



**HAL**  
open science

# Rôle de la reconnaissance CD1d/TCR dans la différentiation des sous populations iNKT

Ludivine Amable

► **To cite this version:**

Ludivine Amable. Rôle de la reconnaissance CD1d/TCR dans la différenciation des sous populations iNKT. Hématologie. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : 2022UNIP5084 . tel-04566081

**HAL Id: tel-04566081**

**<https://theses.hal.science/tel-04566081>**

Submitted on 2 May 2024

**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.

# Université Paris Cité

**Ecole doctorale Hématologie, oncogénèse et biothérapies (HOB, ED 561)**

*Institut de Recherche Saint Louis \_ Ecotaxie, microenvironnement et  
développement lymphocytaire (EMiLy, UMR\_S 1160)*

## **Rôle de la reconnaissance CD1d/TCR dans la différenciation des sous populations iNKT**

Par Ludivine AMABLE

Thèse de doctorat en Hématologie

Présentée et soutenue publiquement le 14 Octobre 2022, à Paris

Rapporteur : Renaud LESOURNE \_ CR-HDR \_ Université de Toulouse

Rapporteur : Valérie ZIMMERMANN \_ CR-HDR \_ Université de Montpellier

Examineur : Bruno LUCAS \_ DR \_ Université Paris Cité

Examineur : Julie DECHANET MERVILLE \_ DR \_ Université de Bordeaux

Directeur de Thèse : Kamel BENLAGHA \_ DR \_ Inserm

# Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse, Renaud Lesourne, Valérie Zimmermann, Julie Dechanet Merville et Bruno Lucas, pour avoir pris de leur temps pour évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie mon directeur de thèse, Kamel BENLAGHA, pour m'avoir accueillie il y a presque cinq ans dans son équipe. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée. Je remercie également le directeur de l'unité U1160, Antoine Toubert, qui je sais, a beaucoup contribué à ma quatrième année de thèse.

Une mention spéciale à Jihene qui a été un support de poids durant ces années. Merci pour ton soutien et ta gentillesse.

Je remercie tous les membres, passés et présents, de l'équipe BENLAGHA. Vous avez tous contribué de près ou de loin à cette thèse. Merci à Lorenzo avec qui tout a commencé et qui m'a permis de prendre de l'assurance devant la paillasse. Merci à Marta, débordante de vie, qui a amené joie de vie et bonne humeur au labo. Une grosse pensée pour Angélique, qui en peu de temps passé avec nous, a su nous toucher au plus profond de notre cœur. Je n'oublie pas non plus Lucie, Sebastian et Dina qui ont été d'agréables compagnons de bureau.

Luis un grand merci ! Surtout pour les derniers moments de cette thèse. Ton aide a vraiment été précieuse pour moi, j'espère ne pas en avoir trop abusé. De tout ce que j'ai pu t'apporter durant ces 2 années, j'aimerais que tu gardes une seule chose en tête vraiment essentielle : NOSTRESS ! Il faut apprendre à relativiser, la vie c'est en dehors du labo !

Un grand merci aux membres de l'équipe Canque, qui ont été mes piliers pendant ces 5 années passées à l'IRSL.

Babeth, la version asiatique de ma mère, tant par sa sauvagerie que sa gentillesse. Cette thèse n'aurait pas été la même sans ta présence. Merci pour nos « petites » pauses discussions, les petites visites à mon bureau, et tous les petits potins que tu nous racontais. Ton franc parler, tes petites manies et ta légendaire discrétion me manqueront.

Seydou, le cousin africain à qui je dois énormément ! Ta présence a rendu cette thèse plus légère et agréable. Tu m'as beaucoup apporté, tant professionnellement parlant et qu'amicalement. Pas besoin de longue dédicace, tu sais déjà.

Emna, ta bienveillance et tes conseils ont été un support de taille pour moi. Je ne peux que mentionner ton petit côté déluré, ton humour décalé et tes légendaires jeux de mots m'ont permis de me détendre et me relaxer pendant cette thèse.

A la team JCB/ Goodhardt, qui m'ont accueillie les bras grands ouverts et qui ont su m'intégrer à leur petit groupe. Un grand merci à tous pour tous ces bons moments passés à vos côtés (Caroline, Nathalie, Cécilia, Fabio, Simone, Isabelle...).

Lydie, une alliée hors pair pendant ces 5 années au labo. Deux antillais ensemble ça aurait pu faire des étincelles... mais pas du tout ! Une véritable entente, de « brèves » conversations, de nombreux points communs, un petit peu malparlantes parfois et une grande passion pour la nourriture. Bref, plus qu'une collègue, une véritable amie !

Je souhaite également remercier l'ensemble des membres de l'unité U1160 pour leurs présences et leurs conseils, notamment Camille que j'espère ne pas avoir trop embêtée avec mes RTqPCR. Je remercie chaleureusement Myriam, Patricia et Zozo avec qui j'ai passé de très bons moments et qui sont toujours là pour nous aider.

Un grand merci à Véronique pour son aide et ses précieux conseils. Je remercie également les animaliers pour leur bonne humeur et leur gentillesse, avec une mention spéciale pour Salimata qui a toujours su me donner le sourire.

Je remercie aussi l'équipe de la plateforme technologique : Niclas, Christelle, Sophie et Claire pour leurs aides.

Je remercie chaleureusement mes amis qui ont cru en moi et m'ont poussée : Z, P-E, Sidi, Nico...

Et pour finir, ma famille que j'aime tant et qui m'ont encouragée et soutenue pendant des années en ne comprenant pas toujours ce que je faisais, à part tuer des souris. C'est grâce à vous cela

Maman, Papa, Counette, Beauté, les tatis, Sousou, Fifi, Dada, Audrey... et tant d'autres.

# Table des matières

---

Remerciements .....	2
Table des matières .....	4
Liste des figures .....	9
Liste des tables .....	11
Liste des abréviations .....	13
Résumé .....	16
Summary .....	19
Introduction.....	22
I. A la découverte des lymphocytes T Natural Killer : Historique, définition, développement, maturation.....	24
A. Caractérisation des lymphocytes T Natural Killer .....	24
1) Historique de la découverte des cellules iNKT .....	24
2) Définition .....	25
3) Diversité des cellules iNKT.....	26
a) Cellules NKT Type II ou NKT non classique .....	27
b) Cellules NKT Type III ou NKT « like ».....	27
c) Les cellules NKT chez l'Homme.....	28
B. Développement des cellules iNKT et régulation du développement des cellules iNKT : des précurseurs aux cellules iNKT fonctionnelles .....	29
1) Origine des précurseurs des cellules iNKT .....	29
2) Étape du développement thymique des cellules iNKT.....	31
a) La Sélection positive .....	31
i) Les thymocytes corticaux.....	32
ii) La liaison homotypique SLAM.....	33
b) La Sélection négative .....	35
c) Les différents modèles de maturation thymique des cellules iNKT .....	36
i) Modèle de maturation linéaire.....	37
ii) Modèle de différenciation des cellules iNKT selon l'expression des facteurs de transcription .....	38
iii) Modèle de développement spatio-temporelle.....	39
d) Caractérisations des facteurs impliqués dans la régulation du développement des cellules iNKT.....	41
i) Facteurs régulant l'ontogénie des cellules iNKT au stade double positif ...	42
ii) Principaux facteurs de transcription impliqués dans la régulation du développement des cellules iNKT .....	43

–	Early growth response 2 (Egr2).....	43
–	Promyelocytic Leukemia Zinc Factor (PLZF).....	43
–	NFκB .....	44
–	GATA3 .....	44
–	T helper inducing Poz Krueppel factor (ThPOK).....	45
–	T-bet.....	45
–	RAR-related Orphan Receptor gamma (ROR-γt).....	46
–	c-myc.....	46
iii)	Cytokines impliquées dans la régulation du développement des cellules iNKT .....	47
–	IL-15.....	47
–	IL-7.....	47
–	TGF-β.....	48
–	IL-25.....	48
C.	Et après ?.....	49
1)	Distribution et localisation des cellules iNKT .....	49
2)	Modalités d'émigration des cellules iNKT .....	50
3)	Mécanismes d'activation et fonctions des cellules iNKT .....	51
4)	Partenaires d'interaction des cellules iNKT.....	52
D.	Implication des cellules iNKT dans une pathologie, l'exemple du cancer .....	54
II.	Interaction TCR/CD1d et son influence dans l'orientation du lignage des sous populations iNKT.....	58
A.	Le TCR et le signal TCR des lymphocytes T αβ conventionnels et des cellules iNKT	58
1)	Le récepteur T des lymphocytes T αβ conventionnels.....	58
2)	Le récepteur T des cellules iNKT.....	59
a)	La chaîne α du TCR des cellules iNKT et son influence dans l'orientation du lignage iNKT.....	59
b)	La chaîne β du TCR des cellules iNKT : son biais d'utilisation et son influence dans le lignage des sous populations iNKT .....	60
3)	La force du signal TCR : facteur pouvant orienter le lignage des sous population iNKT ?.....	62
B.	La molécule CD1d.....	65
1)	Caractérisation de la famille de glycoprotéines CD1 .....	65
2)	Localisation des molécules CD1 .....	67



3) Caractérisation de la molécule CD1d .....	67
a) Biosynthèse de la molécule CD1d.....	68
b) Les isoformes CD1d1 et CD1d2 : influence sur l'orientation du lignage des sous populations iNKT ? .....	70
4) Caractéristiques et singularité de l'interaction TCR/CD1d.....	72
Résultats .....	76
Objectif de la thèse .....	77
Résumé de l'étude .....	79
Discussion et perspectives .....	121
A) Comparaison du développement des cellules iNKT entre les souris B6 et BALB/c	122
1) La force du signal TCR.....	122
2) Les isoformes CD1d1 et CD1d2 .....	123
3) Les souris chimères de moelle.....	126
4) Les molécules SLAM et CD1d .....	130
B) Influence de la demi-dose de CD1d dans le développement des cellules iNKT	131
C) La force du signal TCR peut-elle orienter le lignage des sous populations iNKT ?	132
D) Influence de la force du signal TCR dans le développement des cellules dérivant du thymus.....	133
1) Les lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels .....	133
2) Les lymphocytes T $\gamma\delta$ .....	134
3) Les lymphocytes MAIT.....	135
4) Les lymphocytes T régulateurs.....	135
5) Les lymphocytes T intraépithéliaux.....	135
E) Perspectives .....	137
Bibliographie .....	138
Annexes .....	161

# Liste des figures

---

Figure n° 1 : Comparaison de la fréquence des cellules iNKT humaines sur des marquages de cytométrie fait sur des PBMC et sur des thymocytes .....	28
Figure n° 2 : Comparaison du développement thymique des cellules iNKT et des lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnelles .....	32
Figure n° 3 : Voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la sélection des cellules NKT .....	35
Figure n° 4 : Comparaison des modèles de développement linéaire et du modèle selon l'expression des facteurs de transcription .....	39
Figure n°5 : Schématisation du modèle dynamique et continu de développement spatio-temporelle des cellules iNKT .....	41
Figure n°6 : Facteurs impliqués dans la survie des cellules DP .....	42
Figure n°7 : Régulation transcriptionnelle du développement des cellules iNKT en fonction des différents stages de développement .....	46
Figure n° 8 : Cytokines impliquées dans la différenciation des sous populations iNKT .....	49
Figure n°9 : Chimiokines impliquées dans l'émigration des cellules iNKT .....	51
Figure n°10 : Interactions entre les cellules iNKT et les autres cellules immunitaires.....	53
Figure n°11 : Mécanismes d'action des cellules iNKT face à des cellules tumorales.....	55
Figure n°12 : Comparaison des avantages et limitations à l'utilisation des cellules CAR-T et CAR-NKT .....	57
Figure n°13 : Schématisation de la recombinaison V(D)J du TCR et représentation des emplacements des CDR.....	59
Figure n°14 : Schématisation des différentes hypothèses pouvant orienter le lignage des sous populations iNKT .....	65

Figure n° 15 : Trafic intracellulaire des molécules CD1 .....	69
Figure n°16 : Comparaison des structures cristallographiques des molécules CD1d1 et CD1d2 .....	72
Figure n° 17 : Stratégie d’ancrage des TCR des cellules conventionnelles $\alpha\beta$ sur les molécules de CMH et des TCR des cellules iNKT sur les molécules CD1d .....	73
Figure n°18 : Représentations de l’interaction TCR/ $\alpha$ Gal-Cer/CD1d .....	75
Figure n° 19 : Expression de PLZF dans les chimères mixtes de moelle.....	127
Figure n°20 : Expression de CD5 dans les chimères mixtes de moelle.....	128
Figure n° 21 : Profil des chimères contrôles BALB/c ----> BALB/c CD1d1d2KO.....	129
Figure n° 22 : Corrélation entre la fréquence des cellules iNKT et la proportion des cellules exprimant la molécule CD1d .....	130
Figure n° 23 : Schéma récapitulatif des différences observées entre les cellules iNKT B6 et les cellules iNKT BALB/c.....	131

# Liste des tables

---

Tableau n° 1 : Classification des différents types de lymphocytes T Natural Killer ..... 26

Tableau n°2 : Tableau récapitulatif de l'influence de la force du signal TCR dans le développement et la différenciation des populations thymiques ..... 136

# Listes des abréviations

---

## **A.**

$\alpha$ -Gal-Cer : alpha-Galactosylceramide  
AP : Adaptor Protein

## **C.**

CAR : Chimeric Antigenic Receptor  
CCL : C-C Chemokine Ligand  
CCR : C-C Chemokine Receptor  
CD : Cluster of Differentiation  
CDR : Complementarity Determining Region  
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes  
CXCR : C-X-C Chemokine Receptor

## **D.**

DN : Double Négatif  
DP : Double Positif

## **E.**

Egr2 : Early Growth Response

## **F.**

FTOC : Fetal Thymus Organ Culture

## **G.**

Gata3 : GATA binding protein 3  
GFP : Green Fluorescent Protein

## **I.**

ICOS : Inducible T-cell COStimulator  
IFN : Interféron  
IL : Interleukine  
ILC : Innate Lymphoid Cells  
iNKT : invariant Natural Killer T cell  
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

## **K.**

KO : Knock Out

## **M.**

MAIT : Mucosal Associated Invariant T cell



## **N.**

NF $\kappa$ B : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NFAT : Nuclear factor of activated T-cells

NK : Natural Killer

NKT : Natural Killer T cells

## **P.**

PAMP : Pathogen-associated molecular pattern

PBMC : Peripheral blood mononuclear cell

PLZF : promyelocytic leukemia zinc finger

PSG-L1 : P-selectin glycoprotein ligand-1

## **R.**

ROR- $\gamma$ t : RAR-related orphan receptor gamma

## **S.**

S1P1 : Sphingosine-1-phosphate receptor 1

SAP : slam-associated-protein

SLAM : signaling lymphocytic activation molecule

SP : simple positive

## **T.**

T-bet : T-box expressed in T cells

TCR : T cell Receptor

TCR  $\alpha\beta$  : T cell receptor  $\alpha\beta$

TCR  $\gamma\delta$  : T cell receptor  $\gamma\delta$

TET : Tétramère

TGF- $\beta$  : transforming growth factor  $\beta$

Th : T helper

ThPOk : T-helper-inducing POZ/Krüppel-like factor

TLR : Toll Like Receptor

TNF : Tumor necrosis factor

## **W.**

WT : Wild type

## **Y.**

YFP : Yellow fluorescent protein

# Résumé

---

## **Titre : Rôle de la reconnaissance CD1d/TCR dans la différenciation des sous populations iNKT**

Les cellules invariantes « Natural Killer » T (iNKT) sont une population particulière de lymphocytes T dite non conventionnelle, qui reconnaissent des antigènes lipidiques présentés CD1d, une molécule non classique apparentée au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH). Ces cellules expriment un TCR semi invariant composé majoritairement d'une chaîne TCR $\alpha$  invariante (V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 chez la souris, V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 chez l'homme) associée principalement aux chaînes TCR V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 7, ou V $\beta$ 2 chez la souris, V $\beta$ 11 chez l'homme. Les cellules iNKT acquièrent au cours du développement dans le thymus des caractéristiques effectrices/mémoire liées au facteur clé de transcription PLZF, également important pour le développement des cellules MAIT et des lymphocytes T  $\delta\gamma$ .

A l'image des lymphocytes T CD4+, les cellules iNKT se développent en trois principales sous populations différenciées en phases terminales et fonctionnellement distinctes. Les cellules iNKT1 expriment le facteur de transcription T-bet et sécrètent de l'interféron- $\gamma$  ; les cellules iNKT2 expriment le facteur de transcription GATA3 et PLZF et sécrètent de l'IL-4 et IL-13 ; et les cellules iNKT17 expriment le facteur de transcription ROR- $\gamma$ t et sécrètent de l'IL-17. Fait important, la distribution relative des trois sous-ensembles thymiques iNKT varie dans différentes souches de souris et affecte le phénotype et l'état d'activation des cellules environnantes. En effet, les cellules iNKT1 représentent le principal sous ensemble de cellules iNKT chez les souris C57BL/6 (B6) tandis que la population iNKT2 est dominante chez les souris BALB/c. Il y a plusieurs hypothèses concernant les éléments qui pourraient influencer l'orientation du lignage des sous-ensembles iNKT.

Dans cette étude, nous avons cherché à évaluer dans quelle mesure la reconnaissance du complexe CD1d/ligand par le TCR des cellules iNKT pourrait influencer leur différenciation. Ainsi, dans un premier temps, nous avons comparé le développement des cellules iNKT entre les souris C57BL/6 et BALB/c et étudié l'influence des molécules CD1d1 et CD1d2 différenciellement exprimées dans ces souris. Nos résultats montrent que les cellules iNKT des souris C57BL/6 semblent percevoir un signal TCR plus faible et qu'il y aurait une corrélation entre la composition des sous ensemble des cellules iNKT et la force du signal TCR ce qui

soutiendrait l'idée que la force du signal TCR pourrait influencer la différenciation des sous ensembles des cellules iNKT.

L'étude des souris BALB/c CD1d1 et BALB/c CD1d2, nous a permis de déduire que seule la molécule CD1d1 permettait une sélection efficace de cellules iNKT, ressemblant en phénotype et en nombre à celles observées chez les souris BALB/c, indiquant que l'expression différentielle des molécules CD1d ne peut expliquer la composition différente du sous-ensemble des cellules iNKT entre nos souris C57BL/6 et BALB/c.

Dans un second temps, nous avons analysé le développement de cellules iNKT dérivées de la moelle osseuse de souris B6CD1d1d2KO et de souris BALB/c et inversement dans des souris chimères mixtes. Les cellules iNKT dérivant de la moelle B6CD1d1d2KO sont forcées de se développer sur les cellules BALB/c exprimant la molécule CD1d, permettant leur sélection. Nous avons constaté que la seule reconnaissance du complexe CD1d/ligand par le TCR des cellules iNKT n'est pas suffisante pour conduire un programme de différenciation spécifique de type C57BL/6 ou BALB/c, programme lié à la moelle d'origine de la souris CD1d déficiente. Il y aurait ainsi des facteurs génétiques intrinsèques impliqués.

Et enfin, nous avons étudié l'influence de la demi dose de CD1d dans le développement de nos cellules. Nous avons pu constater que les niveaux d'expression du complexe CD1d/ligand influencent la différenciation des cellules iNKT liées à l'affinité de leur TCR.

L'ensemble de nos résultats nous permet d'apporter un éclairage déterminant quant aux éléments qui pourraient influencer l'orientation du lignage des sous ensemble iNKT.

Mots clés : iNKT, CD1d, reconnaissance TCR/CD1d, différenciation, force du signal TCR

# Summary

---

## **Title** : Role of CD1d/TCR recognition in the differentiation of iNKT subpopulations

Invariant Natural Killer T cells are a particular population of so-called non-conventional T lymphocytes, which recognize lipid antigens presented by CD1d, a non-classical molecule related to the major histocompatibility complex class I. These cells express a semi-invariant TCR mostly composed of an invariant TCR  $\alpha$  chain (V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 in mice, V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 in humans) associated mainly with TCR V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 7, or V $\beta$ 2 chains in mice, V $\beta$ 11 in humans. NKT cells acquire during their development in the thymus effector/memory characteristics linked to the key transcription factor PLZF, also important for the development of MAIT and T $\delta\gamma$  cells.

Like CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, iNKT cells develop into three main subpopulations that are terminally differentiated and functionally distinct. iNKT1 cells express the transcription factor T-bet and mainly secrete interferon- $\gamma$ ; iNKT2 cells express the transcription factor GATA3 and PLZF and secrete IL-4 and IL-13; and iNKT17 cells express the transcription factor ROR- $\gamma$ t and secrete IL-17. Importantly, the relative distribution of the three thymic iNKT subsets varies in different mouse strains and affects the phenotype and activation state of surrounding cells. Indeed, iNKT1 cells represent the main subset of iNKT cells in C57BL/6 mice while the iNKT2 population is dominant in BALB/c mice. There are several hypotheses regarding elements that might influence the lineage orientation of iNKT subsets.

In this study, we sought to assess to what extent the recognition of the CD1d/ligand complex by the TCR of iNKT cells could influence their differentiation.

Thus, first, we compared the development of iNKT cells between C57BL/6 and BALB/c mice and studied the influence of CD1d1 and CD1d2 molecules differentially expressed in these mice. Our results show that the iNKT cells of C57BL/6 mice seem to perceive a weaker TCR signal and that there would be a correlation between the composition of the iNKT cell subsets and the strength of the TCR signal, which would support the idea that the strength of the TCR signal could influence the differentiation of iNKT cell subsets.

The study of BALB/c CD1d1 and BALB/c CD1d2 mice allowed us to deduce that only the CD1d1 molecule provided an efficient selection of iNKT cells, resembling in phenotype and number to that observed in BALB/c mice, indicating that the differential expression of CD1d molecules

does not explain the different composition of the iNKT cell subset between C57BL/6 and BALB/c mice.

Secondly, we analyzed the development of iNKT cells derived from the bone marrow of B6CD1d1d2KO mice and BALB/c mice and vice versa in mixed chimeric mice. iNKT cells derived from B6CD1d1d2KO bone marrow are forced to develop on BALB/c cells expressing the CD1d molecule, allowing them to be selected. We have found that recognition of the CD1d/ligand complex by the TCR of iNKT cells alone is not sufficient to drive a specific differentiation program of the C57BL/6 or BALB/c type, a program linked to the tissue of origin of the CD1d-deficient mouse and involving intrinsic genetic factors.

And finally, we studied the influence of the half dose of CD1d in the development of iNKT cells. We were able to observe that the expression levels of the CD1d/ligand complex influence the differentiation of iNKT cells linked to the affinity of their TCR.

All of our results allow us to shed decisive light on the elements that could influence the orientation of the lineage of iNKT subsets.

Keywords : iNKT, CD1d, TCR/CD1d recognition, differentiation, TCR signal strength

# Introduction

---



# I. A la découverte des lymphocytes T Natural Killer : Historique, définition, développement, maturation....

## A. Caractérisation des lymphocytes T Natural Killer

### 1) Historique de la découverte des cellules iNKT

En 1995 apparaît pour la première fois la terminologie NKT dans une revue scientifique. Elle décrit alors une population de lymphocytes T  $\alpha\beta$  partageant des caractéristiques avec le lignage Natural Killer (NK), notamment l'expression du marqueur NK1.1<sup>1</sup>.

Avant cette dénomination, en 1987, deux groupes distincts ont décrit une population de lymphocyte T n'exprimant pas les marqueurs CD4 et CD8 (cellules double négatives, DN) et ayant une expression biaisée pour la chaîne V $\beta$ 8 du TCR<sup>2,3</sup>. A peu près à la même période, d'autres groupes ont pu mettre en évidence l'existence d'une population de lymphocyte T  $\alpha\beta$  exprimant le marqueur NK1.1, marqueur qui était jusqu'alors considéré comme un marqueur exclusif des cellules NK<sup>4</sup>. Ces cellules T NK1.1+ expriment également un répertoire biaisé pour la chaîne V $\beta$ 8.2 du TCR et se divisent en deux sous-groupes : les cellules DN, et les cellules CD4<sup>+</sup><sup>5</sup>.

L'intérêt et les études portés à ces deux populations se sont accrus à la découverte qu'elles étaient sources de cytokines immunorégulatrices tel que l'IL-4, l'Interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ou encore le TNF<sup>6,7</sup>. Cependant, à cette époque, on ignorait si les études décrivaient la même population ou s'il s'agissait de deux populations distinctes de lymphocytes T  $\alpha\beta$ .

L'utilisation de souris déficiente pour la  $\beta$ 2 microglobuline a permis de mettre évidence le rôle clé d'une molécule apparentée au CMH de classe I exprimée sur les cellules hématopoïétiques, dans le développement des cellules T NK1.1+, ces cellules étant absentes chez ces souris<sup>8,9</sup>. Une étude postérieure a permis d'identifier la molécule de classe I non classique CD1d comme médiatrice de la sélection des cellules T NK1.1+<sup>10</sup>.

A la même période, le caractère invariant des cellules T NK1.1+ a été découvert. En effet, ces cellules ont la particularité d'exprimer un TCR semi invariant composé d'une chaîne  $\alpha$  invariante, V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18, et d'un répertoire V $\beta$  restreint<sup>11</sup>. Il est dit que la chaîne  $\alpha$  du TCR de ces cellules est monomorphe.

De l'éponge marine *Agelas mauritanus*, le premier ligand des cellules T NK1.1+ a été extrait, le KRN7000, plus couramment appelé l' $\alpha$ -GalCer pour alpha-Galactosylceramide<sup>12</sup>. Cette découverte a permis de révolutionner l'étude de ces cellules, permettant la création d'un outil de détection par cytométrie en flux, le tétramère de CD1d couplé à l' $\alpha$ -GalCer (TET- $\alpha$ GalCer)<sup>13</sup>.

Au milieu des années 1990, on utilise désormais le terme NKT pour identifier cette population de ces cellules T NK1.1+<sup>1</sup>, la terminologie T NK1.1+ posant des difficultés. En effet, le marqueur NK1.1 n'est pas exprimé dans toutes les souches de souris, notamment chez les souris BALB/c ou encore les NOD. De plus, toutes les cellules NKT n'expriment pas ce marqueur.

## 2) Définition

Les cellules NKT sont une population particulière de cellules immunitaires. Elles ont des caractéristiques de cellules immunitaires innées et des caractéristiques de cellules immunitaires adaptatives. Elles font parties de la famille des cellules T innées comme les cellules MAIT ou encore les lymphocytes T  $\gamma\delta$ <sup>14,15</sup>. Contrairement aux cellules T conventionnelles, les cellules T innées ont la particularité de reconnaître rapidement des antigènes et s'activer en conséquence notamment via la sécrétion de diverses cytokines<sup>16,17</sup>. Ces cellules agissent donc plus tôt que les cellules T conventionnelles, on dit qu'elles sont une passerelle forte entre l'immunité innée et l'immunité adaptative régulant de nombreuses réponses immunitaires<sup>18</sup>.

Les cellules NKT sont donc une des populations non conventionnelles de lymphocytes T. Ces lymphocytes T  $\alpha\beta$  doivent leur noms du fait qu'elles partagent des caractéristiques du lignage T et du lignage NK. En effet, ces cellules expriment un récepteur T de diversité très réduite avec une chaîne  $\alpha$  invariante, V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18, et un répertoire V $\beta$  restreint (V $\beta$ 2, 7 ou 8). Ce TCR semi-invariant leur permet de ne reconnaître qu'une diversité limitée d'antigène de type glycolipidiques présentée par la molécule non polymorphique apparentée au CMH de classe I : CD1d. Les cellules NKT expriment des marqueurs NK comme NK1.1, NKG2D ou encore CD49b mais aussi des marqueurs d'activation et de mémoire (CD44, CD69). Ces cellules peuvent sécréter différents types de cytokines en fonction des facteurs de transcriptions qu'elles expriment et ce, dès leur génération dans le thymus.

Cette définition s'applique à un type bien particulier de cellules NKT. Nous verrons dans la partie suivante qu'il existe une plus grande diversité de ces cellules.

### 3) Diversité des cellules iNKT

La définition ci-dessus caractérise les premiers types de cellules NKT découvertes. Il s'agit des cellules NKT dites classiques, de type I ou encore invariantes (plus communément appelées cellules iNKT). Ces dernières sont les plus connues et les mieux caractérisées. Mon étude portera uniquement sur ce type de cellules NKT que nous décrirons plus amplement dans les autres parties.

On distingue ainsi deux autres types de populations de cellules NKT. Cette classification est basée sur différents critères, à savoir<sup>19,20</sup> :

- Leur restriction à CD1d
- Leur réactivité à l' $\alpha$ -GalCer
- Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  qu'elles expriment
- Les cytokines qu'elles sécrètent

On observe dans le tableau n°1 ci-dessous la classification des trois populations de cellules NKT<sup>19</sup>.

	Type I (NKT classique, iNKT)	Type II (NKT non classique)	Type III (NKT-like)
Dépendance CD1d	Oui	Oui	Non
Réactivité à l' $\alpha$ Gal-Cer	Oui	Non	Non
Chaîne $\alpha$ du TCR	V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 (Souris) V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 (Homme)	Divers, enrichissement V $\alpha$ 3.2J $\alpha$ 9-V $\alpha$ 8	Divers
Chaîne $\beta$ du TCR	V $\beta$ -8,7 et 2 (Souris) V $\beta$ 11 (Homme)	Divers, enrichissement V $\beta$ 8.2 (Souris)	Divers
Cytokines sécrétées	IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17	IFN- $\gamma$ , IL-4	IFN- $\gamma$

**Tableau n° 1 :** Classification des différents types de lymphocytes T Natural Killer, inspiré de <sup>19</sup>  
Les trois types de cellules NKT : les cellules iNKT, les NKT non classiques et les NKT-like distinguables par leur dépendance à CD1d, leur réactivité à l' $\alpha$ Gal-Cer et le TCR exprimé.

a) Cellules NKT Type II ou NKT non classique

L'utilisation de souris déficientes pour la molécule du CMH de classe II a permis de mettre en évidence une population périphérique de cellules CD4+, ayant une origine thymique, un phénotype mémoire, un répertoire TCR diversifié et une expression du marqueur NK1.1 pour certaines de ces cellules<sup>21</sup>. C'est la première étude qui décrit une population de cellules NKT n'exprimant pas le TCR semi invariant V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 28 et non réactive à l' $\alpha$ -Gal-Cer. Par la suite, ces cellules seront nommées NKT de type II, ou encore NKT non classiques.

Ces cellules, également restreintes à la molécule CD1d, ont un répertoire TCR plus hétérogène que les cellules iNKT. On retrouve cependant un enrichissement pour quelques chaînes : V $\alpha$ 3/V $\alpha$ 1-J $\alpha$ 7/J $\alpha$ 9 et V $\beta$ 8.1/V $\beta$ 3.1-J $\beta$ 2.7<sup>22</sup>. Les cellules NKT de type II reconnaissent différents lipides comparés aux cellules iNKT notamment les sphingolipides comme les sulfatides ou encore les glycéro/phospholipides<sup>23,24</sup>. Cette population est beaucoup moins étudiée et caractérisée que la précédente en raison du manque d'outils et de marqueurs spécifiques. En effet, le tétramère de CD1d associé à l' $\alpha$ -Gal-Cer utilisé pour étudier les cellules iNKT de type I, ne permet pas de marquer les cellules de type II. Pour y pallier, certains groupes ont produits des tétramères de CD1d couplés à la sulfatide. Cependant, ce tétramère semble difficile à utiliser en raison de l'instabilité du complexe CD1d/sulfatide<sup>25</sup>. D'autres approches ont été utilisées pour étudier ces cellules, telles que l'utilisation de la souris J $\alpha$ 18KO (souris dépourvus de cellules NKT de type I) ou encore la souris transgénique 24 $\alpha\beta$  générer en surexprimant un TCR du répertoire de cellules NKT de type II (V $\alpha$ 3.2/V $\beta$ 9) à partir d'hybridomes NKT de type II<sup>26,27</sup>.

b) Cellules NKT Type III ou NKT « like »

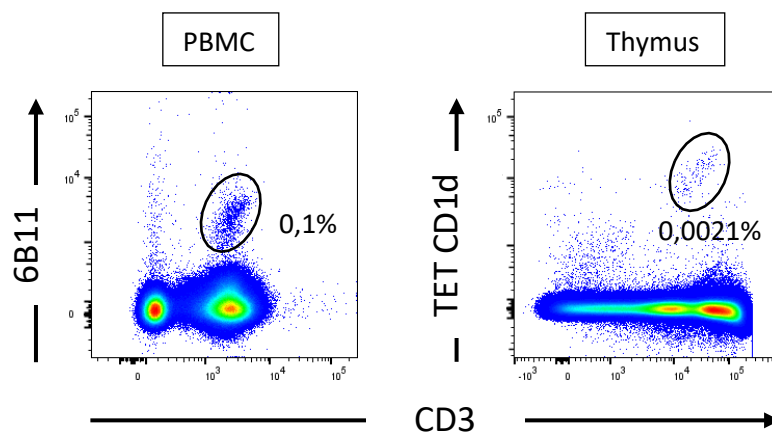
Ce troisième groupe est assez hétérogène. On ne parle plus de cellules NKT mais de cellules de type NKT. Ce groupe est composé de cellules T exprimant des marqueurs NK, non dépendantes à la molécule CD1d, non réactives à l' $\alpha$ -Gal-Cer et présentant un répertoire TCR diversifiés à l'image des cellules T  $\alpha\beta$  conventionnelles<sup>28,29</sup>. Une population de cellules CD8+ NKT « like » a pu être identifiée chez la souris CD1d<sup>-/-</sup><sup>30</sup>. Ces cellules sont phénotypiquement différentes, elles expriment d'autres marqueurs et ont un profil cytokinique différent comparées autres types de cellules NKT<sup>31</sup>. Ces cellules auraient également un potentiel anti

tumoral<sup>32</sup>. Parmi ce groupe hétérogène de cellules, il y aurait également des cellules T  $\alpha\beta$  conventionnelles, qui suite à une infection, surexprimeraient des marqueurs NK tel que les marqueurs NK1.1 ou DX5<sup>33</sup>. Ainsi, ce troisième groupe de cellules ne répond donc pas à la définition classique des cellules NKT et ne sont donc pas considérées comme telles.

c) Les cellules NKT chez l'Homme

Les cellules iNKT chez l'Homme sont bien moins fréquentes que chez la souris et très hétérogènes d'un individu à l'autre, ce qui rend leur étude un peu plus complexe. Les cellules iNKT humaines sont surtout retrouvées dans le sang périphérique (~0,01% à 0,2%) et a une très faible fréquence dans le thymus (~0,002%) comme nous pouvons le voir sur la figure n° 1 sur des marquages en cytométrie en flux que nous avons réalisé<sup>34,35</sup>. Les cellules iNKT murines et humaines présentent de nombreuses similarités.

Les cellules iNKT humaines expriment un TCR invariant composé par les chaînes  $V\alpha 24J\alpha 18$  et  $V\beta 11$ . Tout comme leur homologues murines, ces cellules reconnaissent des glycolipides présentés par CD1d et sont caractérisées par leur capacité à sécréter de grandes quantités de cytokines et l'expression de marqueurs NK tel que CD161<sup>36-38</sup>. En outre, on retrouve également les populations NKT de type II et NKT « like » décrites précédemment<sup>39,40</sup>.



**Figure n° 1 :** Comparaison de la fréquence des cellules iNKT humaines sur des marquages de cytométrie fait sur des PBMC (à gauche) et sur des thymocytes (à droite)  
Les cellules iNKT humaines sont présentes en fréquence plus élevée dans les PBMC comparée au thymus.

## B. Développement des cellules iNKT et régulation du développement des cellules iNKT : des précurseurs aux cellules iNKT fonctionnelles

### 1) Origine des précurseurs des cellules iNKT

Le caractère particulier des cellules iNKT a posé de nombreuses questions notamment quant à leur origine. Ces cellules ont-elles une origine thymique à l'image des cellules T conventionnelles  $\alpha\beta$  ou une origine extrathymique comme les cellules NK avec lesquelles elles partagent des caractéristiques<sup>41-43</sup>.

Des études réalisées sur des souris athymiques et des souris ayant subi une thymectomie quelques jours après leur naissance, ont permis de mettre en évidence le fait que le développement des cellules iNKT était thymus dépendant et qu'il a lieu à la naissance puisque ces souris étaient dépourvues de cellules iNKT<sup>41,44,45</sup>.

Par la suite, deux modèles ont été proposés pour mieux caractériser l'origine des précurseurs des cellules iNKT. Le premier, le modèle de pré-engagement, propose que le lignage des cellules conventionnelles T  $\alpha\beta$  et des cellules iNKT divergent très tôt dans leurs développements<sup>46,47</sup>. Les cellules iNKT se développeraient à partir d'un précurseur déjà engagé vers ce lignage, avant le réarrangement du TCR. Les cellules réarrangeraient par la suite leur TCR avant d'être sélectionnées. Le second modèle propose que les lignages iNKT et conventionnelles T  $\alpha\beta$  dérivent d'un précurseur commun, puis que les cellules seraient « instruites » en fonction de la reconnaissance de leur TCR réarrangé aléatoirement et divergeraient ensuite en deux lignages distincts<sup>48</sup>. Le second modèle, le modèle instructif, est aujourd'hui largement admis.

Le précurseur commun aux lignages T  $\alpha\beta$  et iNKT dérivent donc des cellules souches hématopoïétiques contenues dans la moelle osseuse. Après s'être différenciées en précurseurs lymphoïde communs, ces cellules quittent la moelle et pénètrent dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire via l'expression du récepteur CCR7 et de la glycoprotéine PSGL-1 qui se lient respectivement à CCL21 et à la P-sélectine exprimés sur les cellules endothéliales thymiques<sup>49,50</sup>. Le processus de maturation des cellules va les conduire à passer du cortex à la médulla où elles passeront par différents intermédiaires de développement. Ces cellules sont

tout d'abord définies par le stade DN qui se subdivise en quatre stades selon l'expression des marqueurs CD44 et CD25 : DN1 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), DN2 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), DN3 (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>) et DN4 (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>). Au cours de cette maturation, les cellules perdent progressivement leurs potentiels à se différencier vers les lignages non T. Entre le stade DN2 et DN3, l'engagement vers le lignage T est irréversible<sup>51</sup>. C'est au cours de ces stades que se produit le réarrangement et l'expression de la chaîne  $\beta$  du TCR qui couplée avec la chaîne invariante pré- $\alpha$  formera le pré-TCR. Il s'agit de la  $\beta$  sélection<sup>52</sup>. Seules les cellules qui auront produit un pré-TCR fonctionnel pourront poursuivre leur maturation. Lorsqu'une chaîne  $\beta$  est exprimée à la surface du thymocyte, le processus d'exclusion allélique se produit empêchant tout autre réarrangement du locus  $\beta$ <sup>52</sup>. Après la  $\beta$  sélection, les thymocytes passent au stade DN4 qui est accompagné d'une prolifération importante des cellules. Il s'agit de la  $\beta$  expansion<sup>52</sup>. Les cellules vont par la suite réarranger le locus  $\alpha$  du TCR pour former un récepteur  $\alpha\beta$  matures et exprimer les molécules de co-réceptrices CD4 et CD8 pour atteindre le stade double positif (DP), stage où aura lieu la sélection positive des cellules<sup>53</sup>. A ce stade, les lignées  $\alpha\beta$  et iNKT divergent.

Plusieurs études ont permis de confirmer que la plupart des précurseurs iNKT passaient par un stade DP :

- Des expériences de transferts intrathymiques de cellules DP CD1d<sup>-/-</sup> chez des souris receveuses sauvages ont permis de générer un pool de cellules iNKT<sup>47</sup>
- Dans les souris Rosa26GFP\*CD4-cre, où la GFP est exclusivement exprimé au stade DP, la génération des cellules iNKT n'est permise qu'à partir des cellules GFP<sup>+</sup><sup>54</sup>

Néanmoins, il semblerait qu'une petite fraction de cellules iNKT puisse bypasser le stade DP et dériver du stade DN. Chez la souris E8III-Cre+Rosa26-YFP, où la YFP est exprimé sous le contrôle d'élément régulant l'expression de CD8 $\alpha$  et donc exprimé spécifiquement au stade DP, on détecte des cellules iNKT DN YFP<sup>+</sup> et YFP<sup>-</sup>, sous entendant qu'une fraction mineure de cellules iNKT pourrait dériver du stade DN sans passer par le stade DP<sup>55</sup>.

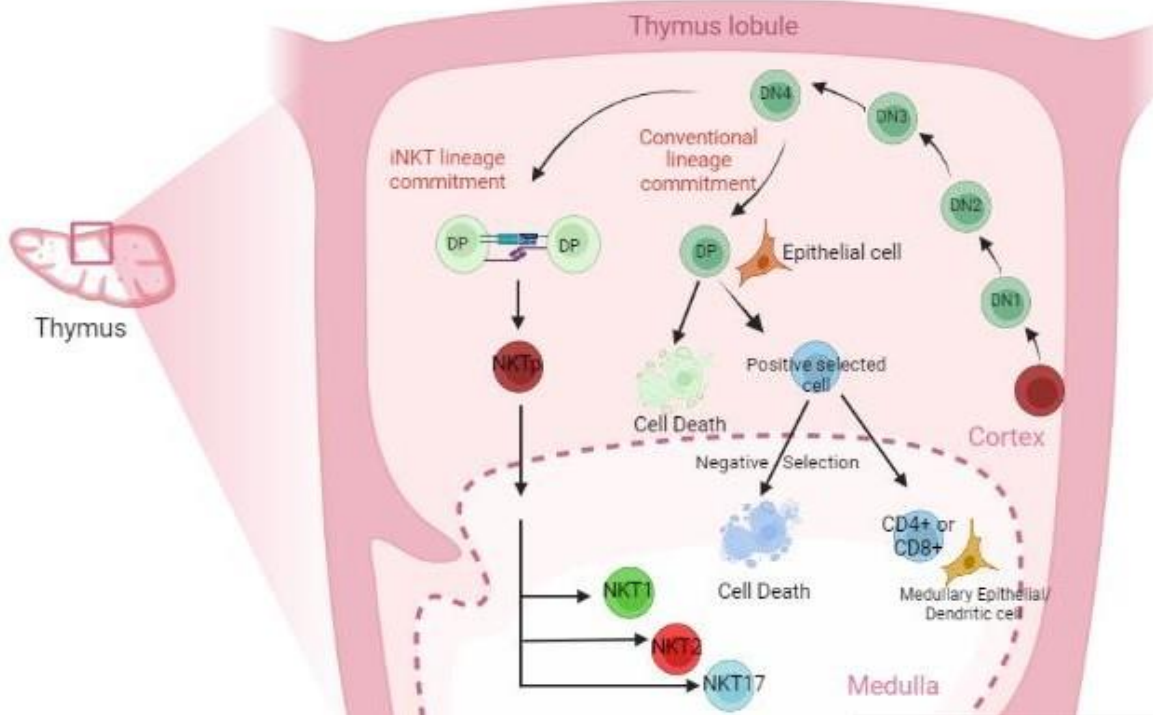
## 2) Etape du développement thymique des cellules iNKT

### a) La Sélection positive

La sélection positive des thymocytes  $\alpha\beta$  est médiée par les cellules épithéliales corticales exprimant les molécules du CMH de type I ou II liées à des antigènes peptidiques. Seules les cellules reconnaissant le complexe CMH/peptide avec une avidité modérée sont sélectionnées. Selon la nature de la molécule du CMH reconnue par leur TCR, les DP perdront le marqueur CD4 (si elles ont reconnu la molécule de CMH I) ou CD8 (si elles ont reconnu la molécule de CMH II). Les cellules sélectionnées positivement passent alors dans le médulla où aura lieu la sélection négative. Les cellules épithéliales médullaires ou les cellules dendritiques présentant des auto antigènes complexés aux molécules de CMH I ou II sont à l'origine de cette sélection. Les cellules reconnaissant trop fortement les molécules du soi sont éliminées par apoptose permettant l'élimination des cellules autoréactives. Ces sélections vont générer un vaste éventail de lymphocytes T immatures avec une grande diversité de reconnaissance et une tolérance pour le soi<sup>56-58</sup>.

A la différence des lymphocytes T conventionnelles  $\alpha\beta$ , la sélection des cellules iNKT est médiée par les thymocytes corticaux voisins (DP) exprimant la molécule CD1d présentant des antigènes de type glycolipidiques. Cette interaction associe des signaux de co-stimulation différents comparée aux cellules épithéliales. En effet, en plus des signaux de co-stimulation classiques associés aux molécules CD3, CD28/B7, ICOS/ICOS-L, la liaison homotypique SLAM est essentielle pour le développement des cellules iNKT. C'est la synergie du signal TCR et du signal SLAM, entraînant un signal fort de sélection, qui permet l'activation de voies de transduction pour l'entrée dans le programme de développement NKT<sup>59,60</sup>. Il a été montré que lorsque que la molécule de CMH II était exprimée sur les thymocytes corticaux au lieu des cellules épithéliales, les lymphocytes T sélectionnés adoptent des caractéristiques de cellules iNKT avec notamment une production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$ <sup>61,62</sup>.





*Figure n° 2 : Comparaison du développement thymique des cellules iNKT et des lymphocytes  $\alpha\beta$  conventionnelles*

Les cellules iNKT et les lymphocytes T conventionnelles  $\alpha\beta$  sont issus d'un précurseur lymphoïde commun et divergent au stade DP. La sélection positive et négative des cellules conventionnelles sont médiées par les cellules épithéliales et permettent le développement d'un large éventail de clones de lymphocytes T immatures avec une tolérance pour le soi. Les cellules iNKT sont, elles, sélectionnées par les cellules DP voisines exprimant la molécule CD1d. Cette sélection permet le développement de trois sous populations de cellules iNKT exprimant des marqueurs d'activation.

La figure n°2 récapitule les principales différences entre le développement des lymphocytes T conventionnelles et des cellules iNKT dans le thymus.

Dans les parties suivantes, nous reviendrons plus en détails sur les différents acteurs permettant la sélection des cellules iNKT.

i) Les thymocytes corticaux

L'utilisation de souris  $\beta 2$ -microglobuline déficientes ( $\beta 2m^{-}$ ) a permis de mettre en évidence l'importance de cette molécule dans le développement des cellules iNKT, à l'époque identifiée comme des cellules DN ayant un fort biais  $V\beta 8.2$ , puisque ces dernières sont pratiquement absentes chez ces souris<sup>63</sup>. La reconstitution de souris chimère récipientes WT irradiées avec

des cellules foie foetal  $\beta 2m^-$  a permis d'appréhender le fait que l'expression de la  $\beta 2$ -microglobuline sur les cellules d'origines hématopoïétiques était essentielle pour le bon développement des cellules DN  $V\beta 8.2$ . En effet, chez ces souris, l'expression de la  $\beta 2$ -microglobuline sur les cellules épithéliales n'a permis la génération que des lymphocytes T CD8+ et non des cellules DN  $V\beta 8.2$  mettant en exergue un nouveau modèle de sélection des cellules dans le thymus médié par des cellules dérivant du compartiment hématopoïétique<sup>64</sup>.

L'identification des cellules du compartiment hématopoïétique permettant le développement des cellules iNKT a été possible par la génération de souris chimères avec différentes déficiences afin que CD1d puisse être exprimé exclusivement par des sous ensemble données de cellules. C'est ainsi que les thymocytes corticaux DP ont été découverts comme source de CD1d permettant la sélection positive des cellules T NK1.1+<sup>65</sup>.

## ii) La liaison homotypique SLAM

Les molécules SLAM (Signaling Lymphocytic Activation Molecule) sont une famille de six récepteurs membranaires exprimés sur les cellules hématopoïétiques. On retrouve dans cette famille :

- SLAMF1 (également connu sous le nom de SLAM ou CD150)
- SLAMF3 (Ly-9 ou CD229)
- SLAMF4 (2B4 ou CD244)
- SLAMF5 (CD84)
- SLAMF6 (Ly108 chez la souris et NTB-A chez l'homme)
- SLAMF7 (CRACC, CD319 ou CS1)

La plupart de ces récepteurs émettent des liaisons homotypiques à l'exclusion de SLAMF4<sup>66,67</sup>.

La signalisation du récepteur SLAM est médiée par la molécule SAP, recrutée via des motifs tyrosine au niveau des queues cytoplasmiques des récepteurs SLAM. SAP se lie également à la tyrosine kinase Fyn<sup>68,69</sup>. L'importance du rôle des molécules SLAM et SAP dans le développement des cellules iNKT a pu être déterminé grâce à des défauts observés chez des individus atteints du syndrome lymphoprolifératif lié à l'X causé par une mutation de SAP et de souris déficientes pour SAP. Dans les deux cas, une diminution significative des cellules

iNKT a été constatée<sup>70-72</sup>. On ignore actuellement précisément comment les signaux du récepteur SLAM-SAP se coordonnent avec ceux émanant du TCR pour permettre le développement des cellules iNKT.

Via l'analyse de souris avec différentes déficiences et un parallèle avec les lymphocytes T conventionnelles, on distinguerait trois voies de signalisations intracellulaires impliquées dans la sélection des cellules NKT : la voie de signalisation liée à la protéine kinase activée par les mitogènes, la voie NF- $\kappa$ B et celle du flux de calcium<sup>73,74</sup>. L'interaction entre la cellule iNKT sélectionnée et la cellule DP entraînerait les cascades de transduction suivante :

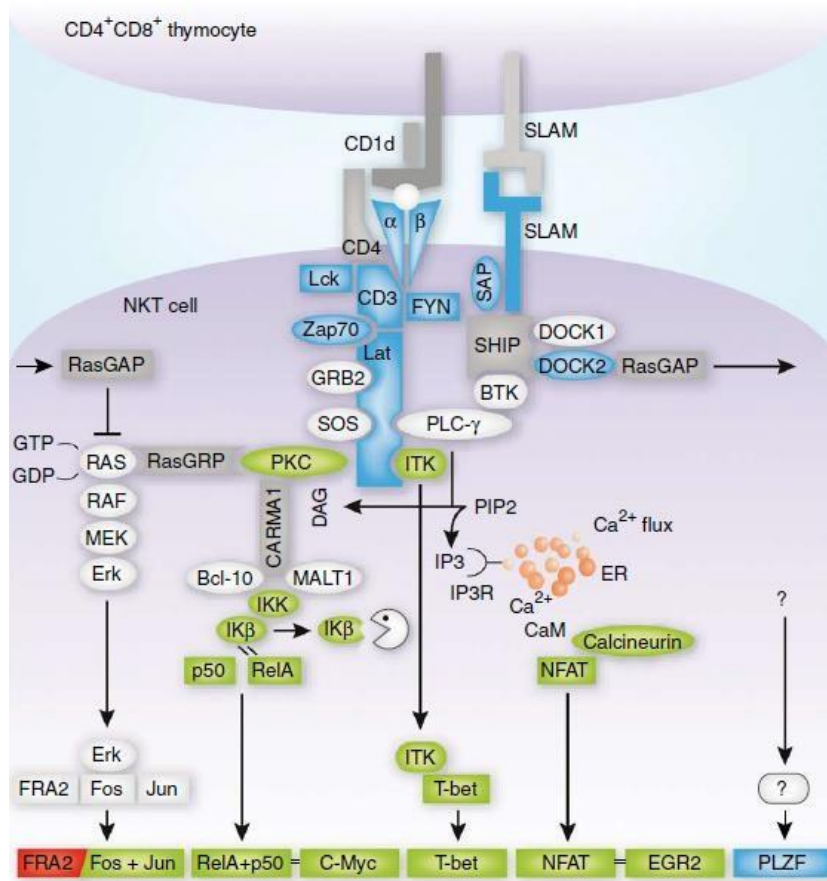
- L'engagement des récepteurs de la famille SLAM à la surface cellulaire conduit au recrutement de la molécule adaptatrice SAP et de la tyrosine kinase de la famille Src Fyn. Le complexe SLAM/SAP/Fyn recrutera via sa phosphorylation la phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ). PLC- $\gamma$  permettra l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et la voie du flux calcique qui va notamment activer NFAT et Egr2 qui, nous verrons par la suite, joue un rôle prépondérant dans le développement des cellules iNKT. Le complexe recrute aussi la protéine d'activation Ras GTPase qui inhibe l'activation de la voie Ras-MAPK<sup>75-78</sup>
- L'engagement du TCR conduit également au recrutement de la tyrosine kinase Fyn. Il y a une interconnexion entre les voies de signalisations déclenchée par l'engagement du TCR et de SLAM. L'engagement du TCR va permettre l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et Ras/Erk<sup>79</sup>

Comme nous le montre la figure n°3, il semblerait ainsi que les signaux induits par le récepteur SLAM coopèrent avec ceux induits par le TCR pour moduler l'activité des voies de signalisation de manière requise pour le développement des cellules iNKT.

Il y a deux courants dans la littérature. Le premier propose que la signalisation SLAM potentialise le signal TCR, ce qui pourrait expliquer le fort signal que reçoivent les cellules iNKT au moment de leur sélection positive<sup>80,81</sup>.

Le second courant propose, au contraire, que la liaison SLAM favorise le développement des cellules iNKT en réduisant le signal après la sélection positive, ce qui induirait une meilleure survie et réponses à l'antigène des cellules iNKT<sup>82</sup>.

Les récepteurs SLAM peuvent avoir des actions activatrices ou inhibitrices en fonction des molécules avec lesquelles ils interagissent par leur domaine cytoplasmique. Ainsi, la question reste entière à savoir si la co-stimulation médiée par SLAM-SAP régule positivement ou négativement la signalisation TCR dans les cellules NKT<sup>83,84</sup>.



**Figure n° 3 :** Voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la sélection des cellules NKT  
 Représentation des 3 principales voies possiblement impliquées dans le développement des cellules iNKT. A gauche, la voie de signalisation liée à la protéine kinase activée par les mitogènes, au milieu la voie NF-κB et à droite celle du flux de calcium<sup>73</sup>

#### b) La Sélection négative

Le phénomène de sélection négative, si primordiale pour les lymphocytes T conventionnels  $\alpha\beta$ , n'est pas clairement défini chez les cellules iNKT. Deux études se sont penchées sur le sujet.

La première a montré que, l'ajout d' $\alpha$ -GalCer aux cultures d'organes thymiques fœtaux (FTOC) entraîne une réduction dose-dépendante du nombre de cellules NKT. De même, l'injection d' $\alpha$ -GalCer à des souris entre trois et quatorze jours après la naissance entraîne une quasi absence de cellules iNKT. Il est intéressant de noter que l'ajout d' $\alpha$ -GalCer doit être fait à un stade précoce du développement des cellules. L'ajout tardif de cet antigène n'a aucun effet sur le développement des cellules iNKT<sup>85</sup>. Il y aurait ainsi une fenêtre développementale pendant laquelle la sélection négative des cellules peut avoir lieu.

La seconde étude, chez une souris surexprimant CD1d, montre une diminution du nombre de cellules iNKT, une fonctionnalité altérée et une augmentation d'expression de la chaîne V $\beta$ 2 du TCR ont été observées<sup>86</sup>. Comme nous le verrons par la suite, la chaîne V $\beta$ 2 du TCR des cellules iNKT est celle qui possède le moins d'affinité pour le complexe TET- $\alpha$ -GalCer. Ceci corrélait avec l'idée que les cellules iNKT exprimant des chaînes plus affines pour le complexe ont été délétés pour leur trop grande affinité pour le complexe antigénique de sélection surexprimé. Dans la même étude, les auteurs ont pu déterminer que les cellules épithéliales et les cellules dendritiques médient la sélection négative des cellules iNKT.

Ces études semblent suggérer que les cellules NKT sont sensibles à la sélection négative au cours de leur développement. Il faut néanmoins souligner que ces études identifient un non développement des cellules iNKT, ce qui pourrait être différent d'une élimination des cellules par la voie de la sélection négative en raison de leur trop forte autoréactivité.

#### c) Les différents modèles de maturation thymique des cellules iNKT

Suite à la sélection positive des cellules iNKT dans le thymus, un processus de maturation thymique sera déclenché permettant aux cellules iNKT d'acquérir leurs phénotypes mémoires/activées. Il existe divers modèles de maturation des cellules iNKT, plus ou moins complémentaires.

### i) Modèle de maturation linéaire

Le modèle de maturation linéaire est le premier à avoir été découvert. Ce modèle est défini par l'acquisition séquentielle des marqueurs CD24, CD44 et NK1.1 définissant quatre stades de maturation.

La population de cellules iNKT la plus précoce, appelée stade 0, est caractérisée par l'expression des marqueurs CD24<sup>High</sup>CD44<sup>Low</sup>NK1.1<sup>Low</sup>. Le stade 0 représente la première population détectable avec le tétramère CD1d- $\alpha$ GalCer<sup>87</sup>. Les cellules iNKT de stade 0 sont rares et non prolifératives (environ  $\sim 0,000001\%$ )<sup>88,89</sup>.

La diminution d'expression du marqueur CD24 est accompagnée d'une phase de forte expansion caractérisant le stade 1 du développement (CD24<sup>Low</sup>CD44<sup>Low</sup>NK1.1<sup>Low</sup>)<sup>90</sup>. Cette phase proliférative, qui aura lieu jusqu'au stade 2, favorisera la constitution d'un pool important de cellules iNKT en périphérie.

Le stade 2 est marqué par l'expression du marqueur CD44, caractérisant le phénotype mémoire des cellules iNKT. Il marque un embranchement dans le développement des cellules. Les cellules peuvent :

- Poursuivre leur développement en stade 3 et exprimer le marqueur NK1.1 définissant le phénotype NK des cellules iNKT. Cette transition est CD1d dépendante. Ces cellules sont alors qualifiées de résidente à long terme<sup>91</sup>.
- Migrer en périphérie et poursuivre ou non leur développement en stade 3

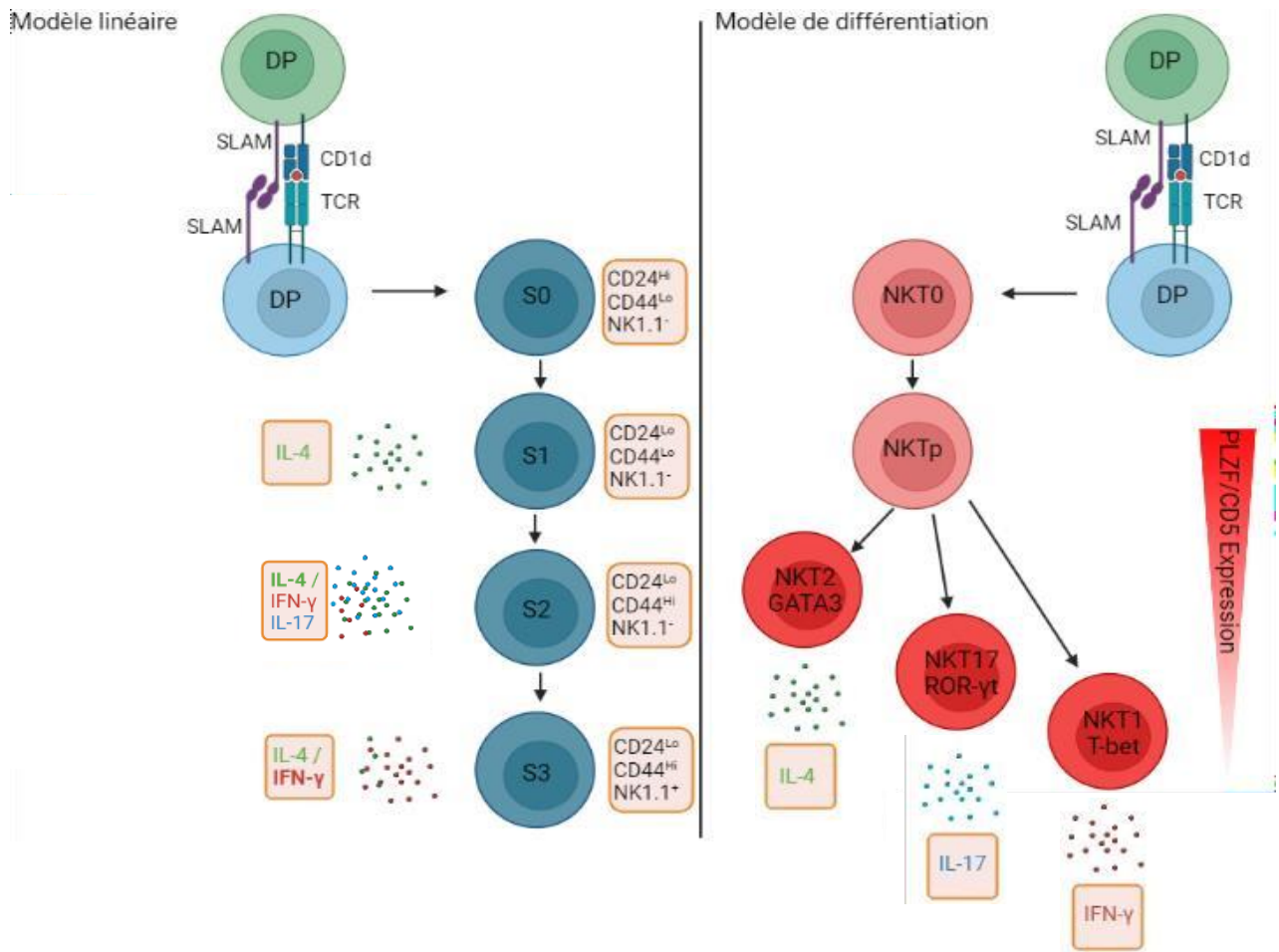
La maturation des cellules iNKT dans le thymus est accompagnée par l'acquisition des fonctions effectrices. En effet les cellules iNKT, au cours de leur maturation, peuvent sécréter de l'IL-4 et de l'IFN- $\gamma$  à différents ratios en fonction du stade de développement comme illustré dans la figure n°4<sup>92</sup>.

ii) Modèle de différenciation des cellules iNKT selon l'expression des facteurs de transcription

L'incapacité du modèle linéaire à être utilisée dans toutes les souches de souris (les souris BALB/c n'expriment pas le marqueur NK1.1) a poussé les chercheurs à explorer d'autres méthodes. En analogie aux lymphocytes T CD4+, le groupe d'Hogquist a ségrégué les cellules iNKT en fonction de l'expression des facteurs de transcription : PLZF, T-bet, ROR- $\gamma$ t et Gata3 distinguant quatre sous populations iNKT<sup>93</sup>. Le précurseur NKTO se différencierait en cellule NKTp par la forte expression du marqueur PLZF. Cette population NKTp pourrait se différencier en trois sous populations iNKT distinctes avec leurs propres signatures transcriptomiques <sup>94-96</sup> :

- La population iNKT1, Th1-like, caractérisée par l'expression du facteur de transcription T-bet et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  ;
- La population iNKT2, Th2-like, définie par l'expression des facteurs de transcription PLZF et Gata3, et la sécrétion d'IL-4/IL-13 ;
- Et la population iNKT17, Th-17 like, qui exprime le facteur de transcription ROR- $\gamma$ t et sécrète de l'IL-17

A noter, le modèle reposant sur les facteurs de transcription est beaucoup plus utilisé mais complémentaire du modèle linéaire. En effet, les populations NKT2 et NKT17 sont présentes dans le stade 2 et la population NKT1 caractérise exclusivement le stade 3. Ces deux modèles sont représentés dans la figure n°4 ci-dessous.



**Figure n° 4 :** Comparaison des modèles de développement linéaire et du modèle selon l'expression des facteurs de transcription.

Le modèle de développement linéaire est représenté sur la gauche de la figure et est défini par l'acquisition séquentielle des marqueurs CD24/CD44/NK1.1 définissant quatre stades de maturation ;le modèle selon l'expression des facteurs de transcription sur la droite classe les cellules en trois populations basées sur l'expression des facteurs de transcription PLZF/ROR-γt/T-bet/GATA3 ; inspiré de Pellicci et al<sup>94</sup>

### iii) Modèle de développement spatio-temporelle

L'essor des techniques de génomiques permettant d'appréhender la complexité transcriptomique d'une cellule à l'état unique a entraîné une plus profonde compréhension de leur signature transcriptomique et de l'hétérogénéité de certaines populations. L'analyse de données de Single Cell RNAseq a donné lieu à une meilleure appréciation du pattern de développement des cellules iNKT et trouver des similitudes avec les autres populations T innées comme les cellules MAIT ou les lymphocytes γδ<sup>97,98</sup>.



L'analyse non supervisée des données de Single Cell RNAseq a identifié neuf clusters iNKT<sup>99</sup>. La comparaison du profil transcriptomique de ces neuf clusters aux données publiées a indiqué que la plupart correspondaient aux sous populations déjà identifiées : iNKT0, iNKT1, iNKT2 et iNKT17. Les clusters identifiés sont :

- Cluster iNKT0
- Cluster « cycling NKT »
- Cluster NKT2a et NKT2b
- Cluster NKT17
- Cluster NKT1a, NKT1b et NKT1c
- Cluster avec une signature transcriptomique interféron

A travers des analyses bio-informatiques, le groupe de Paget a pu prédire un modèle dynamique et continu de développement spatio-temporelle des cellules iNKT (figure n°5). Définissant la population iNKT0 comme la base du modèle, la forte induction de Plac8 et CCR7 permettrait aux cellules iNKT0 de se différencier en iNKT2a. La population iNKT2a est un point d'embranchement central donnant lieu au développement de la population iNKT17 ou de la population iNKT2b qui se différenciera en NKT1a, puis en NKT1b et enfin en NKT1c qui représente l'étape terminale de la différenciation des cellules iNKT1. La population iNKT2a possède une signature transcriptomique chevauchant celles des populations iNKT1 et iNKT17 semblant confirmer leur rôle pivot dans le lignage des sous populations iNKT<sup>97,100</sup>.

Ainsi, Les sous populations iNKT1 et iNKT2 présentent une hétérogénéité inattendue, révélant l'existence de stade transitoire de développement permettant l'acquisition de leurs programmes effecteurs.

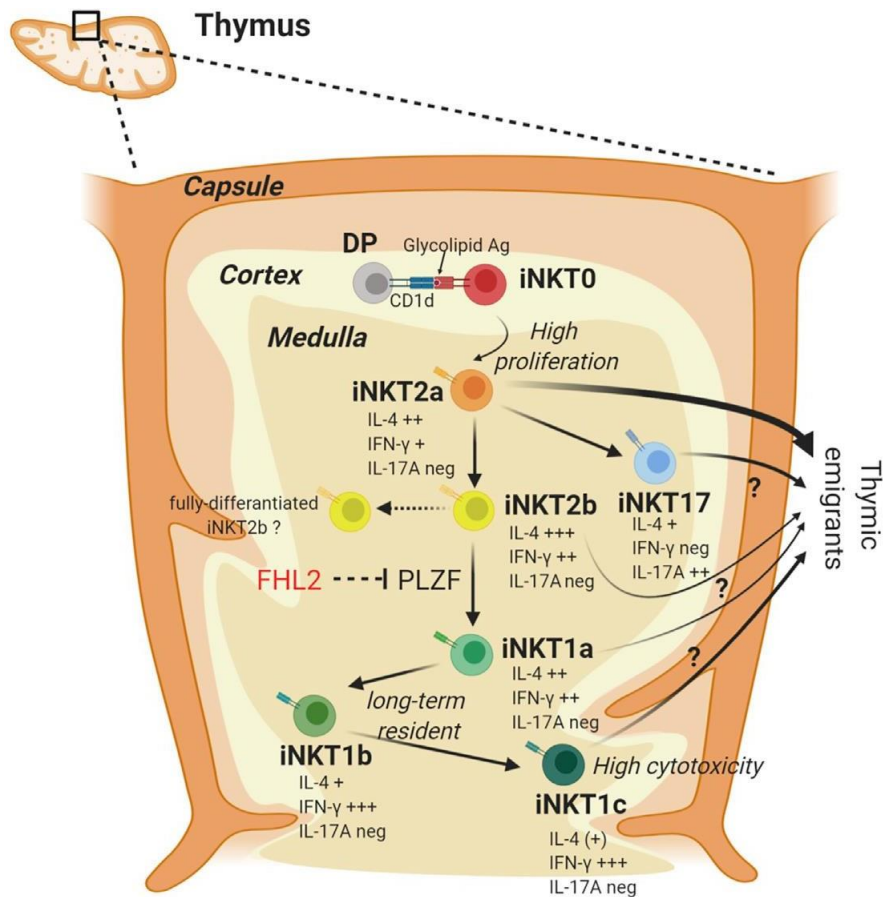


Figure n°5 : Schématisation du modèle dynamique et continu de développement spatio-temporelle des cellules iNKT

Après leur sélection, les cellules iNKT0 se différencient en cellules iNKT2a, embranchement central dans le développement des cellules. Les cellules iNKT2a se différencient en cellules iNKT17 ou en iNKT2b qui permettront le développement des sous populations iNKT1. Le développement des cellules iNKT serait dynamique et continu.

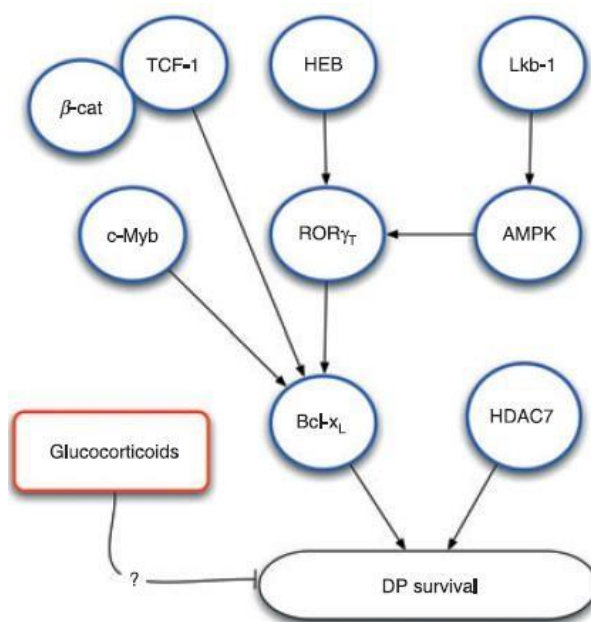
d) Caractérisations des facteurs impliqués dans la régulation du développement des cellules iNKT

Dans cette partie nous aborderons les principaux facteurs impliqués dans la régulation thymique du développement des cellules iNKT. Ces facteurs et les moments pendant lesquels ils interviennent sont schématisés dans la figure n°7 pour les facteurs de transcription et dans la figure n°8 pour les cytokines.

- i) Facteurs régulant l'ontogénie des cellules iNKT au stade double positif

La génération des cellules iNKT dépend, en premier lieu, du réarrangement stochastique de la chaîne  $\alpha$  invariante du TCR,  $V\alpha 14J\alpha 18$ . L'unité génétique  $J\alpha 18$  ayant une position distale de l'unité  $V\alpha 14$ , ce réarrangement est donc secondaire<sup>101-103</sup>. Une durée prolongée de survie des DP est donc nécessaire pour permettre le développement des cellules iNKT<sup>104</sup>. Le facteur de transcription ROR- $\gamma$ T joue un rôle prépondérant dans la survie des DP par la régulation de la molécule anti-apoptotique Bcl-XL<sup>105</sup>. Il y a une quasi-totale absence des cellules iNKT chez les souris ROR- $\gamma$ T déficientes<sup>106</sup>.

D'autres facteurs peuvent également intervenir dans la survie des DP via la régulation de Bcl-XL notamment la voie Wnt- $\beta$ -caténine-TCF-1, ou encore le facteur de transcription c-Myb comme indiqué dans la figure n° 6 ci-dessous<sup>101,107,108</sup>. Le facteur de transcription ROR- $\gamma$ T, peut quant à lui, être régulé par le facteur de transcription HEB ou la protéine kinase AMP<sup>101,109</sup>. L'introduction d'un transgène  $V\alpha 14J\alpha 18$  dans des souris déficientes pour ROR- $\gamma$ T, c-Myb ou encore HEB (souris dépourvus de cellules iNKT) a permis de restaurer le développement des cellules iNKT<sup>108-110</sup>.



**Figure n°6 :** Facteurs impliqués dans la survie des cellules DP<sup>101</sup>

Les facteurs représentés sur cette figure permettent de prolonger la survie des DP allouant le réarrangement secondaire stochastique de la chaîne  $\alpha$  invariante  $V\alpha 14J\alpha 18$  du TCR des cellules iNKT

Le facteur de transcription Runx1 est également important précocement dans l'ontogénie des cellules iNKT. Ces cellules sont quasi indétectables chez les souris déficientes pour ce facteur, malgré des niveaux comparables de réarrangement V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 dans les cellules DP comparées aux souris normales. Runx1 semble être requis pour la sélection des cellules iNKT mais interviendrait plus tardivement que les facteurs que nous venons de voir<sup>106</sup>.

ii) Principaux facteurs de transcription impliqués dans la régulation du développement des cellules iNKT

– Early growth response 2 (Egr2)

L'engagement du TCR et des molécules SLAM entraînent nombres d'évènements de signalisation, entre autres, la libération intracellulaire de calcium qui engendre l'activation du facteur de transcription NFAT transloquant dans le noyau pour activer différentes cibles telles que le facteur de transcription Egr2<sup>111-113</sup>. La famille de facteur de transcription Egr est composée de quatre membres : Egr1, Egr2, Egr3 et Egr4<sup>114</sup>. La seule délétion d'Egr2 provoque des défauts majeurs de développement des cellules iNKT<sup>111</sup>. Les souris déficientes Egr2 ont peu de cellules iNKT et présentent un bloc partiel de développement. Des expériences de Chip-seq ont mis en évidence la fixation de Egr2 sur les promoteurs de nombreux gènes importants pour le développement des cellules iNKT, principalement le facteur de transcription PLZF ou encore l'IL2R codant par la chaîne du récepteur à l'IL-15 qui, nous le verrons juste après, joue un rôle primordial dans la maturation des cellules iNKT<sup>115</sup>.

– Promyelocytic Leukemia Zinc Factor (PLZF)

Le facteur de transcription PLZF est l'un des facteurs clés pour le développement et la fonction des cellules iNKT<sup>116,117</sup>. PLZF est surtout exprimé dans les stades précoces du développement des cellules iNKT, suggérant un rôle précoce dans leur ontogénie<sup>118</sup>. Dans le thymus, les cellules MAIT et les lymphocytes  $\gamma\delta$  l'expriment également<sup>119-121</sup>. Les souris déficientes pour PLZF présentent environ 90% de réduction des cellules iNKT et un bloc développemental au stade 2. Ces cellules n'acquièrent pas leurs fonctionnalités effectrices. Leur phénotype naïf est

conservé et elles s'accumulent dans les ganglions lymphatiques<sup>122,123</sup>. L'expression ectopique de PLZF dans des cellules CD4+ ou CD8+ est suffisante pour que ces dernières acquièrent des fonctions effectrices sans stimulation antigénique et des marqueurs de cellules mémoires<sup>124</sup>. Le facteur de transcription PLZF est essentiel pour le développement, la fonction et la migration des iNKT. Il induit l'acquisition spontanée du statut mémoire/effeteur des cellules iNKT.

#### – NFκB

NFκB est une famille de facteur de transcription composée des cinq membres suivants : RelA (p65), c-Rel, RelB, NFκB1 (p50) et NFκB2 (p52). On distingue deux voies d'activation distinctes mais interdépendantes pour ces facteurs :

- Une voie classique, canonique, activant les dimères p65 et c-Rel,
- Une voie alternative, non canonique, activant les dimères p52-RelB

Ces facteurs transloquent ainsi dans le noyau où ils activeront différentes cibles<sup>125</sup>. Les molécules NFκB ont un rôle clé dans la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives, mais aussi dans le développement et la différenciation des lymphocytes T conventionnels et innés<sup>126-128</sup>.

La délétion des membres de cette famille entraîne des défauts intrinsèques et extrinsèques à différents stades de développement des cellules iNKT<sup>129,130</sup>. Par exemple, la délétion NFκB1 entraîne une forte diminution du nombre et de la fréquence de cellules ainsi qu'un bloc développemental entre le stade 1 et 2<sup>131</sup>. Le facteur RelB est lui requis au niveau des cellules thymiques stromales pour induire la sécrétion d'IL-15 nécessaire pour la maturation des cellules NKT1<sup>132</sup>.

#### – GATA3

Le facteur de transcription GATA3 s'exprime dans les cellules T, NK et iNKT<sup>133</sup>. Dans les cellules T, GATA-3 fonctionne à plusieurs niveaux, pour la différenciation des progéniteurs lymphoïdes communs en cellules DN précoces, pour la β sélection ou encore pour la polarisation Th2<sup>134-136</sup>. Les souris GATA3 déficientes présentent un nombre et une fréquence normale de cellules

iNKT. En revanche, les cellules iNKT CD4<sup>+</sup> ne sont pratiquement pas détectées. GATA3 semble également requis pour la survie, l'activation et les fonctions effectrices des cellules iNKT<sup>137</sup>.

– T helper inducing Poz Krueppel factor (ThPOK)

Le facteur de transcription ThPOK a un rôle bien connu dans le développement des lymphocytes T conventionnels, promouvant l'engagement vers la lignée CD4<sup>138</sup>.

L'expression de GATA3 est nécessaire pour l'activation de facteur de transcription ThPOK. Tout comme pour les souris déficientes en GATA3, les souris ThPOK KO ont un nombre et une fréquence normale des cellules iNKT mais aucune cellule CD4<sup>+</sup> iNKT n'a été générée. En revanche, des cellules iNKT CD8<sup>+</sup>, n'existant pas chez les souris normales sont présentes<sup>139,140</sup>. Il semblerait ainsi que les facteurs GATA3 et ThPOK agissent dans une voie commune supportant le développement de cellules iNKT CD4<sup>+</sup> en réprimant l'expression de CD8 et permettant l'acquisition de fonctions effectrices<sup>141</sup>.

– T-bet

Le facteur de transcription T-bet est essentiel pour la maturation finale en stage 3 et la spécification du lignage Th1 des cellules iNKT mais aussi pour diverses cellules du système immunitaire inné et adaptif comme les cellules NK, les lymphocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels ou encore les ILC<sup>142</sup>. Les souris T-bet<sup>-/-</sup> ont peu de cellules iNKT, bloquées au stade 2 de leur maturation et présentant des altérations fonctionnelles. Chez les souris WT, l'expression de T-bet augmente du stade 1 au 3. T-bet régule directement l'activation des gènes associés aux fonctions des cellules iNKT, telles que la perforine, FasL et IFN- $\gamma$  et permet l'expression de CD122 composant du répéteur à l'IL-15, jouant également un rôle dans la maturation finale des cellules iNKT<sup>143,144</sup>.

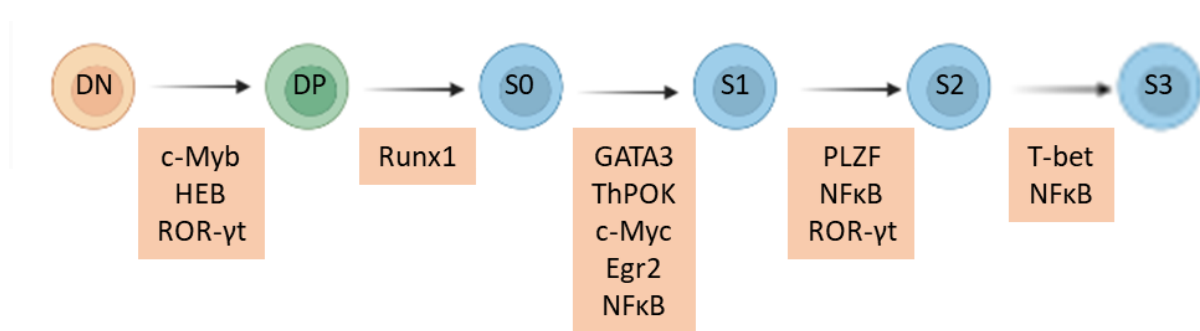
– RAR-related Orphan Receptor gamma (ROR- $\gamma$ t)

En plus de son rôle facilitant le développement des cellules iNKT au stade DP, le facteur de transcription ROR- $\gamma$ t joue un rôle primordial dans la différenciation de la sous population iNKT17. Chez la souris ROR- $\gamma$ t eGFP, seules les cellules GFP+ peuvent produire de l'IL-17 après stimulation<sup>145</sup>. Il s'agirait d'une réexpression de ce facteur et non d'un reste d'expression lié à la sélection positive. Pour confirmer cela il faudrait générer une souris déficiente pour ROR- $\gamma$ t spécifiquement dans les cellules iNKT en utilisant une souris PLZF-Cre.

– c-myc

Le facteur de transcription c-myc est essentiel à de multiples stades du développement et de la fonctionnalité des lymphocytes T  $\alpha\beta$  comme par exemple pour leur prolifération thymique ou leur différenciation en cellules effectrices /mémoires<sup>146,147</sup>.

La délétion de ce facteur au niveau des cellules DP provoque une très forte réduction de la fréquence et du nombre de cellules iNKT. Cette altération ne serait pas due à un problème de survie, la complémentation avec la molécule anti apoptotique Bcl-2 ne corrigeant pas le défaut, mais liée à un défaut de prolifération des cellules. C-Myc promeut la prolifération des cellules iNKT suite à leur sélection<sup>148-150</sup>.



**Figure n°7** : Régulation transcriptionnelle du développement des cellules iNKT en fonction des différents stades de développement, inspiré de <sup>151</sup>

La régulation transcriptionnelle du développement des cellules iNKT intervient à différentes étapes du développement des cellules et est permise par différents acteurs.

iii) Cytokines impliquées dans la régulation du développement des cellules iNKT

– IL-15

A l'instar des lymphocytes CD8+ mémoires, l'interleukine-15 joue un rôle important pour la survie, la maturation et les fonctions effectrices des cellules iNKT, en particulier pour la sous population iNKT1<sup>152</sup>. Les souris déficientes pour l'expression du récepteur à l'IL-15 ou pour l'IL-15 présentent une forte diminution du nombre et de la fréquence des cellules iNKT, essentiellement au stage 3 de leur développement représentant les cellules iNKT1 exclusivement<sup>153</sup>. L'IL-15 sécrétée ou présentée par les cellules thymiques médullaires promeut la survie des cellules par l'expression de la molécule anti apoptotique Bcl-xl, permettant la maturation des cellules du stade 2 au 3 et leur différenciation terminale<sup>154,155</sup>. L'IL-15 induit l'expression du facteur de transcription T-bet et T-bet induit l'expression de CD122 composant du récepteur à l'IL-15. Il y aurait ainsi une boucle de rétrocontrôle positive permettant la différenciation des cellules NKT1 et leurs fonctions effectrices<sup>156,157</sup>.

– IL-7

L'interleukine 7 est une cytokine importante pour le développement et l'homéostasie des lymphocytes T. Il induit des signaux de survie, de prolifération et est important pour la recombinaison VDJ de la chaîne  $\beta$  du TCR<sup>158,159</sup>. Les souris déficientes pour l'expression du récepteur à l'IL-7 ou pour l'IL-7 présentent une forte diminution du nombre et de la fréquence des cellules iNKT<sup>160</sup>. L'expression de transgène Bcl-2 permet de restaurer le phénotype normal des souris. A l'image de l'IL-15, l'IL-7 pourrait promouvoir la survie des cellules iNKT mais dans ce cas par l'expression de la molécule Bcl-2.

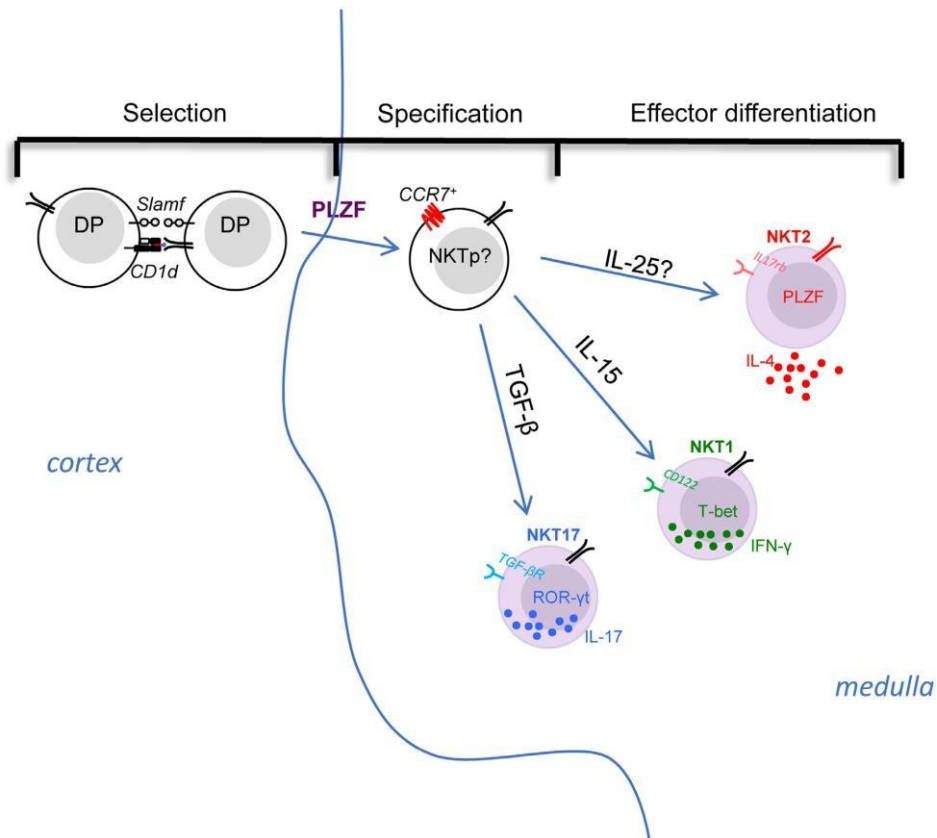


– TGF- $\beta$

La fixation d'une des isoformes de la cytokine TGF- $\beta$  sur son récepteur peut être à l'origine de plusieurs voies de signalisation différentes intervenant dans le développement des cellules iNKT, et plus largement dans le contrôle de la prolifération et la différenciation de nombreux processus physiologiques<sup>161</sup>. La première voie de signalisation, voie Tif-1 $\gamma$ , joue un rôle crucial dans la survie et la prolifération des précurseurs NKT via le maintien de l'expression de l'IL7R et son effet anti apoptotique<sup>162</sup>. La deuxième voie de signalisation, voie Smad4, participerait à la maturation des cellules iNKT du stade 2 au stade 3 (maturation de la sous population iNKT1) par l'expression du facteur de transcription T-bet et du marqueur CD122, composant du récepteur à l'IL-15. La voie Smad4 est également importante pour le développement de la sous population iNKT17 permettant leur survie, ainsi que leur production d'IL-17<sup>163</sup>.

– IL-25

Les souris déficientes pour l'expression du récepteur à l'IL-25 (IL-17RB) présentent un nombre et une fréquence normale de cellules iNKT mais une forte accumulation de cellules en stade 3 de leur développement. Cette étude ne subdivise pas les sous populations iNKT en fonction des facteurs de transcription ROR- $\gamma$ t et T-bet. Elle montre, cependant, que les cellules IL-17RB+ produisent des cytokines TH2 et TH17, semblant désigner les sous populations iNKT2 et iNKT17, cette production étant liée au signal transmis par l'IL-17RB<sup>164</sup>. Une étude postérieure a montré que les cellules iNKT2 et iNKT17 exprimaient IL-17RB<sup>165</sup>. Le contrôle du développement des cellules NKT2 et/ou NKT17 par l'axe IL-17RB/IL-25 reste encore à approfondir. La source d'IL-25 dans le thymus pourrait être les cellules épithéliales thymiques dites « tuft cells »<sup>166</sup>



**Figure n° 8** : Cytokines impliquées dans la différenciation des sous populations iNKT dans le thymus<sup>167</sup>  
 Différentes cytokines interviennent dans la différenciation des sous population iNKT dans le thymus ; le TGF-β est essentiel à la différenciation de la sous population iNKT17, l'IL-15 pour la sous population iNKT1 et possiblement l'IL-25 pour la sous population iNKT2.

C. Et après ?

### 1) Distribution et localisation des cellules iNKT

Chez la souris, les premières cellules iNKT sont détectées environ quatre à cinq jours après la naissance. Ce n'est qu'au 8<sup>ème</sup> jour que ces dernières peuvent coloniser la périphérie. On note une distribution très disparate des cellules iNKT entre les différents organes. Le foie est l'organe avec la plus grande fréquence de cellules iNKT (~10 à 30% des cellules T). On retrouve également des cellules dans les poumons (5-10%), la rate (1-3%), le sang (0,2%), les ganglions lymphatiques (0,2-1%) et bien évidemment dans le thymus (0,5-1%)<sup>168,169</sup>.

De plus, la répartition des sous populations iNKT est différente entre les organes mais aussi entre les souches de souris. La population NKT1 est enrichie dans le foie, la rate et le thymus

d'une souris B6. Chez une BALB/c on retrouve surtout cette population dans le foie. En ce qui concerne la population NKT2, elle est retrouvée majoritairement dans les ganglions lymphatiques et le thymus d'une BALB/c, et peu chez une B6. Et enfin, la population NKT17 est surtout localisée dans les ganglions lymphatiques de la B6 et le thymus de la BALB/c<sup>170</sup>.

Il y a un fort contraste entre la faible fréquence des clones individuels des TCR des lymphocytes T  $\alpha\beta$  et le nombre plus élevé des cellules T de type innées<sup>171</sup>. Il a été évalué, pour les lymphocytes T  $\gamma\delta$ , que le nombre de clone d'une spécificité donné était comparable à la fréquence des lymphocytes T conventionnels effecteurs au plus fort de la réponse d'expansion clonale<sup>172</sup>.

## 2) Modalités d'émigration des cellules iNKT

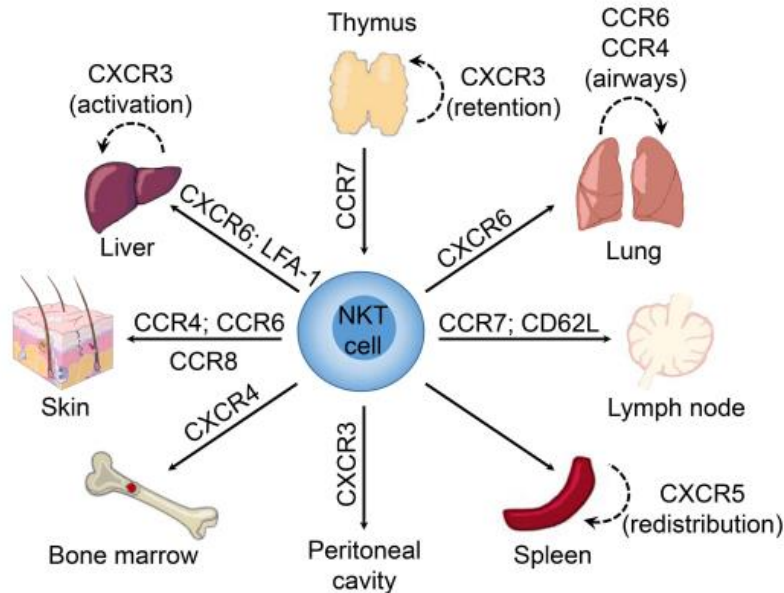
La différence de distribution des sous populations iNKT en périphérie est médiée par l'expression différentielle de facteurs contrôlant leur migration, en particulier certains récepteurs et chimiokines.

Les molécules CCR7 et S1P1 conditionnent la sortie des cellules iNKT du thymus à différents stades de leur maturation. Les souris déficientes pour le récepteur S1P1 ont une très forte diminution du nombre de cellules iNKT en périphérie, ce qui coïncide avec leur augmentation dans le thymus où elles restent séquestrées<sup>173,174</sup>. Dans le thymus, on observe une population de cellules iNKT1 qualifiées de résidente à long terme qui y resterait. Cette rétention serait médiée par l'expression de la chimiokine CXCR3 en raison de la forte concentration de son ligand CXCL10 dans le thymus<sup>175</sup>.

Dans la figure n°9, nous pouvons apprécier les différentes chimiokines impliquées dans la migration des cellules iNKT. Par exemple, l'expression de la chimiokine CXCR4 entraîne la migration vers la moelle osseuse par chimiotactisme en réponse au ligand CXCL12<sup>176</sup>. Ainsi, l'expression du récepteur CXCR6 entraîne la migration des cellules iNKT vers le foie ou les poumons, de CXCR5 la rate, CCR7 les ganglions lymphatiques et CCR4 la peau<sup>177-180</sup>.

Après avoir colonisé la périphérie, les cellules iNKT ne circulent pas dans les différents tissus et organes et sont surtout résidentes à long terme. De la même manière que les lymphocytes

T mémoires, il semblerait que les cellules iNKT n'aient pas besoin de stimulation TCR pour leur homéostasie et leur survie à long terme<sup>181</sup>.



**Figure n°9 :** Chimiokines impliquées dans l'émigration des cellules iNKT<sup>168</sup>

Suite à leur développement dans le thymus, les cellules iNKT vont migrer en périphérie en fonction de l'expression différentielle de certaines chimiokines et récepteurs comme exemplifiés dans la figure.

### 3) Mécanismes d'activation et fonctions des cellules iNKT

Les principaux mécanismes impliqués dans l'activation des cellules iNKT sont :

- Le signal TCR fourni par le complexe CD1d/lipides<sup>182,183</sup>
- Le signal médié par les cytokines, dépendant de l'expression constitutive de certains récepteurs de cytokines par les cellules iNKT. Ce signal est produit par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), stimulées par les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP en anglais) produit par les pathogènes<sup>184,185</sup>
- La synergie des signaux TCR et cytokine<sup>186,187</sup>

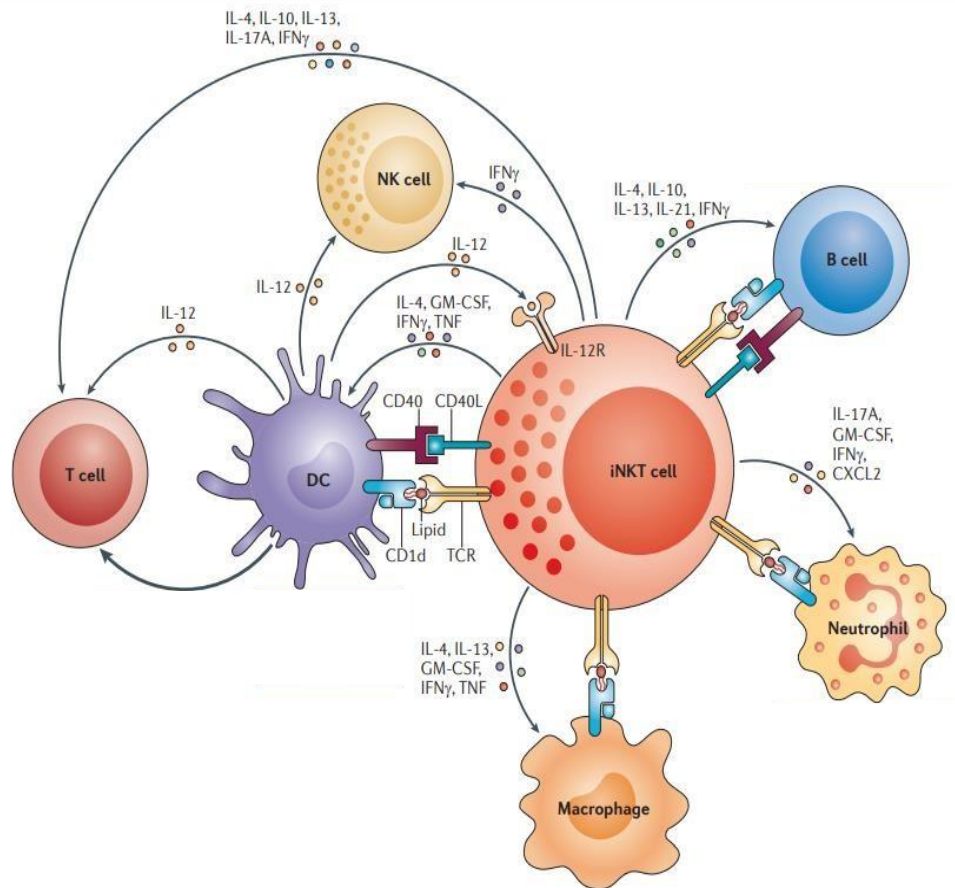
La contribution relative de ces signaux pour l'activation des cellules est contexte dépendant. Le signal TCR fourni par l'interaction entre la CPA et la cellule iNKT peut être suffisant pour induire son activation si ce dernier est fort. Par contre, lorsque le signal TCR est faible, le signal cytokinique seconde ce dernier pour permettre l'activation de la cellule iNKT. Dans certains cas, les seules cytokines pro-inflammatoires produites par les CPA sont suffisantes pour activer les cellules iNKT<sup>188</sup>.

Ainsi, les récepteurs de type Toll (TLR) des CPA détectent les PAMP des pathogènes. Cette détection entraîne une activation de facteur de transcription NF- $\kappa$ B, conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 et l'IL-18. Cette stimulation cytokinique entraîne la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les cellules iNKT<sup>189</sup>.

En réponse à leur activation, les cellules iNKT sont capables de sécréter de forte quantité de cytokine de type TH1, Th2 ou encore Th17. C'est l'une des caractéristiques fortes de ces cellules qui leur permet, entre autres, de moduler les fonctions biologiques de nombres de cellules et d'orchestrer les réponses immunitaires. Ces caractéristiques fonctionnelles seraient dues à la présence d'ARNm de cytokines dans le cytoplasme des cellules en l'absence de tout stimuli<sup>190</sup>. Les cellules iNKT peuvent également avoir une action cytotoxique, notamment la sous population iNKT1, qui agirait par la voie des récepteurs de la mort (Fas/Fasligand ou encore TRAIL/DR5) et/ou la libération de perforine/granzyme ciblant la cellule à unemort programmée<sup>191</sup>.

#### 4) Partenaires d'interaction des cellules iNKT

Les cytokines, les chimiokines et les molécules de surface exprimées par les cellules iNKT peuvent influencer les cellules environnantes et ainsi orchestrer les réponses immunitaires, comme indiqué dans la figure n°10.



**Figure n°10 :** Interactions entre les cellules iNKT et les autres cellules immunitaires<sup>200</sup>

Les cellules iNKT ont un rôle central dans l'orchestration des réponses immunitaires. Elles interagissent et activent de manière directe ou indirecte une multitude de cellules immunitaires comme les cellules dendritiques, les cellules NK ou encore les lymphocytes B

Les cellules iNKT vont :

- Interagir avec les cellules dendritiques. Il s'agit d'une interaction bidirectionnelle permettant d'activer ou de renforcer l'activation des deux partenaires. Cette interaction engendre notamment la transactivation des cellules NK et l'augmentation des réponses antigéniques des lymphocytes T CD4+ ou CD8+<sup>192,193</sup>
- Via la sécrétion de diverses cytokines par les cellules iNKT, avoir un impact sur l'activation et la polarisation des cellules CD4+ vers un profil Th1, Th2 ou Th17<sup>200</sup>
- De manière directe ou indirecte (cytokines) activer les lymphocytes B et promouvoir la production rapide d'immunoglobulines et leur maturation<sup>194,195</sup>

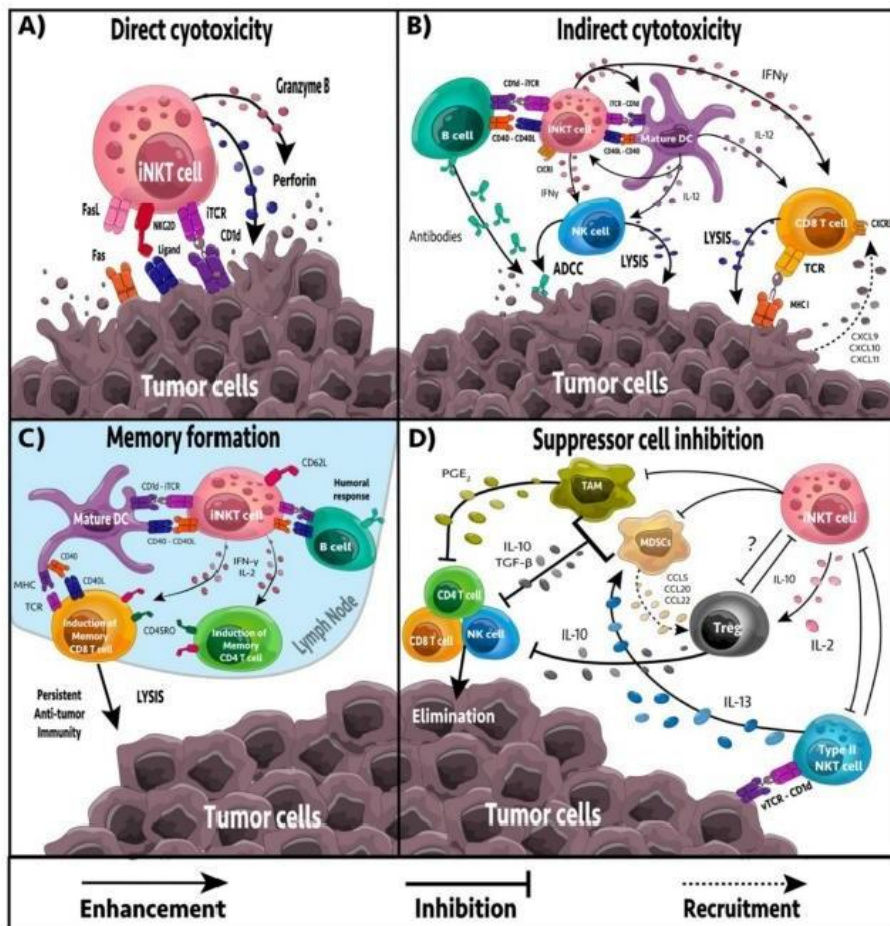
- Interagir, dans le foie et les ganglions lymphatiques, avec les macrophages. Il s'agit, une nouvelle fois, d'une interaction bidirectionnelle provoquant l'activation des cellules et la régulation de la polarisation des macrophages vers un profil M2<sup>196,197</sup>
- Promouvoir le recrutement et l'activation/ la régulation des fonctions suppressives des neutrophiles <sup>198,199</sup>

#### D. Implication des cellules iNKT dans une pathologie, l'exemple du cancer

Les cellules iNKT jouent un rôle dans l'immunité anti-tumorale et l'immunosurveillance<sup>201-203</sup>. La présence de cellules iNKT dans la tumeur est associée à un bon pronostic chez l'Homme<sup>204</sup>. Cependant, les personnes atteintes de cancer présentent souvent peu de cellules iNKT et/ou une fonction altérée des cellules<sup>205,206</sup>. On distingue quatre mécanismes d'action principaux des cellules iNKT face à une tumeur comme indiqué sur la figure n°11<sup>207</sup> :

- Lyse directe des cellules tumorales via l'activité cytotoxique des cellules iNKT<sup>208,209</sup>
- Recrutement des cellules immunitaires innées et adaptatives cytotoxiques<sup>210</sup>
- Inhibition des cellules suppressives du microenvironnement tumorale qui auraient un effet néfaste sur les cellules immunitaires<sup>211</sup>
- Promotion d'une mémoire immunitaire ciblée essentielle pour une réponse durable et pour prévenir les risques de rechute ou d'échappement<sup>212</sup>

Compte tenu du rôle central des cellules iNKT dans l'immunité et l'immunosurveillance antitumorale, leur utilisation en immunothérapie a pris un réel essor. Plusieurs stratégies ont été utilisées et les quatre principales seront présentées.



**Figure n°11** : Mécanismes d'action des cellules iNKT face à des cellules tumorales<sup>207</sup>

Quatre mécanismes d'action des cellules iNKT ont été décrit pour leur lutte face aux cellules tumorales. Les cellules iNKT peuvent avoir une activité cytotoxique direct (A) ou indirect (B) via le recrutement de cellules immunitaire. Il y a formation d'une mémoire immunitaire (C) et les cellules iNKT peuvent inhiber les cellules suppressives du microenvironnement tumorales (D).

### Première stratégie : Injection d' $\alpha$ Gal-Cer

L'injection  $\alpha$ Gal-Cer entraîne une sécrétion rapide de cytokines. Dans des multiples modèles tumoraux murins, cette injection semble avoir des effets anti tumoraux mais limitée<sup>213,214</sup>. Utilisée en phase clinique I, l'injection d' $\alpha$ Gal-Cer est bien tolérée et non toxique. Cependant, seulement 7 patients sur 24, présentant des tumeurs solides en progression, ont répondu au traitement présentant une pathologie stable. La faible efficacité du traitement serait attribuée au faible nombre basal de cellules iNKT chez les patients<sup>215</sup>.



### Deuxième stratégie : Transfert de cellules dendritiques chargées d'αGal-Cer

L'injection de cellules dendritiques chargées d'αGal-Cer permet une activation plus forte des cellules iNKT que la simple injection d'αGal-Cer<sup>216</sup>. Dans de multiples modèles de tumeurs murines, cette injection génère une réduction de la croissance tumorale et des métastases, et donc une meilleure survie. Ces effets semblent dus à l'augmentation de l'expansion des cellules iNKT et à la forte production cytokinique. Cela promeut également la réponse immunitaire des autres cellules<sup>217,218</sup>. Une étude de phase II, concernant des patients atteints de cancer du poumon avancé, semble récolter des résultats encourageants et semble appuyer une poursuite d'une étude plus approfondie en phase III<sup>219</sup>. Ainsi, l'injection de cellules dendritiques chargées d'αGal-Cer engendre une bonne réponse immunitaire mais cette réponse est dépendante du nombre et de la fonction basale des cellules iNKT chez les patients.

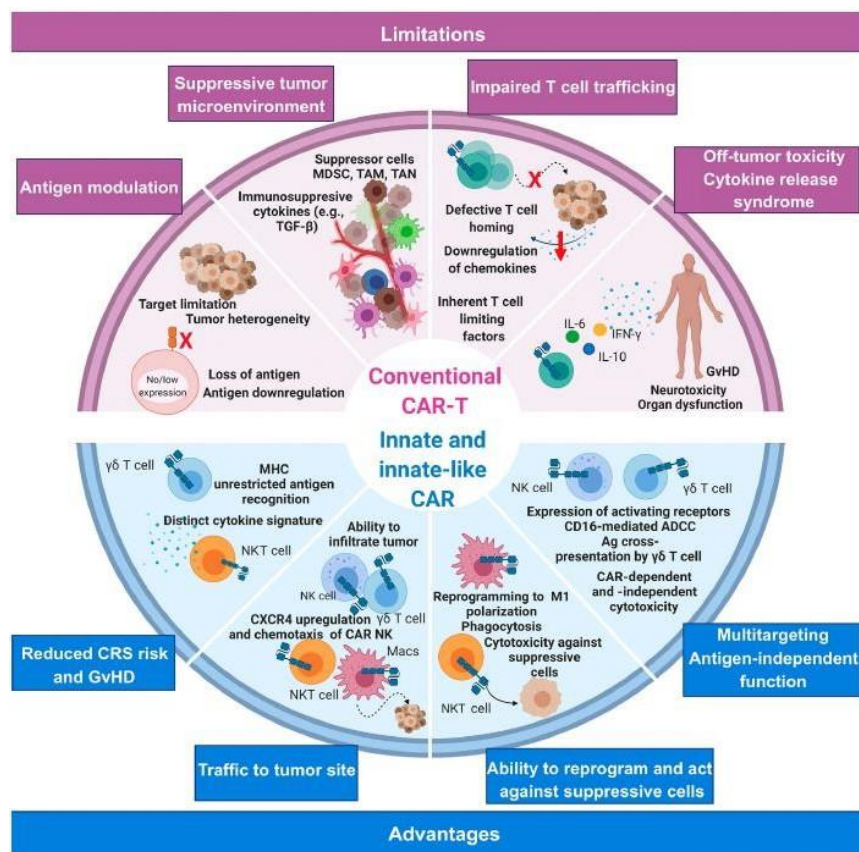
### Troisième stratégie : Injection de cellules iNKT activées

Des PBMC de patients atteints de cancer du poumon avancés ou récurrents ont été mis en culture et stimulés avec de l'αGal-Cer et de l'IL-12. La culture dure trois semaines et a pour objectif d'enrichir le nombre de cellules iNKT et de le retransférer aux patients. Pour certains patients, ce transfert adoptif a permis de fortement enrichir le nombre de cellules iNKT, d'augmenter la cytotoxicité des cellules et a pu promouvoir la régression tumorale<sup>220</sup> ; pour d'autres ce traitement n'a pas eu d'effet malgré l'augmentation ou non du nombre de cellules iNKT<sup>221</sup>.

### Quatrième stratégie : Génération de cellules CAR-iNKT

Les lymphocytes T à récepteur à l'antigène chimérique (CAR-T) sont des cellules génétiquement modifiées pour exprimer un antigène spécifique de la tumeur pour pouvoir la cibler<sup>222</sup>. Ces cellules sont, par exemple, utilisées dans les lymphomes B avec près 90% de patients répondant aux traitements<sup>223</sup>. Les cellules CAR-T sont au cœur de nombreux projets de recherche et suscitent beaucoup d'espoirs en ouvrant le champ des possibles vers une médecine personnalisée. Dans cet essor, les chercheurs ont généré des cellules CAR-T innées. Ces cellules présentent de nombreux avantages comparées aux cellules CAR-T classiques comme nous pouvons le visualiser sur la figure ci-dessous n°12<sup>224</sup>. En effet, ces cellules peuvent infiltrer la tumeur, reprogrammer les cellules immunosuppressives de cette dernière, ou encore, présentent des risques réduits de rejet et ainsi être utilisées en transfert

allogénique<sup>224</sup>. Les cellules CAR-iNKT sont utilisées dans deux essais cliniques ciblant les molécules CD19 et GD2. GD2 est un glycosphingolipide fortement exprimé dans le mélanome, le neuroblastome et certaines tumeurs solides. Les cellules anti-GD2 CAR-NKT exhibent un fort effet cytotoxique in vivo, diminuent la charge tumorale et offrent une meilleure survie. En essai clinique de phase I, les cellules anti-GD2 CAR-NKT dans le neuroblastome réfractaire montrent que le traitement est sûr. Sur trois patients, deux présentent une maladie stable, l'autre une réponse partielle<sup>225</sup>. L'utilisation de cellules anti-CD19 CAR-NKT ; dans des tumeurs malignes de cellules B, engendre une survie prolongée avec des effets anti-tumoraux persistants dans des modèles de xéngreffes chez la souris. Ce traitement présente de meilleurs résultats qu'avec des cellules anti-CD19 CAR-T<sup>226</sup>. Chez l'Homme, l'utilisation de cellules anti-CD19 CAR-NKT semblent également prometteurs avec des réponses partielles ou complètes chez 4 des 5 patients que comporte l'étude<sup>227</sup>.



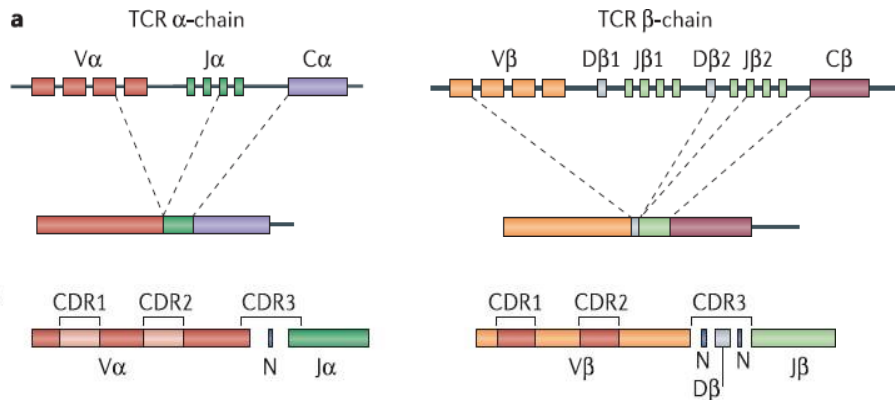
**Figure n°12 :** Comparaison des avantages et limitations à l'utilisation des cellules CAR-T et CAR-NKT<sup>224</sup>  
 Les cellules CAR-NKT présentent de nombreux avantages comparés aux cellules CAR-T, notamment un risque réduit de rejet, une reprogrammation des cellules suppressives tumorales ou encore une habilité à pénétrer dans la tumeur.

## II. Interaction TCR/CD1d et son influence dans l'orientation du lignage des sous populations iNKT

### A. Le TCR et le signal TCR des lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels et des cellules iNKT

#### 1) Le récepteur T des lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels

Le récepteur des cellules T, exprimé à leurs surfaces, joue un rôle central dans le développement, la différenciation et la mobilité des cellules. Le TCR permet aux cellules d'interagir avec leurs microenvironnements et, en particulier, d'assurer leurs fonctions effectrices via la reconnaissance spécifique du TCR avec un peptide complexé aux molécules de CMH I ou II présenté par les cellules présentatrices d'antigènes. Ce récepteur joue donc un rôle essentiel pour notre immunité. Le TCR est un hétérodimère composé par une chaîne  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$  comprenant chacune un domaine variable et un domaine constant<sup>228</sup>. Les régions variables des chaînes, supportant la reconnaissance des antigènes, sont générées par des segments génétiques réarrangés de manière aléatoires lors du développement des lymphocytes T dans le thymus. On dénombre trois segments génétiques pour la chaîne  $\beta$  (V-Variable, D-Diversité, J-Jonction), et deux segments pour la chaîne  $\alpha$  (V-Variable et J-Jonction) composés chacun des différentes unités génétiques (figure n°13)<sup>229</sup>. En plus des multiples combinaisons V(D)J possibles, la variabilité des TCR existe également par ces régions hypervariables (CDR) au niveau du site de liaison à l'antigène. Elles sont au nombre de trois par chaînes. Les régions CDR1 et CDR2 sont codées par la lignée germinale des gènes  $V\alpha$  et  $V\beta$ . Les régions CDR3 sont, elles, codées par la jonction des gènes réarrangés V et J (figure n°13). Il y a donc une diversité supplémentaire, non codée par la lignée germinale, de par l'ajout ou la délétion de certains nucléotides en fonction du réarrangement des unités génétiques V et J<sup>230</sup>. Ainsi, la combinaison unique des segments V(D)J, l'addition aléatoire de nucléotide pendant la recombinaison et les régions CDR sont les clefs de la diversité des spécificités possibles pour le TCR soutenant la reconnaissance d'un large éventail d'antigènes. Pour la souris, la diversité du répertoire des TCR est estimée à vingt millions de cellules présentant un TCR différent<sup>231</sup>.



**Figure n°13** : Schématisation de la recombinaison V(D)J du TCR et représentation des emplacements des CDR<sup>229</sup>

La chaîne  $\alpha$  du TCR est générée par la recombinaison des gènes V et C ; et des gènes V, D, J pour la chaîne  $\beta$ . On distingue des régions hyper variables (CDR) codées par les segments des gènes V ou par la juxtaposition des segments V(D)J participant à la reconnaissance spécifique antigénique.

## 2) Le récepteur T des cellules iNKT

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules iNKT ont la particularité d'exprimer un récepteur T de diversité très réduite composé d'une chaîne  $\alpha$  invariante,  $V\alpha 14$ - $J\alpha 18$ , et un répertoire  $V\beta$  restreint ( $V\beta 2$ , 7 ou 8). Les cellules iNKT ne reconnaissent donc qu'une variété limitée d'antigènes comparées aux lymphocytes conventionnels  $\alpha\beta$ .

- a) La chaîne  $\alpha$  du TCR des cellules iNKT et son influence dans l'orientation du lignage iNKT

C'est en 1994, que le caractère invariant de la chaîne  $\alpha$  du TCR des cellules iNKT a été découvert. Cette chaîne est codée par les segments génétiques  $V\alpha 14$  et  $J\alpha 18$ <sup>11</sup>. Dans cette étude, il a été montré que la chaîne  $V\alpha 14$  se réarrangeait spécifiquement avec la chaîne  $J\alpha 18$ . Le séquençage de la jonction V-J d'hybridomes de cellules iNKT a révélé que cette jonction était surtout monomorphe avec une glycine en position 93 et une aspartate en 94. Une étude ultérieure a révélé que cette combinaison canonique représentait environ 90% des cas<sup>232</sup>. Il demeure cependant, de légères variations de séquences. En effet, la glycine en

position 93 peut être remplacée par une alanine ou une isoleucine. Cette modification d'acides aminés, pour un résidu plus hydrophobe, ne semble pas modifier l'interaction entre la chaîne  $\alpha$  du TCR et la molécule CD1d. Il y a également un phénomène de N-addition qui n'apporte pas de modification au codage de la chaîne invariante. La chaîne V $\alpha$ 14 J $\alpha$ 18 du TCR des cellules iNKT est donc qualifiée de monomorphe.

En dépit de ce caractère monomorphe, notre groupe, dans une étude à laquelle j'ai participé, s'est penché sur le rôle potentiel de la variation en position 93 dans l'orientation de lignage de sous population iNKT. Autrement dit, l'expression d'un acide aminé donné en position 93 peut-elle biaiser la répartition des sous populations iNKT ?

L'étude de la souris transgénique V $\alpha$ 11-V $\alpha$ 14 a permis de répondre à cette question. Chez cette souris, où le transgène V $\alpha$ 14 présente une glycine en position 93, toutes les sous populations iNKT sont présentes, indiquant que la chaîne  $\alpha$  du TCR des cellules iNKT ne semble pas diriger l'orientation du lignage des cellules iNKT<sup>233</sup>. La seule source de variation de la chaîne  $\alpha$  du TCR ne semble pas affecter l'interaction entre la région CDR3 $\alpha$  du TCR et le complexe ligand/CD1d.

- b) La chaîne  $\beta$  du TCR des cellules iNKT : son biais d'utilisation et son influence dans le lignage des sous populations iNKT

La chaîne V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 s'apparie avec les chaînes V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 7, V $\beta$ 8.1 et V $\beta$ 2, dans cet ordre de préférence avec des segments J $\beta$  très divers<sup>234</sup>. Il s'agit du biais V $\beta$ . La diversité de la chaîne  $\beta$  du TCR des cellules iNKT est surtout illustrée par l'utilisation de différents segments génétiques D $\beta$  et J $\beta$ , ainsi que la diversité de la boucle CDR3 $\beta$ <sup>235,236</sup>. Le répertoire de la chaîne  $\beta$  du TCR des cellules iNKT est qualifié de polyclonal.

Comme nous le verrons plus en détails dans la partie suivante, lors de d'une interaction TCR/Lipide/CD1d, la chaîne V $\beta$  du TCR n'entre pas en contact avec le ligand mais seulement avec la molécule CD1d. Plusieurs groupes se sont demandés, néanmoins, si malgré tout, cette chaîne pouvait influencer la reconnaissance des lipides et potentiellement, orienter le lignage

des sous populations iNKT ou encore si l'expression d'une chaîne V $\beta$  donnée biaiserait la répartition des sous populations iNKT.

Les chaînes V $\beta$  sont différemment exprimées entre les sous populations iNKT. La sous population NKT2 exprime le plus les chaînes V $\beta$ 7 et V $\beta$ 2. La chaîne V $\beta$ 8 est globalement exprimée de la même façon entre les sous populations<sup>237</sup>. Il a aussi été démontré que les chaînes V $\beta$  présentaient des avidités différentes, principalement pour le complexe TET- $\alpha$ GalCer. Le groupe de Bendelac a comparé le répertoire V $\beta$  de cellules iNKT NK1.1+ post sélectionnées au répertoire présélectionné de cellules exprimant le transgène V $\alpha$ 14 chez une souris CD1dKO. Ces dernières ont un répertoire TCR composé par la chaîne invariante V $\alpha$ 14, associée à différentes chaînes V $\beta$  et représenterait le répertoire présélectionné V $\beta$  pour la chaîne canonique V $\alpha$ 14. La chaîne V $\beta$ 7 est enrichie environ douze fois entre le répertoire pré et post sélectionnés. Pour les chaînes V $\beta$ 8 et V $\beta$ 2, il y a un enrichissement, respectivement, de huit et deux fois. Il y aurait ainsi une sélection préférentielle des cellules iNKT exprimant la chaîne V $\beta$ 7 suggérant une affinité plus importante de cette chaîne pour le complexe antigénique de la sélection positive<sup>238</sup>. Ceci est renforcé par l'étude du répertoire V $\beta$  chez une souris CD1d+/-, souris où le complexe antigénique de sélection est en quantité non optimale. Il a été observé, chez cette souris, une augmentation de la proportion de cellules iNKT exprimant la chaîne V $\beta$ 7 et une proportion inchangée pour la chaîne V $\beta$ 8<sup>239</sup>. Pour ces deux études, la hiérarchie d'affinité des chaînes V $\beta$  pour le complexe antigénique est : V $\beta$ 7 > V $\beta$ 8 > V $\beta$ 2.

Une troisième étude a généré des hybridomes NKT en faisant coexprimer la chaîne V $\alpha$ 14 et avec toutes les chaînes V $\beta$ . Ces dernières ont la capacité de se lier à la chaîne V $\alpha$ 14 et de générer des TCR fonctionnels, mais seules certaines chaînes peuvent se lier au complexe TET- $\alpha$ GalCer. La chaîne V $\beta$ 8 possède l'affinité la plus forte pour ce complexe, suivie des chaînes V $\beta$ 7 et V $\beta$ 2. Pour cette étude, la hiérarchie d'affinité est la suivante : V $\beta$ 8 > V $\beta$ 7 > V $\beta$ 2<sup>240</sup>. Il y aurait ainsi une corrélation entre l'affinité des chaînes V $\beta$  et leurs fréquences d'utilisation.

Comme nous le verrons par la suite, la sous population iNKT2 semble avoir reçu le signal TCR le plus fort, au vue de l'expression des marqueurs reflétant la force de ce signal. Il est ainsi intéressant de noter que la population NKT2 qui reçoit le signal TCR le plus fort, exprime davantage la chaîne possédant l'affinité la plus importante selon la première classification<sup>241</sup>.

Il pourrait ainsi avoir une corrélation entre une forte affinité pour le complexe antigénique de sélection, la force du signal TCR et l'orientation du lignage des cellules iNKT.

Pour comprendre la possible implication de la chaîne V $\beta$  dans l'orientation du lignage des sous populations iNKT, des souris rétrogéniques ont été générées et comparées exprimant six chaînes V $\beta$  dont les séquences sont connues. Les TCR produits présentent des affinités distinctes pour le complexe TET- $\alpha$ Gal, semblant signifier que la chaîne V $\beta$  pourrait moduler la force de l'interaction des TCR. La sélection et la différenciation des cellules iNKT chez ces souris rétrogéniques sont différentes, ces souris présentant des fréquences et des nombres dissemblables de cellules iNKT et de sous population iNKT<sup>242</sup>.

Cette étude corréle la sélection des cellules iNKT avec l'avidité que leur TCR présente pour un complexe antigénique et la différenciation au temps d'engagement de liaison du TCR. Cette idée que l'avidité jouait un rôle important dans la sélection des cellules iNKT a été mise en exergue par le groupe de Gapin. Ce dernier a démontré que le biais V $\beta$  des cellules iNKT n'était pas dû à un mésappariement de la chaîne invariante V $\alpha$ 14 avec d'autres chaînes V $\beta$ , mais qu'il faudrait une certaine composition du couple  $\alpha/\beta$  pour atteindre le seuil d'affinité requis pour le complexe antigénique pour la sélection des cellules<sup>240</sup>.

On pourrait ainsi se demander si le fait de reconnaître le complexe antigénique, au moment de la sélection positive, de manière très forte détermine le développement des cellules NKT2. La comparaison de souris rétrogéniques apporte une partie de réponse à cette interrogation. Ces souris ont été générées en inoculant des rétrovirus exprimant différentes chaînes V $\beta$  du TCR présentant différentes affinités pour le complexe TET- $\alpha$ GalCer. On remarque ainsi, que pour deux souris présentant une affinité similaire pour le complexe TET- $\alpha$ GalCer, l'une présente un biais NKT1 et l'autre un biais NKT2<sup>240</sup>. Il semblerait ainsi que l'avidité seule ne puisse biaiser l'orientation du lignage.

### 3) La force du signal TCR : facteur pouvant orienter le lignage des sous populations iNKT ?

Différents groupes ont supposés, compte tenu de l'expression de marqueurs d'activation/mémoires, que les cellules iNKT recevaient un fort signal TCR durant ou après leur

sélection. L'utilisation d'une souris NUR77GFP a démontré que les cellules iNKT juste après leur sélection positive, au stade 0, avait une expression de GFP plus importante que les cellules conventionnelles et donc que ces cellules percevaient un signal TCR plus important<sup>243</sup>. On qualifie la sélection des cellules iNKT d'agoniste. Notre groupe, dans des travaux auxquels j'ai participé, a montré que le niveau d'expression du TCR au stade de sélection positive était plus important pour les cellules iNKT que pour les cellules conventionnelles, ce qui pourrait en partie expliquer la plus fort signal TCR reçu (voir article en annexe).

La force du signal du TCR est une variable très importante, conditionnant le développement des cellules iNKT. Plusieurs groupes se sont ainsi penchés sur son potentiel rôle dans l'orientation du lignage des cellules iNKT. Cette question découle des différences observées entre les différentes sous populations iNKT. La sous population iNKT2 exprime le plus fortement les marqueurs CD5, Nur77, Egr2 et PLZF, marqueurs connus pour être exprimés après une stimulation TCR et refléter ainsi la force du signal TCR<sup>244</sup>. Ses observations seraient potentiellement la manifestation d'une force de signal différemment perçue et/ou reçue entre les sous populations iNKT au moment de leurs sélections positives avec la hiérarchie suivante : NKT2 > NKT17 > NKT1.

La souris SKG présente une mutation spontanée de ZAP70 générant un allèle hypomorphe et induisant un signal TCR réduit, renforce cette idée. Chez cette souris, il y a une réduction du nombre et de la fréquence des cellules iNKT, ainsi qu'une prédominance de la sous population iNKT1 au détriment des deux autres sous populations<sup>245</sup>. C'est comme si les précurseurs des cellules iNKT avaient besoin d'un signal TCR assez fort, médié par Zap70, pour favoriser le développement de la sous population iNKT2.

En revanche, la souris transgénique YYAA, présentant également une mutation de ZAP70 et un signal TCR réduit, a une réduction de la population iNKT2, une augmentation de la population iNKT17, sans changement pour la population iNKT1<sup>241</sup>. Ces résultats ne supportent pas tout à fait la thèse selon laquelle la force du signal TCR puisse orienter le lignage des sous populations iNKT. De plus, l'analyse d'une deuxième souris va également dans ce sens. En effet, la souris transgénique 2476F/6F, exhibant une réduction du signal TCR dû à une incapacité de phosphorylation de certains motifs ITAM de CD3ζ, présente une diminution de la sous population iNKT1 et une augmentation de la sous population iNKT2<sup>246</sup>.

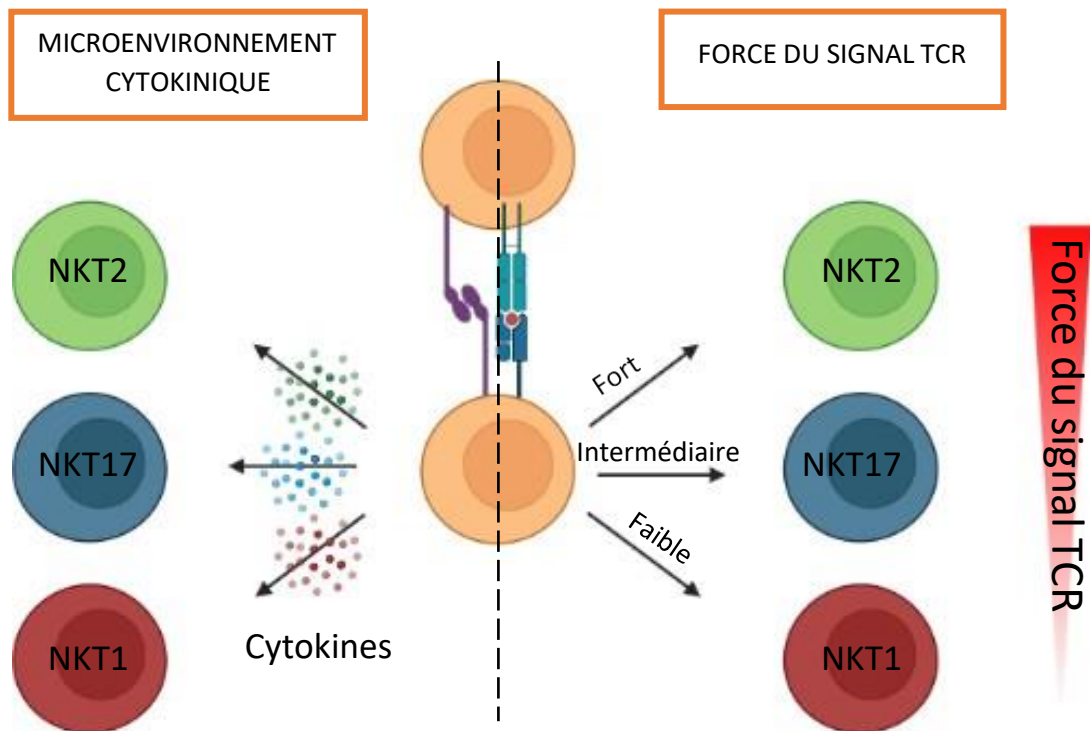


Notons que pour ces études, aucune différence de signal TCR entre les cellules iNKT, au stade 0, stade de leur sélection positive, n'a été distinguée. Il se pourrait alors que les cellules reçoivent le même type de signal, ou que les mesures actuelles ne soient pas assez sensibles pour percevoir des différences, ou encore que la différence du signal TCR soit qualitative et non quantitative.

Récemment, le groupe de Supprian a utilisé un modèle de souris  $V\alpha 14\text{StopF} \times \text{CD4 CreERT2}$  induisant une vague simultanée de développement de cellules iNKT en administrant du 4-hydroxytamoxifen activant l'action de la Cre recombinase à un moment T d'injection. Grâce à un gène rapporteur, ils ont pu ainsi suivre le développement des cellules iNKT après leur induction et ainsi définir la séquence temporelle précise des événements guidant le développement des cellules iNKT.

L'étude de cette vague synchrone de cellules leur a permis de déterminer que, rapidement après l'expression du TCR, les cellules précurseurs iNKT recevaient un fort, homogène et court signal TCR soutenant leur sélection positive. Les signaux TCR ne sont plus détectés aux stades de maturation ultérieurs. Les cellules iNKT atteignent un stade de développement PLZF<sup>high</sup>, plastique et homogène, et ce serait l'action du microenvironnement cytokiniques avoisinants qui provoquerait la différenciation en une sous population iNKT donnée. Il y aurait, selon ce groupe, deux phases distinctes dans le développement des cellules iNKT : une phase de sélection avec un fort, court et homogène TCR, et, un peu plus tard au cours du développement, une phase de différenciation médiée par les cytokines, en absence de signal TCR<sup>247</sup>.

L'importance de la force du signal dans la différenciation des sous populations iNKT reste encore à déterminer. Les deux grandes hypothèses orientant le lignage des sous populations iNKT a été représenté dans la figure n°14 ci-après.



**Figure n°14 :** Schématisation des différentes hypothèses pouvant orienter le lignage des sous populations iNKT.

La partie gauche de la figure représente la thèse selon laquelle le microenvironnement cytokinique orienterait le lignage des sous populations iNKT ; la partie droite la thèse de la force du signal TCR. Un force signal biaiserait le développement vers la sous population iNKT2, un signal intermédiaire vers la sous population iNKT17 et un faible signal vers la sous population iNKT1.

## B. La molécule CD1d

### 1) Caractérisation de la famille de glycoprotéines CD1

CD1 est une famille de glycoprotéines présentant des antigènes de type lipidique hautement conservée chez les mammifères<sup>248,249</sup>. On dénombre cinq isoformes CD1 répartis en deux groupes basés sur la similarité des séquences protéiques<sup>250</sup>. Le groupe I est représenté par CD1a, CD1b et CD1c alors que le groupe II n'a qu'un unique membre, CD1d. Dans certains articles on peut voir apparaître un troisième groupe composé exclusivement du cinquième isoforme, CD1e<sup>251,252</sup>. Contrairement à toutes les autres molécules CD1, CD1e est la seule isoforme qui ne présente pas de lipides. Cette molécule est exprimée sur les cellules

dendritiques et agirait sous forme soluble pour faciliter la présentation de certains lipides par les autres molécules CD1<sup>253,254</sup>.

Chez l'Homme, on retrouve tous les membres de cette famille. En revanche, chez la souris, seule le groupe II est représenté. Il semblerait qu'il y ait eu une rupture de chromosome 1 chez la souris, qui, à l'origine, contenait le locus pour tous les gènes CD1. Cette rupture a divisé le locus CD1 ne laissant que les gènes codant pour CD1d réparti sur une partie du chromosome 3. Ainsi, les gènes CD1 du groupe 1 auraient pu être perdus après cette rupture<sup>255,256</sup>.

Les molécules CD1 sont des hétérodimères, apparentés aux molécules du CMH de classe I, composées par une chaîne lourde  $\alpha$  à trois domaines ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ ), associées de façon non covalente à la chaîne légère de  $\beta 2$ -microglobuline<sup>248</sup>. Le site de liaison à l'antigène est formé par les deux hélices,  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ , reposant une plateforme de feuillet  $\beta$  antiparallèle à huit brins<sup>257</sup>. L'association de ces deux hélices forme des cavités hydrophobes accommodant les chaînes alkyles des lipides. Selon la molécule CD1, ces cavités sont au nombre de deux ou quatre et sont appelées : A', C', F' et T' en analogie aux structures composant la molécule de CMH<sup>258,259</sup>. Le nombre, la nature et le positionnement de chaque poche diffèrent entre les isoformes<sup>260</sup>. Il existe également un pattern d'expression particulier des isoformes que nous verrons plus précisément dans la sous-section suivante.

Tous ces paramètres permettent aux isoformes de s'adapter à une vaste variété d'antigènes lipidiques. La poche A' est assez bien conservée entre les différents isoformes. En revanche, la poche F' est de nature plus variable. Par exemple, pour CD1a, la poche F' est la moins profonde de tous les isoformes et ne permet ainsi d'accueillir que des lipides avec de courtes queues<sup>261,262</sup>. L'hélice  $\alpha 3$  n'interagit pas avec l'antigène mais exclusivement avec la chaîne de  $\beta 2$ -microglobuline. L'hélice  $\alpha 3$ , participant à la stabilité de la molécule, fait la liaison avec le domaine transmembranaire du récepteur reliée à une courte queue cytoplasmique contenant des motifs provoquant l'internalisation du récepteur<sup>263</sup>.

## 2) Localisation des molécules CD1

Chez l'Homme, les molécules CD1 du groupe I sont exprimées sur les cellules spécialisées dans la présentation d'antigènes, surtout sur les cellules dendritiques, et les thymocytes. On note cependant que chaque isoforme a un pattern d'expression particulier. En effet, CD1a est fortement exprimé sur les cellules de Langerhans et CD1c sur les cellules B<sup>250,264</sup>.

Les molécules CD1 du groupe II sont exprimées de manière plus large sur les cellules d'origine hématopoïétique<sup>250,265,266</sup>. CD1d est également exprimé en dehors du compartiment hématopoïétique, notamment sur les hépatocytes et les cellules épithéliales intestinales<sup>261,265</sup>

Ici, on s'intéressera à la molécule CD1d qui présente des antigènes de type glycolipidiques aux cellules iNKT.

## 3) Caractérisation de la molécule CD1d

Comme toutes les molécules CD1, la molécule CD1d a une structure composée par une chaîne lourde  $\alpha$  à trois domaines ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ ) associée de façon non covalente à la chaîne légère de  $\beta 2$ -microglobuline<sup>250</sup>. Les hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ , formant le site de liaison à l'antigène, sont bien plus proches que pour les molécules de CMH I ou II. Ce qui a engendré une ouverture du site de liaison à l'antigène plus étroite et des cavités où l'antigène sera accommodé plus profonds<sup>250</sup>. Pour CD1d, les cavités sont au nombre de deux et prennent la forme de deux longues structures hélicoïdales antiparallèles formant les poches A' et F' ancrés profondément dans la structure<sup>267,268</sup>. Cette proximité entre ces deux hélices crée une sorte de toit au-dessus de site de liaison à l'antigène les protégeant de la présence éventuelle de solvant dans leur microenvironnement<sup>250</sup>. La poche A', la plus profonde, adopte la forme particulière d'un donut/point d'interrogation à l'envers<sup>269</sup>. Elle est formée par des acides aminés volumineux au niveau de la cavité formant un axe autour duquel les chaînes alkyles s'enroulent. La poche F' est orientée de manière plus verticale<sup>250</sup>. Ces deux poches sont tapissées de résidus hydrophobes qui permettent d'accommoder les queues alkyles hydrophobes. Il est spéculé que la poche F' puisse contenir jusqu'à 18 carbones et la poche A' 26<sup>270,271</sup>. Pour les lipides avec de courtes chaînes alkyles, des molécules lipidiques, dont l'identité exacte n'est pas

connue, sont recrutées pour combler l'espace et éviter l'effondrement du sillon hydrophobe de la molécule<sup>272</sup>.

Ainsi les queues hydrophobes des antigènes glycolipiques sont accommodées dans les poches A' et F' et la tête polaire de l'antigène est exposée à la surface pour sa reconnaissance par le TCR.

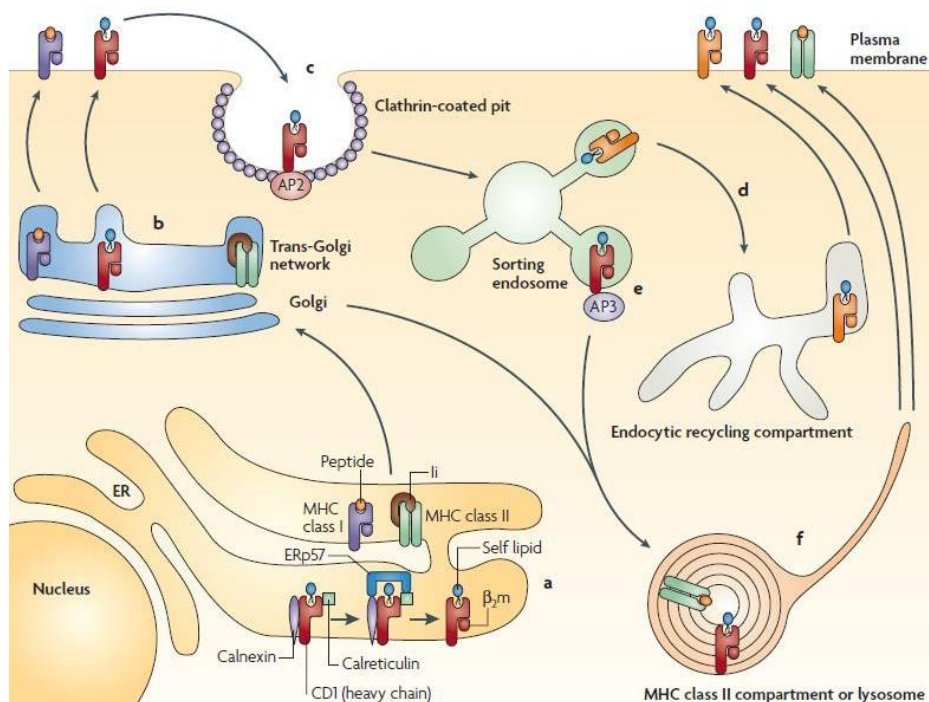
#### a) Biosynthèse de la molécule CD1d

Les chaînes lourdes des molécules CD1d nouvellement synthétisées possèdent des peptides signal qui induisent leur translocation dans la lumière du réticulum endoplasmique. Les chaînes sont alors rapidement glycolysées ce qui permettra leur liaison aux molécules chaperonnes calnexine et calréticuline<sup>273</sup>. Ce complexe recrute la thiol oxydoréductase ERp57, impliquée dans la formation de liaisons disulfures lors du repliement de la protéine<sup>274</sup>. Le plus souvent, les chaînes lourdes des molécules CD1d s'associent à la  $\beta$ 2-microglobuline avant de sortir du réticulum<sup>275</sup>. Il existe cependant une fraction de molécules CD1d exprimée, semblant être fonctionnelles, non associées à une chaîne de  $\beta$ 2-microglobuline. Plusieurs études ont suggéré que les molécules CD1d accommoderaient des lipides endogènes dans la lumière du réticulum endoplasmique<sup>276</sup>. Ces lipides pourraient intervenir pour faciliter l'assemblage et la stabilisation de l'hétérodimère CD1d. Ces lipides seraient pris en charge par les protéines microsomales de transfert des triglycérides (MTP) qui permettraient leur transfert vers les molécules CD1d<sup>275,277,278</sup>.

Pour atteindre la membrane plasmique, deux voies s'offrent aux molécules CD1d. La première, la plus fréquente, est le transit via l'appareil du Golgi avant d'atteindre la membrane. La seconde voie, est la possibilité, dans le réticulum, de s'associer à la chaîne invariante qui possède un signal d'adressage vers les endosomes via l'appareil du Golgi<sup>275,279</sup>. Il pourrait s'agir d'un mécanisme contribuant à la présentation d'antigènes endosomaux qui pourrait être différents de ceux retrouvés dans la lumière du réticulum endoplasmique.

Il y a par la suite un phénomène d'internalisation des récepteurs. Ce phénomène est essentiel pour la prise en charge d'autres antigènes. Les molécules CD1d possèdent, au niveau de leur queue cytoplasmique, un motif de type particulier leur permettant d'interagir avec le complexe AP2 qui induira leur internalisation au niveau des endosomes précoces. Il y a

également une interaction avec le complexe AP3, redirigeant les récepteurs au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes où ils pourront accommoder d'autres antigènes, notamment exogènes, puis retourner à la membrane plasmique allouant leur reconnaissance par le TCR des cellules iNKT<sup>280-282</sup>. L'échange d'antigène dans les endosomes semble être facilité par les saposines<sup>283,284</sup>. Le trafic intracellulaire des molécules CD1 est résumé dans la figure n°15.



**Figure n° 15** : Trafic intracellulaire des molécules CD1<sup>275</sup>

- A : Assemblage de la molécule CD1d composé d'une chaîne lourde et d'une chaîne  $\beta 2$  microglobuline
- B : Transport de la molécule CD1 de l'appareil du Golgi jusqu'à la membrane plasmique
- C : Internalisation des molécules CD1 via le complexe AP2
- D : Voie de recyclage lente pour CD1a et CD1c
- E : Voie de recyclage des molécules CD1b et CD1d vers des compartiments endosomaux et lysosomaux tardifs
- F : Retour à la membrane plasmique avec le possible chargement d'une molécule lipidique au cours de leur trafic

- b) Les isoformes CD1d1 et CD1d2 : influence sur l'orientation du lignage des sous populations iNKT ?

Contrairement à l'Homme, la souris possède deux gènes codant pour CD1d : CD1d1 et CD1d2. Ces deux gènes, orientés en sens opposés de transcription, sont séparés d'environ 6kb<sup>285</sup>. Ces deux isoformes, partageant environ 95% d'homologie, seraient issus d'un événement de duplication assez récent<sup>286</sup>. Les principales sources de divergence entre les séquences sont situées au niveau de la région 5'UTR contenant vraisemblablement les signaux de régulation de la transcription. On dénombre également 17 amino acides de différences dont 9 situés au niveau du site de liaison à l'antigène<sup>285,287</sup>. Il y a notamment le remplacement d'une cystéine en position 168 par un tryptophane. La cystéine 168 est un résidu très conservé par les molécules classiques et non classiques de CMH participant au pont disulfure pour le maintien de la conformation des structures. Cette mutation ne semble pourtant pas avoir de conséquence sur la conformation de la molécule CD1d2. Au niveau transcriptionnel, on retrouve des quantités équivalentes d'ARNm de CD1d1 et CD1d2 dans le thymus. En revanche, dans les autres organes tels que la rate ou le foie, il y a très peu de transcrite de CD1d2. Il se pourrait que la régulation de transcription et/ou de traduction soient différentes entre ces deux gènes<sup>285</sup>.

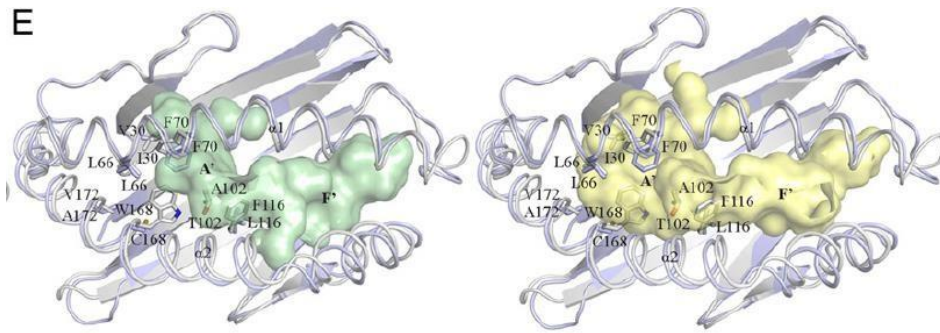
On note également des différences d'expression des gènes CD1d1 et CD1d2 entre les différentes souches de souris. En effet, chez la souris C57BL6, il y a une mutation au niveau de l'exon 3 introduisant un codon stop prématuré abrogeant l'expression d'une protéine CD1d2 dans cette souche de souris<sup>288</sup>. Chez les souris BALB/c, il semblerait que le gène CD1d2 soit fonctionnel et puisse ainsi coder pour une protéine<sup>289</sup>. Deux groupes ont alors étudié la possibilité d'une sélection des cellules iNKT par l'isoforme CD1d2<sup>287</sup>. Dans ces deux études, des souris CD1d1KOCD1d2WT ont été générées à partir de cellules de souches de souris 129/SV portant une mutation dans le gène CD1d1 et réimplantées dans des blastocystes de B6. Cette souris n'exprime pas la mutation dans le gène CD1d2 et pourra générer une protéine CD1d2 fonctionnelle.

Pour la première étude datant de 1999, chez la souris B6 CD1d1KOCD1d2WT, CD1d2 est exprimée dans le thymus mais de manière plus faible que CD1d1 chez une souris B6 WT<sup>290</sup>.

La molécule CD1d2 est presque indétectable en périphérie. A cette période, l'analyse des cellules iNKT se faisait avec l'expression des marqueurs TCR et NK1.1. Cette analyse n'a pas permis de détecter la présence de cellules iNKT et a ainsi conduit la conclusion que l'expression de CD1d2 n'était pas suffisante pour supporter le développement des cellules iNKT. La faible expression de CD1d2 est le reflet de sa faible quantité en ARNm. Il s'agirait d'un défaut de transcription lié à des divergences dans les séquences régulatrices entre CD1d1 et CD1d2. Pour la seconde étude, plus récente, on retrouve un profil d'expression similaire de CD1d2, avec une expression dans le thymus mais plus faiblement que CD1d1 et une quasi absence d'expression en périphérie<sup>287</sup>. L'utilisation du tétramère de CD1d a pu, dans le cas présent, mettre en évidence la présence de cellules iNKT dans les souris B6CD1d1KOCD1d2WT mais en fréquence et en nombre plus faible que chez une souris WT. Il semblerait donc que l'expression de CD1d2 soit suffisante pour soutenir la sélection des cellules iNKT fonctionnelles. Les cellules iNKT sélectionnées par CD1d1 ou CD1d2 présentent des phénotypes différents. On constate un enrichissement en sous population NKT2 et NKT17, une fréquence plus élevée d'utilisation de la chaîne V $\beta$ 8 du TCR et un défaut d'acquisition du marqueur NK1.1 pour les cellules NKT1 pour les cellules iNKT sélectionnées par CD1d2. Il semblerait ainsi que les isoformes CD1d1 et CD1d2 ne sélectionnent pas de la même manière les cellules iNKT.

Dans cette même étude, les auteurs se sont intéressés aux structures cristallographiques des deux isoformes comme nous pouvons le voir dans la figure n°16 ci dessous<sup>287</sup>. Ils ont ainsi pu déterminer que les deux isoformes adoptaient une structure assez similaire et que le polymorphisme était réduit à la poche A' du site de liaison à l'antigène, la molécule CD1d2 en possédant une plus petite. Ainsi, il semblerait que CD1d2 présente de manière plus efficace les glycolipides à courtes chaînes. Ainsi, il se pourrait que ces deux isoformes présentent des antigènes différents, ce qui pourrait avoir une conséquence dans la sélection et/ou la différenciation des cellules iNKT.



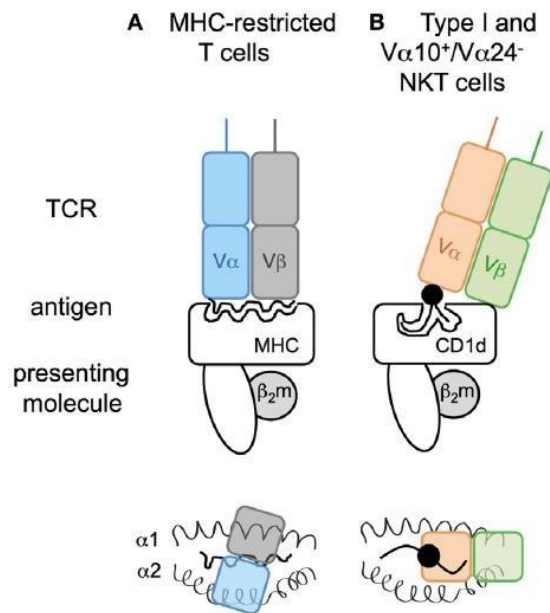


**Figure n°16** : Comparaison des structures cristallographiques des molécules CD1d1 et CD1d2<sup>287</sup>  
 En vert à gauche est représenté le site de liaison à l'antigène de la molécule CD1d2 avec une petite poche A', en jaune à droite le site de liaison à l'antigène de CD1d1

#### 4) Caractéristiques et singularité de l'interaction TCR/CD1d

Les études cristallographiques (figure n°18) ont facilité l'appréhension des modes d'interaction entre les TCR, leurs ligands et les molécules de présentation. Ainsi, Garcia et al, ont démontré que le TCR des lymphocytes T conventionnels sont orientés diagonalement au sillon du site de liaison à l'antigène. Les boucles CDR3  $\alpha$  et  $\beta$  sont en contact avec l'antigène. Les boucles CDR1 et CDR2 sont essentiellement en contact avec les hélices  $\alpha$ <sup>291</sup>.

Le mode d'amarrage des TCR des cellules iNKT est particulier et unique. Contrairement aux cellules conventionnelles, le TCR est orienté parallèlement à l'axe du sillon du site de liaison à l'antigène, incliné au-dessus de la poche F', couvrant les résidus 76-89 et 147-151 des hélices  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 respectivement<sup>292,293</sup>. Ce mode d'amarrage est conservé entre les espèces, quel que soit la chaîne V $\beta$  utilisée et l'antigène reconnu<sup>294-296</sup>. Les deux stratégies d'ancrage sont schématisées dans la figure n°17.



**Figure n° 17** : Stratégie d’ancrage des TCR des cellules conventionnelles  $\alpha\beta$  sur les molécules de CMH (partie gauche) et des TCR des cellules iNKT sur les molécules CD1d (partie droite)<sup>26</sup>

Le TCR des lymphocytes T  $\alpha\beta$  adoptent un amarrage diagonal au sillon du site à l’antigène alors que le TCR des cellules iNKT est orienté de manière parallèle à l’axe du sillon du site de liaison à l’antigène.

L’interaction TCR/ligand/ CD1d est dominée par la chaîne  $\alpha$  du TCR, contribuant entre deux et trois fois plus à la BSA (Buried Surface Area, mesure de la taille d’interaction entre protéines) que la chaîne  $\beta$ . Ce biais pourrait expliquer le caractère de la sélection du TCR semi invariant des cellules iNKT<sup>238,297</sup>.

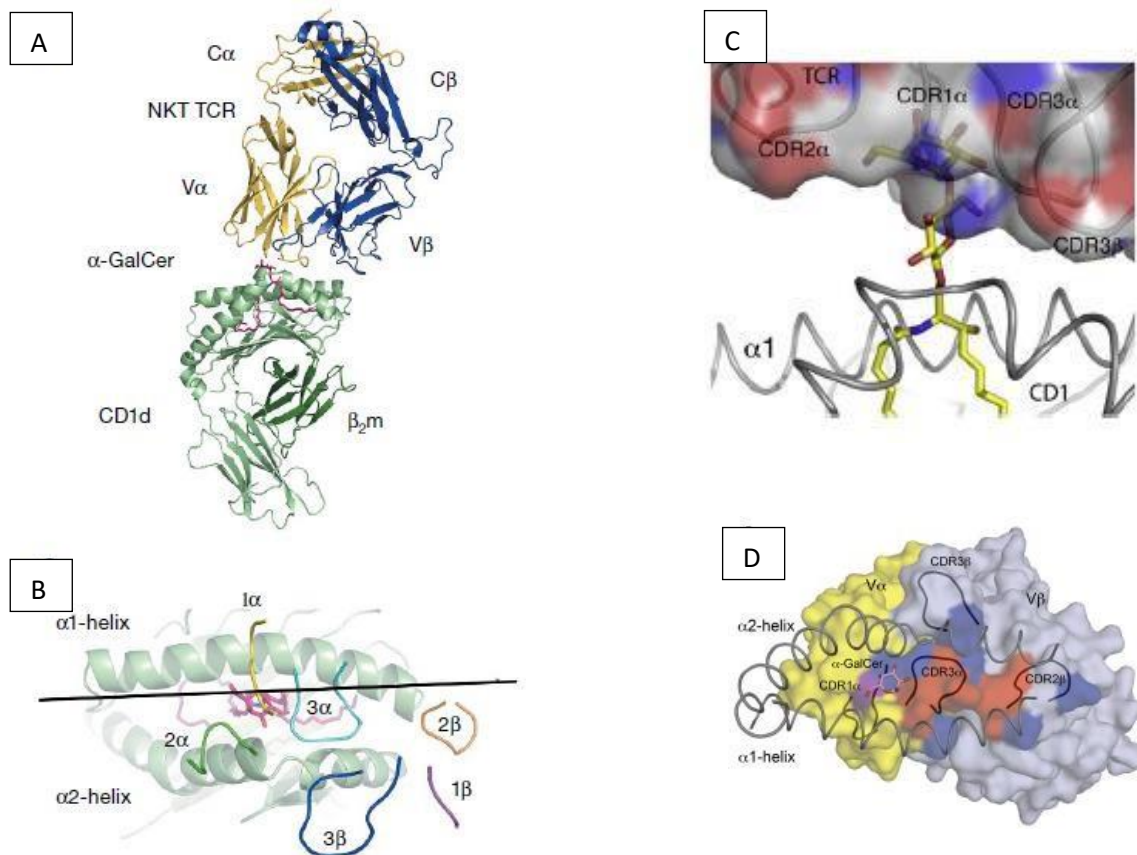
Les interactions de la chaîne  $\alpha$  du TCR avec le complexe ligand/CD1d, sont médiées par les boucles CDR1 et CDR3. La boucle CDR2 n’a qu’une implication minimale dans la reconnaissance du complexe ligand/CD1d, les séquences sont très divergentes entre les espèces, révélant un manque de pression évolutive<sup>298</sup>. La boucle CDR1 interagit exclusivement avec le ligand. Les résidus CDR1 impliqués dans cette reconnaissance sont similaires entre l’Homme, la souris et le rat. Il s’agirait ainsi d’un avantage, conservé au cours de l’évolution et codés par la lignée germinale renforçant encore plus le caractère invariant de la chaîne  $\alpha$  du TCR des cellules iNKT<sup>298</sup>. La boucle CDR3 $\alpha$ , dominant l’interaction avec le complexe ligand/CD1d et codée par la chaîne J $\alpha 18$ , interagit avec le ligand et la molécule CD1d. Les résidus impliqués dans cette interaction sont, là encore, très conservés au cours de l’évolution. L’absence de cellules iNKT dans la souris J $\alpha 18$ KO montre l’importance des résidus CDR3 $\alpha$  codés par la lignée germinale dans la reconnaissance du complexe antigénique.

La chaîne  $\beta$  du TCR des cellules iNKT interagit dans le complexe ligand/CD1d uniquement avec CD1d par les boucles CDR3 $\beta$  et surtout CDR2 $\beta$ . Au vu du caractère invariant et monomorphe de la chaîne  $\alpha$  du TCR des cellules iNKT, plusieurs études voient en la diversité d'utilisation de la chaîne V $\beta$  et les variations non codées par la lignée germinale des séquences CDR3 $\beta$ , une flexibilité de reconnaissance antigénique. En effet, il a été montré que les cellules iNKT V $\beta$ 7+ se lie avec plus d'avidité à l'iGb3 et les cellules V $\beta$ 8.2+ à l' $\alpha$ Gal-Cer<sup>238,299</sup>. Mais comment fait la chaîne V $\beta$  pour pouvoir distinguer les différents antigènes alors que cette dernière est exclusivement en contact avec la molécule CD1d ?

Il y a plusieurs écoles. L'une suggère que la chaîne V $\beta$  via la boucle CDR3 ne permet pas la reconnaissance préférentielle des ligands<sup>298</sup>. Le TCR agirait comme un récepteur de reconnaissance de forme. La boucle CDR3 $\beta$  aurait alors un rôle dans la modulation de l'affinité du TCR soit en affectant sa capacité à se lier à CD1d, soit en affectant la spécificité fine du TCR en modulant l'orientation de la chaîne  $\alpha$ <sup>240</sup>. Ainsi le biais V $\beta$  refléterait surtout une exigence particulière de certains résidus des boucles CDR pour interagir avec le complexe ligand/CD1d<sup>298</sup>. En effet, une étude a révélé que la chaîne  $\alpha$  invariante avait la capacité in vitro de s'apparier à tous les chaînes V $\beta$ , mais qu'il n'y avait que certaines chaînes qui permettaient la liaison avec le complexe TET- $\alpha$ Gal-Cer. Il existerait ainsi, une certaine combinaison de résidus qui supporterait la liaison au complexe antigénique atteignant un certain seuil d'affinité pour être sélectionnés positivement<sup>240</sup>. Ceci a été notamment démontré par le groupe de Mallevaey. Après le constat que l'hybridome NKT formé par les chaînes V $\alpha$ 14 et V $\beta$ 6 n'interagissait pas avec le complexe TET- $\alpha$ GalCer, ils ont remplacé entièrement la région CDR2 $\beta$  par celle de la chaîne V $\beta$ 8.2. Cette modification est suffisante pour permettre à l'hybridome V $\alpha$ 14V $\beta$ 6 d'interagir avec le complexe TET- $\alpha$ GalCer. Il existe pourtant quelques rares cellules iNKT exprimant la chaîne V $\beta$ 6. L'étude de la région CDR3 $\beta$  a permis d'éclairer ce paradoxe. Des hybridomes V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 7 et V $\beta$ 6 ont été générés en exprimant une multitude de séquences CDR3 $\beta$  différentes. Ainsi, pour les hybridomes V $\beta$ 8.2, 80% des séquences CDR3 $\beta$  sont permises à l'interaction avec le complexe TET- $\alpha$ Gal-Cer, 50% pour les hybridomes V $\beta$ 7 et seulement 4% pour les hybridomes V $\beta$ 6. Il semblerait donc que si la chaîne V $\beta$  du TCR des cellules iNKT contient une région CDR2 $\beta$  permettant une interaction adéquate avec CD1d, les cellules atteignent le seuil d'affinité nécessaire pour la sélection des cellules iNKT et sont plus permises pour la diversité des séquences CDR3 $\beta$  plus diverses.

Dans le cas contraire, il faudra une région CDR3 $\beta$  donnée pour pouvoir compenser « ce manque ». Il semblerait ainsi qu'il y ait des contraintes structurelles imposées par la composition en acides aminés des boucles CDR2 $\beta$  et CDR3 $\beta$  ce qui jouerait un rôle critique dans le biais V $\beta$  des TCR des cellules iNKT et leurs affinités d'interaction avec les complexes glycolipidiques.

Pour d'autres, en dépit du fait que la chaîne  $\beta$  du TCR n'interagisse pas directement avec l'antigène, l'utilisation des différentes chaînes  $\beta$  pourrait engendrer des petites modifications structurelles pouvant moduler l'orientation de la chaîne  $\alpha$  contribuant, indirectement, à la reconnaissance préférentielle de différents ligands<sup>294, 300</sup>.



**Figure n°18** : Représentations de l'interaction TCR/αGal-Cer/CD1d<sup>292,301</sup>

- A : Complexe TCR/αGal-Cer/ CD1d \_ en vert l'hétérodimère CD1d, en rose αGal-Cer, en jaune la chaîne  $\alpha$  du TCR des cellules iNKT et bleu la chaîne  $\beta$
- B : Modèle d'amarage parallèle du TCR des cellules iNKT sur le complexe CD1d /αGal-Cer \_ en vert pâle les hélices de CD1d, en rose αGal-Cer et les boucles CDR du TCR
- C : Modélisation des boucles CDR impliqués dans l'interaction avec CD1d ou l' αGal-Cer
- D : Modélisation de l'interaction TCR/αGal-Cer/ CD1d \_ en jaune la chaîne  $\alpha$  du TCR des cellules iNKT et bleu la chaîne  $\beta$

# Résultats

---

## Objectif de la thèse

Mon projet de thèse s'inscrit dans la continuité de mon projet de Master 2 qui avait pour but d'étudier l'influence de la chaîne  $\alpha$  du TCR dans l'orientation du lignage des sous populations iNKT. Nous avons pu déterminer que l'expression d'une chaîne  $\alpha$  donnée ne permettait pas d'orienter le lignage, et surtout, que la densité du TCR contribuait au fort signal que reçoivent les cellules iNKT lors de leur sélection agoniste dans le thymus. La force du signal TCR est une variable essentielle pour le bon développement des cellules iNKT. Nous nous sommes donc particulièrement intéressés à ce facteur.

Dans le thymus, les cellules iNKT se différencient en trois sous populations : iNKT1, iNKT2 et iNKT17, exprimant respectivement les facteurs de transcription T-bet, Gata3 et ROR- $\gamma$ t. L'analyse des marqueurs, reflétant la force du signal TCR, a révélé des disparités parmi les sous populations iNKT. Il semblerait que la population iNKT2 reçoive le plus fort signal, suivi de la population iNKT17 et enfin la population iNKT1 recevrait le plus faible signal. Ces résultats pourraient être le fait d'un signal TCR différemment perçu et/ou reçu lors de la sélection positive des cellules et nous amène au cœur de notre projet de recherche.

Ainsi, mon projet de thèse a pour but de déterminer si la force du signal TCR, notamment à travers la reconnaissance TCR/CD1d, joue également un rôle déterminant dans la différenciation des sous populations iNKT et cela à travers trois approches différentes.

Pour la première approche, nous avons profité de l'existence de souche de souris ayant une distribution différente des sous populations iNKT avec les souris B6 et BALB/c (B6 à dominance NKT1 vs BALB/c à dominance NKT2). Nous avons cette fois ci adopté une approche inverse et nous nous sommes demandés si une force de signal TCR différemment perçue et/ou reçue pouvait être à l'origine des disparités de composition des sous populations iNKT relevées dans ces deux modèles de souris.

Dans une deuxième approche, nous avons évalué le rôle du signal transmis par la molécule sélectrice CD1d dans la différenciation du lignage iNKT. Pour ce faire, nous avons étudié le développement des cellules iNKT chez des souris exprimant une demi dose de CD1d. Nous

avons ainsi développé un modèle de souris où les cellules iNKT percevront un signal TCR réduit.

## Résumé de l'étude

Dans cette étude, nous avons cherché à évaluer le rôle du signal TCR dans l'orientation du lignage des sous populations, et plus spécifiquement, le rôle de la reconnaissance du complexe CD1d/ligand par le TCR des cellules iNKT. Pour se faire, notre étude s'articule en deux parties.

Dans une première partie, nous avons étudié le signal TCR et l'influence des isoformes CD1d1 et CD1d2, chez des souris B6 et BALB/C possédant une répartition différente des sous populations iNKT. Nous avons ainsi pu déterminer que les cellules iNKT des souris BALB/c semblaient recevoir un signal TCR plus important. Nous avons relié ce résultat à la plus grande proportion de cellules iNKT2 chez les BALB/c, sous populations qui, au vues de l'expression de marqueurs reflétant la force du signal TCR, recevraient le plus fort signal TCR. Ces résultats soutiennent ainsi l'idée que la force du signal TCR pourrait influencer la différenciation des sous populations iNKT.

La souris BALB/c exprime deux isoformes de la molécule CD1d : CD1d1 et CD1d2, contrairement à la souris B6 qui n'exprime que l'isoforme CD1d1. L'étude des souris BALB/c exprimant différents isoformes de la molécule CD1d nous a permis de déduire que seule la molécule CD1d1 sélectionne de manière significative des cellules iNKT. En effet, la molécule CD1d2 n'est que très faiblement exprimée et ne permet la sélection que de peu de cellules iNKT avec une différenciation biaisée vers la sous population iNKT1. Cette molécule ne participerait donc pas de manière significative à la sélection des cellules iNKT chez les souris BALB/c et ne peut expliquer la composition différente des sous populations iNKT chez nos souris B6 et BALB/c.

L'étude du rôle de la reconnaissance spécifique TCR/CD1d dans l'orientation du lignage des sous populations iNKT et de la possibilité que l'isoforme CD1d1 présente des antigènes différents chez nos souris ont été étudiés avec des expériences de chimères de moelle mixte. Nous avons pu constater que forcer une moelle B6CD1d1d2KO à se développer sur des thymocytes corticaux BALB/c n'influence pas la différenciation des sous populations iNKT, les cellules iNKT dérivant de la moelle B6CD1d1d2KO se différenciant comme dans une souris B6 classique. La seule reconnaissance du complexe ligand/CD1d par le TCR des cellules iNKT n'est pas suffisante pour conduire un programme de différenciation spécifique de type B6 ou BALB/c.



Dans la deuxième partie, nous avons pu déterminer, par l'analyse de souris exprimant une demi dose de CD1d, que les niveaux d'expression du complexe CD1d/ligand influencent la différenciation des cellules iNKT liées à l'affinité de leur TCR.

L'ensemble de nos résultats nous permet d'apporter un éclairage déterminant quant aux éléments qui pourraient influencer l'orientation du lignage des sous ensembles iNKT.

# Deciphering CD1d-ligand recognition influence on NKT cell differentiation

Ludivine Amable<sup>1</sup>,..... Kamel Benlagha<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Paris, Institut de Recherche Saint-Louis (IRSL), EMiLy, INSERM U1160, Paris, France.

**Abstract:**

Immature DP thymocytes expressing the semi invariant  $V\alpha 14$ - $J\alpha 18/V\beta$  TCR interact in the thymic cortex with CD1d-expressing neighboring thymocytes to enter the NKT cell pool. These positively selected NKT cell differentiate into three functionally distinct subsets named NK1, NKT2, and NKT17. In this study we aimed to assess to what extent CD1d-ligand recognition influence NKT cells differentiation and that could explain strain differential NKT cell distribution in B6 vs BALB/c mice, in which NKT1 and NKT2/17 dominate the NKT cell pool respectively. For this purpose, we generated BALB/c mice expressing either CD1d1 or CD1d2 isomorph, the latter found only in BALB/c mice. We found that CD1d2 is expressed at low levels and select with low efficiency a population of NKT cells with an NKT1 profile resembling to the one selected by CD1d1 in B6 mice. On the other hand, CD1d1 is expressed at high levels, select with high efficiency a population resembling in phenotype, and number the one observed in BALB/c mice indicating that CD1d2 could not account for the differential subset composition between B6 and BALB/c mice. In a second approach, we analyzing the development of B6 CD1d1CD1d2-deficient Bone Marrow (BM) derived NKT cells when forced to develop on CD1d expressed by BALB/c BM cells in mixed bone marrow and vice versa. We found that CD1d-ligand recognition per se is not sufficient to drive a specific differentiation program and indicate that intrinsic genetic factors influence in addition this process. Finally, by comparing NKT cells selected in CD1d<sup>+/-</sup> vs CD1d<sup>+/+</sup> mice on a similar background; we found that CD1d-ligand expression levels influence NKT cell composition linked to NKT cell TCR affinity.

Overall, these results indicate that CD1d mediated TCR signals and other intrinsic signals integrate to influence strain specific NKT cells developmental program and subset distribution.

## Introduction:

Invariant natural Killer (NKT) cells recognize lipid antigens presented by CD1d, a non-classical major histocompatibility complex (MHC) class I-like molecule. These cells express a semi-invariant TCR made up mostly of an invariant TCR $\alpha$  chain (V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 in mice, V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 in humans) associate mainly with TCR $\beta$ 8.2, V $\beta$ 7, or V $\beta$ 2 in mice, V $\beta$ 11 in humans (1, 2). NKT cell acquire during development effector/memory features linked to the key transcription factor promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF), also important for MAIT and  $\gamma\delta$  T cell development (3-5). In the thymus, NKT cells develop into three major terminally differentiated and functionally distinct iNKT cell subsets. NKT1 cells express the transcription factor T-bet and secrete predominantly IFN $\gamma$ ; iNKT2 cells express high levels of the GATA3 and promyelocytic leukaemia zinc finger (PLZF) transcription factors and secrete IL-4 and IL-13; NKT17 have intermediate levels of PLZF, are positive for RAR-related orphan receptor gamma (Ror $\gamma$ t) expression, and secrete IL-17 (6).

NKT cell develop in the thymus and derive from CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double-positive (DP) thymocytes expressing a V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 TCR that recognize glycolipid antigens presented by CD1d on neighboring DP thymocytes in the context of SLAM-SAP mediated co-stimulation (7). NKT cell development can be subdivided into the stages 0 (CD24<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup>), 1 (CD24<sup>-</sup> CD44<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup>), 2 (CD24<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup> NK1.1<sup>-</sup>), and 3 (CD24<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup>) (8). The closest cells to positive selection, stage 0, express HSA, CD69 and Egr-2 and represent the earliest common precursor to NKT cells (9, 10). The selection of these cells is believed to occur through a strong TCR agonist signal at positive selection allowing the expression of Egr-2/PLZF and the entry to the NKT cell program (11, 12). Our own study suggests that high TCR density might contribute to TCR signal strength at stage 0 (13). The subsequent stage 1 comprises progenitor population of NKT cells called NKTp (14). These cells are identifiable by upregulation of PLZF and acquisition of CCR7 and S1PR1. Slamf6, and to a lesser extent Slamf1, are required for iNKT cell development in mice (7). However, whether SLAM-SAP mediated co-stimulation regulates positively or negatively TCR signaling in NKT cells is still unclear. In vitro costimulation of Slamf6 together with the TCR with immobilized antibodies was shown to potentiate Egr2 and PLZF expression in mouse pre-selection double-positive (DP) thymocytes (15-17). However, deletion of the entire slam family receptor (SFR) locus in mice led to reduced iNKT cell numbers

as a consequence of increased TCR signaling and reduced survival suggesting that SFRs promote NKT cell development by reducing TCR signaling (18, 19). Thus, how TCR and SFR signals integrate to control iNKT cell selection and effector differentiation remains a key unresolved question in the field.

TCR-mediated effector subset instruction could occur during cortical selection and/or in the cortex or medulla following the NKTp stage. Different studies showed that CD1d/TCR interaction is important for the NKT cells functional maturation (20-22). In fact, stage 1 and 2 NK1.1- NKT cells progressed to stage 3 NK1.1+ when intrathymically injected in WT but not in CD1d KO mice (20, 21). Our study further showed that cortical thymocytes along with their selecting ligand are required for the further maturation to stage 3 NKT cells (20). CD1d/TCR interaction was also shown to regulate NKT2 function as mature thymic NKT2 cells that produce IL-4 at the steady state no longer do so in a CD1d deficient environment (22). A hierarchy in TCR expression levels and signal strength (NKT2>NKT17>NKT1) in NKT cell subsets led to the hypothesis that TCR signal strength might influence fate decision of developing NKT cells (17). This was exemplified in two studies using mouse models expressing hypomorphic alleles of Zap70 (i.e., SKG BALB/c mice, YYAA and ZAP70AS C57BL/6 mice) showing that the frequency of thymic iNKT2 and iNKT17 cells, but not of iNKT1 cells, was decreased demonstrated that the development of iNKT2 and iNKT17 cells requires stronger TCR signals than for iNKT1 cells (17, 23). Also, C57BL/6 mice deficient in the enzyme A20 (also known as TNFAIP3), a negative regulator of TCR signals, exhibited a decrease in NKT1 cell numbers in the thymus and peripheral tissue (24). To systematically investigate the earliest phases of NKT cell development and subsequent subset differentiation, a TCR-inducible mouse model (CD4-creERT2 V $\alpha$ 14iStopF Nur77- eGFP) was developed by the Schmidt-Supprian group (25). This model allowed generating an inducible wave of iNKT cell development and defines the precise temporal sequence of events guiding NKT cell development and revealed that early TCR signaling instructs a common progenitor state encompassing NKT0 cells, while effector subsets emerge later without further TCR input. The study also showed that NKT17 cells derive from these progenitors during a short proliferative phase within 3 to 5 days, while NKT1 cells in addition continuously emerge through differentiation from NKTp/NKT2-like cells in a process that lasts 14- 20 days and that is likely cytokine driven. This conclusion contrast with

the one down using mouse models expressing hypomorphic alleles of Zap70 (SKG and YYAA) (17, 23, 24). In these models, differences in TCR expression levels and signaling were not obvious at the NKT0 cell stage, and only emerged at subsequent developmental stages (17). Thus how and when TCR signaling control NKT cell selection and effector differentiation is still a matter of debate.

In mice, two genes arranged in opposite transcriptional orientation encoding the CD1d isoform have been identified, CD1D1 and CD1D2 (26). The CD1D2 gene from C57BL/6 mice revealed a frame-shift mutation at the beginning of the fourth exon encoding the  $\alpha 3$  domain, thereby abolishing CD1d2 protein expression in this strain. In the BALB/c mouse, on the other hand, the CD1D2 gene shows a reading frame allowing its transcription and its potential expression at the surface (27). A transgenic mouse for CD1d2 on a B6 background has been successfully generated (28). This mouse is however deficient in NKT cells because of the very low expression of CD1d2 on the surface of cortical thymocytes, necessary for the selection of NKT cells. The authors proposed that a transcriptional deficiency is at the origin of its low expression. In BALB/c mice, the expression level of CD1d1 and CD1d2 mRNAs are equivalent, which predicts their expression at the surface at the same level. However, expression of CD1d2 on the surface of thymocytes has never been documented in BALB/c due to the absence of antibodies discriminating between CD1d1 and CD1d2 molecules. Importantly, it has been shown that CD1d2 molecules can present short, and not long, lipid chain antigens to NKT cells indicating that they can participate in the positive selection of NKT cells in the same way as CD1d1 molecules but with antigens different from those presented by the latter (29). Importantly a recent analysis of mice expressing CD1d2 on a B6 background (B6 CD1d1 KO mice generated with ES cells from 129/SV that harbor functional CD1D2 gene), showed that the selected repertoire is different than the one selected by CD1d1 and that is more NKT2/NKT17 skewed (29). Thus, the question remains whether CD1d2 is expressed at the cell surface of BALB/c cells and to what extent it could influence NKT cell selection and distribution.

The relative distribution of the three thymic NKT1, NKT2, and NKT17 subsets varies in different mouse strains and affects the phenotype and activation status of surrounding cells (6). In several mouse strains, including BALB/c, NKT2 cells were abundant and stimulated by self-ligand to produce IL-4. In those strains, steady state IL-4 conditioned CD8 T cells to become “memory-like”, the production of chemokines by thymic dendritic cells, and the thymic exit of mature “conventional” T cells (6, 30, 31). Additionally, RANKL expressing thymic iNKT2 and iNKT17 cells regulate the differentiation of Aire<sup>+</sup> MHC class II<sup>+</sup> medullary thymic epithelial cells that are involved in clonal deletion of self-reactive T cells and Treg maturation (32). Also, thymic resident NKT1 cells produce IFN- $\gamma$  and promote Qa2 expression in CD4 and CD8 thymocytes, participating with TNF- $\alpha$  in the maturational process of these cells (14).

As mentioned above, it is proposed that differential TCR signal strength perceived by NKT cells direct subset differentiation with NKT2 signal > NKT17 > NKT1 (17, 23). Based on that, we hypothesized that strain differences in NKT cell subset distribution could be dependent on TCR signal strength. To test this, we compared TCR signal strength in NKT cell from B6 and BALB/c mice, in which NKT1 and NKT2/17 dominate the NKT cell pool respectively. We found that NKT cells, and particularly NKT2 cells, in BALB/c mice perceive a higher TCR signal strength compared to B6 mice supporting a relationship between differential TCR strength and NKT cell differentiation. This difference is not due to a higher CD1d or SLAM expression in BALB/c mice or to differences in CD1d1/CD1d2 isomorph expression as we found CD1d2 poorly expressed in BALB/c mice and inefficient in selecting NKT cells. We also set up mixed bone marrow chimeric mice where CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> B6 or BALB/c NKT cells develop respectively on CD1d-expressing WT BALB/c or B6 cortical thymocytes. Interestingly, we found that NKT cells from the CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> compartment distribute similarly to their strain of origin, indicating that CD1d-mediated recognition is not decision maker to direct a specific NKT cell differentiation program and that additional genetic intrinsic factors influence this process. Finally, analysis of NKT cell development in CD1d<sup>+/-</sup> mice showed that CD1d expression levels could influence NKT cell subset distribution and function.

## **Materials and methods**

### **Mice**

J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> and B6 CD1d1<sup>-/-</sup> mice are described elsewhere (33, 34). B6 and BALB/c CD1d1/CD1d2<sup>-/-</sup> mice were purchased from the Jackson Laboratories. WT C57BL/6J and BALB/c mice were purchased from Janvier Laboratories; C57BL/6 Ly-5.1 mice were purchased from Charles River Laboratories. All mice were bred and maintained under specific pathogen free conditions, and experiments were performed in accordance with the Institutional Animal Care and Use Guidelines. The study was approved by the local ethics committee Comite d'Ethique Paris-Nord (C2EA-121) affiliated with the Comite National de reflexion Ethique en Experimentation Animale and to the French ministry for higher education and research.

### **Generation of knock-out transgenic mice for CD1D1 and CD1D2 genes**

CD1d isomorph knock-out BALB/c mice were generated by Crispr-Casp9 technology. For CD1d1 KO mice (named CD1d2 mice), we used founders that had an addition of T in position 17 starting ATG inducing a downstream STOP codon allowing the production of a 19 aa protein. For CD1d2 KO mice (named CD1d1 mice), we used founders that have a deletion of a T at position 23 starting ATG inducing a downstream STOP codon allowing the production of a 38 aa protein. For details, see supplemental material and methods.

### **Cell preparation**

Thymus, pooled peripheral lymph nodes (PLNs; comprising axillary, subaxillary, maxillary, inguinal, and popliteal lymph nodes), and spleen were isolated, mechanically disrupted, and filtered through a 40-mm stainless steel mesh to obtain single-cell suspensions. The recovery of bone marrow cells is performed by placing the bone into a 0.5mL Eppendorf tube pierced with a needle and containing 200 $\mu$ L of sterile 1X PBS. The 0,5 ml tube is then placed in a 1,5 ml Eppendorf tube, span at 5000rpm 5min, and the cell solution is recovered in the 1,5 m tube, and passed through a 70 microns filter (QTY1 FALCON Cell Strainer Filter).



### **Flow cytometry staining**

Single-cell suspensions were incubated with anti-CD16/32 (2.4G2; BD) to block Fc receptors before staining with PE, allophycocyanin, CD1d a-GalCer loaded tetramer, as previously described (35). Binding was revealed with fluorochrome-conjugated Abs diluted in FACS buffer (PBS containing 5% FCS and 0.02% sodium azide). See list of antibodies in supplemental material and methods. For intranuclear staining, cells were fixed and permeabilized after staining, then the Transcriptor Factor Buffer Set (BD Biosciences) was used according to the manufacturer's instructions (eBioscience). For intracellular cytokine staining, cells were fixed with 2% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) and permeabilized with saponin. The Zombie NIR Fixable Viability staining kit was used according to the protocol provided by Biolegend. Flow cytometry was performed on a four-laser LSR Fortessa cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo V10.7.2 (BD Biosciences).

### **Generation of BM chimeras**

BM cells were harvested from both the femurs and tibias of 3–6-week-old donors. B6 and BALB/c BM cells ( $5 \times 10^6$  in total) were intravenously transferred, into the lateral tail vein within 24 h, alone or co-injected at a 1:1 ratio into lethally (9 Gray) irradiated 6–8-week-old (B6 CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> × BALB/c CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup>) F1 mice. BM chimeras were analyzed at 8–10 weeks post-reconstitution. The F1 mice were used as recipients to avoid potential rejection of the BM cells and to distinguish B6- and BALB/c-derived cells

### **In vitro stimulation**

To measure intracellular cytokines, cells were stimulated with 50 ng/ml PMA and 3300 ng/ml ionomycin in the presence of 5 mg/ml brefeldin A for 4h (all reagents from Sigma-Aldrich).

### **Quantitative real-time PCR**

CD69<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> preselection double-positive thymocytes were sorted by on FACS Aria III (BD Biosciences) from BALB/c, BALB/c CD1d1KO (called CD1d2), BALB/c CD1d2KO (called CD1d1) and C57BL/6. Total mRNA was extracted using Direct-zol DNA/RNA Miniprep kit (Zymo Research) as recommended by the manufacturer. Reverse transcription was carried out by using the TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (ThermoFisher) following the manufacturer's instructions. Quantitative real-time PCR was performed on a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using TaqMan gene expression assays for Gapdh (assay number: Mm99999915\_g1), Cd1d1 (assay number: Mm00783541\_s1) and Cd1d2 (assay number: Mm00776138\_gh). Relative expression of Cd1d1 and Cd1d2 was determined using Gapdh as the internal control using the comparative Ct method.

### **Statistical analysis**

FACS data are summarized as mean +SEM. The statistical significance of differences between populations was assessed based on a nonparametric Mann Whitney U test performed using GraphPad Prism software; p values  $\leq 0.05$  were considered significant.

## Results

### TCR signal strength correlate with specific NKT cell subset composition

NKT cell development in mice give rise to three NKT cell subsets named NKT1, NKT2, and NKT17 based on the type of cytokine they produce (6). The B6 and BALB/c mice have different numbers of NKT cells and different distribution of NKT cell-subsets. NKT cell frequency and numbers are lower in B6 compared to BALB/C mice (**Fig. 1A**). In addition, NKT1 cells represent the major NKT cell subset in B6 mice while NKT2 cells represent the dominant NKT2 subset in BALB/c mice (**Fig.1A**). These mice represent thereby a way to understand factors that drive their selection and differentiation. Different studies suggested that TCR strength could play a role in NKT cell-subset differentiation (17, 23). The hypothesis was supported by studies showing that a reduced TCR strength affected mostly NKT2 cell but not NKT1 cells. Because B6 and BALB/c mice have different NKT cell distribution, we thought to compare TCR strength in NKT cell subsets of these two strains to gain insight into the relationship between TCR strength and NKT cell differentiation. Based on the results supporting the role in TCR strength in TCR differentiation mentioned above, one would expect to found a lower TCR strength in NKT cells from B6 mice. Accordingly, when we analyzed CD5, PLZF, and Egr2 expression levels in NKT cells, reflecting TCR signal strength, we observed a lower expression of these markers on total NKT cells, and mainly on NKT2 cells, from B6 mice indicating a lower TCR signal strength perceived by NKT cells from B6 mice (**Fig. 1B**). The lower TCR strength in NKT cells from B6 mice parallel with lower TCR and SLAM expression on these cells compared to BALB/c mice (**Fig.1C**). On the contrary, CD1d and SLAM expression on cortical thymocytes is higher on B6 compared to BALB/c mice (**Fig. 1D**). These results show a correlation between NKT cell subset composition and TCR signal strength in B6 vs BALB/c and support the notion that TCR signal strength could influence NKT cell subset differentiation.

### CD1d isomorph expression is not at the origin of strain specific NKT cell distribution

As CD1d expression levels on cortical thymocytes do not correlate positively with TCR signal strength, we thought that CD1d isomorphs could be of the origin of the differential TCR signal strength and NKT cell distribution between B6 and BALB/c mice as CD1d1 and CD1d2 are differentially expressed in both strains. In fact, B6 mice harbor a point mutation in exon 4 of

CD1D2, which encodes the  $\alpha 3$  domain (27). This frame-shift mutation introduces a stop codon, abolishing surface expression of the molecule. In the BALB/c strain, however, CD1D2 does not contain this mutation. Initial studies, and recent ones, indicated that CD1D2-encoding transcripts were equally abundant compared with CD1D1 transcripts in BALB/c thymocytes (17, 26). However, no serological reagent currently exists to discriminate CD1d1 from CD1d2 proteins and its surface expression and contribution to NKT cell development is unknown. To address this question we generated mice expressing either CD1d1 or CD1d2 molecules by causing a reading frame shift and the appearance of an early stop codon in CD1D2 and CD1D1 genes respectively by Crispr-cas9 technology (**Fig. 2A**). Analysis of CD1d1 KO mice (called thereafter BALB/c CD1d2 mice) showed reduced surface expression of CD1d2 molecules in cortical thymocytes (up to 20 times compared to CD1d1CDd2 double KO mice) and almost no detectable expression of CD1d2 expression in the periphery (**Fig. 2B**). We observed the same trend for CD1d2 expression in B6 CD1d1 KO mice (called thereafter B6 CD1d2) (**Fig. 2B**). These mice express CD1d2 because they were generated with ES cells from 129/SV mice strain expressing CD1d2. These mice were then backcrossed to B6 mice. Analysis of BALB/c CD1d2 KO mice (called thereafter BALB/c CD1d1 mice) showed normal CD1d1 expression on cortical thymocytes compared to BALB/c littermate controls (**Fig. 2B**). Analysis of NKT cell development in BALB/c CD1d2 mice showed a reduced frequency (around 8 times) and numbers compared to WT littermates control making a theoretical proportion of this population around 15 % of NKT cells in BALB/c mice (**Fig. 2C**). NKT cell selection in B6 CD1d2 is less efficient with a 50 time less frequency that B6 mice (**Fig. 2C**). Analysis of NKT cell subsets in BALB/c CD1d2 mice showed an increase in NKT1 and a decrease in NKT2 and NKT17 cell subsets compared to BALB/c littermate control (**Fig. 2C**). This distribution profile is close to the one observed in B6 and B6 CD1d2 mice (**Fig. 2C**). Analysis of NKT cell development in BALB/c CD1d1 mice showed similar frequencies, NKT cells numbers, and NKT cell subset distribution in the thymus of these mice compared to BALB/c littermate control mice. (**Fig. 2C**). Intracellular staining did not show accumulation of CD1d2 molecules within the DP thymocytes (**Fig. 2D**). Transcriptional analysis showed equal amounts of CD1D2 and CD1D1 transcripts in BALB/c CD1d2 DP thymocytes, as observed in BALB/c and B6 mice (**Fig. 2E**). In addition, equal amounts of CD1D2 transcripts were detected in BALB/c CD1d2 and BALB/c mice, pinpointing a translational rather than a transcriptional problem behind the low expression of CD1d2 in the thymus (**Fig. 2E**). In the periphery however, we found reduced

expression of CD1D2 compared to CD1D1 transcripts indicating the existence of a transcriptional problem in addition to a translational one (**Fig. 2E**). Interestingly we found that CD1d2 expression is upregulated in thymic NKT cells compared to DP cells supporting the notion of a translational problem at the origin of the low CD1d2 expression in BALB/c CD1d2 mice (**Fig. 2B**).

Overall, these results show that CD1d2 molecules select NKT cells with lower efficiency compared to CD1d1 molecules. The selected cells in BALB/c CD1d2 mice are mostly NKT1 cells and the one selected in BALB/c CD1d1 mice are mostly NKT2/17 showing a “B6 like” and a “BALB/c like” profile in NKT cell subset distribution respectively (**Fig. 2E, pie chart**). Thus CD1d2 is likely not at the origin the difference in TCR signal strength and subset distribution between B6 and BALB/c mice.

### **CD1d-mediated ligand recognition do not promote specific differentiation path**

So far, our findings indicate that neither CD1d expression levels nor differential CD1d isomorph expression could explain TCR signal strength and subset distribution in B6 and BALB/c mice. To test if CD1d-ligand recognition in the context of B6 vs BALB/c genetic background could play a role in NKT cell subset differentiation, we decided to analyze the development of BALB/c CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> NKT cells selected on B6 CD1d-expressing cortical thymocytes and vice versa by generating mixed chimeric mice (**Fig. 3A**). Because these experiments necessitate mixed F1 B6 CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> x BALB/c CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> recipient mice (called thereafter (B6 x BALB/c) CD1d1/2<sup>-/-</sup> F1 recipient) to allow normal reconstitution, we first asked whether factors intrinsic or extrinsic to hematopoietic cells contribute to the differential NKT cell subset distribution profile in B6 and BALB/c mice. To test this, we transferred B6 (H-2Kb) or BALB/c (H-2Dd) BM cells into lethally irradiated (B6 x BALB/c) CD1d1/2<sup>-/-</sup> F1 recipients. Between 8 and 10 weeks post-BM reconstitution, we analyzed NKT cell subset composition of donor-derived iNKT-cells in the thymus and spleen. As shown in **Figure 3B, upper panel**, B6 and BALB/c BM cells gave rise to high frequencies of thymic and splenic NKT1 and NKT2 cells recapitulating what observed in B6 mice and BALB/c mice respectively. However, we also observed that thymic, but not splenic, BALB/c BM cells gave

rise to high frequencies of thymic NKT1 population, exceeding NKT2 cells, and to a reduced frequencies of NKT17 cells (**Fig. 3B, upper panel**). We however observed the same thymic NKT cell subset distribution pattern in BALB/c → BALB/c CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> BM chimeras indicating that this reversed NKT1/NKT17 distribution observed in mice reconstituted with BM BALB/c cells is intrinsic to the BALB/c BM cells and not to the (B6 x BALB/c) CD1d1/2<sup>-/-</sup> F1 recipient (**Fig. 3B lower panel**). As expected, B6 → B6 CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> BM chimeras show an NKT cell distribution resembling to the one observed in B6 mice (**Fig. 3B, lower panel**). Thus, the BALB/c distribution pattern of thymic NKT cells observed after BALB/c BM reconstitution (high NKT2/NKT1 and low NKT17 frequency), and not the one observed in wild type BALB/c mice and shown in **figure 1 A**, will be considered as reference BALB/c pattern when analyzing BALB/c BM reconstituted mice. Overall, these results indicate that factors intrinsic to hematopoietic cells contribute to the differential NKT cell subset distribution profile.

We next determined whether factors intrinsic or extrinsic to NKT cells control their varying differentiation in B6 and BALB/c BM cells. This was done by infusing B6 and BALB/c BM cells mixed at a 1:1 ratio to chimerically reconstitute lethally irradiated (B6 x BALB/c) CD1d1/2<sup>-/-</sup> F1 mice (**Fig. 3A**). We found that the distribution of thymic and splenic NKT cells derived from B6 BM or BALB/c BM resemble the one observed in B6 BM or BALB/c BM chimeric mice respectively, indicating that NKT cell differentiation and distribution of NKT cells is intrinsic to BM-derived NKT cells (**Fig. 3C**). To directly test the role of CD1d-ligand recognition in NKT cell differentiation, we generated BM chimeras by transferring B6 CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> (H-2Kb) BM cells or BALB/c CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> (H-2Kd) admixed respectively with BALB/c or B6 BM cells into lethally irradiated (B6 x BALB/c) CD1d1/2<sup>-/-</sup> F1 recipients. CD1d-deficient DP thymocytes lack the ability to select NKT cells but can generate NKT cells in the presence of WT B6 or BALB/c DP thymocytes. As shown in **figure 3C**, the thymic and splenic distribution of NKT1 and NKT2 cells developed from the CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> BM compartment does not resemble to the distribution of the co-recipient CD1d-sufficient-originated NKT cells but resemble the one observed in B6 BM or BALB/c BM chimeric mice. Interestingly, we noticed that CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> -originated NKT cells acquired CD1d expression (**Fig. 3D**). The plausible explanation for this is that these cells co-opted CD1d from CD1d-expressing DP thymocytes from co-recipient CD1d-sufficient NKT cells, a phenomenon called trogocytosis (36). Overall, these results

indicate that CD1d-ligand recognition alone is not sufficient to promote strain specific differentiation and subset distribution.

### **CD1d expression levels impact NKT cell subset composition and function**

To assess the influence of CD1d expression we decided to analyze NKT cell development in CD1d heterozygous mice (CD1d<sup>+/-</sup>), where CD1d density is reduced by half, compared to WT mice. We performed this study in B6 CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> x BALB/c F1 mice with a mixed background so we do not have to do the study in B6 and BALB/c background separately. Another advantage using the F1 mice is that they comprise a sizable population of NKT2 and NKT17 cells compared to B6 mice. We thus crossed B6 CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> mice and BALB/c mice and B6 and BALB/c mice to obtain CD1d<sup>+/-</sup> F1 and CD1d<sup>+/+</sup> F1 mice on a mixed B6/BALB/c background (**Fig. 4A**). We found in CD1d<sup>+/-</sup> mice a normal thymic T cell distribution based on CD4 and CD8 (**not shown**) and CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double positive cortical thymocytes in these mice express at their surface half CD1d molecules as expected (**Fig.4B**). We found that the CD1d<sup>+/-</sup> F1 mice have the same frequency (**Fig. 4C**) and absolute numbers (**data not shown**) of NKT cells compared to WT controls as assessed by CD1d-tetramer staining, indicating normal selection in these mice. We, however, found that the distribution of NKT cells in these mice was affected with an increase in the frequency and absolute numbers of NKT2 cells and a decrease in the frequency and absolute numbers in NKT17 cells. The frequency and absolute numbers of NKT1 cells remain unchanged. We also found as expected that reduced CD1d expression induced reduced TCR signal strength as we observed reduced expression levels of CD5, PLZF and Egr2 in total NKT cells from CD1d<sup>+/-</sup> F1 control mice (**Fig. 4D**). When we analyze NKT cell subsets separately, we observed a lower expression of CD5 in all NKT cell subsets, a lower expression of PLZF in NKT1 and NKT2, and a lower expression of Egr2 only on NKT2 cells (**Fig. 4D**). We also analyzed the TCR  $\beta$  chain repertoire in the different NKT cell subsets, the  $\alpha$  chain being constant, and found an increase in the frequency of V $\beta$ 7 in total NKT cells of CD1d<sup>+/-</sup> compared to CD1d<sup>+/+</sup> controls (**Fig. 4E**). Analysis of V $\beta$  chain usage in CD1d<sup>+/+</sup> NKT cell subsets shows this hierarchy of V $\beta$ 7 usage NKT2>NKT1>NKT17 as described in other studies (6). In CD1d<sup>+/-</sup> mice, we observed an increase in the usage of V $\beta$ 7 in NKT2 and NKT1 but not in NKT17 cells compared to CD1d<sup>+/+</sup> mice (**Fig. 4E**). We observed no changes in V $\beta$ 8

usage. (**Fig. 4E**). Our results indicate that there is a correlation between the usage of V $\beta$ 7 and developmental potential in CD1d $^{+/-}$ . In fact, the subsets with higher expression of V $\beta$ 7 have a developmental advantage (NKT2 or NKT1), while subset with the lowest V $\beta$ 7 expression have a reduced developmental potential. In order to assess the functional capabilities of NKT cells developed in CD1d $^{+/-}$  mice, we analyzed cytokine production in these subsets after stimulation with PMA/Ionomycin. We found that NKT cells expressing NK1.1 and representing mature NKT1 cells have their potential to produce IFN- $\gamma$  unaltered (**Fig. 4F**). The NK1.1-CD138-subset comprising T-bet $^{+}$  immature NKT1 cell and NKT2 cells have the same potential to produce IFN- $\gamma$  (cytokine produced by immature NKT1 cells) and a reduced capability to produce IL-4 (cytokine produced by NKT2 cells as mature NK1.1 $^{+}$  NKT1 cells do not produce IL-4) (**Fig. 4F**). As for CD138 $^{+}$  NKT17 cells, we found these cells to have a reduced capability to produce IL-17 (**Fig. 4F**). To assess the consequences of reduced NKT cell functional capabilities in CD1d $^{+/-}$  mice, we decided to analyze the development of Eomes positive CD8 virtual memory cells in CD1d $^{+/-}$  mice. These cells depend largely on IL-4 provided by NKT2 cells for their development as CD1d $^{-/-}$  mice have reduced CD8 virtual memory cells (6). We found the frequency and absolute number of CD8 $^{+}$ Eomes $^{+}$  cells in the thymus of CD1d $^{+/-}$  mice were reduced compared to CD1d $^{+/+}$  control mice (**Fig. 4G**). Overall, these results show that CD1d-expression levels could influence not only NKT cell subsets composition but also acquisition of their effector function.



## Discussion

Mouse NKT cells precursors differentiate after positive selection into three distinct phenotypic and functional subsets named NKT1, NKT2 and NKT17 (6). However, NKT cells distribution in B6 and BALB/c mice are different with a bias for NKT1 and NKT2/NKT17 subsets respectively. In this study, we aimed to determine if CD1d-ligand recognition by developing NKT cells could influence their differentiation profile and explain how subset distribution is different between mouse strains. Our analysis of NKT cell development in BALB/c CD1d1 and BALB/c CD1d2 mice show that exclusive CD1d2 expression in BALB/c mice could not be at the origin of the distribution differences between both strains. Our analysis of B6 (or B6 CD1d1CDd2<sup>-/-</sup>) and BALB/c (or BALB/c CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup>) mixed BM chimeras showed that the differentiation profile of NKT cells and their subset distribution is intrinsic to BM-derived NKT cells and is not influenced by the sole syngeneic CD1d-ligand recognition. Finally, analysis of NKT cell development in CD1d<sup>+/-</sup> mice on mixed B6xBALB/c background show that CD1d-ligand recognition could influence NKT cell distribution and function in mice strain having differential CD1d expression levels such B6 or BALB/c mouse.

TCR strength/duration regulates cell fate decision during T cell development in the thymus leading to the development of helper CD4 and cytotoxic CD8 T cells (37). TCR strength is also proposed to influence cell fate decision of functionally IL-17<sup>-</sup> and IFN- $\gamma$ -producing  $\gamma\delta$  T cells (38, 39). TCR strength is also proposed to influence NKT cell subset differentiation. Reduced TCR strength due to altered components of the signaling cascade downstream TCR in naturally mutant or genetically modified mice affected differentially NKT cell development (17, 23). In these mice NKT2 but not NKT1 cell development is altered suggesting that strong/sustained TCR signal is required for NKT2 cell development. These results fits with the findings that NKT2 and NKT1 cells were found to perceive the highest and lowest TCR signal strength in normal mice (17, 23). NKT cell development in B6 mice is biased toward NKT1 cell development while it biased toward NKT2/NKT17 cell development in BALB/c mice. Interestingly, our results show a higher TCR signal strength perceived by NKT2 rich BALB/c than NKT1 rich B6 NKT1 cells suggesting an influence of TCR signal strength in NKT cell fate decision and providing a potential link with strain NKT cells subset distribution.

Different studies showed that TCR signal perceived by NKT cells is potentiated by homotypic SLAM/SLAM interactions (40). The higher SLAM expression we observed in BALB/c NKT cells compared to B6 could explain higher TCR signal strength perceived by BALB/c NKT cells (15-17). On the other hand, another study proposed that slam family receptors (SFR) dampen TCR signal during NKT cell development and could not explain how higher SLAM expression in BALB/c NKT cells compared to B6 allow higher TCR signal strength (18, 19). Our results show also a reduced CD1d expression levels in BALB/c DP cells that could not explain the high TCR signal strength perceived by BALB/c NKT cells. One possibility could be that the CD1d isomorph CD1d2 expressed exclusively in BALB/c mice provide a differential TCR signal and most importantly influence NKT2/NKT17 differentiation in BALB/c mice. The hypothesis that CD1d2 could select NKT cells have been tested in previous studies by generating mice expressing CD1d2 on B6 background (28). The author found that CD1d2 was poorly expressed in thymocytes of these mice and was thus inefficient to select NKT cells. The author proposed that the low expression of CD1d2 is due to low mRNA transcript expression observed in different organs. This was not the case in the thymus but the authors did not develop this point. Studies on BALB/c mice showed equal amount of CD1d1 and CD1d2 transcript in BALB/c thymocytes and more importantly that CD1d2 presented different ligand than CD1d1 and thus able to potentially influence NKT cell distribution in BALB/c mice (29). To test this hypothesis, we generated CD1d1 KO mice (CD1d2 mice) and to our surprise found that CD1d2 is poorly expressed in DP thymocytes, allowing the selection of a reduced NKT cell population with an “B6 like” profile. The non-expression of CD1d2 is not a problem inherent to the Crispr-Cas9 strategy as we do not see CD1d2 expression as well after backcrossing B6 CD1d1<sup>-/-</sup> mice to BALB/c CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> mice for 5 generation (**data not shown**). Like previous studies, we found equal amount of CD1D1 and CD1D2 transcripts in WT BALB/c mice (29). We also found equal amount of CD1D1 and CD1D2 transcripts in CD1d2 mice, but also in CD1d1 mice. Importantly, we observed equal amount of CD1D2 transcripts in CD1d2 and BALB/c mice indicating that CD1d2 is likely not expressed in BALB/c mice and could not be at the origin of the differential signal strength perceived by BALB/c NKT cells or to their differential subset distribution in normal BALB/c mice. This notion is supported by the fact that NKT cells selected in CD1d2 mice perceive lower TCR signal strength compared to BALB/c NKT cells (**data not**

**shown**) and that the selected cells have an “B6 like” profile. We were not able to detect CD1d2 intracellularly in CD1d2 mice indicating a translational rather than a transcriptional problem at the origin of the absence of cell surface expression of CD1d2 in these mice. This is supported by the fact that the few selected NKT cells in CD1d2 mice upregulated CD1d2 expression compared to DP thymocytes they originate from. We hypothesize that CD1d upregulation is a consequence of positive selection as CD1d is also upregulated in selected NKT cells in normal B6 or BALB/c mice. This phenomenon is not restricted to NKT cells or related to their agonist selection, as it is reminiscent to class I expression that is undetectable in DP thymocytes and upregulated in selected CD4 or CD8 T cells.

To understand how important CD1d-antigen recognition is in dictating NKT cell fate lineage we generated B6 and BALB/c mixed chimeras and also mixed chimeras where either one of B6 or BALB/c compartments is deficient in CD1d. Our results show that NKT cell fate is dictated by factor intrinsic to the NKT cells and that allogenic CD1d-recognition is not able to revert this developmental fate. Surprisingly, we found that while B6 BM chimeras recapitulate B6 NKT cell distribution in the thymus and spleen, BALB/c BM chimeras shift in the thymus toward a NKT1 lineage predominance and a low NKT17 frequency characteristically seen in B6 mice, though keeping high frequency of NKT2 cells. Importantly, our results are consistent with a previous study showing the same non classical thymic NKT cells distribution in syngeneic BALB/c BM chimeric mice (increase NKT1 and reduced NKT17 cells) (17) . Importantly, our results in the spleen of BALB/c BM chimera show a classical BALB/c like NKT pattern with a dominance of NKT2 over NKT1 subset (41), indicating that the non-conventional NKT cell distribution is limited to the thymus. We do not know the reasons for the increased NKT1 and the reduced NKT17 frequencies in thymic BALB/c BM chimeric mice. One explanation of the absence of NKT17 cells is that they have a specific developmental embryonic window of development and that these cells do not develop in adult mice. NKT1 cells then fill the space left by NKT17 cells. This is likely not the case as NKT17 cell develop in the thymus and periphery of B6 BM chimeric mice (**KB unpublished results**). The reported different sensibility to radiation of B6 and BALB/c mice could be an alternative explanation of the NKT cell distribution profile observed in BM BALB/c chimeras (42). Regardless, future studies are needed to solve this issue.

Another study carried out a series of bone marrow transplantation experiments to study NKT cell selection and found an inverse relationship between the CD1d expression level on DP thymocytes and of thymic NKT cell frequency (43). The influence of CD1d expression levels on NKT cells differentiation and subset distribution was not reported in this study. Our own results show that B6 and BALB/c, fit with the cell numbers/CD1d-expression inverse relationship as we found that BALB/c have higher NKT cell numbers and lower CD1d expression. In addition, in the mixed B6 x BALB/c chimera, we observed a reversion in NKT cell numbers with higher NKT cell numbers in the B6 than in the BALB/c compartment (**data not shown**). Mixed chimeras using B6 + BALB/c CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> BM cells and B6 CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> + BALB/c BM cells confirmed the higher capacity of DP thymocytes from BALB/c to select NKT cells (**data not shown**) and the notion that the physiological variation in CD1d expression has an important role in controlling the development of NKT cells (43).

During T cell-APC encounter, it has been reported that T cells can acquire cell surface molecules from APC and this phenomenon is called trogocytosis (36). We observed such a phenomenon in the B6 + BALB/c CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> and the reversed mixed chimeras. In fact, in these mixed chimera B6 CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> or BALB/c CD1d1CD1d2<sup>-/-</sup> NKT cells that developed on BALB/c or B6 thymocytes express now CD1d with high levels, though lower to CD1d expressed on NKT cells developed from CD1d sufficient BM cells. We also do not know the significance of such phenomenon and if it has a physiological significance. This phenomenon was observed in a previous study by the Bendelac group where a WT (10%) + CD1d<sup>-/-</sup> (90%) -> CD1d<sup>-/-</sup> chimera was generated (44). Analysis of CD1d expression in total NKT cells shows a higher frequency of CD1d positive cells (25%) compared to DP thymocytes (10%). Because CD1d expression was not analyzed in each compartment separately in the study, it was suggested that DP expressing CD1d have a selection advantage on the non-expressing ones. Regardless, it would be interesting to assess if such trogocytosis is an NKT cell related epiphenomenon or a phenomenon related to innate cell development that could be tested in MAIT cells.

Because we found that strain CD1d-ligand recognition is not sufficient to influence NKT cell differentiation and subset composition, and that NKT cell intrinsic factors influence this process, it is reasonable to consider that any effect of CD1d-ligand recognition on NKT cell differentiation could be masked by other dominant allelic genetic background variants. To bring out a role of CD1-ligand recognition in NKT cells development we analyzed selection and differentiation on NKT cells in CD1d +/- mice expressing 50% of CD1d at the cell surface on a mixed B6 CD1d1CD1d2-/- x BALB/c background. This way, there are no interference with genetic background variant. We found that the frequency and cell numbers of NKT cells remain unchanged in these mice. Our results are in agreement with a study that compared the frequencies of NKT cells between wild-type NOD and NOD.CD1d +/- mice but did not observe a significant difference, albeit the CD1d expression level was reduced by about 50% in the latter strain. In that study, it was established a negative relation between CD1d expression level and the frequency of thymic NKT cells in different mouse strain (43). The B6 and BALB/c mice we analyzed in our study appeared to fall inside of this linear relationship and confirm that the physiological variation in CD1d expression has an important role in controlling the development of NKT cells, but reducing its level alone is not sufficient to increase the frequency of these cells. We however found that reduced CD1d levels altered NKT cell subset distribution, favoring the V $\beta$ 7 NKT2 richest and disfavoring the poorest V $\beta$ 7 NKT17 subsets. Our results are in agreement with previous studies showing that V $\beta$ 7 confer high affinity to NKT TCR and confirm the importance of V $\beta$  chain in NKT cell subset composition (45, 46). It is possible to consider that lower CD1d expression levels in BALB/c compared to B6 mice explain in part the higher NKT2 cells in these mice but it cannot explain higher NKT17 cells. Thus, physiological variation in CD1d expression levels could influence NKT cell distribution but do not account for NKT cells subset distribution in different mouse strains highlighting the influence of other genetic variant. It is interesting to notice that NKT2 cells in CD1d +/- mice still perceive the highest signal among NKT cells indicating that TCR signal strength hierarchy among NKT cell subsets is maintained. Our results reveal a parallel between TCR signal strength and functional acquisition of NKT cells in addition to the established one with subsets distribution. In fact, analysis of CD1d +/- mice show that NKT2 and NKT17 cells, that perceive a high TCR signal, are affected in their function and both produce less cytokine, while NKT1 cells, that perceive low TCR signal, are not affected in their capacity to produce IFN- $\gamma$ .

Overall, our results provide insightful information regarding the role of CD1d/TCR interaction in the differentiation of NKT cells. While it was assumed that CD1d2 contribute to the development of NKT cells, our study show clearly, through a genetic approach, that CD1d2 do not play a major role in NKT cell development and could not be accounted for to explain strain specific distribution between CD1d2 expressing and non-expressing mouse strains. Our study reveals however, that in conjunction of CD1d/TCR interaction, NKT cell intrinsic factors influence strain specific differentiation and subset distribution.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank staff at IRSL genomic and FACS facility, particularly Christelle Doliger and Sophie Duchez, and at the institute's animal facility, particularly Veronique Parietti. We are indebted to the NIH Tetramer Facility for providing CD1d-tetramers, and all members of Inserm U1160 Unit for helpful discussion. This work was supported by INSERM, idex-NKT-diff (K.B), Université Paris Diderot, Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (L.A).

## REFERENCES

1. Gapin, L., J. L. Matsuda, C. D. Surh, and M. Kronenberg. 2001. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol* 2: 971-978.
2. Lantz, O., and A. Bendelac. 1994. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med* 180: 1097-1106.
3. Alonzo, E. S., R. A. Gottschalk, J. Das, T. Egawa, R. M. Hobbs, P. P. Pandolfi, P. Pereira, K. E. Nichols, G. A. Koretzky, M. S. Jordan, and D. B. Sant'Angelo. 2010. Development of promyelocytic zinc finger and ThPOK-expressing innate gamma delta T cells is controlled by strength of TCR signaling and Id3. *J Immunol* 184: 1268-1279.
4. Kovalovsky, D., O. U. Uche, S. Eladad, R. M. Hobbs, W. Yi, E. Alonzo, K. Chua, M. Eidson, H. J. Kim, J. S. Im, P. P. Pandolfi, and D. B. Sant'Angelo. 2008. The BTB-zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions. *Nat Immunol* 9: 1055-1064.
5. Savage, A. K., M. G. Constantinides, J. Han, D. Picard, E. Martin, B. Li, O. Lantz, and A. Bendelac. 2008. The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity* 29: 391-403.
6. Lee, Y. J., K. L. Holzapfel, J. Zhu, S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2013. Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. *Nat Immunol* 14: 1146-1154.
7. Griewank, K., C. Borowski, S. Rietdijk, N. Wang, A. Julien, D. G. Wei, A. A. Mamchak, C. Terhorst, and A. Bendelac. 2007. Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development. *Immunity* 27: 751-762.
8. Benlagha, K., T. Kyin, A. Beavis, L. Teyton, and A. Bendelac. 2002. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* 296: 553-555.
9. Benlagha, K., D. G. Wei, J. Veiga, L. Teyton, and A. Bendelac. 2005. Characterization of the early stages of thymic NKT cell development. *J Exp Med* 202: 485-492.
10. Klibi, J., L. Amable, and K. Benlagha. 2020. A focus on natural killer T-cell subset characterization and developmental stages. *Immunol Cell Biol* 98: 358-368.
11. Moran, A. E., K. L. Holzapfel, Y. Xing, N. R. Cunningham, J. S. Maltzman, J. Punt, and K. A. Hogquist. 2011. T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J Exp Med* 208: 1279-1289.
12. Seiler, M. P., R. Mathew, M. K. Liszewski, C. J. Spooner, K. Barr, F. Meng, H. Singh, and A. Bendelac. 2012. Elevated and sustained expression of the transcription factors Egr1 and Egr2 controls NKT lineage differentiation in response to TCR signaling. *Nat Immunol* 13: 264-271.
13. Joseph, C., J. Klibi, L. Amable, L. Comba, A. Cascioferro, M. Delord, V. Parietti, C. Lenoir, S. Latour, B. Lucas, C. Viret, A. Toubert, and K. Benlagha. 2019. TCR density in early iNKT cell precursors regulates agonist selection and subset differentiation in mice. *Eur J Immunol* 49: 894-910.
14. Wang, H., and K. A. Hogquist. 2018. CCR7 defines a precursor for murine iNKT cells in thymus and periphery. *Elife* 7.
15. Cruz Tleugabulova, M., M. Zhao, I. Lau, M. Kuypers, C. Wirianto, J. M. Umana, Q. Lin, M. Kronenberg, and T. Mallewaey. 2019. The Protein Phosphatase Shp1 Regulates Invariant NKT Cell Effector Differentiation Independently of TCR and Slam Signaling. *J Immunol* 202: 2276-2286.
16. Dutta, M., Z. J. Kraus, J. Gomez-Rodriguez, S. H. Hwang, J. L. Cannons, J. Cheng, S. Y. Lee, D. L. Wiest, E. K. Wakeland, and P. L. Schwartzberg. 2013. A role for Ly108 in the induction of promyelocytic zinc finger transcription factor in developing thymocytes. *J Immunol* 190: 2121-2128.

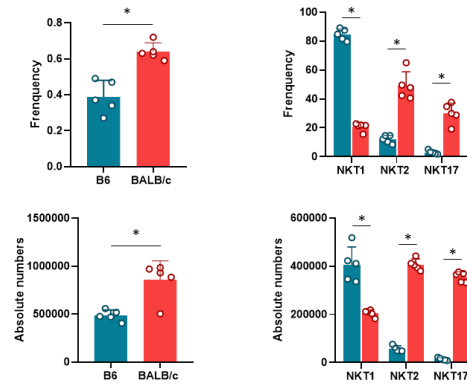
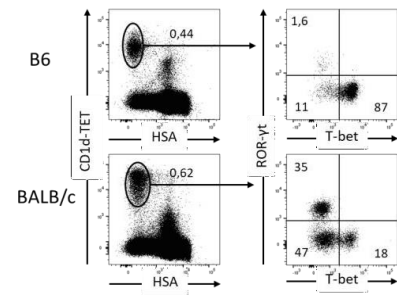


17. Tuttle, K. D., S. H. Krovi, J. Zhang, R. Bedel, L. Harmacek, L. K. Peterson, L. L. Dragone, A. Lefferts, C. Halluszczak, K. Riemondy, J. R. Hesselberth, A. Rao, B. P. O'Connor, P. Marrack, J. Scott-Browne, and L. Gapin. 2018. TCR signal strength controls thymic differentiation of iNKT cell subsets. *Nat Commun* 9: 2650.
18. Kageyama, R., J. L. Cannons, F. Zhao, I. Yusuf, C. Lao, M. Locci, P. L. Schwartzberg, and S. Crotty. 2012. The receptor Ly108 functions as a SAP adaptor-dependent on-off switch for T cell help to B cells and NKT cell development. *Immunity* 36: 986-1002.
19. Lu, Y., M. C. Zhong, J. Qian, V. Calderon, M. Cruz Tleugabulova, T. Mallevaey, and A. Veillette. 2019. SLAM receptors foster iNKT cell development by reducing TCR signal strength after positive selection. *Nat Immunol* 20: 447-457.
20. Klibi, J., and K. Benlagha. 2020. Cortical Thymocytes Along With Their Selecting Ligands Are Required for the Further Thymic Maturation of NKT Cells in Mice. *Front Immunol* 11: 815.
21. McNab, F. W., S. P. Berzins, D. G. Pellicci, K. Kyparissoudis, K. Field, M. J. Smyth, and D. I. Godfrey. 2005. The influence of CD1d in postselection NKT cell maturation and homeostasis. *J Immunol* 175: 3762-3768.
22. Wang, H., E. R. Breed, Y. J. Lee, L. J. Qian, S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2019. Myeloid cells activate iNKT cells to produce IL-4 in the thymic medulla. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 22262-22268.
23. Zhao, M., M. N. D. Svensson, K. Venken, A. Chawla, S. Liang, I. Engel, P. Mydel, J. Day, D. Elewaut, N. Bottini, and M. Kronenberg. 2018. Altered thymic differentiation and modulation of arthritis by invariant NKT cells expressing mutant ZAP70. *Nat Commun* 9: 2627.
24. Drennan, M. B., S. Govindarajan, E. Verheugen, J. M. Coquet, J. Staal, C. McGuire, T. Taghon, G. Leclercq, R. Beyaert, G. van Loo, B. N. Lambrecht, and D. Elewaut. 2016. NKT sublineage specification and survival requires the ubiquitin-modifying enzyme TNFAIP3/A20. *J Exp Med* 213: 1973-1981.
25. Bortoluzzi, S., N. Dashtsoodol, T. Engleitner, C. Drees, S. Helmraath, J. Mir, A. Toska, M. Flossdorf, R. Ollinger, M. Solovey, M. Colome-Tatche, B. Kalfaoglu, M. Ono, T. Buch, T. Ammon, R. Rad, and M. Schmidt-Supprian. 2021. Brief homogeneous TCR signals instruct common iNKT progenitors whose effector diversification is characterized by subsequent cytokine signaling. *Immunity* 54: 2497-2513 e2499.
26. Bradbury, A., K. T. Belt, T. M. Neri, C. Milstein, and F. Calabi. 1988. Mouse CD1 is distinct from and co-exists with TL in the same thymus. *EMBO J* 7: 3081-3086.
27. Park, S. H., J. H. Roark, and A. Bendelac. 1998. Tissue-specific recognition of mouse CD1 molecules. *J Immunol* 160: 3128-3134.
28. Chen, Y. H., B. Wang, T. Chun, L. Zhao, S. Cardell, S. M. Behar, M. B. Brenner, and C. R. Wang. 1999. Expression of CD1d2 on thymocytes is not sufficient for the development of NK T cells in CD1d1-deficient mice. *J Immunol* 162: 4560-4566.
29. Sundararaj, S., J. Zhang, S. H. Krovi, R. Bedel, K. D. Tuttle, N. Veerapen, G. S. Besra, Y. Khandokar, T. Praveena, J. Le Nours, J. L. Matsuda, J. Rossjohn, and L. Gapin. 2018. Differing roles of CD1d2 and CD1d1 proteins in type I natural killer T cell development and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: E1204-E1213.
30. Kang, B. H., H. J. Park, H. J. Park, J. I. Lee, S. H. Park, and K. C. Jung. 2016. PLZF(+) Innate T Cells Support the TGF-beta-Dependent Generation of Activated/Memory-Like Regulatory T Cells. *Mol Cells* 39: 468-476.
31. White, A. J., S. Baik, S. M. Parnell, A. M. Holland, F. Brombacher, W. E. Jenkinson, and G. Anderson. 2017. A type 2 cytokine axis for thymus emigration. *J Exp Med* 214: 2205-2216.
32. White, A. J., W. E. Jenkinson, J. E. Cowan, S. M. Parnell, A. Bacon, N. D. Jones, E. J. Jenkinson, and G. Anderson. 2014. An essential role for medullary thymic epithelial cells during the intrathymic development of invariant NKT cells. *J Immunol* 192: 2659-2666.
33. Cui, J., T. Shin, T. Kawano, H. Sato, E. Kondo, I. Toura, Y. Kaneko, H. Koseki, M. Kanno, and M. Taniguchi. 1997. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 278: 1623-1626.

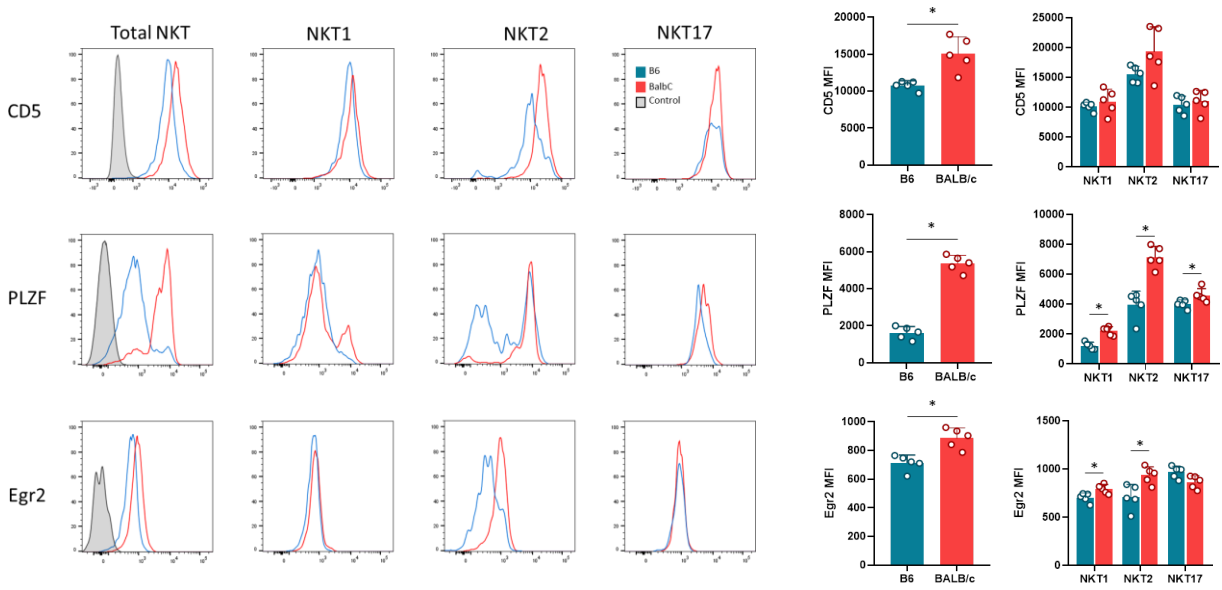
34. Mendiratta, S. K., W. D. Martin, S. Hong, A. Boesteanu, S. Joyce, and L. Van Kaer. 1997. CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity* 6: 469-477.
35. Benlagha, K., A. Weiss, A. Beavis, L. Teyton, and A. Bendelac. 2000. In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *J Exp Med* 191: 1895-1903.
36. Huang, J. F., Y. Yang, H. Sepulveda, W. Shi, I. Hwang, P. A. Peterson, M. R. Jackson, J. Sprent, and Z. Cai. 1999. TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells. *Science* 286: 952-954.
37. Shinzawa, M., E. A. Moseman, S. Gossa, Y. Mano, A. Bhattacharya, T. Guinter, A. Alag, X. Chen, M. Cam, D. B. McGavern, B. Erman, and A. Singer. 2022. Reversal of the T cell immune system reveals the molecular basis for T cell lineage fate determination in the thymus. *Nat Immunol* 23: 731-742.
38. Jensen, K. D., X. Su, S. Shin, L. Li, S. Youssef, S. Yamasaki, L. Steinman, T. Saito, R. M. Locksley, M. M. Davis, N. Baumgarth, and Y. H. Chien. 2008. Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma. *Immunity* 29: 90-100.
39. Sumaria, N., C. L. Grandjean, B. Silva-Santos, and D. J. Pennington. 2017. Strong TCRgammadelta Signaling Prohibits Thymic Development of IL-17A-Secreting gammadelta T Cells. *Cell Rep* 19: 2469-2476.
40. Wu, N., and A. Veillette. 2016. SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies. *Curr Opin Immunol* 38: 45-51.
41. Strong, B. S. I., T. J. Newkold, A. E. Lee, L. E. Turner, A. M. Alhajjat, J. W. Heusel, and A. F. Shaaban. 2016. Extrinsic allospecific signals of hematopoietic origin dictate iNKT cell lineage-fate decisions during development. *Sci Rep* 6: 28837.
42. Tsaih, S. W., M. Presa, S. Khaja, A. E. Ciecko, D. V. Serreze, and Y. G. Chen. 2015. A locus on mouse chromosome 13 inversely regulates CD1d expression and the development of invariant natural killer T-cells. *Genes Immun* 16: 221-230.
43. Wei, D. G., H. Lee, S. H. Park, L. Beaudoin, L. Teyton, A. Lehuen, and A. Bendelac. 2005. Expansion and long-range differentiation of the NKT cell lineage in mice expressing CD1d exclusively on cortical thymocytes. *J Exp Med* 202: 239-248.
44. Schumann, J., M. P. Mycko, P. Dellabona, G. Casorati, and H. R. MacDonald. 2006. Cutting edge: influence of the TCR Vbeta domain on the selection of semi-invariant NKT cells by endogenous ligands. *J Immunol* 176: 2064-2068.
45. Wei, D. G., S. A. Curran, P. B. Savage, L. Teyton, and A. Bendelac. 2006. Mechanisms imposing the Vbeta bias of Valpha14 natural killer T cells and consequences for microbial glycolipid recognition. *J Exp Med* 203: 1197-1207.

Figure 1

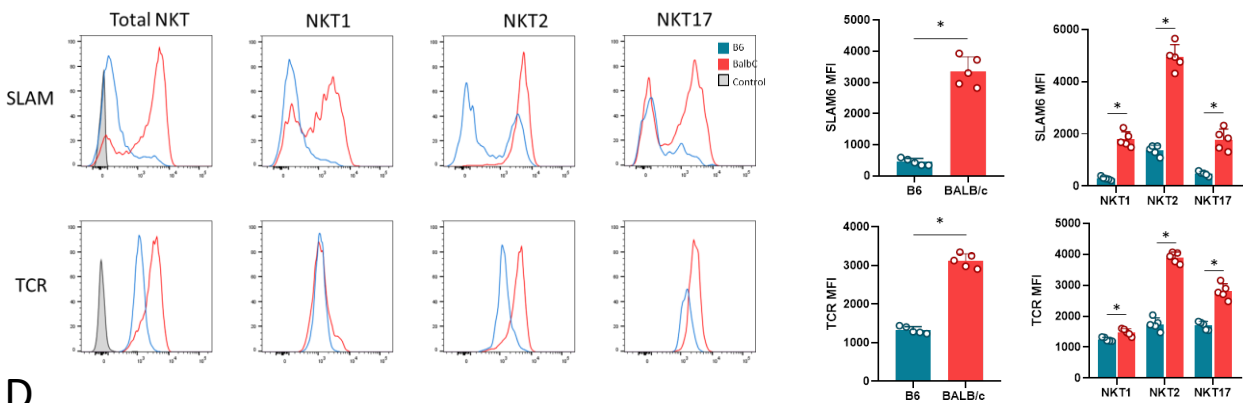
A



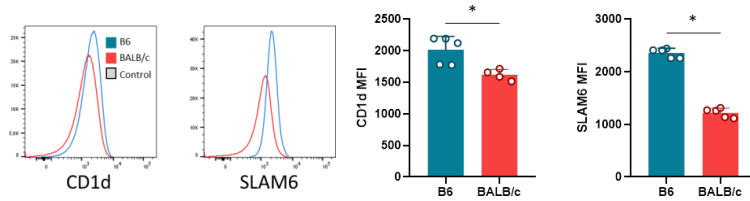
B



C



D



**Figure 1: Differential TCR signal strength in B6 and BALB/c NKT cells.**

**A.** Representative staining of NKT1 (T-bet<sup>+</sup>), NKT2 (T-bet<sup>-</sup>RORγt<sup>+</sup>), and NKT17 (RORγt<sup>+</sup>) subsets among thymic NKT cells from B6 and BALB/c mice. Values indicated on dot plots represent frequencies. Individuals/means + SEM of mean frequency and absolute numbers for total NKT cells each NKT cell subset are depicted in the right panel.

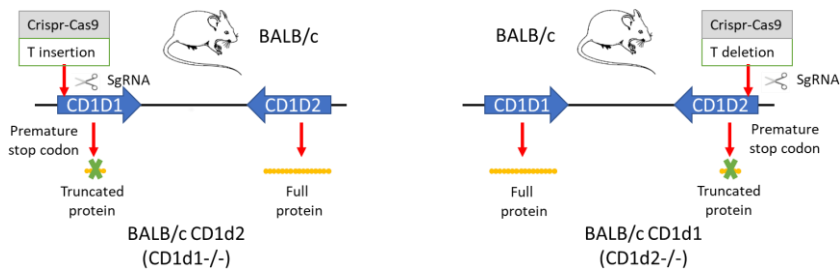
**B.** Representative staining of CD5, PLZF, and Egr2, in thymic iNKT cells and the indicated NKT cell subsets. Individuals/means + SEM of mean MFI of these markers are depicted in the right panel.

**C.** Representative staining of SLAMF6 and TCR in thymic NKT cells and the indicated NKT cell subsets in B6 and BALB/c mice. Individuals/means + SEM of mean MFI of these markers are depicted in the right panel.

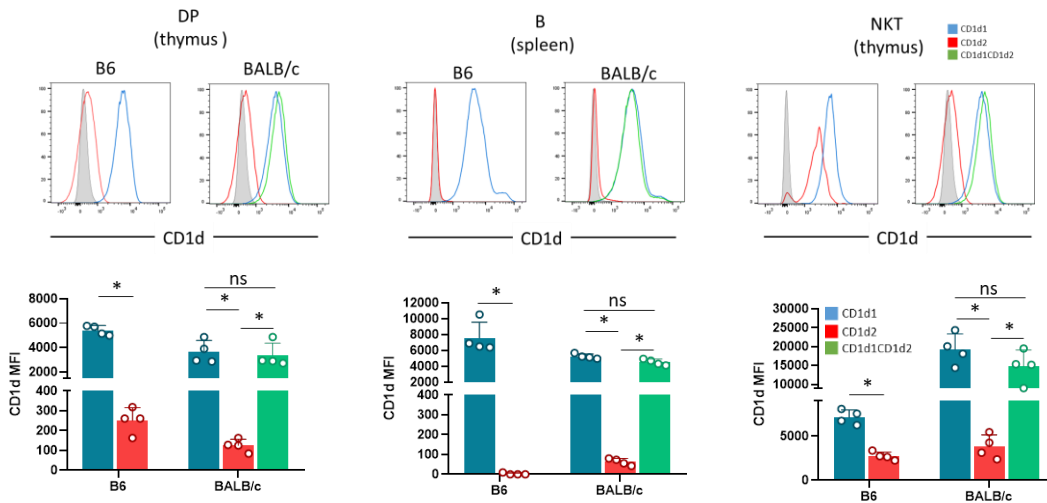
**D.** Representative staining of CD1d and SLAMF6 expression on cortical thymocytes from B6 and BALB/c mice. Data are representative of 4 to 7 experiments in which 4 to 8, 7-8-wk-old mice, were used per strain in each experiment. Significant results are indicated by an asterisk and were assessed by applying a nonparametric Mann Whitney U test. \*p < 0.05.

Figure 2

A



B



C

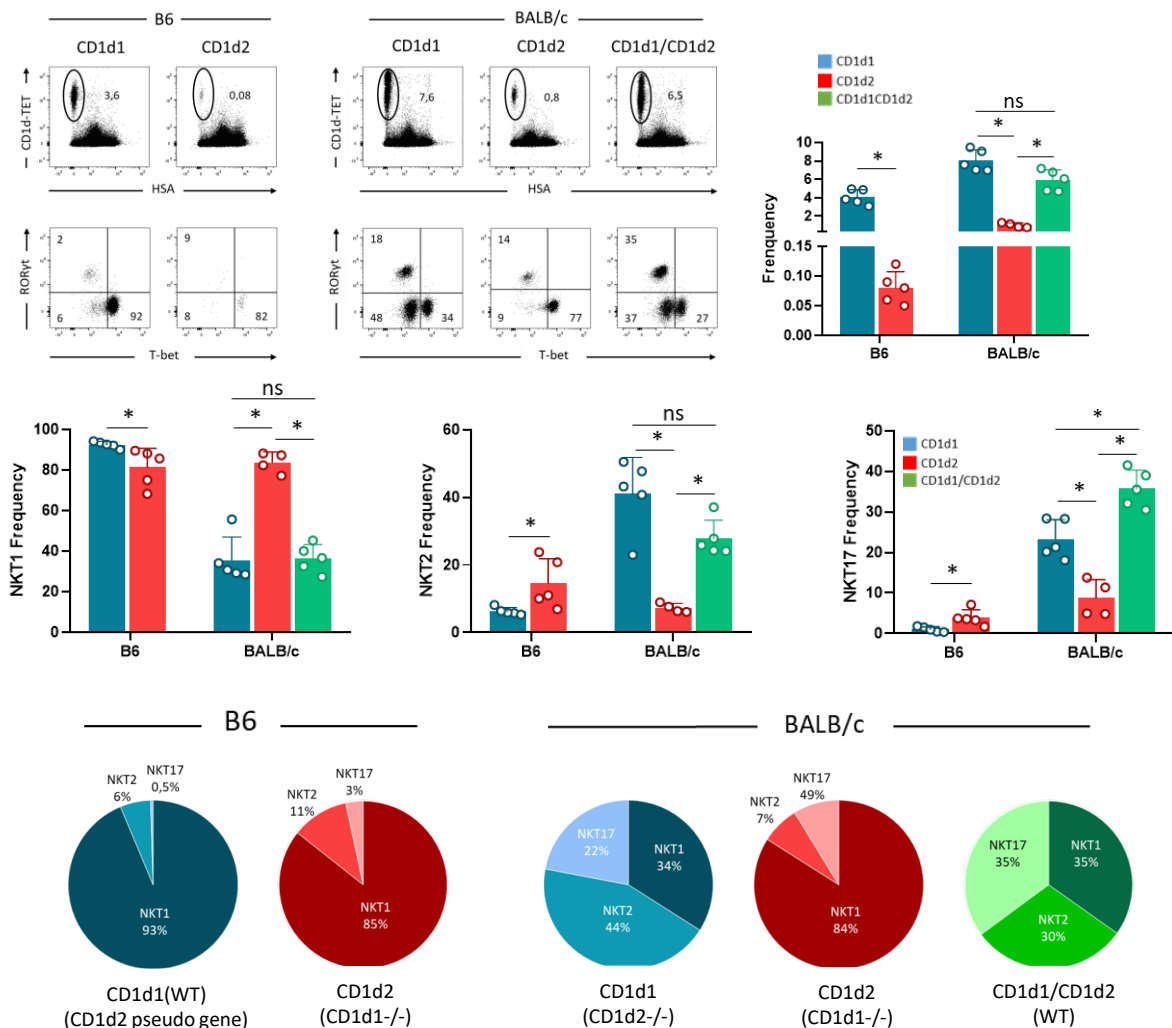
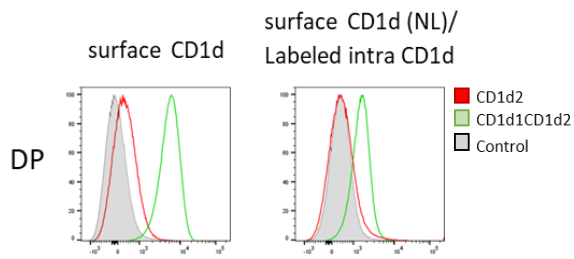
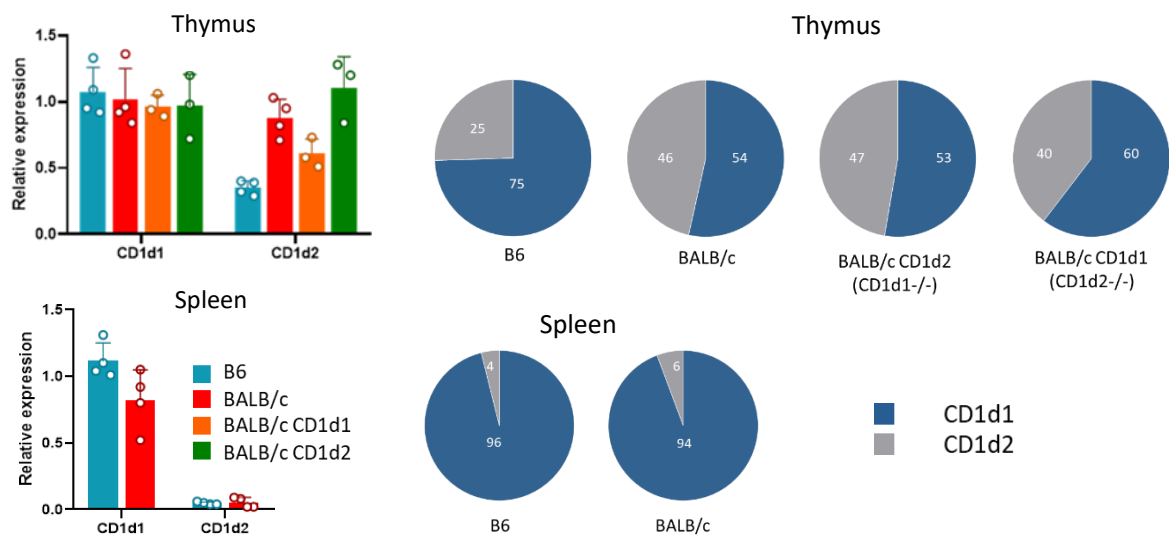


Figure 2 suite

D



E



**Figure 2: CD1d1 and CD1d2 influence on NKT cell selection and distribution.**

**A.** Schematic of CD1d1 and CD1d2 status in the indicated mice strain.

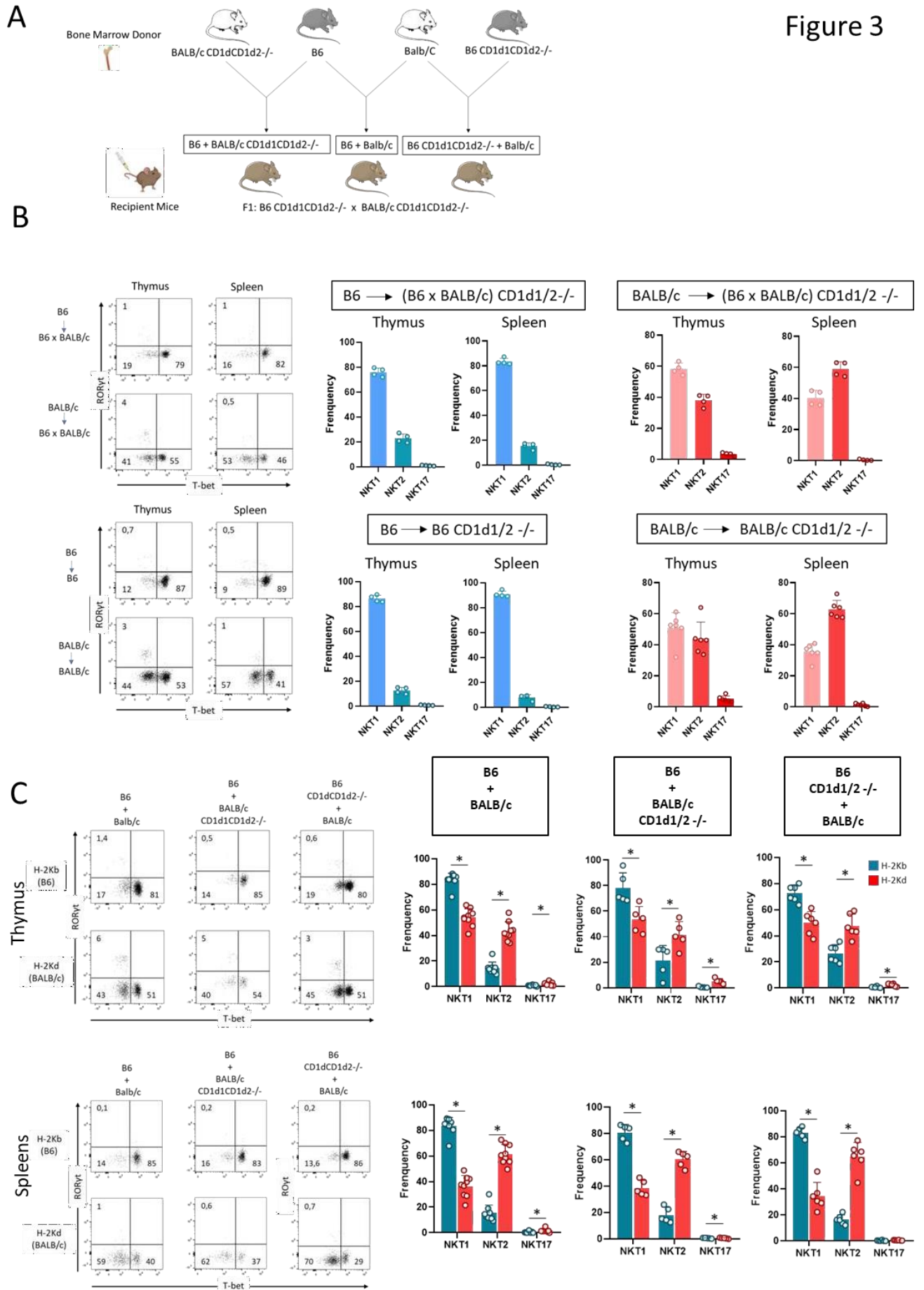
**B.** Representative staining of CD1d expression on cortical thymocytes (DP), NKT cells, and B cells from the indicated mice. Individuals/means + SEM of mean MFI of these markers are depicted in the right panel.

**C.** Representative staining of NKT1 (T-bet<sup>+</sup>), NKT2 (T-bet<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>), and NKT17 (ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>) subsets among thymic NKT cells from the indicated mice. Values indicated on dot plots represent frequencies. Individuals/means + SEM of mean frequency and absolute numbers depicted in the right panel for total NKT cells, and below for each NKT cell subset. The latter results are also shown in pie chart for clarity.

**D.** Representative surface staining (left) and intracellular staining of CD1d on cortical thymocytes (DP) subsequent to a staining with unlabeled anti-CD1d (right) from the indicated mice.

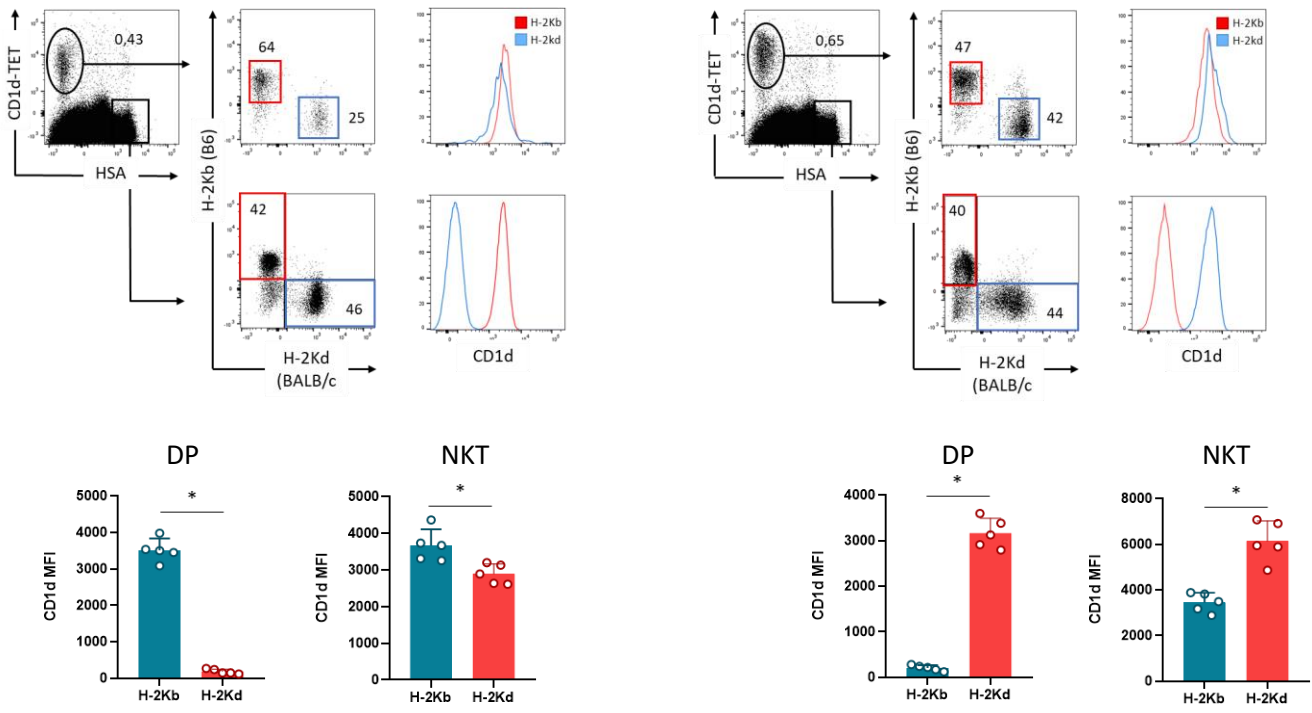
**E.** Molecular Biology. Data are representative of 3 to 4 experiments in which 4 to 8, 7-8-wk-old mice, were used per strain in each experiment. Significant results are indicated by an asterisk and were assessed by applying a nonparametric Mann Whitney U test. \*p < 0.05.

Figure 3





C



**Figure 3: CD1d-mediated ligand recognition does not influence NKT cell specification.**

**A.** Schematic of chimeric mice generation.

**B.** Representative staining of NKT1 (T-bet<sup>+</sup>), NKT2 (T-bet<sup>-</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>), and NKT17 (ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>) subsets among thymic (left) and splenic (right) NKT cells from B6 (H2K-B) and BALB/c (H2K-D) compartment of the indicated mixed bone marrow chimeras. Values indicated on dot plots represent frequencies. Individuals/means + SEM of mean frequency for each NKT cell subset are depicted below in the left and right panel for thymus and spleen respectively.

**C.** Representative staining of CD1d expression in NKT cells (upper) or mainstream T cells (lower) in B6 (H2K-B) and BALB/c (H2K-D) compartment from the indicated mixed bone marrow chimeras. Individuals/means + SEM of mean MFI of these markers are depicted below. Data are representative of 3 to 4 experiments in which 4 to 8, 7-8-wk-old mice, were used per strain in each experiment. Significant results are indicated by an asterisk and were assessed by applying a nonparametric Mann Whitney U test. \* $p < 0.05$ .

Figure 4

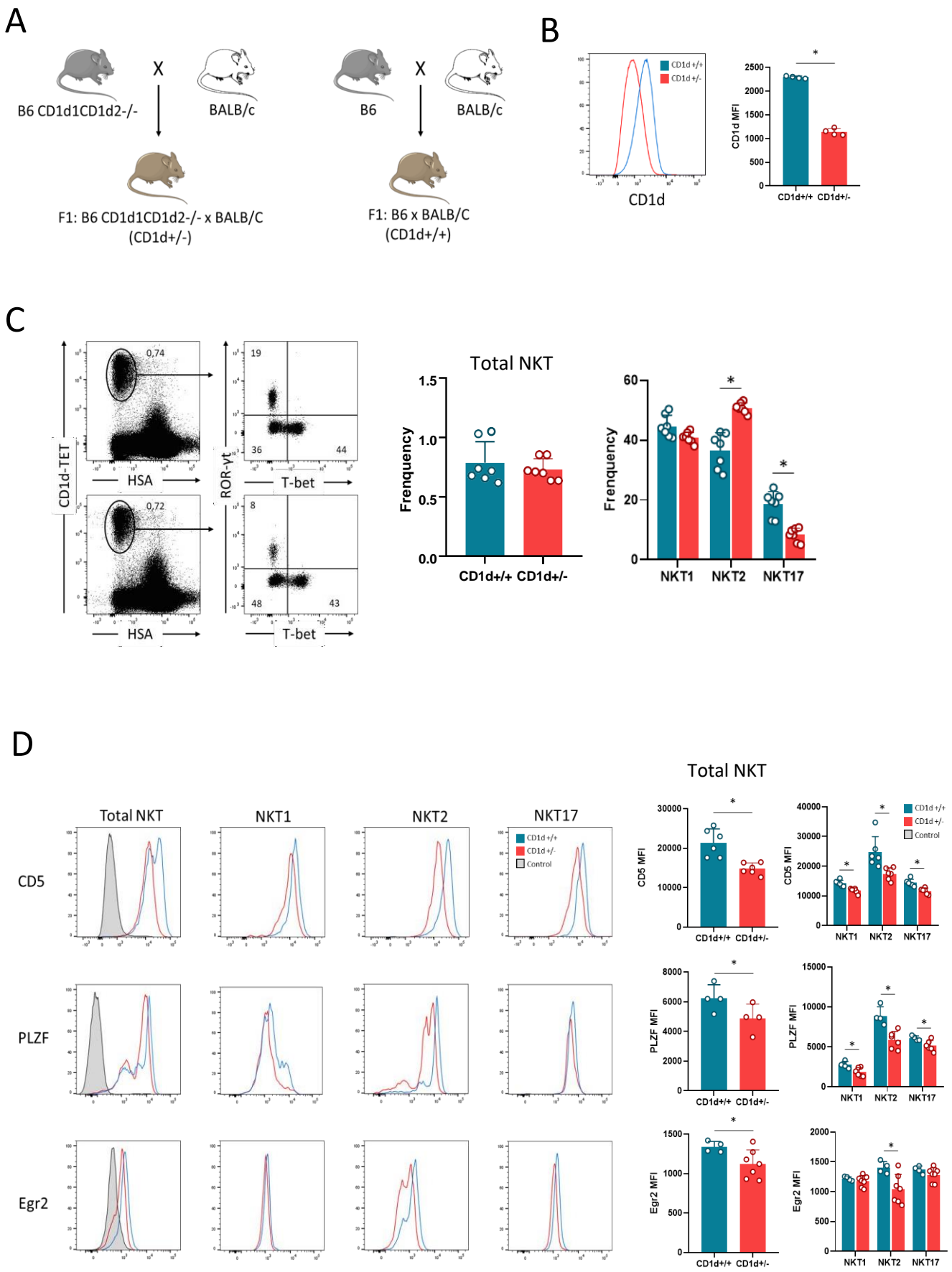
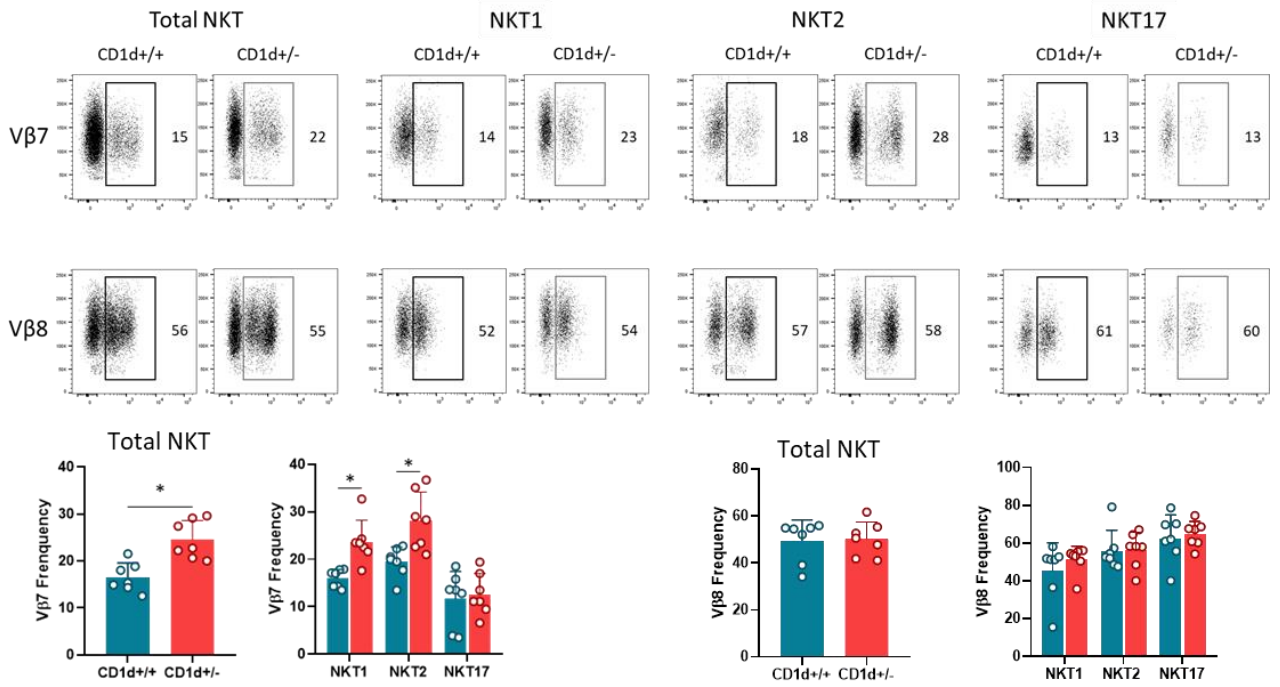
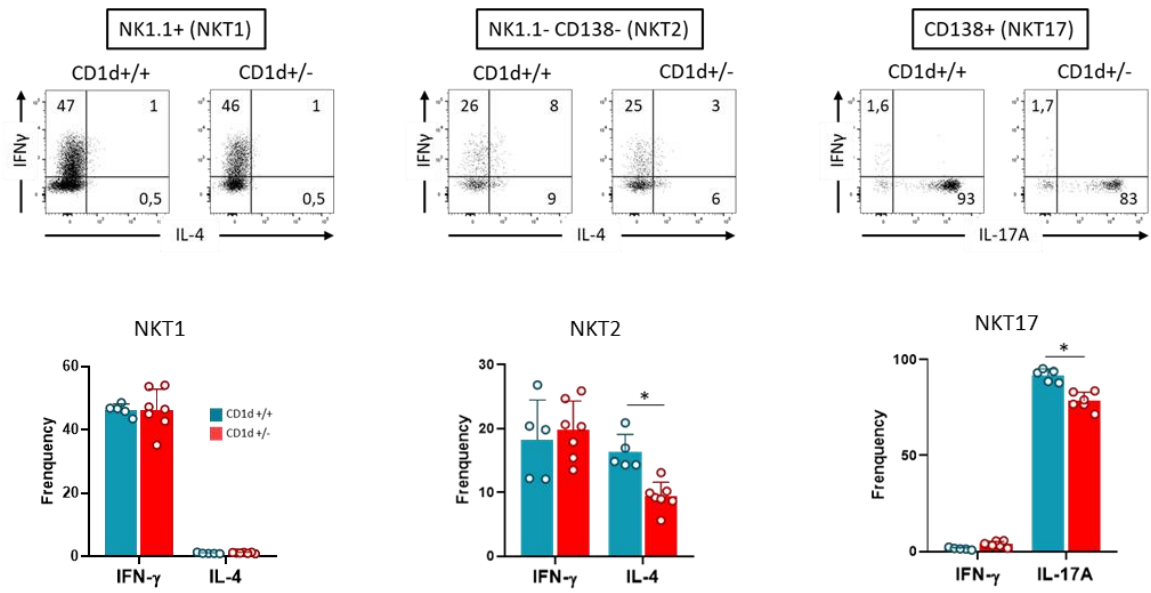


Figure 4 suite

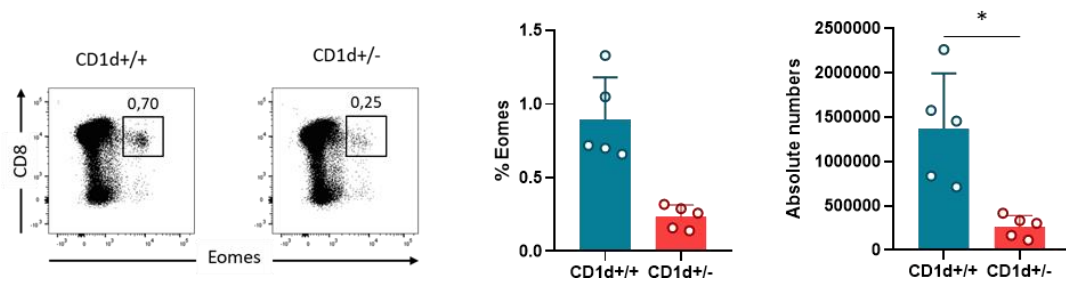
E



F



G



**Figure 4: CD1d expression levels impact NKT cell subset composition and function.**

**A.** Schematic of the crossing strategy used to obtain the indicated mice.

**B.** Representative staining of CD1d expression on DP cortical thymocytes from CD1d<sup>+/+</sup> and CD1d<sup>+/-</sup> mice. Individuals/means + SEM of mean MFI are depicted below in the right.

**C.** Representative staining of NKT1 (T-bet<sup>+</sup>), NKT2 (T-bet<sup>-</sup>ROR $\gamma$ t<sup>-</sup>), and NKT17 (ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>) subsets among thymic NKT cells from CD1d<sup>+/+</sup> and CD1d<sup>+/-</sup> mice. Values indicated on dot plots represent frequencies. Individuals/means + SEM of mean frequency and absolute numbers for total NKT cells each NKT cell subset are depicted in the right panel.

**D.** Representative staining of CD5, PLZF, and Egr2, in thymic NKT cells and the indicated NKT cell subsets. Individuals/means + SEM of mean MFI of these markers are depicted in the right panel.

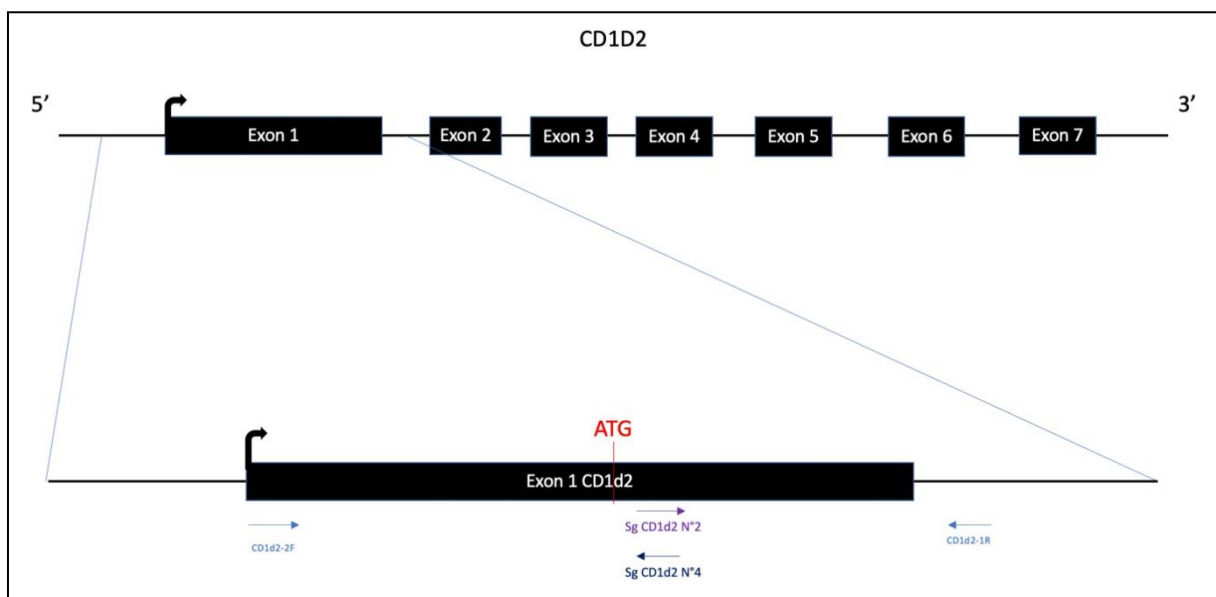
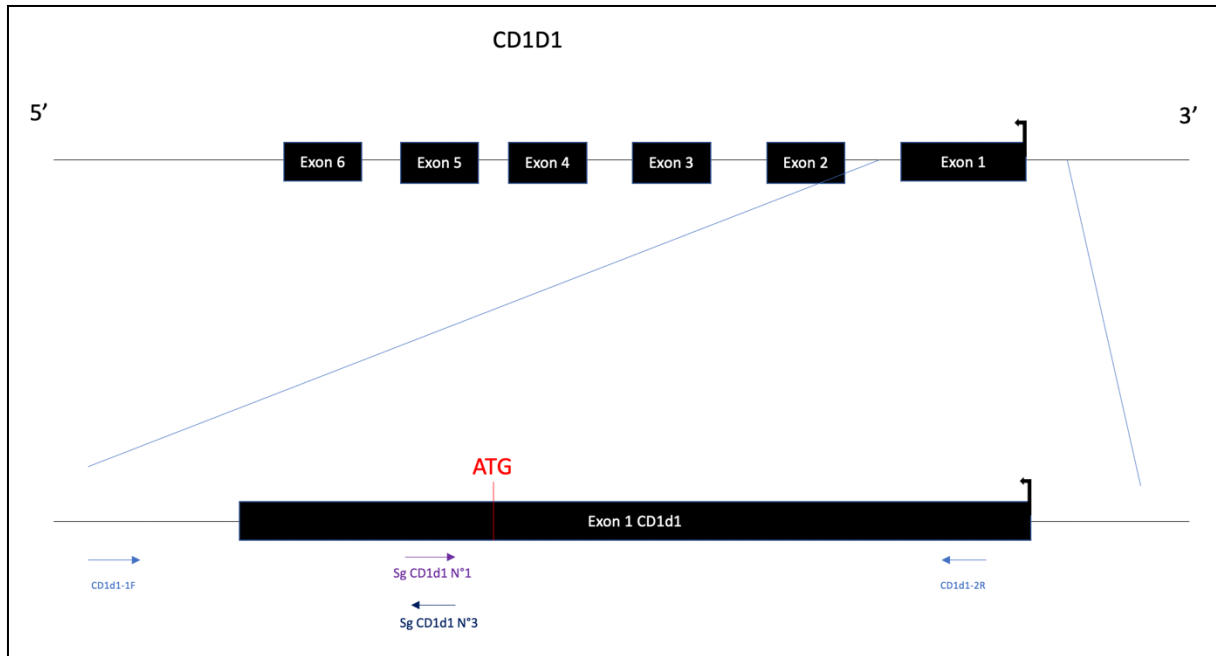
**E.** Representative staining of V $\beta$ 7 and V $\beta$ 8 expression on NKT cells and NKT cell subsets from CD1d<sup>+/+</sup> and CD1d<sup>+/-</sup> mice. Individuals/means + SEM of mean frequency for total NKT cells and each NKT cell subset are depicted below in the left and right panel for V $\beta$ 7 and V $\beta$ 8 respectively.

**F.** Representative staining of IL-4, IFN- $\gamma$ , and IL-17, among thymic NKT cell subsets from CD1d<sup>+/+</sup> and CD1d<sup>+/-</sup> mice. Values indicated on dot plots represent frequencies. Individuals/means + SEM of mean frequency for total NKT cells each NKT cell subset are depicted below in the left and right panel for V $\beta$ 7 and V $\beta$ 8 respectively.

**G.** Representative staining of Eomes among thymic CD8 positive cells from CD1d<sup>+/+</sup> and CD1d<sup>+/-</sup> mice. Values indicated on dot plots represent frequencies. Individuals/means + SEM of mean frequency and absolute numbers are depicted in the right panel.

## Supplemental Material and methods:

### Generation of knock-out transgenic mice for CD1D1 and CD1D2 genes



BALB/c mice were purchased from Janvier Labs at 3 to 4 weeks of age to produce embryos. All experiments were performed in accordance with NIH guide-lines, and the European Union recommendations (2010/63/UE). Female C57BL/6J mice were injected with pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) and human chorionic gonadotropin (hCG) with a 48-hour interval, and mated with male C57BL/6J mice. Cas9 mRNA (3 $\mu$ M) and sgRNAs (200 ng/ $\mu$ L for

each sgRNA) targeting the exon1 of each gene were mixed and electroporated (NEPA21) into the pronuclei of the one-cell embryos. For CD1D1, we used two guides SgRNA1 5'-CCCACAGCAACAGCCATGGT-3' and SgRNA3 5'-CCTACCATGGCTGTTGCTGT-3'. For CD1D2, we used two guides SgRNA2 5'-CCTACCGTGCCTGTTGCTGT-3' and SgRNA4 5'-CAGCAACAGGCACGGTAGGT-3'. After transfection, the zygotes were cultured in KSOM Medium at 37°C - 5% CO<sub>2</sub>, until blastocyst stage (around 100 cells) and transferred into pseudo-pregnant mice. This step was performed in the animal facilities of the Cochin Institute. When founders were identified, they were mated with BALB/c mice to obtain Heterozygote animals for CD1D1, we obtain founders with an insertion of a T base causing a reading frame shift and the appearance of an early stop codon (residual protein of 19aa). For CD1D2, we obtain founders with a deletion of a T base causing a reading frame shift and the appearance of an early stop codon (residual protein of 38aa). PCR and Sanger sequencing were performed for mouse genotyping. For CD1D1, we used forward primer 5'-CCCTTCTCTAGATTGTGTGC-3' and reverse primer 5' CGGGAGCAGAGTAAAGCGCA -3'. For CD1D2 we used forward primer 5'-CCCTTCTCTAGATTGTGTGC-3' and reverse primer 5' CGGGAGCAGAGTAAAGCGCA -3

### Antibodies used in the study

Antibody designation	Fluorochrome	clone	Source
Anti-HSA	BV510	M1/69	Biolegend
Anti-B220	BV510	RA3-6B2	Biolegend
Anti-CD4	BV711	53-7.3	Biolegend
Anti-CD8	BV605	53-6.7	Biolegend
Anti-ROR	BV421 BD	Q31-378	BD
Anti-Tbet	PECy7	4B10	Biolegend
Anti-CD44	BUV737	Clone IM7	BD
Anti-CD1d	PE	1B1	Invitrogen
Anti-CD1d	Pe/Dazzle 594	1B1	Biolegend
Anti-NK1.1	PECy5	PK136	Biolegend
Anti-NK1.1	BV421	PK136	BD
Anti-CD5	BV711	53-7.3	Biolegend
Anti-Ly108	PE	330-AJ	Sony
Anti-TCR $\beta$	FITC	Clone H57-597	eBioscience/Biolegend
Anti-TCR $\beta$	APC	H57-597	eBioscience
Anti-PLZF	AF647	R17-809	BD
Anti-PLZF	APC	9E12	Invitrogen
Anti- EGR2	APC	erongr2	Invitrogen
Anti-Eomes	AF647	W17001A	Biolegend
Anti-V $\beta$ 8.1/8.2	FITC	KJ16-133	BD
Anti-V $\beta$ 8.1/8.2	FITC	KJ16-133.18	Biolegend
Anti-V $\beta$ 7	FITC	TR310	BD/Biolegend
Anti-IFN- $\gamma$	FITC	XMG1.2	Biolegend
Anti-IL17A	AF647	TC11-18H10	BD



Anti-IL4	BV711	11B11	Biolegend
Anti-IL13	PECy7	eBio13A	Invitrogen
Anti-CD138	BV421	281-2	Biolegend
Anti-CD138	PECy7	281-2	Biolegend
Anti-H-2Kd	AF488	SF1-1.1	Biolegend
Anti-H-2Kb	PercP-Cy5.5	AF6-88.5	Biolegend

# Discussion et perspectives

---

L'intérêt porté aux cellules iNKT, et plus largement aux cellules T innées, connaît un nouvel essor au vu de leurs potentiels effets thérapeutiques, notamment en immunothérapie, avec la génération de cellules CAR-iNKT pour lutter contre les cancers avec des essais en phase clinique I. Cette nouvelle ère thérapeutique suscite de nombreux espoirs, là où les méthodes plus traditionnelles ne fonctionnent pas. Pour pouvoir manipuler au mieux ces cellules, la compréhension des mécanismes de leur développement est une variable essentielle.

Avec cette étude, nous avons voulu déterminer si le signal transmis lors de la reconnaissance TCR/CD1d pouvait orienter le lignage des sous populations iNKT. Trois axes seront abordés lors de cette discussion.

#### A) Comparaison du développement des cellules iNKT entre les souris B6 et BALB/c

##### 1) La force du signal TCR

Pour le premier axe de notre étude, nous avons comparé le développement des cellules iNKT entre les souris B6 et BALB/c. Notre choix s'est porté sur ces deux lignées de souris car elles possèdent des distributions différentes des cellules iNKT. La souris B6 a un biais NKT1 alors que la souris BALB/c possède un biais NKT2/NKT17. Nous avons, cette fois ci, pris notre problématique en sens opposé. Nous nous sommes demandés si un signal TCR différent, dû à la reconnaissance TCR/CD1d, pouvait être à l'origine de la distribution divergente observée entre ces deux modèles de souris. Ces souris pourraient ainsi représenter des modèles pour la compréhension des facteurs régulant la sélection et la différenciation des cellules iNKT.

Les cellules iNKT de la souris BALB/c semblent percevoir un signal TCR plus fort que celles de la souris B6. La force du signal TCR lors de la sélection positive a été proposée comme facteur orientant le lignage des sous populations iNKT, la population iNKT2 recevrait le plus fort signal, suivie de la population iNKT17 et enfin, de la population NKT1 qui recevrait le signal le plus faible. Cette thèse expliquerait les problèmes de développement des populations NKT2 et NKT17 dans des modèles de souris où le signal TCR est réduit. Nos résultats soutiendraient alors cette hypothèse car les cellules iNKT de la souris BALB/c qui semblent recevoir le plus fort signal, sont aussi celles qui promeuvent le plus le développement des populations NKT2

et NKT17. Il y aurait une corrélation entre la composition des sous populations iNKT et la force du signal TCR. Ces résultats défendraient la thèse, qu'à la sélection positive, un fort signal TCR biaiserait plus la différenciation vers la sous population iNKT2 ou iNKT17. De ce fait, ces populations auraient besoin d'un fort signal pour pouvoir se développer.

Si l'on convient que les marqueurs reflétant la force du signal TCR sont le reflet d'un signal différemment perçu lors de la sélection positive des cellules, on pourrait se demander si le fait que la population iNKT2 exprime le plus ces molécules soit dû au fait que ce sont les cellules les plus proches de la sélection positive. En effet, le groupe de Supprian, en induisant une vague synchrone de développement des cellules iNKT, a montré que les cellules iNKT1 sont celles qui mettent le plus de temps à émerger (14 à 20 jours contre 3 à 5 jours pour les cellules iNKT17). Ce sont également les cellules qui expriment le plus faiblement les marqueurs en question. On assisterait ainsi à une diminution progressive de l'expression des marqueurs reflétant la force du signal TCR lors de la sélection positive pendant le développement des cellules iNKT. La question de l'existence de la population iNKT2 est en plein débat dans le domaine NKT. Cette population est-elle une population à part entière représentant un stade terminal de maturation ou s'agit-il seulement d'un intermédiaire de développement. La question est encore ouverte, d'autant plus que pour les cellules MAIT, très proches des cellules iNKT, on n'identifie pas de cellules MAIT2. Cette hypothèse semble tout de même peu plausible car il a été montré, par exemple qu'après leur sélection positive, les cellules T conventionnelles conservent une haute expression de la molécule CD5<sup>302</sup>.

## 2) Les isoformes CD1d1 et CD1d2

Nous avons également observé que la molécule CD1d était différenciellement exprimée entre les thymocytes corticaux des souris B6 et BALB/c, ces derniers l'exprimant moins. En plus de cette différence quantitative, il y en a aussi une qualitative. Les thymocytes corticaux des souris BALB/c expriment deux isoformes de la molécule CD1d, CD1d1 et CD1d2, alors que la souris B6 n'exprime que l'isoforme CD1d1. Des études cristallographiques ont permis de déterminer que les isoformes CD1d1 et CD1d2 ne présentaient pas les mêmes antigènes dus à la conformation différente de leur site de liaison à l'antigène. L'isoforme CD1d2 semble accommoder des antigènes avec de plus courtes queues alkyles. Nous nous sommes, en

premier lieu, intéressés à la différence qualitative de l'expression de CD1d entre nos souris B6 et BALB/c. Nous avons ainsi voulu déterminer si l'expression différentielle des isoformes CD1d pouvait expliquer le signal TCR différemment perçu entre les cellules iNKT de nos deux souris et la distribution différente des sous populations NKT. Autrement dit, nous nous sommes demandés si l'isoforme CD1d2 pouvait présenter des ligands différents lors de sélection positive influençant la force du signal TCR et la distribution des sous populations iNKT. Pour ce faire nous avons développé plusieurs approches.

La première approche a été, par CRISPR-Cas9, la génération des souris BALB/c CD1d1KO (BALB/c CD1d2) et BALB/c CD1d2KO (BALB/c CD1d1) allouant l'étude de l'influence individuelle des isoformes CD1d dans le développement des cellules iNKT. Nous avons, de plus, analysé les souris B6 et B6CD1d2.

La souris B6CD1d2, plus communément appelée B6CD1dKO, a été générée à partir de cellules ES de souris 129/SV exprimant la molécule CD1d2. Cette souris a longtemps été considérée comme dépourvue de cellules iNKT, pensant que la molécule CD1d2 ne sélectionnait pas de cellules iNKT. L'isoforme CD1d2 bien que peu exprimée chez les souris B6 CD1d2 et BALB/cCD1d2 permet la sélection de cellules iNKT mais avec un rendement bien inférieur comparé à des souris WT. La faible quantité de protéine produite n'est pas corrélée avec la quantité de transcrite. Les transcrits CD1d1 et CD1d2 sont produits en quantités égales chez nos différentes souris. L'hypothèse d'une séquestration intracellulaire de la protéine a été écartée par des marquages intracellulaires. De plus en plus d'études avancent le fait qu'il n'y a pas forcément de corrélation entre la quantité de transcrite et la quantité de protéine produite<sup>303</sup>. La régulation de la traduction, déterminant la quantité de protéine produite, peut se faire à différents niveaux en allant de l'export de l'ARNm, à la mobilisation de la machinerie de traduction ou encore à la présence de séquence Kozak like. En dépit de leur faible expression, les protéines CD1d2 permettent tout de même la sélection de cellules iNKT. Les molécules CD1d1 et CD1d2 sélectionnent des répertoires de sous populations iNKT différents pour le fond BALB/c. La molécule CD1d1 sélectionne un répertoire biaisé NKT2/NKT17 ressemblant fortement au répertoire d'une souris BALB/c WT exprimant les deux isoformes, alors que la molécule CD1d2 sélectionne un répertoire biaisé NKT1 ressemblant au répertoire d'une souris B6. Ceci laisse présager que la molécule CD1d2 doit être également faiblement exprimée chez les souris BALB/c WT et ne permet la sélection que de peu de cellules iNKT puisque la

population NKT1, majoritaire chez la souris BALB/c CD1d2, est minoritaire chez la souris BALB/c WT.

Il est intéressant de noter que la molécule CD1d2 exprimée sur un fond B6 ou BALB/c sélectionne un répertoire très semblable avec un biais pour la population iNKT1. Cette ressemblance est-elle induite par une faible expression de CD1d2 ? La faible expression de CD1d2 lors de la sélection positive pourrait favoriser le développement de la sous population iNKT1 nécessitant, selon certaines théories, le plus faible signal TCR. Le groupe de Gapin, a également analysé la contribution individuelle des isoformes CD1d1 et CD1d2 dans le développement des cellules iNKT sur fond B6. Tout comme nous, la sélection avec la molécule CD1d2 serait moins efficace, certainement du fait de sa faible expression et sélectionnerait un répertoire biaisé NKT1. De plus, toujours selon ce même groupe, les cellules sélectionnées par CD1d2 seraient plus autoréactives et exprimeraient plus la chaîne  $V\beta 8$  du TCR. Ainsi, la faible expression de CD1d2 engendrait la sélection de TCR de haute affinité qui, chez les souris WT, auraient été sélectionnées négativement. Relevons tout de même que les répertoires sélectionnés par les molécules CD1d1 et CD1d2 sont légèrement différents pour les souris de fond B6. La molécule CD1d2 sélectionne un peu plus de NKT2 et NKT17. Est-ce qu'une expression optimale de la molécule CD1d2 appuierait ce phénotype et permettrait un plus fort développement des sous populations iNKT2 et iNKT17 ? Une des étapes incontournables dans la suite de cette étude serait la modulation du taux d'expression de la molécule CD1d2 pour atteindre des valeurs avoisinantes celle de la molécule CD1d1 via la génération de souris transgéniques.

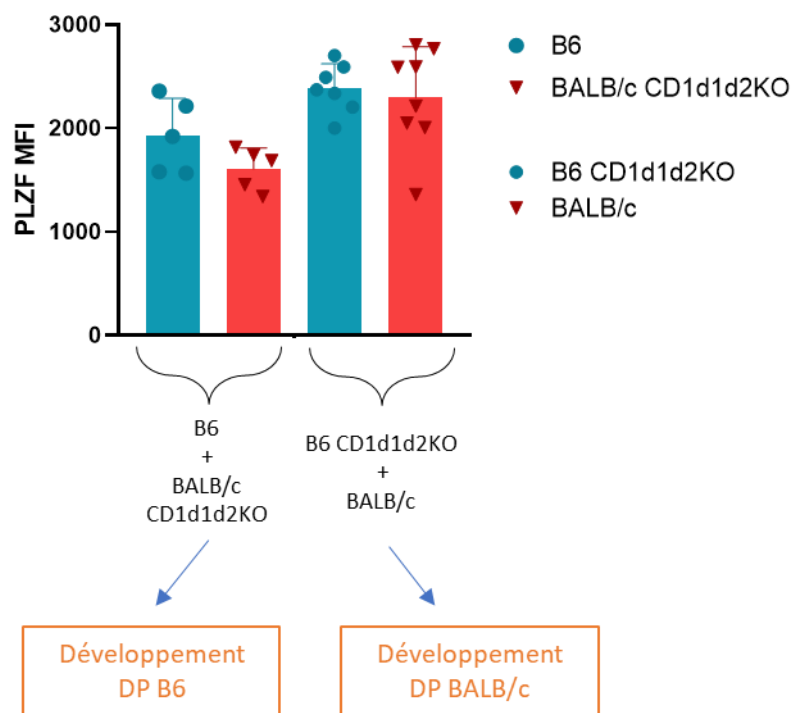
Pour la molécule CD1d1, le répertoire sélectionné serait dépendant du fond B6 ou BALB/c. Le fond B6 biaiserait le développement vers la sous population NKT1, alors que le fond BALB/c vers la sous population NKT2. Nos résultats laissent présumer que la molécule CD1d2 ne participerait pas significativement à la sélection des cellules iNKT chez les souris BALB/c. Nous pouvons ainsi conclure, dans cette sous partie, que la différence d'expression d'isoforme CD1d entre les souris B6 et BALB/c ne semble pas être à l'origine de la répartition différente des cellules iNKT mais aussi de la force du signal TCR différemment perçu

### 3) Les souris chimères de moelle

Après avoir éliminé l'hypothèse que la molécule CD1d2 ne participait pas de manière significative à la sélection des cellules iNKT chez les souris BALB/c, nous nous sommes interrogés, dans une deuxième approche, sur le fait que les molécules CD1d1 des souris B6 et BALB/c pouvaient présenter différents antigènes expliquant les différences constatées entre ces souris. Plus largement, nous cherchions à comprendre si la reconnaissance TCR/CD1d dans un fond B6 ou BALB/c pouvait influencer la différenciation des sous populations iNKT. Pour ce faire, nous avons imaginé un système de souris chimère de moelle où nous avons forcé le développement des cellules iNKT dérivant d'une moelle CD1d1d2KO à se développer sur une moelle CD1d compétente de l'autre fond. Par exemple, nous avons forcé le développement de cellules iNKT dérivant d'une moelle B6CD1d1d2Ko à se développer sur les thymocytes corticaux dérivant d'une moelle BALB/c. Avant cela, nous avons généré des chimères mixtes de moelle B6 + BALB/c pour déterminer si des facteurs intrinsèques ou extrinsèques aux cellules pouvaient contrôler leurs différenciations. Nous avons constaté que la distribution des cellules iNKT dérivant des moelles B6 ou BALB/c ressemblait à la distribution constatée chez les souris B6 et BALB/c classiques. La distribution des cellules NKT serait ainsi intrinsèquement déterminée. Nous ne pouvons, cependant, pas exclure que des facteurs extrinsèques comme les cellules hématopoïétiques ou encore les cellules stromales puissent contribuer également à la différenciation et à la distribution de sous-populations iNKT entre les souches B6 et BALB/c, car la conception de nos expériences n'a pas spécifiquement testé cette question. Nous souhaitons, dans le futur, générer des chimères simples de moelle B6 ou BALB/c pour appréhender l'impact de l'environnement stromales sur le développement des cellules iNKT.

Forcer les cellules iNKT dérivant de la moelle BALB/c CD1d1d2KO à se développer sur une cellule double positive B6 n'influence pas la distribution de sous populations iNKT, le profil biaisé NKT2 étant conservé. On arrive au même résultat avec la chimère inverse. Il semblerait que la reconnaissance TCR/CD1d ne soit pas suffisante pour orienter le lignage des sous populations iNKT. Avec ces chimères, nous avons donné un signal de sélection « de type B6 » à une future cellule iNKT BALB/c, ce qui n'a pas suffi à orienter leur lignage. Ceci peut vouloir dire que la force du signal TCR ne permet pas d'orienter le lignage des sous populations iNKT ou qu'un même signal de sélection est perçu différemment entre nos cellules iNKT B6 et

BALB/c. Pour arriver à différencier ces deux hypothèses, nous voulons, par la suite, examiner le signal TCR dans nos chimères mixtes. Nous avons quelques résultats préliminaires via l'analyse des marqueurs CD5 et PLZF chez ces souris représentés sur les figures n°19 et 20. Pour les cellules iNKT d'une chimère donnée, quel que soit la moelle dont les cellules dérivent, il y a une expression de PLZF équivalente comme si les cellules avaient perçu le signal avec la même force. En outre, on note que les cellules iNKT se développant sur les cellules DP BALB/c ont une expression de PLZF plus forte que celle se développant sur les DP B6. Ainsi, au sein d'une même souris, les cellules iNKT semblent percevoir le signal TCR avec une force identique. Mais lorsque l'on compare les différents types de chimères entre elles, il semblerait que les cellules DP BALB/c induisent un signal plus important. En définitif, les cellules DP B6 et BALB/c semblent induire différentes forces de signaux TCR ce qui ne semblent pas influencer l'orientation du lignage des sous populations iNKT.

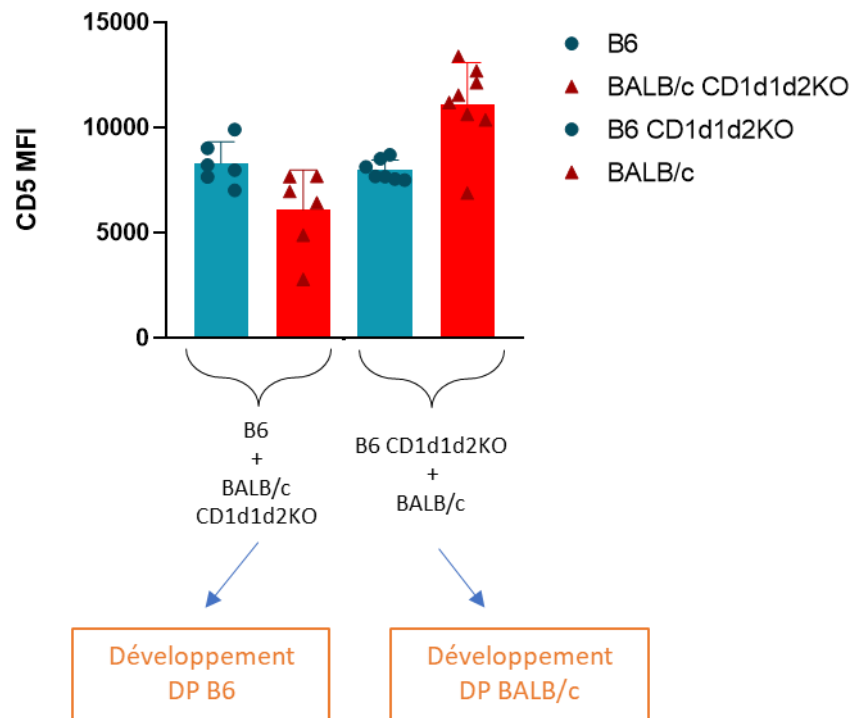


**Figure n° 19** : Expression de PLZF dans les chimères mixtes de moelle

Pour l'expression de CD5, les cellules iNKT qui se sont développées sur les DP B6 (à savoir les cellules iNKT B6 et les cellules iNKT BALB/c CD1d1d2KO) ont une expression équivalente de ce marqueur. En revanche, pour les cellules iNKT qui se sont développées sur les DP BALB/c (à savoir les cellules iNKT B6 CD1d1d2KO et les cellules iNKT BALB/c), on note une expression

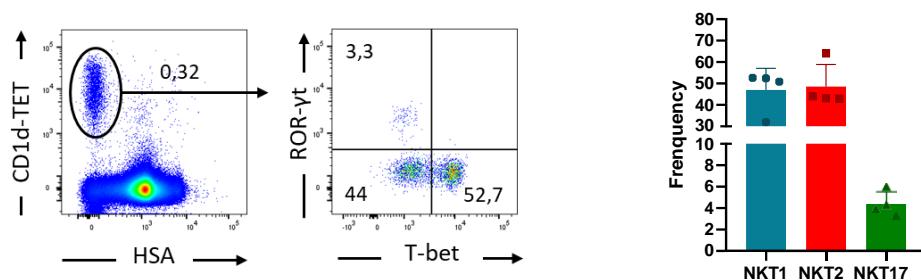


plus forte du marqueur CD5 pour les cellules iNKT BALB/c. Des analyses complémentaires seront nécessaires pour en tirer une conclusion.



**Figure n°20** : Expression de CD5 dans les chimères mixtes de moelle

Dans nos chimères, il y a une petite altération de la distribution des cellules iNKT, notamment pour les cellules dérivant des moelles BALB/c, avec une faible proportion de cellules iNKT17. Il semblerait que notre système soit inefficace pour permettre la différenciation des cellules iNKT17 puisqu'on constate cette même altération de distribution lorsque l'on injecte une moelle BALB/c chez une souris récipiente BALB/c CD1d1d2KO avec une faible proportion de cellules iNKT17 comme nous pouvons l'observer dans la figure n°21. Ces résultats sont conformes à une récente étude du laboratoire de Laurent Gapin qui a généré le même genre de souris chimères développant une faible proportion de cellules iNKT17<sup>241</sup>. Le profil BALB/c de la distribution des sous populations iNKT chez des souris chimères de moelle est donc à différencier d'une distribution classique BALB/c. Ainsi, nous définissons le nouveau profil BALB/c avec peu de cellules iNKT17 et environ 50% de cellules iNKT1 et 50% de cellules iNKT2.



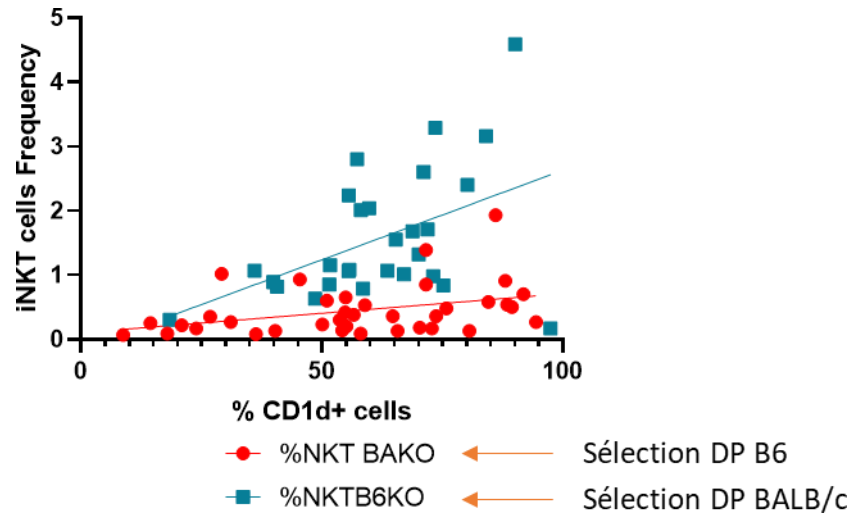
**Figure n° 21 :** Profil des chimères contrôles BALB/c ----> BALB/c CD1d1d2KO

Une étude a également étudié le développement des cellules iNKT dans des chimères mixtes avec une méthodologie différente. Les cellules de foie fœtales d'une souris BALB/c ont été prélevées et réinjectées à des embryons de souris B6 et inversement. Les cellules injectées représentent au maximum 3% des cellules totales. Pour les cellules iNKT B6, dérivant des cellules injectées ou déjà présentes dans l'embryon, une même distribution des sous populations iNKT est observée avec un profil B6 de distribution. A l'inverse, pour les cellules iNKT BALB/c dérivant des cellules déjà présentes dans l'embryon, on constate une fréquence égale des cellules iNKT1 et iNKT2, et très peu de cellules iNKT17. Pour les cellules iNKT BALB/c dérivant des cellules injectées, les cellules iNKT1 dominent et font pencher en faveur d'un profil B6 de distribution. Le papier conclut à une asymétrie de développement. Le développement des cellules iNKT B6 serait intrinsèquement déterminé et celui des cellules iNKT BALB/c extrinsèquement déterminé. Ces résultats semblent être en contradiction avec les nôtres mais sont à remettre en perspective avec le profil BALB/c de distribution des sous populations iNKT des chimères, et au fait que nous avons utilisé un fond mixte comme souris récipientes B6\*BALB/c.

Nous ne pouvons déterminer si les molécules CD1d1 des souris B6 et BALB/c présentent des ligands différents aux cellules iNKT mais si tels étaient le cas, il semblerait que cela n'influence pas le lignage des sous populations iNKT. Ainsi la seule reconnaissance spécifique TCR/CD1d ne semble pas influencer la distribution des cellules iNKT.

En revanche, cette interaction a une influence sur la sélection des cellules iNKT. Une étude a montré une corrélation négative entre l'expression de CD1d sur les DP et la fréquence des cellules iNKT. Ainsi, comme nous pouvons le voir dans la figure n°22, nos résultats semblent

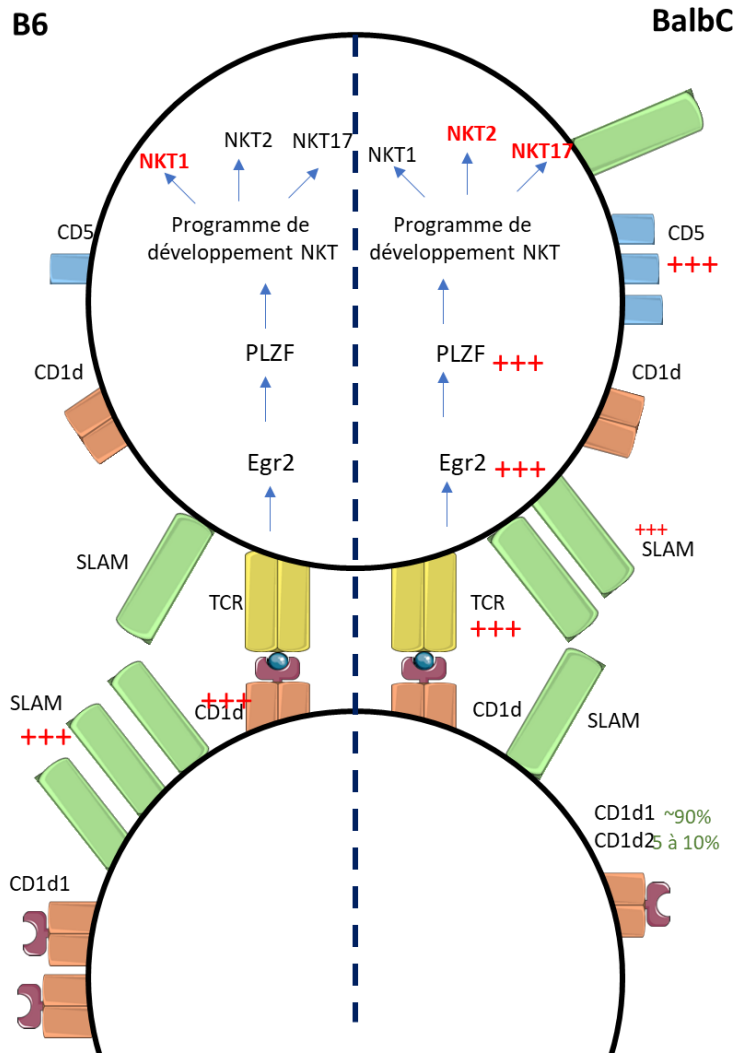
coïncider avec cette hypothèse. En effet, les thymocytes corticaux de la souris BALB/C CD1d+ sélectionnent plus de cellules iNKT dérivant de la moelle de B6CD1d1d2KO que les thymocytes corticaux B6 pour les cellules iNKT BALB/c CD1d1d2KO.



**Figure n° 22** : Corrélation entre la fréquence des cellules iNKT et la proportion des cellules exprimant la molécule CD1d

#### 4) Les molécules SLAM et CD1d

Le rôle exact de la molécule SLAM dans le développement des cellules iNKT n'est pas encore clairement défini. Une étude propose que cette molécule permettrait de potentialiser le signal TCR. Ainsi, la plus forte expression de SLAM sur les cellules iNKT de la souris BALB/c pourrait expliquer le plus fort signal TCR perçu. Une étude plus récente a proposé, à l'opposé, que la molécule SLAM agirait comme un régulateur négatif du signal TCR. Ceci ne pourrait, cependant, pas expliquer la différence observée pour le signal TCR. En outre, pour les thymocytes corticaux, à l'inverse des cellules iNKT, la molécule SLAM est plus fortement exprimée chez les souris B6. Les ratios sont inversés. Il est également intéressant de noter que la molécule TCR est plus exprimée sur les cellules iNKT de la souris BALB/c. Les partenaires d'interactions ne sont pas exprimés de la même manière. La molécule CD1d qui est faiblement exprimée sur les thymocytes corticaux des souris BALB/c interagit avec les TCR fortement exprimés des cellules iNKT BALB/c comme exemplifié sur la figure n°23 ci-dessous. Il pourrait alors y avoir des effets compensatoires.



**Figure n° 23** : Schéma récapitulatif des différences observées entre les cellules iNKT B6 (à gauche) et les cellules iNKT BALB/c (à droite)

## B) Influence de la demie dose de CD1d dans le développement des cellules iNKT

Après avoir déterminé que la différence qualitative de l'expression de CD1d ne semblait pas être à l'origine des différences observées dans le développement des cellules iNKT entre les souris B6 et BALB/c, nous nous sommes intéressés à la différence quantitative. Nous avons, en effet, observé que les thymocytes corticaux des souris B6, permettant la sélection des cellules iNKT, exprimaient plus fortement la molécule CD1d. Pour nous affranchir de la possible implication de facteurs génétiques, nous avons étudié l'influence des niveaux

d'expression de la molécule CD1d dans le développement des cellules iNKT sur un fond mixte B6\*BALB/C. Nous avons généré des souris exprimant une demi dose de CD1d. L'expression d'une demi dose de CD1d engendre un signal TCR diminué. Ces souris étaient également l'occasion, pour nous, d'avoir un modèle où nous induisons un signal TCR réduit sans toucher à la cascade de transduction du TCR. Les modèles de souris ayant un signal réduit sont une des bases pour la théorie de la force du signal TCR orientant le lignage des sous populations iNKT.

La demi dose de CD1d ne semble pas affecter la sélection mais la différenciation des sous populations iNKT. On note une augmentation de la sous population iNKT2 et une diminution de la population iNKT17. Selon le scénario de la force du signal orientant le lignage, nous aurions dû avoir une diminution des populations iNKT2 et iNKT17.

Nous avons relié l'altération de la distribution des sous populations iNKT à une affinité différente des chaînes V $\beta$  du TCR pour le complexe de sélection. Des études ont révélé que la chaîne V $\beta$  du TCR pouvait moduler l'affinité du TCR pour son ligand. La chaîne V $\beta$ 7 est celle qui est la plus enrichie en comparaison du répertoire et pré et post sélection, pour cette raison on lui accorde la plus forte affinité. La population iNKT2 exprime le plus la chaîne V $\beta$ 7 et la population iNKT17 celle qui l'exprime le moins. Ainsi la population iNKT2 posséderait un avantage sélectif et la population iNKT17 un désavantage. La différence quantitative de l'expression de CD1d ne semblait pas être à l'origine des différences observées dans le développement des cellules iNKT entre les souris B6 et BALB/c.

### C) La force du signal TCR peut-elle orienter le lignage des sous populations iNKT ?

Un des principaux arguments qui ne plaide pas en faveur de cette théorie, est le fait qu'on ne distingue pas de différence de signal TCR pour les cellules NK0, population la plus proche de la sélection positive. Plusieurs explications sont possibles. La première est qu'il pourrait y avoir de subtiles différences qu'on ne puisse détecter et que ces différences s'affirmeraient par la suite lors de la maturation des cellules. La deuxième possibilité est que la différence de signal est plus qualitative que quantitative. Les cellules percevraient le signal de sélection avec une force équivalente mais pourraient potentiellement distinguer différents types de signaux.

Et enfin, la dernière possibilité est qu'il n'y ait tout simplement pas de différence de signal pour les cellules NK1.6 et qu'au cours de leur développement les sous populations iNKT acquièrent ces différences. Il y aurait alors une totale déconnexion entre le fort signal homogène résultant de la sélection positive des cellules, leur permettant de rentrer dans le programme de développement NKT, et un second signal médié ou non par le TCR orientant le lignage. Il se pourrait ainsi que les marqueurs reflétant la force du signal TCR différemment exprimés entre les cellules iNKT des souris B6 et BALB/c ne soient pas le résultat d'un signal de sélection différemment perçu. De plus, récemment a émergé dans la littérature, l'idée que cela ne serait pas le signal TCR qui orienterait le lignage des sous populations mais qu'il serait façonné par l'environnement cytokinique. Il pourrait alors être intéressant de comparer le microenvironnement cytokinique entre B6 et BALB/c. Se pourrait-il qu'il ait moins d'IL-15 par exemple ? Nous avons vu dans l'introduction que l'IL-15 jouait un rôle capital dans le développement de la sous population iNKT1.

Une des questions fondamentales de cette étude est de savoir si les différentes forces du signal TCR observées dans les stades de développement matures des cellules reflètent les signaux lors de la sélection positive.

#### D) Influence de la force du signal TCR dans le développement des cellules dérivant du thymus

Le thymus permet le développement et la sélection de plusieurs types de cellules immunitaires T. Dans cette dernière partie de la discussion, nous verrons brièvement l'implication de la force du signal dans le développement de ces différents types de cellules.

##### 1) Les lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels

En plus de son rôle dans la sélection positive et négative des lymphocytes T conventionnelles permettant le développement d'un large éventail de cellules avec une tolérance pour le soi, il a longtemps été supposé que la force du signal TCR pouvait orienter le lignage vers des populations aux fonctions auxiliaires ou cytotoxiques. Il est postulé que le signal médié par le

co-récepteur CD8 est faible et favoriserait le développement de cellules cytotoxiques tandis que le co-récepteur CD4 médie un signal fort et favoriserait le devenir des cellules T auxiliaires<sup>304</sup>. Le groupe Al Singer a publié un article dans lequel il utilisait un modèle de souris dites flipflop où la séquence codante pour le gène CD4 a été insérée à la place de la séquence codante pour le gène CD8 et inversement. Le loci pour le gène CD8 produira ainsi le corécepteur CD4. Ce système a permis de générer des cellules CD8 auxiliaires et de CD4 cytotoxiques. Ce résultat invalide le postulat de la force du signal TCR dans l'orientation des lignées cytotoxiques ou auxiliaires. Le lignage serait biaisé par des éléments régulateurs dans les locis des gènes influant sur la durée de la signalisation TCR, engendrant de longue interaction pour les éléments régulateurs de CD4 et potentiellement un fort signal TCR, et de courte interaction pour CD8 et un faible signal TCR<sup>305</sup>.

## 2) Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Le scénario selon lequel la force du signal TCR pouvait guider l'orientation du lignage des sous populations a également été étudié pour les lymphocytes T  $\gamma\delta$ . Plusieurs études ont suggéré qu'un faible signal TCR ou l'absence de signal, orienteraient le lignage vers la population  $\gamma\delta 17$ <sup>306</sup>. Dans des expériences de cultures d'organes thymiques foetales (FTOC en anglais), le développement des cellules  $\gamma\delta 17$  est inhibé par de forts signaux TCR induits par une stimulation anti-TCR $\delta$  ou anti-CD3 $\epsilon$ <sup>307</sup>. De plus, il semblerait que certaines cellules  $\gamma\delta 17$  soit pré-programmées pour sécréter de l'IL-17 avant même le réarrangement de leur TCR, suggérant que leur développement est intrinsèque et indépendant du TCR<sup>308,309</sup>. Néanmoins, différentes études utilisant des modèles murins où la signalisation TCR est altérée, remettent en question l'hypothèse selon laquelle la force du signal TCR pourrait orienter la différenciation  $\gamma\delta 1 / \gamma\delta 17$ . Les souris double haploinsuffisance pour CD3 $\delta$  et CD3 $\gamma$  présentant une signalisation TCR diminuée, ont une différenciation altérée des cellules thymiques V $\gamma 6$  +  $\gamma\delta T 17$  ainsi que des cellules  $\gamma\delta T 1$  mais pas des cellules V $\gamma 4$  +  $\gamma\delta T 17$ <sup>310</sup>. Ceci semble indiquer que les différents sous-ensembles  $\gamma\delta T 17$  nécessitent une force de signal TCR distincte pour leur développement. De plus, l'étude de souris Zap70 mutantes, ayant également des signaux TCR diminués renforce cette remise en question puisque ces souris présentent une quasi absence des cellules V $\gamma 6$  +

$\gamma\delta$ T17 mais un développement normal des cellules  $\gamma\delta$ T1<sup>311</sup>. Tout comme pour les cellules iNKT, la question reste ouverte.

### 3) Les lymphocytes MAIT

La question n'a pas encore été véritablement soulevée pour les cellules MAIT. Il semblerait tout de même que la population MAIT17 reçoit un signal TCR plus important que la population MAIT1, à l'image des cellules iNKT17 comparées aux cellules iNKT1<sup>312</sup>. Il pourrait être intéressant de comparer la force du signal TCR entre les cellules iNKT et MAIT. On pourrait imaginer que la population MAIT2 qu'on n'arrive pas à identifier chez la souris pourrait être déléetée à cause de sa trop forte affinité pour le complexe de sélection.

### 4) Les lymphocytes T régulateurs

Comme pour les cellules iNKT, la sélection des lymphocytes T régulateurs (Treg) est qualifiée d'antagoniste. En effet, l'utilisation de la souris Nur77eGFP a permis de mettre en évidence la plus forte expression de GFP chez ces cellules comparées aux lymphocytes T conventionnels<sup>243</sup>. Il y aurait deux phases dans le développement des cellules Treg. La première phase est TCR dépendante. Le fort signal perçu par un TCR donné permettrait aux cellules l'entrée dans le programme de développement Treg, rendrait le locus Foxp3 permissif à sa transcription et permettrait l'expression du récepteur à l'IL-2. La seconde phase, TCR indépendante, est induite par les interleukines 2 et 15 qui via STAT5 induiront l'expression du facteur de transcription Foxp3, facteur crucial pour la fonctionnalité des cellules<sup>313</sup>.

### 5) Les lymphocytes T intraépithéliaux

Le clonage et l'expression de TCR des lymphocytes T intraépithéliaux ont permis de mettre en évidence un précurseur DPloCD69hiPD-1hi qui a reçu un fort signal TCR au vu de l'expression de certains marqueurs. Il y aurait un chevauchement entre cette population précurseurs et les



cellules ayant été délétées via la sélection négative, semblant indiqué que l'expression de certains TCR permettrait aux cellules d'échapper à la sélection négative<sup>314</sup>.

L'influence de la force de signal TCR dans les différentes populations thymiques a été récapitulée dans le tableau n°2 ci-dessous.

Population	Influence force du signal TCR dans le développement thymique	Références
Lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permet de sélectionner une diversité de spécificité de TCR avec une tolérance pour le soi</li> <li>- Postulat : Force du signal orienterait le lignage vers la population auxiliaire ou cytotoxique</li> <li>- Les éléments régulateurs des gènes CD4 et CD8 biaiserait la durée de la signalisation TCR</li> </ul>	304, 305
Lymphocytes T $\gamma\delta$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permet la sélection agoniste des cellules</li> <li>- Hypothèse : Faible signal TCR biaiserait la différenciation vers la population <math>\gamma\delta17</math></li> <li>- Contre-argument : Modèles murins où la signalisation TCR est diminuée ne semble pas favoriser cette population en particulier</li> <li>⇒ Question toujours ouverte</li> </ul>	306 à 311
Lymphocytes MAIT	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permet la sélection agoniste des cellules</li> <li>- Pas encore de véritablement étude questionnant le rôle de la force du signal TCR dans la différenciation de ces cellules</li> </ul>	312
Lymphocytes T régulateurs	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permet la sélection agoniste des cellules et l'entrée dans le programme de développement Treg</li> <li>- Seconde phase du développement TCR indépendante</li> </ul>	243, 313
Lymphocytes T EIL	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permet la sélection agoniste des cellules</li> <li>- Expression de TCR particulier permet d'échapper à la sélection négative</li> </ul>	314
Lymphocytes NKT	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permet la sélection agoniste des cellules</li> <li>- 2 hypothèses : Force du signal TCR permet l'orientation du lignage des cellules iNKT Ou Rôle du microenvironnement cytokinique</li> </ul>	243 à 247

**Tableau n°2 :** Tableau récapitulatif de l'influence de la force du signal TCR dans le développement et la différenciation des populations thymiques

## E) Perspectives

En plus des différentes perspectives développées au cours de cette discussion, nous souhaitons mettre en place :

- Un modèle de différenciation in vitro de développement thymique avec d'organoïdes artificiels de thymus (ATO)

Ceci nous permettrait d'identifier des facteurs influant le développement et la différenciation des sous populations iNKT. Nous aurons un total contrôle sur les facteurs apportés au système, cytokines, agonistes....

- Une étude sur l'influence des niveaux d'expression de SLAM dans le développement et la différenciation des cellules iNKT

Dans notre étude, nous nous sommes focalisés sur l'influence de la molécule CD1d dans le développement des cellules iNKT en raison de la différence d'expression de cette molécule sur les thymocytes corticaux des souris B6 et BALB/c. Nous avons également identifié une différence d'expression de la molécule SLAM. Au vu du rôle pas encore totalement identifié de cette molécule dans la modulation du signal TCR, lui dédier une étude pourrait être intéressant.

# Bibliographie

---

1. Makino, Y., Kanno, R., Ito, T., Higashino, K. & Taniguchi, M. Predominant expression of invariant V $\alpha$ 14<sup>+</sup> TCR  $\alpha$  chain in NK1.1<sup>+</sup> T cell populations. *Int Immunol* **7**, 1157–1161 (1995).
2. Makino et al., « Predominant Expression of Invariant V $\alpha$ 14<sup>+</sup> TCR  $\alpha$  Chain in NK1.1<sup>+</sup> T Cell Populations ».
3. Fowlkes et al., « A Novel Population of T-Cell Receptor A $\beta$ -Bearing Thymocytes Which Predominantly Expresses a Single V $\beta$  Gene Family ».
4. Sykes, « Unusual T Cell Populations in Adult Murine Bone Marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and Alpha Beta TCR+NK1.1+ Cells ».
5. Levitsky, Golumbek, et Pardoll, « The Fate of CD4-8- T Cell Receptor-Alpha Beta+ Thymocytes ».
6. Zlotnik et al., « Cytokine Production by Mature and Immature CD4-CD8- T Cells. Alpha Beta- T Cell Receptor+ CD4-CD8- T Cells Produce IL-4 ».
7. Arase et al., « NK1.1+ CD4+ CD8- Thymocytes with Specific Lymphokine Secretion ».
8. Ohteki et MacDonald, « Major Histocompatibility Complex Class I Related Molecules Control the Development of CD4+8- and CD4-8- Subsets of Natural Killer 1.1+ T Cell Receptor-Alpha/Beta+ Cells in the Liver of Mice. »
9. Bix, Coles, et Raulet, « Positive Selection of V Beta 8+ CD4-8- Thymocytes by Class I Molecules Expressed by Hematopoietic Cells. »
10. Bendelac et al., « CD1 Recognition by Mouse NK1<sup>+</sup> T Lymphocytes ».
11. Lantz et Bendelac, « An Invariant T Cell Receptor Alpha Chain Is Used by a Unique Subset of Major Histocompatibility Complex Class I-Specific CD4+ and CD4-8- T Cells in Mice and Humans. »
12. Bendelac, Savage, et Teyton, « The Biology of NKT Cells ».
13. Benlagha et al., « In Vivo Identification of Glycolipid Antigen-Specific T Cells Using Fluorescent Cd1d Tetramers ».
14. Dale I Godfrey et al., “The Burgeoning Family of Unconventional T Cells,” *Nature Immunology* **16**, no. 11 (2015): 1114–1123
15. Toufic Mayassi et al., “A Multilayered Immune System through the Lens of Unconventional T Cells,” *Nature* **595**, no. 7868 (July 22, 2021): 501–510
16. Yifang Gao and Anthony P. Williams, “Role of Innate T Cells in Anti-Bacterial Immunity,” *Frontiers in Immunology* **6** (2015): 302.
17. James E. Ussher, Paul Klenerman, and Chris B. Willberg, “Mucosal-Associated Invariant T-Cells: New Players in Anti-Bacterial Immunity,” *Frontiers in Immunology* **5** (October 8, 2014)

18. Luc Van Kaer, Vrajesh V. Parekh, and Lan Wu, "Invariant Natural Killer T Cells: Bridging Innate and Adaptive Immunity," *Cell and Tissue Research* 343, no. 1 (2011): 43–55
19. Dale I. Godfrey et al., "NKT Cells: What's in a Name?," *Nature Reviews Immunology* 4, no. 3 (March 2004): 231–237
20. Daniel G. Pellicci and Adam P. Uldrich, "Unappreciated Diversity within the Pool of CD1d-Restricted T Cells," *Seminars in Cell & Developmental Biology* 84 (2018): 42–47
21. S Cardell et al., "CD1-Restricted CD4<sup>+</sup> T Cells in Major Histocompatibility Complex Class II-Deficient Mice.," *Journal of Experimental Medicine* 182, no. 4 (October 1, 1995): 993–1004
22. Philomena Arrenberg et al., "Oligoclonality and Innate-like Features in the TCR Repertoire of Type II NKT Cells Reactive to a  $\beta$ -Linked Self-Glycolipid," *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, no. 24 (June 15, 2010): 10984–10989
23. Suryasarathi Dasgupta and Vipin Kumar, "Type II NKT Cells: A Distinct CD1d-Restricted Immune Regulatory NKT Cell Subset," *Immunogenetics* 68, no. 8 (2016): 665–676
24. Alex Jahng et al., "Prevention of Autoimmunity by Targeting a Distinct, Noninvariant CD1d-Reactive T Cell Population Reactive to Sulfatide," *Journal of Experimental Medicine* 199, no. 7 (April 5, 2004): 947–957
25. Avadhesh Kumar Singh, Prabhanshu Tripathi, and Susanna L. Cardell, "Type II NKT Cells: An Elusive Population With Immunoregulatory Properties," *Frontiers in Immunology* 9 (August 28, 2018)
26. Elodie Macho-Fernandez and Manfred Brigl, "The Extended Family of CD1d-Restricted NKT Cells: Sifting through a Mixed Bag of TCRs, Antigens, and Functions," *Frontiers in Immunology* 6 (July 28, 2015)
27. Markus Sköld et al., "CD1d-Specific NK1.1<sup>+</sup> T Cells with a Transgenic Variant TCR," *The Journal of Immunology* 165, no. 1 (July 1, 2000): 168–174
28. Kirsten J. L. Hammond et al., "NKT Cells Are Phenotypically and Functionally Diverse," *European Journal of Immunology* 29, no. 11 (1999): 3768–3781
29. Dale I. Godfrey et al., "NKT Cells: Facts, Functions and Fallacies," *Immunology Today* 21, no. 11 (2000): 573–583
30. G. Eberl et al., "Tissue-Specific Segregation of CD1d-Dependent and CD1d-Independent NK T Cells," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162, no. 11 (June 1, 1999): 6410–6419.
31. Chao Wang et al., "CD8<sup>+</sup>NKT-like Cells Regulate the Immune Response by Killing Antigen-Bearing DCs," *Scientific Reports* 5, no. 1 (2015): 14124
32. Zhengyuan Li et al., "Mouse CD8<sup>+</sup>NKT-like Cells Exert Dual Cytotoxicity against Mouse Tumor Cells and Myeloid-Derived Suppressor Cells," *Cancer Immunology, Immunotherapy* 68, no. 8 (2019): 1303–1315
33. Mark K. Slifka, Robb R. Pagarigan, and J. Lindsay Whitton, "NK Markers Are Expressed on a High Percentage of Virus-Specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T Cells," *The Journal of Immunology* 164, no. 4 (February 15, 2000): 2009–2015

34. Carlos J. Montoya et al., "Characterization of Human Invariant Natural Killer T Subsets in Health and Disease Using a Novel Invariant Natural Killer T Cell-Clonotypic Monoclonal Antibody, 6B11," *Immunology* 122, no. 1 (2007): 1–14
35. Stuart P. Berzins et al., "Limited Correlation between Human Thymus and Blood NKT Cell Content Revealed by an Ontogeny Study of Paired Tissue Samples," *European Journal of Immunology* 35, no. 5 (2005): 1399–1407
36. Nicola M. Heller et al., "Natural Killer T (NKT) Cells in Mice and Men," in *Signaling Mechanisms Regulating T Cell Diversity and Function*, ed. Jonathan Soboloff and Dietmar J. Kappes, 1st ed. (Boca Raton : Taylor & Francis, 2017.: CRC Press, 2017), 119–146.
37. Laurent Brossay et al., "CD1d-Mediated Recognition of an  $\alpha$ -Galactosylceramide by Natural Killer T Cells Is Highly Conserved through Mammalian Evolution," *Journal of Experimental Medicine* 188, no. 8 (October 19, 1998): 1521–1528
38. Xiaohua Wang et al., "Human Invariant Natural Killer T Cells Acquire Transient Innate Responsiveness via Histone H4 Acetylation Induced by Weak TCR Stimulation," *Journal of Experimental Medicine* 209, no. 5 (May 7, 2012): 987–1000
39. Stephan D. Gadola et al., "V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q-Independent, CD1d-Restricted Recognition of  $\alpha$ -Galactosylceramide by Human CD4<sup>+</sup> and CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T Lymphocytes," *The Journal of Immunology* 168, no. 11 (June 1, 2002): 5514–5520
40. Xiao-Yun Min et al., "Human CD3+CD56+NKT-like Cells Express a Range of Complement Receptors and C3 Activation Has Negative Effects on These Cell Activity and Effector Function," *Human Immunology* 82, no. 9 (2021): 625–633
41. K Hammond, "Three Day Neonatal Thymectomy Selectively Depletes NK1.1+ T Cells," *International Immunology* 10, no. 10 (October 1, 1998): 1491–1499
42. Florence Tilloy et al., "Thymic Dependence of Invariant V $\alpha$ 14+ Natural Killer-T Cell Development," *European Journal of Immunology* 29, no. 10 (1999): 3313–3318
43. Y. Makino et al., "Extrathymic Development of V Alpha 14-Positive T Cells," *The Journal of Experimental Medicine* 177, no. 5 (May 1, 1993): 1399–1408.
44. Mark C. Coles and David H. Raulet, "NK1.1 + T Cells in the Liver Arise in the Thymus and Are Selected by Interactions with Class I Molecules on CD4 + CD8 + Cells," *The Journal of Immunology* 164, no. 5 (March 1, 2000): 2412–2418
45. Daniel G. Pellicci et al., "A Natural Killer T (NKT) Cell Developmental Pathway Involving a Thymus-Dependent NK1.1–CD4+ CD1d-Dependent Precursor Stage," *Journal of Experimental Medicine* 195, no. 7 (April 1, 2002): 835–844
46. H. Sato et al., "Induction of Differentiation of Pre-NKT Cells to Mature V 14 NKT Cells by Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor," *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, no. 13 (June 22, 1999): 7439–7444
47. Y. Makino et al., "Development of V $\alpha$ 14+ NK T Cells in the Early Stages of Embryogenesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, no. 13 (June 25, 1996): 6516–6520.

48. Laurent Gapin et al., "NKT Cells Derive from Double-Positive Thymocytes That Are Positively Selected by CD1d," *Nature Immunology* 2, no. 10 (2001): 971–978
49. Wooseok Seo and Ichiro Taniuchi, "Transcriptional Regulation of Early T-Cell Development in the Thymus," *European Journal of Immunology* 46, no. 3 (2016): 531–538
50. Ivan Dzhagalov and Hyewon Phee, "How to Find Your Way through the Thymus: A Practical Guide for Aspiring T Cells," *Cellular and Molecular Life Sciences* 69, no. 5 (2012): 663–682
51. Kyoko Masuda et al., "T Cell Lineage Determination Precedes the Initiation of TCR  $\beta$  Gene Rearrangement," *The Journal of Immunology* 179, no. 6 (September 15, 2007): 3699–3706
52. Avik Dutta, Bin Zhao, and Paul E. Love, "New Insights into TCR  $\beta$ -Selection," *Trends in Immunology* 42, no. 8 (2021): 735–750
53. Dongyuan Ma, Yonglong Wei, and Feng Liu, "Regulatory Mechanisms of Thymus and T Cell Development," *Developmental & Comparative Immunology* 39, no. 1–2 (2013): 91–102
54. Takeshi Egawa et al., "Genetic Evidence Supporting Selection of the V $\alpha$ 14i NKT Cell Lineage from Double-Positive Thymocyte Precursors," *Immunity* 22, no. 6 (2005): 705–716
55. Nyambayar Dashtsoodol et al., "Alternative Pathway for the Development of V $\alpha$ 14+ NKT Cells Directly from CD4–CD8– Thymocytes That Bypasses the CD4+CD8+ Stage," *Nature Immunology* 18, no. 3 (2017): 274–282
56. Yousuke Takahama, "Journey through the Thymus: Stromal Guides for T-Cell Development and Selection," *Nature Reviews Immunology* 6, no. 2 (February 1, 2006): 127–135
57. Timothy K. Starr, Stephen C. Jameson, and Kristin A. Hogquist, "Positive and Negative Selection of T Cells," *Annual Review of Immunology* 21 (2003): 139–176.
58. H. S. Teh, B. Motyka, and S. J. Teh, "Influence of the Affinity of Selecting Ligands on T Cell Positive and Negative Selection and the Functional Maturity of the Positively Selected T Cells," *Critical Reviews in Immunology* 17, no. 5–6 (1997): 399–410
59. Sabrina Bianca Bannstein, "Unraveling Natural Killer T-Cells Development," *Frontiers in Immunology* 8 (2017): 1950.
60. Edy Y. Kim et al., "The Transcriptional Programs of INKT Cells," *Seminars in Immunology* 27, no. 1 (2015): 26–32
61. Wei Li et al., "The SLAM-Associated Protein Signaling Pathway Is Required for Development of CD4+ T Cells Selected by Homotypic Thymocyte Interaction," *Immunity* 27, no. 5 (2007): 763–774
62. Wei Li et al., "Thymic Selection Pathway Regulates the Effector Function of CD4 T Cells," *Journal of Experimental Medicine* 204, no. 9 (September 3, 2007): 2145–2157

63. M Bix, M Coles, and D Raulet, "Positive Selection of V Beta 8+ CD4-8- Thymocytes by Class I Molecules Expressed by Hematopoietic Cells.," *Journal of Experimental Medicine* 178, no. 3 (September 1, 1993): 901–908
64. Alain P. Vicari and Albert Zlotnik, "Mouse NK1.1+ T Cells: A New Family of T Cells," *Immunology Today* 17, no. 2 (1996): 71–76
65. A Bendelac, "Positive Selection of Mouse NK1+ T Cells by CD1-Expressing Cortical Thymocytes.," *Journal of Experimental Medicine* 182, no. 6 (December 1, 1995): 2091–2096
66. Ning Wu and André Veillette, "SLAM Family Receptors in Normal Immunity and Immune Pathologies," *Current Opinion in Immunology* 38 (2016): 45–51
67. André Veillette and Sylvain Latour, "The SLAM Family of Immune-Cell Receptors," *Current Opinion in Immunology* 15, no. 3 (2003): 277–285
68. Betty Chan et al., "SAP Couples Fyn to SLAM Immune Receptors," *Nature Cell Biology* 5, no. 2 (2003): 155–160
69. André Veillette, "Immune Regulation by SLAM Family Receptors and SAP-Related Adaptors," *Nature Reviews Immunology* 6, no. 1 (2006): 56–66
70. Benoit Pasquier et al., "Defective NKT Cell Development in Mice and Humans Lacking the Adapter SAP, the X-Linked Lymphoproliferative Syndrome Gene Product," *Journal of Experimental Medicine* 201, no. 5 (March 7, 2005): 695–701
71. Brian Chung et al., "Cutting Edge: Signaling Lymphocytic Activation Molecule-Associated Protein Controls NKT Cell Functions," *The Journal of Immunology* 174, no. 6 (March 15, 2005): 3153–3157
72. Kim E Nichols et al., "Regulation of NKT Cell Development by SAP, the Protein Defective in XLP," *Nature Medicine* 11, no. 3 (2005): 340–345
73. Dale I Godfrey, Sanda Stankovic, and Alan G Baxter, "Raising the NKT Cell Family," *Nature Immunology* 11, no. 3 (2010): 197–206
74. Susannah C. Shissler and Tonya J. Webb, "The Ins and Outs of Type I INKT Cell Development," *Molecular Immunology* 105 (2019): 116–130
75. Christine Borowski and Albert Bendelac, "Signaling for NKT Cell Development," *Journal of Experimental Medicine* 201, no. 6 (March 21, 2005): 833–836
76. Pamela L. Schwartzberg et al., "SLAM Receptors and SAP Influence Lymphocyte Interactions, Development and Function," *Nature Reviews Immunology* 9, no. 1 (2009): 39–46,



77. Philip E. Lapinski and Philip D. King, "Regulation of Ras Signal Transduction during T Cell Development and Activation," *American Journal of Clinical and Experimental Immunology* 1, no. 2 (2012): 147–153
78. Guoping Fu et al., "Phospholipase C $\gamma$ 2 Plays a Role in TCR Signal Transduction and T Cell Selection," *The Journal of Immunology* 189, no. 5 (September 1, 2012): 2326–2332
79. Taishan Hu et al., "The Ras/MAPK Pathway Is Required for Generation of INKT Cells," ed. Jacques Zimmer, *PLoS ONE* 6, no. 5 (May 10, 2011): e19890
80. S. Harsha Krovi and Laurent Gapin, "Invariant Natural Killer T Cell Subsets—More Than Just Developmental Intermediates," *Frontiers in Immunology* 9 (June 20, 2018): 1393
81. Klaus Griewank et al., "Homotypic Interactions Mediated by Slamf1 and Slamf6 Receptors Control NKT Cell Lineage Development," *Immunity* 27, no. 5 (2007): 751–762
82. Yan Lu et al., "SLAM Receptors Foster INKT Cell Development by Reducing TCR Signal Strength after Positive Selection," *Nature Immunology* 20, no. 4 (2019): 447–457
83. André Veillette, Zhongjun Dong, and Sylvain Latour, "Consequence of the SLAM-SAP Signaling Pathway in Innate-like and Conventional Lymphocytes," *Immunity* 27, no. 5 (2007): 698–710
84. Maren Claus et al., "SLAM Family Receptors in Natural Killer Cells – Mediators of Adhesion, Activation and Inhibition via Cis and Trans Interactions," *Clinical Immunology* 204 (2019): 37–42
85. Daniel G. Pellicci et al., "Intrathymic NKT Cell Development Is Blocked by the Presence of  $\alpha$ -Galactosylceramide," *European Journal of Immunology* 33, no. 7 (2003): 1816–1823
86. Taehoon Chun et al., "CD1d-Expressing Dendritic Cells but Not Thymic Epithelial Cells Can Mediate Negative Selection of NKT Cells," *Journal of Experimental Medicine* 197, no. 7 (April 7, 2003): 907–918
87. Kathryn D. Tuttle and Laurent Gapin, "Characterization of Thymic Development of Natural Killer T Cell Subsets by Multiparameter Flow Cytometry," in *Type 2 Immunity*, ed. R. Lee Reinhardt, vol. 1799 (New York, NY: Springer New York, 2018), 121–133
88. Kamel Benlagha et al., "Characterization of the Early Stages of Thymic NKT Cell Development," *Journal of Experimental Medicine* 202, no. 4 (August 15, 2005): 485–492
89. Albert Bendelac, Paul B. Savage, and Luc Teyton, "The Biology of NKT Cells," *Annual Review of Immunology* 25, no. 1 (April 1, 2007): 297–336
90. Kamel Benlagha et al., "A Thymic Precursor to the NK T Cell Lineage," *Science* 296, no. 5567 (April 19, 2002): 553–555

91. Stuart P. Berzins et al., "Long-Term Retention of Mature NK1.1<sup>+</sup> NKT Cells in the Thymus," *The Journal of Immunology* 176, no. 7 (April 1, 2006): 4059–4065
92. Jonathan M. Coquet et al., "Diverse Cytokine Production by NKT Cell Subsets and Identification of an IL-17–Producing CD4<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> NKT Cell Population," *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, no. 32 (August 12, 2008): 11287–11292
93. You Jeong Lee et al., "Steady-State Production of IL-4 Modulates Immunity in Mouse Strains and Is Determined by Lineage Diversity of INKT Cells," *Nature Immunology* 14, no. 11 (2013): 1146–1154
94. Daniel G. Pellicci, Hui-Fern Koay, and Stuart P. Berzins, "Thymic Development of Unconventional T Cells: How NKT Cells, MAIT Cells and  $\Gamma\delta$  T Cells Emerge," *Nature Reviews Immunology* 20, no. 12 (2020): 756–770
95. Hristo Georgiev et al., "Distinct Gene Expression Patterns Correlate with Developmental and Functional Traits of INKT Subsets," *Nature Communications* 7, no. 1 (2016): 13116
96. Minji Lee et al., "Single-Cell RNA Sequencing Identifies Shared Differentiation Paths of Mouse Thymic Innate T Cells," *Nature Communications* 11, no. 1 (August 31, 2020): 4367.
97. José Alberola-Ila, "Development of A $\beta$  T Cells with Innate Functions," in *Innate Lymphoid Cells*, ed. Xiao-Hong Sun, vol. 1365 (Singapore: Springer Nature Singapore, 2022), 149–160
98. Marion Salou et al., "A Common Transcriptomic Program Acquired in the Thymus Defines Tissue Residency of MAIT and NKT Subsets," *Journal of Experimental Medicine* 216, no. 1 (January 7, 2019): 133–151
99. Thomas Baranek et al., "High Dimensional Single-Cell Analysis Reveals INKT Cell Developmental Trajectories and Effector Fate Decision," *Cell Reports* 32, no. 10 (2020): 108116
100. S. Harsha Krovi et al., "Thymic INKT Single Cell Analyses Unmask the Common Developmental Program of Mouse Innate T Cells," *Nature Communications* 11, no. 1 (2020): 6238
101. Taishan Hu, Idoia Gimferrer, and José Alberola-Ila, "Control of Early Stages in Invariant Natural Killer T-Cell Development: Development of Invariant NKT Cells," *Immunology* 134, no. 1 (2011): 1–7
102. Michael S. Krangel, "Mechanics of T Cell Receptor Gene Rearrangement," *Current Opinion in Immunology* 21, no. 2 (April 2009): 133–139.
103. Alonso Rodríguez-Caparrós et al., "Regulation of T-Cell Receptor Gene Expression by Three-Dimensional Locus Conformation and Enhancer Function," *International Journal of Molecular Sciences* 21, no. 22 (November 11, 2020): 8478

104. Jian Guo et al., "Regulation of the TCR $\alpha$  Repertoire by the Survival Window of CD4+CD8+ Thymocytes," *Nature Immunology* 3, no. 5 (2002): 469–476
105. Zuoming Sun et al., "Requirement for ROR $\gamma$  in Thymocyte Survival and Lymphoid Organ Development," *Science* 288, no. 5475 (June 30, 2000): 2369–2373
106. Elizabeth Hager et al., "Multiple Constraints at the Level of TCR $\alpha$  Rearrangement Impact V $\alpha$ 14i NKT Cell Development," *The Journal of Immunology* 179, no. 4 (August 15, 2007): 2228–2234
107. Taishan Hu et al., "The Transcription Factor C-Myb Primes CD4+CD8+ Immature Thymocytes for Selection into the INKT Lineage," *Nature Immunology* 11, no. 5 (2010): 435–441
108. Ruiqing Wang et al., "Developing and Activated T Cell Survival Depends on Differential Signaling Pathways to Regulate Anti-Apoptotic Bcl-x<sub>L</sub>," *Clinical and Developmental Immunology* 2012 (2012): 1–6
109. Louise M D’Cruz et al., "An Essential Role for the Transcription Factor HEB in Thymocyte Survival, Tcr $\alpha$  Rearrangement and the Development of Natural Killer T Cells," *Nature Immunology* 11, no. 3 (2010): 240–249
110. Jelena S. Bezbradica et al., "Commitment toward the Natural T (INKT) Cell Lineage Occurs at the CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> Stage of Thymic Ontogeny," *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, no. 14 (April 5, 2005): 5114–5119
111. Vanja Lazarevic et al., "The Gene Encoding Early Growth Response 2, a Target of the Transcription Factor NFAT, Is Required for the Development and Maturation of Natural Killer T Cells," *Nature Immunology* 10, no. 3 (2009): 306–313
112. Hamid Bassiri and Kim E Nichols, "It’s up to You Egr2," *Immunology & Cell Biology* 87, no. 5 (2009): 361–363
113. Fernando Macian, "NFAT Proteins: Key Regulators of T-Cell Development and Function," *Nature Reviews Immunology* 5, no. 6 (June 1, 2005): 472–484
114. Andrea Gashler and Vikas P. Sukhatme, "Early Growth Response Protein 1 (Egr-1): Prototype of a Zinc-Finger Family of Transcription Factors," in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, vol. 50 (Elsevier, 1995), 191–224
115. Michael P Seiler et al., "Elevated and Sustained Expression of the Transcription Factors Egr1 and Egr2 Controls NKT Lineage Differentiation in Response to TCR Signaling," *Nature Immunology* 13, no. 3 (2012): 264–271
116. Michael Gleimer, Harald von Boehmer, and Taras Kreslavsky, "PLZF Controls the Expression of a Limited Number of Genes Essential for NKT Cell Function," *Frontiers in Immunology* 3 (2012)

117. Ai-Ping Mao et al., "Multiple Layers of Transcriptional Regulation by PLZF in NKT-Cell Development," *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, no. 27 (July 5, 2016): 7602–7607
118. Jihene Klibi et al., "PLZF Acetylation Levels Regulate NKT Cell Differentiation," *The Journal of Immunology* 207, no. 3 (August 1, 2021): 809–823
119. Hui-Fern Koay et al., "A Three-Stage Intrathymic Development Pathway for the Mucosal-Associated Invariant T Cell Lineage," *Nature Immunology* 17, no. 11 (2016): 1300–131
120. Ying Lu et al., "PLZF Controls the Development of Fetal-Derived IL-17<sup>+</sup> V $\gamma$ 6<sup>+</sup>  $\Gamma\delta$  T Cells," *The Journal of Immunology* 195, no. 9 (November 1, 2015): 4273–4281
121. Zhong-Yan Cheng et al., "ZBTB Transcription Factors: Key Regulators of the Development, Differentiation and Effector Function of T Cells," *Frontiers in Immunology* 12 (July 19, 2021): 713294
122. Adam K. Savage et al., "The Transcription Factor PLZF Directs the Effector Program of the NKT Cell Lineage," *Immunity* 29, no. 3 (2008): 391–403
123. Damian Kovalovsky et al., "The BTB–Zinc Finger Transcriptional Regulator PLZF Controls the Development of Invariant Natural Killer T Cell Effector Functions," *Nature Immunology* 9, no. 9 (2008): 1055–1064
124. Damian Kovalovsky et al., "PLZF Induces the Spontaneous Acquisition of Memory/Effector Functions in T Cells Independently of NKT Cell-Related Signals," *The Journal of Immunology* 184, no. 12 (June 15, 2010): 6746–6755
125. Steve Gerondakis et al., "NF-KB Control of T Cell Development," *Nature Immunology* 15, no. 1 (2014): 15–25
126. Raffi Gugasyan et al., "The NF-KB1 Transcription Factor Prevents the Intrathymic Development of CD8 T Cells with Memory Properties: NF-KB1 Regulates Thymic CD8 T-Cell Development," *The EMBO Journal* 31, no. 3 (February 1, 2012): 692–706
127. Iwao Isomura et al., "C-Rel Is Required for the Development of Thymic Foxp3<sup>+</sup> CD4 Regulatory T Cells," *Journal of Experimental Medicine* 206, no. 13 (December 21, 2009): 3001–3014
128. Iwona Powolny-Budnicka et al., "RelA and RelB Transcription Factors in Distinct Thymocyte Populations Control Lymphotoxin-Dependent Interleukin-17 Production in  $\Gamma\delta$  T Cells," *Immunity* 34, no. 3 (2011): 364–374
129. Sivakumar Vallabhapurapu et al., "Rel/NF-KB Family Member RelA Regulates NK1.1- to NK1.1<sup>+</sup> Transition as Well as IL-15-Induced Expansion of NKT Cells," *European Journal of Immunology* 38, no. 12 (2008): 3508–3519

130. Sanda Stankovic et al., "Distinct Roles in NKT Cell Maturation and Function for the Different Transcription Factors in the Classical NF- $\kappa$ B Pathway," *Immunology & Cell Biology* 89, no. 2 (2011): 294–303
131. Aleksandar K. Stanic et al., "NF- $\kappa$ B Controls Cell Fate Specification, Survival, and Molecular Differentiation of Immunoregulatory Natural T Lymphocytes," *The Journal of Immunology* 172, no. 4 (February 15, 2004): 2265–2273
132. Vallabhapurapu Sivakumar et al., "Differential Requirement for Rel/Nuclear Factor  $\kappa$ B Family Members in Natural Killer T Cell Development," *Journal of Experimental Medicine* 197, no. 12 (June 16, 2003): 1613–1621
133. Alaa Kassim Ali et al., "NK Cell-Specific Gata3 Ablation Identifies the Maturation Program Required for Bone Marrow Exit and Control of Proliferation," *The Journal of Immunology* 196, no. 4 (February 15, 2016): 1753–1767
134. Gabriela Hernández-Hoyos et al., "GATA-3 Expression Is Controlled by TCR Signals and Regulates CD4/CD8 Differentiation," *Immunity* 19, no. 1 (2003): 83–94
135. I-Cheng Ho, Tzong-Shyuan Tai, and Sung-Yun Pai, "GATA3 and the T-Cell Lineage: Essential Functions before and after T-Helper-2-Cell Differentiation," *Nature Reviews Immunology* 9, no. 2 (2009): 125–135
136. T. Naito et al., "Transcriptional Control of T-Cell Development," *International Immunology* 23, no. 11 (November 1, 2011): 661–668
137. Peter J. Kim et al., "GATA-3 Regulates the Development and Function of Invariant NKT Cells," *The Journal of Immunology* 177, no. 10 (November 15, 2006): 6650–6659
138. Jayati Mookerjee-Basu et al., "ThPOK, a Key Regulator of T Cell Development and Function," in *Signaling Mechanisms Regulating T Cell Diversity and Function*, ed. Jonathan Soboloff and Dietmar J. Kappes, 1st ed. (Boca Raton : Taylor & Francis, 2017.: CRC Press, 2017), 67–83
139. Lie Wang et al., "The Sequential Activity of Gata3 and Thpok Is Required for the Differentiation of CD1d-Restricted CD4+ NKT Cells," *European Journal of Immunology* 40, no. 9 (2010): 2385–2390
140. Isaac Engel et al., "Co-Receptor Choice by  $V\alpha$ 14i NKT Cells Is Driven by Th-POK Expression Rather than Avoidance of CD8-Mediated Negative Selection," *Journal of Experimental Medicine* 207, no. 5 (May 10, 2010): 1015–1029
141. Sumone Chakravarti and Dale I. Godfrey, "Directing Traffic on the NKT-Cell Highway: A Key Role for ThPOK," *European Journal of Immunology* 40, no. 9 (2010): 2372–2375

142. Vanja Lazarevic, Laurie H. Glimcher, and Graham M. Lord, "T-Bet: A Bridge between Innate and Adaptive Immunity," *Nature Reviews Immunology* 13, no. 11 (2013): 777–789
143. Michael J Townsend et al., "T-Bet Regulates the Terminal Maturation and Homeostasis of NK and V $\alpha$ 14i NKT Cells," *Immunity* 20, no. 4 (2004): 477–494
144. Jennifer L. Matsuda et al., "T-Bet Concomitantly Controls Migration, Survival, and Effector Functions during the Development of V $\alpha$ 14i NKT Cells," *Blood* 107, no. 7 (April 1, 2006): 2797–2805
145. Marie-Laure Michel et al., "Critical Role of ROR- $\gamma$ t in a New Thymic Pathway Leading to IL-17-Producing Invariant NKT Cell Differentiation," *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, no. 50 (December 16, 2008): 19845–19850
146. Mathis Nozais et al., "MYC Deficiency Impairs the Development of Effector/Memory T Lymphocytes," *iScience* 24, no. 7 (2021): 102761
147. Marei Dose et al., "C-Myc Mediates Pre-TCR-Induced Proliferation but Not Developmental Progression," *Blood* 108, no. 8 (October 15, 2006): 2669–2677.
148. Marcin P. Mycko et al., "Selective Requirement for C-Myc at an Early Stage of V $\alpha$ 14i NKT Cell Development," *The Journal of Immunology* 182, no. 8 (April 15, 2009): 4641–4648
149. Marei Dose et al., "Intrathymic Proliferation Wave Essential for V $\alpha$ 14<sup>+</sup> Natural Killer T Cell Development Depends on c-Myc," *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, no. 21 (May 26, 2009): 8641–8646
150. Marei Dose and Fotini Gounari, "The My(c)stery of INKT Cell Ontogeny," *Cell Cycle* 8, no. 19 (2009): 3082–3085
151. Rupali Das, Derek B. Sant'Angelo, and Kim E. Nichols, "Transcriptional Control of Invariant NKT Cell Development: Regulation of NKT Cell Differentiation," *Immunological Reviews* 238, no. 1 (2010): 195–215
152. Mary K. Kennedy et al., "Reversible Defects in Natural Killer and Memory Cd8 T Cell Lineages in Interleukin 15–Deficient Mice," *Journal of Experimental Medicine* 191, no. 5 (March 6, 2000): 771–780
153. Jennifer L. Matsuda et al., "Homeostasis of V $\alpha$ 14i NKT Cells," *Nature Immunology* 3, no. 10 (2002): 966–974
154. Guangwei Cui et al., "Characterization of the IL-15 Niche in Primary and Secondary Lymphoid Organs in Vivo," *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, no. 5 (February 4, 2014): 1915–1920
155. Beth Lucas et al., "Diversity in Medullary Thymic Epithelial Cells Controls the Activity and Availability of INKT Cells," *Nature Communications* 11, no. 1 (2020): 2198

156. Laura E. Gordy et al., "IL-15 Regulates Homeostasis and Terminal Maturation of NKT Cells," *The Journal of Immunology* 187, no. 12 (December 15, 2011): 6335–6345
157. Eliseo F. Castillo et al., "Thymic and Peripheral Microenvironments Differentially Mediate Development and Maturation of INKT Cells by IL-15 Transpresentation," *Blood* 116, no. 14 (October 7, 2010): 2494–2503
158. Kazushige Maki, Shinji Sunaga, and Koichi Ikuta, "The V–J Recombination of T Cell Receptor- $\gamma$  Genes Is Blocked in Interleukin-7 Receptor-Deficient Mice," *Journal of Experimental Medicine* 184, no. 6 (December 1, 1996): 2423–2428
159. Changwan Hong, Megan A. Luckey, and Jung-Hyun Park, "Intrathymic IL-7: The Where, When, and Why of IL-7 Signaling during T Cell Development," *Seminars in Immunology* 24, no. 3 (2012): 151–158
160. Shizue Tani-ichi et al., "Interleukin-7 Receptor Controls Development and Maturation of Late Stages of Thymocyte Subpopulations," *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, no. 2 (January 8, 2013): 612–617
161. Kalliopi Tzavlaki and Aristidis Moustakas, "TGF- $\beta$  Signaling," *Biomolecules* 10, no. 3 (March 23, 2020): 487
162. Jean-Marc Doisne et al., "INKT Cell Development Is Orchestrated by Different Branches of TGF- $\beta$  Signaling," *Journal of Experimental Medicine* 206, no. 6 (June 8, 2009): 1365–1378
163. Colin Havenar-Daughton et al., "Development and Function of Murine ROR $\gamma$ t+ INKT Cells Are under TGF- $\beta$  Signaling Control," *Blood* 119, no. 15 (April 12, 2012): 3486–3494
164. Hiroshi Watarai et al., "Development and Function of Invariant Natural Killer T Cells Producing TH2- and TH17-Cytokines," ed. Philippa Marrack, *PLoS Biology* 10, no. 2 (February 7, 2012): e1001255
165. Taishan Hu et al., "Increased Level of E Protein Activity during Invariant NKT Development Promotes Differentiation of Invariant NKT2 and Invariant NKT17 Subsets," *The Journal of Immunology* 191, no. 10 (November 15, 2013): 5065–5073
166. Chamutal Bornstein et al., "Single-Cell Mapping of the Thymic Stroma Identifies IL-25-Producing Tuft Epithelial Cells," *Nature* 559, no. 7715 (2018): 622–626
167. Haiguang Wang and Kristin A. Hogquist, "How Lipid-Specific T Cells Become Effectors: The Differentiation of INKT Subsets," *Frontiers in Immunology* 9 (June 26, 2018): 1450
168. Drew Slauenwhite and Brent Johnston, "Regulation of NKT Cell Localization in Homeostasis and Infection," *Frontiers in Immunology* 6 (May 27, 2015)
169. Kirsten J. L. Hammond et al., "CD1d-Restricted NKT Cells: An Interstrain Comparison," *The Journal of Immunology* 167, no. 3 (August 1, 2001): 1164–1173

170. You Jeong Lee et al., "Tissue-Specific Distribution of INKT Cells Impacts Their Cytokine Response," *Immunity* 43, no. 3 (2015): 566–578
171. Sammy Bedoui et al., "Parallels and Differences between Innate and Adaptive Lymphocytes," *Nature Immunology* 17, no. 5 (2016): 490–494
172. Yueh-hsiu Chien, Christina Meyer, and Marc Bonneville, "γδ T Cells: First Line of Defense and Beyond," *Annual Review of Immunology* 32, no. 1 (March 21, 2014): 121–155
173. Maria L. Allende et al., "S1P<sub>1</sub> Receptor Expression Regulates Emergence of NKT Cells in Peripheral Tissues," *The FASEB Journal* 22, no. 1 (2008): 307–315
174. Kenji Chiba et al., "Role of Sphingosine 1-Phosphate Receptor Type 1 in Lymphocyte Egress from Secondary Lymphoid Tissues and Thymus," *Cellular & Molecular Immunology* 3, no. 1 (February 2006): 11–19.
175. Michael B. Drennan et al., "Cutting Edge: The Chemokine Receptor CXCR3 Retains Invariant NK T Cells in the Thymus," *The Journal of Immunology* 183, no. 4 (August 15, 2009): 2213–2216
176. Katia Beider et al., "Involvement of CXCR4 and IL-2 in the Homing and Retention of Human NK and NK T Cells to the Bone Marrow and Spleen of NOD/SCID Mice," *Blood* 102, no. 6 (September 15, 2003): 1951–1958
177. Alexander Wehr et al., "Chemokine Receptor CXCR6-Dependent Hepatic NK T Cell Accumulation Promotes Inflammation and Liver Fibrosis," *The Journal of Immunology* 190, no. 10 (May 15, 2013): 5226–5236
178. Elitza Germanov et al., "Critical Role for the Chemokine Receptor CXCR6 in Homeostasis and Activation of CD1d-Restricted NKT Cells," *The Journal of Immunology* 181, no. 1 (July 1, 2008): 81–91
179. Brent Johnston et al., "Differential Chemokine Responses and Homing Patterns of Murine TCRαβ NKT Cell Subsets," *The Journal of Immunology* 171, no. 6 (September 15, 2003): 2960–2969
180. Jean-Marc Doisne et al., "Skin and Peripheral Lymph Node Invariant NKT Cells Are Mainly Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor  $\Gamma$  + and Respond Preferentially under Inflammatory Conditions," *The Journal of Immunology* 183, no. 3 (August 1, 2009): 2142–2149
181. Catherine M. Crosby and Mitchell Kronenberg, "Tissue-Specific Functions of Invariant Natural Killer T Cells," *Nature Reviews Immunology* 18, no. 9 (2018): 559–574
182. Yuki Kinjo et al., "Natural Killer T Cells Recognize Diacylglycerol Antigens from Pathogenic Bacteria," *Nature Immunology* 7, no. 9 (2006): 978–986
183. Yuki Kinjo et al., "Invariant Natural Killer T Cells Recognize Glycolipids from Pathogenic Gram-Positive Bacteria," *Nature Immunology* 12, no. 10 (2011): 966–974
184. Aaron J. Tyznik et al., "Cutting Edge: The Mechanism of Invariant NKT Cell Responses to Viral Danger Signals," *The Journal of Immunology* 181, no. 7 (October 1, 2008): 4452–4456



185. Manfred Brigl et al., "Innate and Cytokine-Driven Signals, Rather than Microbial Antigens, Dominate in Natural Killer T Cell Activation during Microbial Infection," *Journal of Experimental Medicine* 208, no. 6 (June 6, 2011): 1163–1177
186. Dale Ian Godfrey and Jamie Rossjohn, "New Ways to Turn on NKT Cells," *Journal of Experimental Medicine* 208, no. 6 (June 6, 2011): 1121–1125
187. Emma C. Reilly, Jack R. Wands, and Laurent Brossay, "Cytokine Dependent and Independent INKT Cell Activation," *Cytokine* 51, no. 3 (2010): 227–231
188. Ayano C. Kohlgruber et al., "Activation Strategies for Invariant Natural Killer T Cells," *Immunogenetics* 68, no. 8 (2016): 649–663
189. M. C. Leite-De-Moraes et al., "A Distinct IL-18-Induced Pathway to Fully Activate NK T Lymphocytes Independently from TCR Engagement," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163, no. 11 (December 1, 1999): 5871–5876.
190. Daniel B. Stetson et al., "Constitutive Cytokine MRNAs Mark Natural Killer (NK) and NK T Cells Poised for Rapid Effector Function," *Journal of Experimental Medicine* 198, no. 7 (October 6, 2003): 1069–1076
191. Angélica Díaz-Basabe, Francesco Strati, and Federica Facciotti, "License to Kill: When INKT Cells Are Granted the Use of Lethal Cytotoxicity," *International Journal of Molecular Sciences* 21, no. 11 (May 30, 2020): 3909
192. C. Carnaud et al., "Cutting Edge: Cross-Talk between Cells of the Innate Immune System: NKT Cells Rapidly Activate NK Cells," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163, no. 9 (November 1, 1999): 4647–4650.
193. Shin-ichiro Fujii et al., "The Linkage of Innate to Adaptive Immunity via Maturing Dendritic Cells In Vivo Requires CD40 Ligation in Addition to Antigen Presentation and CD80/86 Costimulation," *Journal of Experimental Medicine* 199, no. 12 (June 21, 2004): 1607–1618.
194. Elizabeth A. Leadbetter et al., "NK T Cells Provide Lipid Antigen-Specific Cognate Help for B Cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, no. 24 (June 17, 2008): 8339–8344
195. Irah L King et al., "Invariant Natural Killer T Cells Direct B Cell Responses to Cognate Lipid Antigen in an IL-21-Dependent Manner," *Nature Immunology* 13, no. 1 (2012): 44–50
196. John Schmieg et al., "Glycolipid Presentation to Natural Killer T Cells Differs in an Organ-Dependent Fashion," *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, no. 4 (January 25, 2005): 1127–1132
197. Yewei Ji et al., "Short Term High Fat Diet Challenge Promotes Alternative Macrophage Polarization in Adipose Tissue via Natural Killer T Cells and Interleukin-4," *Journal of Biological Chemistry* 287, no. 29 (2012): 24378–24386
198. Li Li et al., "NKT Cell Activation Mediates Neutrophil IFN- $\gamma$  Production and Renal Ischemia-Reperfusion Injury," *The Journal of Immunology* 178, no. 9 (May 1, 2007): 5899–5911

199. Carmela De Santo et al., "Invariant NKT Cells Modulate the Suppressive Activity of IL-10-Secreting Neutrophils Differentiated with Serum Amyloid A," *Nature Immunology* 11, no. 11 (2010): 1039–1046
200. Patrick J. Brennan, Manfred Brigl, and Michael B. Brenner, "Invariant Natural Killer T Cells: An Innate Activation Scheme Linked to Diverse Effector Functions," *Nature Reviews Immunology* 13, no. 2 (2013): 101–117
201. Masaki Terabe and Jay A. Berzofsky, "Tissue-Specific Roles of NKT Cells in Tumor Immunity," *Frontiers in Immunology* 9 (August 15, 2018): 1838
202. Masaki Terabe and Jay A. Berzofsky, "Chapter 8 The Role of NKT Cells in Tumor Immunity," in *Advances in Cancer Research*, vol. 101 (Elsevier, 2008), 277–348
203. Kanako Shimizu et al., "NK and NKT Cell-Mediated Immune Surveillance against Hematological Malignancies," *Cancers* 12, no. 4 (March 28, 2020): 817
204. Tsuyoshi Tachibana et al., "Increased Intratumor V $\alpha$ 24-Positive Natural Killer T Cells: A Prognostic Factor for Primary Colorectal Carcinomas," *Clinical Cancer Research* 11, no. 20 (October 15, 2005): 7322–7327
205. Ken-ichirou Yoneda et al., "The Peripheral Blood V $\alpha$ 24+NKT Cell Numbers Decrease in Patients with Haematopoietic Malignancy," *Leukemia Research* 29, no. 2 (2005): 147–152
206. Kazuhiko Yanagisawa et al., "Impaired Proliferative Response of V $\alpha$ 24 NKT Cells from Cancer Patients Against  $\alpha$ -Galactosylceramide," *The Journal of Immunology* 168, no. 12 (June 15, 2002): 6494–6499
207. Adam Nelson, Jordan D. Lukacs, and Brent Johnston, "The Current Landscape of NKT Cell Immunotherapy and the Hills Ahead," *Cancers* 13, no. 20 (October 15, 2021): 5174
208. Leonid S. Metelitsa, "Anti-Tumor Potential of Type-I NKT Cells against CD1d-Positive and CD1d-Negative Tumors in Humans," *Clinical Immunology* 140, no. 2 (2011): 119–129
209. Éilis Dockry et al., "Epigenetic Induction of CD1d Expression Primes Lung Cancer Cells for Killing by Invariant Natural Killer T Cells," *Oncotarget* 7, no. 6 (June 3, 2018): e1428156
210. R. Nakagawa et al., "Antitumor Activity of  $\alpha$ -Galactosylceramide, KRN7000, in Mice With the Melanoma B16 Hepatic Metastasis and Immunohistological Study of Tumor Infiltrating Cells," *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics* 12, no. 2 (February 1, 2001): 51–58
211. Filippo Cortesi et al., "Bimodal CD40/Fas-Dependent Crosstalk between INKT Cells and Tumor-Associated Macrophages Impairs Prostate Cancer Progression," *Cell Reports* 22, no. 11 (2018): 3006–3020
212. Gengwen Tian et al., "CD62L+ NKT Cells Have Prolonged Persistence and Antitumor Activity in Vivo," *Journal of Clinical Investigation* 126, no. 6 (May 16, 2016): 2341–2355
213. Hiroyasu Ito, Tatsuya Ando, and Mitsuru Seishima, "Inhibition of INOS Activity Enhances the Anti-Tumor Effects of Alpha-Galactosylceramide in Established Murine Cancer Model," *Oncotarget* 6, no. 39 (December 8, 2015): 41863–41874

214. Tetsu Kawano et al., "Natural Killer-like Nonspecific Tumor Cell Lysis Mediated by Specific Ligand-Activated V $\alpha$ 14 NKT Cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, no. 10 (May 12, 1998): 5690–5693
215. Giuseppe Giaccone et al., "A Phase I Study of the Natural Killer T-Cell Ligand Alpha-Galactosylceramide (KRN7000) in Patients with Solid Tumors," *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 8, no. 12 (December 2002): 3702–3709.
216. David H. Chang et al., "Sustained Expansion of NKT Cells and Antigen-Specific T Cells after Injection of  $\alpha$ -Galactosyl-Ceramide Loaded Mature Dendritic Cells in Cancer Patients," *Journal of Experimental Medicine* 201, no. 9 (May 2, 2005): 1503–1517
217. Simon Gebremeskel et al., "Natural Killer T Cell Activation Overcomes Immunosuppression to Enhance Clearance of Postsurgical Breast Cancer Metastasis in Mice," *Oncolimmunology* 4, no. 3 (March 4, 2015): e995562
218. I. Toura et al., "Cutting Edge: Inhibition of Experimental Tumor Metastasis by Dendritic Cells Pulsed with Alpha-Galactosylceramide," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163, no. 5 (September 1, 1999): 2387–2391.
219. Takahide Toyoda et al., "Phase II Study of  $\alpha$ -Galactosylceramide-Pulsed Antigen-Presenting Cells in Patients with Advanced or Recurrent Non-Small Cell Lung Cancer," *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 8, no. 1 (2020): e000316
220. Tahiro Shin et al., "Inhibition of Tumor Metastasis by Adoptive Transfer of IL-12-Activated V $\gamma$ 14 NKT Cells," *International Journal of Cancer* 91, no. 4 (February 15, 2001): 523–528
221. D. Bagnara et al., "Adoptive Immunotherapy Mediated by Ex Vivo Expanded Natural Killer T Cells against CD1d-Expressing Lymphoid Neoplasms," *Haematologica* 94, no. 7 (July 1, 2009): 967–974
222. Mihe Hong, Justin D. Clubb, and Yvonne Y. Chen, "Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy," *Cancer Cell* 38, no. 4 (2020): 473–488
223. Uri Greenbaum et al., "Chimeric Antigen Receptor T-Cells in B-Acute Lymphoblastic Leukemia: State of the Art and Future Directions," *Frontiers in Oncology* 10 (August 26, 2020): 1594
224. Diana Cortés-Selva et al., "Innate and Innate-Like Cells: The Future of Chimeric Antigen Receptor (CAR) Cell Therapy," *Trends in Pharmacological Sciences* 42, no. 1 (2021): 45–59
225. Andras Heczey et al., "Anti-GD2 CAR-NKT Cells in Patients with Relapsed or Refractory Neuroblastoma: An Interim Analysis," *Nature Medicine* 26, no. 11 (2020): 1686–1690
226. Antonia Rotolo et al., "Enhanced Anti-Lymphoma Activity of CAR19-INKT Cells Underpinned by Dual CD19 and CD1d Targeting," *Cancer Cell* 34, no. 4 (2018): 596-610.e11
227. Carlos A. Ramos et al., "Allogeneic NKT Cells Expressing a CD19-Specific CAR in Patients with Relapsed or Refractory B-Cell Malignancies: An Interim Analysis. " *Blood* 2021; 138 (Supplement 1): 2819.
228. Stephen J. Turner et al., "Structural Determinants of T-Cell Receptor Bias in Immunity," *Nature Reviews Immunology* 6, no. 12 (December 2006): 883–894

229. Craig H Bassing, Wojciech Swat, and Frederick W Alt, "The Mechanism and Regulation of Chromosomal V(D)J Recombination," *Cell* 109, no. 2 (2002): S45–S55
230. M Attaf et al., "The T Cell Antigen Receptor: The Swiss Army Knife of the Immune System," *Clinical and Experimental Immunology* 181, no. 1 (June 5, 2015): 1–18
231. Armanda Casrouge et al., "Size Estimate of the A $\beta$  TCR Repertoire of Naive Mouse Splenocytes," *The Journal of Immunology* 164, no. 11 (June 1, 2000): 5782–5787
232. Michio Shimamura, Jun Miura-Ohnuma, and Yi-Ying Huang, "Major Sites for the Differentiation of V $\alpha$ 14<sup>+</sup> NKT Cells Inferred from the V-J Junctional Sequences of the Invariant T-Cell Receptor  $\alpha$  Chain: Sites for NKT Cell Development," *European Journal of Biochemistry* 268, no. 1 (2001): 56–61
233. Claudine Joseph et al., "TCR Density in Early INKT Cell Precursors Regulates Agonist Selection and Subset Differentiation in Mice," *European Journal of Immunology* 49, no. 6 (2019): 894–910
234. Garth Cameron et al., "Antigen Specificity of Type I NKT Cells Is Governed by TCR  $\beta$ -Chain Diversity," *The Journal of Immunology* 195, no. 10 (November 15, 2015): 4604–4614
235. Rebeca Jimeno et al., "Tissue-Specific Shaping of the TCR Repertoire and Antigen Specificity of INKT Cells," *eLife* 8 (December 16, 2019): e51663.
236. Jennifer L. Matsuda et al., "Natural Killer T Cells Reactive to a Single Glycolipid Exhibit a Highly Diverse T Cell Receptor  $\beta$  Repertoire and Small Clone Size," *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, no. 22 (October 23, 2001): 12636–12641
237. You Jeong Lee et al., "Steady-State Production of IL-4 Modulates Immunity in Mouse Strains and Is Determined by Lineage Diversity of INKT Cells," *Nature Immunology* 14, no. 11 (2013): 1146–1154
238. Datsen G. Wei et al., "Mechanisms Imposing the V $\beta$  Bias of V $\alpha$ 14 Natural Killer T Cells and Consequences for Microbial Glycolipid Recognition," *Journal of Experimental Medicine* 203, no. 5 (May 15, 2006): 1197–1207
239. Jens Schümann et al., "Cutting Edge: Influence of the TCR V $\beta$  Domain on the Selection of Semi-Invariant NKT Cells by Endogenous Ligands," *The Journal of Immunology* 176, no. 4 (February 15, 2006): 2064–2068
240. Thierry Mallevaey et al., "T Cell Receptor CDR2 $\beta$  and CDR3 $\beta$  Loops Collaborate Functionally to Shape the INKT Cell Repertoire," *Immunity* 31, no. 1 (2009): 60–71
241. <sup>1</sup> Kathryn D. Tuttle et al., "TCR Signal Strength Controls Thymic Differentiation of INKT Cell Subsets," *Nature Communications* 9, no. 1 (2018): 2650
242. Mayra Cruz Tleugabulova et al., "Discrete TCR Binding Kinetics Control Invariant NKT Cell Selection and Central Priming," *The Journal of Immunology* 197, no. 10 (November 15, 2016): 3959–3969
243. Amy E. Moran et al., "T Cell Receptor Signal Strength in Treg and INKT Cell Development Demonstrated by a Novel Fluorescent Reporter Mouse," *Journal of Experimental Medicine* 208, no. 6 (June 6, 2011): 1279–1289

244. Kristin Hogquist and Hristo Georgiev, "Recent Advances in INKT Cell Development," *F1000Research* 9 (February 20, 2020): 127
245. Meng Zhao et al., "Altered Thymic Differentiation and Modulation of Arthritis by Invariant NKT Cells Expressing Mutant ZAP70," *Nature Communications* 9, no. 1 (2018): 2627
246. Nidhi Malhotra et al., "SOX4 Controls Invariant NKT Cell Differentiation by Tuning TCR Signaling," *Journal of Experimental Medicine* 215, no. 11 (November 5, 2018): 2887–2900
247. Sabrina Bortoluzzi et al., "Brief Homogeneous TCR Signals Instruct Common INKT Progenitors Whose Effector Diversification Is Characterized by Subsequent Cytokine Signaling," *Immunity* 54, no. 11 (2021): 2497-2513.e9
248. C. Dascher, "Evolutionary Biology of CD1," in *T Cell Activation by CD1 and Lipid Antigens*, ed. D. Branch Moody, vol. 314 (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007), 3–26
249. Peter Reinink and Ildiko Van Rhijn, "Mammalian CD1 and MR1 Genes," *Immunogenetics* 68, no. 8 (2016): 515–523
250. D. Branch Moody, Dirk M. Zajonc, and Ian A. Wilson, "Anatomy of CD1–Lipid Antigen Complexes," *Nature Reviews Immunology* 5, no. 5 (2005): 387–399
251. Catherine Angénioux et al., "Characterization of CD1e, a Third Type of CD1 Molecule Expressed in Dendritic Cells," *Journal of Biological Chemistry* 275, no. 48 (2000): 37757–37764
252. Adam Shahine, "The Intricacies of Self-Lipid Antigen Presentation by CD1b," *Molecular Immunology* 104 (2018): 27–36,
253. Henri de la Salle et al., "Assistance of Microbial Glycolipid Antigen Processing by CD1e," *Science* 310, no. 5752 (November 25, 2005): 1321–1324.
254. Federica Facciotti et al., "Fine Tuning by Human CD1e of Lipid-Specific Immune Responses," *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, no. 34 (August 23, 2011): 14228–14233
255. Christopher C. Dascher and Michael B. Brenner, "Evolutionary Constraints on CD1 Structure: Insights from Comparative Genomic Analysis," *Trends in Immunology* 24, no. 8 (2003): 412–418
256. D. Branch Moody, "The Surprising Diversity of Lipid Antigens for CD1-Restricted T Cells," in *Advances in Immunology*, vol. 89 (Elsevier, 2006), 87–139
257. D Branch Moody and Rachel N Cotton, "Four Pathways of CD1 Antigen Presentation to T Cells," *Current Opinion in Immunology* 46 (2017): 127–133
258. Adnane Achour, "Major Histocompatibility Complex: Interaction with Peptides," in *ELS*, ed. John Wiley & Sons, Ltd, 1st ed. (Wiley, 2001)
259. E. Yvonne Jones et al., "MHC Class II Proteins and Disease: A Structural Perspective," *Nature Reviews Immunology* 6, no. 4 (2006): 271–282

260. D. M. Zajonc and I. A. Wilson, "Architecture of CD1 Proteins," in *T Cell Activation by CD1 and Lipid Antigens*, ed. D. Branch Moody, vol. 314 (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007), 27–50
261. Nadia R. Cohen, Salil Garg, and Michael B. Brenner, "Chapter 1 Antigen Presentation by CD1," in *Advances in Immunology*, vol. 102 (Elsevier, 2009), 1–94,
262. Dirk M Zajonc et al., "Crystal Structure of CD1a in Complex with a Sulfatide Self Antigen at a Resolution of 2.15 Å," *Nature Immunology* 4, no. 8 (2003): 808–815
263. Hay Dvir et al., "Structural Basis for Lipid-Antigen Recognition in Avian Immunity," *The Journal of Immunology* 184, no. 5 (March 1, 2010): 2504–2511
264. Steven A. Porcelli, "The CD1 Family: A Third Lineage of Antigen-Presenting Molecules," in *Advances in Immunology*, vol. 59 (Elsevier, 1995), 1–98)
265. Steven A. Porcelli and Robert L. Modlin, "THE CD1 SYSTEM: Antigen-Presenting Molecules for T Cell Recognition of Lipids and Glycolipids," *Annual Review of Immunology* 17, no. 1 (1999): 297–329
266. S. K. Dougan, A. Kaser, and R. S. Blumberg, "CD1 Expression on Antigen-Presenting Cells," in *T Cell Activation by CD1 and Lipid Antigens*, ed. D. Branch Moody, vol. 314 (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007), 113–141,)
267. Alysia M. Birkholz and Mitchell Kronenberg, "Antigen Specificity of Invariant Natural Killer T-Cells," *Biomedical Journal* 38, no. 6 (2015): 470–483,
268. .Z-H. Zeng et al., "Crystal Structure of Mouse CD1: An MHC-Like Fold with a Large Hydrophobic Binding Groove," *Science* 277, no. 5324 (July 18, 1997): 339–345
269. Dirk M. Zajonc and Enrico Girardi, "Recognition of Microbial Glycolipids by Natural Killer T Cells," *Frontiers in Immunology* 6 (August 4, 2015)
270. Dirk M Zajonc et al., "Structure and Function of a Potent Agonist for the Semi-Invariant Natural Killer T Cell Receptor," *Nature Immunology* 6, no. 8 (2005): 810–818
271. M. Tsuji, "Glycolipids and Phospholipids as Natural CD1d-Binding NKT Cell Ligands," *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 63, no. 16 (2006): 1889–1898
272. Barbara A. Sullivan et al., "Mechanisms for Glycolipid Antigen-Driven Cytokine Polarization by Vα14 i NKT Cells," *The Journal of Immunology* 184, no. 1 (January 1, 2010): 141–153
273. Suk-Jo Kang and Peter Cresswell, "Calnexin, Calreticulin, and ERp57 Cooperate in Disulfide Bond Formation in Human CD1d Heavy Chain," *Journal of Biological Chemistry* 277, no. 47 (2002): 44838–44844

274. Mark R. Farmery et al., "The Role of ERp57 in Disulfide Bond Formation during the Assembly of Major Histocompatibility Complex Class I in a Synchronized Semipermeabilized Cell Translation System," *Journal of Biological Chemistry* 275, no. 20 (2000): 14933–14938
275. Duarte C. Barral and Michael B. Brenner, "CD1 Antigen Presentation: How It Works," *Nature Reviews Immunology* 7, no. 12 (2007): 929–941
276. Gennaro De Libero and Lucia Mori, "Novel Insights into Lipid Antigen Presentation," *Trends in Immunology* 33, no. 3 (2012): 103–111
277. Stephanie K. Dougan et al., "Microsomal Triglyceride Transfer Protein Lipidation and Control of CD1d on Antigen-Presenting Cells," *Journal of Experimental Medicine* 202, no. 4 (August 15, 2005): 529–539
278. Suzana Brozovic et al., "CD1d Function Is Regulated by Microsomal Triglyceride Transfer Protein," *Nature Medicine* 10, no. 5 (2004): 535–539
279. Jayanthi Jayawardena-Wolf et al., "CD1d Endosomal Trafficking Is Independently Regulated by an Intrinsic CD1d-Encoded Tyrosine Motif and by the Invariant Chain," *Immunity* 15, no. 6 (2001): 897–908
280. Gennaro De Libero and Lucia Mori, "Mechanisms of Lipid-Antigen Generation and Presentation to T Cells," *Trends in Immunology* 27, no. 10 (2006): 485–492
281. Manuela Cernadas et al., "Lysosomal Localization of Murine CD1d Mediated by AP-3 Is Necessary for NK T Cell Development," *The Journal of Immunology* 171, no. 8 (October 15, 2003): 4149–4155
282. D. Branch Moody and Steven A. Porcelli, "Intracellular Pathways of CD1 Antigen Presentation," *Nature Reviews Immunology* 3, no. 1 (January 1, 2003): 11–22
283. Mariolina Salio et al., "Saposins Modulate Human Invariant Natural Killer T Cells Self-Reactivity and Facilitate Lipid Exchange with CD1d Molecules during Antigen Presentation," *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, no. 49 (December 3, 2013)
284. Suk-Jo Kang and Peter Cresswell, "Saposins Facilitate CD1d-Restricted Presentation of an Exogenous Lipid Antigen to T Cells," *Nature Immunology* 5, no. 2 (2004): 175–181
285. A. Bradbury et al., "Mouse CD1 Is Distinct from and Co-Exists with TL in the Same Thymus," *The EMBO Journal* 7, no. 10 (1988): 3081–3086
286. Dirk M. Zajonc, "The CD1 Family: Serving Lipid Antigens to T Cells since the Mesozoic Era," *Immunogenetics* 68, no. 8 (August 2016): 561–576.
287. Srinivasan Sundararaj et al., "Differing Roles of CD1d2 and CD1d1 Proteins in Type I Natural Killer T Cell Development and Function," *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, no. 6 (February 6, 2018)

288. S. H. Park, J. H. Roark, and A. Bendelac, "Tissue-Specific Recognition of Mouse CD1 Molecules," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 160, no. 7 (April 1, 1998): 3128–3134.
289. B. Gozalbo-Lopez et al., "Identification of a New Mouse Cd1d2 Allele," *European Journal of Immunogenetics* 31, no. 1 (2004): 1–3
290. . H. Chen et al., "Expression of CD1d2 on Thymocytes Is Not Sufficient for the Development of NK T Cells in CD1d1-Deficient Mice," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162, no. 8 (April 15, 1999): 4560–4566.
291. K. Christopher Garcia et al., "An A $\beta$  T Cell Receptor Structure at 2.5 Å and Its Orientation in the TCR-MHC Complex," *Science* 274, no. 5285 (October 11, 1996): 209–219
292. Natalie A. Borg et al., "CD1d–Lipid-Antigen Recognition by the Semi-Invariant NKT T-Cell Receptor," *Nature* 448, no. 7149 (2007): 44–49
293. Dale I. Godfrey et al., "Antigen Recognition by CD1d-Restricted NKT T Cell Receptors," *Seminars in Immunology* 22, no. 2 (2010): 61–67
294. Jamie Rossjohn et al., "Recognition of CD1d-Restricted Antigens by Natural Killer T Cells," *Nature Reviews Immunology* 12, no. 12 (2012): 845–857
295. Kwok S. Wun et al., "A Molecular Basis for the Exquisite CD1d-Restricted Antigen Specificity and Functional Responses of Natural Killer T Cells," *Immunity* 34, no. 3 (March 25, 2011): 327–339.
296. Dirk M. Zajonc and Mitchell Kronenberg, "Carbohydrate Specificity of the Recognition of Diverse Glycolipids by Natural Killer T Cells," *Immunological Reviews* 230, no. 1 (2009): 188–200
297. Daniel G. Pellicci et al., "Differential Recognition of CD1d- $\alpha$ -Galactosyl Ceramide by the V $\beta$ 8.2 and V $\beta$ 7 Semi-Invariant NKT T Cell Receptors," *Immunity* 31, no. 1 (2009): 47–59
298. James P Scott-Browne et al., "Germline-Encoded Recognition of Diverse Glycolipids by Natural Killer T Cells," *Nature Immunology* 8, no. 10 (2007): 1105–1113
299. Jens Schümann et al., "Cutting Edge: Influence of the TCR V $\beta$  Domain on the Selection of Semi-Invariant NKT Cells by Endogenous Ligands," *The Journal of Immunology* 176, no. 4 (February 15, 2006): 2064–2068
300. Joshua A Vieth et al., "TCR $\alpha$ -TCR $\beta$  Pairing Controls Recognition of CD1d and Directs the Development of Adipose NKT Cells," *Nature Immunology* 18, no. 1 (2017): 36–44




301. Kwok S. Wun et al., "A Minimal Binding Footprint on CD1d-Glycolipid Is a Basis for Selection of the Unique Human NKT TCR," *Journal of Experimental Medicine* 205, no. 4 (April 14, 2008): 939–949
302. Hala S. Azzam et al., "CD5 Expression Is Developmentally Regulated By T Cell Receptor (TCR) Signals and TCR Avidity," *Journal of Experimental Medicine* 188, no. 12 (December 21, 1998): 2301–2311
303. Yansheng Liu, Andreas Beyer, and Ruedi Aebersold, "On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance," *Cell* 165, no. 3 (2016): 535–550
304. Ronald N. Germain, "T-Cell Development and the CD4–CD8 Lineage Decision," *Nature Reviews Immunology* 2, no. 5 (2002): 309–322
305. Miho Shinzawa et al., "Reversal of the T Cell Immune System Reveals the Molecular Basis for T Cell Lineage Fate Determination in the Thymus," *Nature Immunology* 23, no. 5 (2022): 731–742
306. Kirk D.C. Jensen et al., "Thymic Selection Determines  $\Gamma\delta$  T Cell Effector Fate: Antigen-Naive Cells Make Interleukin-17 and Antigen-Experienced Cells Make Interferon  $\gamma$ ," *Immunity* 29, no. 1 (2008): 90–100
307. Nital Sumaria et al., "Strong TCR $\gamma\delta$  Signaling Prohibits Thymic Development of IL-17A-Secreting  $\Gamma\delta$  T Cells," *Cell Reports* 19, no. 12 (2017): 2469–2476
308. Jan D. Haas et al., "Development of Interleukin-17-Producing  $\Gamma\delta$  T Cells Is Restricted to a Functional Embryonic Wave," *Immunity* 37, no. 1 (2012): 48–59
309. Nicholas A. Spidale et al., "Interleukin-17-Producing  $\Gamma\delta$  T Cells Originate from SOX13+ Progenitors That Are Independent of  $\Gamma\delta$ TCR Signaling," *Immunity* 49, no. 5 (2018): 857-872.e5
310. Miguel Muñoz-Ruiz et al., "TCR Signal Strength Controls Thymic Differentiation of Discrete Proinflammatory  $\Gamma\delta$  T Cell Subsets," *Nature Immunology* 17, no. 6 (2016): 721–727
311. Melanie Wencker et al., "Innate-like T Cells Straddle Innate and Adaptive Immunity by Altering Antigen-Receptor Responsiveness," *Nature Immunology* 15, no. 1 (2014): 80–87
312. François Legoux et al., "Microbial Metabolites Control the Thymic Development of Mucosal-Associated Invariant T Cells," *Science* 366, no. 6464 (October 25, 2019): 494–499
313. Chyi-Song Hsieh, Hyang-Mi Lee, and Chan-Wang J. Lio, "Selection of Regulatory T Cells in the Thymus," *Nature Reviews Immunology* 12, no. 3 (2012): 157–167
314. Benjamin D. McDonald et al., "Elevated T Cell Receptor Signaling Identifies a Thymic Precursor to the TCR $\alpha\beta$ +CD4–CD8 $\beta$ – Intraepithelial Lymphocyte Lineage," *Immunity* 41, no. 2 (2014): 219–229

# Annexes

---

## Research Article

**TCR density in early iNKT cell precursors regulates agonist selection and subset differentiation in mice**

**Claudine Joseph**\*<sup>1,2</sup>, **Jihene Klibi**\*<sup>1,2</sup>, **Ludivine Amable**<sup>1,2</sup>,  
**Lorenzo Comba**<sup>1,2</sup>, **Alessandro Cascioferro**<sup>3</sup>, **Marc Delord**<sup>4</sup>,  
**Veronique Parietti**<sup>5,6</sup>, **Christelle Lenoir**<sup>7,8</sup>, **Sylvain Latour**<sup>7,8</sup>, **Bruno Lucas**<sup>9</sup>,  
**Christophe Viret**<sup>10,11,12</sup>, **Antoine Toubert**<sup>1,2</sup> and **Kamel Benlagha**<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup> INSERM, UMR-1160, Institut Universitaire d'Hématologie, Paris, France

<sup>2</sup> Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>3</sup> Unité de Pathogénomique Mycobactérienne Intégrée, Institut Pasteur, Paris, France

<sup>4</sup> Plateforme de Bio-informatique et Bio statistique, Institut Universitaire d'Hématologie, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>5</sup> Département d'Expérimentation Animale, Institut Universitaire d'Hématologie, Paris, France

<sup>6</sup> Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>7</sup> Laboratory of Lymphocyte Activation and Susceptibility to EBV infection, Paris, France

<sup>8</sup> Imagine Institut, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>9</sup> Institut Cochin, Centre National de la Recherche Scientifique UMR8104, INSERM U1016, Université Paris Descartes, Paris, France

<sup>10</sup> CIRI, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, Lyon, France

<sup>11</sup> INSERM, U1111, Lyon, France

<sup>12</sup> CNRS, UMR5308, Lyon, France

It is established that iNKT cells are a cell type that require strong TCR signal for their proper development and represent a model for thymic agonist selection. The nature of the signal perceived by iNKT cells promoting their specification is not well understood. To address this question, we analyzed iNKT cell development in relevant TCR V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 alpha chain transgenic mice (V $\alpha$ 14Tg). In CD4-V $\alpha$ 14Tg mice, where the transgene is driven by CD4 promoter, we identified a block in iNKT cell development at early developmental stages due to a reduced expression of key transcription factors accompanied with a reduced TCR expression levels. This indicates that TCR signal strength control iNKT cell differentiation. Importantly, we found in WT mice that early precursors of iNKT cells express higher TCR levels compared to positively selected precursors of mainstream T cells showing that TCR levels could contribute to the strength of iNKT cell TCR signaling. Overall, our study highlights TCR signal strength associated with a higher TCR density as an important regulator of iNKT cell lineage specification.

**Keywords:** Agonist · iNKT · TCR · Thymus · Valpha14



Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**Correspondence:** Dr. Kamel Benlagha and Dr. Jihene Klibi  
 e-mail: kamel.benlagha@inserm.fr; klibi.jihene@yahoo.fr

\*These authors equally contributed to this article.

## Introduction

Invariant natural killer T cells (iNKT) cell subsets are a unique regulatory  $\alpha\beta$  T-cell population selected by self-lipid antigens presented by the nonclassical MHC molecule CD1d [1]. Stimulation of iNKT cells by  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ GC), a synthetic CD1d-ligand recognized unanimously by all iNKT cell subsets, results in the release of various cytokines depending on the iNKT cell subset [2]. In this way, iNKT cells have been shown to modulate various immunological conditions. iNKT1 cells produce Th1 and Th2 cytokines and have been involved in different conditions such as autoimmune regulation and tumor rejection [3]. iNKT17 cells produce Th17 cytokines and were shown to be involved in autoimmune diseases and antibacterial responses [4, 5]. A third subset of iNKT cells with features of Th2 cells called iNKT2 was shown to be involved in airway hyperactivity [6].

In contrast to conventional  $\alpha\beta$  T-cell progenitors, iNKT progenitors express TCRs containing a single segment of  $V\alpha$  and  $J\alpha$  DNA ( $V\alpha 14$ - $J\alpha 18$  in mice ( $V\alpha 14$ );  $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$  in humans) combined with one of three  $V\beta$  segments ( $V\beta 8$ , 2, or 7 in mice;  $V\beta 11$  in humans) [7]. While conventional  $\alpha\beta$  TCRs are positively selected by peptides presented in the context of MHC molecules expressed on thymic epithelial cells, glycolipid-presenting nonclassical class I CD1d molecules expressed on  $CD4^+CD8^+$  double positive (DP) cortical thymocytes positively selects iNKT  $V\alpha 14$  TCRs [8].

Following positive selection at the DP stage, a few iNKT cell precursors can readily be characterized as  $CD4^+ CD69^+ HSA^{high}$  cells (stage 0) [9]. Cells at stage 0 downregulate HSA and give rise to stage 1 iNKT cells. Stage 1 iNKT cells appear phenotypically as normal T cells since they do not express NK or activation markers, though they are already committed to the iNKT cell lineage as exemplified by their high expression of the promyelocytic zinc finger transcription factor (PLZF) and their active proliferation. Stage 1 cells acquire a memory-like  $CD44^{high}$  phenotype and give rise to stage 2 iNKT cells. These cells have the same proliferative potential as stage 1 cells and represent a branch point to iNKT cell subsets. For iNKT1 cells, progression to stage 3 is manifest by cessation of proliferation and acquisition of the NK-like program ( $CD44^{high}$ ,  $NK1.1^+$ ). This terminal differentiation can occur either in peripheral tissues or in the thymus itself, where iNKT cells become long-term residents [9]. To study iNKT cell development, the linear model, based on CD44 and NK1.1 expression, and the transcription factor model, based on transcription factor expression, have been used and are complementary [9, 10]. The linear model allows distinguishing the immature  $CD44^{low}$  early precursors of iNKT cells and the mature iNKT1 subset ( $CD44^{high}$ ,  $NK1.1^+$ ). The transcription factor model allows distinguishing all iNKT cell subsets (NKT1, 2, 17) regardless of their maturation stages of development. This model has been completed in a recent study showing that immature iNKT cells that express CCR7 represent a multipotent progenitor pool that gives rise to effector subsets within the thymus [11].

Although born from a common  $CD4^+CD8^+$  DP cortical thymocyte progenitor [12], a divergence in surface phenotype, developmental program, and function becomes apparent shortly after the positive selection of conventional T and iNKT cells [9]. The mechanisms by which bipotent  $CD4^+CD8^+$  progenitors commit to the iNKT versus conventional  $\alpha\beta$  T-cell lineage support an instructive, rather than stochastic precommitted model of lineage commitment, in which the signal emanating from a randomly generated autoreactive  $V\alpha 14$  TCR (alone or in combination with other simultaneous signals) is itself the first impetus driving expression of the iNKT-specific genetic program and expansion of the lineage. Expression of a rearranged  $V\alpha 14$  transgene enhances iNKT cell differentiation, suggesting that all  $CD4^+CD8^+$  DP precursors, rather than a limited precommitted fraction, are available for instruction into the iNKT lineage [13]. The extremely small number of postselection, yet preexpansion, iNKT progenitors suggests that rearrangement of  $V\alpha 14$  occurs randomly [9].

The molecular mechanisms, by which iNKT cell progenitor commit to the iNKT lineage and differentiate, have been extensively studied. CD1d/TCR and homotypic interactions through SLAM family proteins expressed by DP cells are important for the entry of developing T cells in the iNKT cell pool [14]. The transcription factor PLZF is an important developmental regulator of the iNKT lineage specifically expressed in these cells but not in conventional T cells [15, 16]. Expression of PLZF in developing iNKT cells was shown to be epigenetically regulated and linked to TCR induction of *Egr2* necessary for PLZF gene expression [17]. PLZF directs the acquisition of several key components of the iNKT cell effector program during development, including functionality and migration properties [15, 16].

Although the contribution of the  $V\alpha 14$   $\alpha$ -chain in driving DP expressing this receptor to enter into an iNKT cell program is established, its role in the specification of iNKT cells is yet to be determined. To address this question, we analyzed iNKT cell distribution in two lines of  $V\alpha 14$  transgenic (Tg) mice where the rearranged  $\alpha$ -chain is expressed under a  $V\alpha 11$  promoter [13] or under CD4 promoter [14]. In the first case, the  $\alpha$ -chain is expressed early during development starting at the  $CD4^-CD8^-$  DN stage. In the second case, the  $\alpha$ -chain is expressed at the DP stage, a stage where the physiological rearrangement of  $\alpha$ -chains occurs. Analysis of the  $V\alpha 11$ - $V\alpha 14$ Tg mice showed a normal distribution of iNKT cell subsets (NKT1/2/17) indicating that the  $\alpha$ -chain is not sufficient to promote the specification of iNKT cells. Analysis of the  $CD4$ - $V\alpha 14$ Tg mice showed a block in iNKT cell development and an altered distribution of iNKT cell subsets suggesting that its timing of expression is important for iNKT cell specification. Detailed analysis of these mice showed that a reduced expression PLZF and *Egr2* is likely at the origin of this block and indicated that TCR signal strength control lineage specification of iNKT cells. Based on these results, our study proposes that higher TCR expression levels at positive selection could contribute to the strength of TCR signal perceived by iNKT cells and thus to promote agonist selection of these cells and their subset differentiation in physiological condition.

## Results

### Altered distribution and function of iNKT cells in CD4-V $\alpha$ 14 Tg mice

TCR $\alpha$  transgenic mice expressing the rearranged V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 transgene under the control of an endogenous V $\alpha$  promoter, the V $\alpha$ 11 promoter, and the Ig enhancer represent a useful tool to study iNKT cell development and function (V $\alpha$ 11-V $\alpha$ 14Tg) [13]. Due to premature expression of the TCR $\alpha$  transgenic chain, these mice have an altered distribution of thymic T-cell subsets marked by a reduced DP cell frequency and thymic cellularity (Supporting Information Fig. 1A, upper panel). Another V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 transgenic mice have been generated that use a CD4 promoter to drive the expression of the TCR $\alpha$  transgenic chain (CD4-V $\alpha$ 14Tg) [14]. The distribution of thymic cells is corrected in these mice with an increase of the DP subset and a decrease of DN cells (Supporting Information Fig. 1A, lower panel). Total thymocyte numbers are also increased but do not reach WT levels (four times less thymocyte than WT) (Supporting Information Fig. 1A, lower panel). B- and T-cell frequency and numbers in the spleen and PLNs resemble the one observed in WT mice (Supporting Information Fig. 1B). The frequency and absolute numbers of iNKT cells, as assessed by CD1d-tetramers (tet), increased in these mice to the same extent as in V $\alpha$ 11-V $\alpha$ 14Tg mice (Fig. 1A). However, analysis of iNKT cell subsets in thymic CD4-V $\alpha$ 14Tg mice based on their expression of the transcription factor T-bet (iNKT1), ROR $\gamma$ t (iNKT17), and the nonexpression of both factors (iNKT2), showed an increased frequency of iNKT2 cells, compared to both WT or V $\alpha$ 11-V $\alpha$ 14Tg mice (Fig. 1A). It has to be mentioned that we defined iNKT2 cells in the thymus based on the absence of expression of the transcription factor T-bet and ROR $\gamma$ t because we used 7–8-week-old mice where precursor cells, that are also T-bet $^-$  and ROR $\gamma$ t $^-$ , are rare due to the accumulation of mature iNKT cells that represent around 96% of total iNKT cells in mice aged 7 weeks or more [18]. In peripheral lymph nodes (PLNs) and spleen, we also observed an altered distribution of iNKT cells with an increased frequency of iNKT2 cells, compared to WT mice (Supporting Information Fig. 2).

We next investigated the cytokine production profile of iNKT cells in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice after PMA/ionomycin stimulation and found in the thymus, spleen, and PLNs an increased frequency of cells producing IL-4/IL-13 compared to WT mice, reflecting the increased frequency of iNKT2 cells in these mice (Fig. 1B, lower panel, and Supporting Information Fig. 3). As expected, this was not observed in V $\alpha$ 11-V $\alpha$ 14Tg mice (Fig. 1B, upper panel, and Supporting Information Fig. 3).

Overall, these results suggest that the V $\alpha$ 14 alpha chain does not promote by itself the development of specific iNKT cell subsets; however, the timing of its expression proves to impact iNKT cell subset distribution with an increased iNKT2 cells, accompanied by an increased production of IL-4/IL-13.

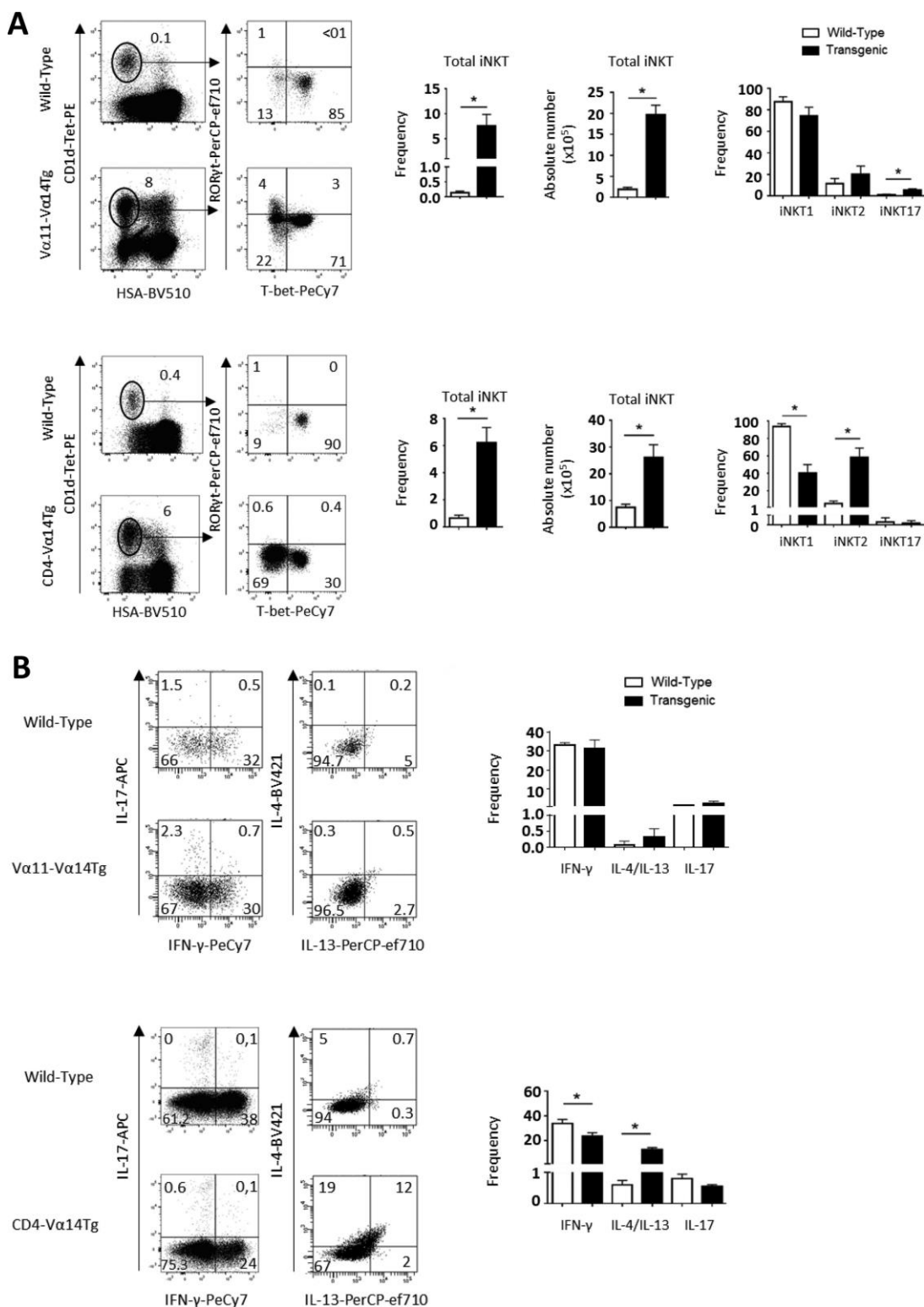
### iNKT cells in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice have a block in the transition from stage 1 to 2

To identify if the altered distribution and function of iNKT cells in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice is related to a perturbed maturation of these cells, we assessed CD44 and NK1.1 expression, markers defining iNKT cell development stage 1–3 [19]. In 4-week-old mice, we found that the frequency of stage 1 iNKT cells increased in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice while stage 3 iNKT cells markedly decreased compared to WT mice indicating a block at the CD44<sup>low</sup> stage 1 (Fig. 2A). The same pattern is observed in 12-week-old CD4-V $\alpha$ 14Tg mice indicating that the developmental defect is not corrected with age (Supporting Information Fig. 4A). We assessed the proliferation status of CD44<sup>low</sup> stage 1 iNKT cells in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice and found it to be equivalent to WT iNKT cells at the same stage (Supporting Information Fig. 5). These results rule out the possibility that the increased generation of stage 1 iNKT cells is due to an increased expansion of these cells and confirm the notion of a block at stage 1 of iNKT cell development in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice. We did not observe however a block in the development of iNKT cells in V $\alpha$ 11-V $\alpha$ 14Tg mice (Supporting Information Fig. 4B). To identify which iNKT cell subset is blocked at the CD44<sup>low</sup> stage, we analyzed CD44 expression in iNKT1, and NKT17 cells in 4-week-old mice and we found that iNKT1 and NKT17 cells that developed in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice are almost all CD44<sup>high</sup> like observed in WT littermate (Fig. 2B). In these young mice, T-bet $^-$ ROR $\gamma$ t $^-$  iNKT cells represent both iNKT2 and precursor cells contrary to old mice where T-bet $^-$ ROR $\gamma$ t $^-$  represent almost exclusively iNKT2 cells as aforementioned. We found in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice that T-bet $^-$ ROR $\gamma$ t $^-$  iNKT cells comprise a higher frequency of CD44<sup>low</sup> cells compared to WT mice (Fig. 2B). The frequency of CD44<sup>low</sup> cells among T-bet $^-$ ROR $\gamma$ t $^-$  iNKT cells remain high in 8-week-old CD4-V $\alpha$ 14Tg mice while their frequency decreased in WT littermate control as they progressed to the CD44<sup>high</sup> stage (Fig. 2B). Analysis performed in PLNs and spleen also showed unusual high frequency of CD44<sup>low</sup> cells among T-bet $^-$ ROR $\gamma$ t $^-$  iNKT cells compared to WT mice (Supporting Information Fig. 6).

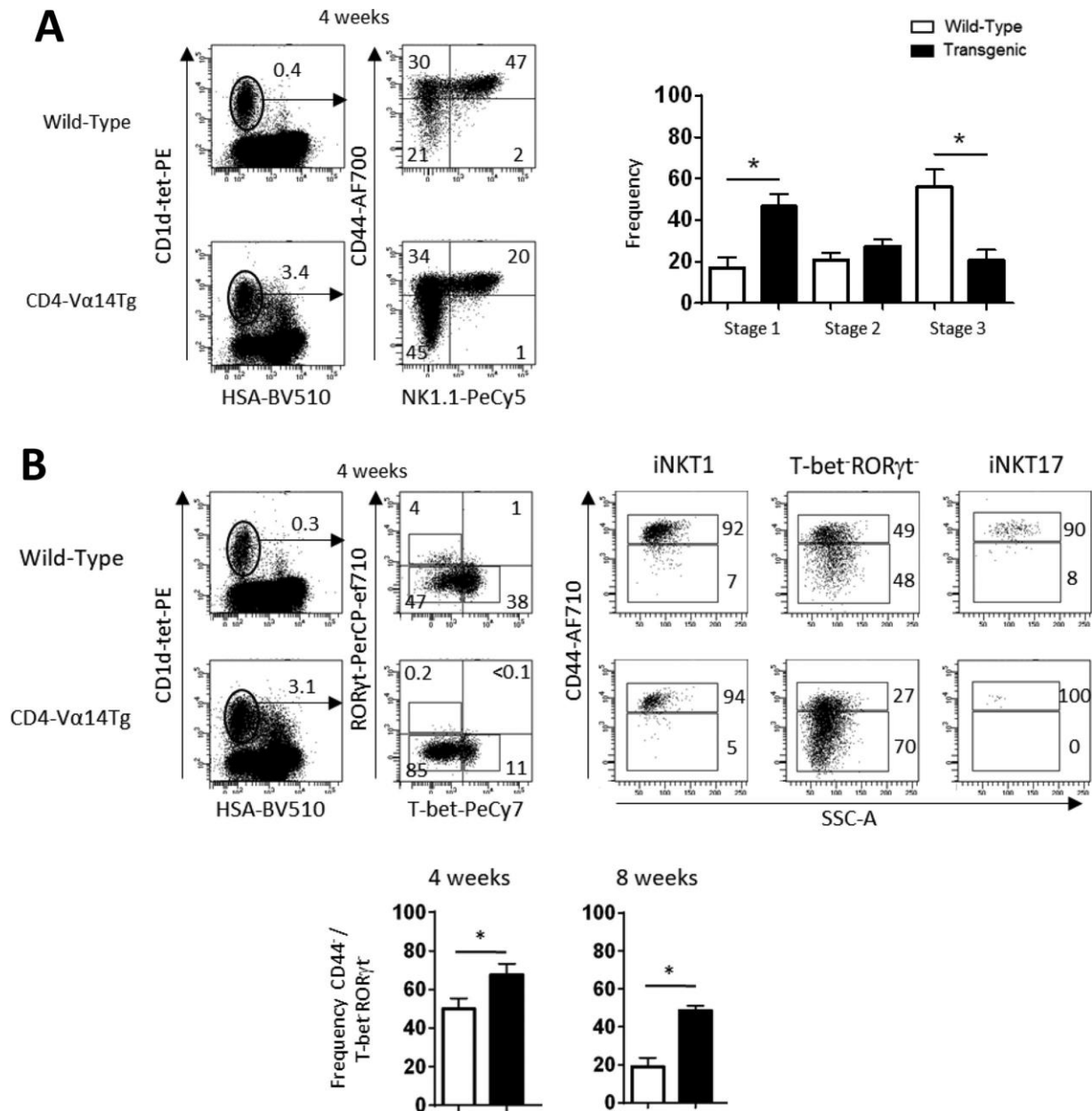
These results indicate that iNKT cells in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice are defective at the thymic developmental CD44<sup>low</sup> stage 1 to CD44<sup>high</sup> stage 2 transition affecting specifically T-bet $^-$ ROR $\gamma$ t $^-$  iNKT cells.

### T-bet $^-$ ROR $\gamma$ t $^-$ iNKT cells in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice represent iNKT cells precursor rather than iNKT2 cells

Because of the aberrant expression of CD44 in iNKT2 cells of CD4-V $\alpha$ 14Tg mice, these cells could represent precursors of iNKT cells instead of mature iNKT2 cells. To distinguish between these two possibilities, we analyzed the expression of IL-17Rb as published results indicated that it is expressed by early iNKT cell precursors at the CD44<sup>low</sup> stage 1 and is upregulated in mature iNKT2 cells at the CD44<sup>high</sup> stage 2 [10, 20]. We found, as expected in WT mice, that the frequency of IL-17Rb<sup>+</sup> iNKT cells increased from stage 1 to



**Figure 1.** Altered distribution and function of iNKT cell in CD4-Vα14Tg mice. (A) Representative staining of iNKT1 (T-bet<sup>+</sup>), iNKT2 (T-bet<sup>-</sup>RORγt<sup>-</sup>), and iNKT17 (RORγt<sup>+</sup>) subsets among thymic iNKT cells in control WT as compared to Vα11-Vα14Tg (upper panel) and CD4-Vα14Tg (lower panel) littermate mice. Frequency of these different subsets are represented and analyzed by flow cytometry (right). (B) Representative staining of IFNγ, IL-17, IL-4, and IL-13 secretion among thymic iNKT cells in control WT mice as compared to Vα11-Vα14Tg (upper panel) and CD4-Vα14Tg (lower panel) littermate mice. Values in dot plots represent frequencies. Frequency of cytokines producing cells is represented (right). Data are pooled from four independent experiments where at least three mice aged 7–8 weeks in each experiment were used and presented as mean + SD. Significance is represented by an asterisk and was evaluated with non-parametric Mann–Whitney U test. A *p* value <0.05 was considered significant. NS: nonsignificant.

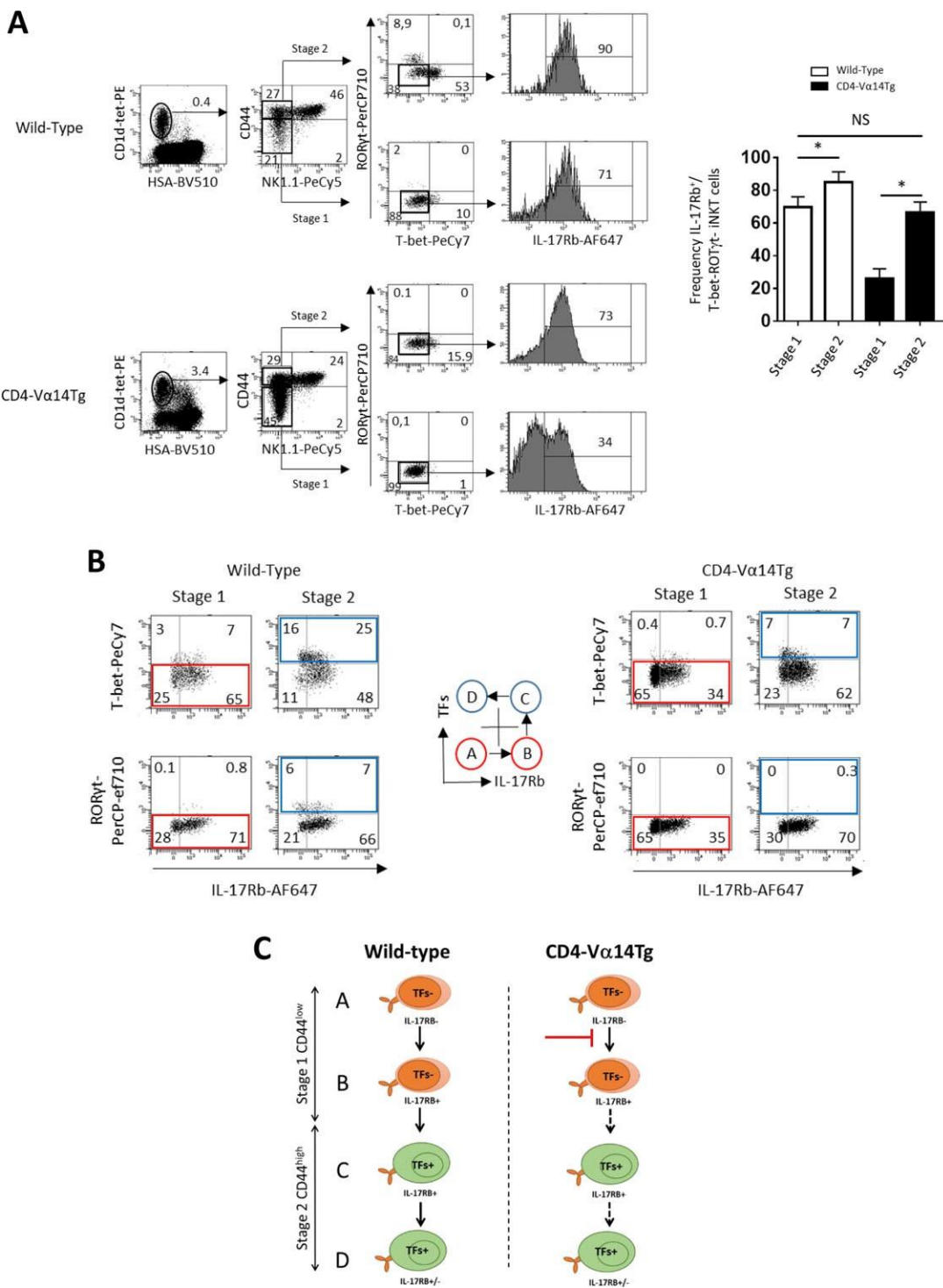


**Figure 2.** Blocked maturation of iNKT cells in CD44<sup>low</sup> stage 1 to CD44<sup>high</sup> stage 2 transition in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice. (A) Representative staining of CD44 and NK1.1 among iNKT cells in thymus from 4-week-old control WT as compared to CD4-V $\alpha$ 14Tg littermate mice. Frequency of the indicated developmental stages are represented and analyzed by flow cytometry (right). (B) Representative staining of CD44 among iNKT1 (T-bet<sup>+</sup>), iNKT17 (ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>), and T-bet<sup>-</sup>ROR $\gamma$ t<sup>-</sup> subsets in thymic iNKT cells in control WT as compared to CD4-V $\alpha$ 14Tg littermate mice. Frequency of CD44<sup>-</sup> cells among T-bet<sup>-</sup>ROR $\gamma$ t<sup>-</sup> iNKT cells in 4- and 8-week-old control WT versus CD4-V $\alpha$ 14Tg littermate mice is represented (bottom). Values in dot plots represent frequencies. Data are pooled from four independent experiments where at least three mice aged 4 weeks were used in each experiment and presented as mean + SD. Significance is represented by an asterisk and was evaluated with nonparametric Mann-Whitney U test. A *p* value <0.05 was considered significant. NS: nonsignificant.

stage 2 mice (71% versus 90%, respectively in representative histogram plot of Fig. 3A) reflecting the appearance of mature iNKT2 cells at the CD44<sup>high</sup> stage 2. In CD4-V $\alpha$ 14Tg mice, we found that the frequency of IL17Rb<sup>+</sup> iNKT cells at the CD44<sup>high</sup> stage 2 is similar to the one observed at the CD44<sup>low</sup> stage 1 of WT mice (73% versus 71% representatively in representative histogram plot of Fig. 3A) indicating that these cells represent immature iNKT cells

rather than iNKT2 cells. Moreover, we found a lower frequency of IL-17Rb<sup>+</sup> iNKT cells at the CD44<sup>low</sup> stage in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice compared to WT mice (34% versus 71% representatively in representative histogram plot of Fig. 3A) suggesting an earlier block within the CD44<sup>low</sup> stage.

To further characterize the early developmental block of iNKT cells in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice, we evaluated the expression of



**Figure 3.** T-bet<sup>-</sup>RORγt<sup>-</sup> iNKT cells in CD4-Vα14Tg mice represent iNKT cells precursor rather than iNKT2 cells. (A) Representative staining of IL-17Rb in iNKT2 (T-bet<sup>-</sup>RORγt<sup>-</sup>) cells among stage 1 (CD44<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>), and stage 2 (CD44<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>) thymic iNKT cells in control WT as compared to CD4-Vα14Tg littermate mice. Value in dot plots represent frequency analyzed by flow cytometry. Frequency of IL-17Rb in these stages is represented (bottom). (B) Representative staining of IL-17Rb and the transcription factor T-bet or RORγt (named TFs and defining with IL-17Rb subtypes A, B, C, and D) among stage 1 (CD44<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>), and stage 2 (CD44<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>) thymic iNKT cells in control WT (left) as compared to CD4-Vα14Tg littermate mice. (C) Schematic representation of iNKT cells developmental stages defined based on their acquisition of IL-17Rb and the transcription factors T-bet or RORγt in WT mice (left) compared to CD4-Vα14Tg mice (right). The horizontal red T in CD4-Vα14Tg mice scheme indicates a block in the transition from stage A to B in the CD44<sup>low</sup> stage 1 and the dashed arrow indicated a reduced acquisition of TFs at CD44<sup>high</sup> stage 2 iNKT cells and reflecting a reduced iNKT cell subset maturation. Data in A and B are pooled from five independent experiments where at least four mice aged 4 weeks in each experiment were used and presented as mean + SD. Significance is represented by an asterisk and was evaluated with nonparametric Mann–Whitney U test. A *p* value <0.05 was considered significant. NS: nonsignificant.



IL-17Rb and the transcription factors (TFs) T-bet and ROR $\gamma$ t on developing iNKT cells. This analysis in WT mice showed that the acquisition of IL-17Rb occur at CD44<sup>low</sup> stage 1 (see red gates in Fig. 3B, left panel) before the acquisition of TFs, that occur mainly at CD44<sup>high</sup> stage 2 (see blue gates in Fig. 3B, left panel), suggesting a sequence of development from stage A to stage D (Fig. 3B, middle panel). Analysis of thymic iNKT cells from CD4-V $\alpha$ 14Tg mice showed a defect in the acquisition of IL-17Rb at the CD44<sup>low</sup> stage 1 resulting in the overrepresentation of stage A (see red gates in Fig. 3B, right panel) and a defect in the acquisition of TFs at CD44<sup>high</sup> stage 2 (see blue gates in Fig. 3B, right panel).

Overall, our results indicated that the block at CD44<sup>low</sup> stage 1 in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice is related to an earlier block before the acquisition of IL-17Rb at this stage and suggested to us that iNKT cell precursors in normal development pass through an IL-17Rb<sup>+</sup> stage at the CD44<sup>low</sup> stage 1 before acquiring specific TFs, mainly taking place at the CD44<sup>high</sup> stage 2 (see model in Fig. 3C).

### iNKT cell lineage-specific gene expression in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice

We next compared gene expression profile on sorted cells from CD4-V $\alpha$ 14Tg mice and WT mice to elucidate the molecular mechanism by which CD4-V $\alpha$ 14Tg mice affected the development of iNKT cells. We found that genes downregulated in CD4-V $\alpha$ 14Tg iNKT cells relative to their expression in control iNKT cells comprised those induced during iNKT cell maturation and included those encoding critical transcription factors T-bet (*Tbx21*) and ROR $\gamma$ t (*Rorc*) [21–23], the NK cell receptor NKG2D (*Klrb1*), the chemokine and cytokine receptors CXCR3 (*Cxcr3*) [24] and CD122 (*Ii2rb*) [25], as well as the cytokine IFN- $\gamma$  (*Ifng*) and the calcium regulator calcyclin (*S100a6*) (Fig. 4A). Gene-set-enrichment analysis (GSEA) of the genes downregulated in CD4-V $\alpha$ 14Tg iNKT cells revealed enrichment for genes encoding products related to iNKT cells and involved in iNKT cell differentiation as well as in signaling pathways, including IFNs, IL-12, and 17, which have been reported to have important roles in iNKT cells [26] (Fig. 4B, left panel). In contrast, constitutive expression of CD4-V $\alpha$ 14Tg resulted in the upregulation of genes encoding products involved in the cell-cycle (top2 HALLMARK database: G2M-checkpoint, and E2F targets; Top2 BIOCARTA database: PTC1 pathway, and RB pathway) and different metabolism (Top2 KEGG database: retinol metabolism, and drug metabolism cytochrome P450) (Fig. 4B, right panel). Ki67 expression analysis confirmed these results and showed a higher frequency of Ki67<sup>+</sup> cells among total iNKT cells from CD4-V $\alpha$ 14Tg mice compared to WT mice (Supporting Information Fig. 5, left panel). This increased frequency of Ki67<sup>+</sup> iNKT cells is not due to a change in the intrinsic proliferative capacity of iNKT cells at any stage of their development (Supporting Information Fig. 5). It is due to the increased proportion of dividing stage 1 CD44<sup>low</sup> iNKT cells in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice compared to WT mice (46% versus 21% respectively as shown in representative dot plots in Fig. 2A) and a reduced

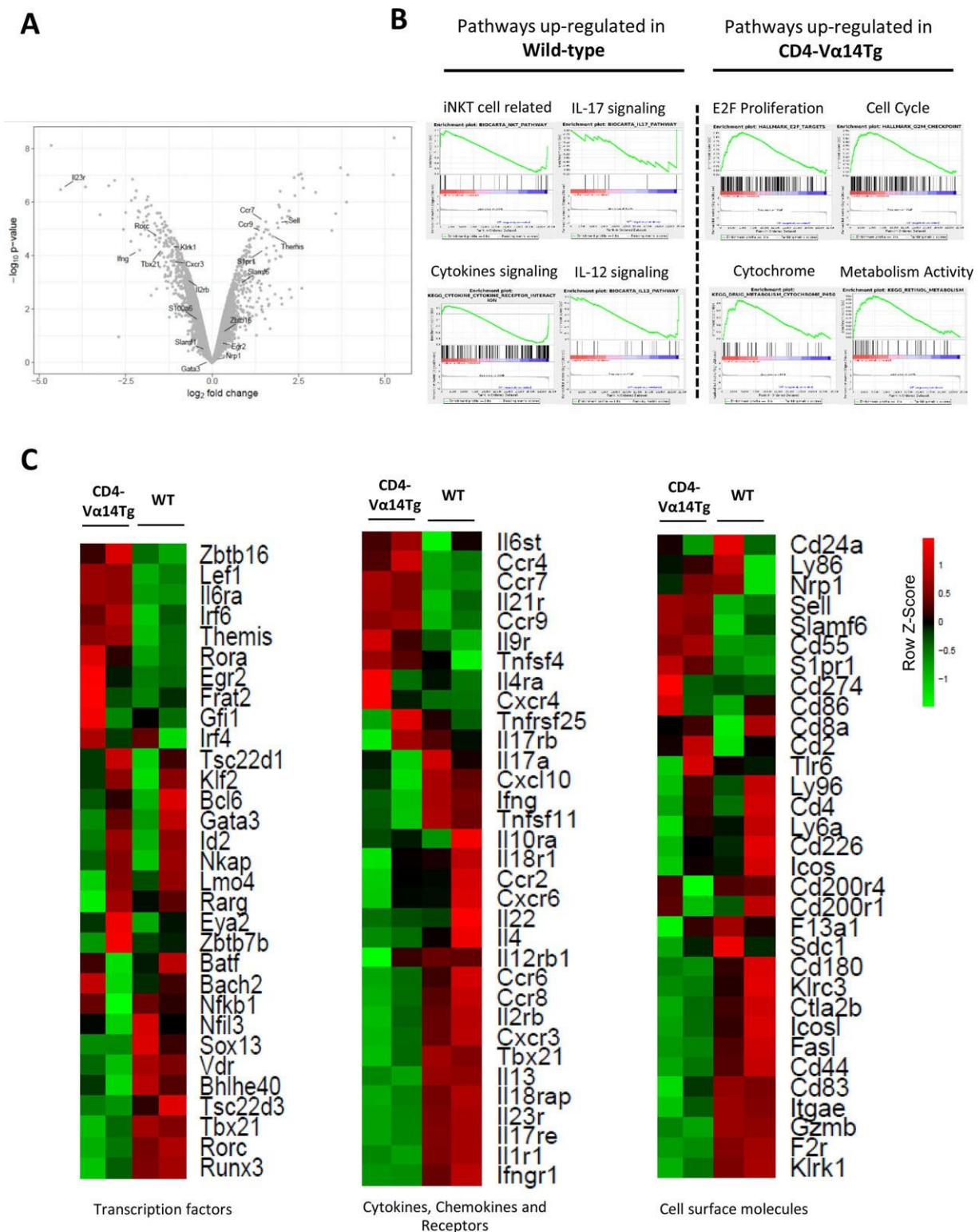
proportion of resting stage 3 iNKT cells (20% versus 47% respectively as shown in representative dot plots in Fig. 2A).

Among the key genes whose downregulation in WT mice characterizes the iNKT cell effector program is *Sell*, which encodes CD62L and is required for recirculation to lymph nodes. Gene expression of *Sell* in iNKT cells from CD4-V $\alpha$ 14Tg mice is upregulated compared to normal mice. On the other hand, *Cd44* expression is downregulated in iNKT cells from CD4-V $\alpha$ 14Tg mice reflecting its cell surface expression (Fig. 4C, and 2A). Other genes such as *themis* and *CCR9* are expressed early during T-cell development and their expression is downregulated as cells mature [27]. Interestingly, we found that both genes expression is upregulated in iNKT cells from CD4-V $\alpha$ 14Tg mice supporting the notion that these cells have a signature of precursor rather than mature cells (Fig. 4C). LEF1 has been reported to be required for the transition of iNKT0 cells to subsequent developmental stages by inducing the expression of *Cd127* (which encodes the cytokine receptor IL-7Ra (CD127)) and *Myc* (which encodes the transcription factor c-Myc). The expression of LEF1 was shown to be increased in the rare early iNKT0 precursor cells [28]. We found that expression of LEF1 was upregulated in iNKT cells from CD4-V $\alpha$ 14Tg mice supporting the notion that these cells are blocked at an early precursor stage of iNKT cell development. A recent study by the Hogquist group indicated that immature iNKT cells that express CCR7 represent a multipotent progenitor pool [11]. We found that the expression of CCR7 was upregulated in iNKT cells from CD4-V $\alpha$ 14Tg mice (Fig. 4C). Also, we found that the frequency of CCR7<sup>+</sup> iNKT cells at the immature CD44<sup>low</sup> stage 1 is higher in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice compared to WT mice (Supporting Information Fig. 7).

Overall, these findings, though not providing mechanistic insights, support the notion that CD4-V $\alpha$ 14Tg alpha chain promoted the early steps of iNKT cell development but not the efficient progression of iNKT cells precursors to subsequent differentiating stages.

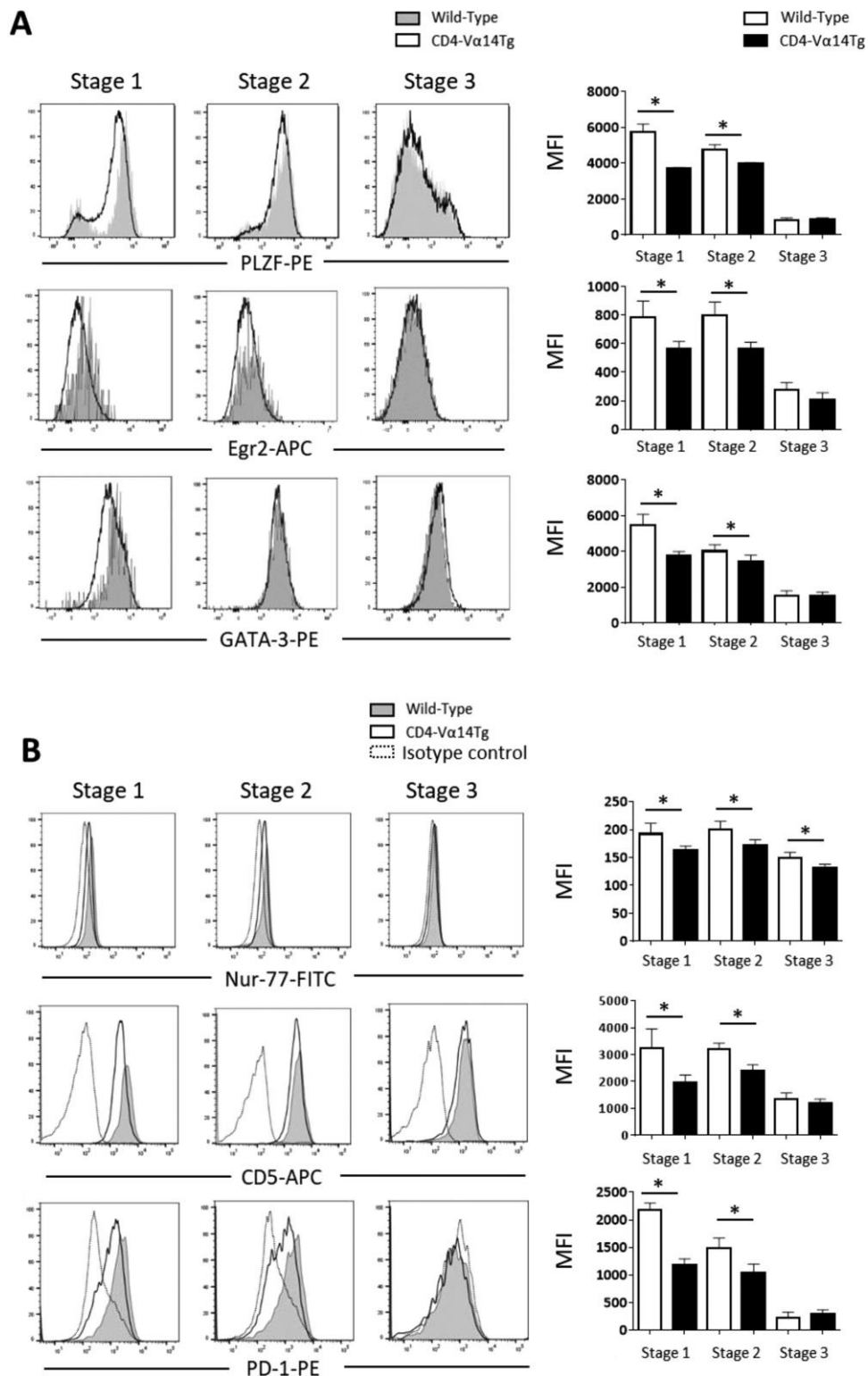
### Reduced expression of PLZF and Egr2 in iNKT cells from CD4-V $\alpha$ 14Tg mice

A hallmark feature of iNKT cells is their robust expression of the zinc-finger transcription factor PLZF, which has been considered a master regulator of their development and function [15, 16]. We thus sought to assess if PLZF is correctly induced in iNKT cells from CD4-V $\alpha$ 14Tg mice at different stages of their development. Consistent with other reports, PLZF expression is high at stage 1 of iNKT cells from WT mice, presumably after receiving strong TCR signal, and then this expression gradually reduced at stage 2 and 3 (Fig. 5A, upper panel). Interestingly, induction of PLZF in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice was reduced in stage 1 and stage 2, though to lesser extent to what observed at stage 1. Similar expression was observed at stage 3. We next analyzed the expression of Egr2 at different stages of iNKT cell development as Egr2 is necessary for the transactivation of PLZF expression in iNKT cells through binding to the Zbtb16 promoter [17]. We found that Egr2 expression gradually declined as iNKT cells mature in WT mice with an identical



**Figure 4.** Lineage-specific signature genes of iNKT cells is altered in CD4-Vα14Tg mice. (A) Volcano plot representing gene expression in thymic iNKT cells showing genes upregulated (right) or downregulated (left) in CD4-Vα14Tg littermate mice relative to their expression in WT iNKT cells (WT; *n* = 2, CD4-Vα14Tg; *n* = 2). (B) Gene-set-enrichment analysis of the indicated pathways in thymic iNKT cells in control WT (left) as compared to CD4-Vα14Tg (right) littermate mice. (C) Heatmap of selected immune genes classified as transcription factors, cytokines chemokines receptors, and cell surface molecules in thymic control WT as compared to CD4-Vα14Tg littermates mouse. Data are pooled from four experiments where three to five mice from each strain were used per experiment. \*Data were obtained from whole genome microarray datasets under GEO accession number GSE129252.

\*Correction added on 08.04.2019, after first online publication: GEO number has been included in Figure 4.



**Figure 5.** Reduced TCR signaling and key iNKT cells lineage related transcription factors in CD4-Vα14Tg mice. (A) Representative staining of PLZF, Egr2, and GATA3 in thymic iNKT cells at the indicated stages of development from 4-week-old control WT as compared to CD4-Vα14Tg littermate mice. MFI of these markers is represented (right). (B) Same as in “A” for Nur77, CD5, and PD1. Data are pooled from at least four independent experiments where three to five mice aged 3–4 weeks were used in each experiment and presented as mean + SD. Significance is represented by an asterisk and was evaluated with nonparametric Mann–Whitney U test. A  $p$  value < 0.05 was considered significant. NS: nonsignificant.

pattern observed for PLZF (Fig. 5A, middle panel). We next sought to evaluate the consequence of a reduction of PLZF expression in GATA-3 expression in early stages of iNKT cell development as previous studies showed that PLZF interacts with *Gata3* promoter to induce its expression in iNKT cell precursor [29]. We found that GATA-3 expression is reduced in stage 1 and to a lesser extent at stage 2 compared to WT iNKT cells (Fig. 5A, lower panel).

Overall these results showed a nonoptimal induction of Egr2 in iNKT cells from CD4-V $\alpha$ 14Tg mice, required for proper expression of PLZF and promotion of iNKT cell developmental program.

### Reduced TCR signaling in iNKT cells from CD4-V $\alpha$ 14Tg mice

iNKT cells are a cell type that require high affinity agonistic TCR signals for their proper development in the thymus [30] and several data suggest that strong TCR signals associated with high expression of Egr2 lead to PLZF induction [15, 17]. We next investigated whether the reduced Egr2/PLZF expression was a result of an inability to generate these strong TCR signals. This was tested using Nur77, CD5, and PD-1, markers known to transduce TCR signal strength at positive selection. WT iNKT cells displayed expression of these markers at stage 1 and signaling remain steady at stage 2 for Nur77 and CD5, and decreased for PD-1 (Fig. 5B). In all cases, signaling further decreased at stage 3 to reach minimal expression. When we compared expression intensity of these markers in different stages of iNKT cells from CD4-V $\alpha$ 14Tg mice, we observed a reduced expression of these markers at stage 1, and 2, and to a lesser extent (Nur77, and CD5) or at similar levels (PD-1) at stage 3 (Fig. 5B). Altogether, these results suggest that that reduced Egr2/PLZF expression and iNKT cell developmental block is likely the result of impaired TCR signal highlighted by inefficient induction of Nur77, CD5, and PD-1.

### Reduced TCR expression levels in iNKT cells from CD4-V $\alpha$ 14Tg mice

The impaired TCR signal observed in iNKT cells from CD4-V $\alpha$ 14Tg mice could be the result of a reduced CD1d expression in DP cortical thymocytes required for positive selection of iNKT cells or a reduced TCR expression levels at the surface of iNKT cells. We found similar levels of CD1d expression on thymocytes of WT and CD4-V $\alpha$ 14Tg mice (Fig. 6A). On the contrary, we found a reduced expression of TCR in stage 1 iNKT cells of CD4-V $\alpha$ 14Tg mice, but not at later developmental stages (Fig. 6B, upper panel). Although these results indicate that reduced TCR levels could be at the origin of altered TCR signaling, we sought to verify if an additional mechanism could be involved based on reports showing that SLAMF6, a costimulatory receptor required for iNKT cell development, is essential for potentiating TCR-mediated induction of Egr2 and PLZF. Analysis of SLAMF6 expression at different stages of iNKT cell development indicated no differences between WT and CD4-V $\alpha$ 14Tg mice (Fig. 6B, lower panel). Because SLAMF6

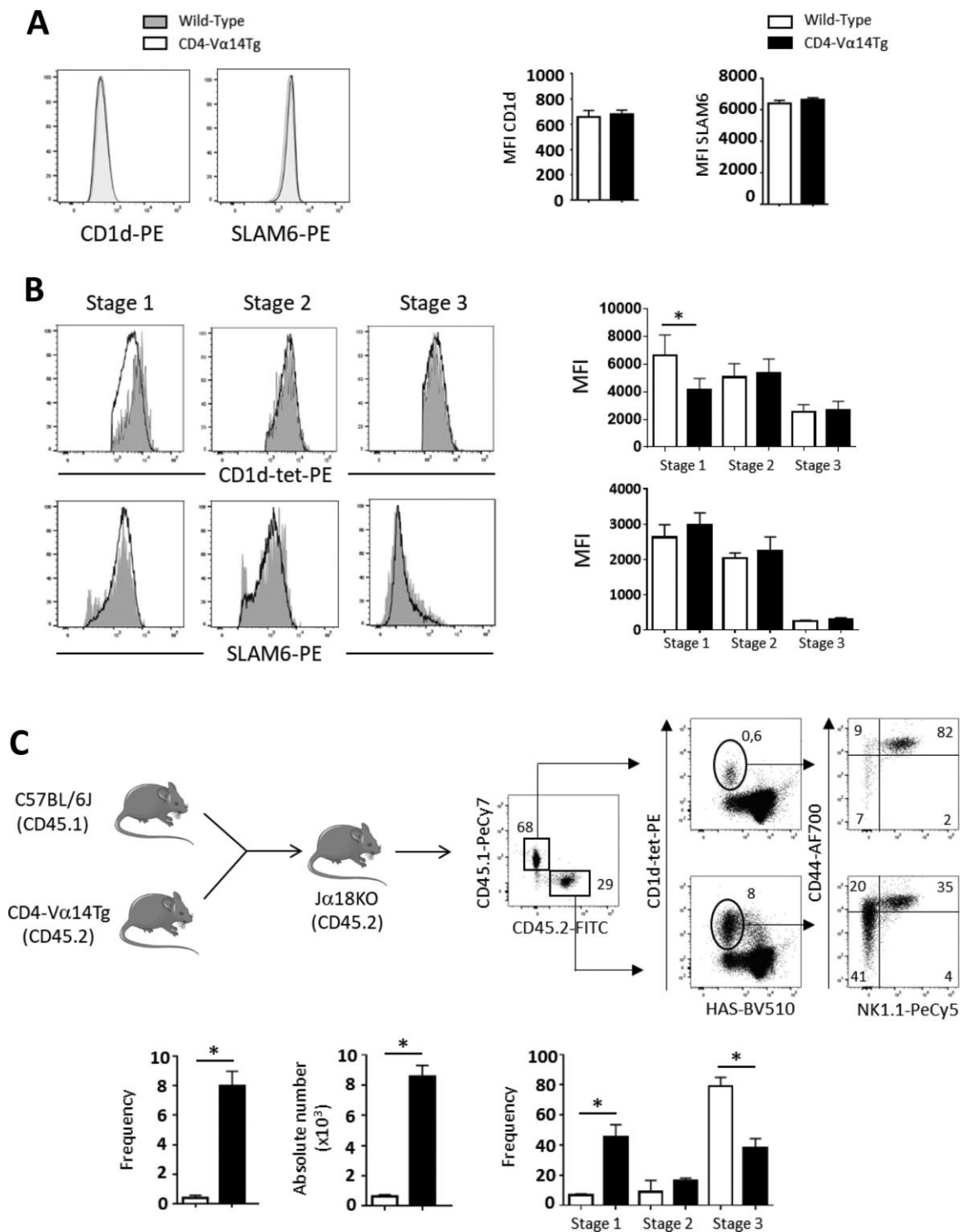
is also expressed at cortical DP thymocytes and interact with SLAMF6 on iNKT cells, we analyzed its expression on these cells and found similar levels of its expression WT and CD4-V $\alpha$ 14Tg mice (Fig. 6A). Altogether, these results indicate that the altered TCR signaling and reduced induction of Egr2 and PLZF resulting in the developmental block of iNKT cell is a consequence of a reduced TCR expression in iNKT cells from CD4-V $\alpha$ 14Tg mice.

### The developmental defect in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice is iNKT cell intrinsic

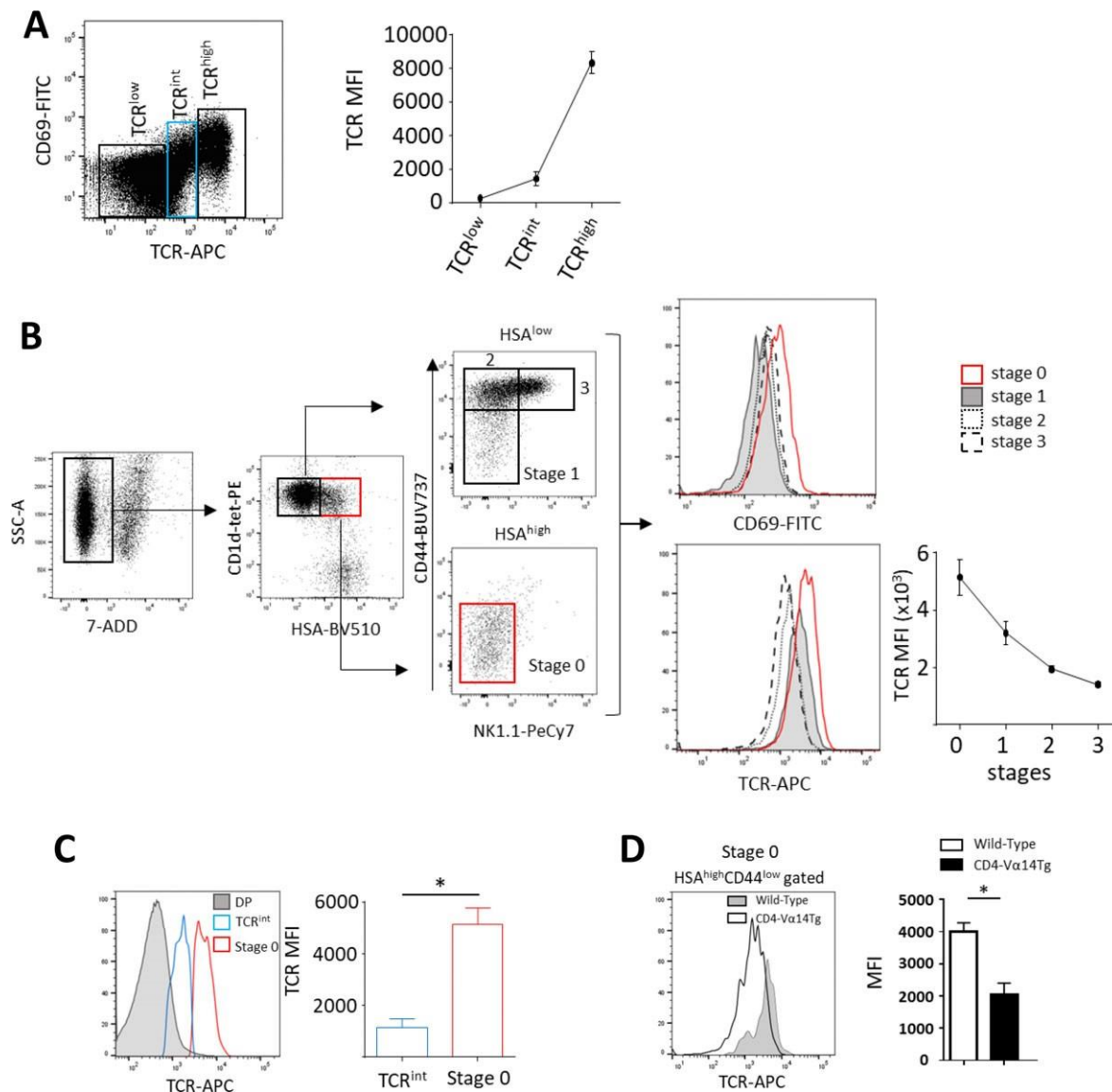
Our results thus suggest that iNKT cell developmental defect in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice is cell intrinsic. To verify this, we generated mixed bone marrow (BM) chimeras in which we transferred a 1:1 ratio of WT and CD4-V $\alpha$ 14Tg BM donor cells into sublethally irradiated  $\text{J}\alpha$ 18KO hosts missing iNKT cells (Fig. 6C, upper panel). After 2-month engraftment, we isolated cells from the thymus and determined the ability of each donor compartment to reconstitute iNKT cells. Whereas WT donor cells were able to fully reconstitute thymic iNKT cells developmental stages, iNKT cells in the CD4-V $\alpha$ 14Tg donor compartment have a block in the thymic CD44<sup>low</sup> stage 1 to CD44<sup>high</sup> stage 2 transition (Fig. 6C, upper and lower panel). These results indicate that the presence of normal BM compartment did not correct iNKT developmental defect in CD4-V $\alpha$ 14Tg compartment showing that the defect is inherent to the iNKT cells.

### TCR density might contribute to agonist selection of iNKT cells

So far our result indicates that variation in TCR density affects downstream signaling and iNKT cells selection. Because iNKT cells are selected by strong TCR signal [30], we hypothesized that high TCR density might contribute to the higher TCR signal strength that iNKT cell perceive at positive selection and responsible for their so called “agonist selection.” Positive selection stage of mainstream T cells is characterized by upregulation of TCR expression by selected DP T cells (TCR<sup>int</sup>) and of the CD69 early activation markers [31] as shown in Fig. 7A, left panel. For iNKT cells, the closest stage to their positive selection we detected in previous studies is called stage 0 [19]. This stage is characterized by high expression levels of HSA (HSA<sup>high</sup>), low expression of CD44 (CD44<sup>low</sup>) and high expression of CD69 as shown in Fig. 7B. We thus compared in WT mice TCR expression levels at the positive selection stage of mainstream T cells (TCR<sup>int</sup>) with TCR levels at stage 0 iNKT cells. As shown in Fig. 7C, we found that TCR expression levels at stage 0 iNKT cells is higher than TCR<sup>int</sup> expression levels of mainstream T cells. TCR expression levels decreases at subsequent stages of iNKT cell development (Fig. 7B) while it increases postpositive selection for mainstream T cells (Fig. 7A). These results suggested to us a model where iNKT cells express high TCR expression levels at positive selection and this



**Figure 6.** The developmental defect in CD4-Vα14Tg mice is iNKT cell intrinsic and due to reduced TCR expression levels. (A) Representative staining of CD1d and SLAMF6 expression on cortical thymocytes from 4-week-old control WT as compared to CD4-Vα14Tg littermate mice. MFI of these markers is represented (right). (B) Representative staining of CD1d-tet and SLAMF6 in thymic iNKT cells and the indicated stages of development from 4-week-old control WT as compared to CD4-Vα14Tg littermate mice. MFI of these markers is represented (right). (C) Lethally irradiated CD45.2 Jα18KO mice were reconstituted with bone marrow (BM) from CD45.1 C57BL/6 and CD45.2 CD4-Vα14Tg mice (scheme in upper panel). iNKT enriched thymic cells were analyzed 8 weeks after BM reconstitution. Representative staining of CD44 and NK1.1 among iNKT cells are shown (upper panel). Values in dot plots represent frequencies. Frequency and absolute number of total iNKT cells and frequency of the indicated different iNKT cell developmental stages are represented (lower panel). Data are pooled from at least three independent experiments where four to five mice in each experiment were used and presented as mean + SD. Significance is represented by an asterisk and was evaluated with nonparametric Mann–Whitney U test. A *p* value <0.05 was considered significant. NS: nonsignificant.



**Figure 7.** TCR expression levels are higher in positively selected iNKT cells compared to mainstream T cells. (A) Representative staining of CD69 and TCR expression on thymic cells (left). MFI of TCR of the indicated gates is represented (right). (B) Cells from the CD8-depleted thymi of 4-week-old mice were positively selected for iNKT cells using magnetic beads and an autoMACS separator and stained for the indicated markers. Doublets were excluded and only viable cells were included in the analysis. iNKT cells were analyzed following the gating strategy shown. Representative staining of CD69 and TCR at the indicated stages are shown and MFI of TCR is represented (far right). (C) Representative staining of TCR expression on mainstream TCR<sup>int</sup> T cells compared to stage 0 iNKT cells. MFI of TCR is represented (right). (D) Same as in C (with an enrichment strategy as in D) for TCR expression at stage 0 of iNKT cells from WT as compared to CD4-V $\alpha$ 14Tg littermate mice. Data are pooled from four independent experiments where at least four mice in each experiment were used and presented as mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ .

high TCR density could contribute to the strong signal they perceive at this stage and necessary for Egr2/PLZF expression and iNKT cells subset differentiation. This model does not exclude the role of iNKT cell ligand (CD1d/ligand) at this stage or later stages of iNKT cell development. Based on our results we propose that high TCR density at early stages of iNKT cells development could participate in their entry to a specific developmental program and subsequent subset differentiation contributing to their so called « agonist selection ». This is prevented by the forced expression of the invariant V $\alpha$ 14 TCR in DP thymocytes of CD4-V $\alpha$ 14Tg mice where we observed a reduced TCR expression levels at stage 0

compared to the same stage in WT mice (average MFI: around 2000 versus 4000, respectively) (Fig. 7D). It is worth mentioning that this reduced TCR expression (by half) observed at stage 0 of development is more dramatic than the one previously observed at the subsequent stage 1 of development (see Fig. 6B). This indicates that iNKT cells from CD4-V $\alpha$ 14Tg mice are blocked in their development at stage 1 because of a reduced signal perceived at stage 0 (Fig. 7D). These cells however were able to enter the iNKT cells pool and not mainstream T-cell pool indicating that TCR signal, though reduced, is higher than the one perceived by mainstream T cells at the same stage and is thus necessary for their selection

but not sufficient for full differentiation resulting in the observed developmental block.

## Discussion

Mouse iNKT cell express a semi invariant TCR made of a constant alpha chain ( $\alpha$ -chain) and a variable beta chain. The importance of the alpha chain in driving the development of iNKT cells is exemplified by an increased iNKT cell population in  $V\alpha 14$ Tg mice [13]. It also indicates that iNKT cell development is dictated by TCR specificity (instructive model) rather than by a predefined program (precommitted model). Thus, although the contribution of the  $V\alpha 14$   $\alpha$ -chain in driving DP expressing this receptor to enter into an iNKT cell program is established, its role in the specification of iNKT cells is yet to be determined. The rationale for this question comes from the fact that some variation in the  $\alpha$ -chain could be observed at position 93 at the V-J junction and represents the major source of iNKT alpha chain variability. In fact, early studies showed that iNKT  $\alpha$ -chain is monomorphic, with a glycine in position 93 and an aspartate at position 94, with a single exception in which valine replaced glycine 93 [7]. Subsequent studies indicated that glycine 93 could also be replaced by an alanine or isoleucine [32]. The first  $V\alpha 14$ Tg mice we analyzed ( $V\alpha 11$ - $V\alpha 14$ ) express the rearranged  $\alpha$ -chain under a  $V\alpha 11$  promoter, rendering its expression early during development starting at the DN stage. The rearranged TCR have a glycine in position 93 and we hypothesized that if this alpha chain subtype supports the development of a distinct iNKT cell subset, iNKT cell development will be biased toward one of the iNKT cell subsets. Our results show that this is not the case because analysis of the  $V\alpha 11$ - $V\alpha 14$ Tg mice showed a normal distribution of iNKT cell subsets indicating that the  $\alpha$ -chain is not sufficient to promote the specification of iNKT cells. Presumably the conversion from glycine to a more hydrophobic amino-acid residue such as alanine, valine, and isoleucine did not alter significantly the interaction between the TCR  $\alpha$ -chain CDR3 region and CD1d allowing iNKT cell with the converted region to still be positively selected however without promoting a specific subset.

In a second  $V\alpha 14$ Tg mice, the  $\alpha$ -chain is expressed at the DP stage under the CD4 promoter [14]. Analysis of these CD4- $V\alpha 14$ Tg mice showed a block in early stages of iNKT cell development and an altered distribution of iNKT cell subsets. Previous reports indicated a developmental defect of iNKT cells in these mice but the nature of the defect was not studied [33, 34]. One could envisage that precursor iNKT cells are “waiting” to develop because the increased number of iNKT precursors has overfilled some sort of selection niche. We do not favor this possibility because precursor cells in these mice do not have an increased expansion potential ruling out the possibility of an increased generation of precursor cells. Also, the block could not be accounted for by a slower iNKT cells developmental maturation process, known to be age dependent [9, 18], since the defect is observed in young mice and remain uncorrected in old ones. Based on these observations, we expect that culture systems of iNKT cells on OP9-DL1 stromal cells will

show that stage 1 iNKT cells are reduced in their capacity to generate stage 2 cells. In our study, we observed a reduced capacity of iNKT cell precursors from CD4- $V\alpha 14$ Tg mice to generate stage 2 cells after adoptive transfer of BM cells into iNKT-deficient mice. This block is not corrected even though the inoculum contains 50% BM cells from WT mice indicating that the defect is intrinsic to the CD4- $V\alpha 14$ Tg iNKT cells. In addition to the block in the stage 1 to stage 2 transition, we observed in these mice a block in the transition from the IL-17Rb<sup>-</sup> to IL-17Rb<sup>+</sup> iNKT cells within the CD44<sup>low</sup> stage1 indicating an earlier block at this stage.

The presence of a block in CD4- $V\alpha 14$ Tg iNKT the development is counterintuitive. These mice were developed by the Bendelac group in order to have a development of iNKT cells the closest to normal mice. In fact, the  $V\alpha 14$  transgene in these mice is under the control of CD4 promoter rendering its expression at the DP stage, the timing where the alpha chain is expressed in physiological development, and avoiding its early expression at the DN stage like observed in conventional  $V\alpha 11$ - $V\alpha 14$  Tg mice where the transgene is under the control of the  $V\alpha 11$  promoter. Our results suggest at first that the timing of expression of the transgene could have an influence on iNKT cell specification. Detailed analysis of these mice showed a reduced PLZF expression related to a reduced TCR expression level in iNKT cells from CD4- $V\alpha 14$ Tg mice and provides a plausible explanation for the cause of this block. In fact, expression of PLZF in developing iNKT cells was shown to be epigenetically regulated and linked to TCR induction of *Egr2* necessary for PLZF gene expression [17]. PLZF directs the acquisition of several key components of the iNKT cell effector program during development, including functionality and migration properties [15, 16]. The relative efficiency of the CD4 promoter or competition for transcription factor could explain the reduced TCR expression in these mice. The generation of  $V\alpha 14$ Tg mice with a transgene under the control of other promoters expressed at the same timing (DP stage) will be of great interest to further understand the importance of TCR signaling in iNKT cell development.

Strong TCR signal is thought to be important for the development of iNKT cells, a process termed “agonist selection” [30]. This process leads also to the development of other nonconventional T-cell lineages with regulatory functions such as CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> intraepithelial lymphocytes (IEL) and Tregs [30, 35, 36]. For iNKT cells, the strong TCR signal could originate from the recognition of specific antigens presented by CD1d. This signal was shown to be potentiated by homotypic interactions between SLAM family members, notably SLAMF6 and to a lesser extent SLAMF1 [37]. As mentioned in the introduction, iNKT cells are selected by DP cortical thymocytes rather by epithelial cells [8]. We found that the expression of CD1d and SLAMF6 expression in these cells from CD4- $V\alpha 14$ Tg mice is similar to WT mice indicating that the selecting molecules are not at the origin of the developmental defect. However, although SLAMF6 expression is not altered in iNKT cells from CD4- $V\alpha 14$ Tg mice, TCR expression level is reduced in iNKT cells at early stages 0 and 1 of their development, the former being the closest stage to positive selection. Thus the iNKT cell defect in CD4- $V\alpha 14$ Tg mice is due to a reduced signal of the TCR

consequent to its reduced expression level at the DP stage and not to its timing of expression unless there is a short window before the DP stage where high TCR expression initiates agonist positive selection as suggested by some studies [38, 39].

The Hogquist group created a model in which TCR $\alpha$  expression would be delayed until the DP stage (as is the case in normal animals) using a Cre/lox-based conditional strategy [38]. They expressed the male HY TCR $\alpha$  at the DP stage of development (HY<sup>CD4</sup> mice). In this model, the defects in  $\beta$ -selection and lineage commitment observed in conventional HY transgenics were corrected. This study shows however that there is a developmental defect of nonconventional CD8 $\alpha\alpha^+$  IEL in HY<sup>CD4</sup> male mice. These cells are known to require a strong TCR signal for their development (agonist selection). The development of these cells is more efficient in HY male compared to HY female, however this higher efficiency is not observed in HY<sup>CD4</sup> male compared to HY<sup>CD4</sup> female indicating a less efficient selection of these cells. The hypothesis proposed to explain the defect in CD8 $\alpha\alpha^+$  IEL development is related to the timing of HY expression and suggest that its early expression is required for CD8 $\alpha\alpha^+$  IEL development. However, in this study, it was shown that HY<sup>CD4</sup> mice have a reduced TCR expression level at the DP and CD8SP cells compared to HY mice. Because CD8 $\alpha\alpha^+$  IEL cells need strong signal for their development, we hypothesized the possibility that the reduced TCR expression in these mice decreased TCR signaling and induced a less efficient selection of these cells. This makes a parallel with CD4-V $\alpha$ 14Tg mice where we observed a low TCR expression in iNKT cell precursors accompanied with a reduced TCR signaling and a defect in their selection keeping in mind that iNKT cells also require strong TCR signal for their selection like CD8 $\alpha\alpha^+$  IEL [30, 35, 36].

While the functional importance of ligand density on thymic development has been examined in several studies, the converse situation involving modulation of TCR density has not as much been explored. The approach employed in a published study is to cross two different TCR transgenic lines to generate dual TCR-expressing (DTE) mice, under the assumption that total TCR surface levels will remain constant [40]. Consistent with this expectation, it was found that in DTE mice expressing the class II restricted and class I restricted HY TCRs, the expression levels of both TCRs are reduced, albeit to different extents. The consequences of this reduced expression on the ability of transgenic TCRs to support positive and negative selection in the presence of one or two selecting ligands were examined. The study showed that lowering TCR expression levels reduces the efficiency of both processes, but cannot redirect thymocytes to a qualitatively different developmental fate. In other words, negatively selected cells could not be positively selected at a lower TCR expression level and vice versa. In our study, reduced TCR expression still allowed selection of iNKT cells but not their full differentiation into distinct subsets. Additionally, based on the expression of IL-17Rb and the transcription factors (TFs) T-bet and ROR $\gamma$ t defining iNKT1 and iNKT17, respectively, we described more precisely the developmental block of iNKT cells in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice. In fact, our results showed that the block at CD44<sup>low</sup> stage 1 in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice is related to an

earlier block before the acquisition of IL-17Rb at this stage and indicated to us that iNKT cell precursors in normal development pass through an IL-17Rb<sup>+</sup> stage at the CD44<sup>low</sup> stage 1 before acquiring specific TFs, mainly taking place at the CD44<sup>high</sup> stage 2 (see model Fig. 3C). This sequence show that all maturing iNKT cell precursors pass through an IL-17Rb<sup>+</sup> stage during development and completed previous studies regarding developmental steps during iNKT cell development [41, 42].

Because our experiments argue that reduced TCR signal during positive selection consequently to their reduced TCR expression affects iNKT cell differentiation, we tested if higher TCR expression on developing iNKT cells contributes to their agonist selection. We found that positively selected iNKT cells (Stage 0) have a higher TCR expression than mainstream T cells at the same stage (TCR<sup>int</sup>). This indicates that the strong TCR signal that iNKT cells perceive at positive selection [30] might originate in part from the high TCR expression levels of these cells and allowing their differentiation. The higher levels of TCR expression of iNKT cells at positive selection is capable of sustaining TCR engagement for longer period of time that in turn affect downstream transcriptional activity of Egr2. Acquiring high level of TCR expression by iNKT cells could be a consequence of the nature of iNKT TCR/CD1d interaction compared to TCR/MHC interaction [43]. Such an interaction allows GATA3 expression known to be expressed early in iNKT cell precursors. GATA3 is an autoactivator of its own expression [44] but also control surface TCR expression by binding to *Tcra* and *Tcrb* gene Loci [45, 46]. This might provide a feed-back loop allowing increased TCR surface expression and increased avidity for their cognate ligand. Our studies thus proposes a model where iNKT cell subset development is affected by the biophysical properties of the TCR-antigen-CD1d interaction and cell surface expression level and is in good agreement with recent findings [47–50].

Overall our study indicated that subtle variation in the canonical V $\alpha$ 14 alpha chain could not be at the origin of the development of specific iNKT cell subsets. It however indicates that TCR strength is critical for the specification of iNKT cells as, after being selected with a reduced TCR signal, iNKT cells in CD4-V $\alpha$ 14Tg mice are blocked at an early developmental stage. Our study thus proposes that higher TCR expression levels at positive selection could participate in physiological condition to the strength of TCR signal promoting agonist selection and subset differentiation of iNKT cells. This could apply for other innate subsets such as CD8 $\alpha\alpha^+$  IEL indicating that TCR expression should be differentially and tightly regulated during T cells development and its dysregulation could have consequences in repertoire composition and immune responses in mice and human.

## Materials and methods

### Mice

C57BL/6J (B6) mice were purchased from Janvier. J $\alpha$ 18KO [3] were a gift from M. Taniguchi (RIKEN, Yokohama, Japan).



V $\alpha$ 11-V $\alpha$ 14Tg mice on C57BL/6J background were described elsewhere [13]. CD4-V $\alpha$ 14Tg mice were purchased from the Jackson Laboratories and described elsewhere [14]. A scheme of CD4-V $\alpha$ 14Tg or V $\alpha$ 11-V $\alpha$ 14Tg  $\times$  C57BL/6J breeding pairs was set to generate littermates of mice of both genotypes. All mice were maintained under specific pathogen-free conditions, and experiments were performed in accordance with the Institutional Animal Care and Use Guidelines. The study was approved by the ethics committee “Comité d’Ethique Paris-Nord; C2EA-121,” affiliated to the “Comité National de réflexion Ethique en Expérimentation Animale (CNREEA) et au Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche.”

### Lymphocyte isolation, enrichment, and stimulation

Cell suspensions from thymus, spleen, or PLNs were prepared and stimulated with PMA/Ionomycin as previously described [4]. Enrichment in iNKT cells for some experiment was performed as described previously [19]. Cell sorting of iNKT cells was performed with a FACSAria III (BD Biosciences).

### Antibodies and flow cytometry

Before cell-surface staining, surface Fc receptors were saturated by incubation with CD16/CD32 (2.4G2) antibody for 15 minutes on ice. The following antibodies were used: AF700 TCR $\beta$  (H57-597), FITC CD69 (H1.2F3), BV421 CD4 (GK1.5), APC CD8 (53-6.7), BV510 HSA (M1/69), BV510 B220 (RA3-6B2), PerCP-eFluor 710 ROR $\gamma$ t (B2D), PeCy7 T-bet (eBio4B10), PE GATA3 (L50-823), PE PLZF (Mags.21F7), PE IL-17a (TC11-18H10), PeCy7 IFN- $\gamma$  (XMG1.2), BV421 IL-4 (11B11), PerCP-eFluor 710 IL-13 (eBio13A), AF647 IL17Rb (9B10), AF700 or PeCy7 CD44 (IM7), PeCy5 NK1.1 (PK136), APC CD5 (53-7.3), AF488 Nur77 (12.14), PE PD1 (J43), FITC Ki-67 (SolA15), PE CCR7 (4B12), PE or APC Rat IgG2a Isotype Control (R35-95), AF 488 Mouse IgG1 Isotype Control (P3.6.2.8.1), PE Hamster IgG2 Isotype control (B81-3); all were purchased from BD Biosciences, eBioscience, Biolegend, and R&D Systems. CD1d- $\alpha$ -GalCer or -PBS57 tetramers were produced with streptavidin-APC, -PE or -BV421 (BD Biosciences). For intranuclear staining, cells were fixed and permeabilized using the Foxp3 staining kit (eBioscience). Intracellular cytokine staining was performed as described previously [4, 18]. Flow cytometry was performed using a 4-laser Fortessa cytometer (BD Biosciences), analyzed using FACSDiva software v8 (BD Biosciences). We have adhered to the “Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies” [52]

### Microarray

RNA was extracted from FACS-sorted tet<sup>+</sup> from thymus of WT or CD4-V $\alpha$ 14Tg mice with TRIzol reagent (Invitrogen) followed by column purification using RNeasy mini Kit (QIAGEN). RNA

samples were hybridized on MoGene2.0.st chips (Affymetrix). Raw chip data preprocessing and quantile-normalization were performed using RMA. Gene level data were then expressed on the log<sub>2</sub> scale and annotated using Affymetrix MoGene2.0.st library files. Metabolic pathway analysis was performed using the GSEA [51] and significance assessed using 1000 gene set permutations.

### Statistical analysis

Statistical tests were performed using the two sided nonparametric Mann–Whitney *U* test using Prism 6.05 (GraphPad). A *p* value <0.05 was considered significant.

**Acknowledgments:** We would like to thank IUH genomic and FACS facility, particularly Niclas Setterblad, Christelle Doliger, and Sophie Duchez; IUH animal facility, and Marika Pla. We are especially indebted to the NIH Tetramer Facility for providing CD1d-tetramers. This work was supported by INSERM, idex-SLI, idex-MelaTNK (K.B. and J.K.), Université Paris Diderot, Ministère de l’Enseignement supérieur, de la Recherche et de l’Innovation (L.A.).

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

### References

- 1 Bendelac, A., Rivera, M. N., Park, S. H. and Roark, J. H., Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 1997. **15**: 535–562.
- 2 Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H. et al., CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997. **278**: 1626–1629.
- 3 Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y. et al., Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 1997. **278**: 1623–1626.
- 4 Doisne, J. M., Soulard, V., Becourt, C., Amniai, L., Henrot, P., Havenar-Daughton, C., Blanchet, C. et al., Cutting edge: crucial role of IL-1 and IL-23 in the innate IL-17 response of peripheral lymph node NK1.1-invariant NKT cells to bacteria. *J. Immunol.* 2011. **186**: 662–666.
- 5 Li, S., Joseph, C., Becourt, C., Klibi, J., Luce, S., Dubois-Laforgue, D., Llarger, E. et al., Potential role of IL-17-producing iNKT cells in type 1 diabetes. *PLoS One* 2014. **9**: e96151.
- 6 Terashima, A., Watarai, H., Inoue, S., Sekine, E., Nakagawa, R., Hase, K., Iwamura, C. et al., A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. *J. Exp. Med.* 2008. **205**: 2727–2733.
- 7 Lantz, O. and Bendelac, A., An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class

- I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J. Exp. Med.* 1994. **180**: 1097–1106.
- 8 **Bendelac, A.**, Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J. Exp. Med.* 1995. **182**: 2091–2096.
- 9 **Benlagha, K., Kyin, T., Beavis, A., Teyton, L. and Bendelac, A.**, A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* 2002. **296**: 553–555.
- 10 **Lee, Y. J., Holzzapfel, K. L., Zhu, J., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A.**, Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. *Nat. Immunol.* 2013. **14**: 1146–1154.
- 11 **Wang, H. and Hogquist, K. A.**, CCR7 defines a precursor for murine iNKT cells in thymus and periphery. *Elife* 2018. **7**: e34793.
- 12 **Gapin, L., Matsuda, J. L., Surh, C. D. and Kronenberg, M.**, NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat. Immunol.* 2001. **2**: 971–978.
- 13 **Bendelac, A., Hunziker, R. D. and Lantz, O.**, Increased interleukin 4 and immunoglobulin E production in transgenic mice overexpressing NK1 T cells. *J. Exp. Med.* 1996. **184**: 1285–1293.
- 14 **Griewank, K., Borowski, C., Rietdijk, S., Wang, N., Julien, A., Wei, D. G., Mamchak, A. A. et al.**, Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development. *Immunity* 2007. **27**: 751–762.
- 15 **Kovalovsky, D., Uche, O. U., Eladad, S., Hobbs, R. M., Yi, W., Alonzo, E., Chua, K. et al.**, The BTB-zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions. *Nat. Immunol.* 2008. **9**: 1055–1064.
- 16 **Savage, A. K., Constantinides, M. G., Han, J., Picard, D., Martin, E., Li, B., Lantz, O. and Bendelac, A.**, The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity* 2008. **29**: 391–403.
- 17 **Seiler, M. P., Mathew, R., Liszewski, M. K., Spooner, C. J., Barr, K., Meng, F., Singh, H. et al.**, Elevated and sustained expression of the transcription factors Egr1 and Egr2 controls NKT lineage differentiation in response to TCR signaling. *Nat. Immunol.* 2012. **13**: 264–271.
- 18 **Doisne, J. M., Becourt, C., Amniai, L., Duarte, N., Le Ludec, J. B., Eberl, G. and Benlagha, K.**, Skin and peripheral lymph node invariant NKT cells are mainly retinoic acid receptor-related orphan receptor ( $\gamma$ )t+ and respond preferentially under inflammatory conditions. *J. Immunol.* 2009. **183**: 2142–2149.
- 19 **Benlagha, K., Wei, D. G., Veiga, J., Teyton, L. and Bendelac, A.**, Characterization of the early stages of thymic NKT cell development. *J. Exp. Med.* 2005. **202**: 485–492.
- 20 **Lee, Y. J., Starrett, G. J., Lee, S. T., Yang, R., Henzler, C. M., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A.**, Lineage-specific effector signatures of invariant NKT cells are shared amongst  $\gamma$ ammadelta T, innate lymphoid, and Th cells. *J. Immunol.* 2016. **197**: 1460–1470.
- 21 **Matsuda, J. L., Zhang, Q., Ndonye, R., Richardson, S. K., Howell, A. R. and Gapin, L.**, T-bet concomitantly controls migration, survival, and effector functions during the development of Valpha14i NKT cells. *Blood* 2006. **107**: 2797–2805.
- 22 **Michel, M. L., Mendes-da-Cruz, D., Keller, A. C., Lochner, M., Schneider, E., Dy, M., Eberl, G. et al.**, Critical role of ROR- $\gamma$ t in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008. **105**: 19845–19850.
- 23 **Townsend, M. J., Weinmann, A. S., Matsuda, J. L., Salomon, R., Farnham, P. J., Biron, C. A., Gapin, L. et al.**, T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity* 2004. **20**: 477–494.
- 24 **Drennan, M. B., Franki, A. S., Dewint, P., Van Beneden, K., Seeuws, S., van de Pavert, S. A., Reilly, E. C. et al.**, Cutting edge: the chemokine receptor CXCR3 retains invariant NK T cells in the thymus. *J. Immunol.* 2009. **183**: 2213–2216.
- 25 **Gordy, L. E., Bezbradica, J. S., Flyak, A. I., Spencer, C. T., Dunkle, A., Sun, J., Stanic, A. K. et al.**, IL-15 regulates homeostasis and terminal maturation of NKT cells. *J. Immunol.* 2011. **187**: 6335–6345.
- 26 **Brennan, P. J., Brigl, M. and Brenner, M. B.**, Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* 2013. **13**: 101–117.
- 27 **Lesourne, R., Uehara, S., Lee, J., Song, K. D., Li, L., Pinkhasov, J., Zhang, Y. et al.**, Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nat. Immunol.* 2009. **10**: 840–847.
- 28 **Carr, T., Krishnamoorthy, V., Yu, S., Xue, H. H., Kee, B. L. and Verykokakis, M.**, The transcription factor lymphoid enhancer factor 1 controls invariant natural killer T cell expansion and Th2-type effector differentiation. *J. Exp. Med.* 2015. **212**: 793–807.
- 29 **Mao, A. P., Constantinides, M. G., Mathew, R., Zuo, Z., Chen, X., Weirauch, M. T. and Bendelac, A.**, Multiple layers of transcriptional regulation by PLZF in NKT-cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2016. **113**: 7602–7607.
- 30 **Moran, A. E., Holzzapfel, K. L., Xing, Y., Cunningham, N. R., Maltzman, J. S., Punt, J. and Hogquist, K. A.**, T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J. Exp. Med.* 2011. **208**: 1279–1289.
- 31 **Van De Wiele, C. J., Marino, J. H., Murray, B. W., Vo, S. S., Whetsell, M. E. and Teague, T. K.**, Thymocytes between the beta-selection and positive selection checkpoints are nonresponsive to IL-7 as assessed by STAT-5 phosphorylation. *J. Immunol.* 2004. **172**: 4235–4244.
- 32 **Shimamura, M., Miura-Ohnuma, J. and Huang, Y. Y.**, Major sites for the differentiation of V alpha 14(+) NKT cells inferred from the V-J junctional sequences of the invariant T-cell receptor alpha chain. *Eur. J. Biochem.* 2001. **268**: 56–61.
- 33 **Lee, Y. J., Wang, H., Starrett, G. J., Phuong, V., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A.**, Tissue-specific distribution of iNKT cells impacts their cytokine response. *Immunity* 2015. **43**: 566–578.
- 34 **Yue, X., Izcue, A. and Borggrefe, T.**, Essential role of mediator subunit Med1 in invariant natural killer T-cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011. **108**: 17105–17110.
- 35 **McDonald, B. D., Bunker, J. J., Ishizuka, I. E., Jabri, B. and Bendelac, A.**, Elevated T cell receptor signaling identifies a thymic precursor to the TCRalpha(+)CD4(-)CD8beta(-) intraepithelial lymphocyte lineage. *Immunity* 2014. **41**: 219–229.
- 36 **Stritesky, G. L., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A.**, Selection of self-reactive T cells in the thymus. *Annu. Rev. Immunol.* 2012. **30**: 95–114.
- 37 **Dutta, M., Kraus, Z. J., Gomez-Rodriguez, J., Hwang, S. H., Cannons, J. L., Cheng, J., Lee, S. Y. et al.**, A role for Ly108 in the induction of promyelocytic zinc finger transcription factor in developing thymocytes. *J. Immunol.* 2013. **190**: 2121–2128.
- 38 **Baldwin, T. A., Sandau, M. M., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A.**, The timing of TCR alpha expression critically influences T cell development and selection. *J. Exp. Med.* 2005. **202**: 111–121.
- 39 **Verstichel, G., Vermijlen, D., Martens, L., Goetgeluk, G., Brouwer, M., Thiault, N., Van Caeneghem, Y. et al.**, The checkpoint for agonist selection precedes conventional selection in human thymus. *Sci. Immunol.* 2017. **2**: eaah4232.
- 40 **Dave, V. P., Allman, D., Wiest, D. L. and Kappes, D. J.**, Limiting TCR expression leads to quantitative but not qualitative changes in thymic selection. *J. Immunol.* 1999. **162**: 5764–5774.
- 41 **Constantinides, M. G. and Bendelac, A.**, Transcriptional regulation of the NKT cell lineage. *Curr. Opin. Immunol.* 2013. **25**: 161–167.

- 42 **Gapin, L.**, Development of invariant natural killer T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2016. **39**: 68–74.
- 43 **Cantu, C., 3rd, Benlagha, K., Savage, P. B., Bendelac, A. and Teyton, L.**, The paradox of immune molecular recognition of alpha-galactosylceramide: low affinity, low specificity for CD1d, high affinity for alpha beta TCRs. *J. Immunol.* 2003. **170**: 4673–4682.
- 44 **Ouyang, W., Lohning, M., Gao, Z., Assenmacher, M., Ranganath, S., Radbruch, A. and Murphy, K. M.**, Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* 2000. **12**: 27–37.
- 45 **Ling, K. W., van Hamburg, J. P., de Bruijn, M. J., Kurek, D., Dingjan, G. M. and Hendriks, R. W.**, GATA3 controls the expression of CD5 and the T cell receptor during CD4 T cell lineage development. *Eur. J. Immunol.* 2007. **37**: 1043–1052.
- 46 **Wei, G., Abraham, B. J., Yagi, R., Jothi, R., Cui, K., Sharma, S., Narlikar, L. et al.**, Genome-wide analyses of transcription factor GATA3-mediated gene regulation in distinct T cell types. *Immunity* 2011. **35**: 299–311.
- 47 **Clancy-Thompson, E., Chen, G. Z., Tyler, P. M., Servos, M. M., Barisa, M., Brennan, P. J., Ploegh, H. L. et al.**, Monoclonal invariant NKT (iNKT) cell mice reveal a role for both tissue of origin and the TCR in development of iNKT functional subsets. *J. Immunol.* 2017. **199**: 159–171.
- 48 **Cruz Tleugabulova, M., Escalante, N. K., Deng, S., Fieve, S., Ereno-Orbea, J., Savage, P. B., Julien, J. P. et al.**, Discrete TCR binding kinetics control invariant NKT cell selection and central priming. *J. Immunol.* 2016. **197**: 3959–3969.
- 49 **Tuttle, K. D., Krovi, S. H., Zhang, J., Bedel, R., Harmacek, L., Peterson, L. K., Dragone, L. L. et al.**, TCR signal strength controls thymic differentiation of iNKT cell subsets. *Nat. Commun.* 2018. **9**: 2650.
- 50 **Michel, M. L., Lenoir, C., Massot, B., Diem, S., Pasquier, B., Sawa, S., Rignault-Bricard, R. et al.**, SLAM-associated protein favors the development of iNKT2 over iNKT17 cells. *Eur. J. Immunol.* 2016. **46**: 2162–2174.
- 51 **Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A. et al.**, Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005. **102**: 15545–15550.
- 52 **Cossarizza, A., Chang, H. D., Radbruch, A., Andr a, I., Annunziato, F., Bacher, P., Barnaba, V. et al.**, Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur. J. Immunol.* 2017. **47**: 1584–1797.

**Abbreviations:** DTE: dual TCR-expressing · GSEA: gene-set-enrichment analysis · IEL: intraepithelial lymphocytes · PLZF: promyelocytic leukemia zinc finger · PLN: peripheral lymph node · TF: transcription factor

**Full correspondence:** Dr. Kamel Benlagha, INSERM, UMR-1160, Institut Universitaire d'H ematologie, Inserm U1160, 1 Ave Claude Vellefaux, 75010 Paris, France  
e-mail: kamel.benlagha@inserm.fr

**Additional correspondence:** Dr. Jihene Klibi, INSERM, UMR-1160, Institut Universitaire d'H ematologie, Inserm U1160, 1 Ave Claude Vellefaux, 75010 Paris, France  
e-mail: klibi.jihene@yahoo.fr

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/eji.201848010>

Received: 13/11/2018

Revised: 27/2/2019

Accepted: 21/3/2019

Accepted article online: 26/3/2019

## PERSPECTIVE

## A focus on natural killer T-cell subset characterization and developmental stages

Jihene Klibi<sup>1,2</sup>, Ludivine Amable<sup>1,2</sup> & Kamel Benlagha<sup>1,2</sup>

1 INSERM, UMR-1160, Institut de Recherche St-Louis (IRSL), Paris, France

2 Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

## Keywords

Developmental stages, natural killer T cells, NKT cell subsets, NKT1, NKT17, NKT2

## Correspondence

Kamel Benlagha, Inserm U1160, 1 Avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France.  
E-mail: kamel.benlagha@inserm.frReceived 25 November 2019;  
Revised 3 and 18 February 2020;  
Accepted 20 February 2020

doi: 10.1111/imcb.12322

*Immunology & Cell Biology* 2020; 98:  
358–368

## Abstract

Almost 20 years ago, CD1d tetramers were developed to track invariant natural killer T (NKT) cells based on their specificity, and to define developmental steps during which differentiation markers and functional features are progressively acquired from early NKT cell precursor to fully mature NKT cell subsets. Based on these findings, a linear developmental model was proposed and subsequently used by all studies investigating the specific role of factors that control NKT cell development. More recently, based on intracellular staining patterns of lineage-specific transcription factors such as T-bet, GATA-3, promyelocytic leukemia zinc finger and ROR $\gamma$ t, a lineage differentiation model was proposed for NKT cell development. Currently, studies on NKT cells development present lineage differentiation model data in addition to the linear maturation model. In the perspective presented here, we discuss current knowledge relating to NKT cell developmental models and particularly focus on the approaches and strategies, some of which appear nebulous, used to define NKT cell developmental stages and subsets.

## INTRODUCTION

Mouse invariant natural killer T (NKT) cells are a subset of T lymphocytes which have been shown to play a significant role in innate and adaptive immune responses. Upon activation, NKT cells can rapidly produce a broad range of cytokines, making them contributors to various pathologies and instrumental in guiding immune responses.<sup>1</sup> Several subsets of NKT cells have been described and were shown to play various roles in normal and disease conditions because they produce different cytokines, and are found in multiple organs.<sup>2</sup>

Mouse NKT cells are born from CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> [double-positive (DP)] cortical thymocyte progenitors that express a semi-invariant T-cell receptor (TCR) composed of an invariant Va14-Ja18 chain paired with one of three Vb segments (Vb8, 2 or 7).<sup>3,4</sup> These cells are positively selected by glycolipid-presenting nonclassical class I CD1d molecules expressed on neighboring DP cortical thymocytes.<sup>1</sup> After positive selection, NKT cells enter a developmental program distinct from mainstream T cells. This program is driven by the transcription factor

promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF), which plays a significant role in the acquisition of their specific phenotypic and functional properties.<sup>5,6</sup> PLZF expression is controlled by the transcription factor Egr2, the expression of which is triggered by a high TCR signal perceived by NKT cell progenitors during selection.<sup>7</sup> PLZF controls the expression of multiple genes required for NKT cells to develop their specific phenotypic features, function and migration properties.<sup>5,6</sup> The expression of PLZF is not specific to NKT cells as it is also expressed by other innate-like T cells, such as cd T cells or mucosal-associated invariant T cells.<sup>6,8,9</sup>

The prototypical mouse NKT cell initially described expresses markers typical of the NK lineage such as NK1.1.<sup>1</sup> These cells were shown to produce mainly interferon- $\gamma$  and to play a role in tumor rejection. CD1d tetramers were used to track NKT cells based on their specificity and to show that following selection mature HSA<sup>low</sup> NKT cells progress through three developmental stages marked by the expression of the surface markers NK1.1 and CD44. Thus, stage 1 cells are CD44<sup>−</sup>NK1.1<sup>−</sup>. The acquisition of the activation marker CD44 indicates

transition to stage 2 cells, which are CD44<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>. Finally, stage 3, mature, NKT cells are CD44<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>.<sup>10</sup> Cells from both stages 1 and 2 are interleukin (IL)-7 responsive and consequently undergo a massive expansion. This intrathymic proliferation applies to other T-cell subsets such as regulatory T cells which also undergo agonist selection.<sup>11</sup> NK1.1 expression is acquired by NKT cells in the thymus or after migration to the periphery, marking the emergence of thymic and peripheral stage 3 invariant NKT (iNKT) cells, the former of which remain thymic resident.<sup>10,12</sup> Whereas stage 1 NKT cells produce T helper (Th) 2-type cytokines, stage 3 iNKT cells produce mainly Th1-type cytokines, and their generation is controlled by T-bet and IL-15.<sup>13</sup> Based on these findings, a linear developmental model was proposed and subsequently used in most studies investigating the specific role of factors that control iNKT cell development (Figure 1a).<sup>10</sup>

In addition to interferon- $\gamma$ -producing NK1.1<sup>+</sup> iNKT cells, we and others contributed to the description of a distinct iNKT cell subset producing IL-17.<sup>14,15</sup> These cells lack NK differentiation markers, but express the transcription factor ROR $\gamma$ t and markers related to the Th17 lineage such as IL-1R, CCR6 and CD103.<sup>14</sup>

Recently, these cells were shown to express the transmembrane (type I) heparan sulfate proteoglycan CD138 (syndecan-1), a member of the syndecan proteoglycan family.<sup>16</sup> These cells are mainly located in the lungs, peripheral lymph nodes and skin,<sup>14,15</sup> and are reported to be involved in inflammation, bacterial infection and autoimmunity.<sup>14,15,17,18</sup>

A third subset of iNKT cells with a “Th2-like” phenotype and function has also been described. These cells express high levels of the IL-25 receptor B (IL-17RB). They are enriched in the lung, produce IL-4 and IL-13 and have been linked to asthma.<sup>19</sup> Based on intracellular staining patterns of transcription factors such as T-bet, GATA-3, PLZF and ROR $\gamma$ t, the Hogquist group<sup>20</sup> distinguished these NKT subsets, designating them NKT1, NKT2 and NKT17. According to these staining patterns, NKT1 cells produce interferon- $\gamma$  and are defined as T-bet<sup>+</sup>PLZF<sup>low</sup>. NKT2 cells produce IL-4 and are defined as GATA-3<sup>high</sup>PLZF<sup>high</sup> cells. NKT17 cells produce IL-17 and are defined as ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>PLZF<sup>int</sup> cells. These subpopulations mirror the Th cell subgroups in that they produce Th1, Th2 and Th17-like cytokines, respectively. Based on these findings, the Hogquist group proposed a new developmental model for NKT cells. In

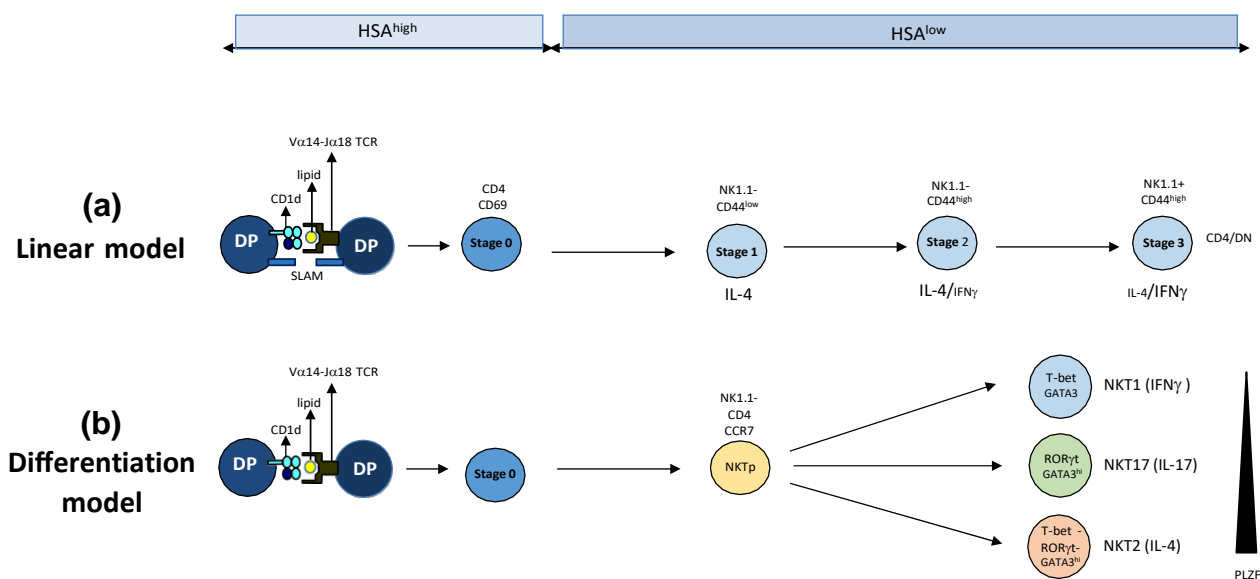


Figure 1. Linear and differentiation models of NKT cell development. (a) The linear development model uses the differentiation markers CD44 and NK1.1 to describe three steps through which NKT cells progress during their development. Stage 1 and 2 cells experience massive expansion before acquiring phenotypic and functional markers related to the NK lineage characterizing developmental stage 3 cells. (b) The differentiation model relies on intracellular staining patterns for lineage-specific transcription factors such as T-bet, GATA-3, PLZF and ROR $\gamma$ t. It also distinguishes three functional iNKT subsets in the thymus, designated as iNKT1, iNKT2 and iNKT17. NKTp represents precursors of NKT cell subsets defined by their CCR7 expression pattern. HSA<sup>high</sup> CD69 positive stage 0 cells are common to both models and represent positively selected NKT cells. DN, double negative; DP, double positive; HSA, heat-stable antigen; IFN, interferon; IL, interleukin; iNKT, invariant natural killer T cell; NKT, natural killer T cell; NKTp, natural killer T-cell precursors; PLZF, promyelocytic leukemia zinc finger; SLAM, signaling lymphocytic activation molecule; TCR, T-cell receptor.

this lineage differentiation model, terminally differentiated cells produce several cytokines derived from common precursors (Figure 1b).<sup>20</sup> A recent study indicated that, among PLZF<sup>high</sup> NKT cells, CCR7<sup>+</sup> cells serve as a common progenitor for NKT cells in this model.<sup>21</sup>

From this perspective, in this paper, we discuss current knowledge regarding NKT cell developmental models and emphasize their complementarity. To do so, we focus on approaches and strategies used to define NKT cell developmental stages and subsets, highlighting those that we consider misleading and/or confusing.

## NKT CELL SUBSET IDENTIFICATION: FOCUSING ON THE NKT2 SUBSET

NKT1 and NKT17 cells are unambiguously defined by their exclusive expression of transcription factors T-bet and ROR $\gamma$ t, related to their respective functions. By contrast, NKT2 cells have been more difficult to define as they express no exclusive transcription factors (Table 1). For example, GATA-3 is highly expressed in NKT2 and NKT17 cells, whereas it is expressed at low levels in NKT1 cells. All three subsets produce IL-4 upon stimulation.<sup>22</sup> However, only NKT2 cells were shown to actively produce IL-4 in the steady state. This property has been exploited to identify NKT2 cells, using hCD2-IL-4 reporter mice, where IL-4 production is signaled by surface expression of human CD2.<sup>21</sup> NKT2 cells have also been defined as cells expressing high levels of PLZF compared with iNKT17 and NKT1 cells, which express intermediate and low levels of PLZF, respectively.<sup>21</sup> Based on these profiles, NKT2 cells were identified as GATA-3<sup>high</sup>PLZF<sup>high</sup>ROR $\gamma$ t<sup>-</sup> iNKT cells in several studies based on intracellular GATA-3, PLZF and ROR $\gamma$ t staining. Our own results indicated that PLZF<sup>high</sup> NKT cells, which are assumed to be exclusively NKT2 cells, comprise T-bet<sup>+</sup> NKT cells regardless of mouse age. This duality of the population is illustrated in Figure 2, where 28% and 38% of ROR $\gamma$ t<sup>-</sup>PLZF<sup>high</sup> iNKT cells are T-bet<sup>+</sup> cells in 2- and 10-week-old mice, respectively (see also Supplementary methods). Similar results were observed with a different clone and fluorochrome used to detect PLZF and in BALB/c mice (not shown). These PLZF<sup>high</sup>T-bet<sup>+</sup> iNKT cells are mostly CD44<sup>high</sup> stage 2 NKT cells (around 75% and 90% of PLZF<sup>high</sup>T-bet<sup>+</sup> iNKT cells are CD44<sup>high</sup> in 2- and 10-week-old mice, respectively; see red gates in Figure 2) and probably represent maturing T-bet<sup>+</sup> NKT1 cells that will downregulate PLZF as they progress to developmental stage 3. These results suggest that PLZF expression levels are insufficient to define NKT2 cells. Among other transcription factors, NKT2 cells were also shown to express the lymphoid enhancer factor (LEF1).

LEF1 increases GATA-3 expression, promoting the development of NKT2 cells.<sup>23</sup> However, it is also detected in NKT1 and NKT17 cells, and has not been routinely used to define NKT2 cells. Consequently, intracellular staining using T-bet and ROR $\gamma$ t (and not PLZF) appears to be the best combination so far to define NKT2 cells. Nevertheless, this combination does not exclude NKT cell precursors (NKTp) that are mostly included among NKT2 cells because they have a similar profile with regard to T-bet, ROR $\gamma$ t and PLZF expression as they are also T-bet<sup>-</sup>ROR $\gamma$ t<sup>-</sup>PLZF<sup>high</sup>. These cells can be distinguished by their surface expression of CCR7.<sup>21</sup> However, because they likely represent a minor fraction in older mice, NKTp would not significantly change NKT cell subset distribution if they are not gated out by this specific marker. By contrast, because most NKTp are CD44<sup>low</sup>, it is important to take care when analyzing NKT cell subset distribution in newborn or young mice, where CD44<sup>low</sup> stage 1 NKT cells represent a considerable population.

Using surface markers rather than transcription factor staining to identify NKT2 cells has been difficult because these markers are shared by either one of the two other subsets (Table 1). Initial studies by the Taniguchi group<sup>24</sup> identified NKT2 cells as cells expressing CD4 and IL-17RB. However, these cells produce IL-17 in addition to IL-4 and other cytokines. This profile could be explained by the fact that ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> IL-17-producing cells could also express CD4,<sup>14,22</sup> and indicates that CD4 might not be a good marker to define NKT2 cells. This is exemplified in a study by Georgiev *et al.*,<sup>25</sup> using the NKT1 marker IL-2R $\beta$  CD122 (part of the IL-15R) and CD4 expression to define NKT2 cells. Isolated CD122<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> cells, thought to be NKT2 cells, produced IL-17A as a result of the inclusion of CD4<sup>+</sup> NKT17 cells.<sup>25</sup> IL-17RB is expressed on NKT17 cells in addition to NKT2 cells, but is absent from NKT1 cells and the majority of NKT17 cells from BALB/C mice.<sup>20</sup> The relationship between IL-17RB<sup>+</sup> and IL-17RB<sup>-</sup> NKT cells was proposed based on fetal thymic organ culture experiments. In these experiments, CD44<sup>low</sup> stage 1 IL-17RB<sup>-</sup> NKT cells were shown to give rise to stage 2 and stage 3 cells, with an IL-17RB<sup>-</sup> phenotype, indicating that IL-17RB<sup>-</sup> NKT cells are precursors of T-bet<sup>+</sup> NKT1 cells. By contrast, IL-17RB<sup>+</sup> NKT cells at the same stage 1 gave rise to IL-17RB<sup>+</sup> stage 2 but not stage 3 cells,<sup>24</sup> suggesting that IL-17RB<sup>+</sup> NKT cells are not T-bet<sup>+</sup> NKT1 cell precursors, and that IL-17RB<sup>+</sup> NKT cells arise in the thymus as a distinct subset from IL-17RB<sup>-</sup> NKT cells.<sup>24,26,27</sup> However, in a recent study, we showed that T-bet<sup>+</sup> NKT cells at the CD44<sup>low</sup> stage 1 express IL-17RB.<sup>28</sup> This result indicates that T-bet<sup>+</sup> and T-bet<sup>-</sup> NKT cell subpopulations probably branch off after IL-17RB downregulation, which starts at developmental stage 2

Table 1. Markers characterizing mature NKT1, NKT2 and NKT17 subsets assessed by surface or intracellular staining at steady state (active) or after stimulation (induced).

Unambiguous markers		Markers expressed in more than one subset
	Transcription factors	
T-bet (NKT1) (16) ROR $\gamma$ t (NKT17) (16)		GATA-3 (NKT1, NKT2, NKT17) (16) PLZF <sup>a</sup> (NKT1, NKT2, NKT17) (16) LEF1 <sup>a</sup> (NKT1, NKT2, NKT17) (19)
	Cytokines	
Interferon- $\gamma$ (NKT1) (16) IL-17 (NKT17) (16) Active IL-4 (NKT2) (16)		Induced IL-4 (NKT1, NKT2, NKT17) (18, 21)
	Surface markers	
NK1.1 (NKT1) (25) IL-2RB (NKT1) (16) CCR6 (NKT17) (11) CD138 (NKT17) (10)		CD4 <sup>a</sup> (NKT1, NKT2, NKT17) (16) CD44 <sup>b</sup> (NKT1, NKT2, NKT17) (16) IL-17RB <sup>c</sup> (NKT2, NKT17) (16, 25) CD27 (NKT1, NKT2) (16, 25) ICOS (NKT2, NKT17) (18, 25) CD43HG (NKT2, NKT17) (18) RankL (NKT2, NKT17) (17) PD-1 (NKT2, NKT17) (25) CCR4 (NKT2, NKT17) (25) IL-6RA (NKT2, NKT17) (21, 25)

IL, interleukin; NKT, natural killer T cell; NKTp, natural killer T-cell precursors; PLZF, promyelocytic leukemia zinc finger.

<sup>a</sup>Expressed in common CCR7<sup>+</sup> precursors (NKTp).

<sup>b</sup>Absent in NKTp.

<sup>c</sup>Expressed in all NKT subsets during their maturation.

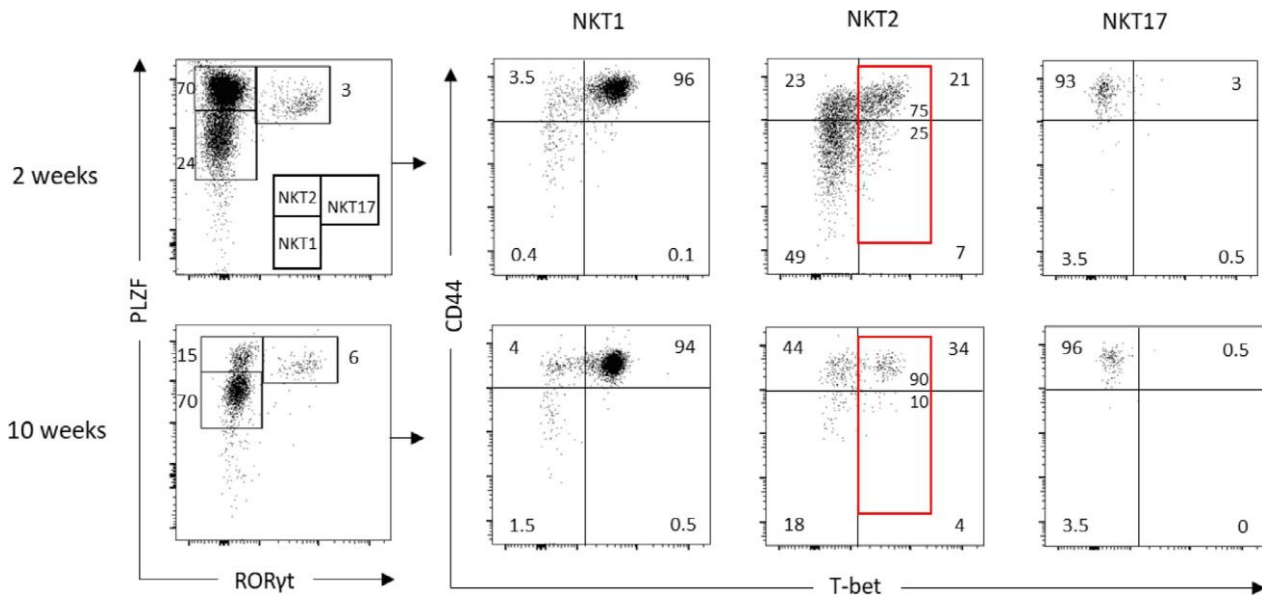


Figure 2. PLZF<sup>high</sup> NKT2 cells include T-bet<sup>+</sup> cells. Representative dot plots of T-bet intracellular staining gated on NKT1, NKT2 or NKT17 cell subsets from 2- or 10-week-old C57BL/6 mice. PLZF<sup>low</sup> NKT1 cells are mostly T-bet<sup>+</sup> and PLZF<sup>int</sup> NKT17 cells are mostly T-bet<sup>-</sup>. By contrast, PLZF<sup>high</sup> NKT2 cells, generally thought to be T-bet<sup>-</sup>, include T-bet<sup>+</sup> cells. Data are representative of five experiments using at least three mice per experiment. Numbers correspond to percentages. NKT, natural killer T cell; PLZF, promyelocytic leukemia zinc finger.

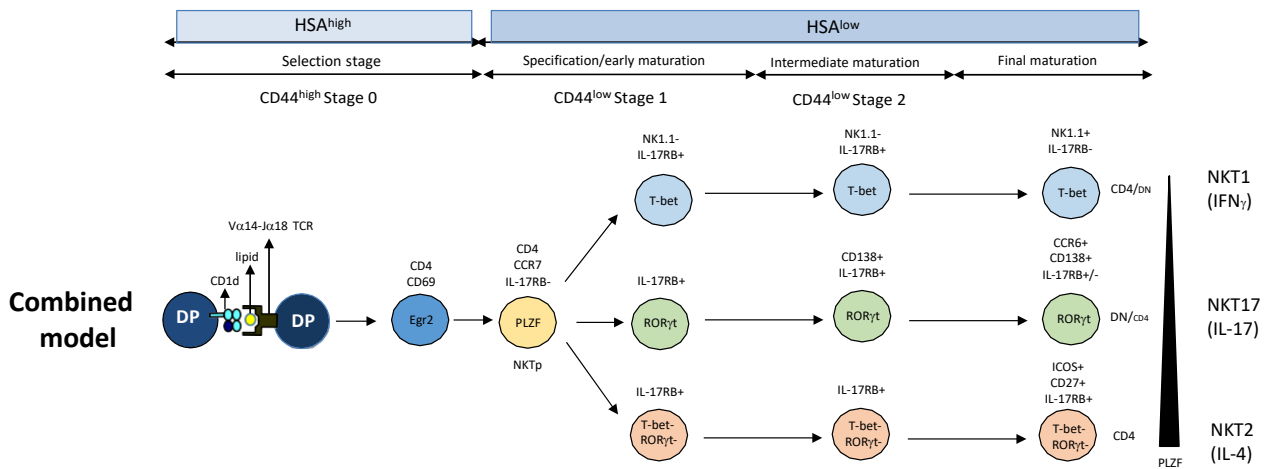


Figure 3. Combined model of NKT cell development. The combined model describes the development of NKT cell subsets through transcription factor expression patterns at the CD44<sup>low</sup> stage 1 and CD44<sup>high</sup> stage 2 of NKT cell development. CD138, syndecan-1; DP, double positive; HSA, heat-stable antigen; IL-17RB, IL-25 receptor b; NKT, natural killer T cell; NKTp, natural killer T-cell precursors; PLZF, SLAM, signaling lymphocytic activation molecule; TCR, T-cell receptor.

(illustrated in the combined model in Figure 3). This finding also indicates that IL-17RB alone cannot be used to distinguish NKT cell subtypes during early developmental stages.

Another surface marker, CD27, was shown to be expressed on NKT2 and NKT1 cells but absent from NKT17 cells.<sup>29</sup> To discriminate between NKT1 and NKT2 cells, Engel *et al.*<sup>29</sup> used CD27 in combination with NK1.1 and CD4 to purify NKT2 cells defined as NK1.1<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> cells. However, some of these cells expressed T-bet, indicating that they also included non- NKT2 cells, as this subset is not supposed to express this transcription factor. It is important to underline that the studies by Georgiev *et al.*<sup>25</sup> and Engel *et al.*<sup>29</sup> are not limited to the flow cytometry aspects presented here, but also use transcriptomics approaches that helped answer open questions and clarified developmental trajectories by establishing the transcriptional and epigenetic profiles of NKT cell subsets. The results presented showed that NKT cell subsets emerge from highly divergent gene programs, and identified candidate genes that may affect NKT cell development, migration or function. In both studies, several genes and/or their products were shown to be preferentially expressed on NKT2 cells, such as those coding for PD-1, RankL, CCR4, IL-6Ra and inducible co-stimulatory receptor (ICOS/CD278).<sup>25,29</sup> Most of these markers were also found to be expressed on NKT17 cells, although generally at a lower level (Table 1). A recent study used ICOS in combination with the 130-kDa highly glycosylated isoform of CD43 (CD43HG) to define three NKT cell subsets in BALB/c mice presenting differential expression profiles for these markers. These subsets

are CD43HG<sup>-</sup>ICOS<sup>lo</sup>, CD43HG<sup>int</sup> ICOS<sup>+</sup> and CD43HG<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> NKT cells, which correspondingly express T-bet<sup>+</sup>RORct<sup>-</sup>, T-bet<sup>-</sup>RORct<sup>-</sup> and T-bet<sup>-</sup>RORct<sup>+</sup>, thus aligning with NKT1, NKT2 and NKT17 cell subsets, respectively.<sup>22</sup> For C57BL/6 NKT cells, the distinction was less clear, and expression of CD43HG was determined on both NKT1 and NKT2 cells. In addition, the distinct distribution observed in the thymus of BALB/c mice was less clear in peripheral lymph nodes and liver. This result demonstrates that there is a strain- and tissue-specific limitation in the utility of CD43HG and ICOS when analyzing the distribution of NKT cells. Because a similar pattern of ICOS expression was observed in thymuses from B6 and BALB/c NKT cell subsets, ICOS could be combined with CD138 rather than CD43HG to study NKT cells distribution in both strains, because it was shown to be specifically expressed by NKT17 cells.<sup>16</sup> In any case, it is clear that further progress in the characterization of NKT2 cells must be made, which will require the discovery of more stringent markers of this lineage to allow us to unravel the different stages of its development.

### COMBINED MODEL FOR NKT CELL DEVELOPMENT

Currently, studies on iNKT cell development present data using a lineage differentiation model in addition to the linear maturation model (see Introduction and Figure 1). The linear maturation model was first developed more than 10 years ago to explain the maturation of NK1.1<sup>+</sup> NKT cells, hereafter NKT1 cells, because the work



supporting this model was performed prior to the description of mature NKT2 and NKT17 cells. In the linear maturation model, acquisition of CD44 reflects a maturational transition for NKT1 cells. In a recent study, we showed that acquisition of CD44 also reflects a maturational transition for NKT17 cells.<sup>30</sup> In fact, NKT17 cells at the CD44<sup>low</sup> stage are CD138<sup>−</sup>CCR6<sup>−</sup>, which express low levels of ROR $\gamma$ t correlating with low or no IL-17 production upon stimulation. When ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> iNKT cells progress from the CD44<sup>low</sup> to CD44<sup>high</sup> stage, they progressively acquire CD138 and CCR6. They also upregulate ROR $\gamma$ t expression and acquire the capacity to produce IL-17 upon stimulation. Based on this progression, CD44<sup>high</sup> stage 2 iNKT cells will comprise developmental intermediates of NKT1 and NKT17 cells. Whereas progressive expression of NK markers will result in the CD44<sup>high</sup>CD44<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> final maturation stage 3 of NKT1 cells, progressive acquisition of CCR6 and CD138 at the CD44<sup>high</sup> stage will lead to the final CD44<sup>high</sup>CCR6<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> maturation stage for NKT17 cells.<sup>30</sup> Thus, a maturation progression occurs for NKT17 cells, similar to what was initially described for NKT1 cells. A maturation sequence probably also occurs for NKT2 cells, but it has yet to be defined. In the lineage differentiation model, most NKT1 and NKT17 cells in adult mice express high levels of CD44 (CD44<sup>high</sup>); conversely, a substantial fraction of NKT2 cells (25% to 40%) express low levels of CD44 (CD44<sup>low</sup>).<sup>20,21</sup> Thus, in this model CD44 is not regarded as a maturational marker. In fact, NKT2 cells are defined as IL-4-producing cells, regardless of CD44 expression. In addition to NKT2 cells, another subset in this differentiation model is called NKTp, for NKT cell precursors. These cells express even lower levels of CD44.<sup>21</sup> In fact, most NKTp cells (around 75%) are CD44<sup>low</sup>, and these cells do not produce IL-4 or the IL-25 receptor B, IL-17RB, which is highly expressed on NKT2 cells.<sup>21,31</sup> However, they do express CCR7. Importantly, transfer experiments with CCR7<sup>+</sup>NKTp precursor cells demonstrated that these cells give rise to CD44<sup>high</sup> NKT1 cells, indicating that CD44 could also reflect a maturational progression for NKT cells in the lineage differentiation model, just like for the linear model.<sup>21</sup>

Based on this observation, we thought it would be useful to combine elements from both models to study iNKT cell development, like we did in recent studies where we analyzed NKT cell subset distribution and phenotype based on NKT transcription factor expression at both CD44<sup>low</sup> and CD44<sup>high</sup> stages.<sup>28,30</sup> A combined model based on the results of these studies is presented in Figure 3. For practical considerations, when studying NKT cell subset distribution in older C57BL/6 mice, where most NKT cells are CD44<sup>high</sup>, the lineage

differentiation approach could be helpful. However, the combined model will be more appropriate when studying early NKT cell developmental stages in younger mice, where NKT cells are frequently CD44<sup>low</sup> stage 1 NKT cells.

## NKT CELL IDENTIFICATION DURING POSITIVE SELECTION

Like conventional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, NKT cells originate from DP precursors following rearrangement of their TCR genes in the thymus. Results from intrathymic transfer experiments were the first to suggest that NKT cell precursors pass through a DP stage during their development.<sup>3</sup> In these experiments, sorted DP TCR $\beta$ <sup>−</sup> thymocytes from CD45.2 CD1<sup>−/−</sup> mice were injected into CD45.1 congenic mice, and CD4<sup>+</sup> or double-negative (DN) NKT cells of donor origin were subsequently detected in every organ tested. Most of these cells expressed NK1.1. These results were confirmed through the analysis of mature NKT cells in CD4-cre transgenic mice crossed with ROSA26 reporter mice, where green fluorescent protein (GFP) expression driven by the CD4 promoter is expressed specifically at the DP stage. In these mice, both CD4 and DN NKT cells expressed GFP, thus providing genetic evidence supporting the selection of NKT cell lineages from DP precursors.<sup>32</sup> A more recent study by Taniguchi's group<sup>33</sup> used a novel fate-mapping approach based on the study of E8<sub>III</sub>-Cre<sup>+</sup>Rosa26-YFP mice, where yellow fluorescent protein (YFP) expression is controlled by the E8<sub>III</sub> enhancer and promoter elements of the gene coding CD8a. Because of this control, YFP is expressed only in DP thymocytes. In these mice, DN YFP<sup>−</sup>, in addition to DN YFP<sup>+</sup>, iNKT cells were detected, suggesting that a small fraction of DN NKT cells could originate from a DN thymocyte stage of development. These findings were confirmed using E8<sub>III</sub>-Cre<sup>+</sup>Rag2<sup>fl/fl</sup> mice, where the Rag2 gene was conditionally ablated at the DP stage. In these mice, transcripts encoding the Va14-Ja18 achain of DN-stage origin were detected, demonstrating unambiguously that a fraction of DN NKT cells develop directly from DN-stage thymocytes bypassing the DP stage.

CD1d tetramer-based enrichment strategies allowed us to physically identify CD4<sup>+</sup>HSA<sup>high</sup> NKT cell precursors in thymuses from newborn mice.<sup>34</sup> Our original study proposed that the HSA<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup>, or stage 0, could represent a branch point between NKT and conventional T lineages. These cells are rare, because they are not cycling like their progeny at developmental stage 1, and they do not express CD44 or NK1.1 (see Introduction). However, they do express the early activation marker CD69, and high levels of Egr2, as found in a later study.<sup>7</sup>

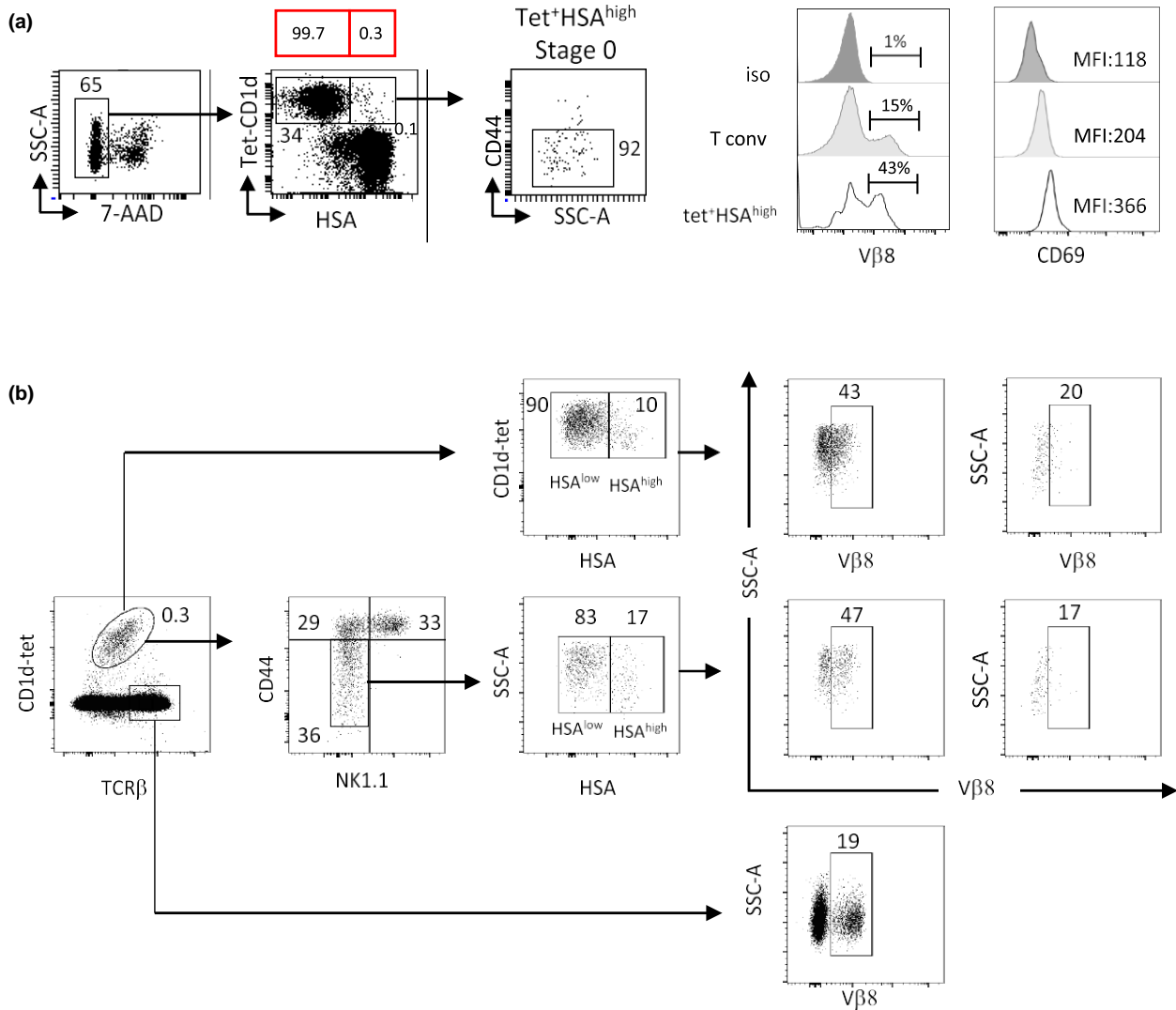


Figure 4. Study of NKT cells at HSA<sup>high</sup> stage 0. (a) Representative dot plots of Vb8 and CD69 staining on HSA<sup>high</sup>CD44<sup>low</sup> NKT cells gated on tetramer-positive (tet<sup>+</sup>) cells from 2-week-old mice pulled down with anti-APC microbeads after magnetic depletion of CD8<sup>+</sup> cells on an autoMACS system. The frequency of HSA<sup>high</sup> NKT cells among tet<sup>+</sup> NKT cells is 0.3%, which is calculated as follows: 0.1/0.1 + 34 9 100 (red gates). These cells show Vb8 bias, and are CD69<sup>+</sup>, indicating that they are *bona fide* NKT cells. (b) Representative dot plots of Vb8 staining on HSA<sup>high</sup> or HSA<sup>low</sup> NKT cells gated on tet<sup>+</sup>TCR<sup>+</sup> or tet<sup>+</sup>TCR<sup>+</sup> CD44<sup>low</sup> cells from 2-week-old mice after magnetic depletion of CD8<sup>+</sup> cells on an autoMACS system. No Vb8 bias was observed in HSA<sup>high</sup> NKT cells, just like for mainstream tet<sup>-</sup>TCR<sup>+</sup> T cells, indicating that these cells are not *bona fide* NKT cells. Data are representative of four experiments, where cells from five or eight mice were pooled per experiment. Numbers represent percentages. 7-AAD, 7-aminoactinomycin D; HSA, heat-stable antigen; MFI, mean fluorescence intensity; NKT, natural killer T cell; TCR, T-cell receptor; SSC, side scatter.

The expression of both molecules reflects a strong signal perceived at positive selection. Importantly, these cells display a bias in their Vb8 beta chain usage, indicating that they are *bona fide* NKT cells. An example of Vb8 bias and CD69 expression in HSA<sup>high</sup> NKT cells is shown in Figure 4a (see also Supplementary methods). The HSA<sup>high</sup> NKT cells we detected were not CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP cells because the NKT cell enrichment strategy we used

was based on CD8 cell depletion prior to pulling down CD1d tetramer-positive (tet<sup>+</sup>) cells (tetramerized with allophycocyanin) using anti-fluorochrome microbeads and the autoMACS system. Another enrichment strategy consisted in directly pulling down tet<sup>+</sup> cells using anti-fluorochrome magnetic beads without prior CD8 cell depletion.<sup>35</sup> This strategy revealed, among HSA<sup>high</sup> NKT cells, a subset of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells and a subset of

CD4<sup>lo</sup>DN cells, each of which represents around 50% of the HSA<sup>high</sup> NKT cells.<sup>36</sup> The DP subset does not express CD69 or Egr2, and was present in NKT cell-deficient mice (CD1d1d2<sup>-/-</sup> and Ja18<sup>-/-</sup> mice), indicating that they are nonspecific contaminants. By contrast, HSA<sup>high</sup> CD4<sup>low</sup>DN cells concomitantly express CD69 and Egr2 and are absent from NKT cell-deficient mice, which strongly supports their identity as true NKT cells, although Vb8 bias has not been assessed. These observations indicate that even when using an enrichment strategy, HSA<sup>high</sup> DP contaminant thymocytes may still be present, corresponding to around 50% of the enriched cell population. The rarity of NKT cells and their low level of TCR expression at the DP stage may make them difficult to detect. Indeed, some studies attempted to characterize HSA<sup>high</sup> NKT cells without using any enrichment strategy. For example, an early study by Michel *et al.*<sup>37</sup> detected HSA<sup>high</sup> NKT cells expressing CD8 and RORc1 (DP NKT cells). However, because all DP thymocytes express RORc1, the DP HSA<sup>high</sup> NKT cells may be contaminated with DP thymocytes. Although these cells did not bind unloaded CD1d tetramers, they have not been checked for Vb8 or CD69 expression. A more recent study analyzed the phenotype of HSA<sup>high</sup> NKT cells obtained without using an enrichment strategy, and found that stage 0 NKT cells consisted of CD44<sup>low</sup> and CD44<sup>high</sup> subpopulations, named stage 0a and stage 0b, respectively.<sup>38</sup> Both subsets express CD4 and CD8 and are thus HSA<sup>high</sup> DP thymocytes. These cells express CD69 at variable levels and are detectable in both C57BL/6 and BALB/c mice. Because these findings are novel, they will need to be confirmed by further analysis, and we strongly recommend any further study includes an assessment of Vb8 bias to confirm the nature of these cells.

In addition to studies aiming to detect and characterize HSA<sup>high</sup> NKT cells, many studies investigating the specific role played by factors controlling iNKT cell development assessed the proportion and absolute numbers of stage 0 iNKT cells. These studies used genetically modified mice compared with normal mice to determine whether these factors affected positive selection. The results in Figure 4a, from our laboratory, show that the proportion of HSA<sup>high</sup> NKT cells among NKT cells in normal 2-week-old C57BL/6 mice is low, at around 0.3% (see red gates). This result confirms our original study, where we reported the NKT cell proportion among NKT cells to vary between 0.2% and 0.5% in 2- to 5-week-old C57BL/6 mice.<sup>34</sup> However, numerous studies investigating NKT cell development report a higher proportion, varying from 3% to 17%.<sup>15,38–46</sup> The unusually high proportion of HSA<sup>high</sup> NKT cells reported in these studies may be a result of the absence of enrichment strategies or

inefficient application of such strategies, resulting in contamination of the HSA<sup>high</sup> NKT cell with conventional T cells or cortical thymocytes. Surprisingly, none of the studies reporting high proportions of this population assessed Vb8 expression to verify that the HSA<sup>high</sup> NKT cells are true NKT cells.

To demonstrate the importance of performing an enrichment strategy to study stage 0 NKT cells, we assessed Vb8 expression in HSA<sup>high</sup> NKT after CD8 depletion without applying CD1d tetramer pull down. The frequency of HSA<sup>high</sup> NKT cells among NKT cells in these conditions was 10%, which represents an unusually high frequency. In addition, no bias in Vb8 usage was found, with only 20% of HSA<sup>high</sup> NKT cells expressing Vb8. This proportion is similar to that measured for mainstream T cells, where 19% of cells express Vb8 (Figure 4b, upper and lower panels, and Supplementary methods). This contrasts with results for HSA<sup>low</sup> NKT cells, where a clear bias toward Vb8 usage is observed, with 43% of these cells expressing Vb8 (Figure 4b, upper panel). As HSA<sup>high</sup> NKT cells at stage 0 are CD44<sup>low</sup>, some studies have analyzed HSA<sup>high</sup> NKT cell from the pool of tet<sup>+</sup>TCRB<sup>+</sup>CD44<sup>low</sup> iNKT cells, as shown in Figure 4b, middle panel.<sup>47,48</sup> However, this strategy does not prevent contamination, because only 17% of CD44<sup>low</sup>HSA<sup>high</sup> NKT cells express Vb8. Thus, iNKT cells must be enriched if we wish to accurately study stage 0 iNKT cells and to unambiguously verify that these cells are NKT cells. The best way to do so, without resorting to intracellular staining, is to assess whether these cells show a Vb8 bias, and if they express CD69. The analysis should be performed on pulled down tet<sup>+</sup> cells after CD8 depletion, because *bona fide* NKT cells are obtained by applying this enrichment strategy. It should be mentioned that although Vb bias analysis might be technically simpler, at least for laboratories with more experience in flow cytometry methods as opposed to high-throughput sequencing techniques, it is less definitive than assessment of the alpha locus, where productive rearrangement events should be largely limited to Va14-Ja18 in a pure NKT preparation. Given the recent increase in accessibility of sequencing technologies required for such analyses, future studies examining extremely rare or difficult-to-purify NKT subsets should include TCR alpha locus analyses to conclusively establish the purity of the populations presented.

## THYMIC RESIDENCY/EMIGRATION OF NKT CELLS

Early studies, using intrathymic fluorescein isothiocyanate (FITC) injection to label thymocytes, showed that FITC<sup>+</sup> recent thymic emigrant (RTE) NKT cells detected 24 h

after injection into the spleen or liver corresponded to CD44<sup>high</sup>NK1.1<sup>-</sup> NKT cells. This result suggests that NKT cells leave the thymus at an intermediate stage 2 of development to migrate to peripheral organs, such as the spleen and liver, where they pursue their maturation to stage 3 NK1.1<sup>+</sup> NKT cells.<sup>10</sup> In parallel, NK1.1<sup>-</sup> stage 2 NKT cells mature in the thymus, where they become NK1.1<sup>+</sup> NKT cells, cease division and accumulate.

A recent study by the Hogquist group<sup>21</sup> used Rag2<sup>GFP</sup> molecular timers in addition to surface markers to delineate developmental trajectories. Using Rag2<sup>GFP</sup> C57BL/6 mice, where GFP expression is under the control of the Rag2 gene, the level of GFP expression indicates the age of the cell. Thus, the highest GFP expression corresponds to the most immature cells, and GFP expression decreases as the cells mature, being extinct in most mature cells. In these mice, the NKT cells expressing the highest GFP levels expressed heat-stable antigen (HSA) and CD69, indicating that they represent stage 0 cells. Furthermore, CCR7<sup>+</sup> NKT cells expressed high to intermediate levels of GFP, with no HSA or CD69 expression, suggesting that they derive from stage 0 NKT cells, and most importantly, are potential precursors of all NKT cell subsets. This possibility was directly tested by intrathymic transfer of CCR7<sup>+</sup> thymocytes into congenic hosts. Five days after transfer, all NKT cell subsets were detected, confirming the precursor hypothesis. The same study investigated the phenotype of iNKT cells emigrating from the thymus, based on intrathymic injection of a biotinylating agent (NHS-Biotin) in the Rag2<sup>GFP</sup> C57BL/6 mice and detection of RTE in the spleen via NHS-Biotin and GFP expression profiles.<sup>21</sup> Analysis of RTE NKT cells 24 h after injection showed that 50% of these cells express the NKTp marker CCR7. Moreover, CCR7<sup>+</sup> cells expressed higher levels of GFP than CCR7<sup>-</sup> RTE NKT cells. CD44 expression levels, as an indication of whether they leave the thymus at stage 1 or 2, were not determined for these cells.

Wang and Hogquist<sup>21</sup> also assessed the thymic residency potential of NKT cell subsets by generating parabiotic mice, where blood circulation is shared through surgical joining. Thymic analysis indicated that over 95% of NKT cells were of host origin. They are thus not circulating cells, and NKT cells in the thymus are probably largely tissue resident. To assess this hypothesis, NKT1 cells were injected intrathymically into a congenic host; 5 days after the transfer, NKT1 cells were not recovered from the spleen, confirming results from previous studies suggesting that they are retained in the thymus.<sup>10,12</sup> Wang and Hogquist also proposed that NKT2 and NKT17 cells could be thymus resident, like NK1.1<sup>+</sup> NKT1 cells. However, they did not perform

intrathymic transfer experiments to prove this residency, rather they hypothesized based on function in the thymus. This hypothesis was based on the absence of NKT cells in CD1<sup>-/-</sup> mice, where a specific reduction of Aire<sup>+</sup> medullary thymic epithelial cells is observed.<sup>49</sup> These medullary thymic epithelial cells depend on RankL for their development,<sup>49</sup> and consequently it was proposed that RankL-producing NKT2 and NKT17 subsets are thymus resident in C57BL/6 mice.<sup>21</sup> It is worth mentioning that RankL-producing NKT2 cells also produce IL-4, but do not promote the emergence of IL-4-dependent virtual memory CD8 T cells in C57BL/6 mice like they do in BALB/c mice.<sup>20</sup> This distinction between mouse strains makes the point that postulating on thymus residency based on modulation of thymic homeostasis could be misleading in certain cases. We recently performed bromodeoxyuridine (BrdU)-pulse-chase experiments to address this question.<sup>30</sup> The experiment consisted in giving water supplemented with BrdU for 2 weeks (pulse) followed by 2 weeks without BrdU (chase). If the frequency of BrdU<sup>+</sup> cells in any given NKT cell subset remained unchanged after 2 weeks of chase compared with analysis after 2 weeks of pulse, we considered it an indication that this subset is thymus resident. However, if the frequency is reduced, the subset likely emigrates from the thymus. Our results indicated that NKT17 cells emigrate from the thymus, as BrdU<sup>+</sup> NKT17 cells were fourfold lower after the chase period. By contrast, control NKT1 cells showed no change in the frequency of BrdU<sup>+</sup> cells.<sup>30</sup> The BrdU-pulse-chase experiment for NKT1 cells supports the results obtained through intrathymic transfer experiments or thymus transplantation, where NKT1 cells were reported to be thymus resident.<sup>10,12,50</sup> However, our results regarding NKT17 emigration do not support the hypothesis advanced by the Hogquist group.<sup>21</sup> Nevertheless, it is important to mention that BrdU-pulse-chase experiments should be interpreted with caution, as loss of BrdU could reflect differences in proliferation rather than reduced residency. In any case, these contrasting results stress the importance of addressing this question through transfer experiments or thymus transplantation studies, like those performed for NKT1 cells. These experiments should not only be performed in C57BL/6 mice, but also in other strains, such as BALB/c mice, where NKT2 and NKT17, but not NKT1, are the dominant NKT cell subsets. Indeed, the nonidentical NKT cell subset compositions and distributions in different mouse strains may reflect differential emigration capabilities. From this perspective, one study found that S1P1 messenger RNA expression, important for thymic emigration, was very low or undetectable in BALB/c but not in C57BL/6 mice

iNKT17 cells.<sup>25</sup> The same study also showed that iNKT17 RTE cells are more frequent in C57BL/6 than in BALB/c mice. These results indicate that iNKT17 cells emigrate inefficiently in BALB/c mice, potentially explaining why these cells are more frequent in the thymus of BALB/c mice compared with B6 mice. NKT17 transfer experiments in BALB/c mice will be essential to test this hypothesis, and other further studies are warranted to understand emigration potential and peripheral maturation of NKT cells in mice with differential distribution of NKT cell subsets.

## CONCLUDING REMARKS

Our understanding of NKT cell development has progressed dramatically since the development of CD1 tetramers, almost 20 years ago. The linear developmental model provided the scaffolding allowing investigators to understand the specific role of various factors in NKT cell development and identifying checkpoints during their development. The lineage differentiation model is very important, as its classification is based on transcription factors and thereby applies to multiple mouse strains. A judicious and rigorous exploitation of the two models should allow us to further advance our understanding of the rules governing the development of NKT cells. Innovative experimental systems and tools, in addition to progress in multicolor flow cytometry and genomics, will be key elements to further define NKT cell subsets and developmental stages, and this should allow us to exploit the NKT cell development process for therapeutic purposes.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank IRSL genomics and FACS facility, Niclas Setterblad, Christelle Doliger and Sophie Duchez; staff at IRSL animal facility, particularly Veronique Parietti. We are grateful to Bruno Canque, Anne Caignard, Saoussen Karray for discussion and advice. We are especially indebted to the NIH Tetramer Facility for providing CD1d tetramers, and to all members of the Benlagha group for helpful discussion. We could not have made so much progress without the constant presence and continuous support of Stoura Bellagha.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 535–562.

2. Crosby CM, Kronenberg M. Tissue-specific functions of invariant natural killer T cells. *Nat Rev Immunol* 2018; 18: 559–574.
3. Gapin L, Matsuda JL, Surh CD, Kronenberg M. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol* 2001; 2: 971–978.
4. Lantz O, Bendelac A. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> T cells in mice and humans. *J Exp Med* 1994; 180: 1097–1106.
5. Kovalovsky D, Uche OU, Eladad S, *et al.* The BTB-zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions. *Nat Immunol* 2008; 9: 1055–1064.
6. Savage AK, Constantinides MG, Han J, *et al.* The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity* 2008; 29: 391–403.
7. Seiler MP, Mathew R, Liszewski MK, *et al.* Elevated and sustained expression of the transcription factors Egr1 and Egr2 controls NKT lineage differentiation in response to TCR signaling. *Nat Immunol* 2012; 13: 264–271.
8. Kreslavsky T, Savage AK, Hobbs R, *et al.* TCR-inducible PLZF transcription factor required for innate phenotype of a subset of cd T cells with restricted TCR diversity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 12453–12458.
9. Lu Y, Cao X, Zhang X, Kovalovsky D. PLZF Controls the development of fetal-derived IL-17<sup>+</sup>Vc6<sup>+</sup> cd T cells. *J Immunol* 2015; 195: 4273–4281.
10. Benlagha K, Kyin T, Beavis A, Teyton L, Bendelac A. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* 2002; 296: 553–555.
11. Apert C, Romagnoli P, van Meerwijk JPM. IL-2 and IL-15 dependent thymic development of Foxp3-expressing regulatory T lymphocytes. *Protein Cell* 2018; 9: 322–332.
12. Berzins SP, McNab FW, Jones CM, Smyth MJ, Godfrey DI. Long-term retention of mature NK1.1<sup>+</sup> NKT cells in the thymus. *J Immunol* 2006; 176: 4059–4065.
13. Townsend MJ, Weinmann AS, Matsuda JL, *et al.* T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Va14i NKT cells. *Immunity* 2004; 20: 477–494.
14. Doisne JM, Becourt C, Amniai L, *et al.* Skin and peripheral lymph node invariant NKT cells are mainly retinoic acid receptor-related orphan receptor ct<sup>+</sup> and respond preferentially under inflammatory conditions. *J Immunol* 2009; 183: 2142–2149.
15. Michel ML, Keller AC, Paget C, *et al.* Identification of an IL-17-producing NK1.1<sup>neg</sup> iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med* 2007; 204: 995–1001.
16. Dai H, Rahman A, Saxena A, *et al.* Syndecan-1 identifies and controls the frequency of IL-17-producing naive natural killer T (NKT17) cells in mice. *Eur J Immunol* 2015; 45: 3045–3051.
17. Doisne JM, Soulard V, Becourt C, *et al.* Cutting edge: crucial role of IL-1 and IL-23 in the innate IL-17 response of peripheral lymph node NK1.1- invariant NKT cells to bacteria. *J Immunol* 2011; 186: 662–666.
18. Li S, Joseph C, Becourt C, *et al.* Potential role of IL-17-producing iNKT cells in type 1 diabetes. *PLoS One* 2014; 9: e96151.

19. Terashima A, Watarai H, Inoue S, *et al.* A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. *J Exp Med* 2008; 205: 2727–2733.
20. Lee YJ, Holzapfel KL, Zhu J, Jameson SC, Hogquist KA. Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. *Nat Immunol* 2013; 14: 1146–1154.
21. Wang H, Hogquist KA. CCR7 defines a precursor for murine iNKT cells in thymus and periphery. *Elife* 2018; 7.
22. Cameron G, Godfrey DI. Differential surface phenotype and context-dependent reactivity of functionally diverse NKT cells. *Immunol Cell Biol* 2018; 96: 759–771.
23. Carr T, Krishnamoorthy V, Yu S, Xue HH, Kee BL, Verykokakis M. The transcription factor lymphoid enhancer factor 1 controls invariant natural killer T cell expansion and Th2-type effector differentiation. *J Exp Med* 2015; 212: 793–807.
24. Watarai H, Sekine-Kondo E, Shigeura T, *et al.* Development and function of invariant natural killer T cells producing T<sub>H</sub>2- and T<sub>H</sub>17-cytokines. *PLoS Biol* 2012; 10: e1001255.
25. Georgiev H, Ravens I, Benarafa C, Forster R, Bernhardt G. Distinct gene expression patterns correlate with developmental and functional traits of iNKT subsets. *Nat Commun* 2016; 7: 13116.
26. Constantinides MG, Bendelac A. Transcriptional regulation of the NKT cell lineage. *Curr Opin Immunol* 2013; 25: 161–167.
27. Gapin L. Development of invariant natural killer T cells. *Curr Opin Immunol* 2016; 39: 68–74.
28. Joseph C, Klibi J, Amable L, *et al.* TCR density in early iNKT cell precursors regulates agonist selection and subset differentiation in mice. *Eur J Immunol* 2019; 49: 894–910.
29. Engel I, Seumois G, Chavez L, *et al.* Innate-like functions of natural killer T cell subsets result from highly divergent gene programs. *Nat Immunol* 2016; 17: 728–739.
30. Klibi J, Li S, Amable L, *et al.* Characterization of the developmental landscape of murine ROR $\gamma$ CT<sup>+</sup> iNKT cells. *Int Immunol* 2020; 32: 105–116.
31. Lee YJ, Starrett GJ, Lee ST, *et al.* Lineage-specific effector signatures of invariant NKT cells are shared amongst cd T, innate lymphoid, and Th cells. *J Immunol* 2016; 197: 1460–1470.
32. Egawa T, Eberl G, Taniuchi I, *et al.* Genetic evidence supporting selection of the V $\alpha$ 14i NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors. *Immunity* 2005; 22: 705–716.
33. Dashtsoodol N, Shigeura T, Aihara M, *et al.* Alternative pathway for the development of V $\alpha$ 14<sup>+</sup> NKT cells directly from CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> thymocytes that bypasses the CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> stage. *Nat Immunol* 2017; 18: 274–282.
34. Benlagha K, Wei DG, Veiga J, Teyton L, Bendelac A. Characterization of the early stages of thymic NKT cell development. *J Exp Med* 2005; 202: 485–492.
35. Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, *et al.* Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med* 2000; 192: 741–754.
36. Tuttle KD, Krovi SH, Zhang J, *et al.* TCR signal strength controls thymic differentiation of iNKT cell subsets. *Nat Commun* 2018; 9: 2650.
37. Michel ML, Mendes-da-Cruz D, Keller AC, *et al.* Critical role of ROR- $\gamma$ CT in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 19845–19850.
38. Kimura MY, Igi A, Hayashizaki K, *et al.* CD69 prevents PLZF<sup>hi</sup> innate precursors from prematurely exiting the thymus and aborting NKT2 cell differentiation. *Nat Commun* 2018; 9: 3749.
39. Cui Y, Chen X, Zhang J, *et al.* Uhrf1 controls iNKT cell survival and differentiation through the Akt-mTOR axis. *Cell Rep* 2016; 15: 256–263.
40. Malhotra N, Qi Y, Spidale NA, *et al.* SOX4 controls invariant NKT cell differentiation by tuning TCR signaling. *J Exp Med* 2018; 215: 2887–2900.
41. Orola MJ, Tizian C, Zhu C, *et al.* The zinc-finger transcription factor MAZR regulates iNKT cell subset differentiation. *Cell Mol Life Sci* 2019; 76: 4391–4404.
42. Ou X, Huo J, Huang Y, Li YF, Xu S, Lam KP. Transcription factor YY1 is essential for iNKT cell development. *Cell Mol Immunol* 2019; 16: 547–556.
43. Pyaram K, Kumar A, Kim YH, *et al.* Keap1-Nrf2 system plays an important role in invariant natural killer T cell development and homeostasis. *Cell Rep* 2019; 27: 699–707.e4.
44. Pyaram K, Sen JM, Chang CH. Temporal regulation of Wnt/b-catenin signaling is important for invariant NKT cell development and terminal maturation. *Mol Immunol* 2017; 85: 47–56.
45. Xu Y, Sun Y, Shen H, *et al.* Regulation of the terminal maturation of iNKT cells by mediator complex subunit 23. *Nat Commun* 2018; 9: 3875.
46. Yue X, Izcue A, Borggrete T. Essential role of Mediator subunit Med1 in invariant natural killer T-cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 17105–17110.
47. O'Hagan KL, Zhao J, Pryshchep O, Wang CR, Phee H. Pak2 controls acquisition of NKT cell fate by regulating expression of the transcription factors PLZF and Egr2. *J Immunol* 2015; 195: 5272–5284.
48. Thapa P, Manso B, Chung JY, *et al.* The differentiation of ROR- $\gamma$ CT expressing iNKT17 cells is orchestrated by Runx1. *Sci Rep* 2017; 7: 7018.
49. White AJ, Jenkinson WE, Cowan JE, *et al.* An essential role for medullary thymic epithelial cells during the intrathymic development of invariant NKT cells. *J Immunol* 2014; 192: 2659–2666.
50. McNab FW, Berzins SP, Pellicci DG, *et al.* The influence of CD1d in postselection NKT cell maturation and homeostasis. *J Immunol* 2005; 175: 3762–3768.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

© 2020 Australian and New Zealand Society for Immunology Inc.