans sortir du thymus (Feng et al., 2002). Toutes ces données suggèrent que *Cd69* est un régulateur négatif de la migration médiée par *S1pr1* des thymocytes hors du thymus, empêchant les thymocytes non matures de quitter cet organe avant la fin de leur développement.

Des études *in vitro* suggèrent également l'implication du CXC-motif chemokine récepteur (CXCR) 4 dans la sortie des lymphocytes T du thymus (Poznansky et al.,

2002; Vianello et al., 2005). CXCR4 est le récepteur du CXCL12, une protéine chimio-attractive à faible concentration (< 100 nM) et chimio-répulsive à forte concentration (> 100 nM) pour les thymocytes murins *in vitro*. Le CXCL12 est fortement produit par les cellules stromales du thymus. *Ex vivo*, seuls les thymocytes SP matures répondent à ce signal répulsif, la migration étant inhibée quand on bloque CXCR4 avec un anticorps neutralisant. CXCR4 contribuerait donc au passage des thymocytes matures dans le sang.

Chez la souris, le signal Ccl19/Ccr7 est essentiel à la sortie des thymocytes matures du thymus néo-natal (Ueno et al., 2002). En revanche, cette chimiokine semble dispensable chez l'adulte, et permettrait surtout la migration des thymocytes conventionnels et Foxp3+ (qui donneront des lymphocytes Treg) du cortex vers la médulla (Cowan et al., 2016; Ueno et al., 2004).

• Cas de la sortie des lymphocytes T de la moelle osseuse

Si on en sait peu sur les signaux permettant la sortie des CLP de la moelle osseuse (cf 1.3.1), certaines équipes se sont intéressées au passage des lymphocytes T dans cet organe lors de leur circulation dans l'organisme. La moelle osseuse est un organe lymphoïde primaire (OLP), c'est-à-dire un organe où sont produits et où se développent les lymphocytes, au même titre que le thymus. De ce fait, on peut se demander si les mêmes mécanismes y contrôlent la sortie des lymphocytes T. Dans la moelle osseuse, en plus des CSH et des progéniteurs des différentes lignées immunitaires, on retrouve des cellules immunitaires matures, notamment des lymphocytes T_{CM} (Mazo et al., 2005). Différentes études ont montré que le système S1P/S1PR était impliqué dans la sortie de la moelle osseuse de certaines cellules immunitaires : les lymphocytes B (Allende et al., 2010; Pereira et al., 2010), les lymphocytes NK (Mayol et al., 2011; Walzer et al., 2007), ou encore les éosinophiles (Sugita et al., 2010). Il en va de même pour les lymphocytes T. En effet, l'utilisation d'un agoniste spécifique de S1pr1, pour bloquer le signal S1P/S1pr1 chez la souris, induit l'accumulation de lymphocytes T matures dans la moelle osseuse (Maeda et al., 2010). Comme dans le thymus, la sortie des lymphocytes T est dépendante d'un gradient de concentration de S1P.

3.3 Entrée dans les OLS

L'entrée dans les OLS peut se faire par deux voies. La voie classique est la voie sanguine (Figure 28 – (1)). Les ganglions lymphatiques sont en effet infiltrés par des capillaires spécialisés avec un endothélium particulier, les HEV (high endothelium venules). L'entrée dans les OLS peut également s'opérer par les canaux lymphatiques afférents (Figure 28 – (2)). Les lymphocytes T naïfs entrent dans les ganglions lymphatiques *via* les HEV (Masopust and Schenkel, 2013). Cette migration dépend de

CD62L et CCR7. La présence de lymphocytes T dans les OLS semble donc nécessiter l'expression de CCR7 et de CD62L à leur surface. De ce fait, les lymphocytes T naïfs et T_{CM} résident principalement dans les OLS, tandis que les lymphocytes T_{EM} qui n'expriment pas CCR7 circulent en périphérie (Sallusto et al., 2004). Pourtant, chez l'homme, on retrouve des lymphocytes T_{EM} dans les ganglions (Sathaliyawala et al., 2013). Cela suggère qu'ils sont capables d'entrer dans les OLS *via* une autre voie comme la lympho afférente, ou qu'ils se sont différenciés *in situ*.

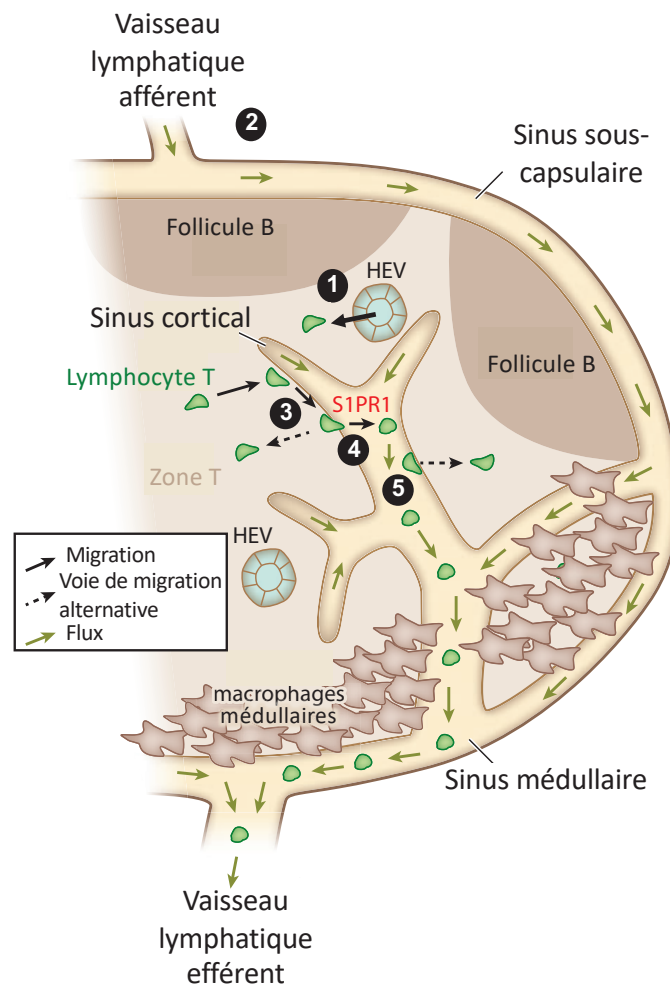


Figure 28 : Voies d'entrée et de sortie des ganglions lymphatiques.

(1) Les lymphocytes T peuvent entrer dans les ganglions via les HEV ou (2) les vaisseaux lymphatiques afférents. Ils sont localisés dans la zone T du ganglion. (3) Les lymphocytes T migrent de façon aléatoire jusqu'à entrer en contact avec un sinus lymphatique cortical. (4) Les lymphocytes T traversent l'endothélium du sinus d'une façon dépendante de S1PR1. (5) Les lymphocytes T sont portés par le flux lymphatique jusqu'au sinus médullaire puis au vaisseau lymphatique efférent. HEV : high endothelium venule ; S1PR1 : S1P receptor 1.

(Adapté de Cyster and Schwab, 2012)

3.3.1 Définition des OLS

Les organes lymphoïdes sont des tissus spécialisés dans l'immunité composés en grande majorité de lymphocytes mais aussi d'autres cellules immunitaires et de différents types de cellules stromales. On distingue deux catégories d'organes lymphoïdes, les OLP et les OLS (Figure 29). Les lymphocytes sont produits à partir de cellules progénitrices dans les OLP, la moelle osseuse et le thymus. Ils s'y développent et y subissent un processus de sélection (pour les lymphocytes T et B) qui leur permet d'arriver à maturité. Les lymphocytes T et B sont ensuite activés dans les OLS, où ils prolifèrent et se différencient en lymphocytes effecteurs. Les OLS sont nombreux dans l'organisme. Certains sont des organes avec une structure bien définie, comme la rate et les ganglions. D'autres sont des tissus lymphoïdes associés à des muqueuses (MALT), parmi lesquels on retrouve les plaques de Peyer dans les tissus lymphoïdes associés au tube digestif (GALT), et les tissus lymphoïdes associés aux bronches (BALT).

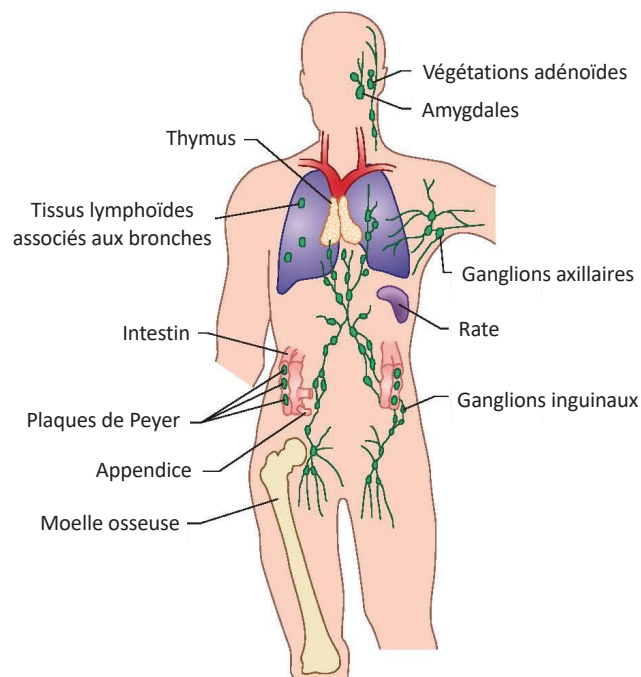


Figure 29 : Tissus et organes lymphatiques centraux et périphériques.

Le système lymphatique est constitué de capillaires débutant en cul-de-sac dans les tissus et se rejoignant pour former des vaisseaux lymphatiques plus larges. Ces derniers permettent un flux unidirectionnel de lymphe vers les organes lymphoïdes. On distingue les organes lymphoïdes primaires (OLP), la moelle osseuse et le thymus, et les organes lymphoïdes secondaires (OLS). Ces derniers peuvent être des organes avec une structure bien définie, comme les ganglions et la rate, ou être disséminés de façon plus diffuse dans les tissus, comme les plaques de Peyer dans les intestins ou les tissus lymphoïdes associés aux bronches (BALT).

(Grossman, 2013)

3.3.2 Structure d'un OLS : exemple des ganglions

Les ganglions sont des glandes de petite taille, allant de quelques millimètres à 1-2 cm chez l'homme, localisées tout au long du système lymphatique. Il en existe des centaines chez l'homme, souvent regroupés dans certaines régions. Ils peuvent former des chaînes de ganglions reliés les uns aux autres par des vaisseaux lymphatiques.

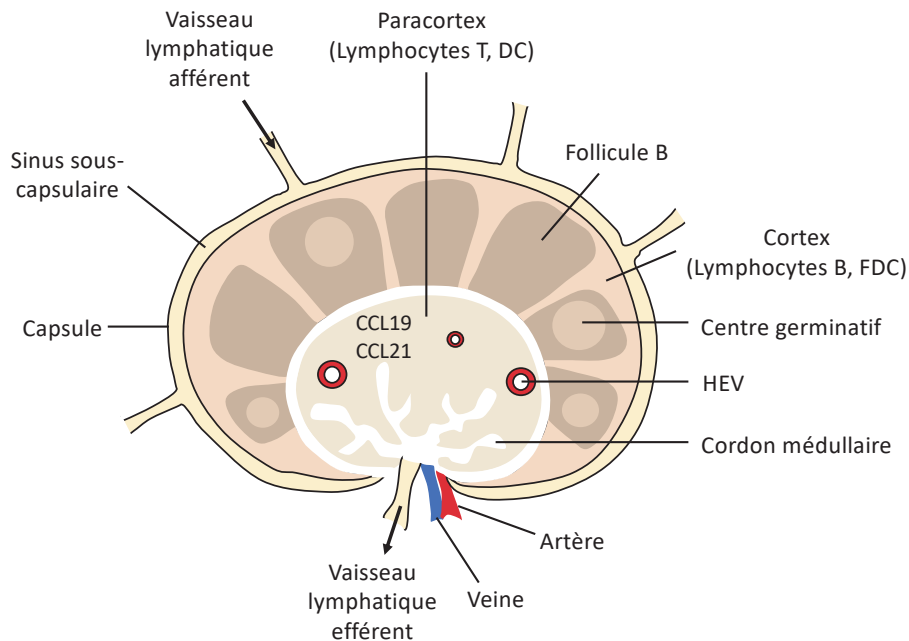


Figure 30 : Structure du ganglion lymphatique.

Le ganglion lymphatique est un organe immunitaire structuré en plusieurs régions distinctes. Il est délimité par une capsule sous laquelle se trouve un sinus lymphatique. Celui-ci est alimenté par les vaisseaux lymphatiques afférents, qui drainent la lymphe depuis les tissus non-lymphatiques ou d'autres ganglions. Le ganglion est constitué de plusieurs lobes comprenant de l'extérieur vers l'intérieur, le cortex, le paracortex et la médulla. Chaque région regroupe des cellules immunitaires définies, afin de faciliter la rencontre des lymphocytes avec l'antigène, leur activation et leur prolifération. Dans le cortex, les lymphocytes B et les FDC constituent des follicules, qui deviennent des centres germinatifs lors de la prolifération des lymphocytes B activés. Les lymphocytes T sont dans le paracortex, où ils scannent les antigènes présentés par les DC. Enfin, la médulla regroupe les plasmocytes et les macrophages, et est infiltrée par des sinus lymphatiques au niveau du cordon médullaire. Du cordon médullaire partent les vaisseaux lymphatiques efférents, dans lesquels les lymphocytes passent pour sortir du ganglion. Les ganglions sont vascularisés par des capillaires avec un endothélium particulier, les HEV, par lesquels entrent les lymphocytes T naïfs. DC : cellules dendritiques ; FDC : cellules dendritiques folliculaires ; HEV : high endothelial venule.

Le ganglion est englobé d'une capsule fibreuse avec, juste en dessous, le sinus lymphatique sous-capsulaire (Drayton et al., 2006) (Figure 30). C'est à ce niveau que débouchent les canaux lymphatiques afférents, qui amènent les éléments portés par la lymphe depuis les tissus non-lymphoïdes. Le tissu est organisé de façon à faciliter la rencontre des lymphocytes avec les antigènes, puis à favoriser leur prolifération et différenciation en lymphocytes effecteurs. Il est constitué de plusieurs lobes comprenant, de l'extérieur vers l'intérieur, le cortex, le paracortex et la médulla. Dans le cortex, on retrouve des petits follicules composés de lymphocytes B et de cellules dendritiques folliculaires. Lorsque les lymphocytes B sont activés, ils prolifèrent, menant à l'apparition de follicules secondaires plus gros, appelés centres germinatifs. Le paracortex correspond à la zone T, où se regroupent les lymphocytes T et les cellules dendritiques. La médulla est une zone regroupant les lymphocytes NK, les plasmocytes et les macrophages. Elle est constituée de tissus lymphatiques appelés cordons médullaires, infiltrés par des sinus lymphatiques. C'est à ce niveau que partent les vaisseaux lymphatiques efférents, qui sont la voie de sortie des lymphocytes. Les ganglions sont vascularisés par des capillaires avec un endothélium particulier, les HEV, par lesquels entrent les lymphocytes T naïfs.

3.3.3 Extravasation et entrée par les HEV

Les lymphocytes T du sang entrent dans les ganglions par les HEV. Ce processus est similaire à l'entrée des pro-thymocytes dans le thymus (décrite en 1.3.1) et se décompose en quatre étapes très bien documentées dans la littérature : le *rolling* le long de l'endothélium des HEV (Figure 31 – (1)), l'activation des intégrines (Figure 31 – (2)), l'adhésion forte à l'endothélium (Figure 31 – (3)), et enfin la migration transendothéliale (Figure 31 – (4)). Nous prendrons ici l'exemple de l'entrée dans les ganglions lymphatiques pour décrire ces étapes.

Cependant, avant de pouvoir entrer dans les OLS, les lymphocytes T doivent s'affranchir d'un signal de rétention : le S1P. En effet, nous avons vu précédemment que le S1P était présent à forte concentration dans le sang, et à faible concentration dans le thymus, et que ce gradient permettait la sortie des lymphocytes T naïfs du thymus. Il en va de même dans les ganglions, où les niveaux de S1P tissulaire sont faibles. Dans ce cas, comment expliquer le mouvement des lymphocytes T contre le gradient de S1P ? Dans un premier temps, il convient de noter que chez la souris, S1pr1 n'est pas nécessaire à l'entrée dans les ganglions (Matloubian et al., 2004). En revanche, sa phosphorylation par Grk2, suivie de son internalisation, est nécessaire à la sortie des lymphocytes T du sang (Arnon et al., 2011). En effet, trois à quatre fois moins de lymphocytes T *Grk2*^{-/-} réalisent les étapes d'extravasation dans les HEV par rapport aux lymphocytes *Grk2*^{+/+}. De plus, dans le sang, riche en S1P, les lymphocytes T

Grk2^{-/-} présentent un niveau élevé de S1pr1 à leur surface, alors que l'expression de S1pr1 est quasiment nulle dans les lymphocytes T *Grk2*^{+/+}. En revanche, la différence entre *Grk2*^{-/-} et *Grk2*^{+/+} est faible dans les ganglions, où la concentration en S1P est faible. S1pr1 est phosphorylé par Grk2 dans les milieux riches en S1P, ce qui induit son internalisation et permet aux lymphocytes T de migrer contre le gradient de S1P, c'est-à-dire du sang vers les OLS.

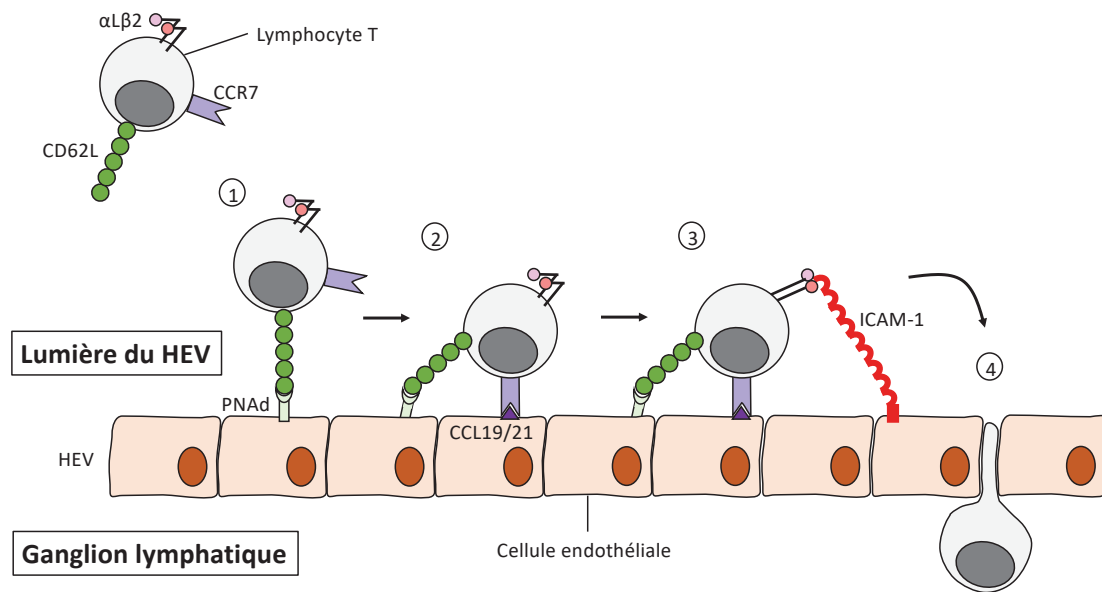


Figure 31 : Migration transendothéliale à travers les HEV.

(1) *Rolling* : L'interaction entre le CD62L des lymphocytes T et le PNAd des cellules endothéliales ralentit leur mouvement dans le sang. Les cellules roulent le long de l'endothélium. (2) *Activation* : La stimulation de CCR7 par fixation de ses ligands les chimiokines CCL19 et CCL21 induit l'activation de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta 2$ des lymphocytes T. (3) *Adhésion forte* : L'intégrine $\alpha\text{L}\beta 2$ activée se fixe à ICAM-1. Ceci induit une adhésion forte des lymphocytes T à l'endothélium vasculaire, qui stoppe totalement leur déplacement. (4) *Diapédèse* : Les lymphocytes T traversent l'endothélium par diapédèse, de façon intracellulaire ou paracellulaire, et pénètrent ainsi dans le ganglion. CCL19/21 : C-C motif chemokine ligand 19 ou 21 ; CCR7 : C-C motif chemokine receptor 7 ; CD62L : cluster de différenciation 62 ligand ; ICAM-1 : intercellular adhesion molecule 1 ; PNAd : peripheral node addressing.

(Adapté de Kindt, 2007)

a) Capture et *rolling* des lymphocytes T le long des HEV

Dans le sang, les lymphocytes T sont soumis à un flux permanent qui leur permet de se déplacer rapidement d'un organe à l'autre. Cependant, pour pénétrer dans les

ganglions, ils ont besoin d'un signal physique pour ralentir leur mouvement et adhérer à la membrane des endothéliums. Des études ont montré que dans les souris déficientes en *L-sélectine* (Cd62l), les lymphocytes T, incapables de ralentir au niveau des HEV, n'entrent pas dans les ganglions (Arbonés et al., 1994). En fait, lors du passage des lymphocytes T dans les HEV, les molécules de CD62L à leur surface sont capables de se fixer à leurs ligands, les peripheral node addressing (PNAd), exprimés par les cellules endothéliales. Cette adhésion de faible intensité permet un ralentissement du flux migratoire des lymphocytes T, qui roulent le long de l'endothélium : c'est l'étape de *rolling* (Butcher and Picker, 1996) (Figure 31 – (1)). La fixation de CD62L avec son ligand est transitoire, car CD62L est rapidement tronqué à la membrane de la cellule par protéolyse. Ce mécanisme permet de libérer les cellules dans la circulation si elles ne possèdent pas les récepteurs nécessaires à la suite du processus, comme les neutrophiles par exemple.

L'expression de CD62L n'est pas obligatoire pour entrer dans tous les OLS. Par exemple, lors de l'entrée dans les plaques de Peyer de la muqueuse intestinale, l'adhésion faible pour le *rolling* est principalement contrôlée par l'intégrine $\alpha_4\beta_7$, qui interagit avec la mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) de la muqueuse (Bargatze et al., 1995).

b) Activation des intégrines par les chimiokines

L'étape de *rolling* favorise l'interaction des récepteurs de chimiokines avec leurs ligands. En particulier, il a été montré qu'une déficience en Ccl19, Ccl21 ou Ccr7 induisait un défaut de résidence des lymphocytes T dans les OLS (Förster et al., 1999; Gunn et al., 1999). Les chimiokines CCL19 et CCL21 sont présentées à la membrane des cellules endothéliales des HEV, liées à des protéoglycanes et glycosaminoglycanes (Miyasaka and Tanaka, 2004). Leur récepteur CCR7 est exprimé par les lymphocytes T naïfs et T_{CM}. Lors du ralentissement des lymphocytes T le long des HEV, CCR7 se lie à CCL19 et CCL21. La stimulation du récepteur induit un signal qui déclenche l'activation de l'intégrine lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1 = $\alpha L\beta 2$) (Figure 31 – (2)). On parle de signalisation « inside-out ». LFA-1 change alors de conformation (Shamri et al., 2005). Il semble que le flux sanguin puisse également être impliqué dans ce changement conformationnel. L'activation des intégrines est un processus rapide, de l'ordre de quelques secondes (Bargatze and Butcher, 1993; Shamri et al., 2005).

En outre, l'équipe de J. Cyster a montré que Cxcl12 pouvait également avoir une implication dans l'entrée des lymphocytes T murins dans les OLS, bien que son rôle exact ne soit pas bien compris (Okada et al., 2002). Cxcl12 est présent à la surface des HEV. Or, chez les souris déficientes en *Ccr7*, une déficience en *Cxcr4* accentue le défaut de résidence observé. Cependant, chez les souris contrôles, la suppression de *Cxcr4* n'induit aucun problème d'entrée dans les OLS. Ces résultats suggèrent un rôle non essentiel de Cxcl12 dans l'entrée des lymphocytes T dans les OLS chez la souris.

c) Adhésion forte aux cellules endothéliale *via* LFA-1/ICAM-1

L'activation de Lfa-1 permet sa fixation à la molécule d'adhésion Icam-1 à la surface de l'endothélium. Cette adhésion forte stoppe de façon brutale le mouvement des lymphocytes T dans le flux sanguin (Shamri et al., 2005). La molécule Icam-1 (et dans une moindre mesure Icam-2) est essentielle à l'adhésion des lymphocytes T à l'endothélium (Boscacci et al., 2010). ICAM-1 induit ce qu'on appelle une signalisation « outside-in » : en se liant directement à l'intégrine LFA-1, elle renforce sa conformation active (Figure 31 – (3)). Plusieurs protéines intracellulaires ont été identifiées comme étant impliquées dans la signalisation induite par ICAM-1, comme les tyrosines-kinases LCK et ZAP-70 qui interagissent avec LFA-1 pour augmenter son affinité aux molécules d'adhésion (Evans et al., 2011). L'activation de ces voies de signalisation renforce l'adhésion des lymphocytes T aux cellules endothéliales.

d) Extravasation des lymphocytes T à travers l'endothélium des HEV

Une fois immobilisés et fermement attachés aux molécules d'adhésion des cellules endothéliales, les lymphocytes T traversent l'endothélium des HEV pour entrer dans la zone T du ganglion : c'est la migration transendothéliale ou diapédèse (Figure 31 – (4)). Celle-ci peut se faire de deux façons : la migration trans-cellulaire, dans laquelle les lymphocytes T passent directement à travers une cellule endothéliale, ou la migration para-cellulaire, dans laquelle les lymphocytes T traversent au niveau de la jonction entre les cellules endothéliales (Vestweber, 2007). À ce jour, il est difficile de déterminer laquelle de ces deux voies est utilisée préférentiellement, du fait de la lourdeur des procédures expérimentales et de la difficulté pour faire la distinction entre les deux mécanismes *in vivo*.

Plusieurs protéines sont impliquées dans la migration transendothéliale des leucocytes, notamment des molécules d'adhésion comme la platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) ou des molécules de jonctions comme les junctional adhesion molecule (JAM)-A, JAM-B, JAM-C, et l'endothelial selective adhesion molecule (ESAM) (Vestweber, 2007). À l'inverse, la vascular endothelial (VE)-cadherin participe au maintien de la barrière endothéliale et limite la transmigration des leucocytes en s'associant avec le VE-receptor protein tyrosine phosphatase (VE-PTP). L'adhésion des lymphocytes T à l'endothélium active VCAM-1, qui *via* une signalisation intracellulaire dissocie rapidement le complexe VE-cadherin/VE-PTP. Ceci permet l'ouverture des jonctions endothéliales et facilite la migration transendothéliale des lymphocytes T (Vockel and Vestweber, 2013).

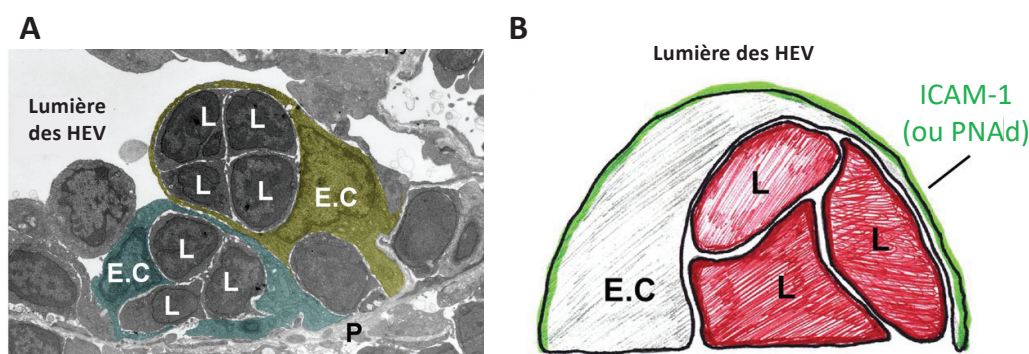


Figure 32 : Les HEV retiennent les lymphocytes dans des poches formées par les cellules endothéliales.

(A) Microscopie électronique à transmission sur des cellules endothéliales de HEV réalisée à partir d'une coupe de ganglion murin. L'image a été pseudocolorée pour délimiter les lymphocytes (L) et les cellules endothéliales (E.C). (B) Représentation schématique d'une poche de rétention. Les cellules endothéliales expriment ICAM-1 sur leur face luminale et latérale. La membrane des cellules endothéliales entourant les lymphocytes est ICAM-1 (ou PNAd)^{neg}, ce qui signifie que les cellules ne sont pas retenues entre deux cellules endothéliales mais dans une poche formée par une seule cellule. P : parenchyme.

(Mionnet et al., 2011)

La migration transendothéliale des lymphocytes T vers les ganglions ne se fait pas en flux permanent. En effet, afin de maintenir stable le nombre de cellules dans les ganglions, les lymphocytes T sont retenus dans des poches formées sous les HEV, grâce à un changement conformationnel des cellules endothéliales (Figure 32). Les expérimentations ont montré que les lymphocytes y attendent quelques minutes que la place se libère pour entrer à leur tour dans le tissu (Mionnet et al., 2011). Après avoir traversé l'endothélium, les lymphocytes T passent la membrane basale et sont guidés par les cellules réticulaires fibroblastiques (FRC) jusqu'au paracortex ganglionnaire, où ils rencontreront les CPA (Bajénoff et al., 2006).

3.3.4 Entrée par la lymphe afférente

Les lymphocytes T présents dans les tissus accèdent aux ganglions par les vaisseaux lymphatiques afférents. Ce sont principalement des lymphocytes T CD4⁺ mémoires (Mackay et al., 1990; Sallusto et al., 1999), qu'une équipe a renommés les T recirculants mémoires (T_{RCM}) car leur phénotype ne correspond pas à aux populations mémoires connues : Ccr7^{int/+} Cd62l^{int} Cd69⁻ Cd103^{+/-} E-selectin ligands⁺ (Bromley et al., 2013). Le processus par lequel les lymphocytes T pénètrent dans les ganglions par la lymphe afférente est à ce jour moins bien compris que l'entrée par les HEV. Il est en

particulier compliqué à étudier chez la souris, car les canaux lymphatiques sont très fins et difficiles à canuler.

a) Intravasation des lymphocytes T des tissus non-lymphoïdes dans la lymphe afférente

Si l'on a d'abord pensé que l'intravasation des lymphocytes T des tissus était un processus passif, ce dernier est en fait fortement dépendant de CCR7, dont le ligand CCL21 est exprimé constitutivement par les cellules endothéliales lymphatiques (Bromley et al., 2005; Debes et al., 2005). Les lymphocytes T Ccr7⁻ s'accumulent dans la peau et les poumons, tandis que seuls les Ccr7⁺ peuvent en sortir. En revanche, Cd62l ne semble pas impliqué (Ledgerwood et al., 2008). Plusieurs molécules d'adhésions sont également impliquées dans la migration transendothéliale (Schineis et al., 2019). On peut citer le CD44, qui agit en se liant au macrophage mannose receptor (MN) exprimé par les cellules endothéliales lymphatiques. Les souris *MN*^{-/-} présentent un défaut de migration des lymphocytes des tissus aux ganglions par la lymphe afférente (Salmi et al., 2013).

Qu'en est-il du rôle du S1P dans le passage des lymphocytes T des tissus non-lymphoïdes à la lymphe afférente ? Une étude récente a démontré l'implication de S1pr1 et S1pr2 exprimés par les lymphocytes T $\gamma\delta$ Ccr6⁺ dans leur sortie des tissus (Laidlaw et al., 2019). Les lymphocytes T $\gamma\delta$ Ccr6⁺ sont une population de lymphocytes T non conventionnels résidant dans le derme, importants pour le recrutement de neutrophiles suite à une infection de la peau. Il semble que S1pr2 inhibe leur sortie du derme. La sortie des lymphocytes T $\gamma\delta$ de la peau ne dépend pas de Ccr7, contrairement aux lymphocytes T conventionnels (Vrieling et al., 2012). En revanche, elle semble requérir l'expression de S1pr1, car l'utilisation de l'antagoniste fonctionnel de S1pr1 AUY954 (Pan et al., 2006) induit une augmentation du nombre de lymphocytes T $\gamma\delta$ retenus dans la peau. Cd69 contribue à la rétention en régulant négativement S1pr1.

Bien que, comme expliqué précédemment, le passage des lymphocytes T conventionnels dans la lymphe afférente dépende de Ccr7, on pourrait se demander si, à l'image des lymphocytes T $\gamma\delta$ Ccr6⁺, le S1P jouerait aussi un rôle dans cette migration transendothéliale. Ce point n'est pas encore bien compris et les réponses divergent selon les études. Par exemple, dans l'article traitant sur les lymphocytes T $\gamma\delta$ Ccr6⁺, les lymphocytes T $\alpha\beta$ *Cd69*^{-/-}, dans lesquels S1pr1 n'est donc pas diminué, ne migrent pas plus de la peau au ganglion drainant que les lymphocytes T $\alpha\beta$ *Cd69*^{+/-} (Laidlaw et al., 2019). Une autre équipe indique que les lymphocytes T déficients pour *S1pr1* passeraient librement dans la lymphe afférente, tandis que leur stimulation par le S1P activerait un signal de rétention (Ledgerwood et al., 2008). A l'inverse, une étude de 2019, supervisée par le même chercheur que la précédente, suggère plutôt qu'une

déficiences en *S1pr1* inhiberaient la migration des lymphocytes T vers les ganglions drainants, et donc que *S1pr1* induirait la migration transendothéliale (Xiong et al., 2019). La divergence entre ces résultats soulève la question de la pertinence des protocoles expérimentaux utilisés *in vivo*, qui ne reflètent pas toujours des conditions homéostatiques. Par exemple, ces articles utilisent des injections sous-cutanées qui sont probablement très destructrices des structures lymphatiques assurant la migration.

Outre l'implication de *S1pr1*, il a aussi été suggéré que l'expression de *S1pr4* par les lymphocytes T était essentielle à leur passage vers la lymphe afférente (Xiong et al., 2019). Ces résultats sont surprenants car pour le moment, le rôle de *S1pr4* dans la migration cellulaire reste assez controversé (Kohn et al., 2003; Wang et al., 2005). Enfin, *S1pr2* pourrait favoriser l'intravasation des lymphocytes T. En effet, exprimé par les cellules endothéliales lymphatiques, il diminuerait la perméabilité de l'endothélium en ciblant les molécules d'adhésions contrôlées par la voie Erk (Xiong et al., 2019). Dans tous les cas, l'implication du *S1P* dans la migration transendothéliale pourrait permettre aux lymphocytes T_{EM} n'exprimant pas *Ccr7* à leur surface de gagner la lymphe afférente pour rejoindre les ganglions drainants. Néanmoins, cet aspect du processus d'intravasation reste à étudier de façon plus précise.

b) Entrée dans les ganglions par la lymphe afférente

Une fois dans la lymphe, les lymphocytes T rampent le long des capillaires lymphatiques pour rejoindre le vaisseau lymphatique principal. Là, ils se laissent porter de façon passive par le flux plus rapide (Teijeira et al., 2017). L'entrée dans les ganglions lymphatiques a été étudiée par imagerie bi-photonique en temps réel, en injectant directement des lymphocytes T dans les canaux lymphatiques afférents. Les vaisseaux lymphatiques afférents débouchent au niveau du sinus sous-capsulaire (Figure 28 – (2)), à partir duquel les lymphocytes T CD4⁺ naïfs rampent jusqu'au sinus médullaire. C'est à ce niveau qu'a lieu leur migration à travers l'endothélium lymphatique, de façon indépendante de *Ccr7* (Braun et al., 2011) mais dépendante de la plasmalemma vesicle-associated protein (PLVAP) (Rantakari et al., 2015). Cette dernière est une glycoprotéine transmembranaire de type 2 qui forme des structures en diaphragme (disque circulaire composé de fibres radiales) permettant de réguler la perméabilité des cavéoles, des pores et des canaux transmembranaires. Dans les souris *Plvap*^{-/-}, 2,9 fois plus de lymphocytes T traversent les membranes des sinus lymphatiques pour pénétrer dans les ganglions. Ceci suggère que *Plvap* contrôle la migration transendothéliale des lymphocytes T de la lymphe afférente, en régulant la perméabilité de l'endothélium. Les autres molécules impliquées dans l'entrée des lymphocytes T dans les ganglions par la lymphe afférente n'ont pas encore été identifiées. Une fois dans le parenchyme, les lymphocytes T rejoignent la zone T paracorticale. Leur mouvement est aléatoire et médié par *Ccr7* (Braun et al., 2011).

Comme après l'entrée par les HEV, ils sont probablement guidés par les cellules stromales.

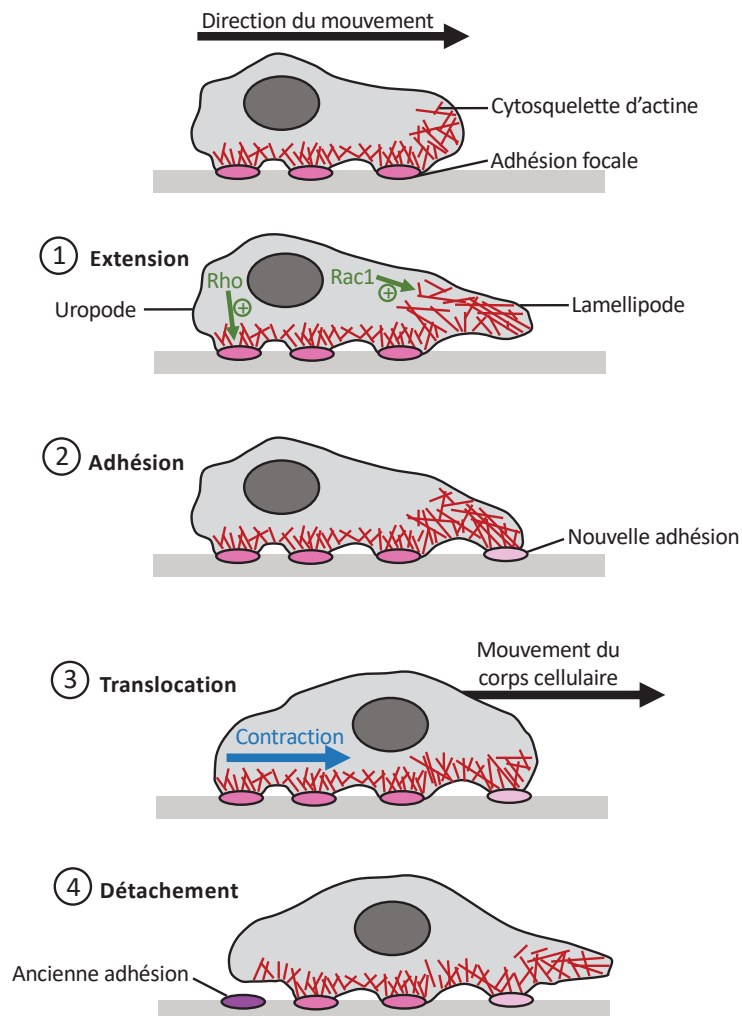


Figure 33 : Migration amiboïde des lymphocytes T.

Les lymphocytes T se déplacent dans les tissus selon un mouvement amiboïde. La progression se fait en quatre étapes. (1) Le signal chimiotactique ou chimiokinésique reçu par la cellule induit sa polarisation. À l'avant, RAC1 stimule la polymérisation de l'actine, ce qui mène à la formation de protrusions appelées front de migration ou lamellipode. À l'arrière, côté uropode, la voie RHO/ROCK favorise l'interaction des molécules d'adhésion avec la matrice extracellulaire. (2) Au niveau du front de migration, de nouvelles adhésions se forment avec la matrice extracellulaire. (3) La dépolymérisation du cytosquelette d'actine au niveau de l'uropode permet la contraction du corps de la cellule et son mouvement vers l'avant. (4) S'en suit la suppression des interactions entre les molécules d'adhésion et la matrice extracellulaire. La cellule se déplace en avant.

(Adapté de MBInfo)

3.4 Contrôle de la mobilité et de la localisation des lymphocytes T au sein des ganglions

Une fois dans les ganglions, les lymphocytes T scannent les CPA présentes dans le but d'identifier l'antigène dont ils sont spécifiques. Pour cela, ils ont besoin de signaux leur permettant de se placer au bon endroit. L'activation des lymphocytes T lors d'une réponse immunitaire nécessite donc une localisation précise au sein des OLS ainsi qu'un contrôle de leur migration à l'intérieur de l'organe. Les acteurs moléculaires impliqués dans la migration et le positionnement des lymphocytes T dans les ganglions ne sont à ce jour que partiellement connus.

3.4.1 Capacité migratoire des lymphocytes T dans les tissus

Les lymphocytes T sont des cellules extrêmement mobiles. Leur vitesse moyenne dans les ganglions lymphatiques est de 10 $\mu\text{m}/\text{min}$ et peut atteindre plus de 25 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Friedl et al., 1998; Miller et al., 2002; Pittet and Mempel, 2008), ce qui leur permet de se déplacer rapidement dans leur environnement. Les lymphocytes T utilisent le mode amiboïde pour se déplacer dans les tissus. Ce mécanisme de migration nécessite une réorganisation du cytosquelette aboutissant à un changement morphologique, avec un allongement du lymphocyte T jusqu'à 10-15 μm , et à la redistribution des récepteurs de surface. Généralement, celle-ci est induite par des ligands de différents récepteurs couplés à des protéines G trimériques, principalement des récepteurs à chimiokines, qui activent des voies de signalisation contrôlées par des GTPases. La polymérisation et dépolymérisation de l'actine activée par les GTPases aboutit à la mise en place de réseaux de fibres d'actine dans le cytoplasme, permettant la formation de protrusions au niveau de la membrane. On constate alors une polarisation de la cellule avec le front de migration (ou lamellipode), riche en actine, et l'uropode, riche en molécules d'adhésion. Le lamellipode est formé grâce à l'activation de la protéine RAC1 (Nobes and Hall, 1999; del Pozo et al., 1999). Il présente des oscillations dynamiques de la membrane, à l'origine de nouveaux contacts avec le collagène de la matrice extracellulaire (Friedl et al., 1998). Au niveau de l'uropode, formé *via* l'activation de la voie ROCK/RHO (Nobes and Hall, 1999; del Pozo et al., 1999), les molécules d'adhésions stabilisent l'orientation de la cellule grâce à la fixation à la matrice extracellulaire. RHO contrôle également la contraction cellulaire (Sanz-Moreno et al., 2008). Plusieurs études ont montré l'existence d'un antagonisme entre RHO et RAC1 (Nimnual et al., 2003; Sanz-Moreno et al., 2008; Wildenberg et al., 2006). Le modèle de la migration amiboïde détermine quatre étapes interdépendantes (Figure 33) : l'extension du lamellipode grâce à la polymérisation de l'actine, la mise en place d'adhésions avec le substrat au niveau de ce front de migration, la contraction du corps de la cellule, et le détachement des adhésions au

niveau de l'eupode accompagné de la dépolymérisation du cytosquelette (Lauffenburger and Horwitz, 1996).

3.4.2 Une migration aléatoire pour scanner l'environnement

L'étude *in vivo* de la migration des lymphocytes T dans les ganglions a été facilitée par le développement des techniques de microscopie bi-photonique. Il est désormais possible d'observer le comportement des cellules directement dans les organes d'une souris anesthésiée. Au début des années 2000, une équipe de recherche s'est intéressée à la mobilité des lymphocytes T dans les ganglions d'une souris BALB/c (Miller et al., 2002, 2003). Une fois localisés dans les espaces interfolliculaires du cortex, les lymphocytes T se déplacent selon un mouvement « *stop-and-go* ». Ils avancent par saccades, alternant des moments de forte mobilité pouvant atteindre 25 $\mu\text{m}/\text{min}$, et des phases presque stationnaires. Ces changements de vitesse ont lieu toutes les deux minutes en moyenne. Au cours de la phase de forte mobilité, les lymphocytes T semblent suivre une trajectoire linéaire. En revanche, si on s'intéresse à leur itinéraire global, on constate qu'ils effectuent un mouvement totalement aléatoire, sur un plan tridimensionnel, avec une vitesse moyenne de 10 $\mu\text{m}/\text{min}$. Ce mouvement aléatoire semble en fait fortement influencé par la présence des FRC. La zone T est constituée d'un réseau très dense de FRC, qui la délimitent et empêchent les lymphocytes T de pénétrer dans les follicules B. Les lymphocytes T se déplacent le long de ce réseau, en suivant les angles formés par les fibres (Bajénoff et al., 2006). La migration aléatoire des lymphocytes T leur permet sans doute de scanner l'ensemble de leur environnement, afin de favoriser leur rencontre avec l'antigène. En conséquence, après activation, la mobilité des lymphocytes T ayant proliféré diminue (Miller et al., 2002, 2003).

3.4.3 Contrôle de la mobilité basale par les chimiokines

La mise en évidence d'un schéma de migration aléatoire remet en question l'hypothèse d'un gradient de chimiokines guidant les lymphocytes T dans les ganglions par chimiotaxie. En revanche, certaines chimiokines sont capables d'induire la mobilité des lymphocytes T sans gradient de concentration, on parle alors de chimiokinésie. Dans la zone T des ganglions, de nombreuses chimiokines sont produites, en particulier CCL19, CCL21 et CXCL12. Ces dernières représentent de bonnes candidates à une potentielle induction de la migration par chimiokinésie.

Plusieurs équipes ont montré que la mobilité des lymphocytes T dans les ganglions était dépendante de la protéine trimérique G_i . Celle-ci peut être inhibée par la toxine pertussique (PTX), qui empêche le couplage de G_i avec les RCPG. *In vivo*, un traitement avec la PTX diminue très fortement la mobilité des lymphocytes T dans les ganglions

(Asperti-Boursin et al., 2007; Okada and Cyster, 2007), indiquant que la mobilité basale des lymphocytes T n'est pas intrinsèque mais dépend de facteurs environnementaux capables d'activer un ou plusieurs RCPG à leur surface. Plus précisément, le caractère essentiel de Ccr7 et de ses ligands Ccl19 et Ccl21 a pu être mis en évidence par le biais d'expérimentations *in vivo* par imagerie bi-photonique. Dans des souris portant la mutation *paucity of lymph node T cells (plt/plt)*, qui sont déficientes en Ccl19 et Ccl21, la mobilité des lymphocytes T dans le ganglion est diminuée par rapport aux non mutées. À l'inverse, la présence de Ccl19 exogène est suffisante à elle seule pour induire la localisation et la forte vélocité des lymphocytes T (Asperti-Boursin et al., 2007; Okada and Cyster, 2007; Worbs et al., 2007). De même, les lymphocytes T Ccr7-KO se déplacent beaucoup moins que les lymphocytes T non mutés. *In vitro*, la mobilité des lymphocytes T est induite par CCL21 immobilisée dans une matrice de collagène et de fibronectine. Soluble, CCL21 n'a aucun effet (Woolf et al., 2007). On parle alors de haptokinésie, en opposition à la chimiokinésie lors de laquelle les chimiokines sont solubles dans le milieu extracellulaire. Dans les ganglions, CCL21 est exprimée à la membrane des FRC, liée à des protéoglycanes, ce qui permet sans doute son action sur les lymphocytes T. Il est à noter que l'effet observé dans les expérimentations citées concerne la vélocité des cellules, mais pas la direction du mouvement. De plus, des tests de chimiotaxie *in vitro* montrent que Ccl21 n'a pas besoin d'être présent en gradient pour induire la migration des lymphocytes T (Okada and Cyster, 2007), ce qui souligne le caractère chimiokinétique (voire même haptokinétique) du signal induit par Ccr7 et ses ligands.

Nous avons vu que dans les HEV, la stimulation de Ccr7 par ses ligands active les intégrines et aboutit à une adhésion forte avec la membrane de l'endothélium. Or, la rapidité de mouvement des lymphocytes T dans le ganglion implique des adhésions faibles et transitoires à la matrice extracellulaire. Dans les tissus, en l'absence des forces de cisaillement que l'on retrouve dans la circulation sanguine, Ccl21 induit la polarisation des intégrines Lfa-1 et V α 4 à la membrane des lymphocytes T, mais sans générer d'adhésion à la matrice (Woolf et al., 2007). L'absence d'adhésion forte pourrait permettre la forte vélocité des lymphocytes T.

Finalement, la signalisation médiée par CCR7, exprimé par les lymphocytes T, et CCL19/CCL21, présents dans l'environnement, constitue un facteur majeur dans la migration basale des lymphocytes T dans les ganglions. Cependant, le défaut de migration induit par une déficience de ces chimiokines ou de leur récepteur n'est responsable que d'environ 40% de la mobilité médiée par la sous-unité G α_i (Asperti-Boursin et al., 2007; Okada and Cyster, 2007). Il reste donc un autre RCPG à identifier, également impliqué dans ce processus. CXCR4 n'est pas ce récepteur. En effet, l'antagonisme de CXCR4 n'a aucun effet sur la mobilité (Asperti-Boursin et al., 2007; Okada and Cyster, 2007).

3.4.4 Contrôle de la localisation par le S1P

Les chimiokines ne sont pas les seules molécules impliquées dans la mobilité et la localisation des lymphocytes T dans les ganglions. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle du S1P dans le positionnement de différents types lymphocytaires. La première concerne le maintien des lymphocytes Tfh et B dans les centres germinatifs des ganglions. Après activation, l'expression de Cxcr5 augmente et celle de Ccr7 diminue dans les lymphocytes Tfh, ce qui les oriente vers les follicules B où ils peuvent activer les lymphocytes B et maintenir leur prolifération dans les centres germinatifs nouvellement formés (Hardtke et al., 2005; Haynes et al., 2007). Cependant, les cellules déficientes en Cxcr5 peuvent encore rejoindre les follicules B, suggérant qu'un autre facteur est impliqué dans ce repositionnement (Haynes et al., 2007). Une double déficience en Cxcr5 et S1pr2 inhibe plus fortement la localisation des lymphocytes Tfh au niveau des centres germinatifs. Ces deux récepteurs agissent en coopération dans la relocalisation des lymphocytes Tfh (Moriyama et al., 2014). Pour comprendre le rôle de S1pr2 dans ce processus, l'équipe de T. Okada a utilisé un modèle de souris *S1pr2^{venus/+}*. Ces dernières possèdent un allèle dans lequel une large portion de la région codante de S1pr2 a été remplacée par la séquence de la protéine fluorescente Venus. Ce modèle permet de visualiser l'expression membranaire de S1pr2. Celui-ci est plus fortement exprimé par les lymphocytes Tfh présents dans les centres germinatifs que par les autres lymphocytes T auxiliaires, tandis que les CD4⁺ naïfs ne l'expriment pas. L'étude montre que S1pr2 retient les lymphocytes Tfh dans les centres germinatifs (Moriyama et al., 2014) (Figure 34). Autre détail intéressant, l'expression de Klf2, et en conséquence de S1pr1, est réduite dans les lymphocytes Tfh lors de leur différenciation. Une surexpression de Klf2 dans les lymphocytes Tfh après la formation des centres germinatifs (grâce à un système inductible par tamoxifène) induit le retour des lymphocytes Tfh dans la zone T (Weber et al., 2015). La diminution de S1pr1 pourrait donc favoriser la localisation dans la zone B. Les lymphocytes Tfh présenteraient donc une diminution de l'expression du S1pr1 membranaire pour permettre à S1pr2 de réaliser son action inhibitrice de migration.

En plus des lymphocytes Tfh, S1pr2 retient également les lymphocytes B à l'intérieur des centres germinatifs en signalant *via* la sous-unité $G\alpha_{12/13}$ et la protéine Rho (Green et al., 2011; Muppidi et al., 2014). Les lymphocytes B surexprimant S1pr2 se positionnent automatiquement dans les centres germinatifs (Figure 34). Ce signal vient probablement contrebalancer les autres signaux chimiotactiques du cortex ganglionnaires. En effet, S1pr2 inhibe la réponse des lymphocytes B des centres germinatifs aux chimiokines Cxcl12 et Cxcl13 *in vitro* (Green et al., 2011).

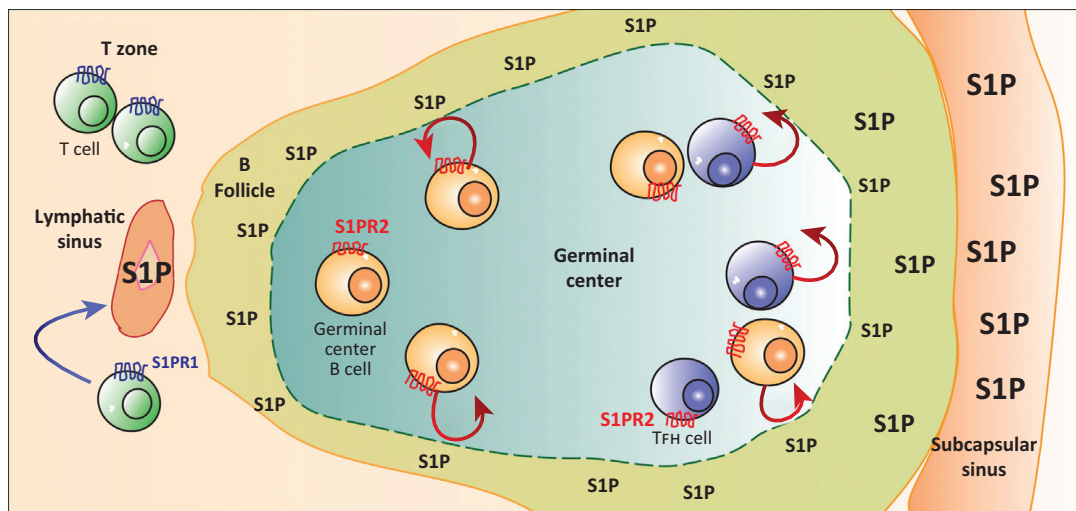


Figure 34 : Le S1P régule le positionnement des lymphocytes Tfh et B dans les follicules B et les centres germinatifs des ganglions.

Les lymphocytes T naïfs et certains lymphocytes T activés (plusieurs jours après stimulation antigénique) expriment S1pr1, qui leur permet de sortir par les sinus lymphatiques efférents où la concentration en S1P est forte. Certains lymphocytes T CD4⁺ activés se différencient en lymphocytes Tfh. Ils diminuent leur expression de S1pr1 et augmentent celle de S1pr2, ce qui leur permet de se positionner au niveau des follicules B. S1pr2 retient les lymphocytes Tfh et B dans les centres germinatifs en induisant leur retour vers le centre germinatif s'ils en sortent. Le contrôle de la migration et du positionnement des lymphocytes par S1pr1 et S1pr2 est permis par les gradients de S1P, d'une part entre le ganglion et les sinus lymphatiques, d'autre part entre les différentes zones tissulaires (schématisé ici par un gradient de couleur dans le centre germinatif). S1P : sphingosine-1-phosphate ; S1pr : récepteur au sphingosine-1-phosphate ; Tfh : lymphocyte T follicular helper.

(Baeyens et al., 2015)

Un autre exemple concerne l'implication de S1PR5 dans le positionnement des lymphocytes NK. Dans les ganglions, quelques cellules immunitaires innées sont présentes pour aider à bloquer la propagation des infections. Parmi elles, les lymphocytes NK produisent de l'IFN γ , qui empêche la sortie des pathogènes par la lymphe afférente, protégeant ainsi l'organisme d'une infection systémique. Les lymphocytes NK sont localisés dans la médulla, dans les zones interfolliculaires proches du sinus sous-capsulaire, et à la frontière entre la zone T et les follicules B. Les souris déficientes pour *Spns2*, qui n'ont donc pas de S1P dans le parenchyme du ganglion, présentent un défaut de localisation des lymphocytes NK (Fang et al., 2017). Notre équipe en collaboration avec celle de K. Balabanian a aussi montré que la localisation était dépendante des récepteurs S1pr5 et Cxcr4, connus pour être impliqués dans la sortie des lymphocytes NK des organes lymphoïdes (Jenne et al., 2009a; Mayol et al., 2011; Walzer et al., 2007). Enfin, le S1P participe également au positionnement des

lymphocytes dans d'autres organes lymphoïdes secondaires. Ainsi, la localisation des lymphocytes B dans la zone marginale de la rate est médiée par S1pr1 (Cinamon et al., 2004).

Il est évident que le rôle du S1P et de ses différents récepteurs dans la localisation des lymphocytes T dans les OLS commence tout juste à être exploré. Il est en outre intéressant de constater que le S1P peut à la fois promouvoir la sortie des lymphocytes T des OLS, et contrôler leur position au sein même de ces organes. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* seront nécessaires pour mieux comprendre leur implication dans la migration intra-tissulaire, ainsi que le caractère essentiel – ou non – de cette implication dans le déroulement de la réponse immunitaire.

3.5 Impact de l'activation des lymphocytes T sur leur rétention dans les ganglions

À l'homéostasie, les lymphocytes T murins résident dans les ganglions entre 12h et 24h (Mandl et al., 2012). En situation d'infection, les lymphocytes T qui reconnaissent un antigène doivent rester plus longtemps dans les OLS, afin de proliférer et de se différencier en lymphocytes T effecteurs. Après stimulation antigénique, les lymphocytes T qui se déplaçaient de façon rapide et aléatoire dans le ganglion se regroupent en clusters quasiment immobiles. Les cellules qui ont proliféré après activation perdent leur mobilité au sein du ganglion (Miller et al., 2002). De plus, la stimulation antigénique des lymphocytes T dans les ganglions est suivie par une diminution transitoire de leur nombre dans les vaisseaux lymphatiques efférents (Cahill et al., 1976; Hall and Morris, 1965). Trois jours après stimulation par l'antigène, les lymphocytes T retrouvent leur mobilité basale d'avant stimulation, avec une vitesse moyenne de 12 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Bréart and Bousso, 2016) ; et on commence à trouver des lymphocytes T activés et ayant proliféré dans la lymphe des ganglions drainants (Matloubian et al., 2004). Il existe donc un mécanisme permettant la rétention transitoire des lymphocytes T dans les ganglions après leur activation, probablement pour optimiser la différenciation et l'expansion clonale avant de les laisser gagner le site de l'infection.

Certains récepteurs chimiotactiques entrent en jeu dans ce processus. Dans les lymphocytes T primaires humains et murins, juste après activation, l'expression ARNm et protéique de KLF2 est augmentée, puis supprimée après quelques heures, *in vitro* et *ex vivo* (Kuo et al., 1997; Schober et al., 1999; Wu and Lingrel, 2005). CD69 quant à lui est rapidement surexprimé par les lymphocytes T arrivant dans les ganglions enflammés (Grigorova et al., 2010). En cohérence avec cette observation, la stimulation TCR *in vitro* des lymphocytes T Cd4⁺ murins avec des anticorps anti-Cd3 et anti-Cd28 induit la diminution en ARNm et en protéine de S1pr1 et S1pr4, ainsi que la

suppression de la capacité à migrer vers le S1P (Graeler and Goetzl, 2002). Les analyses *in vivo* chez la souris confirment ces résultats. À J+1 après stimulation antigénique, l'expression en ARNm de *S1pr1* des lymphocytes T spécifiques de l'antigène diminue d'un facteur 100, et ces derniers perdent leur capacité à migrer en réponse au S1P (Matloubian et al., 2004). Plus précisément, l'expression de *S1pr1* diminue d'autant plus fortement que l'affinité du TCR pour l'antigène est forte (Bréart and Bousso, 2016).

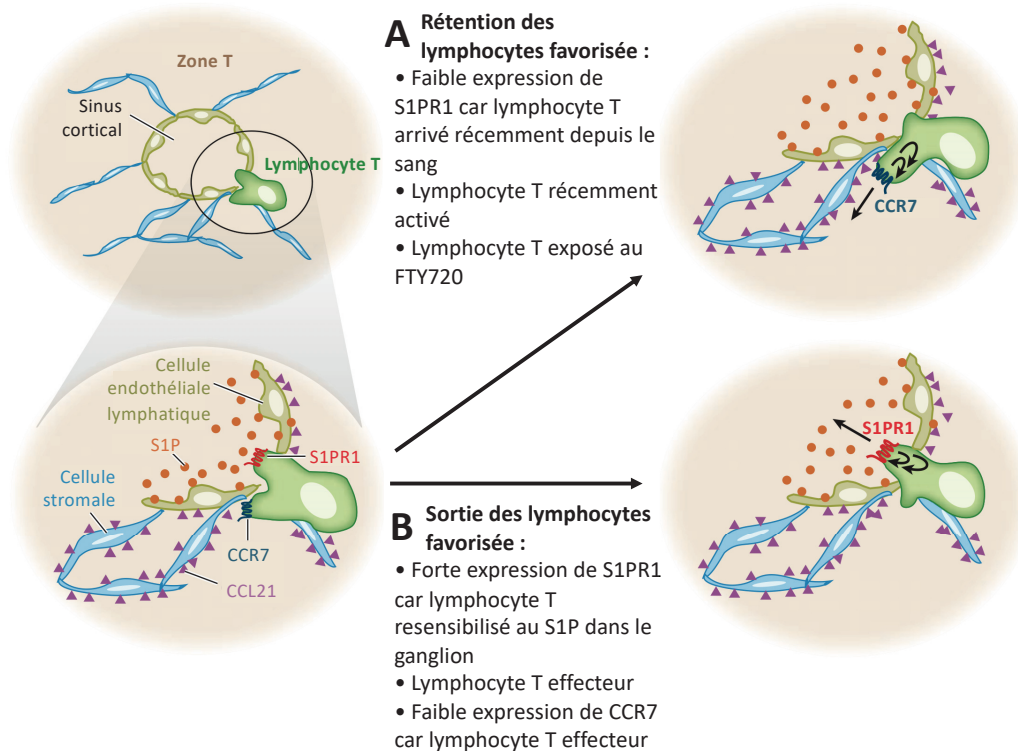


Figure 35 : Contrôle de la rétention et de la sortie des ganglions par CCR7 et S1PR1.

S1PR1 et CCR7 jouent des rôles opposés dans la sortie des lymphocytes T des ganglions lymphatiques. (A) Les lymphocytes T qui arrivent du sang y ont vu leur S1PR1 membranaire internalisé par la forte concentration en S1P. Une fois dans le parenchyme, il leur faut un certain temps pour ré-acquérir l'expression de S1PR1 en surface. Après stimulation antigénique, l'expression de S1PR1 est diminuée. Enfin, le FTY720 induit l'internalisation et la dégradation du récepteur. Dans ces trois situations, la faible expression membranaire de S1PR1 couplée à l'expression de CCR7 retient les lymphocytes T dans le ganglion. (B) À l'inverse, après un certain temps passé dans le ganglion, ou quelques jours après activation, les lymphocytes T ré-acquièrent l'expression de S1PR1 à leur surface, tout en diminuant CCR7. S1PR1 permet de contrebalancer les signaux de rétention et favorise le passage des lymphocytes T vers les sinus lymphatiques. S1PR1 : récepteur au sphingosine-1-phosphate 1 ; CCR7 : C-C motif chemokine receptor 7.

(Cyster and Schwab, 2012)

Plusieurs études ont montré que l'expression de S1PR1 était essentielle à la sortie des lymphocytes T des OLS, comme nous le verrons plus en détail dans le chapitre suivant. Sachant cela, les observations précédentes suggèrent que la diminution de l'expression de S1PR1 empêcherait la sortie des ganglions des lymphocytes T de forte affinité afin d'optimiser leur expansion et leur différenciation (Figure 35A). À l'inverse de S1PR1, CCR7 induit la rétention des lymphocytes T dans les OLS : quand on bloque l'entrée dans les ganglions avec des anticorps bloquants ciblant les intégrines α L et α 4, les lymphocytes *Ccr7*^{-/-} sortent plus vite des ganglions que les lymphocytes *Ccr7*^{+/+} (Pham et al., 2008). Au contraire, les lymphocytes T surexprimant *Ccr7* s'accumulent dans la zone T du ganglion. L'équipe de J. Cyster a montré dans cette étude que S1pr1 permettait de contrebalancer la rétention médiée par *Ccr7*. Ainsi, à J+3 après stimulation, les lymphocytes T ayant réalisé au moins quatre divisions ré-acquièrent l'expression de S1pr1 à leur surface tout en diminuant celle de *Ccr7* (Figure 35B). Les lymphocytes T activés qu'on trouve alors dans la lymphe des ganglions drainants ré-expriment S1pr1 à leur surface et peuvent de nouveau migrer en réponse au S1P (Matloubian et al., 2004). De ce fait, la ré-acquisition de S1pr1 par les lymphocytes T nouvellement activés est associée à leur sortie des ganglions.

D'autres molécules pourraient être également impliquées dans la rétention des lymphocytes T après stimulation. Par exemple, durant la phase précoce d'activation, les lymphocytes T CD8⁺ semblent retenus dans les ganglions grâce à la class I-restricted T cell-associated molecule (CRTAM) (Takeuchi et al., 2009). Ce récepteur de surface est exprimé principalement par les lymphocytes T CD8⁺, et est induit de façon transitoire juste après la stimulation antigénique. Son ligand, la nectin-like molecule-2 (NECL2), est exprimé par les cellules dendritiques présentes dans la zone T. L'interaction *Crtam*/*Necl2* est essentielle à la rétention des lymphocytes T CD8⁺ activés dans les ganglions. En effet, une déficience en *Crtam* est responsable d'un défaut d'accumulation de ces lymphocytes dans les ganglions drainants.

La rétention des lymphocytes T succédant à la stimulation du TCR par un antigène pourrait être un moyen de les maintenir dans un environnement favorable à leur différenciation et leur expansion clonale. De plus, certains lymphocytes T doivent exercer leur activité immunitaire directement dans les OLS. Par exemple, après activation, les lymphocytes Tfh augmentent leur expression de *Cxcr5* tout en réduisant celle de *Ccr7*. De cette façon, ils peuvent rejoindre les follicules B, attirés par la chimiokine *Cxcl13* produite par les FDC (Ansel et al., 1999; Hardtke et al., 2005; Haynes et al., 2007). La diminution d'expression de S1pr1 pourrait les empêcher de rejoindre la circulation sanguine avant d'avoir participé à la maturation des centres germinatifs. Au bout de quelques jours, les lymphocytes T effecteurs ayant terminé leur différenciation ré-expriment S1pr1 et sortent des ganglions par la lymphe afférente grâce au S1P.

3.6 Sortie des OLS

La sortie des lymphocytes T des ganglions se fait par le canal lymphatique efférent et, comme pour le thymus, est dépendante du S1P. En effet, de façon similaire aux études faites sur le thymus, il a été montré qu'un traitement au FTY720 (agoniste de quatre des cinq S1pr), induit une lymphopénie périphérique en séquestrant les lymphocytes T matures dans les OLS (Brinkmann et al., 2002; Chiba et al., 1998). De plus, le récepteur impliqué déclenche une voie de signalisation recrutant une protéine trimérique G avec une sous-unité α_i . Si on injecte des lymphocytes T pré-traités à la PTX dans des souris, puis qu'on bloque l'entrée des ganglions trois heures plus tard à l'aide d'un anticorps anti- α_4 , on observe une diminution de la sortie des lymphocytes T (Lo et al., 2005). Deux hypothèses pourraient expliquer comment le FTY720 induirait une lymphopénie. La première serait qu'il agirait en antagoniste fonctionnel sur le S1pr1 exprimé par les lymphocytes T. Ainsi, les lymphocytes T pré-traités au FTY720 migrent moins bien *ex vivo* (Matloubian et al., 2004), et les lymphocytes *S1pr1*^{-/-} ne sortent plus des OLS et du thymus (Allende et al., 2004; Matloubian et al., 2004). Une autre hypothèse serait que le FTY720 agirait directement sur la perméabilité des cellules endothéliales du sinus lymphatique (Wei et al., 2005).

3.6.1 La sortie des ganglions est dépendante de S1PR1 et du gradient de S1P

La nécessité pour les lymphocytes T d'exprimer S1PR1 à leur surface a été démontrée dans plusieurs études utilisant des transferts adoptifs de lymphocytes T déficients pour *S1pr1* ou le surexprimant. Ainsi, une surexpression de S1pr1 par les lymphocytes T induit une augmentation de leur sortie des ganglions, alors que la sortie des lymphocytes T *S1pr1*^{+/-} est diminuée par rapport aux lymphocytes T *S1pr1*^{+/+} (Lo et al., 2005). Les lymphocytes T *S1pr1*^{-/-} sont capables d'entrer dans les ganglions, la rate et les plaques de Peyer, et de se placer correctement dans la zone T, mais sont incapables d'en sortir : après une injection en IV, on assiste à une absence de lymphocytes T *S1pr1*^{-/-} dans la lymphe accompagnée d'une diminution de leur nombre dans le sang (Matloubian et al., 2004). Ces expériences montrent que *S1pr1* est essentiel au passage des lymphocytes T du parenchyme au sinus lymphatique efférent (Figure 36A).

Toujours comme pour le thymus, la sortie médiée par le S1P est dépendante d'un gradient de concentration entre le parenchyme ganglionnaire et la lymphe. Dans les souris *Sphk*-KO, le S1P disparaît du plasma et de la lymphe alors que dans les souris contrôles sa concentration y est d'environ 100 nM (Pappu et al., 2007). En même temps, on assiste à une diminution du nombre de lymphocytes T circulants. Le niveau élevé de S1P dans la lymphe et le sang est donc essentiel à la recirculation des

lymphocytes T (Figure 36B). À l'inverse, la S1P-lyase est une enzyme qui dégrade le S1P et peut être inhibée par le 2-acetyl-4-tetrahydroxybutylimidazole (THI), un colorant alimentaire. Si on traite une souris avec du THI, la concentration en S1P dans les organes lymphoïdes, initialement de 20, 40, et 150 ng/g de tissu dans le thymus, les ganglions et la rate respectivement (dans cette étude), augmente d'un facteur 100, avec pour conséquence une lymphopénie (Schwab et al., 2005). Pour comparaison, dans cette étude, la concentration en S1P dans le sang des souris contrôles est estimée à 330 ng/g. Ainsi, le maintien d'une concentration faible de S1P interstitiel dans les OLS par la S1P-lyase est également nécessaire à la sortie des lymphocytes T (Figure 36B). De ce fait, il semble établi que les lymphocytes T sortent des OLS grâce au S1pr1 exprimé à leur surface, d'une façon dépendante du gradient de S1P entre le tissu lymphoïde et la lymphe et le sang.

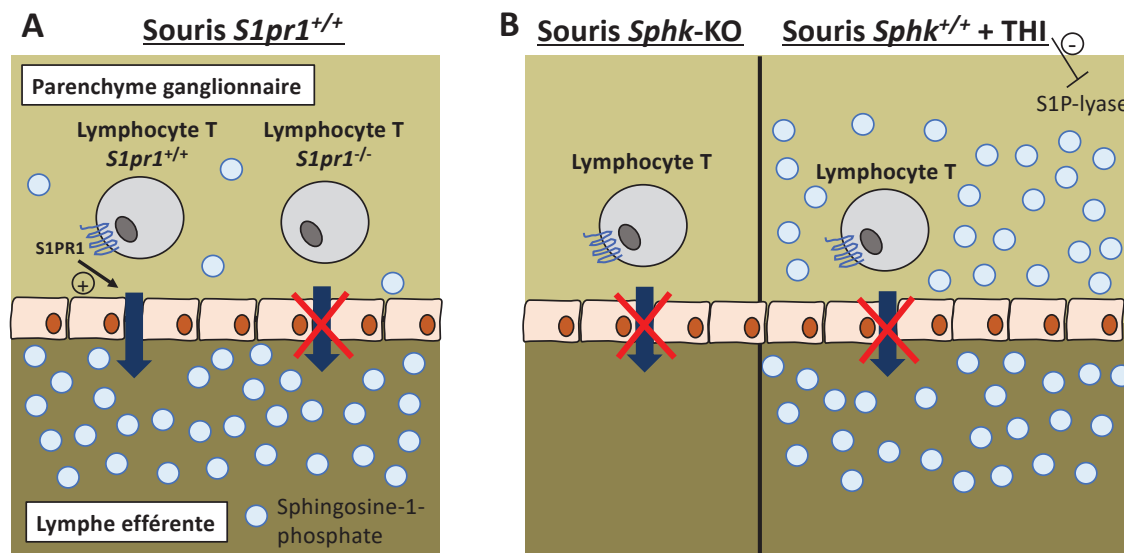


Figure 36 : La sortie des lymphocytes T des ganglions dépend de S1pr1 et du gradient de S1P.

(A) L'expression de S1pr1 est essentielle au passage des lymphocytes T des ganglions vers la lymphe efférente. (B) Cette migration dépend d'un gradient de concentration de S1P, qui est fortement présent dans la lymphe et faiblement dans les tissus. La disruption de ce gradient altère la sortie des lymphocytes T. S1P : sphingosine-1-phosphate ; *Sphk*-KO : sphingosine-kinase knock-out ; THI : 2-acetyl-4-tetrahydroxybutylimidazole.

3.6.2 Dynamique de migration à travers les sinusoides

Les équipes qui se sont intéressées à l'hypothèse selon laquelle le FTY720 agirait plutôt sur les cellules endothéliales pour bloquer la sortie des lymphocytes T ont apporté des éléments permettant de commencer à comprendre la dynamique de migration vers les sinusoides. Pour sortir des ganglions, les lymphocytes T doivent

rejoindre puis traverser la barrière endothéliale des sinus lymphatiques, en passant de la face abluminale à la lumière du sinus. Dans les souris traitées avec du FTY720, les lymphocytes T ne passent plus dans les sinus lymphatiques car ils sont séquestrés du côté abluminal de l'endothélium du sinus (Mandala et al., 2002). Le système S1P/S1PR semble donc crucial pour la migration transendothéliale. L'utilisation du SEW2871, un agoniste sélectif de S1PR1, montre que le récepteur impacté par le FTY720 est S1PR1. En présence de SEW2871 dans des ganglions explantés, les lymphocytes T de la zone médullaire se pressent de façon répétée contre les parois du sinus sans réussir à passer (Wei et al., 2005). La mobilité des lymphocytes T situés dans une région plus éloignée des sinus n'est pas impactée. Après lavage pour éliminer l'agoniste, les lymphocytes T peuvent traverser la barrière. Ils traversent en flux régulier, à une vitesse de 3,9 $\mu\text{m}/\text{min}$. L'étude suggère que le SEW2871 inhiberait la sortie des ganglions en agissant sur le S1pr1 des cellules endothéliales.

L'équipe de J. Cyster et ses collaborateurs ont pu analyser de façon précise par imagerie bi-photonique le parcours des lymphocytes T du cortex jusqu'au vaisseau lymphatique efférent. Les sinus corticaux prennent naissance dans le cortex, à l'intérieur du ganglion, et rejoignent les sinus médullaires en périphérie (Grigorova et al., 2010). Les lymphocytes T du parenchyme, migrant de façon aléatoire, entrent en contact avec un sinus cortical (Figure 28 – (3)). Ils le sondent et y adhèrent d'une façon indépendante de S1pr1 (Benechet et al., 2016; Grigorova et al., 2009; Zhi et al., 2011). Une fois à ce niveau, ils migrent le long de la surface du sinus, y restant attachés parfois jusqu'à 10 min. Les lymphocytes T *S1pr1*^{-/-} ne dépassent pas cette étape, incapables de franchir l'endothélium. En revanche, un tiers des lymphocytes T *S1pr1*^{+/+} allongent des protrusions à travers le sinus au niveau de leur front de migration, puis le traversent pour entrer dans la lumière du sinus (Grigorova et al., 2009; Zhi et al., 2011) (Figure 28 – (4)). Il arrive que plusieurs lymphocytes passent par le même point, suggérant la présence de « *hot spots* » où la migration est facilitée. La migration transendothéliale vers le sinus lymphatique est donc dépendante de S1pr1. En regardant la forme des cellules, Grigorova et ses collègues ont déterminé que les sinus corticaux présentant des lymphocytes T avec une forme arrondie étaient ceux où le flux lymphatique était le plus important, et où les lymphocytes n'étaient donc plus adhérents (Grigorova et al., 2009, 2010). Dans les régions où le flux est faible, la migration à travers l'endothélium du sinus est bidirectionnelle : 50% des lymphocytes T retournent dans le parenchyme après être entrés dans le sinus, suggérant l'existence d'une balance entre les signaux de rétention et d'attraction vers les sinus (Grigorova et al., 2009; Zhi et al., 2011). Dans les sinus corticaux où le flux est plus fort, les lymphocytes T retrouvent une forme ronde et se déplacent de façon unidirectionnelle et à vitesse constante. Ils atteignent ainsi le sinus médullaire qui rejoint le vaisseau lymphatique efférent (Figure 28 – (5)). Ce dernier mènera les lymphocytes T jusqu'au canal thoracique, qui fait le lien entre les réseaux lymphatiques et sanguins.

3.6.3 Signaux de rétention empêchant la sortie des ganglions

Une étude récente a montré que les lymphocytes T murins surexprimant S1pr2 restent bloqués dans les ganglions (Laidlaw et al., 2019), suggérant que S1pr2 pourrait induire un signal de rétention dans les OLS. D'autres signaux bloquant la migration ont, eux, été identifiés de façon formelle chez la souris. Comme nous l'avons vu au chapitre 3.5, la signalisation de Ccl19 et Ccl21 par Ccr7 retient les lymphocytes T dans les ganglions (Pham et al., 2008). Ainsi, S1pr1 jouerait deux rôles majeurs dans ce contexte : contre-balancer le signal de rétention de Ccr7, et permettre directement la sortie des lymphocytes T par les sinus lymphatiques. Cxcr4 semble aussi impliqué dans la rétention des lymphocytes T, en coopération avec Ccr7 : si on inhibe Cxcr4 et qu'on bloque l'entrée dans les ganglions, les lymphocytes T en sortent plus facilement (Nakai et al., 2014). Il a également été montré que Lfa-1 contribuait à la rétention des lymphocytes T dans les ganglions (Reichardt et al., 2013). Par microscopie bi-photonique, on peut voir que les lymphocytes T *Lfa-1^{+/+}*, après avoir sondé l'endothélium lymphatique et être entrés en contact avec la molécule Icam-1, retournent fréquemment dans le parenchyme, alors que les lymphocytes T *Lfa-1^{-/-}* passent directement dans les sinus, avec une vitesse de migration plus élevée que les lymphocytes T *Lfa-1^{+/+}*. Ceci suggère que l'intégrine Lfa-1 retarde la sortie des lymphocytes T en les incitant à retourner dans le parenchyme. Enfin, comme pour le passage dans la lymphe afférente, des molécules d'adhésion pourraient être impliquées dans la migration vers la lymphe efférente.

3.6.4 Sortie des autres OLS

Les études sur la sortie des lymphocytes T des OLS se focalisent principalement sur les ganglions, probablement car ils sont plus faciles à manipuler que les MALT ou les GALT, dont la structure est moins définie. On trouve quelques rares données concernant les plaques de Peyer dans la littérature. Le traitement au FTY720 révèle une augmentation du nombre de lymphocytes T dans les plaques de Peyer (Chiba et al., 1998). Leur sortie a lieu par des vaisseaux lymphatiques (Azzali, 2003). La recirculation des lymphocytes T des plaques de Peyer pourrait donc dépendre des mêmes mécanismes que dans les ganglions, médiée par S1PR1 et les gradients de S1P. À l'inverse des ganglions et des plaques de Peyer, le traitement au FTY720 réduit le nombre de lymphocytes T dans la rate (Honig et al., 2003). La rate est un organe fortement irrigué où, bien que plus faible que dans le sang, la concentration en S1P est plus élevée que dans le thymus ou les ganglions (Schwab et al., 2005). Les lymphocytes T sortent de la rate directement par le sang en passant par la pulpe rouge, mais leur voie de sortie n'a pas encore été clairement définie.

3.7 Le système S1P/S1PR dans la migration des lymphocytes T en condition pathologique

Ainsi que nous avons pu le voir, le S1P et ses récepteurs, en particulier S1PR1, sont largement impliqués dans la circulation des lymphocytes T dans l'organisme à l'homéostasie. Qu'en est-il en cas d'inflammation ? Bien que la concentration en S1P dans les tissus non-lymphoïdes soit faible par rapport au sang, il arrive dans certaines conditions pathophysiologiques que celle-ci soit augmentée localement. En conséquence, l'altération des gradients de S1P pourrait être à l'origine de la rétention des cellules immunitaires dans les tissus enflammés, mais aussi du recrutement des cellules circulantes. Le système S1P/S1PR pourrait jouer un rôle important dans la mobilisation des lymphocytes T en condition inflammatoire ou tumorale.

3.7.1 La migration S1P des lymphocytes T en contexte infectieux

L'inflammation est une réaction immunitaire en réponse à un dommage tissulaire ou une infection causée par un agent externe (microorganisme pathogène, allergène) ou interne (cellule immunitaire autoréactive, cellule cancéreuse). Les facteurs générés lors de l'inflammation induisent de nombreuses modifications vasculaires et histologiques, et permettent l'activation et le recrutement de cellules immunitaires. Plusieurs exemples ont révélé que l'induction de l'inflammation pouvait stimuler l'augmentation locale de la concentration en S1P. L'injection de splénocytes BALB/c ou de particules adénovirales dans l'oreille d'une souris C57BL/6, ou de thioglycollate en intra-péritonéal, accroît fortement le niveau de S1P pendant un à sept jours (Keul et al., 2011; Ledgerwood et al., 2008). L'augmentation est locale et transitoire, puisque le S1P revient à sa concentration basale lorsque l'inflammation est résolue. L'hypercholestérolémie chez les lapins est associée à une augmentation de l'activité des plaquettes, qui relarguent beaucoup plus de S1P qu'en condition non-inflammatoire (Son et al., 2008). Chez l'homme, ce constat a pu être fait dans plusieurs maladies autoimmunes : certains patients atteints de sclérose en plaque présentent des niveaux élevés de S1P dans le sérum ou dans le fluide cérébrospinal (Kułakowska et al., 2010). Après stimulation avec l'allergène, la concentration en S1P et le nombre de lymphocytes, neutrophiles et éosinophiles augmente dans les voies respiratoires des patients asthmatiques (Ammit et al., 2001).

Le S1P agissant dans de nombreux processus, son augmentation lors d'une inflammation pourrait avoir de nombreuses conséquences, en particulier sur les modifications vasculaires des tissus, mais aussi sur la migration des cellules immunitaires. Cependant, on en sait peu sur le rôle du système S1P/S1PR dans la

mobilisation des lymphocytes T en condition inflammatoire. Celle-ci pourrait être faite de deux manières : d'une part en les séquestrant dans les tissus ; d'autre part en les recrutant par chimiotaxie.

D'après Ledgerwood et ses collègues, l'augmentation locale de S1P retiendrait les lymphocytes T dans les zones enflammées (Ledgerwood et al., 2008). La stimulation de S1pr1 par le S1P dans ces conditions induirait l'arrêt du mouvement des lymphocytes T après leur adhérence initiale du côté basal de l'endothélium lymphatique. L'arrêt serait dû à l'augmentation de l'adhérence par les molécules d'adhésion Lfa-1/Icam-1 et very late antigen-4 (VLA-4)/Vcam-1. Cependant, les auteurs ne sont pas clairs sur le mécanisme qui serait induit par le S1P sur S1pr1. On pourrait suggérer ici l'intervention de S1pr2, comme c'est le cas pour les macrophages humains, qui sont retenus dans les plaques d'athéroscléroses par S1PR2 (Skoura, Athanasia et al., 2011). Une autre étude suggère également que S1PR1 retiendrait les lymphocytes T sur le site de l'inflammation, cette fois-ci non pas en inhibant leur migration mais en la stimulant (Jaigirdar et al., 2017). L'injection de lipopolysaccharide (LPS) dans l'oreille d'une souris crée une réaction inflammatoire. Les lymphocytes T Cd4+ activés sont plus nombreux sur le site de l'inflammation que lorsque qu'on injecte du PBS à la souris. Ils se déplacent plus vite dans le tissu, avec une vitesse supérieure à 2 $\mu\text{m}/\text{min}$ et une trajectoire aléatoire. Afin de vérifier si l'augmentation du nombre de lymphocytes T présents était dû à une rétention ou un recrutement, les auteurs ont pré-traité des lymphocytes T OT-II (spécifiques du LPS) activés avec du FTY720 ou un antagoniste de S1pr1 avant de les transférer directement dans l'oreille. Le traitement diminue le nombre de lymphocytes T dans les tissus enflammés, indiquant qu'ils y sont retenus d'une façon dépendante de S1pr1. L'activité Sphk1 est accrue sur le site de l'inflammation, ce qui laisse penser que les niveaux de S1P sont augmentés par rapport aux tissus non stimulés. Dans l'arthrite rhumatoïde chez l'homme, les lymphocytes T CD4+ activés s'accumulent dans le synovium enflammé, où l'activité de la SPHK1 est également forte. Cette étude propose donc qu'en cas d'inflammation, l'augmentation du S1P tissulaire produit par la SPHK1 contribue à la rétention dépendante de S1PR1 des lymphocytes T CD4+ activés.

Il n'existe pour l'instant pas d'étude montrant clairement que l'augmentation tissulaire de S1P lors d'une inflammation favoriserait le recrutement de lymphocytes T. Dans les lésions d'ischémie-reperfusion rénales, l'infiltration précoce et transitoire des lymphocytes T CD4+ est médiée par S1PR1 (Lai et al., 2007). Cependant, aucun lien n'est fait entre cette infiltration et une augmentation éventuelle de S1P. Par contre, cela a été montré pour les macrophages : l'inhibition des effets du S1P sur ses récepteurs avec du FTY720 pendant l'inflammation induit une perte de 80% des macrophages recrutés sur le site de l'inflammation. Les gradients de S1P sont essentiels pour recruter ces derniers *via* un mécanisme dépendant de S1PR3 (Keul et al., 2011).

3.7.2 La migration au S1P des lymphocytes T en contexte tumoral

Le S1P contrôle plusieurs processus pouvant promouvoir la formation et la croissance d'une tumeur : l'inflammation, la néovascularisation, la prolifération et la survie cellulaire. L'expression de l'un ou l'autre des récepteurs par les cellules tumorales a été corrélée à un comportement métastatique, ou au contraire à l'inhibition de la migration tumorale. Par exemple, des cellules de tumeur gastrique exprimant exclusivement S1PR3 migrent en réponse au S1P, alors que la migration de celles qui expriment surtout S1PR2 est inhibée (Yamashita et al., 2006).

Les lymphocytes T qui envahissent les tumeurs sont appelés lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL). Dans le cas de certaines inflammations chroniques, et notamment des cancers, l'activation des lymphocytes T peut avoir lieu directement dans le site enflammé, dans des organes lymphoïdes dits tertiaires (OLT) (Dieu-Nosjean et al., 2014). Ces structures sont organisées d'une façon relativement similaire aux OLS, avec des follicules de lymphocytes B entourés de lymphocytes T et de cellules dendritiques. L'infiltration de l'OLT par des HEV permet l'arrivée de lymphocytes T naïfs dans l'OLT. La présence d'OLT au sein d'une tumeur est généralement associée à un bon pronostic (Dieu-Nosjean et al., 2014). La sortie des TIL des OLT et leur circulation hors de la tumeur n'ont pas encore été réellement étudiées. Les OLT possèdent cependant des structures lymphatiques associées, suggérant une recirculation des lymphocytes T par cette voie. Il serait intéressant de vérifier si cette recirculation est, comme pour les OLS, dépendante de S1PR1.

Outre les OLT, qui ne sont pas systématiquement présents dans les tumeurs, on connaît mal le rôle joué par les S1PR sur le contrôle de l'infiltration des TIL. Généralement, les études mettent plutôt en avant l'impact de l'expression des S1PR par les cellules du microenvironnement tumoral sur la sécrétion de facteurs chimioattractants, et non l'impact de leur expression par les lymphocytes T eux-mêmes. Les tumeurs mettent à profit la fonction régulatrice des lymphocytes Treg pour supprimer l'immunité anti-tumorale (Darrasse-Jèze et al., 2009). Certaines études ont montré que S1pr1 régulait négativement le développement et la circulation en périphérie des lymphocytes Treg (Liu et al., 2009). À l'inverse, son expression par les lymphocytes Treg conduirait à l'accumulation de ces derniers dans les tumeurs, limitant de ce fait l'infiltration par les LTc (Priceman et al., 2014). En effet, l'augmentation de l'expression de S1PR1 par les lymphocytes T CD4+ favorise l'activation de la voie JAK/Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) et la migration des lymphocytes Treg vers la tumeur. La diminution du nombre de lymphocytes T CD8+ ne semble par contre pas dû à l'expression intrinsèque de S1pr1. La régulation de la migration des TIL par le S1P reste encore largement à explorer.

3.7.3 Utilisation du système S1P/S1PR dans les traitements médicaux

Du fait de son impact direct sur les cellules immunitaires, le système S1P/S1PR semble une cible adéquate pour le traitement des maladies autoimmunes. Le FTY720 (Fingolimod ou Ginealya) est le premier inhibiteur des S1PR autorisé par la US Food and Drug Administration (FDA). Il obtient en France l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2011. Le FTY720 est un agoniste de quatre des cinq S1PR, S1PR1, 3, 4 et 5 (Gräler and Goetzl, 2004), qui peut agir comme un antagoniste fonctionnel en induisant l'internalisation puis la dégradation de S1PR1 (Oo et al., 2007). Comme nous l'avons vu précédemment, le FTY720 empêche la sortie des lymphocytes T des OLS (Matloubian et al., 2004; Mehling et al., 2008). Il est actuellement recommandé dans le traitement de la sclérose en plaques, une maladie autoimmune caractérisée par une démyélinisation conduisant à une dégénérescence des fibres nerveuses (Brinkmann et al., 2010; Chun et al., 2019). Le traitement au FTY720 réduit le nombre de lymphocytes T naïfs et T_{CM} dans le sang des patients. Or, dans la sclérose en plaques, 90% des lymphocytes T accumulés dans le fluide cérébrospinal sont de phénotype T_{CM} (Kivisäkk et al., 2004). L'intérêt du traitement est donc d'empêcher leur sortie des OLS, afin de diminuer leur infiltration dans la zone cérébrospinale et limiter la dégradation de la gaine de myéline.

Actuellement, une douzaine d'autres drogues ciblant le système S1P/S1PR sont en essai clinique (Tsai and Han, 2016). On peut citer l'ozanimod, pour le traitement de la sclérose en plaques et la rectocolite hémorragique (Cohen et al., 2016; Sandborn et al., 2016), le ponescimod pour la sclérose en plaque et le psoriasis (Olsson et al., 2014; Vaclavkova et al., 2014), et le siponimod pour la sclérose en plaque (Kappos et al., 2018).

En résumé, le S1P et ses récepteurs jouent un rôle crucial dans la circulation des lymphocytes T, à l'homéostasie et probablement en condition pathophysiologique. Si on commence à connaître assez bien la fonction de S1pr1 dans ces processus, il n'en est pas de même pour les autres récepteurs, en particulier S1pr2 et S1pr4 qui sont aussi exprimés par les lymphocytes T murins. De plus, les études ayant été menées principalement chez la souris, on ne sait pas vraiment si le rôle des S1PR est le même chez l'homme. Mieux comprendre le fonctionnement de ces récepteurs ainsi que leurs interactions dans la migration des lymphocytes T pourra, à terme, apporter de nouvelles voies thérapeutiques pour le traitement des maladies autoimmunes et du cancer.

OBJECTIFS DE TRAVAIL

Les lymphocytes T sont des acteurs importants de la réponse immunitaire adaptative. Leur circulation continue entre les différents compartiments de l'organisme joue un rôle crucial dans l'immunosurveillance. La forte mobilité des lymphocytes T constitue donc une caractéristique essentielle à leur fonction.

Le passage des lymphocytes T du sang aux tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes, et de ces tissus à la lymphe et au sang, est orchestrée par différents récepteurs et molécules chimiotactiques. Si le processus d'extravasation commence à être bien décrit dans la littérature, les mécanismes de sortie des organes lymphoïdes restent à ce jour moins compris. On sait que le S1P régule la sortie des lymphocytes T des OLS. Sa forte concentration dans le sang et la lymphe permet d'attirer les lymphocytes T hors des OLS, où la concentration en S1P est faible. Le S1P peut se lier à cinq récepteurs membranaires (S1PR1-5) exprimés en combinaisons variables par les différentes populations de lymphocytes. Pourtant, les études visant à décrypter le rôle de ces récepteurs dans la migration des lymphocytes T se sont principalement focalisées sur S1pr1 dans les lymphocytes T naïfs murins.

Chez la souris, l'expression de S1pr1 diminue suite à l'activation des lymphocytes T (Matloubian et al., 2004), ce qui permettrait de les retenir dans les OLS le temps de leur différenciation en lymphocytes T effecteurs. Le groupe de Jason Cyster, un pionnier dans ce domaine, a proposé que les lymphocytes T effecteurs tardifs et mémoire réacquerraient ensuite l'expression de S1pr1 (Cyster, 2004; Matloubian et al., 2004), ce qui leur permettrait de répondre au S1P et ainsi de sortir des OLS. Ce modèle n'a cependant pas été testé de façon approfondie, en particulier chez l'homme, et différents éléments dans la littérature suggèrent que l'expression de S1pr1 serait plutôt diminuée sur les lymphocytes T mémoires (Schenkel and Masopust, 2014), remettant ainsi en question le modèle de J. Cyster. Par ailleurs, son modèle ne prend pas en compte les autres récepteurs comme S1pr2 ou S1pr4 qui sont pourtant exprimés à haut niveau sur les lymphocytes T (Jin et al., 2003). De ce fait, on connaît actuellement mal le rôle des récepteurs autres que S1PR1, ainsi que celui des combinaisons des S1PR, dans ce contexte.

Nous souhaitons donc comprendre **comment les récepteurs au S1P et leur combinatoire régulent la migration des lymphocytes T**, en particulier chez l'homme. Pour répondre à cette problématique, nous avons choisi d'organiser ce projet de recherche autour de trois axes :

1 – Étude *ex vivo* du rôle des S1PR dans la migration des lymphocytes T primaires humains. L'expression des S1PR par les lymphocytes primaires humains ainsi que leur impact sur la migration de ces derniers en réponse au S1P sont à ce jour inconnus.

2 – Étude de l'antagonisme fonctionnel entre S1PR1 et S1PR2. Les résultats du premier axe suggèrent que la balance entre l'expression de S1PR1 et S1PR2 pourrait déterminer la réponse migratoire des lymphocytes T au S1P, avec S1PR1 qui induirait la migration et S1PR2 qui l'inhiberait.

3 – Étude des différences entre S1PR1 et S1PR5. Contrairement aux lymphocytes T, les lymphocytes NK ont besoin du signal S1P pour sortir d'organes lymphoïdes dans lesquels la concentration en S1P est élevée, comme la rate ou la moelle osseuse (Drouillard et al., 2018a; Mayol et al., 2011). Nous suggérons que S1PR5 serait moins sensible à l'internalisation en présence de S1P, ce qui expliquerait son utilisation préférentielle par les lymphocytes NK.

Afin de réaliser ces études, nous avons réalisé des tests de chimiotaxie sur des lymphocytes T extraits d'amygdales pédiatriques humaines, en présence de S1P et de différents inhibiteurs. Ensuite, nous avons mis en place un modèle *in vitro* de lignées lymphocytaires T, les Jurkat, surexprimant chacune de façon exogène S1PR1, S1PR2 ou S1PR5. Ce modèle nous a permis d'étudier et de comparer certaines caractéristiques de ces S1PR, comme leur sensibilité à l'internalisation médiée par le S1P, leur rôle dans l'induction de la migration, ou la signalisation en aval de ces récepteurs. Des modèles de souris mutantes *S1pr2-KO* et *S1pr5-FLAG* nous ont également permis d'amorcer *in vivo* la confirmation de nos observations *in vitro*.

Une meilleure compréhension des mécanismes de circulation des lymphocytes T pourra, à terme, permettre la mise en place de nouvelles voies thérapeutiques ciblant ces cellules immunitaires.

RESULTATS

I – Étude *ex vivo* du rôle des S1PR dans la migration des lymphocytes T humains

Ce premier article, sur lequel j'ai eu l'occasion de travailler à mon arrivée dans l'équipe, représente le point de départ de mon projet de thèse. J'ai notamment participé à la répétition de certaines expérimentations (figure 2) pour renforcer leur significativité, ainsi qu'à la réalisation de la figure supplémentaire 2. Les résultats qui y sont présentés sont importants pour comprendre au mieux les problématiques et les objectifs de ces travaux de thèse.

État de l'art :

- Chez la souris, S1pr1 est essentiel à la sortie des lymphocytes T naïfs des OLS.
- L'expression de S1pr1 est régulée juste après activation des lymphocytes T murins.
- Un traitement au FTY720, un inhibiteur non spécifique de S1PR1, induit chez les patients une lymphopénie périphérique des lymphocytes T naïfs et T_{CM}, mais pas des lymphocytes T_{EM}.
- À ce jour, les données concernant le rôle des S1PR chez l'homme et dans les lymphocytes T mémoires sont limitées.

Objectif :

- Comprendre le rôle des S1PR dans la migration *ex vivo* des lymphocytes T humains.

Principaux résultats :

- Dans les amygdales humaines, les lymphocytes T naïfs et mémoires expriment les mêmes niveaux d'ARNm pour S1PR2 et S1PR4. En revanche, l'expression de S1PR1 est diminuée avec la différenciation en lymphocyte T mémoire.
- Chez l'homme, S1PR1 induit la migration des lymphocytes T naïfs d'amygdale *ex vivo*, alors que S1PR2 inhibe la migration des lymphocytes T mémoires (Figure 37).
- Le ratio entre S1PR1 et S1PR2 semble contrôler la réponse migratoire des lymphocytes T primaires humains. Il pourrait donc exister un antagonisme fonctionnel entre S1PR1 et S1PR2 dans la réponse migratoire au S1P.

Impacts :

- Les données connues sur le rôle de S1pr1 dans la migration des lymphocytes T naïfs chez la souris pourraient être applicables à l'homme : S1PR1 induit la migration des lymphocytes T naïfs.
- La réponse migratoire opposée des lymphocytes T naïfs et mémoires soulève la question du rôle du S1P dans la recirculation des lymphocytes T mémoires.
- Mise en évidence d'un antagonisme entre S1PR1 et S1PR2.
- Le mécanisme d'inhibition de la migration par S1PR2 pourrait être utilisé à des fins thérapeutiques.

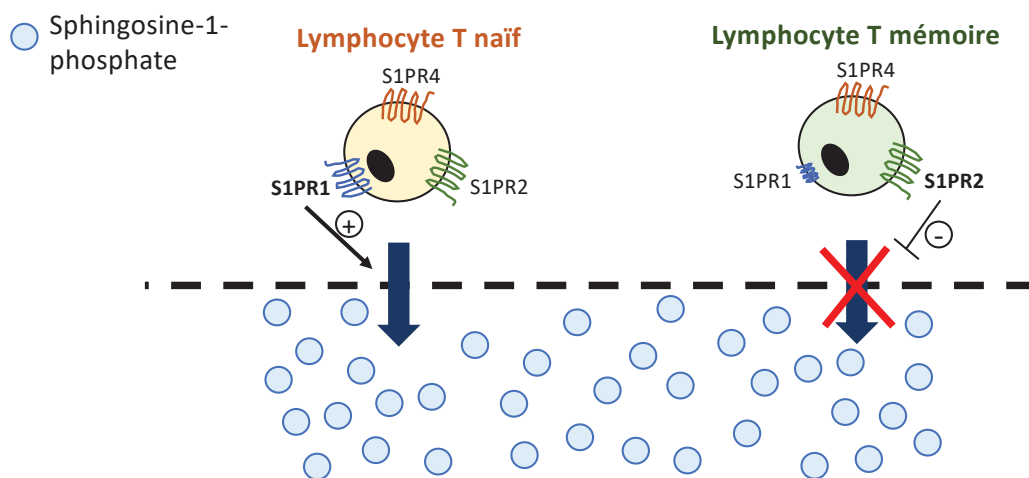


Figure 37 : Effets antagonistes de S1PR1 et S1PR2 sur la migration des lymphocytes T humains.

Lors des tests de chimiotaxie réalisés *ex vivo* sur des lymphocytes extraits d'amygdales pédiatriques humaines, S1PR1 induit la migration des lymphocytes T naïfs alors que S1PR2 inhibe la migration des lymphocytes T mémoires. On observe donc un effet antagoniste des deux récepteurs sur la migration. S1PR : récepteur au sphingosine-1-phosphate.

Human Naive and Memory T Cells Display Opposite Migratory Responses to Sphingosine-1 Phosphate

Annabelle Drouillard,^{*,†,‡,§,¶} Antoinette Neyra,^{*,†,‡,§,¶} Anne-Laure Mathieu,^{*,†,‡,§,¶}
 Antoine Marçais,^{*,†,‡,§,¶} Mélanie Wencker,^{*,†,‡,§,¶} Jacqueline Marvel,^{*,†,‡,§,¶}
 Alexandre Belot,^{*,†,‡,§,¶,||} and Thierry Walzer^{*,†,‡,§,¶}

The role of sphingosine-1 phosphate (S1P) in leukocyte trafficking has been well deciphered in mice but remains largely undressed in humans. In this study, we assessed the ex vivo response to S1P of primary human T cell subsets. We found that tonsil but not blood leukocytes were responsive to S1P gradients, suggesting that T cell responsiveness is regulated during their recirculation in vivo. Tonsil naive T cells were readily chemoattracted by S1P in an FTY720-sensitive, S1PR1-dependent manner. Surprisingly, S1P had the opposite effect on effector memory T cells, resident memory T cells, and recently activated T cells, inhibiting their spontaneous or chemokine-induced migration. This inhibition was also more pronounced for CD4 T cells than for CD8 T cell subsets, and was dependent on S1PR2, as shown using the S1PR2 antagonist JTE-013. S1PR1 was progressively downregulated during T cell differentiation whereas S1PR2 expression remained stable. Our results suggest that the ratio between S1PR1 and S1PR2 governs the migratory behavior of T cell subsets. They also challenge previous models of the role of S1P in lymphocyte recirculation and suggest that S1P promotes retention of memory T cell subsets in secondary lymphoid organs, via S1PR2. *The Journal of Immunology*, 2018, 200: 551–557.

Memory T cell subsets have complementary functions and distinct tissue distributions. Central memory T cells (TCM) defined as CCR7⁺CD45RA[−] in humans have superior proliferative capacity and recirculate through secondary lymphoid organs (SLO) via blood and lymph. Effector memory T cells (TEM), defined as CCR7[−]CD45RA[−]CD45RO⁺ in humans, have important immediate effector functions and recirculate through the blood and spleen (1). In humans, a high frequency of T cells found in nonreactive lymph nodes (LNs) is of TEM phenotype, even in infants, suggesting that TEM may recirculate via nonlymphoid tissues to the afferent lymph, as previously proposed

(2). The recently described resident memory T cells (TRM) do not recirculate but are instead resident in both nonlymphoid and lymphoid organs (3). They are defined as CD69⁺CD103^{+/−} in all species, irrespective of the expression of other markers, even though this definition is known to be imperfect (4). TRM localization, at sites of pathogen entry, is thought to be essential for recall responses.

Sphingosine-1 phosphate (S1P) binds to five different G-protein coupled receptors (S1PR1–5). Extracellular S1P is carried in the body by albumin and other lipoproteins. S1P concentration is maintained at high levels in the blood and lymph and at low levels within tissues (5). S1PR1, S1PR3, and S1PR5 are coupled to G_{αi} and provide attractive cues to lymphocytes. A series of studies found that S1PR1 allows the egress of T and B cells from SLO to the blood and lymph (5). S1PR4 is believed to regulate T cell proliferation and cytokine secretion but not cell migration (6). S1PR2 is the only S1P receptor coupled to G₁₂/G₁₃ and signals via Rho instead of Rac-like G_{αi}-coupled receptors (7). This property may explain how S1PR2 mediates chemorepulsion and antagonizes S1PR1 signaling in mouse osteoclast precursors (8) or germinal center B cells (9), a process important for their proper localization. S1PR2 is also known to be insensitive to the effect of FTY720, a supra agonist for all other S1P receptors that induces their internalization (10, 11).

S1P responsiveness is regulated during T cell activation, as shown in mouse studies. Recently activated T cells (act-T cells) upregulate CD69 expression. CD69 binds surface S1PR1 and induces its internalization, trapping act-T cells in inflamed LNs (12) or in nonlymphoid tissues such as the skin (13). Upon TCR stimulation, S1PR1 is also downregulated transcriptionally, which may contribute to T cell sequestration in LN. This downregulation is, however, transient as S1PR1 levels increase during differentiation into effector and memory T cells, which is believed to permit egress from SLO by restoring responsiveness to S1P (14, 15). S1P responsiveness is also cyclically modulated during lymphocyte recirculation. In particular, lymphocyte S1PR1 is downregulated

*International Center for Infectology Research, 69000 Lyon, France; [†]INSERM, U1111, 69000 Lyon, France; [‡]École Normale Supérieure de Lyon, 69000 Lyon, France; [§]Université Lyon 1, 69000 Lyon, France; [¶]CNRS, UMR5308, 69000 Lyon, France; and ^{||}Service de Néphrologie Rhumatologie Dermatologie Pédiatriques, Hospices Civils de Lyon, Université Claude-Bernard Lyon 1, 69000 Lyon, France
 ORCID: 0000-0001-7188-7655 (A.D.); 0000-0001-6241-459X (J.M.); 0000-0002-0857-8179 (T.W.).

Received for publication September 5, 2017. Accepted for publication November 7, 2017.

The laboratory of T.W. was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR JC SPHINKS to T.W. and ANR JC BaNK to A.M.), the ARC Foundation (Équipe Labellisée), and the European Research Council (ERC-Stg 281025) and receives institutional grants from INSERM, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, and École Normale Supérieure de Lyon.

A.D., A.N., A.-L.M., A.M., and M.W. performed experiments and analyzed data. J.M., A.B., and M.W. provided intellectual input and reagents. T.W. conceived the ideas and interpreted data; T.W. wrote the paper and edited it with the assistance of the other authors.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Thierry Walzer, Centre International de Recherche en Infectologie, INSERM U1111 – CNRS UMR5308, Université Lyon 1, ENS de Lyon, 21 Avenue Tony Garnier, 69365 Lyon Cedex 07, France. E-mail address: Thierry.walzer@inserm.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: act-T, activated T; LN, lymph node; SLO, secondary lymphoid organ; S1P, sphingosine-1 phosphate; TCM, central memory T cell; TEM, effector memory T cell; TRM, resident memory T cell.

Copyright © 2018 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/18/\$35.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1701278

in the blood, upregulated in lymphoid organs, and downregulated again in the lymph, in a manner dependent on local SIP concentrations (16) and on the GRK2 kinase (17).

Few studies have addressed the role of SIP receptors in primary human lymphocytes. It was reported that human thymocytes displayed a strong response to SIP in migration assays (18) and that tonsil B cell subsets respond to SIP (19). Moreover, numerous studies have documented the important lymphopenia induced by the treatment with FTY720, a Food and Drug Administration–approved treatment for relapsing multiple sclerosis (20–23). FTY720 binds with a higher affinity to S1PR1 and, although the mechanism of FTY720 action is still debated, it is likely that much of its action comes from its ability to induce S1PR1 internalization in lymphocytes. In treated patients, FTY720 induces a quick decrease in peripheral naive cells and TCM but it does not affect peripheral TEM and NK cells (20, 21, 24), which is attributed to a low S1PR1 expression on these cell types and a lower sensitivity to FTY720-induced internalization of S1P5 (25). Hence, most of our knowledge of the role of SIP receptors in lymphocyte trafficking results from the study of loss-of-function mutant mouse models or the study of the impact of FTY720 in patients, and the role and regulation of SIP receptors in human leukocytes remains mostly unexplored. In this study, we revisited this point and measured the response of human memory T cell subsets to SIP, and assessed the role of the different SIP receptors in this response.

Materials and Methods

Patients and preparation of human lymphocyte suspensions

All material was used after obtaining informed consent, and the research was conducted in accordance with the Helsinki Declaration. Human peripheral blood was obtained from healthy donors. Cells were ficollized and then washed several times in complete medium before resuspension in chemotaxis medium. Pediatric tonsils were obtained from patients undergoing tonsillectomy and were cut into pieces using a scalpel and then passed through a 70 μ m cell strainer to produce a cell suspension. Cells were then ficollized and washed before migration studies.

Chemotaxis assays

Tonsil lymphocytes or PBMC were suspended in RPMI 1640 supplemented with 4 mg/ml fatty acid–free bovine albumin (Sigma, St. Louis, MO). The same medium was used to prepare SIP (Sigma) or CXCL12 (R&D Systems, Minneapolis, MN) at the indicated concentrations. Cell migration was analyzed in Transwell chambers (Costar, Cambridge, MA) with 5 μ m pore-width polycarbonate filters. Pharmacological modulators of SIP receptors FTY720 (Novartis, Basel, Switzerland), JTE-013 (Tocris, Bristol, U.K.), SEW2871 (Sigma), and CYM50358 (Tocris) were used at the indicated concentrations. PBMC or tonsil cells were added to the top chambers of the Transwell systems in the presence or absence of the pharmacological inhibitors and incubated at 37°C for 2 h. The chemoattractants were then added in the lower chamber and the cells were allowed to migrate for 2 h. Transmigrated cells were stained for CD3 (UCHT1), CD4 (RPA-T4), CD8 (RPA-T8), CD45RO (UCHL1), CCR7 (G043H7), CD69 (FN50), CD103 (Ber-act8), CD38 (HIT32), and HLA-DR (LN3) and analyzed/counted by flow cytometry (MACSQuant; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). All Abs were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA), eBioscience (San Diego, CA), Beckman-Coulter (Miami, FL), or BioLegend (San Diego, CA). The migration index was calculated as the ratio between the number of cells migrating in the SIP (or CXCL12) condition and the number of cells migrating in the control (medium only) condition, as measured by flow cytometry. The percentage of input was calculated as the ratio between the number of cells migrating in a given condition and the number of cells used for the chemotaxis assay.

Cell sorting and RNA preparation

Tonsil lymphocytes were stained for surface markers (similar stainings as for chemotaxis experiments) and sorted into different subsets using a FACSAria Cell Sorter (Becton-Dickinson, San Jose, CA). The purity of sorted cell populations was over 98% as checked by flow cytometry. Sorted

cells were lysed using Trizol reagent (Invitrogen) and RNA was extracted according to the manufacturer's instructions.

Quantitative RT-PCR

We used a high-capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) to generate cDNA for RT-PCR. PCR was carried out with a SybrGreen-based kit (FastStart Universal SYBR Green Master, Roche, Basel, Switzerland) or SensiFast SYBR No-ROX kit (Bioline) on a StepOne plus instrument (Applied Biosystems) or a LightCycler 480 system (Roche). Primers were designed using the Roche software. The following primers were used for quantitative PCR: S1PR1 (forward) 5'-AACTTCGCCCTGCTTGAG-3', S1PR1 (reverse) 5'-TCCAGGCTTTTGTGTAGCTT-3', S1PR2 (forward) 5'-CCACTCGGCAATGACCTGT-3', S1PR2 (reverse) 5'-ACGCCCTGCCAGTAGATCG-3', S1PR3 (forward) 5'-GCAGGC-AACCTCCTCTCAT-3', S1PR3 (reverse) 5'-GAAAAAGCAGCCAAGTTC-CA-3', S1PR4 (forward) 5'-AATGGGCTTCCCATGGTC-3', S1PR4 (reverse) 5'-CAGGGTGCTCTCTGCTCCTA-3', S1PR5 (forward) 5'-GAGTGCAATGGCACAATTA-3', S1PR5 (reverse) 5'-GGAACCTCAGGCTTGATCC-3', KLF2 (forward) 5'-CATCTGAAGGCGCATCTG-3', KLF2 (reverse) 5'-CGTGTGCTTTCGGTAGTGG-3', OAZ1 (forward) 5'-GGATAAACCC-AGCGCCAC-3', OAZ1 (reverse) 5'-TACAGCAGTGGAGGGAGACC-3'.

Statistics

Statistical analyses were performed using parametric or nonparametric tests (*t* test or ANOVA) run on the Prism software (GraphPad). Levels of significance are expressed as *p* values (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

Results

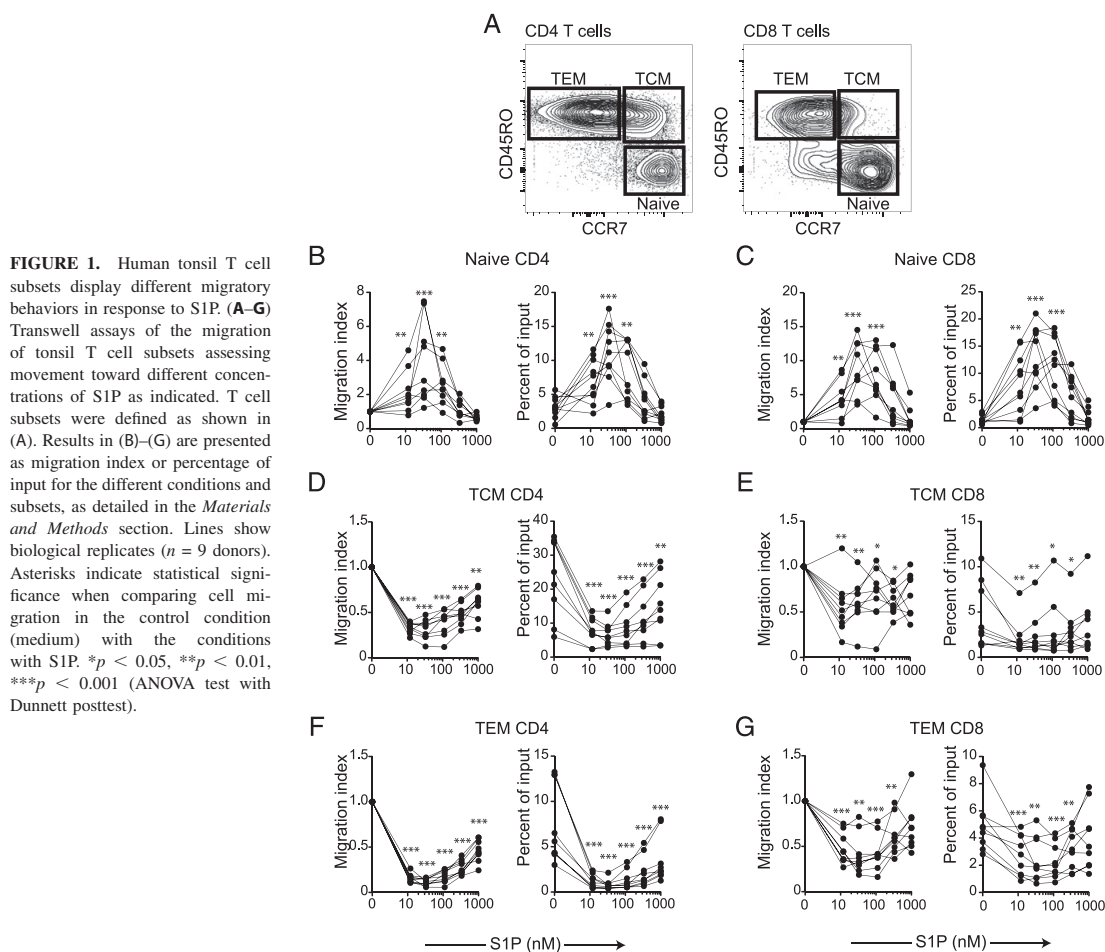
Lymphocyte response to SIP is regulated during recirculation across lymphoid organs

We measured the response of freshly isolated human lymphocyte subsets to SIP using Transwell migration systems. We first tested the response of PBMC obtained from healthy donors, taking naive CD4 and CD8 T cells as the prototypic cell types responsive to SIP. T cell subsets were desensitized by flow cytometry as shown in Fig. 1A. However, as previously demonstrated in mice, human blood naive T cells did not respond to SIP (Supplemental Fig. 1A). A prior incubation in culture medium supplemented (or not) with serum or cytokines did not change this response (data not shown). This unresponsiveness was specific to SIP as blood T cells were highly responsive to chemokines such as CXCL12 (Supplemental Fig. 1B). Assuming that SIP receptors were desensitized in blood leukocytes as a result of high SIP concentrations in this compartment as described in mice, we measured the response of freshly isolated tonsil lymphocytes to SIP gradients. As shown in Fig. 1B, 1C, tonsil naive T cell chemotaxis was strongly increased when SIP gradients were applied, and compared with the control condition without SIP. Maximum migration was obtained with 30–60 nM SIP, in the range of previously published values for mouse T cells. Higher SIP concentrations inhibited this migration, a response typically observed with other G protein–coupled receptors. Both naive CD4 and CD8 T cells migrated in response to SIP, with naive CD8 T cells displaying the strongest response.

These data show that, like in the mouse (16), human lymphocyte response to SIP fluctuates during recirculation, presumably because of receptor internalization in blood lymphocytes.

SIP inhibit spontaneous migration of memory T cells

Next, we measured the migration of memory T cell subsets in response to SIP or CXCL12. Blood memory T cells did not respond to SIP but were strongly reactive to CXCL12 (Supplemental Fig. 1C–F). Surprisingly, when analyzing the response of tonsil lymphocytes, SIP did not attract TCM and TEM toward the lower chamber but rather inhibited their spontaneous migration



(Fig. 1D–G), especially for memory CD4 T cells. TCM had an intermediate migratory response between naive and TEM, suggesting that the response to S1P was mediated by two different receptors whose expressions were regulated in opposite ways during T cell differentiation. When expressing the same migration results as a percentage of input, we noticed that tonsil naive T cells were rather stationary in the absence of chemotactic signals. Reciprocally, memory T cells of both subsets were constitutively motile, but this migration could be inhibited in a dose-dependent manner by S1P added in the lower chamber (Fig. 1D–G). Similar results were obtained with LN lymphocytes (data not shown), suggesting that our conclusions on the response of memory T cells to S1P likely apply to those of all SLO. Finally, we also tested the capacity of tonsil T cells to respond to a physiological source of S1P, i.e., FCS, diluted at different concentrations. As shown in Supplemental Fig. 2, naive and memory T cells displayed opposite responses to FCS, naive T cells being attracted and memory T cell migration being inhibited by S1P.

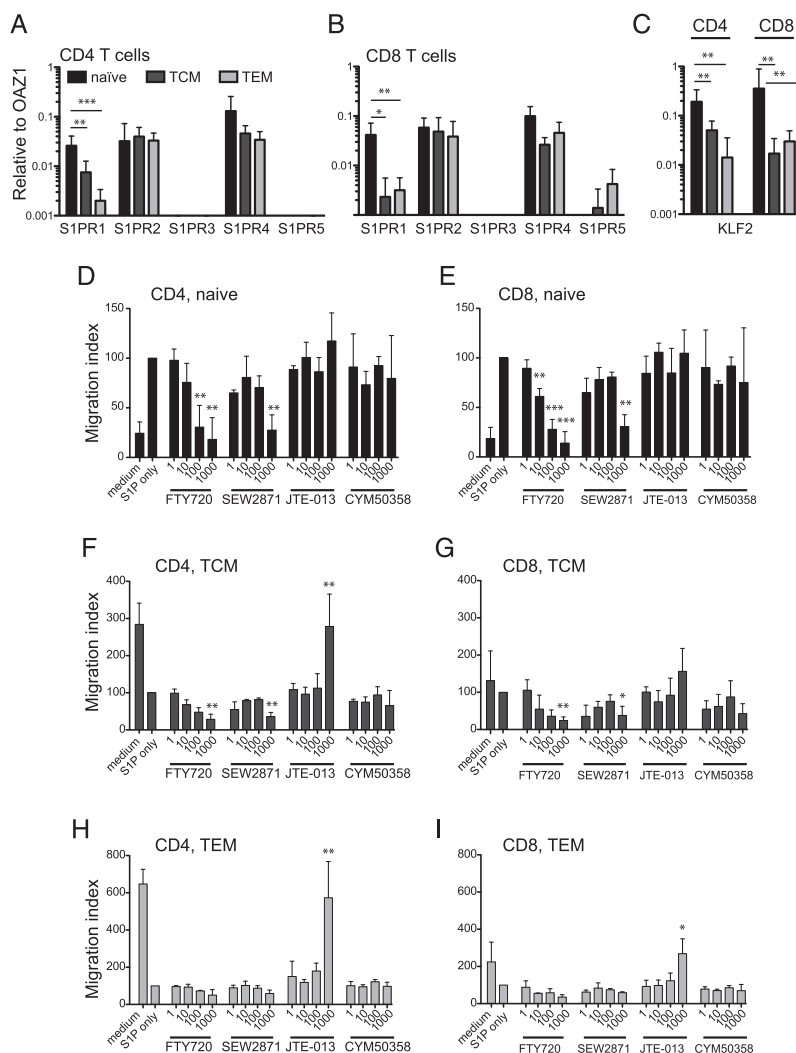
Altogether, these results show that T cell response to S1P is highly regulated during differentiation and that naive and TEM subsets have opposite responses to S1P. These data also suggest that TEM are retained by S1P within SLO whereas naive T cells can exit in response to the same signal.

S1PR1 and S1PR2 are respectively involved in naive and memory T cell response to S1P

To gain insight into the mechanism underlying the different behaviors of naive and memory T cell subsets in the presence of S1P gradients, we first measured the expression of S1P receptors by semiquantitative RT-PCR in sorted T cell subsets. As shown in Fig. 2A and 2B, S1PR1, S1PR2, and S1PR4 were expressed at high levels in T cells, whereas S1PR3 was barely detected and S1PR5 was only expressed at low levels in CD8 TEM. Of note, S1PR1 expression was progressively downregulated upon T cell differentiation into memory cells, whereas S1PR2 and S1PR4 expression levels remained constitutively expressed. S1PR1 downregulation correlated with KLF2 being strongly downregulated in TEM (Fig. 2C). KLF2 is known to induce S1PR1 expression in T cells (26).

We then tested the effect of different pharmacological inhibitors of these receptors on the capacity of T cell subsets to respond to S1P. Tonsil naive T cell migration was strongly inhibited by S1PR1 inhibitors FTY720 and SEW2871 (Fig. 2D, 2E) but insensitive to the S1PR4 inhibitor CYM50358. The S1PR2 inhibitor JTE-013 abrogated the inhibitory effect of S1P on TCM and TEM migration (Fig. 2F–I). This inhibitor had, however, no effect on spon-

FIGURE 2. S1PR1 and S1PR2 mediate the response to SIP in human naive and memory T cells. **(A–C)** Quantitative real-time PCR analysis of S1PR (A and B) and KLF2 (C) expression in flow cytometry-sorted T cell subsets from human tonsils. Results show the mean $\pm$ SD of five independent experiments for a total of $n = 6$ donors. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Mann–Whitney tests). **(D–I)** Transwell assays of the migration of the indicated tonsil T cell subsets assessing movement toward different concentrations of SIP as indicated. Prior to the addition of SIP in the lower chamber, cells were treated for 2 h in the top chamber with the indicated pharmacological inhibitors at the indicated concentrations (nanomolars). Results show the mean $\pm$ SD of three independent experiments with $n = 3$ donors. Asterisks indicate statistical significance when comparing cell migration in the control condition (SIP only) with the conditions with inhibitors. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (ANOVA test with Dunnett posttest).



taneous T cell migration (data not shown). Of note, FTY720 and SEW2871 had a negative impact on memory T cell migration in the presence of SIP whereas JTE-013 treatment tended to increase naive T cell migration to SIP, suggesting that S1PR1 and S1PR2 are active in all T cell subsets but that the relative level of each receptor conditions the migratory behavior in response to SIP. Interestingly, when plotting the maximum migration index as a function of S1PR1 expression in the various T cell subsets, we found a very tight linear correlation between both factors (Supplemental Fig. 3), suggesting that S1PR1 expression is the limiting rate factor in SIP-induced migration and that the apparent repulsion mediated by S1PR2 only occurs when S1PR1 is expressed at very low levels, i.e., in memory T cells, especially of the CD4 subset.

Spontaneous migration of TRM and act-T cells is inhibited by SIP in an S1PR2-dependent way

As our results suggested that SIP could be an important tissue-retention signal in humans, we next studied the SIP response of

TRM and recently act-T cells. In mice, TRM are believed to be retained in tissues by default of a response to SIP. Indeed, TRM express very low levels of KLF2 and S1PR1 (27). Moreover, CD69 expression induces S1PR1 internalization, further inhibiting migration toward SIP (12). To test this point in humans, we measured the SIP response of human tonsil TRM defined as CD69 positive T cells coexpressing (or not) CD103. As shown in Fig. 3A and 3B, SIP inhibited spontaneous migration of CD4⁺ TRM, irrespective of their CD103 expression. Again, the S1PR2 antagonist JTE-013 abrogated this inhibitory effect (Fig. 3C). For CD8⁺ TRM, SIP inhibited spontaneous migration of CD69⁺CD103⁺ but not CD69⁺CD103⁻ cells, and JTE-013 abrogated this effect.

Upon Ag-mediated activation, T cells are retained within SLOs, presumably to sustain their activation and differentiation through serial interactions with Ag presenting cells. Mechanistically, it was previously reported that mouse T cells lose their reactivity during this phase by down regulating S1PR1 expression (14). We addressed this point in humans, exploiting the fact that tonsils contain act-T cells in a variable proportion, classically defined as

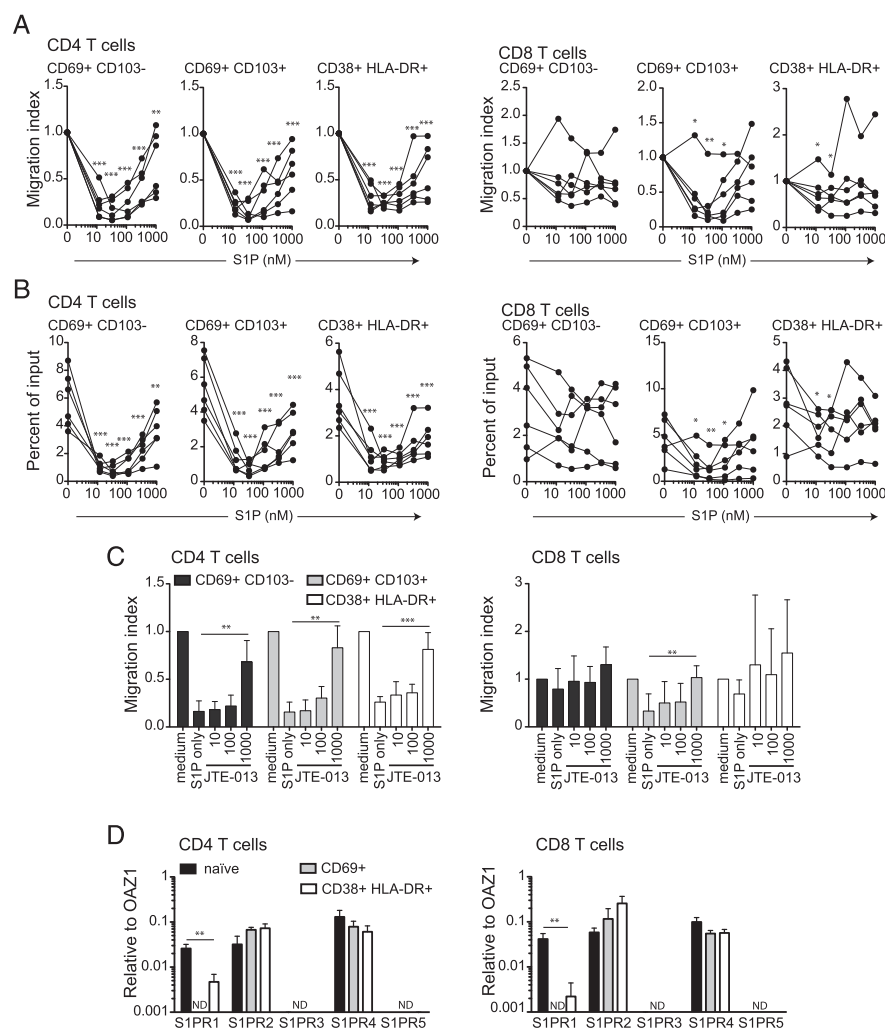


FIGURE 3. S1PR2 inhibits spontaneous migration of TRM and act-T cells. Transwell assays of the migration of the indicated tonsil T cell subsets assessing movement toward different concentrations of S1P as indicated. Results are shown as **(A)** migration index; **(B)** percentage of input. Lines show biological replicates ($n = 6$ donors). Asterisks indicate statistical significance when comparing cell migration in the control condition (medium) with the conditions with S1P. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ (ANOVA test with Dunnett posttest). **(C)** Prior to the addition of S1P in the lower chamber, cells were treated for 2 h in the top chamber with the JTE-013 at the indicated concentrations (nanomolars). Results show the mean $\pm$ SD of six independent experiments with $n = 6$ donors. Asterisks indicate statistical significance when comparing cell migration in the control condition (S1P only) with the conditions with JTE-013. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (Mann–Whitney tests). **(D)** Quantitative real-time PCR analysis of S1PR expression in the indicated T cell subsets sorted by flow cytometry from human tonsil lymphocyte preparations. $n = 3$ sorts from three different donors.

CD38⁺HLA-DR⁺. As shown in Fig. 3A and 3B, the spontaneous migration of act-CD4⁺ and act-CD8⁺ T cells was strongly inhibited by S1P, an effect that could be again curbed by the S1PR2 antagonist JTE-013 (Fig. 3C). We also measured the expression of S1P receptors in TRM CD69⁺ and act-T cells. S1PR1 was found to be highly downregulated in act-T cells compared with naive T cells and undetectable in TRM whereas the level of S1PR2 was similar to that of other T cell subsets (Fig. 3D).

S1PR2 engagement inhibits chemokine-induced migration of memory T cell subsets

Altogether, our results demonstrate the major role of S1PR2 in human memory T cell response to S1P and suggest a functional

antagonism between S1PR1 and S1PR2 in T cell subsets. As lymphocytes are constantly exposed to opposing signals influencing their mobility, we also wanted to test the impact of S1P on the capacity of naive and memory T cells to respond to chemokine gradients. We therefore measured the migration of tonsil T cells in response to various concentrations of CXCL12, the ligand for CXCR4, a receptor involved in T cell homeostasis (28) and SLO organization (29), in the presence or absence of S1P given at an optimal concentration (37 nM). As shown in Fig. 4, the addition of S1P in the lower chamber slightly increased the migration of naive CD4 and CD8 T cells but decreased that of TEM and to a lesser extent that of TCM induced by CXCL12. The latter effect was abrogated by JTE-013 in all conditions, demonstrating that S1PR2

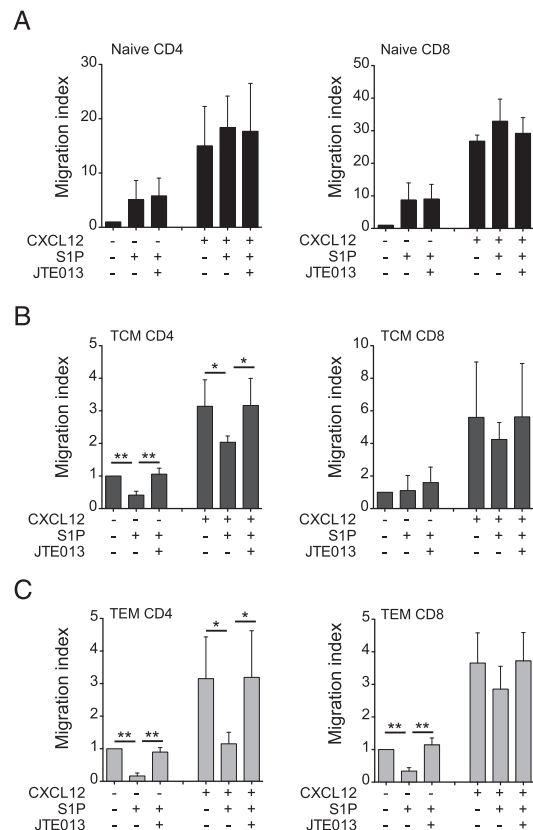


FIGURE 4. S1PR2 inhibits CXCL12-induced migration of memory T cell subsets. (A–C) Transwell assays of the migration of the indicated tonsil T cell subsets assessing movement toward CXCL12 (12 ng/ml) $\pm$ S1P (37 nM) as indicated. Results are shown as migration index. Prior to the addition of S1P in the lower chamber, cells were treated (or not) for 2 h in the top chamber with JTE-013 (1000 nM). Results show the mean $\pm$ SD of four independent experiments with $n = 3$ donors. Asterisks indicate statistical significance when comparing cell migration in the control condition (S1P only) with the conditions with JTE-013. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Mann–Whitney tests).

engagement can oppose chemokine-induced migration in memory T cell subsets.

Discussion

In this study, we demonstrate that human T cell responsiveness to S1P is regulated at multiple levels. First, as previously demonstrated in mice (16), S1P receptors are desensitized in blood circulating T cells. This is likely the consequence of ligand-induced receptor internalization. All our attempts to restore T cell sensitivity to S1P by preincubation in various conditions failed, suggesting that the recycling of S1P receptors on the cell surface requires active signals, more complex than the mere deprivation of S1P. Second, the expression of S1P receptors is highly regulated during human T cell differentiation. S1PR1 expression is indeed high in human naive T cells, likely induced by the transcription factor KLF2 (26) but decreases upon differentiation in TCM and even more in TEM, TRM and act-T cells. By contrast, S1PR2 expression remains stable during differentiation. Hence the ratio between S1PR1 and S1PR2 progressively

decreases during T cell differentiation into memory subtypes. This correlated with the migratory behavior of naive versus memory T cells in the presence of S1P; S1PR1 mediated attraction of naive T cells whereas S1PR2 inhibited spontaneous or chemokine-induced memory T cell migration. The affinity of S1P to S1PR2 appears substantially lower than its affinity to S1PR1 (Kd of 27 nM versus Kd of 8 nM for review, see Ref. 30). This suggests that T cells are attracted toward high S1P concentrations as long as S1PR1 expression is sufficient to overcome S1PR2 activity. Our results suggest that TEM, TRM, act-T cells, and to a lesser extent TCM are retained within SLO through S1PR2 signaling. These data challenge the classical view that S1P is a major exit signal for T lymphocytes. S1P-mediated retention of memory and act-T cells within SLO may favor the re-encounter of Ag presented by dendritic cells. These data may also explain why, as recently shown, TEM are very abundant within SLO (2). Importantly, memory T cell subsets were found to display higher spontaneous migration than naive T cells, possibly through constitutive activation of integrins. This intrinsically high mobility may be important for their entry into SLO and to more efficiently scan APCs. It has been postulated that egress structures in SLO like LN may be relatively permissive to T lymphocytes, possibly through egress portals (15). In this context, S1PR2 may be important to override the constitutive mobility of memory T cells and promote their retention within SLO. How memory T cell subsets reach the blood circulation remains to be determined. S1P-induced S1PR2 desensitization and attraction by other chemotactic signals such as proinflammatory or homeostatic chemokines may allow the egress from SLO. Similar to S1PR1, S1PR2 can be indeed internalized upon stimulation with agonists (31). In zebrafish, the miles apart mutant, S1PR2 R150H alters the migration of cardiac precursor cells to the midline, a phenomenon due to constitutive desensitization and internalization of S1PR2 (32). CXCL12 is highly expressed in the medullar region of LN (29) and may also contribute to promote entry of memory T cells into lymphatic vessels.

S1PR2 has been previously shown to contribute to accumulation of germinal center B cells in the central region of the mouse follicle [Wang et al. (6); Green et al. (9)]. Sic et al. (19) also showed that human tonsil germinal center and plasma B cells spontaneous migration was inhibited by S1P. As these cells express high levels of S1PR2, this was likely to be mediated by S1PR2, although this point required formal testing. Likewise, S1PR2 was shown to be critical for mouse follicular helper T cell retention in germinal centers (33) and in the proper localization of osteoclast precursors in the bone (8). S1PR2 also inhibits migration in many nonhematopoietic cell types, including vascular endothelial and smooth muscle cells as well as tumor cells (7). Our findings therefore corroborate prior reports suggesting counterbalancing roles of S1PR1 and S1PR2, and suggest that the antagonism between S1PR1 and S1PR2 is also important to control the distribution of naive and memory T cells in human. Previous studies suggest that S1PR2 usually inhibits S1PR1 signaling by activating Rho and inhibiting Rac (34–36). S1PR1 is also known to signal through Akt (36), an event that has been coupled to S1P responsiveness and actin polymerization in human T cells (37).

The S1PR2 receptor plays important roles in the physiology of several tissues and organs, and thus, a therapeutic application of S1PR2 antagonists or allosteric modulators will inevitably cause adverse effects if given systemically. However, local targeting of S1PR2 may alleviate symptoms induced by overt T cell reactions, in the context of various inflammatory, allergic, or autoimmune syndromes.

Acknowledgments

We acknowledge the contribution of SFR Biosciences (UMS3444/CNRS, ENSL, UCBL, US8/INSERM) facilities, in particular the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris, and the flow cytometry facility.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Sallusto, F., D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401: 708–712.
- Thome, J. J., N. Yudanin, Y. Ohmura, M. Kubota, B. Grinshpun, T. Sathaliyawala, T. Kato, H. Lerner, Y. Shen, and D. L. Farber. 2014. Spatial map of human T cell compartmentalization and maintenance over decades of life. *Cell* 159: 814–828.
- Mueller, S. N., T. Gebhardt, F. R. Carbone, and W. R. Heath. 2013. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu. Rev. Immunol.* 31: 137–161.
- Steinert, E. M., J. M. Schenkel, K. A. Fraser, L. K. Beura, L. S. Manlove, B. Z. Igyártó, P. J. Southern, and D. Masopust. 2015. Quantifying memory CD8 T cells reveals regionalization of immunosurveillance. *Cell* 161: 737–749.
- Cyster, J. G., and S. R. Schwab. 2012. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 30: 69–94.
- Wang, W., M. H. Graeler, and E. J. Goetzl. 2005. Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration. *FASEB J.* 19: 1731–1733.
- Blankenbach, K. V., S. Schwalm, J. Pfeilschifter, and D. Meyer Zu Heringdorf. 2016. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 antagonists: therapeutic potential and potential risks. *Front. Pharmacol.* 7: 167.
- Ishii, M., J. Kikuta, Y. Shimazu, M. Meier-Schellersheim, and R. N. Germain. 2010. Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. *J. Exp. Med.* 207: 2793–2798.
- Green, J. A., K. Suzuki, B. Cho, L. D. Willison, D. Palmer, C. D. Allen, T. H. Schmidt, Y. Xu, R. L. Proia, S. R. Coughlin, and J. G. Cyster. 2011. The sphingosine 1-phosphate receptor S1P2 maintains the homeostasis of germinal center B cells and promotes niche confinement. *Nat. Immunol.* 12: 672–680.
- Mandala, S., R. Hajdu, J. Bergstrom, E. Quackenbush, J. Xie, J. Milligan, R. Thornton, G.-J. Shi, D. Card, C. Keohane, et al. 2002. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 296: 346–349.
- Brinkmann, V., M. D. Davis, C. E. Heise, R. Albert, S. Cottens, R. Hof, C. Bruns, E. Prieschl, T. Baumruker, P. Hiestand, et al. 2002. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* 277: 21453–21457.
- Shiow, L. R., D. B. Rosen, N. Brdicová, Y. Xu, J. An, L. L. Lanier, J. G. Cyster, and M. Matloubian. 2006. CD69 acts downstream of interferon- α /beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* 440: 540–544.
- Mackay, L. K., A. Braun, B. L. Macleod, N. Collins, C. Tebartz, S. Bedoui, F. R. Carbone, and T. Gebhardt. 2015. Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention. *J. Immunol.* 194: 2059–2063.
- Matloubian, M., C. G. Lo, G. Cinamon, M. J. Lesneski, Y. Xu, V. Brinkmann, M. L. Allende, R. L. Proia, and J. G. Cyster. 2004. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427: 355–360.
- Pham, T. H., T. Okada, M. Matloubian, C. G. Lo, and J. G. Cyster. 2008. S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by G α i-coupled receptors to promote T cell egress. *Immunity* 28: 122–133.
- Lo, C. G., Y. Xu, R. L. Proia, and J. G. Cyster. 2005. Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. *J. Exp. Med.* 201: 291–301.
- Arnon, T. I., Y. Xu, C. Lo, T. Pham, J. An, S. Coughlin, G. W. Dorn, and J. G. Cyster. 2011. GRK2-dependent S1PR1 desensitization is required for lymphocytes to overcome their attraction to blood. *Science* 333: 1898–1903.
- Resop, R. S., M. Douaisi, J. Craft, L. C. Jachimowski, B. Blom, and C. H. Uittenboogaart. 2016. Sphingosine-1-phosphate/sphingosine-1-phosphate receptor 1 signaling is required for migration of naive human T cells from the thymus to the periphery. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138: 551–557.e8.
- Sic, H., H. Kraus, J. Madl, K.-A. Flittner, A. L. von Münchow, K. Pieper, M. Rizzi, A.-K. Kienzler, K. Ayata, S. Rauer, et al. 2014. Sphingosine-1-phosphate receptors control B-cell migration through signaling components associated with primary immunodeficiencies, chronic lymphocytic leukemia, and multiple sclerosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134: 420–428.
- Mehling, M., V. Brinkmann, J. Antel, A. Bar-Or, N. Goebels, C. Vedrine, C. Kristofic, J. Kuhle, R. L. P. Lindberg, and L. Kappos. 2008. FTY720 therapy exerts differential effects on T cell subsets in multiple sclerosis. *Neurology* 71: 1261–1267.
- Vaessen, L. M. B., N. M. van Besouw, W. M. Mol, J. N. Ijzermans, and W. Weimar. 2006. FTY720 treatment of kidney transplant patients: a differential effect on B cells, naïve T cells, memory T cells and NK cells. *Transpl. Immunol.* 15: 281–288.
- Pinschewer, D. D., V. Brinkmann, and D. Merkler. 2011. Impact of sphingosine 1-phosphate modulation on immune outcomes. *Neurology* 76(8, Suppl. 3): S15–S19.
- Song, Z.-Y., R. Yamasaki, Y. Kawano, S. Sato, K. Masaki, S. Yoshimura, D. Matsuse, H. Murai, T. Matsushita, and J. Kira. 2015. Peripheral blood T cell dynamics predict relapse in multiple sclerosis patients on fingolimod. *PLoS One* 10: e0124923.
- Walzer, T., L. Chiosone, J. Chaix, A. Calver, C. Carozzo, L. Garrigue-Antar, Y. Jacques, M. Baratin, E. Tomasello, and E. Vivier. 2007. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat. Immunol.* 8: 1337–1344.
- Jenne, C. N., A. Enders, R. Rivera, S. R. Watson, A. J. Bankovich, J. P. Pereira, Y. Xu, C. M. Roots, J. N. Beilke, A. Banerjee, et al. 2009. T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. *J. Exp. Med.* 206: 2469–2481.
- Carlson, C. M., B. T. Endrizzi, J. Wu, X. Ding, M. A. Weinreich, E. R. Walsh, M. A. Wani, J. B. Lingrel, K. A. Hogquist, and S. C. Jameson. 2006. Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature* 442: 299–302.
- Skon, C. N., J.-Y. Lee, K. G. Anderson, D. Masopust, K. A. Hogquist, and S. C. Jameson. 2013. Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* 14: 1285–1293.
- Balabanian, K., E. Brodin, V. Biais, L. Bouchet-Delbos, E. Lainey, O. Fenneteau, D. Bonnet, L. Fiette, D. Emilie, and F. Bachelier. 2012. Proper desensitization of CXCR4 is required for lymphocyte development and peripheral compartmentalization in mice. *Blood* 119: 5722–5730.
- Hargreaves, D. C., P. L. Hyman, T. T. Lu, V. N. Ngo, A. Bidgol, G. Suzuki, Y. R. Zou, D. R. Littman, and J. G. Cyster. 2001. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J. Exp. Med.* 194: 45–56.
- Kihara, A. 2014. Sphingosine 1-phosphate is a key metabolite linking sphingolipids to glycerophospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1841: 766–772.
- Orr Gandy, K. A., M. Adada, D. Canals, B. Carroll, P. Roddy, Y. A. Hannun, and L. M. Obeid. 2013. Epidermal growth factor-induced cellular invasion requires sphingosine-1-phosphate/sphingosine-1-phosphate 2 receptor-mediated ezrin activation. *FASEB J.* 27: 3155–3166.
- Burczyk, M., M. D. Burkhalter, T. Blättle, S. Matysik, M. G. Caron, L. S. Barak, and M. Philipp. 2015. Phenotypic regulation of the sphingosine 1-phosphate receptor miles apart by G protein-coupled receptor kinase 2. *Biochemistry* 54: 765–775.
- Moriyama, S., N. Takahashi, J. A. Green, S. Hori, M. Kubo, J. G. Cyster, and T. Okada. 2014. Sphingosine-1-phosphate receptor 2 is critical for follicular helper T cell retention in germinal centers. *J. Exp. Med.* 211: 1297–1305.
- Okamoto, H., N. Takuwa, T. Yokomizo, N. Sugimoto, S. Sakurada, H. Shigematsu, and Y. Takuwa. 2000. Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol. Cell. Biol.* 20: 9247–9261.
- Takashima, S., N. Sugimoto, N. Takuwa, Y. Okamoto, K. Yoshioka, M. Takamura, S. Takata, S. Kaneko, and Y. Takuwa. 2008. G12/13 and Gq mediate S1P2-induced inhibition of Rac and migration in vascular smooth muscle in a manner dependent on Rho but not Rho kinase. *Cardiovasc. Res.* 79: 689–697.
- Sanchez, T., and T. Hla. 2004. Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J. Cell. Biochem.* 92: 913–922.
- Mudd, J. C., P. Murphy, M. Manion, R. Debernardo, J. Hardacre, J. Ammori, G. A. Hardy, C. V. Harding, G. H. Mahabaleswar, M. K. Jain, et al. 2013. Impaired T-cell responses to sphingosine-1-phosphate in HIV-1 infected lymph nodes. *Blood* 121: 2914–2922.

Blood T cells

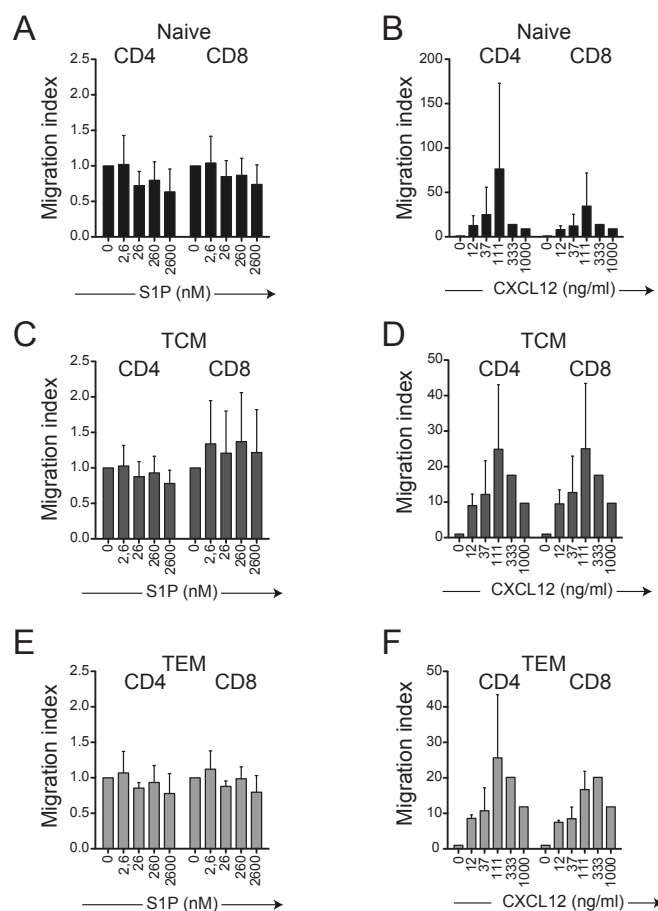


Figure S1: Human blood T cell subsets are not responsive to S1P

Transwell assays of the migration of blood T cell subsets assessing movement toward different concentrations of S1P or CXCL12 as indicated. T cell subsets were defined as shown in figure 1. Results are presented as migration index and are the mean $\pm$ SD of six experiments with N=6 donors for S1P studies and N=2 donors for CXCL12 studies.

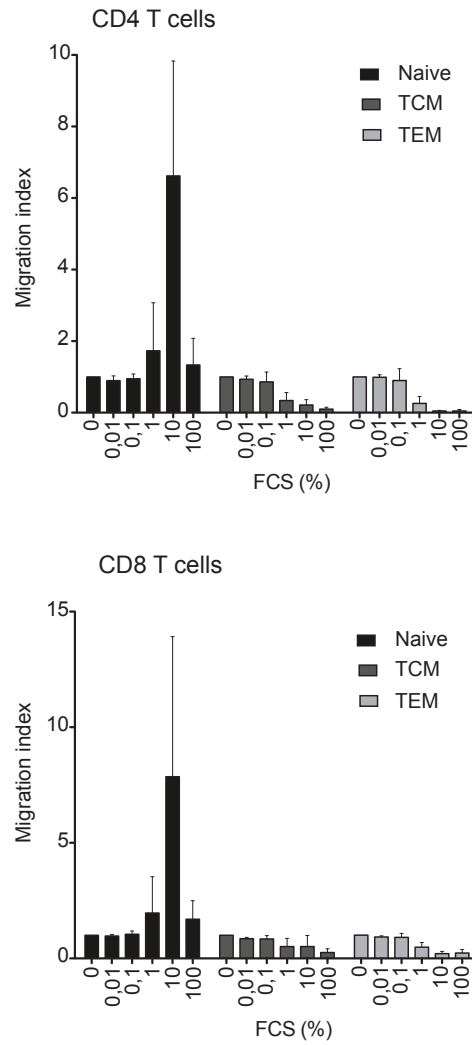


Figure S2: Opposite migratory responses of tonsil naïve and memory T cells to FCS
Transwell assays of the migration of blood T cell subsets assessing movement toward different concentrations of FCS as indicated. T cell subsets were defined as shown in figure 1. Results are presented as migration index and are the mean $\pm$ SD of four experiments with N=4 donors.

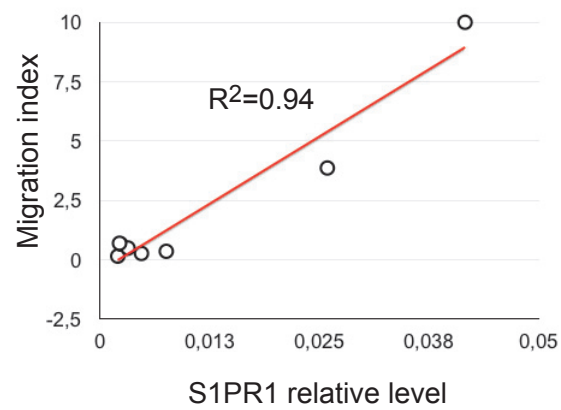


Figure S3: The migration induced by S1P is highly correlated with the level of S1PR1 mRNA expression in tonsil T cell subsets
Graph showing the migration index of T cell subsets at 37nM S1P in relation with the S1PR1 mRNA relative expression as measured by Q-PCR.

II – Étude *in vitro* de l'antagonisme entre S1PR1 et S1PR2 dans la migration lymphocytaire

Dans le premier article, nous avons mis en évidence l'existence potentielle d'un antagonisme fonctionnel entre S1PR1 et S1PR2 dans la réponse migratoire des lymphocytes T humains des amygdales en réponse au S1P. Cependant, nos résultats reposent sur l'utilisation d'inhibiteurs dont la spécificité peut être remise en question, en particulier le JTE013. De ce fait, nous avons voulu confirmer ces résultats avec une approche génétique, en utilisant une lignée cellulaire humaine. Le deuxième article présente le modèle *in vitro* mis en place pour étudier l'antagonisme entre S1PR1 et S1PR2, ainsi que les expérimentations réalisées dans ce cadre.

2.1 Article 2

État de l'art :

- Le S1P est essentiel à la sortie des lymphocytes T des OLS.
- Dans les amygdales humaines, les lymphocytes T naïfs et mémoires expriment les mêmes niveaux d'ARNm pour *S1PR2* et *S1PR4*. En revanche, l'expression de *S1PR1* est diminuée avec la différenciation en lymphocyte T mémoire.
- Chez l'homme, S1PR1 induit la migration des lymphocytes T naïfs d'amygdale *ex vivo*, alors que S1P inhibe la migration des lymphocytes T mémoires d'une façon qui pourrait être dépendante de S1PR2. Il semble donc exister un antagonisme fonctionnel entre S1PR1 et S1PR2 dans la réponse migratoire au S1P.
- La plupart des études se focalisent sur S1pr1 dans les lymphocytes T naïfs murins, et les connaissances relatives à l'homme, à S1PR2 et/ou aux lymphocytes T mémoires sont à ce jour limitées.

Objectif :

- Étudier les caractéristiques de S1PR1 et S1PR2 humains pour mieux comprendre leur rôle individuel et combiné dans la migration des lymphocytes T.

Principaux résultats :

- Génération d'un modèle *in vitro* de lignées cellulaires T surexprimant S1PR1 ou S1PR2, tagués en N-terminal avec un peptide FLAG.
- S1PR2 est plus sensible à l'internalisation par le S1P que S1PR1. Pour les deux récepteurs, l'internalisation est très rapide, alors que l'externalisation est beaucoup plus lente.
- La surexpression de S1PR1 augmente la migration médiée par le S1P des Jurkat. La surexpression de S1PR2 augmente la migration spontanée des Jurkat,

diminue la migration à faible dose de S1P, et l'augmente fortement à forte dose.

- S1PR2 pourrait stimuler indirectement la migration médiée par S1PR1.

Impacts :

- La balance entre les niveaux de S1PR1 et S1PR2 contrôle la migration des lymphocytes T humains.
- La fonction inhibitrice de migration de S1PR2 pourrait finalement être plus nuancée que ce que les études *ex vivo* laissaient penser.
- Ce modèle pourrait permettre d'étudier également le rôle des autres S1PR, individuel et combiné.

S1PR1 and S1PR2 regulate in opposite ways spontaneous and S1P-induced human T cell migration

Antoinette Neyra¹, Annabelle Drouillard¹, Luise Roser¹, Fabien Crauste², Anne-Laure Mathieu¹, Michelle Ainouze¹, Emmanuel Bachy³, Laurent Genestier³, Antoine Marçais¹ and Thierry Walzer¹

¹CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Univ Lyon, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, F-69007 Lyon, France

² Université de Paris, MAP5, CNRS, F-75006, France

³ CRCL, Centre de Recherche sur le Cancer de Lyon, INSERM U1052 - CNRS UMR5286, Centre Léon Bérard, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

Contact / corresponding author:

Thierry Walzer

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)

INSERM U1111 – CNRS UMR5308, Université Lyon 1, ENS de Lyon

21 Avenue Tony Garnier - 69365 LYON cedex 07, France

Tel +33 (0)437 28 23 73. Fax: +33 (0)437 28 23 41 E-mail: thierry.walzer@inserm.fr;

Abstract

Sphingosine-1 phosphate (S1P) is a major regulator of T cell recirculation, favoring egress from different tissues. The response to S1P is mediated by S1P receptors (S1PR) that are expressed in a combinatorial manner in T cells. S1PR1 is known to be the main chemotactic S1PR in naïve T cells while S1PR2 was proposed to act as an antagonist of S1PR1, favoring tissue retention of memory or unconventional T cell subsets. To examine this point further, we studied the impact of S1PR1 and/or S1PR2 overexpression on the migratory response of the human T cell line Jurkat. We also used mathematical modeling to describe the migration of S1PR1 and S1PR2 expressing cells. Our results show that S1PR1 and S1PR2 regulated the response of Jurkat T cells in opposed ways ie S1PR1 decreased spontaneous T cell migration but increased T cell migration at low S1P doses, while S1PR2 had the reciprocal effect. The effect of S1PR1 was strongly attenuated by S1PR2 overexpression, clearly showing that S1PR2 acts antagonistically to S1PR1. As S1PR2 is more rapidly internalized than S1PR1, it could act as a transient antagonist, slowing down the response induced by S1PR1. This process could prolong residency of S1PR1 expressing naïve and memory T cells within secondary lymphoid organs during their recirculation, and favor tissue retention of S1PR1 negative resident memory T cells.

Introduction

Sphingosine-1 phosphate (S1P) is a lysophospholipid that binds five G protein-coupled receptors (S1PR1-5) and mediates a wide range of effects on different cell types, both intracellularly and extracellularly [1]. S1P is not soluble in aqueous solutions and is carried in the body fluids by albumin and high-density lipoproteins. S1P concentration is regulated by different enzymes and is kept at high levels in the blood and lymph and at low levels within tissues [2]. S1P gradients are essential for lymphocyte migration, as shown by different studies in mouse where those gradients were disrupted by deleting genes encoding for enzymes involved in synthesis or degradation of S1P [3] or for S1P transporters [4], or by treating mice with pharmacological inhibitors of these enzymes [5]. S1P-mediated migration of lymphocytes such as T cells is a complex phenomenon as all five S1P receptors (S1PR) are expressed in a combinatorial manner in lymphocyte subsets, and the migratory response to S1P of a given subset therefore results from the integration of signals emanating from several receptors. How combinatorial expression of S1PR regulates the response to S1P is however poorly understood, even though there is ample information on the features of each receptor.

S1PR1 mediates T cell egress from primary and secondary lymphoid organs to the blood or to the efferent lymph, by sensing S1P gradients [2]. S1PR1 is coupled to G α i- and its engagement induces a series of signaling events such as Rac activation and actin cytoskeleton rearrangement leading to T cell migration [6]. S1PR1-mediated T cell migration is regulated at different levels. Firstly, at the transcriptional level, S1PR1 is under the control of the KLF2 transcription factor, whose expression is down regulated in recently activated T cells, and in memory T cell subsets such as tissue-resident memory T cells (Trm) [7]. Down regulation of S1PR1 is thought to contribute in a major way to tissue residency [8]. Secondly, the membrane protein CD69 can physically interact with S1PR1, leading to its functional inhibition and internalization. CD69 is rapidly induced upon T cell activation or type I IFN signaling thereby inducing the sequestration of T cells within lymphoid organs [9]. Thirdly, S1PR1 expression is rapidly internalized upon ligand binding. This internalization is induced by the GRK2 kinase that phosphorylates S/T residues in the C-terminal intra-cytoplasmic portion of S1PR1 [10].

S1PR2 is the only S1P receptor coupled to G12/G13 and signals via Rho [11]. S1PR2 is insensitive to the effect of FTY720, a supra agonist for all other S1P receptors that induces their internalization [12],[13]. S1PR2 has been shown to mediate chemorepulsion and antagonize S1PR1 signaling in mouse osteoclast precursors [14] or germinal center B cells [15], a process important for their proper localization. S1PR2 has also been shown to regulate T cell migration indirectly by regulating lymphatic permeability [16]. Moreover, we recently reported that S1P inhibited the spontaneous or chemokine-induced migration of human tonsil effector memory T cells and resident memory T cells, in a manner seemingly dependent on S1PR2. Indeed, a short treatment with the S1PR2 antagonist JTE-013 could alleviate S1P-mediated inhibition of migration. These data led us to propose that the relative amount of S1PR1 and S1PR2 controlled T cell migratory behavior and the impact of S1P on tissue residency vs recirculation [17]. A recent study in mouse corroborated this model by showing a reduced number of mouse $\gamma\delta$ T cells in the skin in the absence of both CD69 and S1PR2, further suggesting that CD69 and S1PR2 cooperate to promote tissue retention of T cell subsets [18].

However, S1PR2 expression is not restricted to resident memory T cell subsets, but rather broadly expressed in all T cell subsets, including naïve T cells, raising questions about the impact of S1PR1/S1PR2 co-expression on T cell migratory behavior. In particular, it remains unclear if S1PR1 simply acts dominantly on S1PR2, or if the co-expression of both receptors changes the parameters of S1PR1-mediated migration. These questions are difficult to address using human primary cells that cannot be easily manipulated. For this reason, we set up a well-controlled in vitro system, taking advantage of Jurkat cells to study how S1PR1 and S1PR2 changed the migratory behavior of T cells in response to S1P and the consequences of co-expression of both receptors.

Material and Methods

Cell lines, culture and treatments

T and B cells were cultured in RPMI 1640 GlutaMAX medium (Gibco, Carlsbad, CA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Dutscher, Brumath, France), 100 U/mL of penicillin/streptomycin (P/S) (Gibco, Carlsbad, CA) and 10 mM of hepes (Gibco, Carlsbad, CA), excepted DERL-2 cells that were cultured in RPMI 1640 GlutaMAX medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 100 U/mL of penicillin/streptomycin, 10 mM of hepes and 100 ng/μl recombinant human IL-2 (Peprotech, London, UK). NK92 cells were cultured in RPMI 1640 GlutaMAX medium supplemented with FCS, 100 U/mL of penicillin/streptomycin, 10 mM of hepes, 1 mM of sodium-pyruvate (Gibco, Carlsbad, CA), 50 μM of 2-mercaptoethanol (Gibco, Carlsbad, CA), and 10 % murine IL-2 derived from the supernatant of the murine T lymphoma cell line EL4. Prior to utilization, EL4 supernatant was centrifuged and sterile filtered. All cell lines were incubated at 37°C with 5% CO₂ in upright positioned flasks, excepted for HuT102 cells that were cultured in horizontal position. For subculture, semi-adherent HuT102 cell supernatant was collected. Adherent cells were washed with 1 mL of DPBS 1X (Gibco, Carlsbad, CA) and dissociated with 1 mL of Trypsin (Gibco, Carlsbad, CA) during 3 min at 37 °C. Then, 1 mL of medium was added to stop the reaction. Trypsinized cells and supernatant were centrifuged at 1500 rpm for 5 min and resuspended. For all cells, cell suspension was diluted at 1:5 (NK92 and DERL-2 cells) or 1:10 (all other cell lines) in fresh medium.

RNA extraction and Quantitative RT-PCR

Cell lines were expanded the day prior to RNA extraction to assure they were in a proliferative phase. Cell line RNA was extracted with the Direct-Zol RNA MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA) according to the manufacturer's protocol. cDNA was generated with the High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) according to the manufacturers' protocol in a PCR Cycler (Eppendorf), with the following steps : 60 min at 37 °C, 5 min at 95 °C, then cooled until 4 °C. PCR was carried out with a SybrGreen-based kit (FastStart Universal SYBR Green Master, Roche, Basel, Switzerland) on a StepOne plus

instrument (Applied biosystems, Carlsbad, USA) with the following primers : S1PR1 (forward) 5'-AACTTCGCCCTGCTTGAG-3', S1PR1 (reverse) 5'-TCCAGGCTTTTGTGTAGCTT-3', S1PR2 (forward) 5'-CCACTCGGCAATGTACCTGT-3', S1PR2 (reverse) 5'-ACGCCTGCCAGTAGATCG-3', S1PR3 (forward) 5'-GCAGGCAACCTCCTCTCAT-3', S1PR3 (reverse) 5'-GAAAAAGCAGCCAAGTTCCA-3', S1PR4 (forward) 5'-AATGGGCTTCCCATGGTC-3', S1PR4 (reverse) 5'-CAGGGTGCTCTGCTCCTA-3', S1PR5 (forward) 5'-CCACGACTGTCTTCCCAAGT-3', S1PR5 (reverse) 5'-ATTTCCCCTGCATCTTTTCC-3', β Actin (forward) 5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3', β Actin (reverse) 5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'.

Chemotaxis assays

Chemotaxis assays were performed on 96 well transwell plates (Corning, Cambridge, USA) with 8 μ m pore-width polycarbonate filters. Cells, inhibitors and chemoattractants were resuspended in chemotaxis medium (culture medium without FCS (see "Cell lines" section) supplemented with 4 mg/mL of fatty acid free BSA (Sigma, St-Louis, USA)). 2.10^5 cells on 75 μ L of chemotaxis medium were incubated 2h at 37°C and 5% CO₂ in transwell plate top chamber, with FTY720 (Sigma, St-Louis, USA) at indicated concentrations or chemotaxis medium. 235 μ L of chemotaxis medium alone or supplemented with S1P (Tocris, Bristol, UK) or CXCL12 (Bio-Techne, Minneapolis, Minnesota) at indicated concentrations were then added in lower chamber. Cells were allowed to migrate for 2h at 37°C. Transmigrated cells were stained with anti-DYKDDDDK (Biolegend, San Diego, CA, clone L5) and LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR (Invitrogen, Carlsbad, CA) and counted by flow cytometry (MACSquant, Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Results were analyzed on FlowJo software. The migration index was calculated as the ratio between the number of cells migrating in the S1P (or CXCL12) condition and the number of cells migrating in the control (medium only) condition, as measured by flow cytometry. The percentage of input was calculated as the ratio between the number of cells migrating in a given condition and the number of cells used for the chemotaxis assay.

For multiplexed cell chemotaxis, Jurkat WT and Jurkat transduced for S1PR-FLAG were barcoded with anti-CD45 antibodies from Biolegend (San Diego, CA, clone 2D1) or BD

Biosciences (San Jose, CA, clone HI30), then washed and pooled at equal ratios, and 5.10^5 cells were put on the top chamber.

Internalization/externalization studies

Cells were pre-incubated overnight in culture medium without FCS (see “Cell lines” section), alone (internalisation experiments) or supplemented with 4 mg/mL of fatty acid free BSA and 333 nM of S1P (externalisation experiments). The day of the experiment, cells were incubated either in medium alone (externalisation experiments) or supplemented with fatty acid free BSA and the indicated concentration of S1P during different times. Then, cells were stained with anti-DYKDDDDK and LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR. Datas were analyzed by flow cytometry and with the FlowJo software.

Lentiviral transduction

Lentiviral particle production

Human S1PR-Tango plasmids were purchased from Addgene (Kroeze et al, 2015). S1PR optimized coding sequences were amplified from the plasmids by PCR with the Phusion High Fidelity kit (New England Biolabs, Evry, France) with the following primers : S1PR1 (forward) 5'-GCGCTTAATTAAACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGGACCAACATCAGTCCCATT-3', S1PR1 (reverse) 5'-GCGCACGCGTTCAGCTTGAGCTATTACATTACCACTACTCATAATTGTTTC-AGG-3', S1PR2 (forward) 5'-GCGCTTAATTAAACCATGGATTACAAGGATGACGACGAT-AAGGGCTCACTTTACAGTGAATACC-3', S1PR2 (reverse) 5'-GCGCACGCGTTCACACGACGGTG-TTGCCCT-3'. PCR products were purified with the Nucleospin Gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). PCR products and the pRRSIN-MND-IRES2-ZsGreen-WPRE lentiviral plasmid (Vect'UB, TBMCore, Bordeaux) were digested overnight at 37°C with MluI-HF and PacI (New England Biolabs, Evry, France), purified, and ligated 1h with T4 DNA ligase (Promega, Madison, Wisconsin) at a ratio vector/insert 1:6. 50 µL of JM109 competent bacteria (Promega, Madison, Wisconsin) were then added to 2 µL of ligation product, let 30 min on ice, transformed for 45 sec at 42°C and immediately put on ice for 5 min. 300 µL of S.O.C. medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) was added before bacteria were incubated at 37°C for 1h with shaking. Bacteria were seeded on Petri dishes with LB agar medium

supplemented with 100 ng/mL of ampicillin (Sigma) to grow overnight. Clones were amplified on liquid LB medium at 37°C with shaking overnight and plasmids were extracted with NucleoBond Xtra Maxi kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Lenviral particles were produced by AniRA Vectorologie (Lyon) from the plasmids.

Cell line transduction with lentiviral particles

Cells were transduced at MOI 1 by adding lentiviral particles and 8 µg/mL of polybrene (Sigma, St-Louis, USA) to cell culture. After three days, cells were stained with anti-DYKDDDDK and LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR and ZsGreen expression was assessed by flow cytometry (MACSQuant, Miltenyi Biotec).

Statistical analysis

Statistical analysis were performed using parametric or nonparametric tests (Friedman test or ANOVA) run on Prism 7 (GraphPad) software. Data normality was tested with Shapiro-Wilk test prior to analysis. Levels of significance are expressed as p values (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

Mathematical modeling.

The migration rate of Jurkat cells from the upper to the lower chamber is assumed to depend in a polynomial way on the S1P concentration, [S1P]. This is the simplest and more straightforward way of accounting for a dependency of the migration rate on the S1P concentration while estimating a minimum number of parameter values. We consider migration rates in the form of

$$D = d_0 + d_1[S1P] + d_2[S1P]^2 + d_3[S1P]^3,$$

where values of parameters d_0 , d_1 , d_2 and d_3 have to be estimated.

For each condition the simplest (lowest degree) polynomial function is fitted to the data, by minimizing weighted least squares, that is

$$\text{Min} \left(\frac{\text{Model's output} - \text{Mean experimental value}}{\text{Standard deviation}} \right)^2.$$

Experimental values (Mean $\pm$ SD) are given in Figure 3A for each condition, and the model's output is the percentage of the initial cell population that migrated to the lower chamber,

$$100(1 - \exp(-2D)).$$

Table S1 shows estimated parameter values.

Table S1

	Parameters of the migration rate $D = d_0 + d_1[\text{S1P}] + d_2[\text{S1P}]^2 + d_3[\text{S1P}]^3$			
	d_0 (nM.h ⁻¹)	d_1 (h ⁻¹)	d_2 (nM ⁻¹ .h ⁻¹)	d_3 (nM ⁻² .h ⁻¹)
Untouched	0.0068	0.0119	-0.0031	0
S1PR1	0.003	0.0328	-0.0085	0
S1PR2	0.0172	-0.0577	0.0453	-0.0081

Results

The Jurkat cell line as a model to study S1P-mediated migration

We searched for a good cellular model to study cell migration in response to S1P and the role of S1PR1 and S1PR2 in this process. We reasoned that such a cell line should express both receptors and associated signaling machinery and be able to migrate in a chemotaxis chamber in response to S1P. We screened a variety of human lymphocytic cell lines for their S1PR expression and for their responsiveness to S1P in vitro. The expression of S1PR was measured at the mRNA level by RT-QPCR. The different cell lines expressed various combinations of S1PR receptors, with S1PR2 and S1PR4 being usually more expressed than the others while S1PR5 was hardly detected (Figure 1A). For the migration assay, we used a simple transwell system, as previously published, that we adapted for cell lines that have a bigger size than primary cells, by using filters with 8 μ m pores. Cell migration was evaluated by counting migrated cells by flow cytometry. Results in Figure 1B show that several of the T cell lines we used responded to S1P gradients by migrating to the lower chamber of the transwell system, including the Jurkat and HuT102 T cell lines and the SU-DHL-4 B cell line. S1P-mediated migration in cell lines correlated positively with S1PR1 expression ($r=0,758$, $p=0,015$, Spearman test) but not with the other receptors. We excluded the HuT102 because it is transformed by HTLV-1. We then selected the Jurkat cell line because it grew very well and its response to S1P was more robust than that of SU-DHL-4 cells (Figure 1C). We confirmed the role of S1PR1 in S1P-mediated Jurkat T cell migration by using the S1PR1 functional antagonist FTY720 (Figure 1D).

S1PR1 and S1PR2 are internalized by similar doses of S1P but S1PR2 is more rapidly internalized

To study the response of S1PR1 and S1PR2 in Jurkat T cells, we expressed N-terminal tagged versions of each receptor in these cells by means of lentiviral transduction. Lentiviral vectors expressed ZsGreen as reporter gene allowing the identification of transduced cells (Figure 2A). N-terminal tagging was the only option to measure surface levels of S1PR1/2, and the Flag tag did not influence the response to S1P (data not shown). The Flag tag was detectable on the cell surface, at a level proportional to that of the reporter gene (Figure 2A). The expression of ZsGreen positive Jurkat cells gradually decreased over time in culture (Figure 2B), suggesting a negative impact of S1PR1/2 overexpression on cell viability, even though this effect was rather slow.

We compared S1P-mediated internalization of S1PR1 and S1PR2 in Jurkat cells. To this aim, we first deprived transduced cells of serum overnight and then incubated them with graded concentrations of S1P. Results in Figure 2C indicate a similar sensitivity of S1PR1 and S1PR2 to S1P, as comparable doses of S1P induced their internalization. We then compared the kinetics of receptor internalization at a saturating dose of S1P. Results in Figure 2D show that S1PR2 was internalized in a faster way than S1PR1, with about 5-10 minutes being sufficient to internalize 50% of cell surface S1PR2 and near 30 minutes for S1PR1. S1PR2 internalization was also almost complete (about 85%) after 15 minutes while 2 hours were required to reach a similar level of S1PR1 internalization. These data suggest that both receptors signal upon initial exposure of T cells to S1P but that S1PR1 signaling becomes rapidly predominant upon internalization of S1PR2. We then analyzed receptor recycling following internalization. Transduced cells were exposed to saturating doses of S1P overnight, and then cultured in the absence of S1P for different periods, afterwards S1PR1 and S1PR2 expression were measured. Results presented in Figure 2E show a similar kinetics of S1PR1 and S1PR2 re-expression on the cell surface in these conditions. Of note, this process was slow, as 6 hours were required to reach maximal levels of each receptor.

S1PR1 and S1PR2 overexpression change migratory behavior of Jurkat cells in response to S1P

Next, we investigated the impact of S1PR1 or S1PR2 overexpression on Jurkat cell migration in response to graded doses of S1P. To minimize experimental variation between conditions, we used a barcoding system based on pre-staining with different anti-CD45 antibodies, allowing the simultaneous measurement of migration of the different modified cells by flow cytometry (Figure S1). ZsGreen negative cells were used as controls and ZsGreen highly positive were gated to test the impact of S1PR overexpression. Importantly, cells were incubated in the top chamber without S1P for 2 hours before the lower chamber was filled, to allow optimal expression of S1PR. Results of the migration assay were expressed either as percentage of input (Figure 3A) or as migratory index (Figure 3B), relative to the control condition without S1P. Several changes were induced by S1PR1 or S1PR2 expression. S1PR1 expression increased the percentage of input cells that migrated, especially at low S1P doses compared to control Jurkat. Reciprocally, S1PR1 decreased spontaneous migration ie the migration of cells without S1P in the lower chamber (Figure 3A). Accordingly, when we

expressed results as migratory index, S1PR1 induced a strong response at all S1P doses (Figure 3B). S1PR2 expression also changed the migratory response of Jurkat cells to S1P, ie it tended to inhibit migration at low S1P doses and to increase it at high S1P doses, thus shifting the dose response towards high S1P doses. Moreover, S1PR2 increased the spontaneous migration of Jurkat cells in the absence of S1P (Figure 3A). As a result, the migratory index of S1PR2-Jurkat cells showed a “sinusoidal” mode of migration with S1P-mediated inhibition at low doses and S1P-mediated activation of migration at high doses. This effect was specific to S1P as S1PR1 and S1PR2 did not significantly change the migration of Jurkat cells induced by CXCL12 (Figure 3C).

We then wanted to study the impact of S1PR1 and S1PR2 co-expression on S1P-mediated migration. To this aim, we transduced Jurkat cells with both S1PR1 (eCFP vector) and S1PR2 (ZsGreen vector). We then analyzed migration of double positive cells compared to single positive or double negative cells (see Figure S2 for gating strategy of the different populations). Single expression of S1PR1 and S1PR2 led to similar changes as observed in the previous experiments, with shifts in the migratory profile towards low S1P doses or high S1P doses, compared to non-transduced control cells respectively (Figure 3D-E), this phenomenon being particularly clear when looking at the migration index (Figure 3E). Co-expression of S1PR1 and S1PR2 endowed cells with a migratory response corresponding to the average of S1PR1 and S1PR2 actions (Figure 3D-E). This demonstrates the antagonistic relation between S1PR1 and S1PR2 on cell migration in response to S1P.

Mathematical modeling of migration behavior suggests a bimodal response of S1PR2 depending on S1P dose

Next, to understand better the properties of S1PR1 and S1PR2, we decided to model Jurkat cell migration in response to S1P for the different conditions in Figure 3A-B ie untouched cells, or overexpression of S1PR1 or S1PR2. Percentages of the initial cell population that migrated from the upper to the lower chamber in response to various concentrations of S1P have been mathematically computed by fitting data in Figure 3A and estimating parameter values defining the migration rates. Untouched and S1PR1-expressing cell populations are characterized by an optimal concentration of S1P for which migration is maximal (Figure 4A, black and blue curves, and Table S1). For Jurkat WT cells, the maximal percentage of input is around 3.6%, for 81 nM of S1P. For Jurkat S1PR1-FLAG cells the maximal percentage is higher,

around 6.7%, but it is reached for a very close dose of S1P, 84 nM. S1PR2-FLAG cell populations exhibit a more complex behavior: low concentrations of S1P inhibit the migration, therefore the S1P dose-dependent response of S1PR2-FLAG cells appears bimodal (Figure 4A, green curve). Maximal migration is consequently observed for S1PR2-FLAG cells for much higher concentrations of S1P (around 820 nM, maximal percentage equals 6.4%) and intermediary doses of S1P (<100 nM) inhibit cell migration. The maximal percentage of input is similar to the one of S1PR1-FLAG cells, but it requires approximately 10 times more S1P.

Additionally, Jurkat S1PR2-FLAG cells already exhibit a high (50% of the maximum) migration rate in the absence of S1P (Figure 4B). Their migration rate remains below 50% of its maximum for all doses of S1P associated to an increase of migration for Jurkat WT and S1PR1-FLAG cells up to their maximal values (doses < 100 nM). An increase of S1PR2-FLAG migration is only observed for higher doses of S1P, the same doses that inhibit migration for WT and S1PR1-FLAG cells. The S1P dose-dependent migration of S1PR1-FLAG and S1PR2-GLAD cells then exhibits opposite characteristics, potentially underlying specific stimulatory or inhibitory roles in T cell migrations.

Discussion

Here, we showed that ectopic expression of S1PR1 or S1PR2 in Jurkat T cells markedly changed their migratory behavior in response to S1P. S1PR1 shifted the dose response towards low S1P doses, and also inhibited their spontaneous migration. These data confirm the major function of S1PR1 as a chemotactic receptor for S1P in T cells [2]. Moreover, they suggest that in the absence of S1P, S1PR1 blocks random T cell motility. By contrast, S1PR2 expression in Jurkat cells enhanced spontaneous Jurkat migration and inhibited their migration at low S1P doses but increased their migration at high S1P doses. Mathematical modeling allowed us to describe more precisely the migratory behavior of Jurkat cells with or without S1PR1 and S1PR2. The migration model showed a deeper impact of S1PR2 over S1PR1, which was expected given the fact that S1PR1 is endogenously expressed by Jurkat cells and functional as shown by the impact of FTY720 on their migration to S1P. The high spontaneous migration and the inhibition of migration at low S1P doses conferred by S1PR2, as predicted by the model, is reminiscent of the migratory phenotype of effector and resident memory T cells that we previously described [17]. This correlation suggests an important role of S1PR2 in shaping the migratory response of memory T cell subsets towards S1P gradients. One could hypothesize that S1PR2 expression favors memory T cell tissue retention by inhibiting their response to S1P. Such a role has been proposed to contribute to skin residency of $\gamma\delta$ T cells in mouse [18]. We propose that S1PR2 could be involved in a much broader way in tissue residency of multiple lymphocyte subsets. Indeed, Immgen RNAseq data suggest that most lymphocyte subsets express S1PR2, and that $\gamma\delta$ T cells do not express this receptor at higher levels than conventional T cells, irrespective of their activation or differentiation status [19]. In fact, Immgen data suggest that among T cell subsets, S1PR2 is expressed at the highest level by resident memory T cells and by hepatic NKT cells, in correlation with markers of tissue residency such as Hobit [20] and CXCR6 (Figure S3). CD69 is also believed to act in a major way to promote tissue residency of T cells by inhibiting S1PR1 expression and function [9],[21]. Interestingly, S1PR2 and CD69 have been shown to cooperate to promote tissue residency of $\gamma\delta$ T cells in mouse [18]. However, many resident cell types such as NKT cells or developing thymocytes do not express CD69 (Immgen data). In these cell types, S1PR2 may be even more important to impose tissue residency. A careful study of the distribution of lymphocyte populations in S1PR2 deficient mice will be instrumental to address these questions.

Of note, S1PR2 is internalized at a more rapid rate than S1PR1. Thus, S1PR1 could theoretically signal after S1PR2 internalization in lymphocytes. The biological relevance of this phenomenon is unknown, but one could speculate that it could allow the migration of recirculating lymphocytes such as naïve T cells only in conditions of durable exposure to S1P in which S1PR1 would be optimally engaged after S1PR2 internalization. This would avoid constant reactions to low amplitude oscillations of S1P concentrations that might occur in vivo [22],[23]. S1PR2-mediated inhibition of S1PR1 action could be also important to help orient T cell migration towards the highest concentration of S1P. Indeed, in the three-dimensional cellular environment, multiple sources of S1P may be sensed simultaneously and S1PR2 may therefore help responding to the strongest signal. For S1PR1-expressing lymphocytes, S1PR2 could also increase the time of residency within lymphoid or non-lymphoid tissues by preventing egress as long as T cells are not in contact of very high S1P concentrations eg at the proximity of lymphatic endothelia[4],[24]. How S1PR2 inhibits S1PR1 signaling at low S1P doses was not addressed in our study. However, S1PR2 is known to signal via G12/13 that activates the small GTPase Rho while S1PR1 signaling involves Gi and Rac. Rac and Rho GTPases antagonize each other at multiple levels [25], to control cell polarization and orient migration, by coordinating protrusive and retractile activities. While subtle balances of Rho and Rac activation are needed in any cell type for guided migration, it is likely that excessive Rho activation via S1PR2 would inhibit migration.

Another interesting property conferred by S1PR2 is the high “spontaneous” migration, ie the migration of cells in the lower chamber of the transwell system in the absence of S1P or other chemotactic agent. This chemokine-independent motile phenotype conferred by S1PR2 could be important to confer an exploratory behavior to resident or circulating lymphocytes that could help them surveying tissues. In particular naïve T cells are known to spend about 24 hours within secondary lymphoid organs such as lymph nodes before exiting them via the lymphatic system [26]. During this transit, they scan antigen-presenting cells in search of their cognate antigen, and S1PR2 may be important to promote motility and help them scanning as many antigen-presenting cells as possible.

One limit of our in vitro approach with the Jurkat cell line is the endogenous expression of S1P receptors. We tried to knock out S1PR1, as it was the only S1P receptor apparently functional in this cell line, using the Crispr/Cas9 technology. However, we failed to obtain homozygous inactivation of S1PR1 alleles, which might be due to the known role of S1PR1 in preserving T cell viability via the control of mitochondrial function [24]. Other cell lines that did not express S1PR1 were tested in our model but they did not respond to S1P even when S1PR1 was expressed, suggesting that the mere expression of S1PR1 is not sufficient to confer responsiveness to S1P.

In conclusion, our data established a crosstalk between S1PR1 and S1PR2 signaling in T cells during S1P-mediated migration that could be relevant for different aspects of T cell physiology such as recirculation vs residency and activation by antigen-presenting cells. The S1PR family has been heavily targeted by the pharmaceutical industry [11],[27] and it can be hypothesized that S1PR2 antagonists may interfere with T cell function by hampering their migratory phenotype, which could be of interest for therapeutic purposes. Moreover, our study shows that co-expression of several S1P receptors may confer unanticipated migratory phenotypes. As S1PR are never expressed individually, more studies will be needed to understand the complex interactions that occur between receptors during cell migration.

References

1. **Cartier A, Hla T.** Sphingosine 1-phosphate: Lipid signaling in pathology and therapy. *Science*. 2019; **366**.DOI: 10.1126/science.aar5551.
2. **Cyster JG, Schwab SR.** Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 2012; **30**:69–94.DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-075011.
3. **Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, Camerer E, et al.** Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science*. 2007; **316**:8.
4. **Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, Sunden Y, et al.** The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J. Clin. Invest.* 2012; **122**:1416–1426.DOI: 10.1172/JCI60746.
5. **Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, et al.** Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*. 2004; **427**:60.
6. **Sanchez T, Hla T.** Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J Cell Biochem.* 2004; **92**:913–922.DOI: 10.1002/(ISSN)1097-4644.
7. **Sebzda E, Zou Z, Lee JS, Wang T, Kahn ML.** Transcription factor KLF2 regulates the migration of naive T cells by restricting chemokine receptor expression patterns. *Nat Immunol.* 2008; **9**:292–300.DOI: 10.1038/ni1565.
8. **Skon CN, Lee J-Y, Anderson KG, Masopust D, Hogquist KA, Jameson SC.** Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* 2013; **14**:1285–1293.DOI: 10.1038/ni.2745.
9. **Shiow LR, Rosen DB, Brdicková N, Xu Y, An J, Lanier LL, Cyster JG, et al.** CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature*. 2006; **440**:4.
10. **Arnon TI, Xu Y, Lo C, Pham T, An J, Coughlin S, Dorn GW, et al.** GRK2-dependent S1PR1 desensitization is required for lymphocytes to overcome their attraction to blood. *Science*. 2011; **333**:1898–1903.DOI: 10.1126/science.1208248.
11. **Blankenbach KV, Schwalm S, Pfeilschifter J, Meyer Zu Heringdorf D.** Sphingosine-1-Phosphate Receptor-2 Antagonists: Therapeutic Potential and Potential Risks. *Front. Pharmacol.* 2016; **7**:167.DOI: 10.3389/fphar.2016.00167.
12. **Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, Thornton R, et al.** Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science*. 2002; **296**:9.
13. **Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R, Bruns C, et al.** The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem.* 2002; **277**:7.
14. **Ishii M, Kikuta J, Shimazu Y, Meier-Schellersheim M, Germain RN.** Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. *J. Exp. Med.* 2010; **207**:2793–2798.DOI: 10.1084/jem.20101474.
15. **Green JA, Suzuki K, Cho B, Willison LD, Palmer D, Allen CDC, Schmidt TH, et al.** The sphingosine 1-phosphate receptor S1P₂ maintains the homeostasis of germinal center B cells and promotes niche confinement. *Nat. Immunol.* 2011; **12**:672–680.DOI: 10.1038/ni.2047.
16. **Xiong Y, Piao W, Brinkman CC, Li L, Kulinski JM, Olivera A, Cartier A, et al.** CD4 T cell sphingosine 1-phosphate receptor (S1PR)1 and S1PR4 and endothelial S1PR2 regulate afferent lymphatic migration. *Sci. Immunol.* 2019; **4**.DOI: 10.1126/sciimmunol.aav1263.

17. **Drouillard A, Neyra A, Mathieu A-L, Marçais A, Wencker M, Marvel J, Belot A, et al.** Human Naive and Memory T Cells Display Opposite Migratory Responses to Sphingosine-1 Phosphate. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2018; **200**:551–557.DOI: 10.4049/jimmunol.1701278.
18. **Laidlaw BJ, Gray EE, Zhang Y, Ramírez-Valle F, Cyster JG.** Sphingosine-1-phosphate receptor 2 restrains egress of $\gamma\delta$ T cells from the skin. *J. Exp. Med.* 2019; **216**:1487–1496.DOI: 10.1084/jem.20190114.
19. **Heng TSP, Painter MW, Immunological Genome Project Consortium.** The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nat. Immunol.* 2008; **9**:1091–1094.DOI: 10.1038/ni1008-1091.
20. **Mackay LK, Minnich M, Kragten NAM, Liao Y, Nota B, Seillet C, Zaid A, et al.** Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. *Science*. 2016; **352**:459–463.DOI: 10.1126/science.aad2035.
21. **Mackay LK, Braun A, Macleod BL, Collins N, Tebartz C, Bedoui S, Carbone FR, et al.** Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2015; **194**:2059–2063.DOI: 10.4049/jimmunol.1402256.
22. **Ramos-Perez WD, Fang V, Escalante-Alcalde D, Cammer M, Schwab SR.** A map of the distribution of sphingosine 1-phosphate in the spleen. *Nat. Immunol.* 2015; **16**:1245–1252.DOI: 10.1038/ni.3296.
23. **Fang V, Chaluvadi VS, Ramos-Perez WD, Mendoza A, Baeyens A, Rivera R, Chun J, et al.** Gradients of the signaling lipid S1P in lymph nodes position natural killer cells and regulate their interferon- γ response. *Nat. Immunol.* 2016.DOI: 10.1038/ni.3619.
24. **Mendoza A, Fang V, Chen C, Serasinghe M, Verma A, Muller J, Chaluvadi VS, et al.** Lymphatic endothelial S1P promotes mitochondrial function and survival in naive T cells. *Nature*. 2017; **546**:158–161.DOI: 10.1038/nature22352.
25. **Schaks M, Giannone G, Rottner K.** Actin dynamics in cell migration. *Essays Biochem.* 2019; **63**:483–495.DOI: 10.1042/EBC20190015.
26. **Rot A, von Andrian UH.** Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol.* 2004; **22**:928.
27. **Davis MD, Clemens JJ, Macdonald TL, Lynch KR.** Sphingosine 1-phosphate analogs as receptor antagonists. *J. Biol. Chem.* 2005; **280**:9833–9841.DOI: 10.1074/jbc.M412356200.

Figure legends

Figure 1: The Jurkat cell line as a model of study of S1P-induced migration

(A) RT-QPCR measurement of mRNA levels for the indicated S1P receptors in the indicated cell lines, relative to β -actin (housekeeping gene). N=1, representative of 2 experiments. (B) Percentage migration of different lymphocytic cell lines in a transwell system. Each dot corresponds to one experiment. Here are represented the control condition and the condition on which each cell line had the strongest (positive or negative) response. (C) Percentage migration of Jurkat and SU-DHL4 cells at different S1P doses. Mean $\pm$ SEM of ≥ 3 experiments. (D) Percentage migration of Jurkat cells incubated for 2h in the top chamber with the indicated inhibitor. N=1

Figure 2: Dynamics of cell surface S1PR1 and S1PR2 expression in transduced Jurkat cells

(A) Representative flow cytometry analysis of ZsGreen and Flag expression in Jurkat cells transduced with Flag-tagged S1PR1 or S1PR2. (B) Percentage of ZsGreen positive over time in culture in Jurkat cells transduced with S1PR1 or S1PR2. (C) Cell surface Flag-S1PR1 or Flag-S1PR2 expression in transduced Jurkat cells exposed to graded doses of S1P for 4h after O/N serum deprivation, relative to levels before S1P treatment. Pooled data from N=3 experiments. (D) Cell surface Flag-S1PR1 or Flag-S1PR2 expression in transduced Jurkat cells exposed to saturating doses of S1P (300nM) for the indicated times after O/N serum deprivation, relative to levels before S1P treatment. Pooled data from N=3 experiments. (E) Re-expression of Flag-S1PR1 or Flag-S1PR2 in transduced Jurkat cells after O/N culture in saturating doses of S1P, followed by culture in the absence of S1P for the indicated time. Pooled data from N=3 experiments.

Figure 3: Antagonistic effects of S1PR1 and S1PR2 on spontaneous and S1P-mediated T cell migration

(A-B) Chemotaxis assay measuring Jurkat cell migration in response to different doses of S1P. Results in (A) show the percentage of input cells that migrated, and in (B) the migration index relative to the condition without S1P. Mean + SEM of 6 different

experiments. (C) Percentage of migration of the indicated cells in response to different doses of CXCL12. Data are pooled from three different experiments. (D-E) Jurkat cells were transduced with both S1PR1 and S1PR2. Cell migration in response to different doses of S1P was measured. Results in (D) show the percentage of input cells that migrated, and in (E) the migration index relative to the condition without S1P. Mean + SEM of 3 different experiments, for the different cell lines as indicated.

Figure 4: Mathematical modeling of S1PR1 and S1PR2 overexpression impact on Jurkat migration.

(A) Experimental (mean $\pm$ SD, squares) and simulated (straight lines) percentages of input for Jurkat WT (black), S1PR1-FLAG (blue) and S1PR2-FLAG (green). Experimental data have been introduced in Figure 3B. Simulated percentages are obtained by fitting data with a polynomial model of the migration rate. (B) Simulated percentage of the maximal migration for each condition (Jurkat WT, black; S1PR1-FLAG, blue; S1PR2-FLAG, green). The percentage is computed as the ratio of the percentage of input (Figure 4A, straight lines) and the maximal simulated average percentage of input (WT: 3.6% for 81 nM of S1P; S1PR1-FLAG: 6.7% for 84 nM of S1P; S1PR2-FLAG: 6.4% for 820 nM of S1P). The dash line indicates 50% of the maximal percentage of input.

Figure S1: Barcoding system allowing simultaneous measurement of migration of different pools of Jurkat cells.

Jurkat cells were labelled with anti-CD45 coupled to different fluorochromes for barcoding and pooled at equal ratio. Cell migration in response to different doses of S1P was measured. Results show the percentage of input cells that migrated, or the migration index relative to the condition without S1P.

Figure S2: Gating strategy of S1PR1/S1PR2 single or co-expressors and of control cells when both receptors were transduced in Jurkat cells.

Jurkat cells were transduced or co-transduced with lentiviral particles expressing either S1PR1-FLAG and eCFP, either S1PR2-FLAG and ZsGreen. The staining was realized two days after infection. Chemotaxis studies were performed on the indicated gated subsets.

Figure S3: Genes showing a pattern of expression correlated to that of S1PR2 in T cells

Genes whose expression is positively correlated with murine S1pr2 in T cells are represented. Gene position on the graph is dependent on their correlation coefficient (indicated in brown). Zfp683 is also known as Hobit. (Datas from ImmGen)

Figure 1

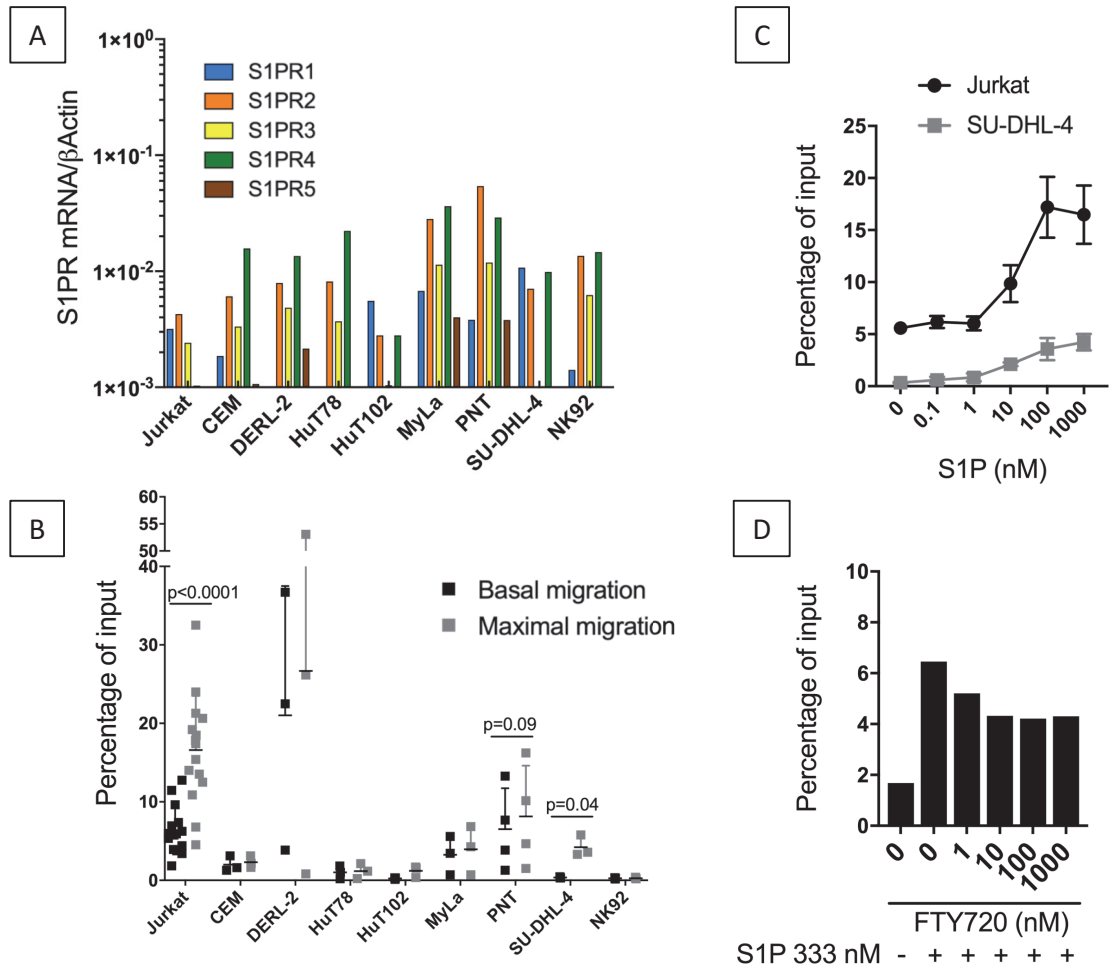


Figure 2

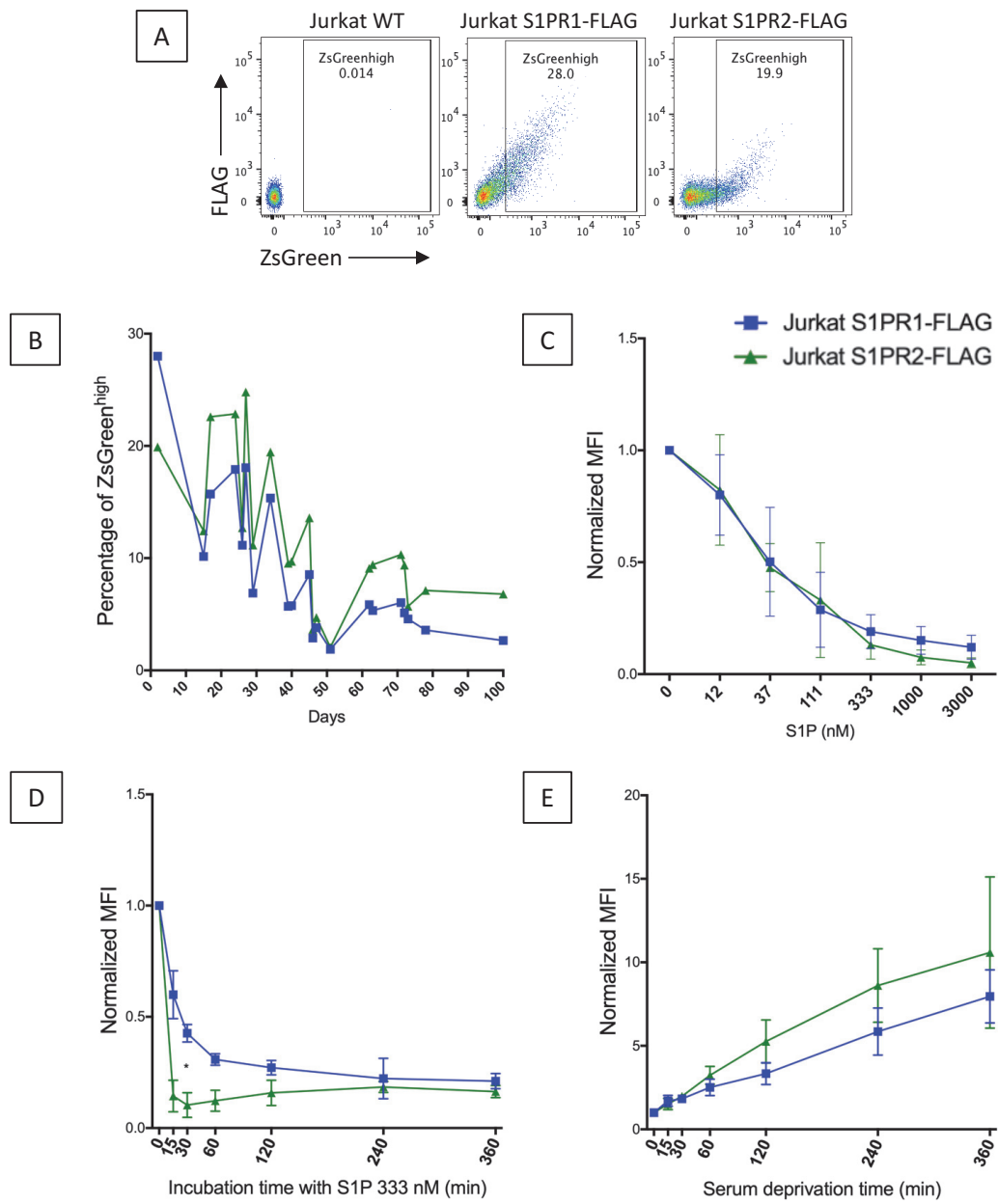


Figure 3

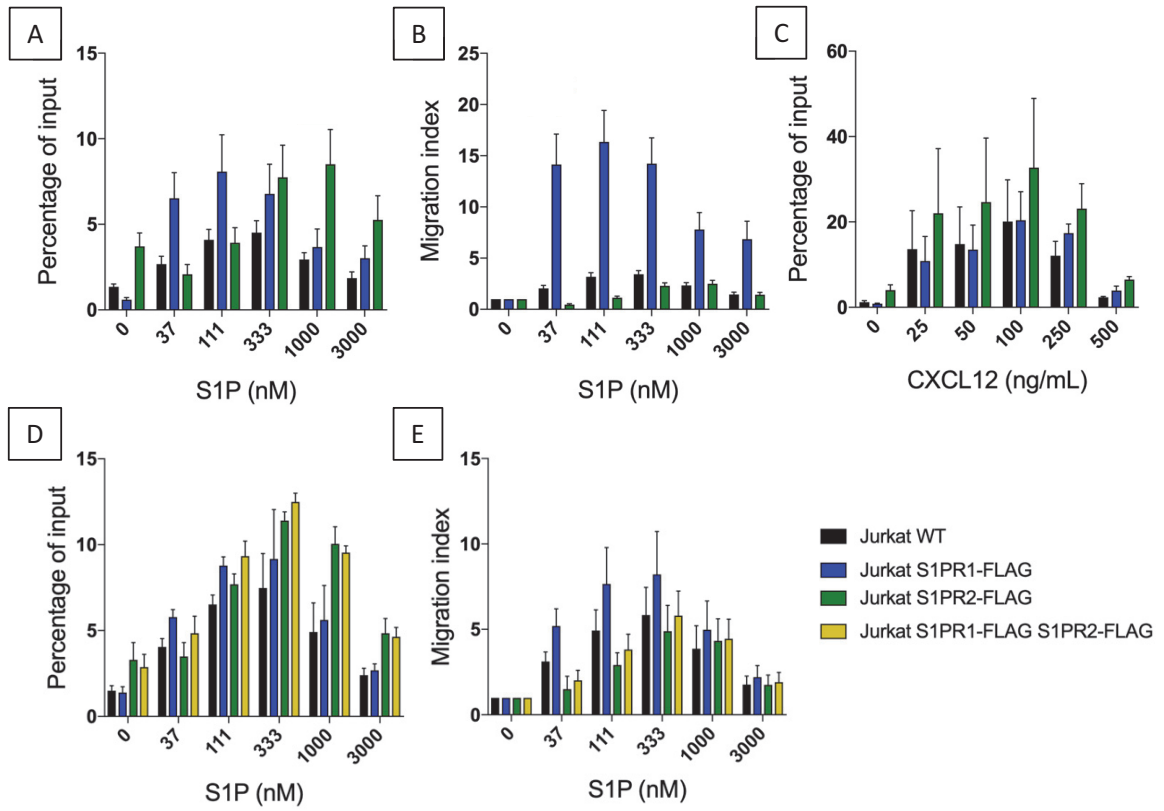


Figure 4

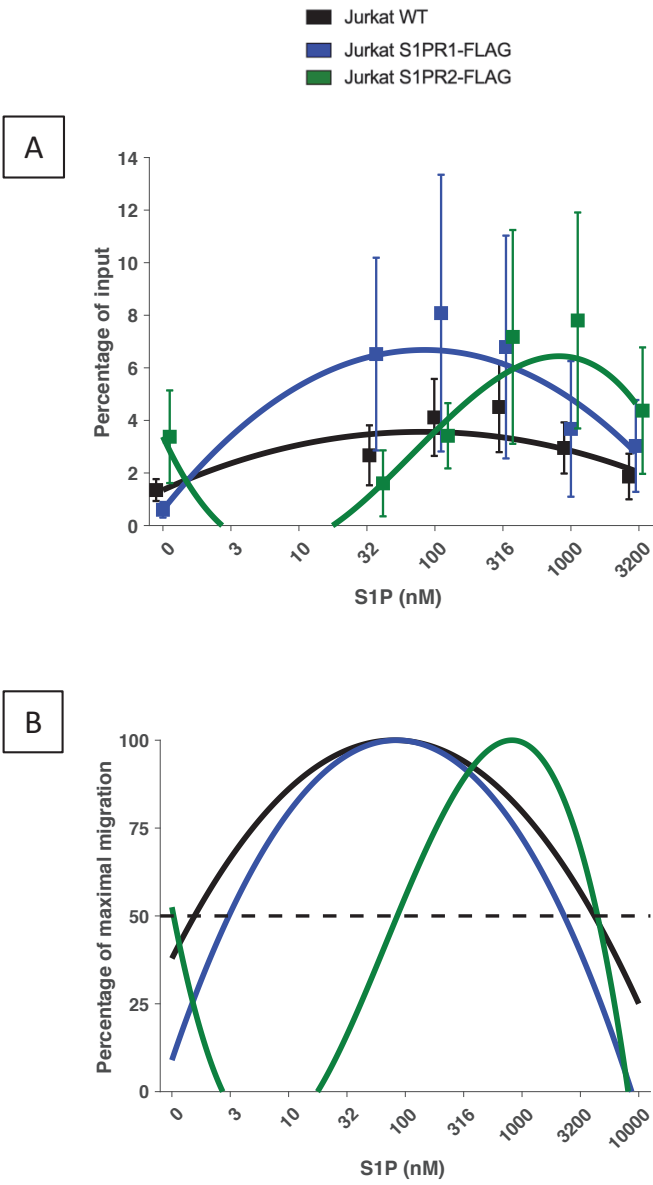


Figure S1

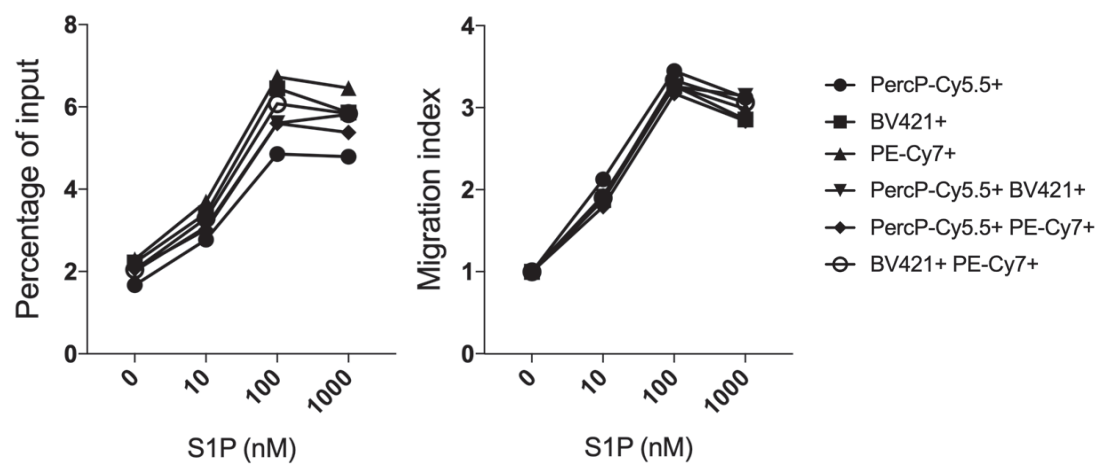


Figure S2

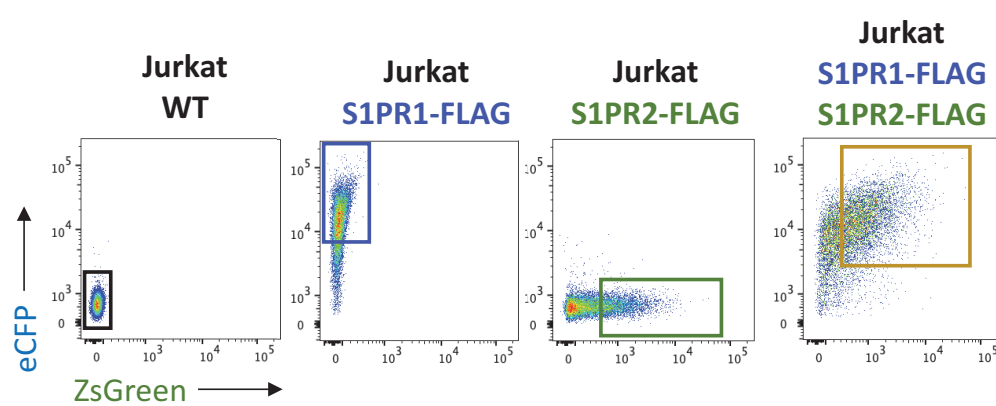
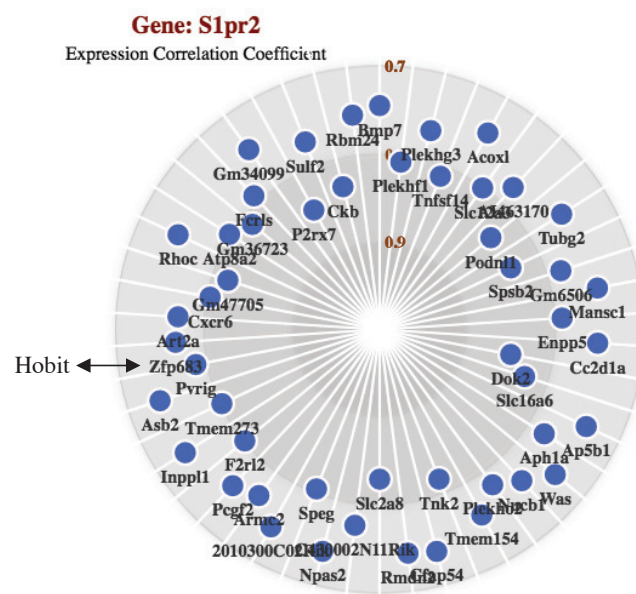


Figure S3



2.2 Résultats complémentaires à l'article 2

2.2.1 Génération d'un anticorps anti-S1PR2 humain

L'une des limites dans l'étude des S1PR humains est l'absence d'anticorps spécifiques et fonctionnels pour les détecter par cytométrie en flux. En collaboration avec l'entreprise Biotem, nous sommes en train de générer des anticorps anti-S1PR2. La procédure de génération a lieu au sein de l'entreprise, et nous intervenons aux différentes étapes de criblage afin de valider et sélectionner les hybridomes positifs (Figure 38). Pour ce faire, les sérums et surnageants de cultures sont utilisés afin de marquer des Jurkat S1PR2-FLAG, dans lesquelles le signal attendu doit être plus fort que dans les Jurkat non transduites. La Figure 39 montre un exemple des trois types de profils de marquage que l'on a pu obtenir : l'hybridome 6E11 n'est pas spécifique de S1PR2, le 1C4 semble marquer S1PR2 mais avec un signal plutôt faible, et le 6D10 présente un signal fort et apparemment spécifique de S1PR2. Le marquage sur les Jurkat surexprimant S1PR2 est plus fort que celui sur les cellules non transduites, qui elles-mêmes présentent un signal non nul : en effet, ces dernières expriment S1PR2 de façon endogène. Nous sommes en train de générer des Jurkat *S1PR2*-KO afin d'avoir un vrai contrôle négatif. Nous avons à ce jour sélectionné trois hybridomes produisant soit des IgM, soit des IgG, qui sont en phase de sous-clonage.

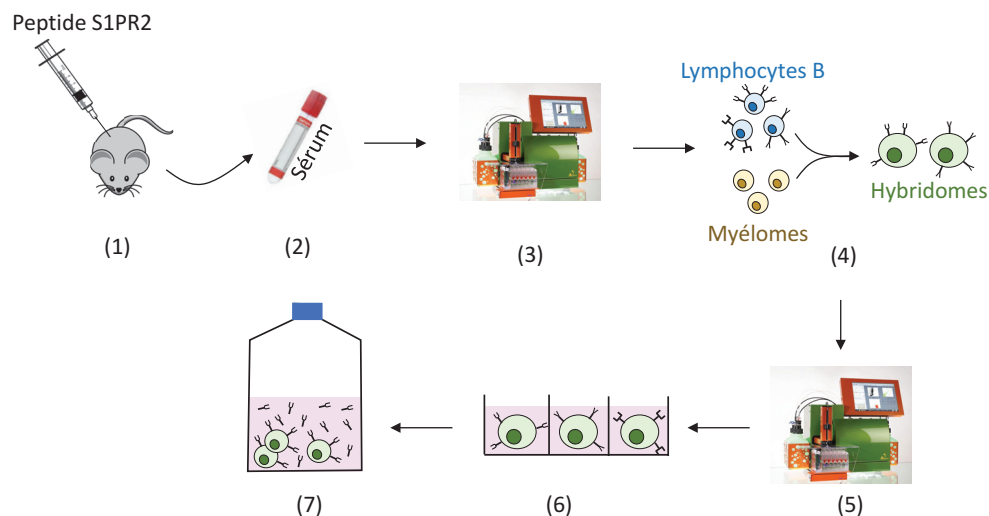


Figure 38 : Génération d'anticorps anti-S1PR2.

(1) Immunisation des souris avec un peptide simulant une partie du domaine extracellulaire de S1PR2. (2) Récupération du sérum des souris immunisées. (3) Criblage des sérums sur Jurkat non transduites et Jurkat S1PR2-FLAG, par cytométrie en flux. (4) Génération d'hybridomes à partir des lymphocytes B des sérums sélectionnés. (5) Criblage des hybridomes. (6) Sous-clonage des hybridomes sélectionnés. (7) Amplification des clones et production d'anticorps monoclonaux.

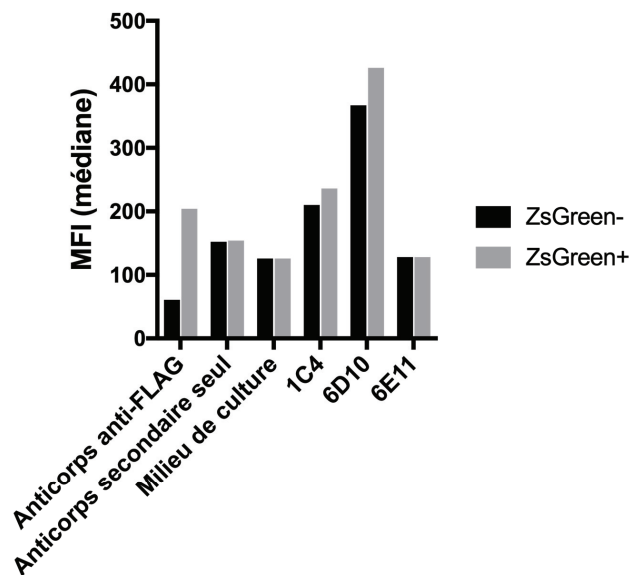


Figure 39 : Exemple de marquage par les anticorps anti-S1PR2 en phase de test.

Les Jurkat S1PR2-FLAG ont été privées de sérum pendant 4h, puis marquées avec un anticorps anti-FLAG (contrôle d'expression de S1PR2-FLAG) ou avec les surnageants de culture d'hybridomes. La MFI (médiane) du signal obtenu a été calculée et comparée entre les cellules ZsGreen- et ZsGreen+. n=1, représentatif de 2 expériences.

2.2.2 Conséquences *in vivo* de la perte de S1PR2

Étant donné que notre étude se focalise sur la migration des lymphocytes T humains, nous nous sommes interrogés sur la pertinence d'un modèle murin pour une étude *in vivo*, chose impossible à réaliser chez l'homme. Nous avons pu obtenir des souris *S1pr2*-KO, dans lesquelles l'ORF de *S1pr2* a été remplacé par un gène de résistance à la néomycine contrôlé par le promoteur de la phosphoglycerate kinase (PGK) (Ishii et al., 2002).

a) Impact de la délétion S1PR2 sur la localisation des lymphocytes dans l'organisme

La première étape a consisté à phénotyper ces souris. Chez l'homme, on observe une inhibition médiée par S1PR2 de la migration des lymphocytes T mémoires des amygdales (Article 1, figures 1 et 2), supposée participer à leur rétention dans l'organe. Si le phénomène existe également chez la souris, on s'attend à ce qu'une délétion de *S1pr2* perturbe la localisation des populations de lymphocytes T. En particulier, les lymphocytes T mémoires devraient être moins présents dans les OLS et augmenter en pourcentage dans le sang. Nous avons comparé la répartition des sous-populations de lymphocytes T dans différents organes de souris contrôles et *S1pr2*-KO de 16

semaines. Dans les poumons et la rate, les différences sont très marquées : le nombre de lymphocytes T naïfs et mémoires *S1pr2*-KO diminue dans les poumons, et augmente dans la rate, par rapport aux contrôles non-KO (Figure 40). Une tendance, un peu plus légère, semble également se dessiner dans certains organes : le nombre de lymphocytes T mémoires diminue dans les ganglions et le foie, et augmente dans le sang des souris *S1pr2*-KO. Globalement, une délétion en *S1pr2* pourrait donc diminuer la rétention des lymphocytes T mémoires dans certains tissus, et augmenter leur passage dans le sang et la rate. Nous avons également phénotypé des souris plus jeunes (6 semaines) sans pouvoir distinguer des différences aussi marquées (données non montrées) : le système immunitaire évolue avec l'âge et il est possible que les différences ne soient pas encore visibles. Ces résultats sont à confirmer en étudiant un plus grand nombre de souris de différents âges.

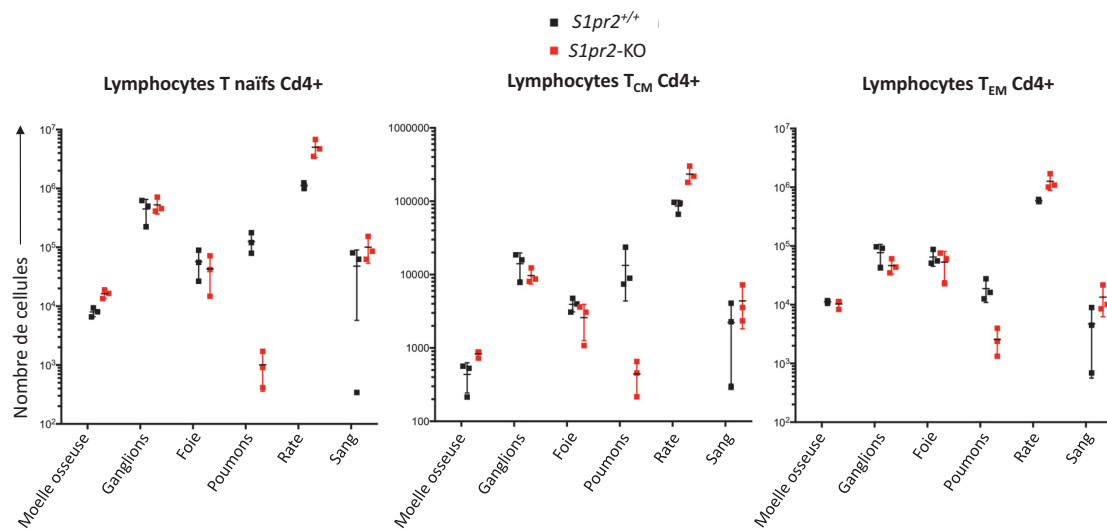


Figure 40 : Répartition des populations de lymphocytes dans les organes de souris *S1pr2*-KO.

Le nombre de lymphocytes dans différents organes (moelle osseuse, ganglions inguinaux, foie, poumons, rate et sang) murins a été comparé entre souris BALB/c contrôles et *S1pr2*-KO. Les résultats présentés sont pour les lymphocytes T Cd4+ ; les différences entre souris contrôles et *S1pr2*-KO vont dans le même sens pour les lymphocytes T Cd8+. n=3 (souris 16 semaines). T_{EM} = T effecteur mémoire ; T_{CM} = T mémoire central.

b) Impact de la délétion *S1PR2* sur la migration des lymphocytes T

Nous avons ensuite voulu voir si la délétion de *S1pr2* impactait la capacité migratoire des lymphocytes T murins *ex vivo*. Des lymphocytes ont été isolés à partir de ganglions et de rates de souris contrôles et *S1pr2*-KO. Des tests de chimiotaxie ont

été réalisés sur plaque transwell en présence de différentes doses de S1P, et nous avons comparé la réponse migratoire des lymphocytes T Cd4+ et Cd8+ entre les souris non mutées et *S1pr2*-KO (Figure 41). Les lymphocytes T naïfs murins contrôles des ganglions migrent en réponse au S1P de façon dose-dépendante, avec un pic de migration à 10 nM de S1P (Figure 41A). Les lymphocytes T_{CM} migrent faiblement, les lymphocytes T_{EM} pas du tout, mais surtout la migration spontanée (sans S1P) des populations mémoires Cd4+ est plus élevée que celle des cellules naïves. Dans la rate, les lymphocytes T ne migrent plus du tout, et la migration des lymphocytes T Cd4+ est même inhibée par de fortes doses de S1P (Figure 41B). Pour la souris *S1pr2*-KO, les profils de migration sont les mêmes que pour les cellules des souris contrôles dans les ganglions, avec peut-être juste une légère augmentation de la migration des lymphocytes T_{CM} Cd4+ (Figure 41A). Dans la rate, la migration des lymphocytes T *S1pr2*-KO est globalement plus élevée que celle des contrôles, mais avec une grande variabilité entre les souris (Figure 41B). Une délétion en *S1pr2* *in vivo* ne semble donc pas impacter la migration des lymphocytes T des ganglions, mais augmenterait légèrement celle des lymphocytes T de la rate.

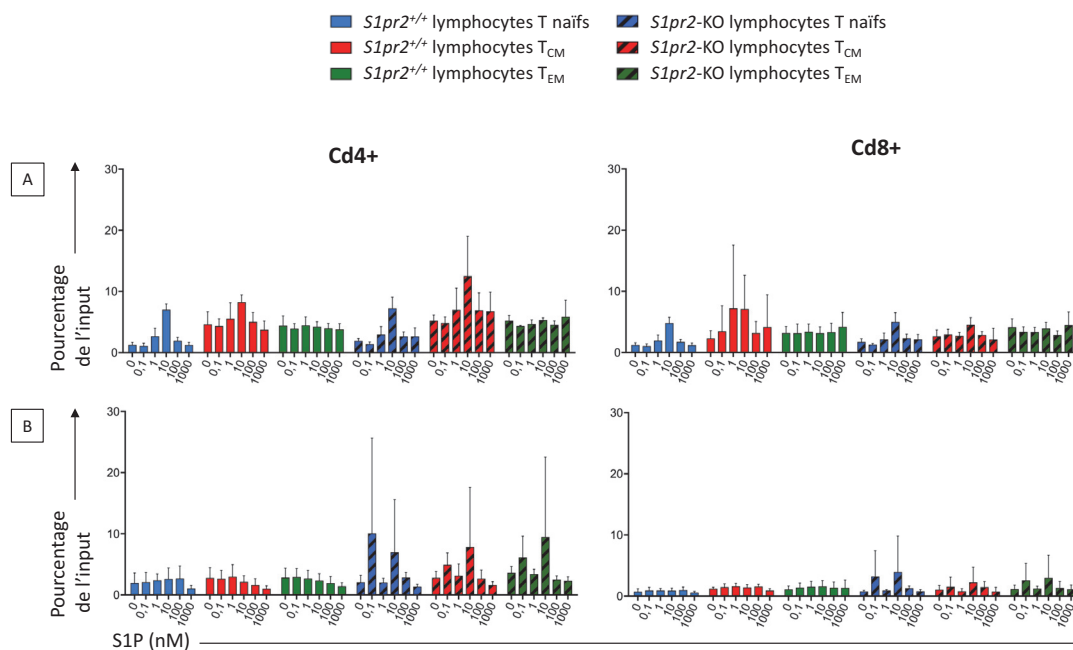


Figure 41 : Migration au S1P des lymphocytes T *S1pr2*-KO murins.

Des tests de chimiotaxie ont été réalisés sur cellules isolées de (A) ganglions ou (B) rates de souris *S1pr2*^{+/+} et *S1pr2*-KO et préalablement privées de sérum pendant 2h. Les cellules ont été déposées dans la chambre supérieure et exposées pendant deux heures à différentes concentrations de S1P. Le nombre de cellules ayant migré dans chaque condition a été comparé au nombre total de cellules déposées dans la chambre supérieure (pourcentage de l'input). Moyennes + SD de 4 souris. S1P = sphingosine-1-phosphate ; TEM = T effecteur mémoire ; TCM = T mémoire central.

III – Comparaison des rôles de S1PR1 et S1PR5 dans la migration lymphocytaire

Les résultats des études précédentes de l'équipe ainsi que les données publiées dans la littérature nous ont amenés à nous intéresser en parallèle à un autre récepteur au S1P, S1PR5. En effet, si S1PR1 est connu pour induire la sortie des lymphocytes T naïfs des OLS, les lymphocytes NK matures utilisent préférentiellement S1PR5 pour leur migration (Drouillard et al., 2018a). En apparence, la fonction de ces deux récepteurs semble être la même : en fixant le S1P, ils induisent la migration d'un type de lymphocytes et permettent ainsi leur sortie des organes lymphoïdes. Pourtant, leur utilisation spécifique par l'une ou l'autre population lymphocytaire suggère des différences entre S1PR1 et S1PR5. En outre, l'expression de S1PR5 est acquise par les lymphocytes T_{EM} CD8+ humains alors qu'elle est absente des autres lymphocytes T (Article 1, figure 2B), ce qui pourrait signifier que S1PR5 apporte à cette sous-population une fonction que S1PR1 ne peut leur fournir. En tenant compte de ces informations, nous avons choisi de nous intéresser aux différences entre S1PR1 et S1PR5, notamment en comparant certaines de leurs caractéristiques comme leur sensibilité au S1P ou leur capacité à induire la migration lymphocytaire.

3.1 Impact de l'environnement sur la migration médiée par S1PR1 ou S1PR5

Les lymphocytes T naïfs et NK matures ne suivent pas le même schéma de circulation dans l'organisme. Alors que les lymphocytes T naïfs se rendent d'OLS en OLS afin de scanner les antigènes présentés par les CPA, les lymphocytes NK sont principalement localisés au niveau de la rate et du sang, ainsi que dans certains organes non-lymphoïdes (Grégoire et al., 2007). De ce fait, avant de retourner dans le sang, les lymphocytes T et NK sont exposés à des environnements différents, où ils peuvent recevoir des signaux influençant leur migration. Nous nous sommes demandé si la migration dépendante du S1P des lymphocytes T naïfs et NK matures étaient impactée par leur localisation dans l'organisme.

Des lymphocytes ont été isolés à partir d'amygdales, de rate, de moelle osseuse et de sang humains. Des tests de chimiotaxie ont été réalisés sur plaque transwell en présence de différentes doses de S1P, et nous avons comparé la réponse migratoire des lymphocytes T CD4+ et CD8+ naïfs et des lymphocytes NK dans les différents organes (Figure 42A). Dans les amygdales, où on suppose que la concentration en S1P est assez faible, les trois populations migrent en réponse au S1P, de façon dose-dépendante. En particulier, l'amplitude de la migration induite par le S1P est très forte chez les lymphocytes T CD8+. Dans la moelle osseuse et dans la rate, où la concentration en S1P est théoriquement un peu plus élevée car ces organes sont plus

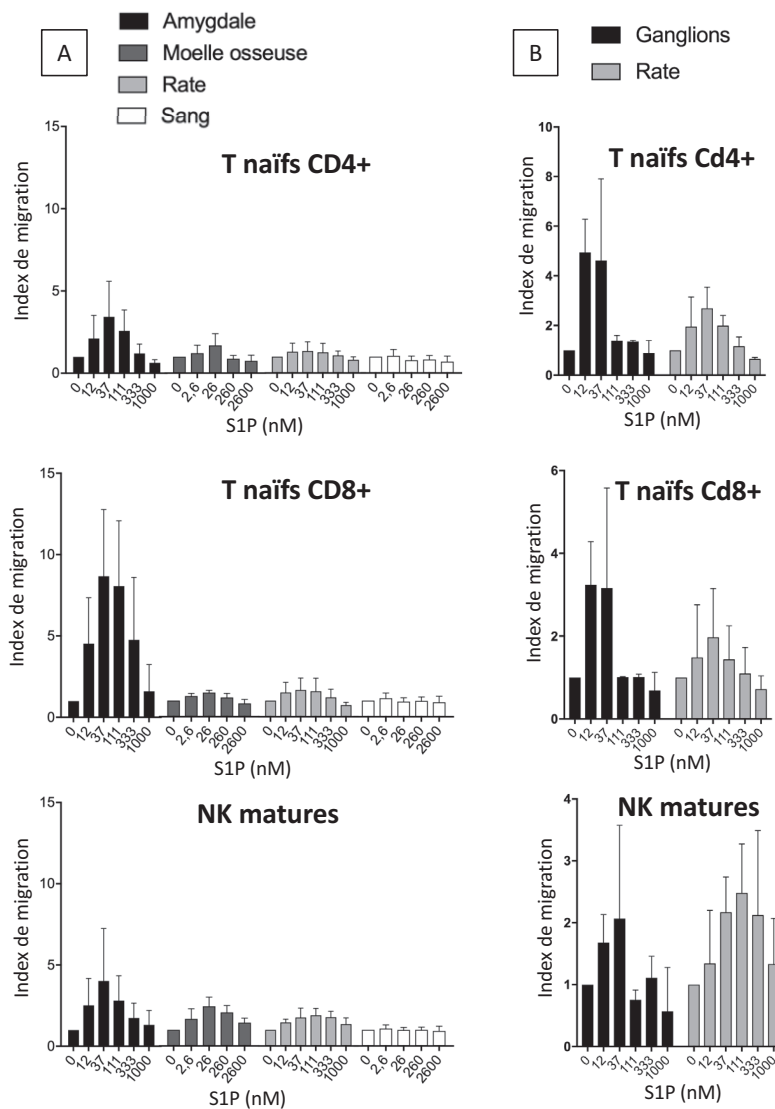


Figure 42 : Migration au S1P des lymphocytes T et NK humains et murins.

Des tests de chimiotaxie ont été réalisés sur cellules humaines et murines isolées de différents organes et préalablement privées de sérum pendant 2h. Les cellules ont été déposées dans la chambre supérieure et exposées pendant deux heures à différentes concentrations de S1P. Le nombre de cellules ayant migré dans chaque condition a été normalisé avec le nombre de cellules ayant migré en absence de S1P (index de migration). **(A)** Cellules humaines ; amygdales n=8 ; moelle osseuse n=3 ; rate n=6 ; sang n=8 individus. **(B)** Cellules murines ; n=2. Moyennes $\pm$ SD du nombre d'individus indiqués. NK = lymphocytes Natural Killer ; S1P = sphingosine-1-phosphate ; T = lymphocytes T.

vascularisés, l'amplitude de migration est diminuée. Enfin, les lymphocytes du sang ne sont pas du tout réceptifs au signal médié par le S1P. On constate donc que, chez l'homme, l'environnement dans lequel se trouvent les lymphocytes influence fortement leur capacité à répondre au S1P. De façon intéressante, plus

l'environnement est riche en S1P, plus la migration est diminuée. Cet effet dure dans le temps, puisque le comportement des lymphocytes est impacté même après les deux heures de privation de sérum réalisés avant la migration. On peut facilement suggérer que le S1P présent dans les organes serait responsable d'une internalisation plus ou moins forte des S1PR, ce qui modulerait la réponse migratoire des lymphocytes. L'effet en fonction de l'organe est le plus important chez les lymphocytes T CD8+.

Nous avons réalisé les mêmes tests chez la souris, en comparant cette fois-ci ganglions et rate (Figure 42B). On peut observer clairement une diminution de la migration dépendante du S1P des lymphocytes T Cd4+ et Cd8+ de la rate par rapport à ceux des ganglions. En revanche, la migration des lymphocytes NK ne semble pas impactée par la forte concentration en S1P de la rate. Bien que l'on n'ait pas pu reproduire cet effet chez l'homme, ceci suggère que, au moins chez la souris, les S1pr utilisés par les lymphocytes NK ne sont pas inactivés par une forte exposition au S1P.

3.2 Comparaison des séquences C-terminales de S1PR1 et S1PR5

Plusieurs études menées sur des cellules humaines HEK293T ont montré que S1PR1 était internalisé en présence de S1P (Gonzalez-Cabrera et al., 2007; Liu et al., 1999). De plus, une étude réalisée sur la lignée de lymphome B murin WEHI-231 a montré qu'une exposition à de faibles doses de S1P était suffisante pour réduire la quantité de S1PR1, mais pas de S1PR5, à la membrane des cellules (Jenne et al., 2009a). Afin de voir s'il est en effet possible que S1PR1 et S1PR5 ne soient pas internalisés de la même façon par le S1P, nous nous sommes intéressés à leur séquence protéique. Génétiquement, S1PR5 est moins proche de S1PR1 que S1PR2 et S1PR3 (Figure 19). De plus, l'alignement de séquences protéiques par BLAST montre que, bien que possédant le même ligand, S1PR1 et S1PR5 ne partagent que 47% de similarité.

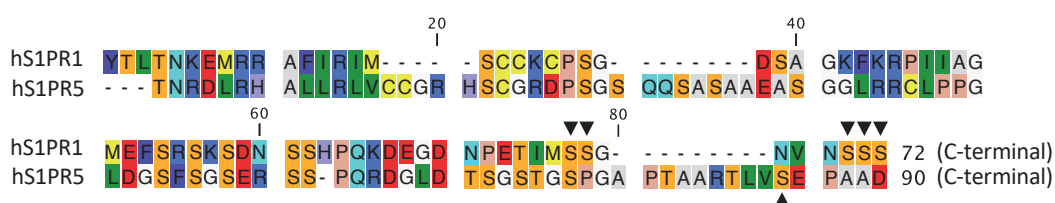


Figure 43 : Comparaison des domaines intracellulaires 4 (correspondant à la queue C-ter) de S1PR1 et S1PR5.

Pour S1PR1, on retrouve 5 sérines sur les 10 derniers acides aminés de la protéine, contre seulement 1 sérine pour S1PR5 (flèches noires).

L'internalisation de S1PR1 est consécutive à la phosphorylation par GRK2 d'un domaine riche en sérine de la queue C-terminale (Watterson et al., 2002). En comparant les deux séquences C-terminales, on constate que pour S1PR1 les 10 derniers acides aminés de la protéine contiennent 5 sérines phosphorylables, contre

seulement une sérine pour S1PR5 (Figure 43, flèches noires). Cela nous a conduit à émettre l'hypothèse que, de par sa séquence protéique, S1PR5 serait moins facilement internalisable que S1PR1. Cette caractéristique permettrait aux cellules qui l'expriment, comme les lymphocytes NK, de conserver leur capacité migratoire même dans des environnements riches en S1P. Ainsi, les lymphocytes NK, qui doivent fréquemment passer de la rate au sang, utiliseraient S1PR5 plutôt que S1PR1.

3.3 Etude de la sensibilité de S1PR1 et S1PR5 au S1P

Afin de vérifier si effectivement S1PR5 était moins facilement internalisable que S1PR1, nous avons mesuré l'expression membranaires de ces récepteurs dans une lignée de lymphocytes T. Pour cela, le même modèle que décrit dans l'article 1 a été utilisé : des cellules Jurkat ont été transduites avec des particules lentivirales capables d'induire l'expression soit de S1PR1, soit de S1PR5. Étant donnée l'absence dans le commerce d'anticorps de cytométrie en flux fonctionnels et spécifiques de ces deux récepteurs, nous les avons tagués en N-terminal avec un polypeptide FLAG (DYKDDDDK).

Les cellules transduites ont été incubées dans un milieu sans sérum pendant une nuit entière. Le SVF utilisé en culture cellulaire est composé majoritairement d'albumine, qui est un transporteur du S1P (Christoffersen et al., 2011; Murata et al., 2000). En privant les cellules de sérum, on supprime leur exposition au S1P extracellulaire, ce qui devrait potentialiser l'expression membranaire des S1PR sensibles à l'internalisation par ce dernier. Les Jurkat ont ensuite été incubées pendant 30 min ou 4h avec différentes concentrations de S1P, et la présence du peptide FLAG à la surface des cellules a été mesurée par cytométrie en flux (Figure 40A - 30 min et 4h poolées). On constate que l'expression membranaire de S1PR1 diminue d'une façon dépendante de la dose et du temps alors que celle de S1PR5 reste plutôt stable. Un temps d'incubation court (30 min) suffit à induire l'internalisation de S1PR1, même à petites doses de S1P. 50% du S1PR1 membranaire est perdu avec une incubation entre 111 et 333 nM de S1P, c'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser 333 nM pour les expériences suivantes.

Nous avons ensuite comparé l'internalisation de S1PR1 et S1PR5 au cours du temps. Comme précédemment, les cellules ont été incubées durant une nuit dans un milieu sans SVF, puis resuspendues dans 333 nM de S1P et incubées pendant différents temps (Figure 44B). Pour S1PR1, l'internalisation est très rapide et on perd 50% de son expression de surface dans les 30 premières minutes, ce qui est cohérent avec le résultat de la Figure 44A. On atteint un plateau après 4h d'incubation. Avec 333 nM de S1P, l'expression de S1PR1 est donc fortement diminuée mais pas totalement supprimée. L'expression de S1PR5 diminue légèrement au cours de la première heure, puis reste stable, sans jamais descendre en-dessous de 70%. Ce dernier semble donc peu sensible à l'internalisation par le S1P.

Enfin, nous avons réalisé l'expérience inverse : les Jurkat transduites ont été incubées dans 333 nM de S1P pendant une nuit, puis privées de sérum durant différents temps (Figure 44C). La quantité de S1PR1 membranaire augmente progressivement au cours du temps. À 6h, la courbe semble encore ascendante, mais la valeur après 16h d'incubation est relativement similaire (donnée non montrée, n=1). À l'inverse, l'expression de S1PR5 ne varie pas. Il convient cependant de noter qu'une incubation dans 333 nM de S1P ne réduit pas énormément l'expression de S1PR5 (Figure 44B). Par conséquent, il est possible que, même après une nuit d'incubation, le niveau de S1PR5 membranaire soit toujours à son maximum et ne puisse pas être augmenté plus.

Ces trois expériences montrent que S1PR1 est très sensible à l'internalisation induite par le S1P extracellulaire, alors que S1PR5 n'est quasiment pas internalisé dans les mêmes conditions. Il est possible que ces différences soient exploitées par les populations de lymphocytes pour avoir la réponse migratoire adéquate dans les différents compartiments de l'organisme.

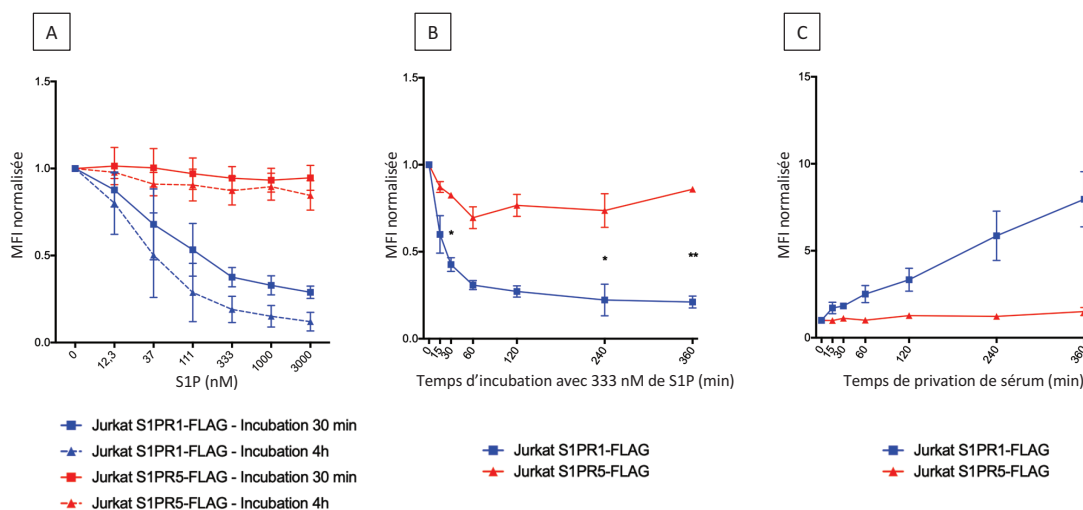


Figure 44 : Sensibilité de S1PR1 et S1PR5 à l'internalisation médiée par le S1P.

Les Jurkat S1PR1-FLAG et les Jurkat S1PR5-FLAG ont été incubées pendant une nuit **(A)** dans du milieu sans sérum, puis incubées avec différentes doses de S1P pendant 30 min ou 4h ; **(B)** dans du milieu sans sérum, puis incubées avec 333 nM de S1P pendant différents temps ; **(C)** dans 333 nM de S1P, puis incubées dans du milieu sans sérum pendant différents temps. L'expression membranaire du FLAG a été mesurée par cytométrie en flux. La MFI a été calculée avec le logiciel FlowJo, et les valeurs de chaque condition ont été normalisées avec la valeur au point 0 min. Comparaison entre les deux S1PR pour chaque point : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (ANOVA ou test de Friedman en fonction de la normalité des données). Moyennes $\pm$ SD de 3 expériences avec triplicats. S1P = sphingosine-1-phosphate.

3.4 Migration au S1P médiée par S1PR1 et S1PR5

Comme S1PR1 est responsable de la migration des lymphocytes T naïfs, et S1PR5 de celle des lymphocytes NK matures, nous nous sommes demandé si les deux récepteurs induisaient le même type de réponse migratoire au S1P. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé plusieurs tests de chimiotaxie en plaque transwell. Les données pour les Jurkat non transduites (Jurkat WT) et S1PR1-FLAG sont les mêmes que celles présentées dans l'article 1, mais seront cette fois-ci comparées aux Jurkat S1PR5-FLAG.

3.4.1 Impact de S1PR1 et S1PR5 sur la migration au S1P

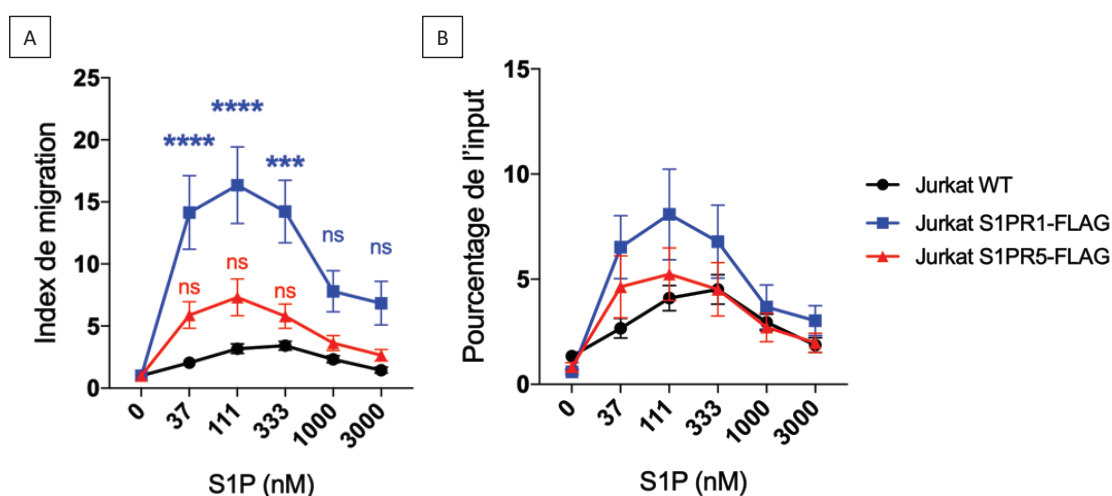


Figure 45 : Rôle de S1PR1 et S1PR5 dans la migration S1P des Jurkat.

Les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-CD45 couplés à des fluorochromes différents afin de les différencier, puis mixées à ratio égal. Des tests de chimiotaxie ont été réalisés sur ces cellules après 2h de privation de sérum. L'analyse a été faite sur les cellules ZsGreen- pour les Jurkat non transduites (Jurkat WT), ou ZsGreen+ pour les Jurkat transduites. **(A)** Le nombre de cellules ayant migré dans chaque condition a été normalisé avec le nombre de cellules ayant migré en absence de S1P (index de migration), **(B)** ou a été comparé au nombre total de cellules déposées dans la chambre supérieure (pourcentage de l'input). Comparaison avec la migration des Jurkat WT : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns ou pas d'indication = non significatif (ANOVA ou test de Friedman en fonction de la normalité des données). Moyennes $\pm$ SEM de 6 expériences.

Dans un premier temps, nous avons vérifié si la surexpression de S1PR1 et S1PR5 influençait la réponse migratoire en présence de S1P, par rapport aux Jurkat WT. Les cellules ont été privées de sérum pendant deux heures dans la chambre supérieure d'une plaque transwell, puis du milieu contenant différentes concentrations de S1P a été ajouté dans la chambre inférieure. Au bout de deux heures, les cellules ayant migré

dans la chambre inférieure ont été récupérées et comptées par cytométrie en flux. Comme montré précédemment, la surexpression de S1PR1 augmente fortement la migration des Jurkat, avec une augmentation d'un facteur 15 au pic de migration par rapport à la condition sans S1P (Figure 45A – S1P), contre un facteur 3 dans les Jurkat WT. Le pourcentage de Jurkat S1PR1-FLAG ayant migré parmi les cellules totales est également augmenté par rapport aux Jurkat WT (Figure 45B – S1P). De plus, le pic de migration est atteint pour une concentration plus faible de S1P (111 nM au lieu de 333 nM pour les Jurkat WT). L'effet d'une surexpression de S1PR5 sur la migration des Jurkat semble plus faible : l'index est légèrement plus élevé et le pic de migration est également atteint à 111 nM, avec une migration augmentée aux faibles doses de S1P, mais le pourcentage de cellules ayant migré vers les fortes concentrations en S1P est globalement le même que pour les Jurkat WT. La différence observée en index et non en input est due au fait que la surexpression de S1PR5 diminue la migration spontanée (input pour S1P 0 nM), mais affecte peu la migration en présence de S1P. Il apparaît donc qu'une surexpression de S1PR1 augmente fortement l'amplitude de migration des Jurkat en réponse au S1P ainsi que leur sensibilité au S1P, alors que S1PR5 a peu d'effet notable sur cette migration mis à part l'abaissement de la dose de S1P nécessaire à la migration.

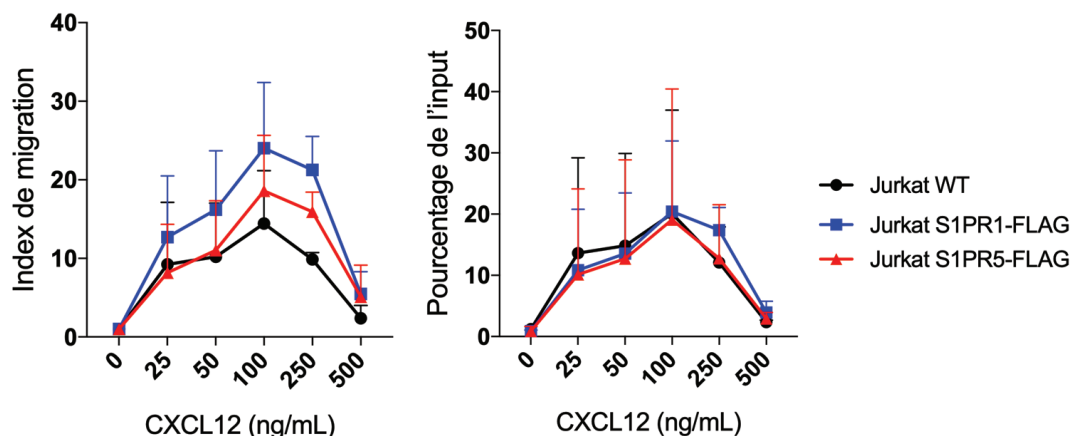


Figure 46 : Impact d'une surexpression de S1PR1 ou S1PR5 sur la migration S1P-indépendante des Jurkat.

Les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-CD45 couplés à des fluorochromes différents afin de les différencier, puis mixées à ratio égal. Des tests de chimiotaxie ont été réalisés sur ces cellules après 2h de privation de sérum. L'analyse a été faite sur les cellules ZsGreen- pour les Jurkat WT, ou ZsGreen+ pour les Jurkat transduites. Le nombre de cellules ayant migré dans chaque condition a été normalisé avec le nombre de cellules ayant migré en absence de S1P (index de migration) ou a été comparé au nombre total de cellules déposées dans la chambre supérieure (pourcentage de l'input). Comparaison avec la migration des Jurkat WT par ANOVA ou test de Friedman en fonction de la normalité des données : différences non significatives. Moyenne $\pm$ SD de 3 expériences avec triplicats.

Nous nous sommes également intéressés à l'impact d'une surexpression de S1PR1 et S1PR5 sur la migration S1P-indépendante des Jurkat. Les mêmes tests de chimiotaxie que décrits précédemment ont été réalisés, avec cette fois-ci dans la chambre inférieure différentes concentrations de CXCL12 au lieu du S1P. La migration en réponse au CXCL12 est la même pour les trois lignées (Figure 46). En effet, le pourcentage de cellules ayant migré ne varie pas en fonction du S1PR surexprimé (pourcentage de l'input). Comme pour la figure 41, la différence observée en index et non en pourcentage de l'input est due aux variations de migration spontanée (input pour S1P 0 nM) consécutive à la surexpression de S1PR1 ou S1PR5, mais pas à la migration en réponse au CXCL12. Ces résultats montrent que les différences de migration observées avec le S1P (Figure 45) sont bien dépendantes du S1P.

3.4.2 Rôle du gradient de S1P dans la migration médiée par S1PR1 et S1PR5

Puisque les lymphocytes primaires en provenance de différents organes ne présentent pas la même réponse migratoire, et que S1PR1 et S1PR5 ne sont pas internalisés de la même façon en présence de S1P, nous avons voulu savoir si la migration avec ces deux récepteurs était modulée par l'exposition des cellules au S1P présent dans leur environnement. De nouveaux tests de chimiotaxie ont été réalisés en faisant varier le temps de privation de sérum avant l'étape de migration. Pour les trois lignées, Jurkat WT, S1PR1-FLAG et S1PR5-FLAG, on peut voir que l'amplitude de la réponse migratoire augmente avec le temps de privation de sérum (Figures 48A-B), ce qui signifie que les cellules répondent mieux au S1P. L'effet est le plus fort pour les Jurkat S1PR1-FLAG, qui triplent leur index de migration entre 0 et 4h de privation de sérum. On observe moins de différences chez les Jurkat S1PR5-FLAG, ce qui est cohérent avec l'absence d'externalisation lors d'une privation de sérum (Figure 44C). Si on regarde le pourcentage de cellules ayant migré (Figure 47C-D), les différences sont moins marquées, comme si la privation de sérum influençait plus la migration basale. Ainsi, l'incubation des Jurkat dans un milieu dépourvu de S1P modifie peu leur capacité à migrer en réponse au S1P, mais diminue leur capacité à passer spontanément dans la chambre inférieure. Cet effet est plus fort lorsque S1PR1 est surexprimé, mais presque inexistant quand c'est S1PR5 qui est surexprimé.

Ensuite, nous avons étudié l'effet direct du S1P sur la capacité migratoire des Jurkat, en pré-incubant celles-ci deux heures dans 300 nM de S1P avant l'étape de migration. De façon évidente, l'exposition de toutes les lignées au S1P réduit leur migration au S1P (Figure 48A-B) et augmente leur migration basale (Figure 48B), ce qui suggère que les S1PR responsables de la migration dans ces cellules ont été inactivés par le S1P extracellulaire. L'intensité de l'inhibition de migration induite par la pré-incubation dans 300 nM de S1P suit le profil de migration de chacune des lignées : plus

la migration sans pré-incubation est grande, plus l'inhibition après pré-incubation est forte. De ce fait, il n'y a presque plus de réponse migratoire après pré-incubation dans 300 nM de S1P. Ces résultats permettent de dire que la migration induite par S1PR1 est fortement influencée par la présence de S1P dans l'environnement, ce dernier inhibant la réponse migratoire. Cela semble également être le cas pour la migration

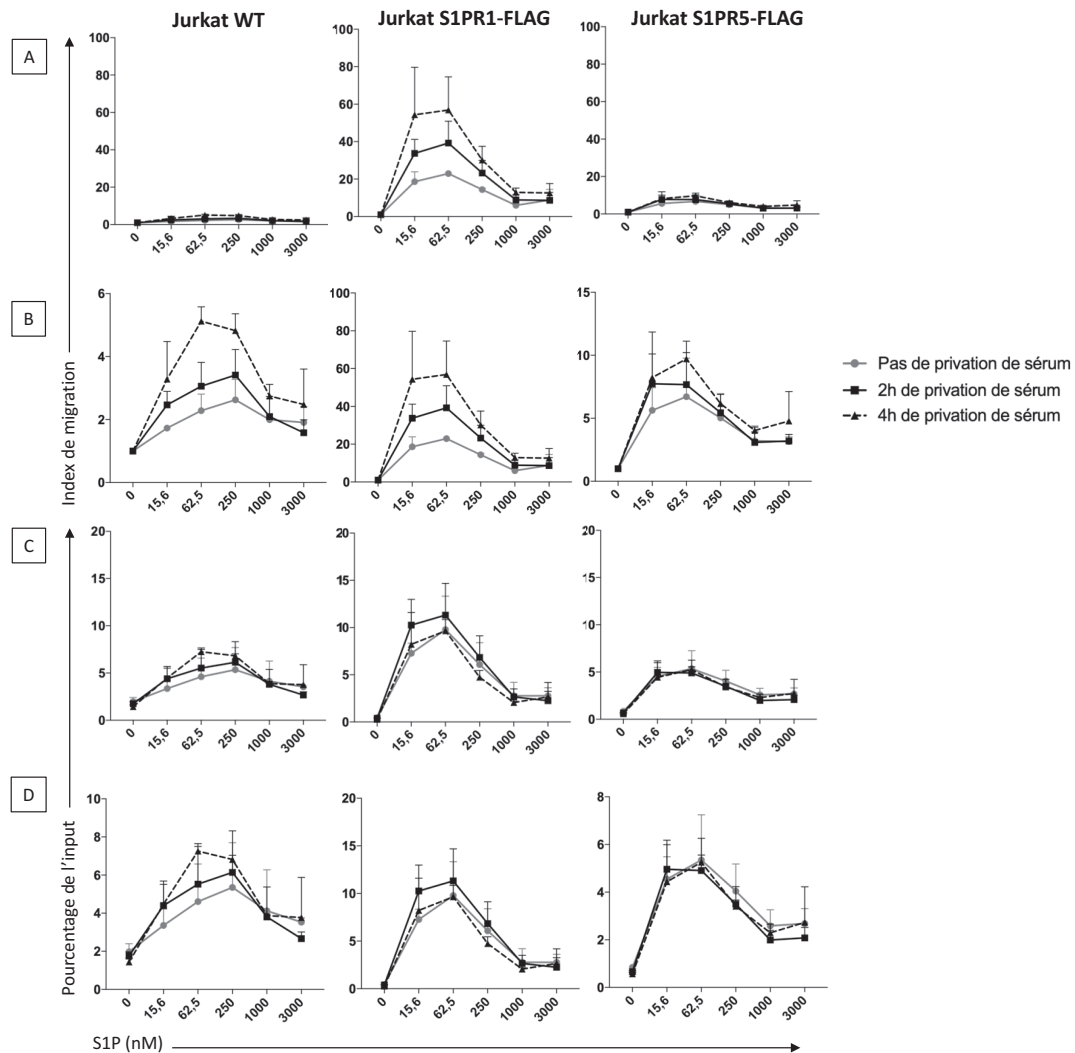


Figure 47 : Impact du temps de privation de sérum sur la migration des Jurkat.

Les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-CD45 couplés à des fluorochromes différents afin de les différencier, puis mixées à ratio égal. Des tests de chimiotaxie ont été réalisés sur ces cellules après 0h, 2h ou 4h de privation de sérum. L'analyse a été faite sur les cellules ZsGreen- pour les Jurkat WT, ou ZsGreen+ pour les Jurkat transduites. **(A-B)** Le nombre de cellules ayant migré dans chaque condition a été normalisé avec le nombre de cellules ayant migré en absence de S1P (index de migration, **A** = même échelle, **B** = échelles adaptées), **(C-D)** ou a été comparé au nombre total de cellules déposées dans la chambre supérieure (pourcentage de l'input, **C** = même échelle, **D** = échelles adaptées). Moyennes $\pm$ SEM de 2 expériences avec duplicats.

induite par S1PR5. Cependant, comme on peut le voir dans les différents tests de chimiotaxie (Figures 46, 48 et 49), la surexpression de S1PR5 ne modifie pas énormément la migration des Jurkat WT, à l'exception de la dose de S1P au pic de migration. On ne peut donc pas exclure la possibilité que l'effet constaté (Figure 48) est causé non pas par l'inactivation du S1PR5 exogène, mais par celle du S1PR1 endogène.

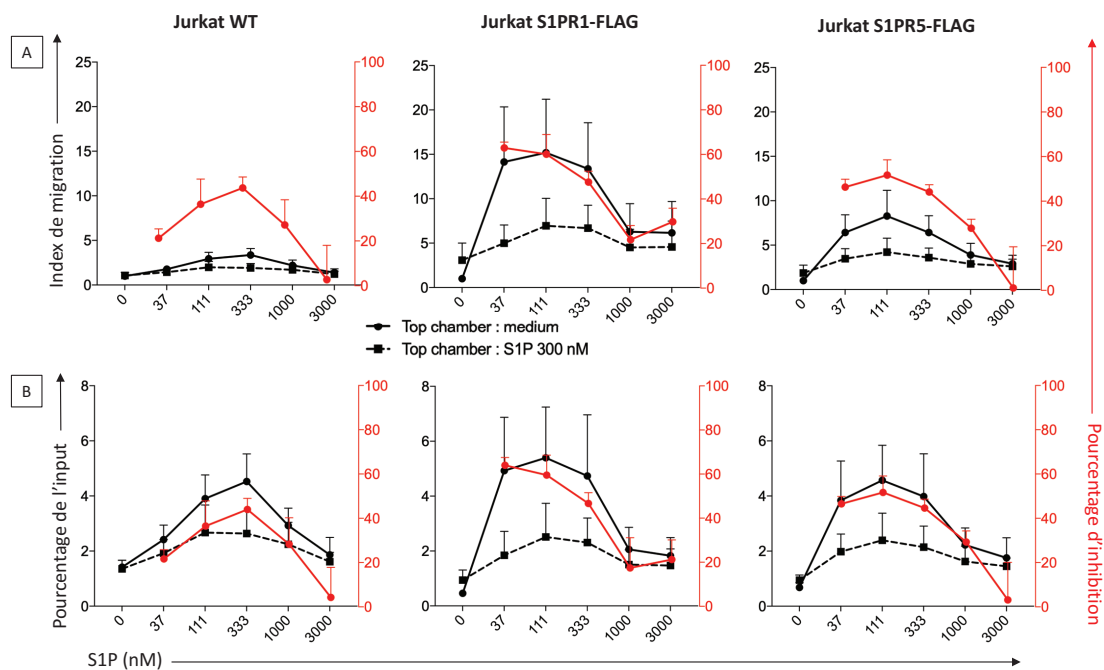


Figure 48 : Impact d'une pré-incubation au S1P sur la migration des Jurkat.

Les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-CD45 couplés à des fluorochromes différents afin de les différencier, puis mélangées à ratio égal. Des tests de chimiotaxie ont été réalisés sur ces cellules après 2h d'incubation dans du milieu additionné de 300 nM de S1P. L'analyse a été faite sur les cellules ZsGreen- pour les Jurkat WT, ou ZsGreen+ pour les Jurkat transduites. **(A)** Le nombre de cellules ayant migré dans chaque condition a été normalisé avec le nombre de cellules ayant migré en absence de S1P (index de migration), **(B)** ou a été comparé au nombre total de cellules déposées dans la chambre supérieure (pourcentage de l'input). Pour chaque point de migration, le pourcentage d'inhibition a été calculé en comparant la migration après pré-incubation dans 300 nM de S1P avec la migration sans pré-incubation dans du S1P (qui correspond à une inhibition de 0%). Moyennes $\pm$ SD de 3 expériences avec triplicats.

3.4.3 Existe-t-il un effet additif entre S1PR1 et S1PR5 ?

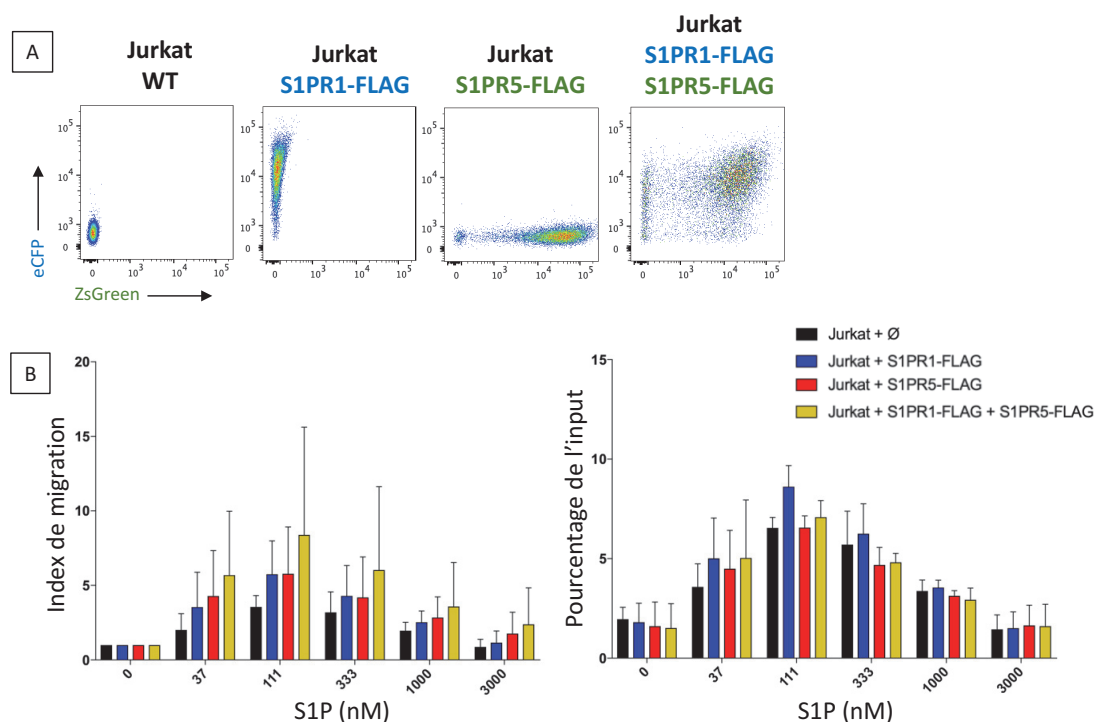


Figure 49 : Impact d'une co-expression de S1PR1 et S1PR5 sur la migration des Jurkat. (A) Les Jurkat ont été transduites ou co-transduites avec des particules lentivirales exprimant soit S1PR1-FLAG et la eCFP, soit S1PR5-FLAG et la ZsGreen. Le marquage a été réalisé à J+2 après infection. (B) Les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-CD45 couplés à des fluorochromes différents afin de les différencier, puis mixées à un ratio 1:1:1:1. Des tests de chimiotaxie ont été réalisés sur ces cellules après 2h de privation de sérum. L'analyse a été faite sur les cellules eCFP- ZsGreen- pour les Jurkat non transduites (Jurkat WT), ou eCFP+, ZsGreen+ ou eCFP+ ZsGreen+ pour les Jurkat transduites. Le nombre de cellules ayant migré dans chaque condition a été normalisé avec le nombre de cellules ayant migré en absence de S1P (index de migration), ou est comparé au nombre total de cellules déposées dans la chambre supérieure (pourcentage de l'input). Moyennes $\pm$ SD de 3 expériences avec triplicats.

Même si l'effet de S1PR5 sur la migration des Jurkat semble faible, nous avons voulu savoir si les deux S1PR interagissaient lorsqu'ils étaient exprimés sur la même cellule, comme c'est le cas dans les lymphocytes CD8+ T_{EM} (Drouillard et al., 2018b). Pour cela, les Jurkat ont été transduites individuellement ou co-transduites avec des particules lentivirales induisant l'expression de S1PR1-FLAG ou S1PR5-FLAG. Les récepteurs portant le même tag, la transduction de chacun des deux types de particules virales a été validée grâce à l'expression de molécules fluorescentes différentes, la eCFP (S1PR1) et la ZsGreen (S1PR5) (Figure 49A). Des tests de migration en présence de différentes doses de S1P ont été réalisés sur les cellules ainsi obtenues. Comme observé précédemment, la migration des Jurkat surexprimant S1PR1 est plus

forte (Figure 49B). Si on regarde les résultats exprimés en index de migration, la migration des Jurkat non transduites (Jurkat WT) est plus faible. En input, elle est identique à celle des Jurkat S1PR5-FLAG et des Jurkat S1PR1-FLAG S1PR5-FLAG. La différence entre les deux modes de représentation est due au fait que la migration basale des cellules transduites est plus faible que celle des WT. Il est intéressant de constater que les réponses migratoires des Jurkat S1PR5-FLAG et des Jurkat S1PR1-FLAG S1PR5-FLAG sont plus ou moins similaires. On n'a donc pas ici d'effet additif des deux récepteurs, comme on aurait pu s'y attendre.

En considérant tous les résultats obtenus lors de notre étude comparative entre S1PR1 et S1PR5, nous en sommes arrivés à remettre en question la validité de notre modèle concernant S1PR5. En effet, il paraît surprenant que ce dernier, connu pour induire la migration des lymphocytes NK, n'augmente pas spécialement la migration des Jurkat en réponse au S1P. Notre hypothèse est que S1PR5 n'est pas - ou peu - fonctionnel chez les Jurkat. Ces dernières, qui ne l'expriment pas à l'état non transduit, n'ont peut-être tout simplement pas la machinerie cellulaire adaptée à la signalisation S1PR5-médiée.

3.5 Test de nouveaux modèles

Étant donné que les Jurkat n'expriment pas S1PR5, il est difficile de savoir si le peu d'effet observé est dû au récepteur en lui-même ou au type cellulaire utilisé. Comme l'ajout de S1PR1 exogène augmente clairement la migration des Jurkat, nous avons voulu vérifier s'il était possible de retrouver cet effet dans une lignée qui n'exprime pas du tout S1PR1 au départ, comme les HuT78 (Article 2, figure 1A). Notre hypothèse était que, si le S1PR n'était pas exprimé naturellement, il risquerait de ne pas être fonctionnel, et le faire exprimer ne suffirait pas car il manquerait la machinerie cellulaire en aval. Les HuT78 non transduites (HuT78 WT) ne migrent pas en réponse au S1P (Figure 50), et sur quatre expériences indépendantes, une seule indique une migration des HuT78 S1PR1-FLAG (Figure 50 – Réplicat 1). Cependant, comme le pourcentage de cellules ayant migré est très faible (moins de 1%), les différences observées ne sont pas très pertinentes. Les HuT78 ne sont donc pas un bon modèle pour étudier le rôle de S1PR1 dans la migration, et il est peu probable que le S1PR1 exogène y soit fonctionnel.

Pour étudier S1PR5 dans un modèle plus pertinent, nous avons voulu faire les mêmes tests dans une lignée de lymphocytes NK exprimant déjà S1PR5, les NK92. Cependant, l'expression de S1PR1 et S1PR5 après transduction est très faible et est quasiment totalement perdue à J+10 (données non montrées). Il faudrait refaire le test sur une autre lignée.

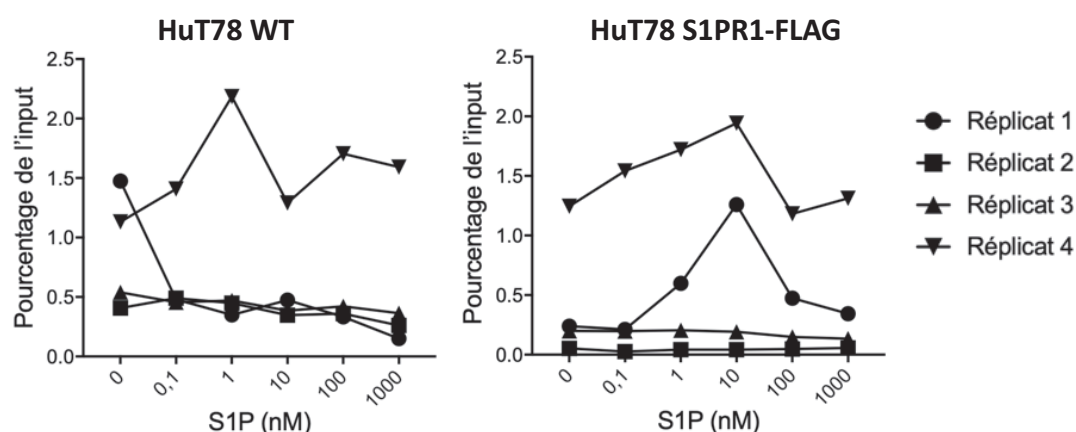


Figure 50 : Impact d'une surexpression de S1PR1 sur la migration des HuT78.

La lignée de lymphocytes T HuT78 a été transduite avec des particules lentivirales induisant l'expression de S1PR1-FLAG. Des tests de chimiotaxie ont été réalisés sur ces cellules après 2h de privation de sérum. L'analyse a été faite sur les cellules ZsGreen- pour les HuT78 non transduites (HuT78 WT), ou ZsGreen+ pour les HuT78 transduites. Le nombre de cellules ayant migré dans chaque condition a été normalisé avec le nombre de cellules ayant migré en absence de S1P (index de migration), ou a été comparé au nombre total de cellules déposées dans la chambre supérieure (pourcentage de l'input). Une courbe = une expérience (n=4 expériences avec duplicats).

3.6 Expression *in vivo* de S1PR5

Comme nous avons suggéré que S1PR5 était moins sensible à l'internalisation par le S1P, il serait intéressant de vérifier si c'est bien le cas *in vivo*. À ce jour, il n'existe pas d'anticorps spécifique de S1pr5 fonctionnel pour la cytométrie en flux. Nous avons donc généré des souris mutantes dans lesquelles le tag FLAG a été inséré en N-terminal de *S1pr5* par électroporation à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9. L'insertion du tag a été validée par séquençage. La procédure de CRISPR/Cas9 est réalisée à un stade de développement pluri-cellulaire, et la mutation n'a pas lieu dans toutes les cellules. De ce fait, la première génération de souris obtenues après ce type de procédure est dite « chimère », c'est-à-dire que les souris possèdent des cellules avec des génomes différents (portant la mutation ou non). Nous avons regardé chez une souris chimère comment était exprimé le FLAG à la surface des lymphocytes NK dans différents organes. Les cellules de sang, rate, moelle osseuse et ganglions ont été préparées puis marquées avec des anticorps pour identifier les lymphocytes NK et détecter le FLAG. La rate d'une souris non taguée a été utilisée en contrôle négatif, elle détermine le bruit de fond de l'anticorps anti-FLAG.

L'analyse en cytométrie en flux révèle des niveaux faibles d'expression du FLAG. Cependant, si on calcule la MFI (moyenne géométrique) du signal pour différentes populations, on peut observer certaines différences d'expression du tag (Figure 51).

Les lymphocytes B constituent un contrôle négatif car ils n'expriment jamais S1pr5, ce qui est bien le cas ici. Les lymphocytes T expriment légèrement S1pr5, probablement par les populations de lymphocytes T_{EM} CD8+. La population de monocytes, qui devrait exprimer S1pr5 (Debien et al., 2013), n'est pas exploitable du fait d'un problème de compensation entre les anticorps anti-FLAG (APC) et anti-Cd11b (APC-R700). Concernant les lymphocytes NK, les résultats sont surprenants. En effet, l'expression de S1pr5 est acquise au cours de leur maturation (Walzer et al., 2007). En conséquence, on attendrait une expression globalement plus forte dans les lymphocytes NK matures (Cd27-) que dans les immatures (Cd11b-). De plus, il semble qu'il y ait des variations d'expression de S1PR5 entre les différents organes étudiés, ce qui contredirait l'hypothèse selon laquelle S1pr5 n'est pas internalisé. Cependant, on ne peut conclure en se basant uniquement sur ces données, qui ont été obtenues sur une seule souris *S1pr5*-FLAG chimère. Il faudra refaire ces mesures sur des souris hétérozygotes et homozygotes pour la mutation, lorsque celles-ci seront disponibles.

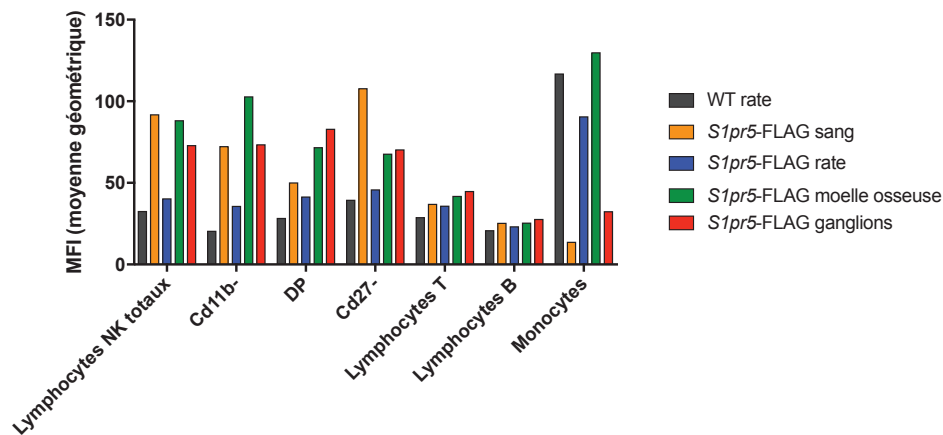


Figure 51 : Expression *in vivo* de S1pr5 dans une souris *S1pr5*-FLAG chimère.

Les cellules du sang, de la rate, de la moelle osseuse et des ganglions d'une souris S1PR5-FLAG chimère ont été marqués avec des anticorps spécifiques du tag FLAG. La MFI (moyenne géométrique) du signal obtenu pour le tag FLAG a été calculée et comparée à celle obtenue dans les cellules d'une rate de souris non taguée.

Finalement, l'ensemble de ces résultats suggère que S1PR1 et S1PR5 possèdent des caractéristiques différentes, en tout cas dans notre modèle cellulaire *in vitro*. En particulier, S1PR1 est sensible à l'internalisation médiée par le S1P et induit une forte migration en réponse au S1P, tout en diminuant la dose nécessaire pour une migration maximale. S1PR5 quant à lui n'est pas internalisé en présence de S1P, et semble surtout diminuer la dose de S1P requise pour le pic de migration, tout en affectant peu l'amplitude de la migration.

MATERIEL ET METHODES COMPLEMENTAIRES

Souris

Les souris C57BL/6 et BALB/c ont été achetées chez les laboratoires Charles River (L'Arbresle, France) et élevées au Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (Lyon, France). Les souris *S1pr2*-KO ont été décrites dans la littérature (Ishii et al., 2002). Les souris mutantes *S1pr5*-FLAG ont été générées sur fond génétique C57BL/6 au Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (Lyon, France). Le tag FLAG 5'-CGCAGCAGCCCCGGGCUCCAU-3' a été inséré après le codon start du gène *S1pr5* par électroporation à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9. La séquence de l'ARN guide a été générée avec l'outil CRISPOR (Tefor). Les oligonucléotides utilisés ont été achetés chez Eurogentec (Liège, Belgique). Toutes les expérimentations ont été menées en accord avec les recommandations françaises du Guide de l'évaluation éthique des études sur animaux et la directive européenne 86/609/CEE.

Lignée cellulaire endothéliale

La lignée endothéliale HMEC-1 (ATCC, Paris, France) nous a été généreusement donnée par l'équipe du Pr Olivier Thaumat (Lyon, France). Les cellules ont été cultivées dans un milieu complet pour la croissance des cellules endothéliales (PromoCell) à 37°C et 5% CO₂. Lors des passages, les cellules HMEC-1 adhérentes ont été lavées avec 1 mL de DPBS 1X et dissociées de leur support avec 2-3 mL de trypsine pendant 5-15 min à 37 °C. La réaction a été stoppée avec 8 mL de milieu. Les cellules dissociées ont été centrifugées à 1500 RPM pendant 5 min, puis resuspendues et diluées au 1/5^{ème} dans du milieu de culture frais.

Anticorps

Tous les anticorps utilisés ont été achetés chez BD Biosciences (San Jose, CA), eBioscience (San Diego, CA), Beckman-Coulter (Miami, FL) et BioLegend (San Diego, CA).

Phénotypage des souris mutantes

Souris S1pr2-KO

Des suspensions cellulaires obtenues à partir de rates, ganglions, poumons, intestins, foies, moelle osseuse et sang de souris *S1pr2*-KO et BALB/c ont été marquées avec des anticorps dirigés contre Cd4 (clone GK1.5), Cd8 (clone 53-6.7), Cd44 (clone IM7), Cd62l (clone MEL-14), Nk1.1 (clone PK136), Cd45 (clone 30-F11). Les marquages ont été analysés par cytométrie en flux (LSR Fortessa, BD Biosciences, San Jose, CA) puis avec le logiciel FlowJo.

Souris S1pr5-FLAG

Des suspensions cellulaires obtenues à partir de rates, ganglions, moelle osseuse et sang de souris *S1pr5-FLAG* et C57BL/6 ont été marquées avec des anticorps dirigés contre Cd3 (clone 145-2C11), Nk1.1 (clone 500A2), Cd11b (clone M1/70), Cd27 (clone LG.3A10) et FLAG (clone L5). Les marquages ont été analysés par cytométrie en flux (LSR Fortessa) puis avec le logiciel FlowJo.

Préparation des lymphocytes primaires humains

Tout le matériel biologique a été fourni après consentement éclairé des patients, et cette étude a été réalisée en accord avec la Déclaration d'Helsinki de l'Association Médicale Mondiale. Les amygdales pédiatriques provenant de patients ayant subi une amygdalectomie, ainsi que les rates, ont été coupées en morceaux à l'aide d'un scalpel, puis écrasées à travers un filtre cellulaire de 70 μm afin d'obtenir une suspension cellulaire. Le sang périphérique humain et la moelle osseuse proviennent de donneurs sains. Un ficoll a été réalisé sur les cellules qui ont ensuite été lavées plusieurs fois dans du milieu RPMI 1640 GlutaMAX medium (Gibco, Carlsbad, CA) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Dutscher, Brumath, France) inactivé à 56°C, 100 U/mL de pénicilline/streptomycine (P/S) (Gibco, Carlsbad, CA) et 10 mM d'hepes.

Tests de chimiotaxie

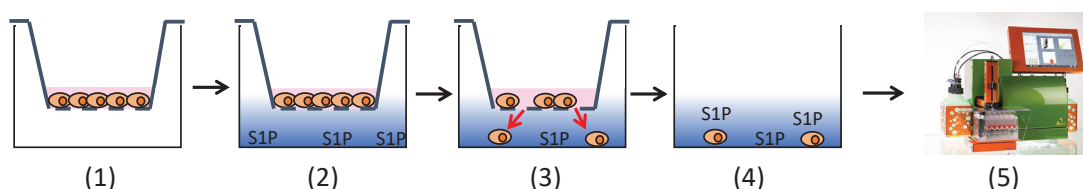


Figure 52 : Schéma expérimental des tests de chimiotaxie

(1) Les plaques Transwell utilisées sont composées d'une chambre inférieure et d'une chambre supérieure amovible dont le fond est une membrane poreuse. Les cellules sont incubées deux heures dans la chambre supérieure à 37°C et 5% de CO₂. (2) Le S1P (ou autre molécule chimioattractante) dilué dans du milieu est déposé dans la chambre inférieure. (3) Les cellules migrent pendant deux heures. (4) La chambre supérieure est ôtée. (5) Les cellules présentes dans la chambre inférieure seront comptées au cytomètre en flux.

Lignées cellulaires

Les tests de chimiotaxie ont été réalisés comme décrits dans la section matériel et méthodes de l'article 2. Pour l'expérience avec le S1P (Tocris, Bristol, UK) dans la chambre supérieure, la procédure était la même qu'avec le FTY720. Pour les cinétiques de privation de sérum, nous avons fait varier le temps de privation de sérum (0h, 2h ou

4h). Pour la migration transendothéliale, $7,5 \cdot 10^4$ cellules HMEC-1 ont été mises en culture dans la chambre supérieure de la plaque transwell. Trois jours plus tard, le milieu de culture a été enlevé, la chambre supérieure a été lavée trois fois avec 75 μ L de DPBS 1X, et le test de chimiotaxie a été réalisé comme décrit précédemment.

Cellules primaires

Les tests de chimiotaxie sur cellules primaires murines ont été réalisés dans des plaques transwell 24 puits (Corning, Cambridge, USA) avec inserts de 5 μ m. 10^6 cellules resuspendues dans 100 μ L de milieu de chimiotaxie (RPMI 1640 GlutaMAX additionné de 100 U/mL de P/S et de 4 mg/mL de BSA fatty acid-free (Sigma, St-Louis, USA)) ont été incubées 2h à 37°C et 5% CO₂ dans la chambre supérieure de la plaque. 600 μ L de milieu de chimiotaxie seul ou avec S1P ont ensuite été ajoutés dans la chambre inférieure. Les plaques ont été incubées à 37°C pour une migration de 2h. Les cellules de la chambre inférieure ont été culottées 2 min à 1500 RPM et 4°C. À cette étape, les cellules ont été marquées 30 min avec des anticorps dirigés contre Cd3 (clone 500A2), Cd4 (clone GK1.5), Cd8 (clone 53-6.7), Cd44 (clone IM7), Cd62l (clone MEL-14), Nk1.1 (clone PK136), Cd27 (clone LG.3A10), Cd11b (clone M1/70). Les cellules ont été comptées par cytométrie en flux (MACSQuant, Miltenyi Biotec) et les résultats analysés avec le logiciel FlowJo. Les résultats ont été soit normalisés avec le nombre de cellules ayant migré en absence de S1P (index de migration), soit comparés avec le nombre total de cellules déposées dans la plaque (pourcentage de l'input).

Transduction lentivirale

La transduction des Jurkat avec les particules lentivirales induisant l'expression de S1PR5-FLAG a été réalisée selon le protocole décrit dans l'article 2. S1PR5 a été cloné dans le plasmide lentiviral avec les amorces suivantes : (forward) 5'-GCGCTTAATTAAACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGAGAGTGGACTGCTGCGGCC-3', (reverse) 5'-GCGCACGCGTTCAGTCGGCGGCGGGTTCGG-3'.

Génération d'anticorps anti-S1PR2

Criblage

Les anticorps anti-S1PR2 ont été générés comme décrit dans la Figure 38. Le processus de génération est réalisé par Biotem (Marseille, France) et nous validons les différentes étapes par criblage FACS. Des souris ont été immunisées avec un ou plusieurs peptide(s) simulant une partie du domaine extracellulaire de S1PR2. Le sérum d'une de ces souris a été sélectionné (marquage positif de S1PR2-FLAG par cytométrie en flux). Des hybridomes ont été générés par fusion entre les lymphocytes B du sérum sélectionné et des cellules de myélome. Les hybridomes positifs passent par plusieurs phases de sous-clonage, afin d'obtenir un clone le plus pur possible. Les clones finaux seront amplifiés et serviront à la production d'anticorps monoclonaux anti-S1PR2.

Test des surnageants de clones sur Jurkat S1PR2-FLAG

Les Jurkat S1PR2-FLAG ont été privées de sérum pendant 4h, puis marquées avec les différents sérums ou surnageants de culture d'hybridomes, suivi d'un anticorps secondaire anti-IgG murin (Invitrogen, Carlsbad, CA). Les résultats ont été analysés par cytométrie en flux (MACSQuant) et avec le logiciel FlowJo. Nous avons comparé le marquage entre les Jurkat ZsGreen- (WT) et ZsGreen+ (S1PR2-FLAG).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Au cours de ces travaux, nous nous sommes intéressés au rôle des S1PR dans la migration des lymphocytes T en réponse au S1P ; en particulier aux différences entre S1PR1 et S1PR2, et entre S1PR1 et S1PR5. Nous avons montré dans un premier temps que, chez l'homme, les lymphocytes T naïfs des amygdales migraient en réponse au S1P d'une façon dépendante de S1PR1, alors que la migration des lymphocytes T mémoires était inhibée par S1PR2 (Article 1). La migration des lymphocytes NK est quant à elle médiée par S1PR5 (Drouillard et al., 2018a). Le rôle des S1PR dans la circulation des lymphocytes T ayant été très peu étudié chez l'homme, il était intéressant de poursuivre cette étude afin d'essayer de démontrer d'une façon plus générale l'implication de S1PR1, S1PR2 et S1PR5 dans la migration des lymphocytes T humains. En outre, les potentielles interactions entre les S1PR co-exprimés par les cellules constituent un point quasiment inexistant dans la littérature.

Les études chez l'homme sont limitées par plusieurs facteurs. Tout d'abord, il est parfois compliqué d'obtenir des prélèvements, et la fréquence de ces derniers est souvent aléatoire. Ensuite, les cellules primaires sont plus difficiles à garder en culture et à modifier génétiquement, ce que nous avons besoin de réaliser pour ce projet. Enfin, il est bien évidemment impossible de faire des études *in vivo* dans ce contexte, alors que cela est possible chez l'animal. C'est d'ailleurs probablement pour ces raisons que la grande majorité des études sur les S1PR ont été conduites chez le rongeur.

De ce fait, on ne retrouve que très peu d'études sur les S1PR chez l'homme. Outre deux études citées précédemment (Blankenbach et al., 2016; Davis et al., 2005), un autre article décrit des expérimentations similaires afin de mieux comprendre le rôle des S1PR dans la sortie des lymphocytes T humains du thymus (Resop et al., 2016). Il en ressort que S1PR1 est essentiel à la migration des thymocytes matures humains en réponse au S1P. Ces derniers expriment de forts niveaux de *S1PR1*, mais aussi de *S1PR2*. Il est également suggéré, de façon très indirecte, que S1PR2 pourrait inhiber la migration des thymocytes matures. Les autres rares études que l'on trouve chez l'homme sont des études *in vitro*, principalement dans des lignées cellulaires non lymphocytaires comme les HEK293T, qui valident l'internalisation (par immunofluorescence ou western-blot) de S1PR1 humain en présence de S1P (Liu et al., 1999; Oo et al., 2007) mais n'apportent pas d'information sur son rôle dans la migration. Un article explique que la migration au S1P de différentes lignées dérivées de lymphomes T humains dépend fortement de leur expression endogène de S1PR1 (Messias et al., 2016), mais les auteurs ne s'intéressent pas à S1PR2 et S1PR5, ces derniers n'étant presque pas exprimés dans les lignées choisies. Enfin, une unique étude tente de caractériser l'impact d'une co-expression de deux S1PR sur la migration, mais dans des lignées de lymphocytes B (Sic et al., 2014).

Notre étude apporte donc de nouveaux éléments dans la compréhension du rôle des S1PR dans la circulation des lymphocytes T chez l'homme. En effet, nous avons montré que S1PR1 et S1PR2 contrôlaient la réponse au S1P des lymphocytes T de l'amygdale, un OLS. Puis, contrairement à la plupart des données de la littérature, nous avons regardé leur impact dans une lignée T, ce qui permet de suggérer que les résultats obtenus pourraient être appliqués aux lymphocytes T *in vivo*. Le modèle de S1PR tagués nous a permis de visualiser directement l'expression membranaire des S1PR par cytométrie en flux, chose auparavant impossible. Enfin, si l'effet combiné de S1PR1 et S1PR2 sur la migration a été précédemment étudié dans des lignées de lymphocytes B humains (Sic et al., 2014), cela n'avait jamais été fait dans des lymphocytes T, ni pour S1PR5.

I – Les Jurkat S1PR-FLAG : un modèle pratique mais imparfait

La raison du choix d'une étude *in vitro* plutôt que l'exploitation d'un modèle murin est simple : bien que de nombreuses études existent déjà chez la souris, la possibilité d'une application chez l'homme des processus mis en évidence par ce biais n'a pas encore été démontrée. En effet, les systèmes immunitaires humains et murins ne sont pas totalement identiques, et les S1PR humains et murins pas totalement homologues : 94,2% d'homologie protéique entre l'homme et la souris pour S1PR1, 90,7% pour S1PR2, et 86,3% pour S1PR5 (d'après un BLAST sur UniProt). On ne peut donc pas exclure la possibilité d'une fonction différente des S1PR entre les deux espèces. D'ailleurs, nos expériences préliminaires ne montraient pas d'inhibition de migration des lymphocytes T mémoire murins, contrairement à ce qui se passe chez l'homme (Figure 41). De plus, l'intérêt de notre étude, qui se démarque des études principales sur le rôle des S1PR dans la migration des lymphocytes T, est justement d'être menée chez l'homme et non chez la souris. En effet, les observations que nous avons faites précédemment sur les lymphocytes d'amygdales (Article 1) reposent sur l'utilisation d'inhibiteurs dont la spécificité peut être remise en question. Par la suite nous aurons forcément besoin de valider notre modèle *in vivo*, mais il était essentiel de passer par des lignées humaines dans un premier temps pour confirmer les observations faites sur cellules primaires.

Le choix de la lignée pour l'établissement de notre modèle s'est fait après plusieurs tests sur différentes lignées. Comme tout modèle *in vitro*, ce dernier n'est pas parfait mais nous avons fait ce choix en fonction de nos objectifs. Notre idée initiale était d'utiliser une lignée n'exprimant pas – ou faiblement – les S1PR qui nous intéressaient. Cependant, nous avons vite constaté que l'étude de la migration sur des lignées ne migrant presque pas (comme les CEM ou les HuT78) ne permettait pas de regarder l'impact d'une surexpression de l'un des récepteurs. En outre, une lignée présentant une réponse migratoire au S1P mais trop fragile (comme les Ly12) rendait difficiles les

modifications génétiques nécessaires à l'établissement du modèle. Ces observations ont restreint notre choix aux Jurkat, qui présentent l'avantage d'être des cellules robustes migrant fortement en réponse au S1P (Article 2, figure 1B-C), mais également le désavantage d'exprimer de hauts niveaux d'ARNm de *S1PR1* et *S1PR2* (Article 2, figure 1A).

1.1 Avantages du modèle

Les cellules Jurkat sont résistantes à la fois à l'infection par particules lentivirales et à la nucléofection par électroporation. Elles poussent mieux dans une culture à forte concentration mais repartent sans trop de difficultés lors d'un sous-clonage. Nous avons décidé de travailler sur des Jurkat transduites avec des particules lentivirales afin d'induire la surexpression de l'un des S1PR. Ce modèle nous a permis d'étudier le rôle des S1PR humains dans les lymphocytes T sans passer par des cellules primaires. L'avantage principal des lignées générées est la possibilité de contrôler directement l'expression membranaire des S1PR grâce au FLAG inséré en N-terminal. Ce dernier ne semble pas impacter l'effet des S1PR sur la migration. En effet, l'équipe de J. Cyster a déjà tagué S1pr1 en N-terminal dans des lymphocytes T primaires murins, et le S1pr1-FLAG semble fonctionnel après ré-injection *in vivo* (Lo et al., 2005).

1.2 Limites du modèle

1.2.1 Validité physiologique d'une étude *in vitro*

Les résultats générés lors d'une étude *in vitro* sont toujours à prendre avec du recul. Les Jurkat sont une lignée issue d'un lymphome T, qui par définition a subi des mutations par rapport aux lymphocytes T primaires. Si ces deux types de cellules partagent des caractéristiques moléculaires communes, il n'en demeure pas moins que des différences peuvent exister au niveau de la machinerie cellulaire, notamment au niveau de la signalisation induite par les S1PR. Par exemple, entre deux lignées cellulaires T, les résultats obtenus ne sont pas toujours totalement identiques : lors de la mise au point du protocole de mesure de l'externalisation des S1PR tagués, nous avons fait un premier test sur deux lignées sans pré-incuber les cellules dans du S1P sur la nuit (Figure 53). Les profils d'externalisation des trois S1PR semblent aller dans le même sens dans les deux lignées, mais dans les CEM un plateau est très vite atteint (au bout d'une heure), alors que dans les Jurkat l'expression de S1PR1 continue d'augmenter après 4h de privation de sérum (remarque : les résultats présentés ici ne sont pas tout à fait identiques à ceux présentés dans la partie « Résultats », car le protocole utilisé diffère légèrement). Les résultats présentés dans cette étude sont donc spécifiques de notre modèle et il conviendra de les valider dans d'autres modèles si l'on souhaite les généraliser et étendre nos hypothèses à l'homme.

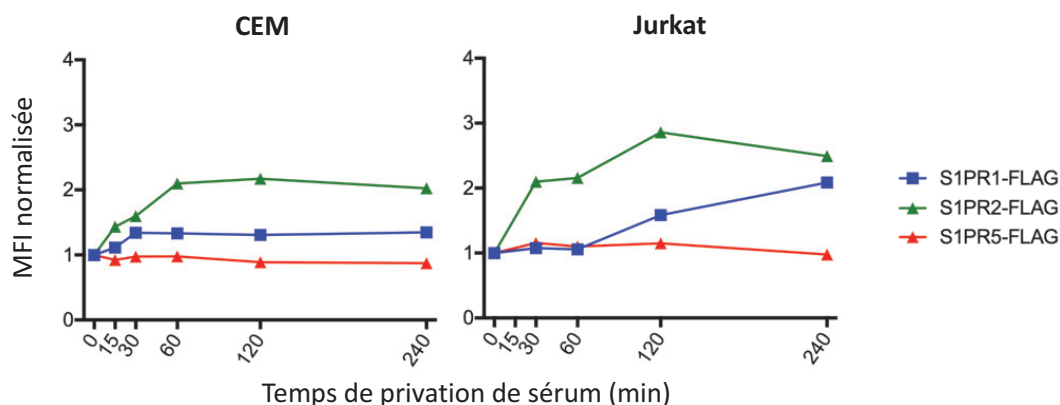


Figure 53 : Externalisation de S1PR1-, S1PR2- et S1PR5-FLAG lors d'une privation de sérum, dans les CEM ou les Jurkat.

Les CEM et les Jurkat S1PR1-FLAG, S1PR2-FLAG et S1PR5-FLAG ont été incubées dans du milieu sans sérum pendant différents temps. L'expression membranaire du FLAG a été mesurée par cytométrie en flux. La MFI a été calculée avec le logiciel FlowJo, et les valeurs de chaque condition ont été normalisées avec la valeur au point 0 min. n=1.

1.2.2 Des paramètres difficilement contrôlables

Expression endogène des S1PR

Notre modèle cellulaire présente certains paramètres difficilement contrôlables et dont on ne peut s'affranchir. En particulier, les Jurkat expriment les ARNm de *S1PR1*, *S1PR2* et *S1PR3* de façon endogène (Article 2, figure 1A). Nous avons montré statistiquement que seul S1PR1 influençait la migration au S1P de nos lignées, on ne peut donc pas ignorer un éventuel impact de ce dernier dans les Jurkat S1PR2-FLAG et S1PR5-FLAG, d'autant plus qu'il nous est impossible d'évaluer son expression membranaire. Une solution serait de supprimer ce gène par CRISPR/Cas9. Nous avons fait plusieurs tentatives mais n'avons pu obtenir que des KO hétérozygotes (données non montrées), suggérant soit que nos ARN guides n'étaient pas adaptés, soit que le KO homozygote était létal pour les Jurkat. Ce dernier point est à considérer, étant donné que *S1pr1* est impliqué dans la survie des lymphocytes T naïfs murins (Mendoza et al., 2017). Cependant, nous n'avons pour l'instant pas insisté sur cet aspect, et la maîtrise de la technologie de CRISPR/Cas9 ayant progressé dans notre équipe depuis ces premiers tests, il serait intéressant de retenter l'expérience.

Contrôle de l'expression des S1PR tagués

L'utilisation du FLAG et de la ZsGreen nous permet de vérifier l'expression des récepteurs tagués, mais pas de contrôler nous-même les niveaux d'expression. On

pourrait envisager l'utilisation d'un vecteur lentiviral inducible par la doxycycline afin de faire varier l'expression des récepteurs dans les lignées.

Présence de Jurkat ZsGreen- parmi les cellules transduites

On observe systématiquement la présence de Jurkat ZsGreen- FLAG- (n'exprimant ni la molécule fluorescente de la particule lentivirale, ni le FLAG) parmi nos cellules transduites (Article 2, figure 2A). De plus, le pourcentage de Jurkat ZsGreen+ diminue au cours du temps (Article 2, figure 2B). Ceci suggère une possible sélection négative des Jurkat non-transduites, et pose la question d'une éventuelle toxicité de la surexpression de certains S1PR et/ou de l'expression de la ZsGreen, comme c'est le cas pour la GFP par exemple (Ansari et al., 2016). Pour l'instant, les données de la littérature ne rapportent pas de variation des niveaux de ZsGreen au cours du temps dans les quelques lignées testées (Richards et al., 2002). Dans notre cas, même après tri des Jurkat strictement ZsGreen^{high}, on retrouve après quelques jours de culture des cellules ZsGreen-. Y a-t-il une sélection négative à cause de la toxicité, avec perte du génome lentiviral, ou est-ce une variation cyclique de l'expression du vecteur, qui expliquerait l'existence de plusieurs niveaux d'expression du FLAG au sein d'une même culture de cellules ?

Existence potentielle d'une compétition entre les sous-populations lymphocytaires

In vivo, les lymphocytes T exprimant différentes combinaisons de S1PR sont probablement soumis à un effet de compétition pour la détection du S1P. Afin de reproduire cet effet, nous avons fait le choix de faire nos tests de chimiotaxie en multiplex, en essayant de respecter un ratio équivalent entre chaque lignée.

Validité du contrôle Jurkat WT

Les cellules contrôles Jurkat WT utilisées dans notre étude sont des Jurkat non-transduites. On ne peut pas négliger un effet de l'infection en elle-même sur les cellules transduites, même si cet effet est supposé faible.

1.3 Modèle de chimiotaxie

La question se pose également de la pertinence physiologique de notre modèle de chimiotaxie. *In vivo*, les lymphocytes n'ont jamais à passer à travers des pores aussi gros (8 µm pour les lignées, 5 µm pour les cellules primaires), et leur migration est influencée par toute sorte de signaux environnementaux, notamment *via* leur interaction avec les cellules endothéliales qu'ils traversent. Le groupe de J. Bromberg a mis au point un modèle de transmigration à travers des cellules endothéliales (Xiong et al., 2017). D'après leur article, les lymphocytes T primaires migrent de façon unidirectionnelle (basal vers apical) à travers les cellules endothéliales lymphatiques, alors que leur migration est bi-directionnelle à travers les cellules endothéliales

sanguines. Nous avons fait un premier test avec les HMEC-1, une lignée humaine de cellules endothéliales microvasculaires de derme que nous avons à notre disposition : on constate une inhibition globale de la migration au S1P (Figure 54) par rapport à la migration sur plastique (données non montrées, similaires aux données de la partie « Résultats »). À l'inverse de nos résultats, le groupe de Bromberg montre que les lymphocytes T Cd4⁺ murins et T_{eff} humains migrent beaucoup moins en réponse au S1P à travers le plastique des plaques transwell (environ 5% de l'input) qu'à travers un tapis de cellules endothéliales lymphatiques (Xiong et al., 2019). Cependant, les cellules utilisées ne sont pas les mêmes. De plus, notre test de chimiotaxie a été réalisé sans être sûr de l'état de la couche de cellules endothéliales, qui n'était pas visible au microscope : les cellules étaient-elles à confluence, ou le tapis cellulaire trop épais ? Il est possible également que la couche de cellules endothéliales empêche le S1P de diffuser aussi facilement qu'avec le plastique seul, et qu'il faille utiliser plus de S1P pour que les cellules détectent des doses équivalentes à celles sans cellules endothéliales. Dans tous les cas, ce protocole est à mettre au point car il est évident qu'une mise en situation plus physiologique apportera des résultats plus pertinents.

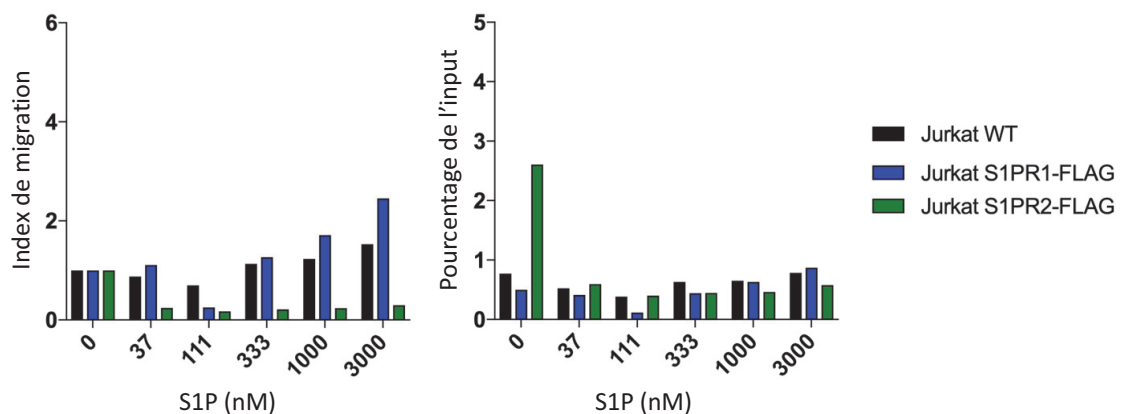


Figure 54 : Migration S1P des Jurkat WT, S1PR1-FLAG et S1PR2-FLAG à travers des cellules endothéliales HMEC-1.

Les cellules HMEC-1 ont été cultivées au fond de la chambre supérieure des puits d'une plaque transwell pendant trois jours. Les cellules Jurkat ont été marquées avec des anticorps anti-CD45 couplés à des fluorochromes différents afin de les différencier, puis mixées à ratio égal. Des tests de chimiotaxie dans les plaques avec HMEC-1 ont été réalisés sur ces cellules après 2h de privation de sérum. L'analyse a été faite sur les cellules ZsGreen- pour les Jurkat WT, ou ZsGreen+ pour les Jurkat transduites. Le nombre de cellules ayant migré dans chaque condition a été normalisé avec le nombre de cellules ayant migré en absence de S1P (index de migration), ou a été comparé au nombre total de cellules déposées dans la chambre supérieure (pourcentage de l'input). n=1

II – S1PR1 et S1PR2, un rôle vraiment antagoniste ?

Nous nous sommes intéressés aux rôles de S1PR1 et S1PR2 dans la migration des lymphocytes T. Nous avons montré que ces deux récepteurs étaient sensibles à l'internalisation par le S1P, et qu'ils n'induisaient pas le même type de réponse migratoire en présence de S1P. S1PR1 et S1PR2 ont déjà montré des rôles antagonistes dans plusieurs domaines cellulaires, notamment dans l'angiogenèse (Allende et al., 2003; Du et al., 2010), la perméabilité vasculaire (Sanchez et al., 2007) et dans la migration lymphocytaire (Drouillard et al., 2018b; Sic et al., 2014). Pourtant, dans notre modèle, cette notion d'antagonisme est à nuancer.

1.1 S1PR1 et S1PR2 sont internalisés par le S1P

Nos résultats montrent une internalisation très rapide de S1PR1 et S1PR2 lorsqu'ils sont mis en présence de S1P, avec une réduction de l'expression de S1PR2 de 80% en 15 min (Article 2, figure 2D). L'externalisation en revanche est un peu plus lente dans le temps. Il était déjà connu que le S1PR1 humain était internalisé par le S1P, avec un $T_{1/2}$ établi à environ 15 min (Liu et al., 1999; Oo et al., 2007), ce qui correspond à nos données. L'externalisation avait été estimée plus rapide, avec un $T_{1/2}$ d'environ 30 min dans des HEK293T, contre au moins 2-3h dans notre modèle (Article 2, figure 2E). On ne trouve quasiment pas de données concernant l'internalisation et l'externalisation de S1PR2 dans la littérature, mais il a été montré qu'il pouvait être internalisé par le S1P (Wang et al., 2018). Le mécanisme impliqué dans l'internalisation reste inconnu. Comme expliqué en introduction, il est possible que celle-ci passe par une phosphorylation médiée par GRK2, comme pour S1PR1 (Mendelson et al., 2013) : S1PR2 possède une série de sérine en C-terminal, mais plus éloignée de l'extrémité de la protéine que S1PR1 (Figure 55). Ceci pourrait expliquer les différences de cinétique entre les deux récepteurs : S1PR1, bien qu'ayant plus d'affinité pour le S1P que S1PR2 (van Brocklyn et al., 1999; Kon et al., 1999; Lee et al., 1998; Sato et al., 2000), semble moins sensible à l'internalisation par le S1P ; son internalisation et son externalisation suivent une cinétique plus lente (Article 2, figure 2D-E). On pourrait facilement vérifier l'implication de GRK2 par CRISPR/Cas9.

Les lymphocytes T naïfs qui entrent dans les OLS y transitent 12h à 24h (Mandl et al., 2012). Ce temps est nécessaire pour leur permettre de scanner les complexes CMH-peptides présentés par les APC. Les lymphocytes T qui entrent dans les OLS n'expriment pas S1PR1 à leur surface (Arnon et al., 2011). Le fait que S1PR1 soit ré-externalisé lentement retarderait son expression et par conséquent la capacité de sortie des lymphocytes T naïfs, leur permettant de rester un temps suffisant dans les OLS. Au contraire, l'internalisation de S1PR1 et S1PR2 est rapide, probablement pour qu'une fois dans le sang les lymphocytes ne répondent plus aux signaux de S1P. En effet, les lymphocytes T naïfs qui passent dans le sang n'ont pas d'avantage à y rester

trop longtemps car leur objectif est de se rendre le plus vite possible dans un autre OLS. Or, l'internalisation de S1PR1 est essentielle à la sortie des lymphocytes T naïfs du sang (Arnon et al., 2011).

Pour S1PR2, la cinétique d'internalisation/externalisation du récepteur est plus difficile à interpréter. Si on considère que S1PR2 inhibe la migration des lymphocytes T primaires alors que S1PR1 l'induit (Article 1), on pourrait penser qu'une diminution de S1PR1 serait associée à une augmentation (ou un maintien) du S1PR2 en surface afin d'assurer la rétention des lymphocytes dans les tissus. Cependant, comme nous le discuterons par la suite, la fonction de S1PR2 ne semble pas totalement inhibitrice de la migration, mais plutôt inhibitrice à faibles doses de S1P et inductrice à fortes doses (Article 2, figure 3A-B). Ainsi, à l'entrée dans les ganglions où la concentration en S1P est faible, S1PR2 serait ré-exprimé plus vite que S1PR1, ce qui pourrait augmenter la rétention des lymphocytes T dans le tissu. À l'inverse, une fois dans le sang, où la concentration en S1P est forte, S1PR2 serait internalisé très vite, pour supprimer la capacité migratoire des lymphocytes T. Ces suppositions restent hypothétiques et il n'est pas non plus exclu que ces caractéristiques de S1PR2 soient en fait importantes dans une fonction cellulaire autre que la migration.

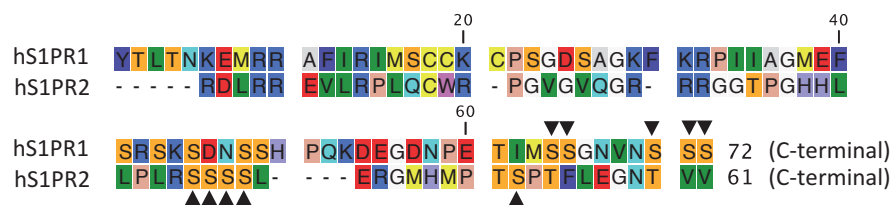


Figure 55 : Comparaison des domaines intracellulaires 4 (correspondant à la queue C-ter) de S1PR1 et S1PR2.

Pour S1PR1, on retrouve 5 sérines sur les 10 derniers acides aminés de la protéine, alors que pour S1PR2 les 5 premières sérines sont plus éloignées de l'extrémité C-terminale (flèches noires).

1.2 Quel(s) rôle(s) jouent S1PR1 et S1PR2 dans la migration des Jurkat ?

1.2.1 Rôle individuel des récepteurs

La surexpression de S1PR1 dans les Jurkat augmente fortement leur migration et leur sensibilité au S1P : le pic de migration est atteint pour des concentrations en S1P plus faible que pour les Jurkat WT (Article 2, figure 3A-B). Ces résultats sont en adéquation avec les données de la littérature : chez l'homme, les lymphocytes T naïfs primaires des amygdales et les thymocytes matures migrent *ex vivo* en réponse au S1P, grâce à S1PR1 (Article 1, figures 1 et 2 ; Resop et al., 2016), et les lymphocytes T *S1pr1*^{-/-} murins sont plus retenus dans les ganglions (Lo et al., 2005). Les données obtenues permettent de modéliser une migration dépendante de la dose (Article 2,

figure 4). En revanche, l'effet de S1PR2 est plus surprenant. On n'observe pas l'inhibition de migration globale que l'on peut voir avec les lymphocytes T mémoires humains (Article 1, figure 1) et les lymphocytes T murins (Green et al., 2011; Laidlaw et al., 2019; Moriyama et al., 2014; Muppidi et al., 2014). Le S1PR1 endogène est toujours présent dans les Jurkat S1PR2-FLAG, à des niveaux inconnus et non contrôlables, ce qui empêche peut-être S1PR2 de s'exprimer pleinement. De plus, le modèle utilisé ici est différent des cellules primaires, il peut donc y avoir d'autres facteurs moléculaires qui entrent en jeu et font varier la réponse migratoire. L'idéal serait, encore une fois, de travailler dans une cellule totalement vierge de S1PR, pour s'affranchir de potentielles interactions. Une autre idée intéressante serait de co-exprimer CD69 et S1PR2 dans une même lignée. CD69 induisant l'internalisation de S1PR1 (Bankovich et al., 2010; Shioh et al., 2006), on pourrait avoir une inhibition du S1PR1 endogène et ainsi voir l'effet de S1PR2 seul.

On constate donc que, à faibles doses de S1P, S1PR2 inhibe la migration des Jurkat, alors qu'à forte dose il l'augmente, induisant une migration équivalente voire supérieure à celle générée par S1PR1 (Article 2, figure 3A-B). Cette constatation est en opposition totale avec les données de la littérature, qui parlent d'inhibition de migration, voire de chimiorépulsion, mais jamais d'induction de migration lorsqu'il s'agit de S1PR2. Le groupe de M. Poznansky a montré *ex vivo* un phénomène similaire en regardant l'effet de Cxcl12 sur des thymocytes murins : à faibles concentrations de Cxcl12, les thymocytes migrent en direction de la chimiokine, alors qu'avec une forte dose de Cxcl12 la migration sur plaque transwell est inhibée (migration inférieure à la migration spontanée) et les thymocytes s'éloignent de Cxcl12 lors des tests en plaque de méthylcellulose (Poznansky et al., 2002; Vianello et al., 2005). Cette notion d'inhibition de migration (voire de répulsion) est différente de la réduction de migration que l'on observe lorsqu'un récepteur est inactivé par de trop fortes doses de son ligand. Dans notre cas, ce phénomène intervient même plutôt à faibles concentrations, ce qui est intrigant. Plusieurs hypothèses sont envisageables :

- 1) Tout simplement, comme S1PR2 est très vite internalisé (Article 2, figure 2C), sa fonction serait aussi inactivée très vite. Ainsi, dès 100 nM, on n'aurait plus du tout d'effet de S1PR2, ce qui permettrait au S1PR1 endogène, internalisé moins vite, de s'exprimer et d'induire la migration. Dans ce cas, l'effet de S1PR2 à faible dose serait supérieur à celui de S1PR1 puisqu'on ne voit pas de migration du tout à 37 nM.
- 2) L'effet du S1P sur S1PR2 serait différent en fonction des doses détectées. Techniquement, S1PR2 est capable de recruter les protéines de la famille $G_{i/o}$ pour activer la migration *via* RAC (Lepley et al., 2005; Windh et al., 1999), ou $G_{12/13}$ pour l'inhiber *via* RHO (Sugimoto et al., 2003; Takashima et al., 2008). On peut imaginer que les faibles concentrations en S1P induisent la signalisation RHO *via* S1PR2, alors qu'à forte concentration S1PR2 serait internalisé, ce qui activerait une autre voie de signalisation en recrutant une autre protéine G, qui cette fois stimulerait

positivement la migration. Ou inversement, sachant que l'activation des protéines de la famille G_{13} pourrait se faire de façon ligand-indépendante (Windh et al., 1999), la voie RHO pourrait être activée à des doses de S1P trop faibles pour être détectées par S1PR2 (37 nM), tandis que le S1P activerait plutôt la voie RAC1. Certains RCPG sont capables d'activer des voies de signalisation indépendantes des protéines G, *via* la β -arrestine (Jean-Charles et al., 2017). Il serait intéressant d'étudier la signalisation intracellulaire induite par les différentes doses de S1P.

- 3) S1PR2 inhiberait directement la migration à faibles doses de S1P, et potentialiserait l'action de S1PR1 à fortes doses *via* une interaction directe ou indirecte entre les deux récepteurs. Ce pourrait être un phénomène similaire à celui observé avec Cxcr4 et Ccr7 : *in vitro* comme *in vivo*, la fixation de Cxcl12 à Cxcr4 augmente la migration des lymphocytes T médiée par Ccr7, favorisant ainsi leur entrée dans les ganglions à travers les HEV (Bai et al., 2009). Cette hypothèse souligne l'intérêt d'étudier l'interaction entre les deux S1PR dans un modèle de co-expression et de voir si la balance d'expression a un impact sur la réponse migratoire.

Il est possible que ce phénomène ne soit vrai que dans notre modèle, ce qui expliquerait qu'on ne l'observe pas dans les lymphocytes T primaires humains. On peut aussi supposer que ce phénomène existe *in vivo* mais que les protocoles expérimentaux précédents n'ont pas pu le mettre en évidence. Dans ce cas, quel serait l'intérêt physiologique d'une telle réponse ? L'effet de S1PR2 sur la migration des lymphocytes T mémoires pourrait être local et dépendre des concentrations de S1P. Quand les lymphocytes T mémoires sont dans la zone T du ganglion, la faible concentration de S1P les retiendrait dans l'organe *via* S1PR2, peut-être le temps de scanner les antigènes. Puis, si les lymphocytes T mémoires arrivent à se rapprocher des sinus lymphatiques, où la concentration en S1P est plus élevée, la forte concentration induirait l'action migratoire de S1PR2, leur permettant de sortir du ganglion. Cette caractéristique de S1PR2 pourrait également servir en cas d'inflammation. Certaines infections accroissent localement les niveaux de S1P de façon transitoire (Keul et al., 2011; Ledgerwood et al., 2008). Les lymphocytes T mémoires des ganglions drainants, qui n'expriment presque plus S1PR1, pourraient alors détecter cette augmentation comme un signal d'attraction grâce à S1PR2.

Une autre observation intéressante peut être faite : celle de l'impact d'une surexpression des S1PR sur la migration basale. Quand S1PR1 est surexprimé, la migration dépendante du S1P augmente, mais la migration spontanée est diminuée (Article 2, figure 3A). À l'inverse, quand S1PR2 est surexprimé, on observe cette inhibition de migration à faibles doses, mais la migration spontanée est augmentée. C'est un phénomène que l'on retrouve de façon assez reproductible dans toutes nos expériences, même avec les autres S1PR (données non montrées). Cela corrobore avec les données chez l'homme : dans les lymphocytes T mémoires, la migration est inhibée

par le S1P mais la migration spontanée est beaucoup plus élevée que celle des lymphocytes T naïfs (Article 1, figure 1). Ce constat n'a encore jamais été fait dans la littérature, et il est difficile à interpréter. Là encore, on peut poser des hypothèses quant au mécanisme sous-jacent. L'une d'elle serait que, même après les 2h de privation de sérum, la signalisation induite par le S1P du milieu de culture persiste au niveau intracellulaire. De plus, on ne peut pas exclure un effet du S1P endogène, produit en intracellulaire lors du métabolisme des lipides. Une autre hypothèse serait une activation constitutive, ligand-indépendante, de S1PR2, comme cela a été suggéré pour S1PR5 (Niedernberg et al., 2003). Cette forte migration spontanée favoriserait le déplacement aléatoire des lymphocytes T dans la zone T du ganglion pour scanner les CPA, en coopération avec CCR7.

1.2.2 Régulation de la migration par la balance entre S1PR1 et S1PR2

In vivo comme *in vitro*, aucune des cellules étudiées ici n'exprime qu'un seul des deux récepteurs, d'où l'intérêt d'un système de co-expression des S1PR tagués pour mieux comprendre le rôle de S1PR1 et S1PR2 dans la migration des lymphocytes T humains. La surexpression de S1PR1 dans une lignée qui surexprime déjà S1PR2 augmente globalement la migration : l'inhibition à 37 nM de S1P est moins forte, et le pic de migration est plus élevé (Article 2, figure 3D), comme si l'effet entre les deux récepteurs était additif. Dans la lignée de lymphocytes B humains BJAB, l'effet est différent : la surexpression de S1PR1 augmente fortement la migration alors que celle de S1PR2 l'inhibe totalement, tandis que leur co-expression donne une amplitude de migration située entre les deux (Sic et al., 2014).

On peut supposer que, dans les lymphocytes T, S1PR2 favoriserait la migration médiée par S1PR1, tout en augmentant la dose de S1P nécessaire à la migration. C'est-à-dire que si S1PR1 est inhibé, on n'aura pas de migration induite en surexprimant S1PR2. Ceci expliquerait qu'on ne voit qu'une inhibition dans les lymphocytes T mémoires primaires, dans lesquels l'expression de S1PR1 diminue. En pratique, l'explication est sans doute plus compliquée, car la migration des lymphocytes T implique des interactions avec le milieu extracellulaire, dont les cellules endothéliales, qui influencent aussi la migration (Xiong et al., 2017, 2019).

Est-ce que S1PR2 influence l'internalisation de S1PR1 ? Par exemple, s'il l'augmente, cela pourrait expliquer le fait que le pic de migration soit décalé vers les concentrations plus élevées de S1P dans les S1PR2-FLAG et les Jurkat co-transduites. On pourrait étudier l'internalisation dans notre modèle de co-expression, de la même façon qu'on l'a fait dans les Jurkat simple-transduites. S1PR1 et S1PR2 peuvent former des homodimères et des hétérodimères *in vitro* (Van Brocklyn et al., 2002; Zaslavsky et al., 2006). Si cela est aussi vrai *in vivo*, cela pourrait impacter directement

l'internalisation et/ou la migration en fonction des niveaux d'expression de chacun des deux récepteurs.

1.3 Impact d'une délétion S1PR2 *in vivo*

Le phénotypage des souris *S1pr2*-KO apporte des résultats encourageants : il semble y avoir une tendance à la diminution du nombre de lymphocytes T mémoires dans les tissus, et une augmentation dans le sang et la rate, organe très irrigué, ce qui suggère que S1PR2 participe à la rétention des cellules dans les tissus. Cependant, ces différences ne sont pas toujours très claires et il faut absolument refaire le marquage sur un plus grand nombre de souris. De plus, les observations que l'on fait sont la conséquence de l'organisme dans son ensemble. Il est possible que les éventuels effets de la délétion sur S1PR2 soient compensés par les signaux de l'environnement, ou que l'impact du KO sur d'autres cellules (comme les cellules endothéliales par exemple) soit plus fort. Pour s'affranchir de cet aspect, une expérience simple serait de faire un co-transfert adoptif de lymphocytes *S1pr2*^{+/+} et *S1pr2*^{-/-} dans une souris BALB/c (Figure 56). On pourrait ainsi contrôler la circulation des cellules injectées et vérifier comment celles-ci se répartissent dans les différents organes et fluides.

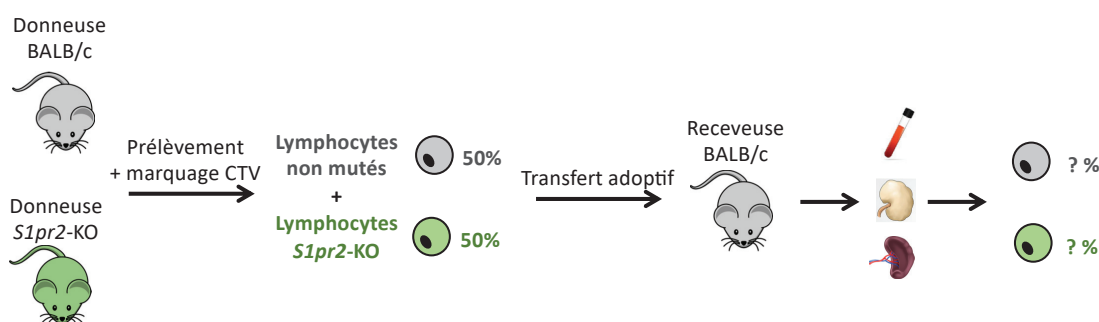


Figure 56 : Schéma expérimental de transfert adoptif.

Les lymphocytes sont isolés à partir de rate ou ganglions de souris BALB/c et *S1pr2*-KO, marqués avec différentes concentrations de cell trace violet (CTV), puis mixés à ratio égal et réinjectés dans une souris receveuse BALB/c non mutée. Après un temps donné, les différents organes sont collectés et le nombre et la fréquence de chaque sous-population de lymphocytes T sont calculés.

Les résultats des tests de chimiotaxie ne vont pas dans le même sens. Notre hypothèse de départ était que les lymphocytes *S1pr2*-KO étaient moins retenus et migraient donc plus que les lymphocytes contrôles. Cette hypothèse s'est heurtée à deux contradictions. La première est la constatation que les lymphocytes T mémoires murins n'ont pas le même comportement migratoire que les lymphocytes T mémoires humains. La migration de ces derniers est totalement inhibée par le S1P (Article 1,

figure 1), avec une diminution dose-dépendante de la migration par rapport à la migration spontanée, alors que chez la souris il n'y a pas (ou peu) de différence entre les migrations avec ou sans S1P (Figure 41). Cette observation remet en question la fonction de S1pr2 dans les lymphocytes T mémoires de la souris. En fait, nous n'avons pas de données concernant l'expression des S1PR dans les populations mémoires murines. Les études publiées concernent les lymphocytes T naïfs, et nous avons rencontré des problèmes lors des tentatives de mesure de l'ARNm par RT-qPCR (populations trop faibles, amorces pas assez spécifiques) et par PrimeFlow RNA assay (beaucoup trop de bruit de fond et de variabilité entre les réplicats). Il est donc tout à fait possible que les S1pr exprimés diffèrent des lymphocytes T humains. Il se peut également que les 10% de différence de séquence entre les protéines S1PR2 murine et humaine soit responsables d'une différence dans leur fonction, au niveau de la fixation du S1P ou de la signalisation par exemple. Enfin, les souris que nous utilisons sont élevées dans un environnement SPF (specific pathogen-free) : elles ne rencontrent pas de pathogène et ne génèrent donc pas de « vrais » lymphocytes T mémoires, ce qui peut expliquer la différence de réponse migratoire avec l'homme.

La deuxième contradiction, qui découle de la première, est que la migration des lymphocytes T mémoires des ganglions n'est pas augmentée quand S1pr2 est absent (Figure 41). Seule la rate semble présenter une différence, mais la variabilité est forte. Pourtant le phénomène de « répulsion » médié par S1pr2 a déjà été observé chez la souris : *in vivo*, la surexpression de S1pr2 bloque les lymphocytes T dans les ganglions (Laidlaw et al., 2019). S1pr2 retient les lymphocytes Tfh et B dans les centres germinatifs des ganglions (Green et al., 2011; Moriyama et al., 2014; Muppidi et al., 2014) et les lymphocytes $\gamma\delta$ Ccr6+ dans le derme (Laidlaw et al., 2019). La différence est qu'ici nous regardons l'impact d'une délétion, et non du S1pr2 endogène ou surexprimé. L'absence de S1pr2 pourrait-elle être compensée par un gène à la fonction redondante ? Ma thèse se focalise sur S1PR1, S1PR2 et S1PR5, mais nous avons en réalité fait toutes nos manipulations sur les cinq S1PR. Le rôle de S1PR4 dans la migration lymphocytaire est méconnu et controversé. Nos résultats montrent que la surexpression de S1PR4 n'impacte pas la migration au S1P des Jurkat, mais augmente sensiblement leur migration spontanée, comme S1PR2 (Figure 57). Nous nous sommes beaucoup interrogés sur l'intérêt de ce S1PR, exprimé par toutes les populations de lymphocytes (Article 1, figure 2A-B ; Walzer et al., 2007). Serait-il possible que S1PR4 joue le rôle de récepteur « decoy », c'est-à-dire qu'il fixe le ligand sans induire de signalisation, comme c'est le cas pour certains récepteurs à cytokines (Mantovani et al., 2001) ? Ainsi, dans les lymphocytes T mémoires, le S1pr1, dont l'expression est fortement diminuée, serait en compétition avec S1pr4, qui contribuerait avec S1pr2 à la rétention dans les OLS. Ce serait alors S1pr4 qui prendrait le rôle de S1pr2 dans les lymphocytes S1pr2-KO. Cette hypothèse est à approfondir, d'abord avec notre système de co-expression des S1PR dans les Jurkat, puis sur cellules primaires pour vérifier que nos observations *in vitro* sont applicables chez la souris.

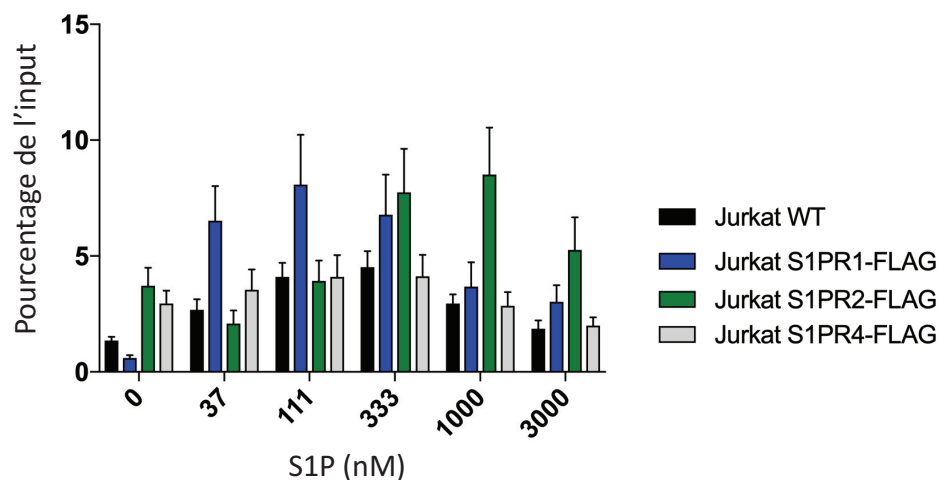


Figure 57 : Impact d'une surexpression de S1PR4 sur la migration S1P des Jurkat.

Les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-CD45 couplés à des fluorochromes différents afin de les différencier, puis mixées à ratio égal. Des tests de chimiotaxie ont été réalisés sur ces cellules après 2h de privation de sérum. L'analyse a été faite sur les cellules ZsGreen- pour les Jurkat WT, ou ZsGreen+ pour les Jurkat transduites. Le nombre de cellules ayant migré dans chaque condition a été comparé au nombre total de cellules déposées dans la chambre supérieure (pourcentage de l'input). Moyennes $\pm$ SEM de 6 expériences.

Finalement, nous disposons ici de trois modèles d'étude différents, dans lesquels la fonction de S1PR2 semble différente. S1PR2 inhibe la migration au S1P des lymphocytes T mémoires d'amygdales humaines, et l'inhibition de S1PR2 restaure la migration. Une surexpression de S1PR2 inhibe la migration des Jurkat à faible dose de S1P, mais l'augmente à fortes doses. Enfin, une délétion de *S1pr2* n'a pas d'impact sur les lymphocytes T des ganglions murins. Le problème est que la façon d'étudier S1PR2 est différente entre les trois modèles ; et s'il est possible effectivement que S1PR2 agisse différemment en fonction du modèle, il est également possible que les différences viennent du mode d'étude lui-même. À noter que la souris *S1pr2*-KO nous a été fournie par une équipe qui publie énormément sur les S1PR dans la migration des lymphocytes. Il est possible qu'ils aient déjà fait ces mêmes expériences sans les publier car non concluantes.

III – Comparaison entre S1PR1 et S1PR5

1.1 S1PR1 induit une migration plus forte que S1PR5.

1.1.1 Rôle individuel des récepteurs

Nos résultats montrent que, si une surexpression de S1PR1 augmente fortement la migration, l'ajout de S1PR5 aux Jurkat semble impacter surtout la migration basale et diminuer la dose nécessaire à la migration, sans impacter l'amplitude (Figure 45). Les données de la littérature nous indiquent que les lymphocytes NK murins *S1pr5^{-/-}* ne migrent plus en réponse au S1P *ex vivo* (Mayol et al., 2011; Walzer et al., 2007), et que l'inhibition de S1PR5 par un antagoniste bloque la migration des lymphocytes NK humains, toujours *ex vivo* (Drouillard et al., 2018a) ; mais on ne connaît pas l'impact d'une surexpression de S1PR5 sur les cellules primaires. Par contre, la transduction de S1PR5 dans la lignée de lymphome B WEHI-231 induit une migration en présence de 1 nM de S1P (Jenne et al., 2009a). Cette migration est bien plus faible qu'avec S1PR1 (environ 10% de cellules migrent avec S1PR5, contre 35% avec S1PR1). Ces résultats suivent donc la même tendance que les nôtres, bien que l'on n'ait ici qu'une seule valeur de S1P comme point de comparaison.

Concernant la migration spontanée, on ne peut pas comparer nos résultats avec la littérature, car la lignée utilisée par Jenne et ses collègues ne migre pas sans transduction de l'expression de S1PR1 ou de S1PR5. La même question se pose qu'avec S1PR2 : quel mécanisme entre en jeu, et quel pourrait être l'intérêt physiologique ? Il est possible que par un effet intrinsèque, l'expression de S1PR5 rende les cellules plus dépendantes au S1P, mais aussi plus sensibles. Ce dernier point serait cohérent avec le fait que S1PR5 a la plus grande affinité pour le S1P (Im et al., 2000b; Malek et al., 2001). Cette grande affinité serait compensée par une réponse migratoire plus faible, ce qui participerait à la régulation du nombre de lymphocytes exprimant S1PR5 sortant des organes lymphoïdes.

1.1.2 Impact d'une co-expression de S1PR1 et S1PR5

Quand on co-exprime S1PR1-FLAG et S1PR5-FLAG, le profil de migration des cellules obtenues est quasiment identique à celui des Jurkat ne surexprimant que S1PR5, comme si l'effet de S1PR1 était diminué (Figure 49B). On n'a donc pas ici d'effet additif des deux récepteurs, comme on aurait pu s'y attendre, mais une inhibition par S1PR5 de la migration médiée par S1PR1. Il pourrait exister un phénomène de compétition entre les deux récepteurs : S1PR5 a plus d'affinité pour le S1P que S1PR1, et il est moins internalisé. De plus, dans notre modèle, l'expression de S1PR5 est légèrement plus forte que celle de S1PR1 (Figure 49A). De ce fait, S1PR5 capterait plus

de S1P que S1PR1, ce qui diminuerait l'effet de S1PR1 sur la migration et favoriserait celui, plus faible, de S1PR5. Il est difficile de faire un parallèle avec des cellules primaires co-exprimant les deux S1PR, car la migration des lymphocytes T_{EM} CD8+ humains est inhibée par S1PR2 (Article 1, figure 2I). Nous nous sommes d'ailleurs demandé pourquoi ces derniers exprimaient S1PR5. Notre hypothèse était que, S1PR5 n'étant pas internalisable, sa présence viendrait supporter la migration dépendante de S1PR1 en cas d'infection, dans des contextes où S1PR1 et S1PR2 seraient tous deux internalisés. Cependant, comme nous allons le discuter à présent, l'inactivation d'un RCPG par désensibilisation n'est pas toujours associée à son internalisation.

1.2 Une différence majeure : l'internalisation par le S1P

1.2.1 S1PR5 n'est pas internalisé par le S1P

Nos résultats montrent de façon très claire que l'expression membranaire de S1PR5 n'est pas régulée par le S1P extracellulaire (Figure 44). Dans les WEHI-231, S1PR5 n'est internalisé ni par le S1P, ni par le FTY720 (Jenne et al., 2009a). On constate néanmoins une légère diminution de l'expression de S1PR5 au cours de la première heure d'incubation (Figure 44B). *Ex vivo*, S1PR1 est recyclé en 30 min à 2h à la membrane plasmique (Liu et al., 1999; Oo et al., 2007). Pourrait-on imaginer que S1PR5 est internalisé, mais recyclé beaucoup plus rapidement que S1PR1 ? De cette manière, on assisterait à une diminution du S1PR5 membranaire en début de cinétique, mais l'internalisation serait très vite compensée par le recyclage du récepteur. Une comparaison des niveaux de S1PR en intra- et extracellulaire au cours du temps apporterait une information intéressante. Nous avons fait un premier test non concluant de marquage intracellulaire du FLAG, il faudra le mettre au point.

L'internalisation de S1PR1 passe par une phosphorylation préalable de son domaine C-terminal (Watterson et al., 2002). Le destin du récepteur internalisé (recyclage ou dégradation) dépend de son taux d'ubiquitination consécutif à l'internalisation (Oo et al., 2007). Est-ce que le même mécanisme est mis en jeu pour S1PR1, S1PR2 et S1PR5 ? Y a-t-il une différence d'ubiquitination en fonction de la quantité de S1P, ou du temps de stimulation du récepteur ? Est-ce que le devenir des S1PR dans le cytosol a un impact sur la réponse migratoire ? Dans un premier temps, pour voir si les S1PR sont simplement internalisés ou dégradés, on pourrait faire les mêmes expériences d'internalisation, en présence ou non d'un inhibiteur du protéasome.

Il convient cependant de nuancer nos résultats par rapport au modèle : S1PR1 est toujours moins exprimé que S1PR5 (ZsGreen et tag) dans notre modèle, comme si l'expression de S1PR1 était fortement régulée contrairement à S1PR5. Cela pourrait

être parce que S1PR1 a une action forte sur nos cellules, donc plus contrôlée, alors que S1PR5 n'en a pas beaucoup, donc moins contrôlé et moins internalisé.

1.2.2 La migration médiée par S1PR5 semble pourtant sensible au S1P extracellulaire

Pour S1PR1 comme pour S1PR5, une privation de sérum a peu d'impact sur la migration (Figure 47C-D). Par contre, une pré-incubation avec du S1P diminue fortement la migration (Figure 48B). Pour S1PR1 notamment, la vitesse d'internalisation et d'externalisation n'est pas la même, ce qui est à prendre en compte : le temps de privation de sérum est peut-être trop court pour avoir un effet. Nous avons tenté une privation de sérum sur la nuit, mais les cellules étaient toutes mortes et le barcoding n'a pas tenu. Ces résultats de migration étaient attendus pour les Jurkat S1PR1-FLAG, mais sont plus surprenants pour les Jurkat S1PR5-FLAG. La réponse migratoire de ces dernières semble diminuée par le S1P du milieu, malgré la présence de S1PR5. On ne peut pas exclure la possibilité que l'effet constaté sur les Jurkat S1PR5-FLAG soit causé non pas par l'inactivation du S1PR5 exogène, mais par celle du S1PR1 endogène.

Les expériences de chimiotaxie avec du S1P dans la chambre supérieure peuvent avoir une autre interprétation : la migration au S1P nécessite un gradient de concentration. Une question intéressante se pose : pour le point de migration à 111 nM de S1P (chambre inférieure), le gradient de S1P est inversé. Pourtant, on a quand même une petite migration. Pourquoi ? Si c'était simplement dû à une migration spontanée, on observerait la même migration partout. Le fait qu'il y ait besoin d'un gradient *in vivo* vient peut-être du fait que si les cellules sont déjà dans un environnement avec beaucoup de S1P, leurs récepteurs sont désensibilisés voire internalisés. Dans notre expérience, peut-être que le temps d'incubation (2h) n'est pas suffisant pour internaliser totalement les S1PR, ce qui n'inhibe pas totalement leur action. De plus, il y a sans doute diffusion du S1P entre les deux compartiments au cours des 2h de migration. On ne peut pas contrôler les niveaux de S1P à la fin. Il est également difficile de contrôler le S1P intracellulaire, produit et possiblement relargué par les Jurkat de façon constitutive (Yang et al., 1999). Nous n'avons jamais vérifié l'expression des S1PR en haut et en bas après migration, ce qui pourrait être intéressant pour voir si le S1P affecte les cellules qui n'ont pas migré.

1.2.3 La désensibilisation n'est pas forcément suivie d'une internalisation

Pour vérifier si l'internalisation de S1PR1 et/ou S1PR5 est vraiment importante à la migration, on pourrait faire un test : dans un premier temps, tronquer le domaine C-

terminal de ces récepteurs pour voir si les cellules migrent toujours en réponse au S1P. Dans un second temps, créer un S1PR1 mutant possédant la queue C-terminale de S1PR5, et un S1PR5 mutant possédant la queue C-terminale de S1PR1. Si l'internalisation est importante dans la signalisation pour la migration, on devrait avoir une modification des réponses induites par les S1PR mutés.

On peut aussi imaginer que S1PR5 peut être phosphorylé puis désensibilisé après fixation du S1P, sans que cela ne soit suivi d'une internalisation. La réponse migratoire des lymphocytes T au S1P est le résultat d'une cascade de signalisations déclenchée par la fixation du S1P à l'un de ses récepteurs. La transduction du signal nécessite le couplage du S1PR à une protéine G trimérique. En cas de stimulation répétée ou prolongée par un ligand, les RCPG peuvent être phosphorylés par une protéine GRK. Cette phosphorylation permet généralement le recrutement de β -arrestines, qui induisent le découplage du récepteur avec la protéine G : c'est la désensibilisation (Rajagopal and Shenoy, 2018). Celle-ci peut être associée dans certains cas à une internalisation du récepteur *via* des puits de clathrine. Ainsi, l'absence d'internalisation de S1PR5 ne signifie pas qu'il n'est pas désensibilisé et inactivé par le S1P. Ceci expliquerait que même si S1PR5 n'est pas internalisé (du moins chez l'homme), les lymphocytes NK du sang ne migrent pas (Figure 42A). Une question demeure cependant : le S1PR5 du sang n'est-il vraiment pas internalisé ?

1.3 Expression *in vivo* de S1PR5

Pour vérifier si S1pr5 était vraiment insensible à l'internalisation *in vivo*, nous avons généré des souris possédant le tag FLAG en N-terminal du gène *S1pr5*. Le marquage présenté ici est réalisé sur une souris chimère, c'est-à-dire qu'elle porte un génome mosaïque qui peut atténuer le phénotype mutant. La souris a été génotypée et porte bien la mutation mais possède d'autres allèles pour *S1pr5*. Ce marquage sera refait lorsque nous aurons des souris hétérozygotes et homozygotes.

Les résultats obtenus ne correspondent pas tout à fait à ce qu'on attendait. Même si on n'a une expression du FLAG que sur les populations supposées l'exprimer (lymphocytes NK, lymphocytes T très légèrement car seulement sur les lymphocytes T_{EM} CD8+), et pas sur les lymphocytes B, le signal reste très faible : les variations n'étaient pas visibles à l'œil nu (non montré) et la MFI maximale est d'environ 100 (Figure 51). Au sein des lymphocytes NK, le FLAG est exprimé indépendamment du niveau de maturation, avec des variations aléatoires entre les sous-populations et les organes, alors que l'ARNm de *S1pr5* est normalement exprimé surtout par les lymphocytes NK Cd27- (Walzer et al., 2007). Est-ce que le FLAG pourrait empêcher l'expression de *S1pr5* murin *in vivo* ? S1pr5 est essentiel à la sortie des lymphocytes NK matures de la moelle osseuse (Jenne et al., 2009a; Walzer et al., 2007). Par conséquent, si le FLAG altérerait la fonction du récepteur, on observerait un défaut dans

le pourcentage de lymphocytes NK matures, ce qui n'est pas le cas. Dans ce cas, qu'est-ce qui pourrait expliquer ce signal faible et ces variations entre les populations et les organes ?

- 1) Peut-être que le tag FLAG est plus difficile à détecter sur cellules primaires murines du fait de sa conformation : le tag pourrait se retrouver masqué au milieu des sept domaines transmembranaires de S1pr5. On pourrait envisager de faciliter la révélation du marquage avec des tampons jouant sur l'acidité et la basicité. Pourtant, le groupe de J. Cyster détecte le FLAG sur S1pr1 murin en utilisant un anticorps dans un marquage classique (Lo et al., 2005).
- 2) S1pr5 serait internalisé dans certains organes, ou tout simplement pas exprimé. Après tout, son expression en ARNm par les lymphocytes n'a pas été étudiée dans tous les organes. De plus, nous avons montré que S1PR5 n'était pas internalisé dans les Jurkat, qui sont une lignée humaine de lymphocytes T. Une fois encore, la différence entre les récepteurs humain et murin (86,3% d'homologie) peut être à l'origine d'une différence de fonction. À ce jour, on sait juste que S1pr5 n'est pas internalisé par Cd69 (Jenne et al., 2009a), mais peut-être l'est-il par d'autres protéines. Il sera intéressant de vérifier si S1pr5 suit le même schéma d'internalisation cyclique que S1pr1 (Lo et al., 2005).

Avant de conclure sur ce point, il faudra réaliser des marquages sur des souris *S1pr5*-FLAG hétérozygotes et homozygotes, voire transduire des lymphocytes primaires *in vitro* pour vérifier qu'on détecte bien le FLAG sur S1pr5 murin.

Nous avons supposé que S1PR5, moins sensible à la désensibilisation par le S1P, était utilisé par les lymphocytes NK car ils doivent sortir d'organes dans lesquels la concentration en S1P est élevée. Si S1pr5 est finalement désensibilisable, voire internalisable chez la souris, notre hypothèse ne convient pas : dans ce cas, quelle pourrait être la raison de l'utilisation de S1PR5 ou de S1PR1 ? Premièrement, il peut y avoir des différences de cinétique de désensibilisation. Cette hypothèse s'accorderait finalement avec notre idée de départ : si S1PR5 est désensibilisé moins vite que S1PR1, il pourrait permettre la sortie d'organes où la concentration en S1P est élevée. Dans le cas des lymphocytes T_{EM} CD8+, ce pourrait être un atout en cas d'infection. Deuxièmement, S1PR1 et S1PR5 n'activent pas les mêmes voies de signalisation (Figure 21). L'utilisation de S1PR5 apporterait des fonctionnalités que la cellule n'aurait pas avec S1PR1. Nous pourrions comparer la signalisation induite par les deux S1PR lors d'une migration par exemple, pour voir si les mêmes protéines sont recrutées.

IV – Perspectives et conclusion

L'objectif de ces travaux de thèse était de mieux comprendre le rôle des S1PR dans la migration des lymphocytes T, avec une attention particulière sur les interactions qui pourraient exister entre eux. Parmi les cinq récepteurs, nous avons choisi de nous concentrer sur trois d'entre eux, avec des questionnements et des hypothèses spécifiques à chacun des deux axes d'étude.

Dans la continuité de nos premiers travaux sur le rôle de S1PR1 et S1PR2 dans les lymphocytes primaires humains, nous souhaitons dans un premier temps valider nos observations dans un modèle *in vitro*, dans lequel nous pouvions mieux maîtriser l'expression des S1PR qu'avec des inhibiteurs pas toujours totalement spécifiques. Nous avons en effet montré que S1PR1 induisait la migration des Jurkat tout en diminuant leur migration spontanée, alors que S1PR2 augmentait la mobilité basale des Jurkat tout en inhibant cette migration à faible dose de S1P. De façon surprenante, nous avons aussi constaté que la migration des Jurkat surexprimant S1PR2 était augmentée en présence de fortes concentrations de S1P. La co-expression des deux S1PR donnait un comportement migratoire situé plus ou moins entre les réponses induites par les récepteurs individuellement. *In vivo*, les résultats préliminaires ont montré qu'une délétion de S1PR2 semblait avoir tendance à diminuer la rétention des lymphocytes T dans les tissus, bien que cela n'affectait pas la migration *ex vivo* des lymphocytes T des ganglions. Ces résultats valident en partie les observations faites chez l'homme mais soulèvent d'autres questions, en particulier concernant le rôle de S1pr2 chez la souris :

Est-ce que S1pr2 a une fonction de rétention des lymphocytes T chez la souris ?

Pour répondre à cette question, nous allons poursuivre nos investigations dans le modèle murin *S1pr2*-KO. En particulier, nous allons dans un premier temps confirmer si une délétion de *S1pr2* modifie ou non la localisation des lymphocytes T, par des répétitions du phénotypage présenté Figure 40, mais aussi par des transferts adoptifs de lymphocytes T WT et *S1pr2*-KO dans des souris BALB/c, afin de suivre la circulation des lymphocytes *S1pr2*-KO sans contrainte de l'environnement.

Dans un second temps, nous allons répéter les tests de chimiotaxie, car nous n'avons pas suffisamment de réplicats pour des résultats significatifs. Il sera intéressant de comparer la migration dans plus d'organes, et peut-être de prolonger le temps de privation de sérum avant l'étape de migration afin de potentialiser l'expression membranaire de S1pr2.

Pour comparer les rôles des S1PR2 humain et murin, nous pourrions transduire les Jurkat avec un vecteur exprimant le S1pr2 murin, et comparer *in vitro* la réponse migratoire induite par ces deux récepteurs. Cela nous permettra de valider si les deux

récepteurs fonctionnent effectivement différemment, ou si les différences viennent des modèles utilisés.

Si on arrive à mettre en évidence une différence de localisation des lymphocytes T dans les souris *S1pr2*-KO, il sera intéressant d'étudier l'impact d'une telle délétion sur la lutte anti-tumorale ou en cas d'infection. En effet, une diminution de la rétention des lymphocytes T dans les tissus pourrait avoir plusieurs impacts : une diminution du temps de résidence dans les OLS des lymphocytes T récemment activés, et par conséquent une diminution de l'efficacité de la réponse immunitaire cellulaire (expansion clonale et différenciation moins fortes) ; un recrutement plus rapide des lymphocytes T mémoires sur le site de l'infection ; une sensibilité plus élevée aux infections causée par une rétention plus faible des lymphocytes T_{RM} dans les tissus... Nous avons mis au point dans notre équipe un modèle d'étude de la survie tumorale qui pourrait être utilisé à cet effet.

S1PR1 est-il régulé de la même façon chez l'homme et chez la souris ?

Si on prend en compte l'éventualité que S1PR2 pourrait fonctionner différemment chez l'homme et chez la souris, qu'en est-il des modèles établis concernant S1PR1 ? Il y a certes plus d'études concernant le rôle de S1PR1 chez l'homme, notamment son caractère essentiel au passage des lymphocytes T dans le sang, mais certaines observations n'ont jamais été validées chez l'homme, en particulier celle de la régulation cyclique de S1PR1 au cours de la circulation. D'après le modèle admis chez la souris, les lymphocytes T naïfs perdent rapidement l'expression de *S1pr1* après activation, puis le ré-acquièrent au bout de quelques jours pour sortir des ganglions (Matloubian et al., 2004). Une façon simple de vérifier si ces affirmations peuvent être appliquées à l'homme serait de mesurer l'expression de S1PR1-FLAG dans les Jurkat à différents temps après activation, ainsi que leur capacité à répondre au S1P dans ces mêmes temps. Une expérience encore plus intéressante serait de faire cela dans les Jurkat co-transduites avec S1PR1 et S1PR2, puisque c'est le cas des lymphocytes T naïfs d'amygdales.

Quelle(s) voie(s) de signalisation utilise S1PR2 pour diriger la réponse migratoire ?

S1PR2 induit une réponse migratoire en deux phases chez les Jurkat. On suppose qu'il inhibe la migration à travers la voie RHO/ROCK, qui induit la mise en place de fibres de stress (Sugimoto et al., 2003; Takashima et al., 2008). Théoriquement, S1PR2 peut aussi activer la migration *via* RAC1 (Lepley et al., 2005; Windh et al., 1999). Nous souhaiterions mieux comprendre la signalisation mise en jeu dans les différentes conditions (sans S1P, avec de faibles concentrations, avec de fortes concentrations). Ceci est possible grâce à différents inhibiteurs comme la rhosin-hydrochloride (inhibiteur de RHO) ou le Y-27632 dihydrochloride (inhibiteur de ROCK). L'une de nos hypothèses est que, à fortes doses de S1P, S1PR2 favorise la migration médiée par

S1PR1. Si c'est vrai, en inhibant S1PR1 (avec du FTY720 ou du SEW2871), on perdrait la migration induite par S1PR2.

Quel est l'impact d'une délétion de S1PR1 ou S1PR2 sur la migration ?

Nous avons un modèle qui surexprime S1PR1 et/ou S1PR2. À présent, il faudrait valider l'effet inverse, à savoir l'impact d'une délétion de ces deux gènes sur la migration. Nous sommes en train de générer des Jurkat *S1PR2*-KO par CRISPR/Cas9, qu'il faut à présent sous-cloner. Si le S1PR2 endogène est fonctionnel dans les Jurkat, on devrait assister à une augmentation de la migration au S1P dans les Jurkat *S1PR2*-KO. C'est ce que le test préliminaire réalisé sur le pool de cellules non sous-clonées semble montrer (données non montrées). Concernant S1PR1, le KO par CRISPR/Cas9 apparaît plus difficile à réaliser. Comme mentionné au cours de la discussion, nous pouvons envisager de transduire l'expression de CD69 afin d'induire l'internalisation permanente de S1PR1. Dans ce cas, on s'attend à une diminution de la migration, voire à un profil similaire à celui des Jurkat surexprimant S1PR2.

Entre S1PR1 et S1PR2 : quel est le rôle de S1PR4 dans la migration des lymphocytes T ?

S1PR4 est également exprimé par les lymphocytes T, mais son rôle est trop peu compris. Pourtant, sa présence n'est peut-être pas négligeable : il régule la migration médiée par S1PR1 dans certaines lignées B (Sic et al., 2014). Nous ne nous sommes pas focalisés sur lui dans ce projet de thèse mais nous avons pu générer des données le concernant. S1PR4 est internalisé mais semble moins sensible au S1P que S1PR1 et S1PR2 (données non montrées). Il sera intéressant de voir s'il agit sur la migration médiée par S1PR1 et/ou S1PR2, voire tenter un modèle de co-expression des trois S1PR.

Dans un second axe, nous nous sommes intéressés à la différence entre S1PR1 et S1PR5, espérant trouver une explication à l'utilisation spécifique de ces récepteurs par certaines populations lymphocytaires, et entre autres à l'expression de S1PR5 par les lymphocytes T_{EM} CD8+. Nous avons montré que S1PR5 n'était pas internalisé par le S1P, au contraire de S1PR1 ; et qu'il n'augmentait pas l'amplitude de migration mais abaissait la dose nécessaire pour atteindre le pic de migration, tout en diminuant la migration spontanée. Nous n'avons pour l'instant pas pu confirmer que S1pr5 n'était pas internalisable chez la souris, mais les données *in vivo* présentées restent très préliminaires. Cet axe d'étude requiert davantage d'expérimentations afin de répondre à diverses questions :

S1PR5 n'est-il vraiment pas internalisé *in vivo* ?

La question se pose de l'internalisation de S1PR5. La détection du tag sur les cellules primaires est faible, mais le signal semble varier entre les organes et les sous-populations. Est-ce un artéfact de marquage, ou est-ce réellement ce qui se passe *in vivo* ? Si oui, ces différences viennent-elles d'une variation de l'expression basale de S1pr5, ou est-ce que le récepteur est en fait internalisé dans certaines situations ? Ce point a été bien développé dans la discussion donc nous ne nous attarderons pas dessus ici, mais une étude plus approfondie s'impose afin de mieux comprendre cette caractéristique de S1PR5.

S1PR5 est-il désensibilisé par le S1P ?

Pour vérifier si S1PR5 peut être désensibilisé sans être internalisé, il serait possible d'étudier la signalisation en aval du récepteur, par exemple mesurer le relargage de calcium, après stimulation par différentes doses de S1P pendant différents temps. Cela viendrait compléter les tests de chimiotaxie dans lesquels les Jurkat ont été pré-incubées dans du S1P.

Notre modèle est-il adapté à l'étude de S1PR5 ?

Nous avons soulevé dans les résultats le problème que pouvait poser l'utilisation des Jurkat dans l'étude de S1PR5 : ces dernières n'expriment pas celui-ci de façon endogène, la signalisation associée y est peut-être altérée. Il conviendrait de tester notre modèle de transduction sur une lignée de lymphocytes NK, afin de voir d'une part si S1PR5 y est aussi insensible à l'internalisation, d'autre part s'il induirait une réponse migratoire plus forte que dans les lymphocytes T.

Notre étude peut s'inscrire dans un objectif thérapeutique. Le système S1P/S1PR est actuellement déjà ciblé dans le traitement de certaines pathologies. En particulier, nous croyons à l'intérêt que pourrait avoir S1PR2 dans ce contexte. Lever les barrières de rétention des lymphocytes T mémoires ou au contraire les amplifier pourrait constituer une stratégie thérapeutique intéressante. Étant donné que S1PR2 joue un rôle non seulement dans la migration, mais aussi dans la physiologie de certains tissus, une utilisation systémique aurait sans doute des effets négatifs. Par contre, on pourrait envisager une application locale d'antagonistes de S1PR2 dans le cas de sur-réactions des lymphocytes T, comme par exemple une inflammation ou une allergie, pour limiter leur accumulation sur le site enflammé. C'est en partie dans cet objectif que nous avons entrepris la génération d'anticorps anti-S1PR2, qui nous l'espérons aboutira à l'obtention d'anticorps spécifiques et efficaces. Ces derniers constitueront un outil non négligeable pour l'étude du rôle de S1PR2 dans la migration des lymphocytes T.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adada, M., Canals, D., Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2013). Sphingosine-1-phosphate receptor 2. *FEBS J.* 280, 6354–6366.
- Allen, S.J., Crown, S.E., and Handel, T.M. (2007). Chemokine: Receptor Structure, Interactions, and Antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 787–820.
- Allende, M.L., Yamashita, T., and Proia, R.L. (2003). G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood* 102, 3665–3667.
- Allende, M.L., Sasaki, T., Kawai, H., Olivera, A., Mi, Y., Echten-Deckert, G. van, Hajdu, R., Rosenbach, M., Keohane, C.A., Mandala, S., et al. (2004). Mice Deficient in Sphingosine Kinase 1 Are Rendered Lymphopenic by FTY720. *J. Biol. Chem.* 279, 52487–52492.
- Allende, M.L., Tuymetova, G., Lee, B.G., Bonifacino, E., Wu, Y.-P., and Proia, R.L. (2010). S1P1 receptor directs the release of immature B cells from bone marrow into blood. *J. Exp. Med.* 207, 1113–1124.
- Allende, M.L., Bektas, M., Lee, B.G., Bonifacino, E., Kang, J., Tuymetova, G., Chen, W., Saba, J.D., and Proia, R.L. (2011). Sphingosine-1-phosphate Lyase Deficiency Produces a Pro-inflammatory Response While Impairing Neutrophil Trafficking. *J. Biol. Chem.* 286, 7348–7358.
- Ammit, A.J., Hastie, A.T., Edsall, L.C., Hoffman, R.K., Amrani, Y., Krymskaya, V.P., Kane, S.A., Peters, S.P., Penn, R.B., Spiegel, S., et al. (2001). Sphingosine 1-phosphate modulates human airway smooth muscle cell functions that promote inflammation and airway remodeling in asthma. *FASEB J.* 15, 1212–1214.
- An, S., Zheng, Y., and Bleu, T. (2000). Sphingosine 1-Phosphate-induced Cell Proliferation, Survival, and Related Signaling Events Mediated by G Protein-coupled Receptors Edg3 and Edg5. *J. Biol. Chem.* 275, 288–296.
- Ancellin, N., and Hla, T. (1999). Differential Pharmacological Properties and Signal Transduction of the Sphingosine 1-Phosphate Receptors EDG-1, EDG-3, and EDG-5. *J. Biol. Chem.* 274, 18997–19002.
- Andersen, M.H., Schrama, D., thor Straten, P., and Becker, J.C. (2006). Cytotoxic T Cells. *J. Invest. Dermatol.* 126, 32–41.
- Andrieu, G., Ledoux, A., Branka, S., Bocquet, M., Gilhodes, J., Walzer, T., Kasahara, K., Inagaki, M., Sabbadini, R.A., Cuvillier, O., et al. (2017). Sphingosine 1-phosphate signaling through its receptor S1P5 promotes chromosome segregation and mitotic progression. *Sci Signal* 10, eaah4007.
- Ansari, A.M., Ahmed, A.K., Matsangos, A.E., Lay, F., Born, L.J., Marti, G., Harmon, J.W., and Sun, Z. (2016). Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in *In Vivo* Cell Tracking Experiments. *Stem Cell Rev. Rep.* 12, 553–559.
- Ansel, K.M., McHeyzer-Williams, L.J., Ngo, V.N., McHeyzer-Williams, M.G., and Cyster, J.

- J.G. (1999). In Vivo–Activated Cd4 T Cells Upregulate Cxc Chemokine Receptor 5 and Reprogram Their Response to Lymphoid Chemokines. *J. Exp. Med.* **190**, 1123–1134.
- Arbonés, M.L., Ord, D.C., Ley, K., Ratech, H., Maynard-Curry, C., Otten, G., Capon, D., and Tedder, T.F. (1994). Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* **1**, 247–260.
- Arnon, T.I., Xu, Y., Lo, C., Pham, T., An, J., Coughlin, S., Dorn, G.W., and Cyster, J.G. (2011). GRK2-Dependent S1PR1 Desensitization Is Required for Lymphocytes to Overcome Their Attraction to Blood. *Science* **333**, 1898–1903.
- Asperti-Boursin, F., Real, E., Bismuth, G., Trautmann, A., and Donnadieu, E. (2007). CCR7 ligands control basal T cell motility within lymph node slices in a phosphoinositide 3–kinase– independent manner. *J. Exp. Med.* **204**, 1167–1179.
- Azzali, G. (2003). Structure, lymphatic vascularization and lymphocyte migration in mucosa-associated lymphoid tissue. *Immunol. Rev.* **195**, 178–189.
- Baeyens, A., Fang, V., Chen, C., and Schwab, S.R. (2015). Exit strategies: S1P signaling and T cell migration. *Trends Immunol.* **36**, 778–787.
- Bai, A., Hu, H., Yeung, M., and Chen, J. (2007). Krüppel-Like Factor 2 Controls T Cell Trafficking by Activating L-Selectin (CD62L) and Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Transcription. *J. Immunol.* **178**, 7632–7639.
- Bai, Z., Hayasaka, H., Kobayasi, M., Li, W., Guo, Z., Jang, M.H., Kondo, A., Choi, B.-I., Iwakura, Y., and Miyasaka, M. (2009). CXC chemokine ligand 12 promotes CCR7-dependent naive T cell trafficking to lymph nodes and Peyer’s patches. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 1287–1295.
- Bajénoff, M., Egen, J.G., Koo, L.Y., Laugier, J.-P., Brau, F., Glaichenhaus, N., and Germain, R.N. (2006). Stromal Cell Networks Regulate Lymphocyte Entry, Migration, and Territoriality in Lymph Nodes - PubMed. *Immunity* **25**, 989–1001.
- Bankovich, A.J., Shiow, L.R., and Cyster, J.G. (2010). CD69 Suppresses Sphingosine 1-Phosphate Receptor-1 (S1P1) Function through Interaction with Membrane Helix 4. *J. Biol. Chem.* **285**, 22328–22337.
- Bargatze, R.F., and Butcher, E.C. (1993). Rapid G protein-regulated activation event involved in lymphocyte binding to high endothelial venules. *J. Exp. Med.* **178**, 367–372.
- Bargatze, R.F., Jutila, M.A., and Butcher, E.C. (1995). Distinct roles of L-selectin and integrins $\alpha 4\beta 7$ and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer’s patch-HEV in situ: The multistep model confirmed and refined. *Immunity* **3**, 99–108.
- Benechet, A.P., Menon, M., Xu, D., Samji, T., Maher, L., Murooka, T.T., Mempel, T.R., Sheridan, B.S., Lemoine, F.M., and Khanna, K.M. (2016). T cell-intrinsic S1PR1 regulates endogenous effector T-cell egress dynamics from lymph nodes during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 2182.
- Bennett, S.R.M., Carbone, F.R., Karamalis, F., Flavell, R.A., Miller, J.F.A.P., and Heath,

W.R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393, 478–480.

Benoist, C., and Mathis, D. (1989). Positive selection of the T cell repertoire: Where and when does it occur? *Cell* 58, 1027–1033.

Bingaman, A.W., Patke, D.S., Mane, V.R., Ahmadzadeh, M., Ndejemi, M., Bartlett, S.T., and Farber, D.L. (2005). Novel phenotypes and migratory properties distinguish memory CD4 T cell subsets in lymphoid and lung tissue. *Eur. J. Immunol.* 35, 3173–3186.

Bode, C., Sensken, S.-C., Peest, U., Beutel, G., Thol, F., Levkau, B., Li, Z., Bittman, R., Huang, T., Tölle, M., et al. (2010). Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate. *J. Cell. Biochem.* 109, 1232–1243.

Boscacci, R.T., Pfeiffer, F., Gollmer, K., Sevilla, A.I.C., Martin, A.M., Soriano, S.F., Natale, D., Henrickson, S., von Andrian, U.H., Fukui, Y., et al. (2010). Comprehensive analysis of lymph node stroma-expressed Ig superfamily members reveals redundant and nonredundant roles for ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in lymphocyte homing. *Blood* 116, 915–925.

Braun, A., Worbs, T., Moschovakis, G.L., Halle, S., Hoffmann, K., Bölter, J., Münk, A., and Förster, R. (2011). Afferent lymph–derived T cells and DCs use different chemokine receptor CCR7–dependent routes for entry into the lymph node and intranodal migration. *Nat. Immunol.* 12, 879–887.

Bréart, B., and Bousso, P. (2016). S1P1 downregulation tailors CD8+ T-cell residence time in lymph nodes to the strength of the antigenic stimulation. *Eur. J. Immunol.* 46, 2730–2736.

Bréart, B., Ramos-Perez, W.D., Mendoza, A., Salous, A.K., Gobert, M., Huang, Y., Adams, R.H., Lafaille, J.J., Escalante-Alcalde, D., Morris, A.J., et al. (2011). Lipid phosphate phosphatase 3 enables efficient thymic egress. *J. Exp. Med.* 208, 1267–1278.

Brinkmann, V. (2007). Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: Mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol. Ther.* 115, 84–105.

Brinkmann, V., Davis, M.D., Heise, C.E., Albert, R., Cottens, S., Hof, R., Bruns, C., Prieschl, E., Baumruker, T., Hiestand, P., et al. (2002). The Immune Modulator FTY720 Targets Sphingosine 1-Phosphate Receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 21453–21457.

Brinkmann, V., Billich, A., Baumruker, T., Heining, P., Schmouder, R., Francis, G., Aradhye, S., and Burtin, P. (2010). Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 883–897.

van Brocklyn, J.R., Tu, Z., Edsall, L.C., Schmidt, R.R., and Spiegel, S. (1999). Sphingosine 1-Phosphate-induced Cell Rounding and Neurite Retraction Are Mediated by the G Protein-coupled Receptor H218. *J. Biol. Chem.* 274, 4626–4632.

- Bromley, S.K., Thomas, S.Y., and Luster, A.D. (2005). Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nat. Immunol.* *6*, 895–901.
- Bromley, S.K., Mempel, T.R., and Luster, A.D. (2008). Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat. Immunol.* *9*, 970–980.
- Bromley, S.K., Yan, S., Tomura, M., Kanagawa, O., and Luster, A.D. (2013). Recirculating Memory T Cells Are a Unique Subset of CD4⁺ T Cells with a Distinct Phenotype and Migratory Pattern. *J. Immunol.* *190*, 970–976.
- Burczyk, M., Burkhalter, M.D., Blätte, T., Matysik, S., Caron, M.G., Barak, L.S., and Philipp, M. (2015). Phenotypic Regulation of the Sphingosine 1-Phosphate Receptor Miles Apart by G Protein-Coupled Receptor Kinase 2. *Biochemistry* *54*, 765–775.
- Butcher, E.C., and Picker, L.J. (1996). Lymphocyte Homing and Homeostasis. *Science* *272*, 60–67.
- Cahill, R.N., Frost, H., and Trnka, Z. (1976). The effects of antigen on the migration of recirculating lymphocytes through single lymph nodes. *J. Exp. Med.* *143*, 870–888.
- Carlson, C.M., Endrizzi, B.T., Wu, J., Ding, X., Weinreich, M.A., Walsh, E.R., Wani, M.A., Lingrel, J.B., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2006). Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature* *442*, 299–302.
- Chiba, K., Yanagawa, Y., Masubuchi, Y., Kataoka, H., Kawaguchi, T., Ohtsuki, M., and Hoshine, Y. (1998). FTY720, a Novel Immunosuppressant, Induces Sequestration of Circulating Mature Lymphocytes by Acceleration of Lymphocyte Homing in Rats. I. FTY720 Selectively Decreases the Number of Circulating Mature Lymphocytes by Acceleration of Lymphocyte Homing. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *160*, 5037–5044.
- Christoffersen, C., Obinata, H., Kumaraswamy, S.B., Galvani, S., Ahnström, J., Sevana, M., Egerer-Sieber, C., Muller, Y.A., Hla, T., Nielsen, L.B., et al. (2011). Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 9613.
- Chun, J., Goetzl, E.J., Hla, T., Igarashi, Y., Lynch, K.R., Moolenaar, W., Pyne, S., and Tigyi, G. (2002). International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid Receptor Nomenclature. *Pharmacol. Rev.* *54*, 265–269.
- Chun, J., Kihara, Y., Jonnalagadda, D., and Blaho, V.A. (2019). Fingolimod: Lessons Learned and New Opportunities for Treating Multiple Sclerosis and Other Disorders. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *59*, 149–170.
- Cinamon, G., Matloubian, M., Lesneski, M.J., Xu, Y., Low, C., Lu, T., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2004). Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat. Immunol.* *5*, 713–720.
- Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T., and Terhorst, C. (1988). The T Cell Receptor/CD3 Complex: A Dynamic Protein Ensemble. *Annu. Rev. Immunol.* *6*, 629–662.

Clore, G.M., and Gronenborn, A.M. (1995). Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines. *FASEB J.* 9, 57–62.

Cohen, J.A., Arnold, D.L., Comi, G., Bar-Or, A., Gujrathi, S., Hartung, J.P., Cravets, M., Olson, A., Frohna, P.A., and Selmaj, K.W. (2016). Safety and efficacy of the selective sphingosine 1-phosphate receptor modulator ozanimod in relapsing multiple sclerosis (RADIANCE): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol.* 15, 373–381.

Comerford, I., Harata-Lee, Y., Bunting, M.D., Gregor, C., Kara, E.E., and McColl, S.R. (2013). A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 24, 269–283.

Cowan, J.E., McCarthy, N.I., and Anderson, G. (2016). CCR7 Controls Thymus Recirculation, but Not Production and Emigration, of Foxp3+ T Cells. *Cell Rep.* 14, 1041–1048.

Crotty, S. (2014). T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 41, 529–542.

Curtsinger, J.M., Schmidt, C.S., Mondino, A., Lins, D.C., Kedl, R.M., Jenkins, M.K., and Mescher, M.F. (1999). Inflammatory Cytokines Provide a Third Signal for Activation of Naive CD4+ and CD8+ T Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 3256–3262.

Curtsinger, J.M., Valenzuela, J.O., Agarwal, P., Lins, D.C., and Mescher, M.F. (2005). Type I IFNs Provide a Third Signal to CD8 T Cells to Stimulate Clonal Expansion and Differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 4465–4469.

Cyster, J.G. (2004). Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 127–159.

Cyster, J.G., and Schwab, S.R. (2012). Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 69–94.

Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.-C., et al. (2008). Interleukin 4 inhibits TGF- β -induced-Foxp3+ T cells and generates, in combination with TGF- β , Foxp3– effector T cells that produce interleukins 9 and 10. *Nat. Immunol.* 9, 1347.

Darrasse-Jèze, G., Bergot, A.-S., Durgeau, A., Billiard, F., Salomon, B.L., Cohen, J.L., Bellier, B., Podsypanina, K., and Klatzmann, D. (2009). Tumor emergence is sensed by self-specific CD44^{hi} memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 2648–2662.

Debes, G.F., Arnold, C.N., Young, A.J., Krautwald, S., Lipp, M., Hay, J.B., and Butcher, E.C. (2005). Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. *Nat. Immunol.* 6, 889–894.

Debien, E., Mayol, K., Biajoux, V., Daussy, C., De Agüero, M.G., Taillardet, M., Dagany, N., Brinza, L., Henry, T., Dubois, B., et al. (2013). S1PR5 is pivotal for the homeostasis of

patrolling monocytes. *Eur. J. Immunol.* **43**, 1667–1675.

Del Prete, G.F., Carli, M.D., Mastromauro, C., Biagiotti, R., Macchia, D., Falagiani, P., Ricci, M., and Romagnani, S. (1991). Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J. Clin. Invest.* **88**, 346.

Delon, C., Manifava, M., Wood, E., Thompson, D., Krugmann, S., Pyne, S., and Ktistakis, N.T. (2004). Sphingosine Kinase 1 Is an Intracellular Effector of Phosphatidic Acid. *J. Biol. Chem.* **279**, 44763–44774.

Dembić, Z., Haas, W., Zamoyska, R., Parnes, J., Steinmetz, M., and Boehmer, H. von (1987). Transfection of the CD8 gene enhances T-cell recognition. *Nature* **326**, 510–511.

Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., and Schuler, G. (2001). Ex Vivo Isolation and Characterization of Cd4+ Cd25+ T Cells with Regulatory Properties from Human Blood. *J. Exp. Med.* **193**, 1303.

Dieu-Nosjean, M.-C., Goc, J., Giraldo, N.A., Sautès-Fridman, C., and Fridman, W.H. (2014). Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond. *Trends Immunol.* **35**, 571–580.

Donovan, E.E., Pelanda, R., and Torres, R.M. (2010). S1P3 confers differential S1P migration by autoreactive and non-autoreactive immature B cells and is required for normal B cell development. *Eur. J. Immunol.* **40**, 688–698.

van Doorn, R., Lopes Pinheiro, M.A., Kooij, G., Lakeman, K., van het Hof, B., van der Pol, S.M., Geerts, D., van Horssen, J., van der Valk, P., van der Kam, E., et al. (2012). Sphingosine 1-phosphate receptor 5 mediates the immune quiescence of the human brain endothelial barrier. *J. Neuroinflammation* **9**, 133.

Drayton, D.L., Liao, S., Mounzer, R.H., and Ruddle, N.H. (2006). Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat. Immunol.* **7**, 344–353.

Drouillard, A., Mathieu, A.-L., Marçais, A., Belot, A., Viel, S., Mingueneau, M., Guckian, K., and Walzer, T. (2018a). S1PR5 is essential for human natural killer cell migration toward sphingosine-1 phosphate. *J. Allergy Clin. Immunol.* **141**, 2265–2268.e1.

Drouillard, A., Neyra, A., Mathieu, A.-L., Marçais, A., Wencker, M., Marvel, J., Belot, A., and Walzer, T. (2018b). Human Naive and Memory T Cells Display Opposite Migratory Responses to Sphingosine-1 Phosphate. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **200**, 551–557.

Druzd, D., Matveeva, O., Ince, L., Harrison, U., He, W., Schmal, C., Herzel, H., Tsang, A.H., Kawakami, N., Leliavski, A., et al. (2017). Lymphocyte Circadian Clocks Control Lymph Node Trafficking and Adaptive Immune Responses. *Immunity* **46**, 120–132.

Du, W., Takuwa, N., Yoshioka, K., Okamoto, Y., Gonda, K., Sugihara, K., Fukamizu, A., Asano, M., and Takuwa, Y. (2010). S1P(2), the G Protein-Coupled Receptor for sphingosine-1-phosphate, Negatively Regulates Tumor Angiogenesis and Tumor

Growth in Vivo in Mice. *Cancer Res.* 70, 772–781.

Eberl, G., Colonna, M., Santo, J.P.D., and McKenzie, A.N.J. (2015). Innate lymphoid cells: A new paradigm in immunology. *Science* 348.

Edsall, L.C., and Spiegel, S. (1999). Enzymatic Measurement of Sphingosine 1-Phosphate. *Anal. Biochem.* 272, 80–86.

Evans, R., Lellouch, A.C., Svensson, L., McDowall, A., and Hogg, N. (2011). The integrin LFA-1 signals through ZAP-70 to regulate expression of high-affinity LFA-1 on T lymphocytes. *Blood* 117, 3331–3342.

Eyerich, K., and Eyerich, S. (2015). Th22 cells in allergic disease. *Allergo J. Int.* 24, 1–7.

Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., et al. (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J. Clin. Invest.* 119, 3573–3585.

Fahl, S.P., Coffey, F., and Wiest, D.L. (2014). Origins of $\gamma\delta$ T Cell Effector Subsets: A Riddle Wrapped in an Enigma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 4289–4294.

Fang, V., Chaluvadi, V.S., Ramos-Perez, W.D., Mendoza, A., Baeyens, A., Rivera, R., Chun, J., Cammer, M., and Schwab, S.R. (2017). Gradients of the signaling lipid S1P in lymph nodes position natural killer cells and regulate their interferon- γ response. *Nat. Immunol.* 18, 15–25.

Feng, C., Woodside, K.J., Vance, B.A., El-Khoury, D., Canelles, M., Lee, J., Gress, R., Fowlkes, B.J., Shores, E.W., and Love, P.E. (2002). A potential role for CD69 in thymocyte emigration. *Int. Immunol.* 14, 535–544.

Ferlinz, K., Kopal, G., Bernardo, K., Linke, T., Bär, B., Breiden, B., Neumann, U., Lang, F., Schuchman, E.H., and Sandhoff, K. (2001). Human Acid Ceramidase: Processing, Glycosylation, and Lysosomal Targeting. *J. Biol. Chem.* 276, 35352–35360.

Finley, A., Chen, Z., Esposito, E., Cuzzocrea, S., Sabbadini, R., and Salvemini, D. (2013). Sphingosine 1-Phosphate Mediates Hyperalgesia via a Neutrophil-Dependent Mechanism. *PLOS ONE* 8, e55255.

Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs. *Cell* 99, 23–33.

Förster, R., Davalos-Missslitz, A.C., and Rot, A. (2008). CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 362–371.

Friedl, P., Zänker, K.S., and Bröcker, E.-B. (1998). Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: Differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc. Res. Tech.* 43, 369–378.

Fukuhara, S., Simmons, S., Kawamura, S., Inoue, A., Orba, Y., Tokudome, T., Sunden, Y., Arai, Y., Moriwaki, K., Ishida, J., et al. (2012). The sphingosine-1-phosphate transporter

- Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J. Clin. Invest.* **122**, 1416–1426.
- Ganusov, V.V., and De Boer, R.J. (2007). Do most lymphocytes in humans really reside in the gut? *Trends Immunol.* **28**, 514–518.
- Gay, D., Maddon, P., Sekaly, R., Talle, M.A., Godfrey, M., Long, E., Goldstein, G., Chess, L., Axel, R., Kappler, J., et al. (1987). Functional interaction between human T-cell protein CD4 and the major histocompatibility complex HLA-DR antigen. *Nature* **328**, 626–629.
- Gebhardt, T., Wakim, L.M., Eidsmo, L., Reading, P.C., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2009). Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat. Immunol.* **10**, 524–530.
- Germain, R.N. (2002). T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 309–322.
- Girkontaite, I., Sakk, V., Wagner, M., Borggreffe, T., Tedford, K., Chun, J., and Fischer, K.-D. (2004). The Sphingosine-1-Phosphate (S1P) Lysophospholipid Receptor S1P3 Regulates MAdCAM-1+ Endothelial Cells in Splenic Marginal Sinus Organization. *J. Exp. Med.* **200**, 1491–1501.
- Glickman, M., Malek, R.L., Kwitek-Black, A.E., Jacob, H.J., and Lee, N.H. (1999). Molecular Cloning, Tissue-Specific Expression, and Chromosomal Localization of a Novel Nerve Growth Factor-Regulated G-Protein-Coupled Receptor, nrg-1. *Mol. Cell. Neurosci.* **14**, 141–152.
- Godfrey, D.I., Hammond, K.J.L., Poulton, L.D., Smyth, M.J., and Baxter, A.G. (2000). NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol. Today* **21**, 573–583.
- Gonzalez-Cabrera, P.J., Hla, T., and Rosen, H. (2007). Mapping Pathways Downstream of Sphingosine 1-Phosphate Subtype 1 by Differential Chemical Perturbation and Proteomics. *J. Biol. Chem.* **282**, 7254–7264.
- Graeler, M., and Goetzl, E.J. (2002). Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells. *FASEB J.* **16**, 1874–1878.
- Gräler, M.H., and Goetzl, E.J. (2004). The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *FASEB J.* **18**, 551–553.
- Gräler, M.H., Bernhardt, G., and Lipp, M. (1998). EDG6, a Novel G-Protein-Coupled Receptor Related to Receptors for Bioactive Lysophospholipids, Is Specifically Expressed in Lymphoid Tissue. *Genomics* **53**, 164–169.
- Gräler, M.H., Grosse, R., Kusch, A., Kremmer, E., Gudermann, T., and Lipp, M. (2003). The sphingosine 1-phosphate receptor S1P4 regulates cell shape and motility via coupling to Gi and G12/13. *J. Cell. Biochem.* **89**, 507–519.
- Green, J.A., Suzuki, K., Cho, B., Willison, L.D., Palmer, D., Allen, C.D.C., Schmidt, T.H.,

- Xu, Y., Proia, R.L., Coughlin, S.R., et al. (2011). The sphingosine 1-phosphate receptor S1P 2 maintains the homeostasis of germinal center B cells and promotes niche confinement. *Nat. Immunol.* 12, 672–680.
- Grégoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E., and Walzer, T. (2007). The trafficking of natural killer cells. *Immunol. Rev.* 220, 169.
- Griffith, J.W., Cl, S., and Ad, L. (2014). Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 659–702.
- Grigorova, I.L., Schwab, S.R., Phan, T.G., Pham, T.H.M., Okada, T., and Cyster, J.G. (2009). Cortical sinus probing, S1P 1 -dependent entry and flow-based capture of egressing T cells. *Nat. Immunol.* 10, 58–65.
- Grigorova, I.L., Panteleev, M., and Cyster, J.G. (2010). Lymph node cortical sinus organization and relationship to lymphocyte egress dynamics and antigen exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 20447.
- Grossman, S. (2013). *Porth's Pathophysiology: Concepts of Altered Health States* (Lippincott Williams & Wilkins).
- Gunn, M.D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L.T., and Nakano, H. (1999). Mice Lacking Expression of Secondary Lymphoid Organ Chemokine Have Defects in Lymphocyte Homing and Dendritic Cell Localization. *J. Exp. Med.* 189, 451.
- Hall, J.G., and Morris, B. (1965). The immediate effect of antigens on the cell output of a lymph node. *Br. J. Exp. Pathol.* 46, 450.
- Hänel, P., Andréani, P., and Gräler, M.H. (2007). Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J.* 21, 1202–1209.
- Hanson, M.A., Roth, C.B., Jo, E., Griffith, M.T., Scott, F.L., Reinhart, G., Desale, H., Clemons, B., Cahalan, S.M., Schuerer, S.C., et al. (2012). Crystal Structure of a Lipid G protein-Coupled Receptor. *Science* 335, 851–855.
- Hardtke, S., Ohl, L., and Förster, R. (2005). Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help. *Blood* 106, 1924–1931.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17–producing CD4 + effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6, 1123–1132.
- Hauser, M.A., and Legler, D.F. (2016). Common and biased signaling pathways of the chemokine receptor CCR7 elicited by its ligands CCL19 and CCL21 in leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* 99, 869–882.
- Haynes, N.M., Allen, C.D.C., Lesley, R., Ansel, K.M., Killeen, N., and Cyster, J.G. (2007). Role of CXCR5 and CCR7 in Follicular Th Cell Positioning and Appearance of a Programmed Cell Death gene-1high Germinal Center-Associated Subpopulation. *J.*

Immunol. Baltim. Md 1950 179, 5099–5108.

Hisano, Y., Kobayashi, N., Kawahara, A., Yamaguchi, A., and Nishi, T. (2011). The Sphingosine 1-Phosphate Transporter, SPNS2, Functions as a Transporter of the Phosphorylated Form of the Immunomodulating Agent FTY720. *J. Biol. Chem.* 286, 1758–1766.

Hofmann, M., and Pircher, H. (2011). E-cadherin promotes accumulation of a unique memory CD8 T-cell population in murine salivary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16741.

Hogan, R.J., Zhong, W., Usherwood, E.J., Cookenham, T., Roberts, A.D., and Woodland, D.L. (2001). Protection from Respiratory Virus Infections Can Be Mediated by Antigen-Specific Cd4+ T Cells That Persist in the Lungs. *J. Exp. Med.* 193, 981–986.

Honig, S.M., Fu, S., Mao, X., Yopp, A., Gunn, M.D., Randolph, G.J., and Bromberg, J.S. (2003). FTY720 stimulates multidrug transporter– and cysteinyl leukotriene–dependent T cell chemotaxis to lymph nodes. *J. Clin. Invest.* 111, 627–637.

Igarashi, N., Okada, T., Hayashi, S., Fujita, T., Jahangeer, S., and Nakamura, S. (2003). Sphingosine Kinase 2 Is a Nuclear Protein and Inhibits DNA Synthesis. *J. Biol. Chem.* 278, 46832–46839.

Ikeda, M., Kihara, A., and Igarashi, Y. (2004). Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 338–343.

Im, D.-S., Heise, C.E., Ancellin, N., O'Dowd, B.F., Shei, G., Heavens, R.P., Rigby, M.R., Hla, T., Mandala, S., McAllister, G., et al. (2000a). Characterization of a Novel Sphingosine 1-Phosphate Receptor, Edg-8. *J. Biol. Chem.* 275, 14281–14286.

Im, D.-S., Heise, C.E., Ancellin, N., O'Dowd, B.F., Shei, G., Heavens, R.P., Rigby, M.R., Hla, T., Mandala, S., McAllister, G., et al. (2000b). Characterization of a Novel Sphingosine 1-Phosphate Receptor, Edg-8. *J. Biol. Chem.* 275, 14281–14286.

Im, D.S., Clemens, J., Macdonald, T.L., and Lynch, K.R. (2001). Characterization of the human and mouse sphingosine 1-phosphate receptor, S1P5 (Edg-8): structure-activity relationship of sphingosine1-phosphate receptors. *Biochemistry* 40, 14053–14060.

Imhof, B.A., Deugnier, M.A., Girault, J.M., Champion, S., Damais, C., Itoh, T., and Thiery, J.P. (1988). Thymotaxin: a thymic epithelial peptide chemotactic for T-cell precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 7699–7703.

Ishii, I., Friedman, B., Ye, X., Kawamura, S., McGiffert, C., Contos, J.J.A., Kingsbury, M.A., Zhang, G., Brown, J.H., and Chun, J. (2001). Selective Loss of Sphingosine 1-Phosphate Signaling with No Obvious Phenotypic Abnormality in Mice Lacking Its G Protein-coupled Receptor, LPB3/EDG-3. *J. Biol. Chem.* 276, 33697–33704.

Ishii, I., Ye, X., Friedman, B., Kawamura, S., Contos, J.J.A., Kingsbury, M.A., Yang, A.H., Zhang, G., Brown, J.H., and Chun, J. (2002). Marked Perinatal Lethality and Cellular

Signaling Deficits in Mice Null for the Two Sphingosine 1-Phosphate (S1P) Receptors, S1P2/LPB2/EDG-5 and S1P3/LPB3/EDG-3. *J. Biol. Chem.* 277, 25152–25159.

Itay, R., Nalawade, S., Eagar, T.N., and Forsthuber, T.G. (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 74, 5–17.

Ito, K., Anada, Y., Tani, M., Sano, T., Kihara, A., and Igarashi, Y. (2007). Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 212–217.

Jaigirdar, S.A., Benson, R.A., Elmesmari, A., Kurowska-Stolarska, M.S., McInnes, I.B., Garside, P., and MacLeod, M.K.L. (2017). Sphingosine-1-Phosphate Promotes the Persistence of Activated CD4 T Cells in Inflamed Sites. *Front. Immunol.* 8.

Jaillard, C., Harrison, S., Stankoff, B., Aigrot, M.S., Calver, A.R., Duddy, G., Walsh, F.S., Pangalos, M.N., Arimura, N., Kaibuchi, K., et al. (2005). Edg8/S1P5: An Oligodendroglial Receptor with Dual Function on Process Retraction and Cell Survival. *J. Neurosci.* 25, 1459.

Jarman, K.E., Moretti, P.A.B., Zebol, J.R., and Pitson, S.M. (2010). Translocation of Sphingosine Kinase 1 to the Plasma Membrane Is Mediated by Calcium- and Integrin-binding Protein 1. *J. Biol. Chem.* 285, 483–492.

Jean-Charles, P.-Y., Kaur, S., and Shenoy, S.K. (2017). GPCR signaling via β -arrestin-dependent mechanisms. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 70, 142.

Jenne, C.N., Enders, A., Rivera, R., Watson, S.R., Bankovich, A.J., Pereira, J.P., Xu, Y., Roots, C.M., Beilke, J.N., Banerjee, A., et al. (2009a). T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. *J. Exp. Med.* 206, 2469–2481.

Jenne, C.N., Enders, A., Rivera, R., Watson, S.R., Bankovich, A.J., Pereira, J.P., Xu, Y., Roots, C.M., Beilke, J.N., Banerjee, A., et al. (2009b). T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. *J. Exp. Med.* 206, 2469–2481.

Jiang, S., and Dong, C. (2013). A complex issue on CD4⁺ T-cell subsets. *Immunol. Rev.* 252, 5–11.

Jin, Y., Knudsen, E., Wang, L., Bryceson, Y., Damaj, B., Gessani, S., and Maghazachi, A.A. (2003). Sphingosine 1-phosphate is a novel inhibitor of T-cell proliferation. *Blood* 101, 4909–4915.

Johnson, K.R., Johnson, K.Y., Becker, K.P., Bielawski, J., Mao, C., and Obeid, L.M. (2003). Role of Human Sphingosine-1-phosphate Phosphatase 1 in the Regulation of Intra- and Extracellular Sphingosine-1-phosphate Levels and Cell Viability. *J. Biol. Chem.* 278, 34541–34547.

Jolly, P.S., Bektas, M., Olivera, A., Gonzalez-Espinosa, C., Proia, R.L., Rivera, J., Milstien, S., and Spiegel, S. (2004). Transactivation of Sphingosine-1-Phosphate Receptors by Fc ϵ RI Triggering Is Required for Normal Mast Cell Degranulation and Chemotaxis. *J.*

Exp. Med. 199, 959–970.

Jonnalagadda, D., Sunkara, M., Morris, A.J., and Whiteheart, S.W. (2014). Granule-mediated release of sphingosine-1-phosphate by activated platelets. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1841, 1581–1589.

Kaech, S.M., and Wherry, E.J. (2007). Heterogeneity and Cell-Fate Decisions in Effector and Memory CD8+ T Cell Differentiation during Viral Infection. *Immunity* 27, 393–405.

Kappos, L., Bar-Or, A., Cree, B.A.C., Fox, R.J., Giovannoni, G., Gold, R., Vermersch, P., Arnold, D.L., Arnould, S., Scherz, T., et al. (2018). Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *The Lancet* 391, 1263–1273.

Keul, P., Lucke, S., von Wnuck Lipinski, K., Bode, C., Gräler, M.H., Heusch, G., and Levkau, B. (2011). Sphingosine-1-Phosphate Receptor 3 Promotes Recruitment of Monocyte/Macrophages in Inflammation and Atherosclerosis. *Circ. Res.* 108, 314–323.

Kindt, T.J. (2007). *Kuby Immunology* (New York: W.H.Freeman & Co Ltd).

Kitatani, K., Idkowiak-Baldys, J., and Hannun, Y.A. (2008). The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell. Signal.* 20, 1010.

Kivisäkk, P., Mahad, D.J., Callahan, M.K., Sikora, K., Trebst, T., Tucky, B., Wujek, J., Ravid, R., Staugaitis, S.M., Lassmann, H., et al. (2004). Expression of CCR7 in Multiple Sclerosis: Implications for CNS Immunity. *Ann. Neurol.* 55, 627–638.

Klausner, R.D., Lippincott-Schwartz, J., and Bonifacino, J.S. (1990). The T Cell Antigen Receptor: Insights Into Organelle Biology. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 403–431.

Kobayashi, N., Nishi, T., Hirata, T., Kihara, A., Sano, T., Igarashi, Y., and Yamaguchi, A. (2006). Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner. *J. Lipid Res.* 47, 614–621.

Kobayashi, N., Kobayashi, N., Yamaguchi, A., and Nishi, T. (2009). Characterization of the ATP-dependent Sphingosine 1-Phosphate Transporter in Rat Erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 284, 21192–21200.

Kohno, T., Matsuyuki, H., Inagaki, Y., and Igarashi, Y. (2003). Sphingosine 1-phosphate promotes cell migration through the activation of Cdc42 in Edg-6/S1P4-expressing cells. *Genes Cells* 8, 685–697.

Kon, J., Sato, K., Watanabe, T., Tomura, H., Kuwabara, A., Kimura, T., Tamama, K., Ishizuka, T., Murata, N., Kanda, T., et al. (1999). Comparison of Intrinsic Activities of the Putative Sphingosine 1-Phosphate Receptor Subtypes to Regulate Several Signaling Pathways in Their cDNA-transfected Chinese Hamster Ovary Cells. *J. Biol. Chem.* 274, 23940–23947.

Kono, M., Belyantseva, I.A., Skoura, A., Frolenkov, G.I., Starost, M.F., Dreier, J.L., Lidington, D., Bolz, S.-S., Friedman, T.B., Hla, T., et al. (2007). Deafness and Stria Vascularis Defects in S1P2 Receptor-null Mice. *J. Biol. Chem.* 282, 10690–10696.

- Kułakowska, A., Zendzian-Piotrowska, M., Baranowski, M., Konończuk, T., Drozdowski, W., Górski, J., and Bucki, R. (2010). Intrathecal increase of sphingosine 1-phosphate at early stage multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* **477**, 149–152.
- Kumar, A., and Saba, J. (2015). Regulation of Immune Cell Migration by Sphingosine-1-Phosphate. *Cell. Mol. Biol. OMICS* **61**.
- Kuo, C.T., Veselits, M.L., and Leiden, J.M. (1997). LKLF: A Transcriptional Regulator of Single-Positive T Cell Quiescence and Survival. *Science* **277**, 1986–1990.
- Lai, L.-W., Yong, K.-C., Igarashi, S., and Lien, Y.-H. (2007). A sphingosine-1-phosphate type 1 receptor agonist inhibits the early T-cell transient following renal ischemia–reperfusion injury. *Kidney Int.* **71**, 1223–1231.
- Laidlaw, B.J., Gray, E.E., Zhang, Y., Ramírez-Valle, F., and Cyster, J.G. (2019). Sphingosine-1-phosphate receptor 2 restrains egress of $\gamma\delta$ T cells from the skin. *J. Exp. Med.* **216**, 1487–1496.
- Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. *Cell* **84**, 359–369.
- Le Stunff, H., Peterson, C., Thornton, R., Milstien, S., Mandala, S.M., and Spiegel, S. (2002). Characterization of Murine Sphingosine-1-phosphate Phosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* **277**, 8920–8927.
- Ledgerwood, L.G., Lal, G., Zhang, N., Garin, A., Esses, S.J., Ginhoux, F., Merad, M., Peche, H., Lira, S.A., Ding, Y., et al. (2008). The sphingosine 1-phosphate receptor 1 causes tissue retention by inhibiting the entry of peripheral tissue T lymphocytes into afferent lymphatics. *Nat. Immunol.* **9**, 42–53.
- Lee, M.-J., Evans, M., and Hla, T. (1996). The Inducible G Protein-coupled Receptor edg-1 Signals via the G/Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. *J. Biol. Chem.* **271**, 11272–11279.
- Lee, M.-J., Brocklyn, J.R.V., Thangada, S., Liu, C.H., Hand, A.R., Menzeleev, R., Spiegel, S., and Hla, T. (1998). Sphingosine-1-Phosphate as a Ligand for the G Protein-Coupled Receptor EDG-1. *Science* **279**, 1552–1555.
- Lee, Y.-M., Venkataraman, K., Hwang, S.-I., Han, D.K., and Hla, T. (2007). A novel method to quantify sphingosine 1-phosphate by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **84**, 154–162.
- Lepley, D., Paik, J.-H., Hla, T., and Ferrer, F. (2005). The G Protein-Coupled Receptor S1P2 Regulates Rho/Rho Kinase Pathway to Inhibit Tumor Cell Migration. *Cancer Res.* **65**, 3788–3795.
- Lind, E.F., Prockop, S.E., Porritt, H.E., and Petrie, H.T. (2001). Mapping Precursor Movement through the Postnatal Thymus Reveals Specific Microenvironments Supporting Defined Stages of Early Lymphoid Development. *J. Exp. Med.* **194**, 127–134.
- Liu, C.H., and Hla, T. (1997). The Mouse Gene for the Inducible G-Protein-Coupled

Receptoredg-1. *Genomics* 43, 15–24.

Liu, C.H., Thangada, S., Lee, M.-J., Van Brocklyn, J.R., Spiegel, S., and Hla, T. (1999). Ligand-induced Trafficking of the Sphingosine-1-phosphate Receptor EDG-1. *Mol. Biol. Cell* 10, 1179–1190.

Liu, G., Burns, S., Huang, G., Boyd, K., Proia, R.L., Flavell, R.A., and Chi, H. (2009). The receptor S1P 1 overrides regulatory T cell–mediated immune suppression through Akt-mTOR. *Nat. Immunol.* 10, 769–777.

Liu, Y., Wada, R., Yamashita, T., Mi, Y., Deng, C.-X., Hobson, J.P., Rosenfeldt, H.M., Nava, V.E., Chae, S.-S., Lee, M.-J., et al. (2000). Edg-1, the G protein–coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J. Clin. Invest.* 106, 951–961.

Lo, C.G., Xu, Y., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2005). Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. *J. Exp. Med.* 201, 291–301.

Long, J.S., Pyne, N.J., and Pyne, S. (2008). Lipid phosphate phosphatases form homo- and hetero-oligomers: catalytic competency, subcellular distribution and function. *Biochem. J.* 411, 371–377.

Long, J.S., Fujiwara, Y., Edwards, J., Tannahill, C.L., Tigyi, G., Pyne, S., and Pyne, N.J. (2010). Sphingosine 1-Phosphate Receptor 4 Uses HER2 (ERBB2) to Regulate Extracellular Signal Regulated Kinase-1/2 in MDA-MB-453 Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 285, 35957–35966.

Maceyka, M., Sankala, H., Hait, N.C., Stunff, H.L., Liu, H., Toman, R., Collier, C., Zhang, M., Satin, L.S., Merrill, A.H., et al. (2005). SphK1 and SphK2, Sphingosine Kinase Isoenzymes with Opposing Functions in Sphingolipid Metabolism. *J. Biol. Chem.* 280, 37118–37129.

Mackay, C.R., Marston, W.L., and Dudler, B. (1990). Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J. Exp. Med.* 171, 801.

Mackay, L.K., Braun, A., Macleod, B.L., Collins, N., Tebartz, C., Bedoui, S., Carbone, F.R., and Gebhardt, T. (2015). Cutting Edge: CD69 Interference with Sphingosine-1-Phosphate Receptor Function Regulates Peripheral T Cell Retention. *J. Immunol.* 194, 2059–2063.

MacLennan, A.J., Browe, C.S., Gaskin, A.A., Lado, D.C., and Shaw, G. (1994). Cloning and Characterization of a Putative G-Protein Coupled Receptor Potentially Involved in Development. *Mol. Cell. Neurosci.* 5, 201–209.

MacLennan, A.J., Carney, P.R., Zhu, W.J., Chaves, A.H., Garcia, J., Grimes, J.R., Anderson, K.J., Roper, S.N., and Lee, N. (2001). An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LPB2 sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability. *Eur. J. Neurosci.* 14, 203–209.

Maeda, Y., Matsuyuki, H., Shimano, K., Kataoka, H., Sugahara, K., and Chiba, K. (2007).

Migration of CD4 T Cells and Dendritic Cells Toward Sphingosine 1-phosphate (S1P) Is Mediated by Different Receptor Subtypes: S1P Regulates the Functions of Murine Mature Dendritic Cells via S1P Receptor Type 3. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **178**.

Maeda, Y., Seki, N., Sato, N., Sugahara, K., and Chiba, K. (2010). Sphingosine 1-phosphate receptor type 1 regulates egress of mature T cells from mouse bone marrow. *Int. Immunol.* **22**, 515–525.

Malek, R.L., Toman, R.E., Edsall, L.C., Wong, S., Chiu, J., Letterle, C.A., Brocklyn, J.R.V., Milstien, S., Spiegel, S., and Lee, N.H. (2001). Nrg-1 Belongs to the Endothelial Differentiation Gene Family of G Protein-coupled Sphingosine-1-phosphate Receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 5692–5699.

Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., Quackenbush, E., Xie, J., Milligan, J., Thornton, R., Shei, G.-J., Card, D., Keohane, C., et al. (2002). Alteration of Lymphocyte Trafficking by Sphingosine-1-Phosphate Receptor Agonists. *Science* **296**, 346–349.

Mandl, J.N., Liou, R., Klauschen, F., Vrisekoop, N., Monteiro, J.P., Yates, A.J., Huang, A.Y., and Germain, R.N. (2012). Quantification of lymph node transit times reveals differences in antigen surveillance strategies of naïve CD4+ and CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 18036.

Mantovani, A., Locati, M., Vecchi, A., Sozzani, S., and Allavena, P. (2001). Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends Immunol.* **22**, 328–336.

Mao, C., Xu, R., Szulc, Z.M., Bielawska, A., Galadari, S.H., and Obeid, L.M. (2001). Cloning and Characterization of a Novel Human Alkaline Ceramidase A MAMMALIAN ENZYME THAT HYDROLYZES PHYTOCERAMIDE. *J. Biol. Chem.* **276**, 26577–26588.

Marrack, P., and Kappler, J. (1997). Positive selection of thymocytes bearing $\alpha\beta$ T cell receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 250–255.

Masopust, D., and Schenkel, J.M. (2013). The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 309–320.

Masopust, D., Choo, D., Vezys, V., Wherry, E.J., Duraiswamy, J., Akondy, R., Wang, J., Casey, K.A., Barber, D.L., Kawamura, K.S., et al. (2010). Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *J. Exp. Med.* **207**, 553–564.

Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **427**, 355–360.

Matsuyuki, H., Maeda, Y., Yano, K., Sugahara, K., Chiba, K., Kohno, T., and Igarashi, Y. (2006). Involvement of Sphingosine 1-phosphate (S1P) Receptor Type 1 and Type 4 in Migratory Response of Mouse T Cells Toward S1P. *Cell. Mol. Immunol.* **3**.

Mayol, K., Biajoux, V., Marvel, J., Balabanian, K., and Walzer, T. (2011). Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking. *Blood* **118**,

4863–4871.

Mazo, I.B., Honczarenko, M., Leung, H., Cavanagh, L.L., Bonasio, R., Weninger, W., Engelke, K., Xia, L., McEver, R.P., Koni, P.A., et al. (2005). Bone Marrow Is a Major Reservoir and Site of Recruitment for Central Memory CD8⁺ T Cells. *Immunity* 22, 259–270.

Mehling, M., Brinkmann, V., Antel, J., Bar-Or, A., Goebels, N., Vedrine, C., Kristofic, C., Kuhle, J., Lindberg, R.L.P., and Kappos, L. (2008). FTY720 Therapy Exerts Differential Effects on T Cell Subsets in Multiple Sclerosis. *Neurology* 71.

Mendelson, K., Zygmunt, T., Torres-Vázquez, J., Evans, T., and Hla, T. (2013). Sphingosine 1-Phosphate Receptor Signaling Regulates Proper Embryonic Vascular Patterning. *J. Biol. Chem.* 288, 2143–2156.

Mendoza, A., Bréart, B., Ramos-Perez, W.D., Pitt, L.A., Gobert, M., Sunkara, M., Lafaille, J.J., Morris, A.J., and Schwab, S.R. (2012). The Transporter Spns2 Is Required for Secretion of Lymph but Not Plasma Sphingosine-1-Phosphate. *Cell Rep.* 2, 1104–1110.

Mendoza, A., Fang, V., Chen, C., Serasinghe, M., Verma, A., Muller, J., Chaluvadi, V.S., Dustin, M.L., Hla, T., Elemento, O., et al. (2017). Lymphatic endothelial S1P promotes mitochondrial function and survival in naive T cells. *Nature* 546, 158–161.

Messias, C.V., Santana-Van-Vliet, E., Lemos, J.P., Moreira, O.C., Cotta-de-Almeida, V., Savino, W., and Mendes-da-Cruz, D.A. (2016). Sphingosine-1-Phosphate Induces Dose-Dependent Chemotaxis or Fugetaxis of T-ALL Blasts through S1P1 Activation. *PLOS ONE* 11, e0148137.

Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Alemany, R., Laser, K.T., Neumann, E., Zhang, C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K.H., and van Koppen, C.J. (1998). Sphingosine kinase-mediated Ca²⁺ signalling by G-protein-coupled receptors. *EMBO J.* 17, 2830–2837.

Miller, M.J., Wei, S.H., Parker, I., and Cahalan, M.D. (2002). Two-Photon Imaging of Lymphocyte Motility and Antigen Response in Intact Lymph Node. *Science* 296, 1869–1873.

Miller, M.J., Wei, S.H., Cahalan, M.D., and Parker, I. (2003). Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2604.

Mionnet, C., Sanos, S.L., Mondor, I., Jorquera, A., Laugier, J.-P., Germain, R.N., and Bajénoff, M. (2011). High endothelial venules as traffic control points maintaining lymphocyte population homeostasis in lymph nodes. *Blood* 118, 6115–6122.

Miyasaka, M., and Tanaka, T. (2004). Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 360–370.

Mizugishi, K., Yamashita, T., Olivera, A., Miller, G.F., Spiegel, S., and Proia, R.L. (2005). Essential Role for Sphingosine Kinases in Neural and Vascular Development. *Mol. Cell. Biol.* 25, 11113–11121.

Morales-Ruiz, M., Lee, M.-J., Zöllner, S., Gratton, J.-P., Scotland, R., Shiojima, I., Walsh, K., Hla, T., and Sessa, W.C. (2001). Sphingosine 1-Phosphate Activates Akt, Nitric Oxide Production, and Chemotaxis through a GiProtein/Phosphoinositide 3-Kinase Pathway in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 276, 19672–19677.

Moriyama, S., Takahashi, N., Green, J.A., Hori, S., Kubo, M., Cyster, J.G., and Okada, T. (2014). Sphingosine-1-phosphate receptor 2 is critical for follicular helper T cell retention in germinal centers. *J. Exp. Med.* 211, 1297–1305.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two Types of Murine Helper T Cell Clone. I. Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 136, 2348–2357.

Muppidi, J.R., Schmitz, R., Green, J.A., Xiao, W., Larsen, A.B., Braun, S.E., An, J., Xu, Y., Rosenwald, A., Ott, G., et al. (2014). Loss of signalling via Gα13 in germinal centre B-cell-derived lymphoma. *Nature* 516, 254–258.

Murata, N., Sato, K., Kon, J., Tomura, H., Yanagita, M., Kuwabara, A., Ui, M., and Okajima, F. (2000). Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem. J.* 352, 809.

Nakai, A., Hayano, Y., Furuta, F., Noda, M., and Suzuki, K. (2014). Control of lymphocyte egress from lymph nodes through β2-adrenergic receptors. *J. Exp. Med.* 211, 2583–2598.

Niedernberg, A., Blaukat, A., Schöneberg, T., and Kostenis, E. (2003). Regulated and constitutive activation of specific signalling pathways by the human S1P5 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 138, 481–493.

Nimnual, A.S., Taylor, L.J., and Bar-Sagi, D. (2003). Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat. Cell Biol.* 5, 236–241.

Nobes, C.D., and Hall, A. (1999). Rho GTPases Control Polarity, Protrusion, and Adhesion during Cell Movement. *J. Cell Biol.* 144, 1235–1244.

Novgorodov, A.S., El-Alwani, M., Bielawski, J., Obeid, L.M., and Gudz, T.I. (2007). Activation of sphingosine-1-phosphate receptor S1P5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration. *FASEB J.* 21, 1503–1514.

Nussbaum, C., Bannenberg, S., Keul, P., Gräler, M.H., Gonçalves-de-Albuquerque, C.F., Korhonen, H., Lipinski, K. von W., Heusch, G., Neto, H.C. de C.F., Rohwedder, I., et al. (2015). Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes leukocyte rolling by mobilizing endothelial P-selectin. *Nat. Commun.* 6, 1–12.

Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., and Corcoran, L.M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 160–171.

Obar, J.J., and Lefrançois, L. (2010). Early events governing memory CD8+ T-cell differentiation. *Int. Immunol.* 22, 619–625.

- Ogawa, C., Kihara, A., Gokoh, M., and Igarashi, Y. (2003). Identification and Characterization of a Novel Human Sphingosine-1-phosphate Phosphohydrolase, hSPP2. *J. Biol. Chem.* 278, 1268–1272.
- Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). CC Chemokine Receptor 7 Contributes to Gi-dependent T Cell Motility in the Lymph Node. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 178.
- Okada, T., Ngo, V.N., Ekland, E.H., Förster, R., Lipp, M., Littman, D.R., and Cyster, J.G. (2002). Chemokine Requirements for B Cell Entry to Lymph Nodes and Peyer's Patches. *J. Exp. Med.* 196, 65–75.
- Okamoto, H., Takuwa, N., Gonda, K., Okazaki, H., Chang, K., Yatomi, Y., Shigematsu, H., and Takuwa, Y. (1998). EDG1 Is a Functional Sphingosine-1-phosphate Receptor That Is Linked via a Gi/o to Multiple Signaling Pathways, Including Phospholipase C Activation, Ca²⁺Mobilization, Ras-Mitogen-activated Protein Kinase Activation, and Adenylate Cyclase Inhibition. *J. Biol. Chem.* 273, 27104–27110.
- Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S., and Spiegel, S. (1999). Sphingosine Kinase Expression Increases Intracellular Sphingosine-1-Phosphate and Promotes Cell Growth and Survival. *J. Cell Biol.* 147, 545–558.
- Olivera, A., Allende, M.L., and Proia, R.L. (2013). Shaping the landscape: Metabolic regulation of S1P gradients. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1831, 193–202.
- Olsson, T., Boster, A., Fernández, Ó., Freedman, M.S., Pozzilli, C., Bach, D., Berkani, O., Mueller, M.S., Sidorenko, T., Radue, E.-W., et al. (2014). Oral ponesimod in relapsing–remitting multiple sclerosis: a randomised phase II trial. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 85, 1198–1208.
- Oo, M.L., Thangada, S., Wu, M.-T., Liu, C.H., Macdonald, T.L., Lynch, K.R., Lin, C.-Y., and Hla, T. (2007). Immunosuppressive and Anti-angiogenic Sphingosine 1-Phosphate Receptor-1 Agonists Induce Ubiquitinylation and Proteasomal Degradation of the Receptor. *J. Biol. Chem.* 282, 9082–9089.
- O'Sullivan, C., and Dev, K.K. (2013). The structure and function of the S1P1 receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 401–412.
- Page, D.M., Kane, L.P., Onami, T.M., and Hedrick, S.M. (1996). Cellular and biochemical requirements for thymocyte negative selection. *Semin. Immunol.* 8, 69–82.
- Pan, S., Mi, Y., Pally, C., Beerli, C., Chen, A., Guerini, D., Hinterding, K., Nuesslein-Hildesheim, B., Tuntland, T., Lefebvre, S., et al. (2006). A Monoselective Sphingosine-1-Phosphate Receptor-1 Agonist Prevents Allograft Rejection in a Stringent Rat Heart Transplantation Model. *Chem. Biol.* 13, 1227–1234.
- Pappu, R., Schwab, S.R., Cornelissen, I., Pereira, J.P., Regard, J.B., Xu, Y., Camerer, E., Zheng, Y.-W., Huang, Y., Cyster, J.G., et al. (2007). Promotion of Lymphocyte Egress into Blood and Lymph by Distinct Sources of Sphingosine-1-Phosphate. *Science* 316, 295–298.

- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., et al. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* *6*, 1133–1141.
- Peest, U., Sensken, S.-C., Andréani, P., Hänel, P., Van Veldhoven, P.P., and Gräler, M.H. (2008). S1P-lyase independent clearance of extracellular sphingosine 1-phosphate after dephosphorylation and cellular uptake. *J. Cell. Biochem.* *104*, 756–772.
- Pereira, J.P., Cyster, J.G., and Xu, Y. (2010). A Role for S1P and S1P1 in Immature-B Cell Egress from Mouse Bone Marrow. *PLOS ONE* *5*, e9277.
- Pham, T.H.M., Okada, T., Matloubian, M., Lo, C.G., and Cyster, J.G. (2008). S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by Gai-coupled receptors to promote T cell egress. *Immunity* *28*, 122.
- Pham, T.H.M., Baluk, P., Xu, Y., Grigorova, I., Bankovich, A.J., Pappu, R., Coughlin, S.R., McDonald, D.M., Schwab, S.R., and Cyster, J.G. (2010). Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning. *J. Exp. Med.* *207*, 17–27.
- Pittet, M.J., and Mempel, T.R. (2008). Regulation of T-cell Migration and Effector Functions: Insights From in Vivo Imaging Studies. *Immunol. Rev.* *221*, 107–129.
- Poznansky, M.C., Olszak, I.T., Evans, R.H., Wang, Z., Foxall, R.B., Olson, D.P., Weibrecht, K., Luster, A.D., and Scadden, D.T. (2002). Thymocyte emigration is mediated by active movement away from stroma-derived factors. *J. Clin. Invest.* *109*, 1101–1110.
- del Pozo, M.A., Vicente-Manzanares, M., Tejedor, R., Serrador, J.M., and Sánchez-Madrid, F. (1999). Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* *29*, 3609–3620.
- Priceman, S.J., Shen, S., Wang, L., Deng, J., Yue, C., Kujawski, M., and Yu, H. (2014). S1PR1 Is Crucial for Accumulation of Regulatory T Cells in Tumors via STAT3. *Cell Rep.* *6*, 992–999.
- Rajagopal, S., and Shenoy, S.K. (2018). GPCR Desensitization: Acute and Prolonged Phases. *Cell. Signal.* *41*, 9.
- Ramos-Perez, W.D., Fang, V., Escalante-Alcalde, D., Cammer, M., and Schwab, S.R. (2015). A map of the distribution of sphingosine 1-phosphate in the spleen. *Nat. Immunol.* *16*, 1245–1252.
- Rantakari, P., Auvinen, K., Jäppinen, N., Kapraali, M., Valtonen, J., Karikoski, M., Gerke, H., Iftakhar-E-Khuda, I., Keuschnigg, J., Umemoto, E., et al. (2015). The endothelial protein PLVAP in lymphatics controls the entry of lymphocytes and antigens into lymph nodes. *Nat. Immunol.* *16*, 386–396.
- Rathinasamy, A., Czeloth, N., Pabst, O., Förster, R., and Bernhardt, G. (2010). The Origin and Maturity of Dendritic Cells Determine the Pattern of Sphingosine 1-phosphate Receptors Expressed and Required for Efficient Migration. *J. Immunol.*

Baltim. Md 1950 185, 4072–4081.

Reichardt, P., Patzak, I., Jones, K., Etemire, E., Gunzer, M., and Hogg, N. (2013). A role for LFA-1 in delaying T-lymphocyte egress from lymph nodes. *EMBO J.* 32, 829–843.

Resop, R.S., Douaisi, M., Craft, J., Jachimowski, L.C.M., Blom, B., and Uittendogaart, C.H. (2016). Sphingosine-1-phosphate/sphingosine-1-phosphate receptor 1 signaling is required for migration of naive human T cells from the thymus to the periphery. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 551-557.e8.

Richards, B., Zharkikh, L., Hsu, F., Dunn, C., Kamb, A., and Teng, D.H.-F. (2002). Stable expression of Anthozoa fluorescent proteins in mammalian cells. *Cytometry* 48, 106–112.

Rosato, P.C., Beura, L.K., and Masopust, D. (2017). Tissue resident memory T cells and viral immunity. *Curr. Opin. Virol.* 22, 44–50.

Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708–712.

Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 745–763.

Salmi, M., Karikoski, M., Elima, K., Rantakari, P., and Jalkanen, S. (2013). CD44 Binds to Macrophage Mannose Receptor on Lymphatic Endothelium and Supports Lymphocyte Migration via Afferent Lymphatics. *Circ. Res.* 112, 1577–1582.

Sanchez, T., and Hla, T. (2004). Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J. Cell. Biochem.* 92, 913–922.

Sanchez, T., Skoura, A., Ming, T.W., Casserly, B., Harrington, E.O., and Hla, T. (2007). Induction of Vascular Permeability by the Sphingosine-1-Phosphate Receptor–2 (S1P2R) and its Downstream Effectors ROCK and PTEN. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1312–1318.

Sánchez-Sánchez, N., Riol-Blanco, L., and Rodríguez-Fernández, J.L. (2006). The Multiple Personalities of the Chemokine Receptor CCR7 in Dendritic Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 5153–5159.

Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Wolf, D.C., D’Haens, G., Vermeire, V., Hanauer, S., Ghosh, S., Smith, H., Cravetq, M., Frohna, P.A., et al. (2016). Ozanimod Induction and Maintenance Treatment for Ulcerative Colitis. *N. Engl. J. Med.* 374, 1754–1762.

Santos-Cortez, R.L.P., Faridi, R., Rehman, A.U., Lee, K., Ansar, M., Wang, X., Morell, R.J., Isaacson, R., Belyantseva, I.A., Dai, H., et al. (2016). Autosomal-Recessive Hearing Impairment Due to Rare Missense Variants within S1PR2. *Am. J. Hum. Genet.* 98, 331–338.

Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Sahai, E., and

- Marshall, C.J. (2008). Rac Activation and Inactivation Control Plasticity of Tumor Cell Movement. *Cell* 135, 510–523.
- Sathaliyawala, T., Kubota, M., Yudanin, N., Turner, D., Camp, P., Thome, J.J.C., Bickham, K.L., Lerner, H., Goldstein, M., Sykes, M., et al. (2013). Distribution and Compartmentalization of Human Circulating and Tissue-Resident Memory T Cell Subsets. *Immunity* 38, 187–197.
- Sato, K., Ui, M., and Okajima, F. (2000). Differential roles of Edg-1 and Edg-5, sphingosine 1-phosphate receptors, in the signaling pathways in C6 glioma cells. *Mol. Brain Res.* 85, 151–160.
- Saule, P., Trauet, J., Dutriez, V., Lekeux, V., Dessaint, J.-P., and Labalette, M. (2006). Accumulation of memory T cells from childhood to old age: Central and effector memory cells in CD4+ versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8+ compartment. *Mech. Ageing Dev.* 127, 274–281.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A., and Schlissel, M.S. (1992). V(D)J Recombination: Molecular Biology and Regulation. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 359–383.
- Schenkel, J.M., and Masopust, D. (2014). Tissue-Resident Memory T Cells. *Immunity* 41, 886–897.
- Schineis, P., Runge, P., and Halin (2019). Cellular traffic through afferent lymphatic vessels. *Vascul. Pharmacol.* 112, 31–41.
- Schober, S.L., Kuo, C.T., Schluns, K.S., Lefrançois, L., Leiden, J.M., and Jameson, S.C. (1999). Expression of the Transcription Factor Lung Krüppel-like Factor Is Regulated by Cytokines and Correlates With Survival of Memory T Cells in Vitro and in Vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 163, 3662–3667.
- Schulze, T., Golfier, S., Tabeling, C., Räbel, K., Gräler, M.H., Witzernath, M., and Lipp, M. (2011). Sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1P4) deficiency profoundly affects dendritic cell function and TH17-cell differentiation in a murine model. *FASEB J.* 25, 4024–4036.
- Schwab, S.R., Pereira, J.P., Matloubian, M., Xu, Y., Huang, Y., and Cyster, J.G. (2005). Lymphocyte Sequestration Through S1P Lyase Inhibition and Disruption of S1P Gradients. *Science* 309, 1735–1739.
- Schwarz, R.H. (1992). Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71, 1065–1068.
- Scimone, M.L., Aifantis, I., Apostolou, I., Boehmer, H. von, and Andrian, U.H. von (2006). A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7006.
- Sensken, S.-C., Bode, C., Nagarajan, M., Peest, U., Pabst, P., and Gräler, M.H. (2010). Redistribution of Sphingosine 1-phosphate by Sphingosine Kinase 2 Contributes to Lymphopenia. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 184, 4133–4142.

- Shamri, R., Grabovsky, V., Gauguier, J.-M., Feigelson, S., Manevich, E., Kolanus, W., Robinson, M.K., Staunton, D.E., Andrian, U.H. von, and Alon, R. (2005). Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat. Immunol.* *6*, 497–506.
- Shiow, L.R., Rosen, D.B., Brdičková, N., Xu, Y., An, J., Lanier, L.L., Cyster, J.G., and Matloubian, M. (2006). CD69 acts downstream of interferon- α/β to inhibit S1P₁ and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* *440*, 540–544.
- Sic, H., Kraus, H., Madl, J., Flittner, K.-A., von Münchow, A.L., Pieper, K., Rizzi, M., Kienzler, A.-K., Ayata, K., Rauer, S., et al. (2014). Sphingosine-1-phosphate receptors control B-cell migration through signaling components associated with primary immunodeficiencies, chronic lymphocytic leukemia, and multiple sclerosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *134*, 420–428.e15.
- Sinha, R.R., Park, C., Hwang, I.-Y., Davis, M.D., and Kehrl, J.H. (2009). B Lymphocytes Exit Lymph Nodes through Cortical Lymphatic Sinusoids by a Mechanism Independent of Sphingosine-1-Phosphate-Mediated Chemotaxis. *Immunity* *30*, 434–446.
- Skon, C.N., Lee, J.-Y., Anderson, K.G., Masopust, D., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2013). Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for establishment of resident memory CD8⁺ T cells. *Nat. Immunol.* *14*, 1285–1293.
- Skoura, Athanasia, A., Michaud, J., Im, D.-S., Thangada, Shobha, T., Xiong, Y., Smith, J.D., and Hla, T. (2011). Sphingosine-1-Phosphate Receptor-2 Function in Myeloid Cells Regulates Vascular Inflammation and Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 81–85.
- Son, D.S., Lee, H.W., Shin, H.W., Lee, J.J., Yoo, H.S., Kim, T.J., Yun, Y.P., and Hong, J.T. (2008). Enhanced release of sphingosine-1-phosphate from hypercholesterolemic platelets: Role in development of hypercholesterolemic atherosclerosis. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *78*, 383–390.
- Soroosh, P., Ine, S., Sugamura, K., and Ishii, N. (2007). Differential Requirements for OX40 Signals on Generation of Effector and Central Memory CD4⁺ T Cells. *J. Immunol.* *179*, 5014–5023.
- Spiegel, S., Foster, D., and Kolesnick, R. (1996). Signal transduction through lipid second messengers. *Curr. Opin. Cell Biol.* *8*, 159–167.
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Santo, J.P.D., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2013). Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 145–149.
- Steinmann, G.G. (1986). Changes in the Human Thymus During Aging. *Curr. Top. Pathol.* *75*, 43–88.
- Sugimoto, N., Takuwa, N., Okamoto, H., Sakurada, S., and Takuwa, Y. (2003). Inhibitory and Stimulatory Regulation of Rac and Cell Motility by the G12/13-Rho and Gi Pathways Integrated Downstream of a Single G Protein-Coupled Sphingosine-1-Phosphate Receptor Isoform. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 1534–1545.

- Sugita, K., Kabashima, K., Sakabe, J., Yoshiki, R., Tanizaki, H., and Tokura, Y. (2010). FTY720 Regulates Bone Marrow Egress of Eosinophils and Modulates Late-Phase Skin Reaction in Mice. *Am. J. Pathol.* 177, 1881–1887.
- Takashima, S., Sugimoto, N., Takuwa, N., Okamoto, Y., Yoshioka, K., Takamura, M., Takata, S., Kaneko, S., and Takuwa, Y. (2008). G12/13 and Gq mediate S1P2-induced inhibition of Rac and migration in vascular smooth muscle in a manner dependent on Rho but not Rho kinase. *Cardiovasc. Res.* 79, 689–697.
- Takeuchi, A., Itoh, Y., Takumi, A., Ishihara, C., Arase, N., Yokosuka, T., Koseki, H., Yamasaki, S., Takai, Y., Miyoshi, J., et al. (2009). CRTAM Confers Late-Stage Activation of CD8+ T Cells to Regulate Retention Within Lymph Node. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 183, 4220–4228.
- Tan, C., and Gery, I. (2012). The Unique Features of Th9 Cells and their Products. *Crit. Rev. Immunol.* 32, 1.
- Tani, M., Iida, H., and Ito, M. (2003). O-Glycosylation of Mucin-like Domain Retains the Neutral Ceramidase on the Plasma Membranes as a Type II Integral Membrane Protein. *J. Biol. Chem.* 278, 10523–10530.
- Tani, M., Sano, T., Ito, M., and Igarashi, Y. (2005). Mechanisms of sphingosine and sphingosine 1-phosphate generation in human platelets. *J. Lipid Res.* 46, 2458–2467.
- Teijaro, J.R., Turner, D., Pham, Q., Wherry, E.J., Lefrançois, L., and Farber, D.L. (2011). Tissue-Retentive lung memory CD4 T cells mediate optimal protection to respiratory virus infection. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 5510.
- Teijeira, A., Hunter, M.C., Russo, E., Proulx, S.T., Frei, T., Debes, G.F., Coles, M., Melero, I., Detmar, M., Rouzaut, A., et al. (2017). T Cell Migration from Inflamed Skin to Draining Lymph Nodes Requires Intralymphatic Crawling Supported by ICAM-1/LFA-1 Interactions. *Cell Rep.* 18, 857–865.
- Thangada, S., Khanna, K.M., Blaho, V.A., Oo, M.L., Im, D.-S., Guo, C., Lefrancois, L., and Hla, T. (2010). Cell-surface residence of sphingosine 1-phosphate receptor 1 on lymphocytes determines lymphocyte egress kinetics. *J. Exp. Med.* 207, 1475–1483.
- Thuy, A.V., Reimann, C.-M., Hemdan, N.Y.A., and Gräler, M.H. (2014). Sphingosine 1-Phosphate in Blood: Function, Metabolism, and Fate. *Cell. Physiol. Biochem.* 34, 158–171.
- Townsend, M.J., Weinmann, A.S., Matsuda, J.L., Salomon, R., Farnham, P.J., Biron, C.A., Gapin, L., and Glimcher, L.H. (2004). T-bet Regulates the Terminal Maturation and Homeostasis of NK and Vα14i NKT Cells. *Immunity* 20, 477–494.
- Tsai, H.-C., and Han, M.H. (2016). Sphingosine-1-Phosphate (S1P) and S1P Signaling Pathway: Therapeutic Targets in Autoimmunity and Inflammation. *Drugs* 76, 1067–1079.
- Ueno, T., Hara, K., Willis, M.S., Malin, M.A., Höpken, U.E., Gray, D.H.D., Matsushima, K., Lipp, M., Springer, T.A., Boyd, R.L., et al. (2002). Role for CCR7 Ligands in the

Emigration of Newly Generated T Lymphocytes from the Neonatal Thymus. *Immunity* 16, 205–218.

Ueno, T., Saito, F., Gray, D.H.D., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Boyd, R.L., and Takahama, Y. (2004). CCR7 Signals Are Essential for Cortex–Medulla Migration of Developing Thymocytes. *J. Exp. Med.* 200, 493–505.

Vaclavkova, A., Chimenti, S., Arenberger, P., Holló, P., Sator, P.-G., Burcklen, M., Stefani, M., and D’Ambrosio, D. (2014). Oral ponesimod in patients with chronic plaque psoriasis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *The Lancet* 384, 2036–2045.

Van Brocklyn, J.R., Lee, M.-J., Menzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D.M., Coopman, P.J.P., Thangada, S., Liu, C.H., et al. (1998). Dual Actions of Sphingosine-1-Phosphate: Extracellular through the Gi-coupled Receptor Edg-1 and Intracellular to Regulate Proliferation and Survival. *J. Cell Biol.* 142, 229–240.

Van Brocklyn, J.R., Gräler, M.H., Bernhardt, G., Hobson, J.P., Lipp, M., and Spiegel, S. (2000). Sphingosine-1-phosphate Is a Ligand for the G Protein-Coupled Receptor EDG-6. *Blood* 95.

Van Brocklyn, J.R., Behbahani, B., and Lee, N.H. (2002). Homodimerization and heterodimerization of S1P/EDG sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1582, 89–93.

Van Veldhoven, P.P., and Mannaerts, G.P. (2000). Sphingosine-1-phosphate lyase. *Methods Enzymol.* 311, 244–254.

Van Veldhoven, P.P., Gijsbers, S., Mannaerts, G.P., Vermeesch, J.R., and Brys, V. (2000). Human sphingosine-1-phosphate lyase: cDNA cloning, functional expression studies and mapping to chromosome 10q22. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1487, 128–134.

Veldhoen, M., Uyttenhove, C., Snick, J. van, Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor- β “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9–producing subset. *Nat. Immunol.* 9, 1341–1346.

Veldkamp, C.T., Kiermaier, E., Gabel-Eissens, S.J., Gillitzer, M.L., Lippner, D.R., DiSilvio, F.A., Mueller, C.J., Wantuch, P.L., Chaffee, G.R., Famiglietti, M.W., et al. (2015). Solution Structure of CCL19 and Identification of Overlapping CCR7 and PSGL-1 Binding Sites. *Biochemistry* 54, 4163–4166.

Venkataraman, K., Lee, Y.-M., Michaud, J., Thangada, S., Ai, Bonkovsky, H.L., Parikh, N.S., Habrukowich, C., and Hla, T. (2008). Vascular Endothelium As a Contributor of Plasma Sphingosine 1-Phosphate. *Circ. Res.* 102, 669–676.

Vestweber, D. (2007). Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol. Rev.* 218, 178–196.

Vianello, F., Kraft, P., Mok, Y.T., Hart, W.K., White, N., and Poznansky, M.C. (2005). A

CXCR4-dependent Chemorepellent Signal Contributes to the Emigration of Mature Single-Positive CD4 Cells From the Fetal Thymus. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 175.

Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2018). Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* 174, 1054–1066.

Vockel, M., and Vestweber, D. (2013). How T cells trigger the dissociation of the endothelial receptor phosphatase VE-PTP from VE-cadherin. *Blood* 122, 2512–2522.

Vrieling, M., Santema, W., Van Rhijin, I., Rutten, V., and Koets, A. (2012). $\gamma\delta$ T Cell Homing to Skin and Migration to Skin-Draining Lymph Nodes Is CCR7 Independent. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 188, 578–584.

Walzer, T., Chiossone, L., Chaix, J., Calver, A., Carozzo, C., Garrigue-Antar, L., Jacques, Y., Baratin, M., Tomasello, E., and Vivier, E. (2007). Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat. Immunol.* 8, 1337–1344.

Wang, J., Kano, K., Saigusa, D., and Aoki, J. (2019). Measurement of the Spatial Distribution of S1P in Small Quantities of Tissues: Development and Application of a Highly Sensitive LC-MS/MS Method Combined with Laser Microdissection. *Mass Spectrom.* 8.

Wang, W., Graeler, M.H., and Goetzl, E.J. (2005). Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration. *FASEB J.* 19, 1731–1733.

Wang, Y., Chen Dixin, Zhang Yan, Wang Pingzhang, Zheng Can, Zhang Songyang, Yu Bing, Zhang Lu, Zhao Guizhen, Ma Baihui, et al. (2018). Novel Adipokine, FAM19A5, Inhibits Neointima Formation After Injury Through Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2. *Circulation* 138, 48–63.

Watterson, K.R., Johnston, E., Chalmers, C., Pronin, A., Cook, S.J., Benovic, J.L., and Palmer, T.M. (2002). Dual Regulation of EDG1/S1P1 Receptor Phosphorylation and Internalization by Protein Kinase C and G-protein-coupled Receptor Kinase 2. *J. Biol. Chem.* 277, 5767–5777.

Weber, J.P., Fuhrmann, F., Feist, R.K., Lahmann, A., Al Baz, M.S., Gentz, L.-J., Vu Van, D., Mages, H.W., Haftmann, C., Riedel, R., et al. (2015). ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Krüppel-like factor 2. *J. Exp. Med.* 212, 217–233.

Wei, S.H., Rosen, H., Matheu, M.P., Sanna, M.G., Wang, S.-K., Jo, E., Wong, C.-H., Parker, I., and Cahalan, M.D. (2005). Sphingosine 1-phosphate type 1 receptor agonism inhibits transendothelial migration of medullary T cells to lymphatic sinuses. *Nat. Immunol.* 6, 1228–1235.

Weichand, B., Weis, N., Weigert, A., Grossmann, N., Levkau, B., and Brüne, B. (2013). Apoptotic cells enhance sphingosine-1-phosphate receptor 1 dependent macrophage migration. *Eur. J. Immunol.* 43, 3306–3313.

- Weinreich, M.A., and Hogquist, K.A. (2008). Thymic emigration: when and how T cells leave home. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 2265.
- Weis, W.I., and Kobilka, B.K. (2014). The Molecular Basis of G Protein–Coupled Receptor Activation. *Annu. Rev. Biochem.* **87**, 897–919.
- Wildenberg, G.A., Dohn, M.R., Carnahan, R.H., Davis, M.A., Lobdell, N.A., Settleman, J., and Reynolds, A.B. (2006). p120-Catenin and p190RhoGAP Regulate Cell-Cell Adhesion by Coordinating Antagonism between Rac and Rho. *Cell* **127**, 1027–1039.
- Windh, R.T., Lee, M.-J., Hla, T., An, S., Barr, A.J., and Manning, D.R. (1999). Differential Coupling of the Sphingosine 1-Phosphate Receptors Edg-1, Edg-3, and H218/Edg-5 to the Gi, Gq, and G12 Families of Heterotrimeric G Proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 27351–27358.
- Woolf, E., Grigorova, I., Sagiv, A., Grabovsky, V., Feigelson, S.W., Shulman, Z., Hartmann, T., Sixt, M., Cyster, J.G., and Alon, R. (2007). Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces. *Nat. Immunol.* **8**, 1076–1085.
- Worbs, T., Mempel, T.R., Bölter, J., Andrian, U.H. von, and Förster, R. (2007). CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo. *J. Exp. Med.* **204**, 489.
- Wu, J., and Lingrel, J.B. (2005). Krüppel-like Factor 2, a Novel Immediate-Early Transcriptional Factor, Regulates IL-2 Expression in T Lymphocyte Activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 3060–3066.
- Xing, Y., Wang, X., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2016). Late stages of T cell maturation in the thymus involve NF-κB and tonic type I interferon signaling. *Nat. Immunol.* **17**, 565–573.
- Xiong, Y., Brinkman, C.C., Famulski, K.S., Mongodin, E.F., Lord, C.J., Hippen, K.L., Blazar, B.R., and Bromberg, J.S. (2017). A robust in vitro model for trans-lymphatic endothelial migration. *Sci. Rep.* **7**, 1–14.
- Xiong, Y., Piao, W., Brinkman, C.C., Li, L., Kulinski, J.M., Olivera, A., Cartier, A., Hla, T., Hippen, K.L., Blazar, B.R., et al. (2019). CD4 T cell sphingosine 1-phosphate receptor (S1PR)1 and S1PR4 and endothelial S1PR2 regulate afferent lymphatic migration. *Sci. Immunol.* **4**.
- Xu, R., Jin, J., Hu, W., Sun, W., Bielawski, J., Szulc, Z., Taha, T., Obeid, L.M., and Mao, C. (2006). Golgi alkaline ceramidase regulates cell proliferation and survival by controlling levels of sphingosine and S1P. *FASEB J.* **20**, 1813–1825.
- Yagi, H., Kamba, R., Chiba, K., Soga, H., Yaguchi, K., Nakamura, M., and Itoh, T. (2000). Immunosuppressant FTY720 inhibits thymocyte emigration. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1435–1444.
- Yamaguchi, F., Tokuda, M., Hatase, O., and Brenner, S. (1996). Molecular Cloning of the Novel Human G Protein–Coupled Receptor (GPCR) Gene Mapped on Chromosome 9.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 227, 608–614.

Yamashita, H., Kitayama, J., Yamaguchi, H., Mori, K., Osada, M., Aoki, S., Yatomi, Y., Takuwa, Y., and Nagawa, H. (2006). Sphingosine 1-Phosphate Receptor Expression Profile in Human Gastric Cancer Cells: Differential Regulation on the Migration and Proliferation. *J. Surg. Res.* 130, 80–87.

Yamazaki, Y., Kon, J., Sato, K., Tomura, H., Sato, M., Yoneya, T., Okazaki, H., Okajima, F., and Ohta, H. (2000). Edg-6 as a Putative Sphingosine 1-Phosphate Receptor Coupling to Ca²⁺ Signaling Pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 583–589.

Yang, L., Yatomi, Y., Miura, Y., Satoh, K., and Ozaki, Y. (1999). Metabolism and functional effects of sphingolipids in blood cells. *Br. J. Haematol.* 107, 282–293.

Yatomi, Y., Ruan, F., Hakomori, S., and Igarashi, Y. (1995). Sphingosine-1-phosphate: A Platelet-Activating Sphingolipid Released From Agonist-Stimulated Human Platelets. *Blood* 86, 193–202.

Yatomi, Y., Igarashi, Y., Yang, L., Hisano, N., Qi, R., Asazuma, N., Satoh, K., Ozaki, Y., and Kume, S. (1997a). Sphingosine 1-Phosphate, a Bioactive Sphingolipid Abundantly Stored in Platelets, Is a Normal Constituent of Human Plasma and Serum. *J. Biochem. (Tokyo)* 121, 969–973.

Yatomi, Y., Yamamura, S., Ruan, F., and Igarashi, Y. (1997b). Sphingosine 1-Phosphate Induces Platelet Activation through an Extracellular Action and Shares a Platelet Surface Receptor with Lysophosphatidic Acid. *J. Biol. Chem.* 272, 5291–5297.

Yoshida, R., Nagira, M., Kitaura, M., Imagawa, N., Imai, T., and Yoshie, O. (1998). Secondary Lymphoid-tissue Chemokine Is a Functional Ligand for the CC Chemokine Receptor CCR7. *J. Biol. Chem.* 273, 7118–7122.

Zachariah, M.A., and Cyster, J.G. (2010). Neural Crest–Derived Pericytes Promote Egress of Mature Thymocytes at the Corticomedullary Junction. *Science* 328, 1129–1135.

Zaslavsky, A., Singh, L.S., Tan, H., Ding, H., Liang, Z., and Xu, Y. (2006). Homo- and hetero-dimerization of LPA/S1P receptors, OGR1 and GPR4. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1761, 1200–1212.

Zhi, L., Kim, P., Thompson, B.D., Pitsillides, C., Bankovich, A.J., Yun, S.-H., Lin, C.P., Cyster, J.G., and Wu, M.X. (2011). FTY720 blocks egress of T cells in part by abrogation of their adhesion on the lymph node sinus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187, 2244.

Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2012). The Chemokine Superfamily Revisited. *Immunity* 36, 705–716.

Zúñiga-Pflücker, J.C., and Lenardo, M.J. (1996). Regulation of thymocyte development from immature progenitors. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 215–224.