

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : *Immunologie*

Par

**Jeanne PERROTEAU**

**Du développement des cellules iNKT humaines, à l'analyse de populations périphériques autoréactives.**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 18/10/2019

Unité de recherche : Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers (CRCINA) –  
UMR Inserm 1232, CNRS ERL 6001

## Rapporteurs avant soutenance :

Agnès LEHUEN Directrice de Recherche, CNRS, Institut Cochin, Paris  
André HERBELIN Directeur de Recherche, Inserm, IRTOMIT, Poitiers

## Composition du Jury :

Président :	Agnès LEHUEN	Directrice de Recherche, CNRS, Institut Cochin, Paris
Examineurs :	Fabienne HASPOT-DEGAUQUE	Chargée de Recherche, Inserm, CRTI, Nantes
	Christophe PAGET	Chargé de Recherche, Inserm, CEPR, Tours
Dir. de thèse :	Xavier SAULQUIN	Professeur universitaire, Université de Nantes
Co-dir. de thèse :	Laetitia GAUTREAU-ROLLAND	Maître de conférences universitaire, Université de Nantes

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement les membres de mon jury Agnès Lehuen, Fabienne Haspot-Degauque, André Herbelin et Christophe Paget pour avoir pris le temps d'évaluer mon travail de thèse.

Un remerciement supplémentaire à Fabienne, pour avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse, et avoir entendu parler de cellules iNKT pendant quatre ans. Toutes nos rencontres annuelles et autres échanges ont été un réel plaisir.

J'ai eu la chance, pour m'accompagner dans cette belle aventure, d'avoir deux directeurs de thèse pour m'encadrer. Laetitia, Xavier, merci pour m'avoir prise en stage il y a maintenant 6 ans de cela, pour m'avoir donné ma chance pendant mes années d'études, et finalement permis de faire une thèse à vos côtés. Je me souviens, comme si c'était hier, du jour où vous m'avez accompagnée à mon oral de l'école doctorale, j'avais comme l'impression que ma maman et mon papa m'accompagnaient à ma première rentrée scolaire ! Tout au long de ces années, vous avez su me transmettre votre goût pour la recherche et aussi pour l'enseignement, je vous en suis très reconnaissante. Malgré les hauts et les bas des résultats, vous m'avez toujours encouragée. Pas toujours simple non plus de s'adapter à vos emplois du temps chargés, mais grâce à ça j'ai pu gagner en autonomie. Et en retour merci de m'avoir laissée m'organiser comme je le voulais, parce que je l'admets je n'ai pas été une étudiante modèle, quand par exemple je terminais mes présentations orales à 13h55 pour 14h00, et que par conséquent vous alliez découvrir mon diapo en même temps que tout le monde ! Vous m'avez aussi permis de voyager en me laissant partir en congrès, ce furent des expériences inoubliables, je retiendrai forcément San Francisco en solo, mais aussi Amsterdam en sous-équipe. Merci pour tout !

Honneur aux femmes, et quelle FEMME ! Laetitia, je ne sais pas comment décrire notre relation, un subtil mélange entre collègue, amies, et bien plus encore ... Merci pour toute l'énergie que tu as dépensée pour moi, car je sais à quel point elle est précieuse pour toi. J'en profite pour m'excuser de t'avoir fait passer des petites nuits, quand tu as dû corriger mon rapport de master 1 ou plus récemment pour finaliser notre papier. Tu aimes rassembler les gens : les repas chez toi, l'escape-game, ou encore tes 10 ans de mariage, des moments fort sympathiques ! Tu m'as toujours soutenue, même en dehors du labo, au bord des terrains de hand, Hugo a raison « allez les jaunes ! ». Il y a quatre ans, tu m'avais

fait promettre de soutenir ma thèse un vendredi, alors voilà on y est et j'ai tenu ma promesse, j'espère maintenant que cette journée tiendra aussi toutes ses promesses ;-)  
Ah et une dernière chose, moi non plus je ne sais pas comment je vais faire sans toi, alors j'espère que, d'une manière ou d'une autre, tu ne resteras jamais très loin de moi ...

Xavier, je ne t'oublie pas bien sûr ! Merci à ta force de persuasion qui m'a très souvent convaincue avec raison, et à ta gourmandise aussi qui m'a permis de manger moins de sucreries parce que t'étais passé par là avant moi ;-)  
Je conserve précieusement le mail d'encouragements que tu m'avais envoyé avant les examens du master 2, je ne m'y attendais tellement pas et il a été d'un grand soutien. Comme je te le disais l'autre jour, lorsqu'on se remémorait des souvenirs, tu es mon mentor, je vais bientôt suivre tes pas jusqu'à Marseille, et qui sait peut-être encore après ...

Rien de tout cela n'aurait démarré, si tu n'avais pas été là Laurent ! D'ailleurs je crois que j'ai encore des batchs de tétramères que tu nous envoyais au début, bon pas sûr qu'aujourd'hui ils marquent grand-chose. Merci beaucoup de nous avoir guidé dans le monde des NKT, ton expertise nous a été précieuse. Je te remercie aussi d'avoir fait partie de mon comité de suivi thèse, malgré le décalage horaire et les dysfonctionnements de la visio-conférence ... Heureusement que tu étais là au congrès CD1-MR1 2017, merci d'avoir pris le temps de discuter avec moi, d'avoir récupéré mon poster, et de m'avoir ramenée à la gare routière. Bon je sais ce que tu vas me dire quand tu liras les résultats sur la partie développement : « Jeanne, Diva n'est pas un logiciel d'analyse de cytométrie en flux », oui je sais, mais moi je l'aime bien quand même ;-)

La dream-team comme j'aime à l'appeler : Laetitia, Leslie, Mélinda, Cassie, Lucile, Ulrich, Jocelyn, que de bons moments passés avec vous ! Des déjeuners toujours placés sous le signe de l'humour, ça me manque tellement. Des blagues à la pelle, un jeu du killer angoissant, des anecdotes pas piquées des vers, en somme des collègues formidables, qui donnent envie de venir au labo chaque jour.

Leslie l'éponge, un grand merci pour tout ce tu m'as apporté depuis le début et aujourd'hui encore. Vives les tétramères, les enrichissements immunomagnétiques et la cytométrie en flux ! Je ne suis pas encore venue te voir au pays des caribous, mais je garde ça dans un coin de ma thèse, ou sur un post-it ;-)  
Prends bien soin de toi et de ton petit poussin qui va bientôt arriver.

Mélinda, ça a été tellement dur quand tu es partie ... Avec toi c'était des jetés de boulettes de post-it, le cadeau d'un poisson rouge à Nico, le cache-cache de la bouteille d'Ulrich, les debriefs des séries télé et autres émissions, sans oublier des vendredis après-midi très prolifiques X) Pour tout ça, pour ta façon de prononcer « bocage », et tout le reste, merci beaucoup !

Cassie, c'est toujours un plaisir quand tu repasses nous voir au labo ! Merci à toi et ton portable pour avoir toujours su répondre à nos questionnements du déjeuner, j'ose pas imaginer la tête qu'avait ton historique de navigation X) Ta soirée d'après-thèse reste inoubliable, bon d'accord t'étais partie te coucher, mais nous on l'aura bien arrosée !

Contente de t'avoir retrouvée Lucile, avec ta joie de vivre et ton sourire ! Je crois que je n'oublierai jamais les fameux abricots de ton anniversaire qui étaient soi-disant pas si forts X)

Ulrich, mon co-équipier de hand, un sport, un vrai ! Je te remercie pas pour les choux de Bruxelles du midi, mais pour le reste si ;-)

Oh Djodjo, y'a pas moyen djodjo, la vie au labo est bien plus marrante avec toi. Voisin de module, mais pas seulement, voisin de rue aussi, merci de partager tes trajets en vélo avec moi ;-)

Tes jeux de mots et blagues vont me manquer c'est certain !

Mention spéciale à Pitou, qui a dû nous supporter avec Mélinda les fameux vendredis après-midi prolifiques X) Te souviens-tu du débrief de l'épisode 86 de la saison 162 de Grey's Anatomy ?! Merci d'avoir élucidé le message d'attente en anglais du CHU, maintenant je le connais par cœur : « We will answer your call in a moment », merci aussi de m'avoir congelé des cellules, j'ai encore ressorti quelques-unes de tes ampoules y'a pas longtemps, et merci pour tout le reste.

Marie-Claire, Régine et Marie-Claude, je crois qu'il y a un peu de ma maman dans chacune de vous, merci beaucoup pour tout ! Tout le temps que vous m'avez accordé et tous les précieux conseils que vous m'avez donnés.

Marie-Claire, nos discussions m'ont beaucoup enrichie, et merci d'avoir toujours été à mon écoute. Je me souviens encore que c'est toi qui m'as appris à entretenir des cellules Hela. Oups, je crois bien que pour ma première fois en solo j'ai dû les reprendre en milieu

RPMI ! Ma gourmandise pour les bonbons Haribo te remercie aussi d'avoir oublié d'éteindre le FACS ;-)

Quel bonheur de pouvoir partager la pièce de culture avec toi Régine ! Cette pièce aura été le lieu de beaucoup de nos discussions. Merci pour les fleurs dans les béciers ;-) Et quoique tu dises, t'es encore jeune !

Marie-Claude, merci pour ta bienveillance, et aussi pour les petits chocolats à la St Nicolas !

Ohlala Richard, c'est le seul passage que tu vas lire alors j'espère qu'il te plaira ;-) Je ne sais pas trop comment te remercier pour tout ce que tu m'as apporté, je crois que même un iceberg de marzipan ne suffirait pas ! Dernièrement, tu m'as permis de travailler à tes côtés et même à ta paillasse, et ça je ne l'oublierai pas, ainsi que toutes les blagues que tu as pu venir accrocher à mon bureau.

Tout a commencé avec toi Fabienne, il y a maintenant 7 ans, lorsque je suis venue pour un stage d'observation de quelques jours. Merci de m'avoir fait entrer dans l'équipe, parce que depuis je n'en suis jamais partie !

Béa et Henri, merci ! Notamment pour mon post-doc à Marseille, j'espère réussir à représenter dignement notre équipe.

Merci Emmanuel pour ton implication dans mon travail de thèse.

Je remercie aussi tous les autres membres de l'équipe que j'ai pu côtoyer, et les stagiaires que j'ai pu rencontrer.

Mais le labo, c'est pas seulement l'équipe ! Emilie, Kathleen, Agnès, Virginie, Nico, Romain, je suis super contente de vous avoir rencontré et d'avoir pu partager de bons moments avec vous.

Joëlle, vive le hand ! Yannick, on est d'accord que la piscine de Saint-Mars-La-Jaille est la meilleure ;-)

Un grand merci à tous ceux qui ont participé au projet de la fête de la science 2017, une expérience inoubliable !

Même si on ne s'est jamais vu, merci à toi « Virginie en salle 2 », et bien sûr à Céline et Régis, toujours de bonne composition.

La thèse a été une belle aventure pour moi, et vous y êtes grandement pour quelque chose les morues ! Quoique vous en pensiez maintenant, rappelez-vous qu'il y a un peu plus de 4 ans on n'imaginait pas pouvoir vivre ça ensemble, et finalement on l'a fait. Je crois que je ne suis jamais autant sortie, et que je n'ai jamais autant voyagé qu'avec vous les filles. Merci de m'avoir supportée à chaque moment, et même pendant mes matchs de hand. J'espère de tout cœur que notre amitié résistera au temps, et que dans 60 ans, quand on sera des mamies, on se remémorera les bons souvenirs autour d'un cassoulet de phacochère, avec un bouquet de rhododendrons en guise de décoration de table, sans oublier Justine qui nous relatera tous ses problèmes de fistule !

Justine en parlant de toi, heureusement que t'as été là, même sans être là physiquement ces derniers mois ! Un snap tous les jours, avec des châteaux, ou des tas de pierres, et des appels à n'en plus finir ... Comment ne pas repensez à nos jeudis soirs, où les autres morues nous ont lâchement abandonnées, elles auraient pas dû, elles le savaient pourtant X) Bon bah depuis, l'embuscade et le saucisson aux herbes sont bannis de mon régime alimentaire, et j'ai un T-shirt qui me sert de pyjama, ahah ^^ Merci pour m'avoir appris le bon sens pour faire les courses, même si on n'est toujours pas d'accord entre le rayon poisson et gâteaux apéros, « oui, oui, on fait nos courses ensemble, mais nan, nan on vit pas ensemble » ! J'aime bien quand tu ronchannes, un peu moins quand tu chantes les spice girls, j'adore quand tu cuisines, beaucoup moins quand tu mets des oignons, mais au final je t'aime comme tu es ;-)

Tu m'avais promis que tu serais là pour moi lors de ma dernière année, et tu as tenu parole ! Laetitia, je crois bien que tu as été celle qui m'a le plus gardée, je te tire mon chapeau ;-)

On est d'accord que le chasse-neige c'est pour les débutants, et que la sangria y'a que ça de vrai, même si je préfère quand même le punch X) J'adore quand tu essayes de me mener en bateau, parce que souvent je plonge, et il faut du temps pour connaître toutes tes facettes, mais au final je t'aime comme tu es ;-)

Andréa, t'étais là à mes 25 ans, mais déjà aussi à mes 20 ans, en fait t'es là depuis le début de la fac ! On ne s'est jamais lâchées, même si tu as fait le mauvais choix de partir en physiologie ;-)

Bon par contre t'étais pas là quand il fallait débarrasser la table au ski X) J'adore ton esprit synthétique, même si j'étais incapable de comprendre ta prise de notes, et je dois admettre que j'aime bien ta façon très personnelle de faire comprendre aux gens que tu n'es pas d'accord avec eux, au final je t'aime comme tu es ;-)

Laure, on s'est croisées pour la première fois en TD en master 1, et depuis on est toujours amies ! Tu as été une super collègue de classe, surtout pour les projets en anglais et en microbio X) Bon par contre tu te souviens que plus jamais je ne déménagerai ta potée ?! En parlant de déménagement, tu seras toujours la bienvenue à Marseille. Je t'ai connue au début très sage, et depuis tu vas de surprises en surprises, mais au final je t'aime comme tu es ;-)

Impossible de ne pas parler du hand, plus qu'un sport, c'est un club, une famille. Merci à tous ceux qui m'ont permis de me défouler, et de me libérer l'esprit tout au long de mes études. J'ai beaucoup appris sur moi-même et sur mes capacités !

Mallo, c'est bien plus que le hand qui nous lie aujourd'hui ! Avec toi c'est facile, peut-être parce qu'on est toujours d'accord, et pourtant on en parle des heures entières, sur un canapé, dans une voiture, et même sous le préau de la salle. Ça doit bien faire dix ans qu'on partage que des bons moments ensemble, et j'espère que c'est pas prêt de s'arrêter car n'oublie pas que Tac n'est jamais bien loin de Tic ;-)

Anaïs, merci d'être mon amie depuis le CP ! On se voit peut, mais généralement quand on se retrouve on se couche pas de bonne heure, comme quand on avait 12 ans X)

Merci à toute la famille, les tontons, les tatates, les cousins et cousines, de me demander régulièrement comment avancent mes études. Ça y est je vais enfin pouvoir vous dire que j'ai fini !

Un merci tout particulier aux Guérins, tous les 5 vous êtes très importants pour moi !

Papy et Mamie Crossouard, Papy et Mamie Perroteau, j'espère que vous êtes fiers de moi.

Merci à mon grand-frère Clément, et à Mélanie, d'être toujours là pour moi quand j'en ai besoin. C'est génial de pouvoir venir passer des vacances chez vous et se ressourcer. Merci aussi d'avoir agrandi la famille avec Joseph et Alexie, les deux plus beaux crapauds de la terre selon tata Jeannou !

Je ne remercierai jamais assez mes parents, qui m'ont toujours soutenue dans mes choix. Maman, Papa, sans vous je ne serai jamais arrivée jusqu'ici, vous avez toujours fait en sorte que je sois dans de bonnes conditions pour étudier. Merci de m'accueillir chaque week-end chez vous, mais bon je sais, j'ai 27 ans, il va être temps que je quitte le nid ! Vous êtes formidables <3

# Sommaire

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>2</b>
<b>SOMMAIRE</b>	<b>8</b>
<b>TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>13</b>
<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>18</b>
<b>PREMIERE PARTIE : DEFINITION ET CARACTERISTIQUES DES CELLULES NKT</b>	<b>19</b>
<b>I - LES CELLULES NKT DE TYPE I : iNKT</b>	<b>20</b>
1) LES RECEPTEURS DES CELLULES NK	21
a/ Le récepteur NK1.1 ou CD161	21
b/ Les autres récepteurs des cellules NK	22
2) LE TCR INKT SEMI-INVARIANT	22
3) LE COMPLEXE ANTIGENIQUE	24
a/ La restriction à la molécule de présentation CD1d	24
b/ Les antigènes glycolipidiques	26
1. Le mécanisme d'activation par des glycolipides exogènes	27
2. Le mécanisme d'activation par des glycolipides endogènes	27
3. L' $\alpha$ -galactosylcéramide	29
c/ La présentation antigénique et le mode de reconnaissance par le TCR	31
4) LES FONCTIONS DES CELLULES INKT	33
a/ La cytotoxicité	33
b/ La production de cytokines	34
c/ L'effet sur les autres acteurs de l'immunité	35
<b>II – LES AUTRES CELLULES NKT</b>	<b>37</b>
1) LES CELLULES NKT DE TYPE II	37
2) LES CELLULES NKT-LIKE	39
	8

<b>III – TABLEAU BILAN DES CARACTERISTIQUES PRINCIPALES DES CELLULES NKT</b>	<b>39</b>
<b>DEUXIEME PARTIE : DEVELOPPEMENT DES CELLULES INKT</b>	<b>40</b>
<b>I - LE DEVELOPPEMENT DES CELLULES INKT MURINES</b>	<b>40</b>
1) L'ORIGINE THYMIQUE DES CELLULES INKT MURINES	40
2) MODELE DE DEVELOPPEMENT DES CELLULES INKT	42
a/ Précurseur engagé ou commun aux cellules T $\alpha\beta$ classiques ?	44
b/ L'embranchement des cellules iNKT	45
3) LA SIGNATURE PLZF (PROMYELOCYTIC LEUKEMIA ZINC FINGER)	50
4) LA SIGNALISATION LORS DE LA SELECTION POSITIVE	51
5) LA SELECTION NEGATIVE	57
6) JUSQU'AUX SOUS-POPULATIONS DE CELLULES INKT	61
a/ Les cellules iNKT1, iNKT2 et iNKT17	61
b/ Les cellules iNKT <sub>FH</sub> et iNKT10	65
7) LA VOIE ALTERNATIVE DE DEVELOPPEMENT DES CELLULES INKT DN	65
<b>II - LE DEVELOPPEMENT DES CELLULES INKT HUMAINES</b>	<b>67</b>
<b>TROISIEME PARTIE : AUTOREACTIVITE DES CELLULES INKT</b>	<b>69</b>
<b>I- LES ORIGINES DE L'AUTOREACTIVITE</b>	<b>69</b>
1) LES LIGANDS ENDOGENES	69
2) LA CHAINE $\beta$ DU TCR INKT	73
<b>II- L'IMPLICATION DES CELLULES INKT DANS DES CONTEXTES PATHOLOGIQUES</b>	<b>75</b>
1) LES REACTIONS ALLERGIQUES	75
2) LA TOLERANCE A LA GREFFE	80
3) LA REPOSE ANTI-TUMORALE	81
4) LES MALADIES AUTO-IMMUNES	86
5) LA REPOSE ANTI-INFECTIEUSE	91
<b>PROJETS DE RECHERCHE</b>	<b>97</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>98</b>
<b>PREMIERE PARTIE : L'AUTOREACTIVITE DES CELLULES INKT HUMAINES</b>	<b>99</b>
	9

<b>DEUXIEME PARTIE : LE DEVELOPPEMENT DES CELLULES INKT HUMAINES</b>	<b>132</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>159</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>172</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>192</b>

# Table des figures et tableaux

Figure 1 Structure du CD1d murin.	25
Figure 2 Modèle d'activation des cellules iNKT par des glycolipides exogènes.	27
Figure 3 Modèle d'activation des cellules iNKT par des glycolipides endogènes.	28
Figure 4 Structure chimique de l' $\alpha$ GalCer.	29
Figure 5 Structure cristallographique du complexe hCD1d- $\alpha$ GalCer.	30
Figure 6 Structure de la cavité du CD1d humain chargé avec de l' $\alpha$ GalCer.	31
Figure 7 Comparaison des structures cristallographiques entre un TCR et son complexe antigénique.	32
Figure 8 Empreintes des contacts réalisés par un TCR iNKT sur un complexe CD1d- $\alpha$ GalCer.	33
Figure 9 Modèle de précurseur iNKT commun ou engagé proposé par Bendelac, Rivera, Park et Roark.	45
Figure 10 Modèle de développement des cellules iNKT CD4 <sup>+</sup> et DN matures selon Benlagha <i>et al.</i> .	49
Figure 11 Stades de développement des cellules iNKT selon les marqueurs CD24, CD44 et NK1.1.	50
Figure 12 Implication de la voie de signalisation Slam/SAP/Fyn suite à la sélection positive d'un précurseur iNKT par un thymocyte DP selon Lu <i>et al.</i> .	56
Figure 13 Modèle de développement des cellules iNKT selon les principaux marqueurs et les sous-populations finales.	64
Figure 14 Structure cristallographique d'un TCR iNKT murin contactant le mCD1d chargé avec du $\beta$ -GalCer.	70
Figure 15 Mécanismes d'action possibles des cellules iNKT dans la réponse anti-tumorale.	83
Figure 16 Schéma bilan des effets des cellules iNKT observés chez la souris et chez l'Homme dans les différents contextes pathologiques.	95
Figure 17 Schéma explicatif du protocole de dilacération mécanique des échantillons de thymus humains avec photo d'un échantillon avant dilacération.	133
Figure 18 Schéma représentatif d'un tétramère CD1d- $\alpha$ GalCer.	134
Figure 19 Schéma explicatif du protocole d'enrichissement immunomagnétique en cellules iNKT avec des tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer à partir d'échantillons de thymus humains.	135
Figure 20 Stratégie de sélection des thymocytes iNKT après double enrichissement immunomagnétique et marquages additionnels.	140
Figure 21 Fréquences des thymocytes iNKT totaux humains parmi les cellules CD3 <sup>+</sup> , et des compartiments iNKT DP (CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ), SP4 (CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> ), SP8 (CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> ) et DN (CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> ).	141
Figure 22 Répartition des différents compartiments iNKT DP, SP4, SP8 et DN au niveau thymique et en périphérie.	142
Figure 23 Fréquences des compartiments iNKT humains DP, SP4, SP8 et DN parmi les cellules CD3 <sup>+</sup> dans le thymus et le sang périphérique.	143
Figure 24 Schéma représentatif de l'expression séquentielle de différents marqueurs membranaires lors du développement thymique de cellules T $\alpha\beta$ conventionnelles humaines, et analysés pour le développement des thymocytes iNKT humains.	144
Figure 25 Marquage membranaire sur des thymocytes iNKT humains totaux.	145

Figure 26 Marquage membranaire sur les différents compartiments de thymocytes iNKT humains DP, SP4, SP8 et DN.	146
Figure 27 Marquage intracellulaire sur des cellules iNKT totales issues de sang périphérique humain.	148
Figure 28 Marquages intracellulaires sur des thymocytes iNKT totaux humains.	149
Figure 29 Contrôles de marquage des anticorps anti-T-bet et ROR $\gamma$ t.	150
Figure 30 Marquage CD1d sur des thymocytes totaux humains.	151
Figure 31 Marquage CD1d sur les différents compartiments DP, SP4, SP8 et DN à partir de thymocytes humains d'un donneur.	152
Figure 32 Vérification du phénotype iNKT des cinq lignées cellulaires de thymocytes générées.	154
Figure 33 Stratégie de sélection des thymocytes iNKT après enrichissement immunomagnétique et marquages additionnels pour tri cellulaire par cytométrie en flux.	154
Figure 34 Réactivité des cinq lignées de thymocytes iNKT.	156
Figure 35 Analyse fonctionnelle de la production de TNF $\alpha$ par les lignées de thymocytes iNKT #1 et #2.	156
Figure 36 Marquage SYK sur les cinq lignées de thymocytes iNKT.	157
Figure 37 Marquage SYK sur des thymocytes iNKT <i>ex vivo</i> .	158
Figure 38 Schéma de la signalisation TCR via la protéine kinase SYK.	162
Figure 39 Schéma des différents mécanismes, non exclusifs, identifiés comme étant impliqués dans l'autoréactivité des cellules iNKT.	164
Figure 40 Schéma de l'implication de la voie de signalisation SYK dans l'apparition de MAI.	166
Figure 41 Modèle de différenciation des cellules iNKT humaines au niveau thymique.	169
Tableau I Tableau bilan des caractéristiques principales des différents types de cellules NKT.	39
Tableau II Liste des différents anticorps utilisés lors des marquages membranaires et intracellulaires.	136

## Listes des abréviations

$\alpha$ GC ou  $\alpha$ GalCer :  $\alpha$ -GalactosylCéramide

$\alpha$ -Gal-A :  $\alpha$ -Galactosidase A

ACD : Allergic Contact Dermatitis, dermatite de contact allergique

$\beta$ 2-m :  $\beta$ 2-microglobuline

$\beta$ -GlcCer :  $\beta$ -GlucosylCéramide

$\beta$ -GalCer :  $\beta$ -GalactosylCéramide

BALF : BronchoAlveolar Lavage Fluid, fluides de lavages broncho-alvéolaires

BCR : B Cell Receptor

CAR : Chimeric Antigen Receptor, récepteur chimérique spécifique d'antigène

CD : Cellule Dendritique

CHS : Contact HyperSensibility

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

CVB4 : Coxsackievirus B4

DN : Double Négatif

DP : Double Positif

DUSP : DUal Specificity Phosphatase

EBA : Epidermolyse Bulleuse Acquise

Egr2 : Early growth response 2

eLPA : Acide ether-LysoPhosphatidique

FSC : forward scatter

FH : Follicular Helper

GFP : Green Fluorescent Protein, protéine fluorescente de couleur verte

GNPAT : dihydroxyacetonephosphate acyl-transferase

GVHD : Graft Versus Host Disease, maladie du greffon contre l'hôte

HAART : Highly Activated AntiRetroviral Therapy

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

IDO : Indoleamine 2,3-dioxygenase

Ig : Immunoglobuline

iGb3 : isoglobotrihexocylcéramide

IL-17RB : récepteur B de l'IL-17  
iNKT : invariant Natural Killer T  
ITSM : Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motifs  
LCMV : Lymphocytic ChorioMeningitis Virus, virus de la chorioméningite lymphocytaire  
LPC : LysoPhosphatidylCholine  
LPS : LipoPolySaccharides  
LSM : LysoSphingoMyéline  
MAI : Maladie Auto-Immune  
MAIT : Mucosal-Associated Invariant T  
MCL : Mantle Cell lymphoma , lymphome à cellules du manteau  
MDSC : Myeloid-Derived Suppressor Cell, cellule suppressive d'origine myéloïde  
MLR : Mixed Lymphocyte Reaction  
NOD : NonObese Diabetic  
NSG : NOD Scid Gamma  
PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern, motif moléculaire associé aux pathogènes  
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells, cellules mononucléées du sang périphérique  
PCR : Polymerase Chain Reaction, réaction en chaine par polymérase  
pDC : plasmacytoid Dendritic Cell, cellule dendritique plasmacytoïde  
PE : PhosphatidylEthanolamine  
PG : PhosphatidylGlycérol  
PI : PhosphatidylInositol  
PKC  $\zeta$  : Protéine Kinase C  $\zeta$   
pLPE : LysoPhosphatidylEthanolamine plasmalogène  
PLZF : Promyelocytic Leukemia Zing Finger  
PTK : Protéine Tyrosine Kinase  
RAG : Recombination Activating Genes  
ROS : Reactive Oxygen Species  
RT : Reverse Transcription, transcription inverse  
SAP : SLAM Associated Protein  
scFv : single-chain variable fragment, fragment variable d'une chaine d'un anticorps monoclonal  
SHP : Small Heterodimer Partner  
SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis

SLAM : Signaling Lymphocytic Activation Molecule

SSC : side scatter

SYK : Spleen Tyrosine Kinase

TAM : Tumor-Associated Macrophages, macrophages associés aux tumeurs

TAP : Transporteur de Peptides Antigéniques

TCR : T Cell Receptor

TLR : Toll Like Receptor

Treg : lymphocyte T régulateur

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

XLP : X-Linked Lymphoproliferative

YFP : Yellow Fluorescent Protein, protéine fluorescente de couleur jaune

## Avant-propos

J'ai effectué mes quatre années de doctorat à Nantes, au sein de l'équipe 1 du Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers (CRCINA), sous la direction du maître de conférences universitaire Laetitia Gautreau-Rolland et du professeur universitaire Xavier Saulquin. Une partie des travaux de l'équipe 1 est orientée vers l'étude de populations de lymphocytes T non conventionnels, et c'est dans ce contexte que s'insèrent mes travaux de thèse sur les cellules iNKT.

Mon projet de recherche visait à étudier les caractéristiques de lymphocytes iNKT humains autoréactifs. L'autoréactivité se définit par la capacité du système immunitaire d'un individu à s'activer en l'absence d'antigènes exogènes (contexte du Soi). Ce projet a démarré lors de mon stage de master 1, avec le test d'outils immunologiques permettant d'identifier des cellules iNKT potentiellement capables de s'activer dans le contexte du Soi. Il s'est poursuivi pendant mon stage de master 2, lors duquel j'ai pu générer des lignées cellulaires iNKT autoréactives à partir de prélèvements de sang humains. Mon travail de thèse a ensuite consisté à identifier les caractéristiques de ces cellules iNKT pouvant leur conférer ce potentiel autoréactif, et s'est élargi à l'étude du développement des cellules iNKT à partir d'échantillons de thymus humains.

Au cours de mon doctorat, j'ai eu la chance d'assister à des congrès scientifiques de grande envergure, comme le congrès de la Société Française d'Immunologie en 2016, le congrès spécialisé dans mon domaine de recherche CD1-MR1 en 2017, et le congrès européen d'immunologie en 2018. J'ai également participé au congrès nantais organisé par le Labex-IGO (Immunotherapy-Graft-Oncology), où j'ai pu présenter mes résultats lors d'une communication orale. En même temps que d'effectuer mes travaux de recherche, j'ai enseigné pendant trois années au sein de la Faculté des Sciences et des Techniques de l'Université de Nantes. L'expérience acquise auprès des étudiants et des enseignants-chercheurs lors de séances de TD, de TP ou de présentations orales de stage a été très enrichissante, et a rythmé mes journées de travail entre le laboratoire et la faculté. Je me suis également investie dans des projets de vulgarisation scientifique avec l'organisation,

la mise en place et la participation à des stands tenus par le laboratoire lors de la manifestation de la Fête de la Science à Nantes.

# **INTRODUCTION**

Le système immunitaire est souvent décrit comme composé de deux types d'immunités : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée a pour caractéristiques d'intervenir rapidement, en reconnaissant des motifs communs à différentes classes de pathogènes, mais sans conserver une mémoire de la rencontre avec ces pathogènes. L'immunité adaptative se met en place plus lentement, car elle nécessite la reconnaissance du pathogène, ou d'une partie du pathogène, par un récepteur spécifique. Néanmoins lors d'une nouvelle rencontre avec le même pathogène, elle agit plus rapidement car elle conserve une mémoire de la première rencontre.

A l'interface entre ces deux immunités, on trouve un ensemble de cellules, appelé « cellules T innées », dont les molécules de restriction sont conservées entre les individus. Cet ensemble comprend principalement les cellules iNKT, les cellules MAIT (pour Mucosal-Associated Invariant T) et les cellules T  $\gamma\delta$ , qui sont toutes aussi relativement conservées entre les individus, et qui peuvent représenter jusqu'à 10 à 20% des cellules T humaines. Ces cellules T ont la particularité de s'activer très rapidement et constituent un pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Gao and Williams, 2015; Gutierrez-Arcelus et al., 2019).

## **Première partie : Définition et caractéristiques des cellules NKT**

Les cellules NKT, pour Natural Killer T, sont des lymphocytes T situés à la frontière entre l'immunité innée et l'immunité adaptative puisqu'ils possèdent des caractéristiques propres à des effecteurs appartenant à ces deux types d'immunité. En effet, les lymphocytes NKT expriment des récepteurs des cellules NK, cellules de l'immunité innée, et de manière simultanée un récepteur des cellules T ou TCR (T Cell Receptor), cellules appartenant à l'immunité adaptative. Ces cellules sont retrouvées dans plusieurs espèces de mammifères comme la souris, le rat, l'Homme et d'autres primates.

Le terme de « cellules NK T » est apparu pour la première fois en 1995, dans l'étude de Makino *et al.* (Makino et al., 1995) où ils étudient une population nouvellement décrite de lymphocytes T  $\alpha\beta$  exprimant également le récepteur NK1.1. Une analyse approfondie de

la séquence du TCR de ces cellules leur a permis de mettre en évidence la présence en grande majorité de cellules exprimant le segment  $V\alpha 14$  associé au segment  $J\alpha 281$ , et dans une moindre mesure de cellules  $V\alpha 14$  négatives. Depuis, le terme de cellules NKT a été accepté, et selon la classification établie en 2004 par Godfrey *et al.* (Godfrey *et al.*, 2004), il existe 3 types de cellules NKT : les NKT de type I ou iNKT (invariant NKT) correspondant aux cellules  $V\alpha 14J\alpha 281^+$  de Makino, les cellules NKT de type II, et les cellules NKT-like.

Mon travail de thèse ne s'est porté que sur l'étude des cellules iNKT, c'est pourquoi je vais tout particulièrement m'attacher à la description de ce type de NKT, et passer rapidement en revue les caractéristiques des deux autres types.

## **I - Les cellules NKT de type I : iNKT**

C'est en 1987 qu'il est pour la première fois fait référence à une nouvelle population de thymocytes  $CD4^-CD8^-$  (DN pour double négatif) exprimant un TCR  $\alpha\beta$ , et dont la chaîne  $\beta$  est restreinte par l'utilisation du segment  $V\beta 8$  (Fowlkes *et al.*, 1987). Dans cette étude, il n'est pas fait mention de l'expression d'un récepteur de cellules NK, mais la restriction au segment  $V\beta 8$  laisse à penser que nous sommes bien en présence de cellules iNKT comme cela sera décrit par la suite (Première partie, I- 2), page 22).

Depuis le milieu des années 90, il est donc admis que les cellules iNKT constituent une population de lymphocytes à part entière et caractérisée par l'expression simultanée de récepteurs des cellules NK et d'un TCR. Ce TCR, de type  $\alpha\beta$ , a la particularité d'être semi-invariant d'où le nom de iNKT pour invariant NKT. De plus, les cellules iNKT sont restreintes par la molécule CD1d qui leur présente des antigènes de nature glycolipidique. Une fois activées, les cellules iNKT ont la capacité de produire de grandes quantités de cytokines et sont également cytotoxiques. La mise en évidence de ces caractéristiques va être décrite plus précisément dans les paragraphes qui vont suivre.

Les cellules iNKT sont présentes dans les organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse et thymus), mais également dans des organes périphériques comme le foie, la rate ou le

sang. Chez la souris, les cellules iNKT représentent entre 0,5 et 2,5% des lymphocytes T dans le thymus, la rate, le sang et la moelle osseuse, alors qu'elles sont présentes à plus de 25% parmi les lymphocytes T hépatiques (Bendelac et al., 2007; Hammond et al., 2001). Chez l'Homme, les cellules iNKT sont très peu présentes parmi les lymphocytes T, à savoir en moyenne 0,1% dans le sang périphérique, 0,5% dans le foie, 0,08% dans la rate et seulement 0,007% dans le thymus (Chan et al., 2013; Kenna et al., 2003).

## 1) Les récepteurs des cellules NK

L'expression de récepteurs des cellules NK par des cellules exprimant un TCR est le point commun à tous les types de cellules NKT, et cette caractéristique a constitué la première originalité de cette population de lymphocytes.

### a/ Le récepteur NK1.1 ou CD161

Suite au travail de Fowlkes *et al.*, Megan Sykes a publié une étude en 1990 (Sykes, 1990) dans laquelle elle met à nouveau en évidence la présence de cellules NK1.1<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>, cette fois-ci dans la moelle osseuse de souris. Les cellules iNKT étaient donc initialement définies comme des cellules T  $\alpha\beta$  exprimant le récepteur NK1.1, marqueur correspondant au CD161 chez l'Homme. Par la suite, l'étude de cette population reposait donc sur l'expression simultanée de ce récepteur et d'un TCR  $\alpha\beta$ .

Néanmoins, il a été montré à la fin des années 90 que toutes les cellules iNKT n'exprimaient pas le récepteur NK1.1, mais correspondaient pourtant bien à des lymphocytes iNKT du fait de l'expression d'un TCR semi-invariant restreint à la molécule CD1d (Hameg et al., 1999). De plus, l'expression du récepteur NK1.1 peut être perdue après activation des cellules iNKT (Chen et al., 1997). A l'inverse, toutes les cellules T  $\alpha\beta$  et NK1.1 positives ne sont pas forcément des cellules iNKT car elles peuvent exprimer un TCR variable non restreint à la molécule CD1d. C'est le cas par exemple lors d'une infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire qui engendre une expression de récepteurs NK par les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> conventionnels spécifiques du virus (Slifka et al., 2000). Il est donc apparu que le récepteur NK1.1 n'était pas suffisant

pour identifier toutes les cellules iNKT, et à l'inverse permettait même de mettre en évidence des cellules non iNKT, c'est pourquoi la nécessité de son expression a été abandonnée dans la définition des cellules iNKT (Hammond et al., 2001). A noter également que les premières études menées chez la souris ont été réalisées avec la souche C57BL/6 qui exprime le récepteur NK1.1, alors que d'autres souches, telles que BALB/c ou NOD<sup>1</sup>, ne l'expriment pas naturellement d'où l'importance d'utiliser d'autres marqueurs que le NK1.1 pour identifier les cellules iNKT chez la souris (Hammond et al., 2001). Ce fut par exemple le cas dans l'étude de Gombert *et al.* (Gombert et al., 1996), où un déficit numérique et fonctionnel en cellules iNKT, identifiées par l'expression des marqueurs CD44 et Ly49-A et l'absence d'expression de MEL-14 et 3G11, a pu être mis en évidence chez des souris NOD.

#### b/ Les autres récepteurs des cellules NK

Dans une moindre mesure, d'autres récepteurs des cellules NK peuvent être exprimés par les cellules iNKT. Le CD94 est en moyenne exprimé par 49% des cellules iNKT, alors que le CD69, exprimé également par d'autres types cellulaires, ne l'est qu'à 6,4% par les cellules iNKT (Gumperz et al., 2002). Chez la souris, des récepteurs inhibiteurs de la famille Ly49 sont diversement exprimés par les cellules iNKT (Sköld and Cardell, 2000). En effet, dans la rate et dans le foie, les cellules iNKT DN expriment ce type de récepteurs alors que ce n'est pas le cas des cellules iNKT CD4<sup>+</sup>. Dans le thymus et la moelle osseuse, les cellules iNKT expriment fortement le marqueur Ly49 indépendamment de l'expression du CD4.

## 2) Le TCR iNKT semi-invariant

Un TCR  $\alpha\beta$  est composé de deux chaînes associées par un pont disulfure : une chaîne  $\alpha$  construite par le réarrangement de segments géniques germinaux V, J et C $\alpha$ , et une chaîne  $\beta$  construite par le réarrangement de segments géniques germinaux V, D, J et C $\beta$ . Les

---

<sup>1</sup> Pour NonObese Diabetic, souris développant spontanément un diabète apparenté au diabète de type 1 chez l'Homme.

cellules iNKT ont la particularité d'exprimer un TCR très conservé que ce soit chez la souris comme chez l'Homme, d'où le nom de iNKT pour invariant NKT.

En 1992, Arase et ses collaborateurs (Arase et al., 1992) se sont attachés à étudier les caractéristiques du TCR d'une population de cellules NK1.1<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> TCR<sup>low</sup> présente dans le thymus et la moelle osseuse de souris, et représentative à l'époque des cellules iNKT murines. Dans cette étude, ils montrent que ces cellules expriment préférentiellement une chaîne  $\beta$  comprenant les segments géniques germinaux V $\beta$ 7 ou V $\beta$ 8.2. Si la chaîne  $\beta$  du TCR iNKT murin laisse place à une petite variabilité, du fait de l'intégration de segments V $\beta$  différents et de jonctions V-D-J diverses, la chaîne  $\alpha$  quant à elle est clairement invariante comme ont pu le démontrer Lantz et Bendelac en 1994 (Lantz and Bendelac, 1994). En effet, ils ont mis en évidence au sein de la chaîne  $\alpha$  du TCR la présence systématique des segments V $\alpha$ 14 et J $\alpha$ 281, maintenant appelé J $\alpha$ 18.

En 1993 parallèlement à chez la souris, Porcelli et ses collaborateurs (Porcelli et al., 1993) ont étudié, chez l'Homme, les séquences des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR de lymphocytes DN obtenus à partir du sang périphérique d'individus sains. Concernant la chaîne  $\alpha$ , ils ont pu mettre en évidence l'utilisation des segments V $\alpha$ 24 et J $\alpha$ Q, maintenant appelé J $\alpha$ 18, par un grand nombre de clones dérivés des cellules DN TCR $\alpha\beta^+$  étudiées. L'analyse de la séquence des chaînes  $\beta$  de ces cellules montre une utilisation restreinte de segments V, notamment le segment V $\beta$ 11. Un an plus tard, à l'aide d'anticorps anti-V $\alpha$ 24 et V $\beta$ 11 produits par leurs soins, Dellabona et ses collaborateurs (Dellabona et al., 1994) ont pu mettre en évidence que les cellules DN TCR $\alpha\beta^+$  co-exprimaient la chaîne V $\alpha$ 24 et la chaîne V $\beta$ 11, et que la chaîne  $\alpha$  comprenait systématiquement le segment J $\alpha$ Q alors que le segment J $\beta$  était variable.

Chez la souris comme chez l'Homme, il a en plus été démontré par ces études que, malgré les quelques N additions/délétions possibles au niveau de la jonction V-J, la chaîne  $\alpha$  restait néanmoins complètement invariante en termes d'acides aminés. De plus, la comparaison entre les segments V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 281 chez la souris et V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q chez l'Homme a permis de mettre en évidence une homologie en acides aminés de 62%. De même, les segments V $\beta$ 8.2 chez la souris et V $\beta$ 11 chez l'Homme sont homologues (62%). Tous ces

résultats ont permis de mieux caractériser les cellules iNKT avec l'expression d'un TCR semi-invariant constitué d'une chaîne  $\alpha$  invariante et d'une chaîne  $\beta$  peu variable. Et aujourd'hui encore la description de ces cellules fait référence à l'utilisation des segments  $V\alpha 14-J\alpha 18$  et  $V\beta 2, 7$  ou  $8$  chez la souris, et des segments  $V\alpha 24-J\alpha 18$  et  $V\beta 11$  chez l'Homme.

Grâce cette caractéristique, la fonction des cellules iNKT a pu être étudiée par la génération de souris déficientes pour le segment  $J\alpha 18$ , et notamment par l'utilisation de la souche améliorée produite par l'équipe de Kronenberg en 2015 (Chandra et al., 2015), dans laquelle le reste du locus  $\alpha$  demeure complet.

### 3) Le complexe antigénique

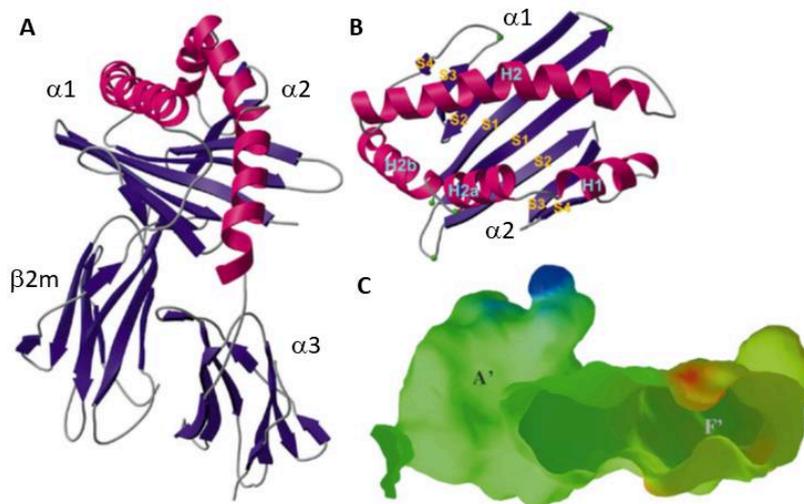
En plus d'avoir un TCR très peu variable, les cellules iNKT ont la particularité d'être restreintes par la molécule CD1d qui leur présente des antigènes de nature glycolipidique. La définition des cellules iNKT a donc évolué et met en lumière cette caractéristique par l'appellation « cellules CD1d-restreintes ».

#### a/ La restriction à la molécule de présentation CD1d

Les premières descriptions de cellules iNKT ont mis en évidence des cellules T  $\alpha\beta$  DN, c'est-à-dire n'exprimant ni le co-récepteur CD4, ni le co-récepteur CD8. Forts de cette observation, les chercheurs en ont déduit que les cellules iNKT n'étaient sûrement pas restreintes par les molécules classiques du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), à savoir les molécules du CMH-I et du CMH-II. En 1994, Bendelac et ses collaborateurs (Bendelac et al., 1994) ont mis en évidence une absence de cellules  $NK1.1^+ TCR\alpha\beta^+$  exprimant les segments  $V\beta 2, 7$  ou  $8$ , et donc apparentées aux cellules iNKT, chez des souris déficientes pour la  $\beta 2$ -microglobuline, suggérant ainsi que l'expression de cette molécule est indispensable au développement des cellules iNKT. Un an plus tard, alors que l'homologie entre le TCR des cellules iNKT murines et humaines est clairement établie, Bendelac et son équipe (Bendelac et al., 1995) propose que le ligand des cellules iNKT doit être aussi très homologue entre les deux espèces. Leurs recherches se sont donc

tournées vers des molécules non polymorphiques et ont mis en évidence les molécules CD1.1 et CD1.2 comme ligands des cellules iNKT chez la souris. En 1997, l'homologue de ces deux molécules chez l'Homme, appelé CD1d, est lui aussi mis en évidence comme ligand des cellules iNKT humaines (Exley et al., 1997).

Le gène codant pour la molécule CD1d se situe sur le chromosome 3 chez la souris et sur le chromosome 1 chez l'Homme. La molécule CD1d est un hétérodimère constitué d'une chaîne lourde de 49 kDa, associée de manière non covalente à la  $\beta$ 2-microglobuline (Figure 1A), et faisant partie du groupe 2 de la famille des molécules CD1 chez l'Homme<sup>2</sup>. Cette association la rapproche structurellement des molécules de CMH-I, d'où le terme de « CHM-I like ». Comme décrit précédemment, la molécule CD1d est non polymorphique chez l'Homme, et présente deux versions chez la souris (CD1d1 et CD1d2) identiques à 95%. La chaîne lourde du CD1d est composée de trois domaines  $\alpha$  (1 à 3), avec deux hélices  $\alpha$  et des feuillets  $\beta$ . Les deux hélices  $\alpha$ , surmontant le plateau de feuillets  $\beta$  des domaines 1 et 2, constituent le large site de fixation de l'antigène, homologue à plus de 60% entre les deux espèces (Figure 1B). Ce site comprend deux poches hydrophobes notées A' et F' (Figure 1C) (Brigl and Brenner, 2004; Zeng et al., 1997).



**Figure 1** Structure du CD1d murin. **A** Structure cristallographique du CD1d1 murin avec les trois domaines  $\alpha$  et la  $\beta$ 2-microglobuline, en rose les hélices  $\alpha$  et en bleu les feuillets  $\beta$ . **B** Vue du dessus du site de fixation de l'antigène composé d'un plateau de 8 feuillets  $\beta$  (S1 à 4 en bleu) et de deux hélices  $\alpha$  (H1, H2, H2a et H2b en rose) provenant des domaines  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2. **C** Représentation du site de fixation de l'antigène avec ses deux poches hydrophobes A' et F'. Modifiée d'après Zeng *et al.*, 1997.

<sup>2</sup> Chez l'Homme la famille de molécules CD1 comprend cinq éléments (de a à e). Les molécules CD1a, b, c et e font partie du groupe 1, et la molécule CD1d fait partie du groupe 2.

La molécule CD1d est exprimée par de nombreux types cellulaires tels que les monocytes, les macrophages, les cellules B, les cellules dendritiques, les thymocytes et les cellules épithéliales intestinales (Dougan et al., 2007), et dans une grande variété de tissus (intestin, foie, pancréas, peau, rein, thymus, ...) (Canchis et al., 1993).

#### b/ Les antigènes glycolipidiques

L'identification de la nature de l'antigène présenté par les molécules CD1 a d'abord été démontrée pour la molécule CD1b. En 1994, Beckman et ses collaborateurs (Beckman et al., 1994) identifient très clairement l'acide mycolique (acide gras complexe présent dans la paroi des mycobactéries) comme un antigène pouvant activer des cellules T  $\alpha\beta^+$  CD1b restreintes. Cette découverte d'antigène activateur non peptidique a été renforcée par l'étude d'Adachi *et al.* (Adachi et al., 1995), dans laquelle ils démontrent la conservation du compartiment iNKT chez des souris TAP1<sup>3</sup> (pour Transporteur de Peptides Antigéniques) déficientes, ne présentant donc pas de peptides au sein de molécules de présentation antigénique. L'ensemble de ces observations a donc permis de repenser la nature de l'antigène reconnu par des lymphocytes T  $\alpha\beta$ , et ainsi supposer que les autres molécules de présentation CD1 pouvaient aussi présenter des antigènes de nature lipidique.

Quelques années plus tard, en 1997, des glycolipides de la famille des glycosylcéramides ont pour la première fois été mis en évidence comme activateurs des cellules NKT CD1d-restreintes chez la souris (Kawano et al., 1997). Les glycolipides sont des glycoconjugués composés d'un sucre associé via une liaison glycosidique à un lipide. Ces molécules ont la particularité d'être hydrophobes du fait de leurs chaînes d'acides gras, mais également polaires grâce à la présence du sucre. Les glycosylcéramides sont composés d'un sucre associé à un céramide, lui-même constitué d'une sphingosine et d'un acide gras. Les glycolipides étant très présents dans les membranes de certains pathogènes, ils peuvent être directement reconnus par les cellules iNKT après avoir été capturés par des cellules

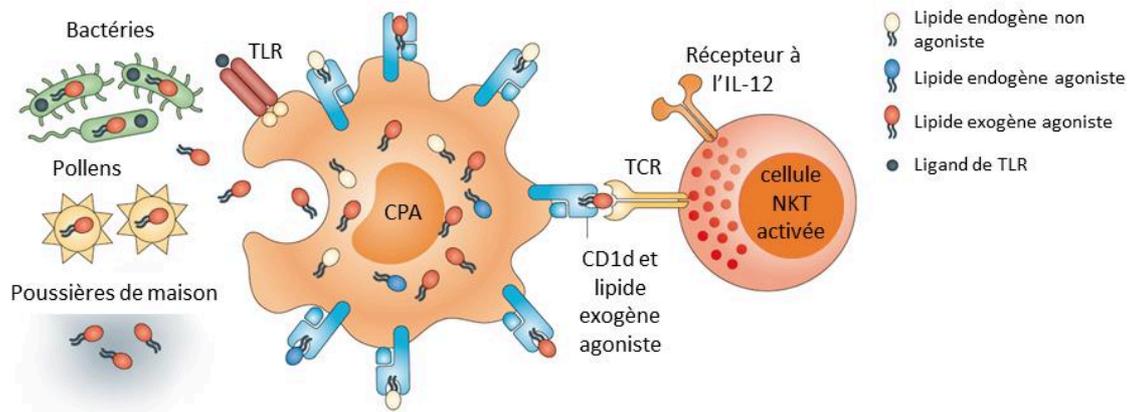
---

<sup>3</sup> Le transporteur TAP est un hétérodimère, constitué des protéines TAP1 et TAP2, qui se situe dans la membrane du réticulum endoplasmique rugueux, et qui transporte les peptides du cytosol vers la lumière du réticulum où ils se lient aux molécules de CMH-I.

présentatrices d'antigènes (CPA). Néanmoins d'autres pathogènes non producteurs de glycolipides peuvent tout de même activer les cellules iNKT.

### 1. Le mécanisme d'activation par des glycolipides exogènes

Les cellules iNKT peuvent reconnaître des glycolipides exogènes issus par exemple de bactéries ou d'allergènes (pollens, poussières de maison). Le mécanisme est assez simple, puisqu'une fois le glycolipide capturé par une CPA, il est présenté en surface dans une molécule CD1d, et peut être reconnu par le TCR d'une cellule iNKT (Figure 2). La présentation dans la molécule CD1d peut nécessiter ou non la transformation du glycolipide par la machinerie cellulaire de la CPA (Prigozy et al., 2001).



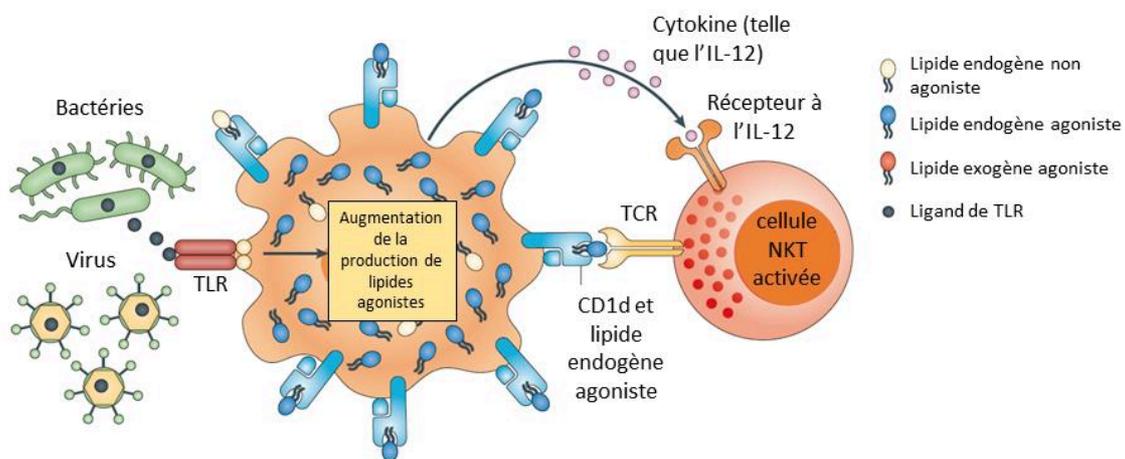
**Figure 2** Modèle d'activation des cellules iNKT par des glycolipides exogènes. Les CPA peuvent capturer des glycolipides issus de pathogènes, et les présenter en surface au sein de molécules CD1d, afin d'activer des cellules iNKT. Modifiée d'après Rossjohn *et al.*, 2012.

### 2. Le mécanisme d'activation par des glycolipides endogènes

Cependant tous les pathogènes ne produisent pas de glycolipides, c'est le cas notamment des virus. Pourtant, ils peuvent eux aussi activer les cellules iNKT. Un autre mécanisme d'activation de ces cellules existe donc, et ce en l'absence de glycolipides exogènes. Une étude de la présence, du phénotype et de la réponse de cellules iNKT a été réalisée chez des souris germ-free et a permis de démontrer aucune différence avec des cellules iNKT de souris conventionnelles (Park et al., 2000). Autrement dit, la sensibilisation à des glycolipides de nature exogène n'est pas nécessaire pour le développement et la fonction

des cellules iNKT, et il existe une autre voie d'activation de ces cellules via des glycolipides endogènes.

Dans ce second mécanisme d'activation, les pathogènes non producteurs de glycolipides activent les TLR (Toll Like Receptor, qui reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes ou PAMP) de CPA. Cette activation engendre une surproduction de glycolipides endogènes de la part de ces CPA, qui sont ensuite exprimés fortement en surface au sein de molécules CD1d. En présence de cytokines particulières produites par les CPA (par exemple l'IL-12), les cellules iNKT reconnaissent via leur TCR ces complexes CD1d-glycolipide et sont activées. (Figure 3).



**Figure 3** Modèle d'activation des cellules iNKT par des glycolipides endogènes. Lorsque les pathogènes ne produisent pas de glycolipides, ils activent les CPA via les TLR. Ces CPA augmentent alors leur production de glycolipides endogènes qui sont exprimés en surface au sein de molécules CD1d, et qui activent les cellules iNKT dans un contexte cytokinique particulier. Modifiée d'après Rossjohn *et al.*, 2012.

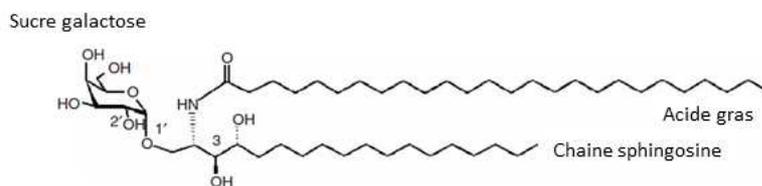
Par exemple, l'activation de cellules dendritiques via le TLR 9, engendre une augmentation de l'expression du CD1d, ainsi que des ARN messagers codants pour des enzymes impliquées dans la synthèse de glycolipides endogènes, dont la production est ainsi augmentée. Ces cellules dendritiques activent ensuite les cellules iNKT de manière IFN- $\beta$  dépendante, puisqu'en son absence (anticorps bloquants le récepteur à l'IFN- $\beta$  ou cellules iNKT issues de souris n'exprimant pas ce récepteur) aucune production d'IFN $\gamma$  par les cellules iNKT n'est observée (Paget *et al.*, 2007).

De par la reconnaissance de glycolipides endogènes, les cellules iNKT présentent donc un potentiel autoréactif. Les bases mécanistiques, actuellement identifiées, conduisant à

cette autoréactivité seront présentées dans une autre partie de cette introduction (Troisième partie, page 69), et ont fait l'objet d'un projet développé au cours de ma thèse.

### 3. L' $\alpha$ -galactosylcéramide

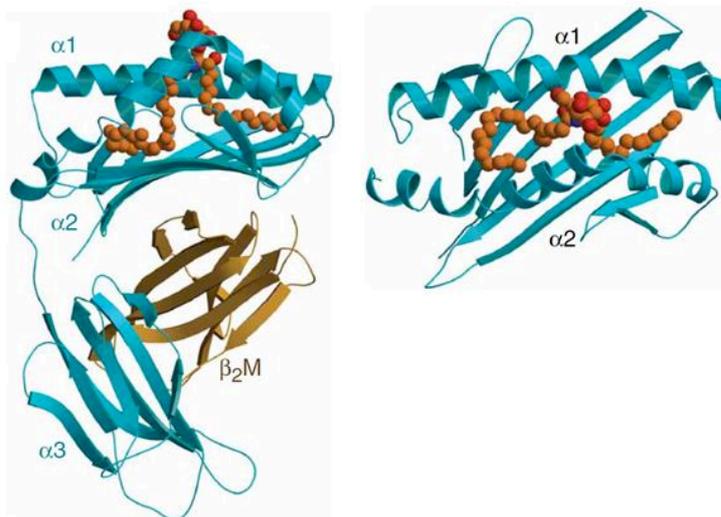
En mettant en évidence la nature glycolipidique de l'antigène reconnu par les cellules iNKT, Kawano et ses collaborateurs (Kawano et al., 1997) ont décrit une molécule fortement activatrice ( $K_D = 200$  nM, (Sidobre et al., 2002)) et spécifique des cellules iNKT appelée  $\alpha$ -galactosylcéramide ( $\alpha$ GalCer ou  $\alpha$ GC). L' $\alpha$ GalCer est une molécule synthétique dérivée d'un glycolipide provenant d'une éponge marine nommée *Agelas Mauritanus*. Il est composé d'un sucre galactose lié en  $\alpha$  par son carbone 1 à un céramide via une liaison osidique. Un céramide est un sphingolipide composé d'un acide gras lié via une liaison amide à la sphingosine. La sphingosine est composée de 18 carbones et dans le cas de l' $\alpha$ GalCer l'acide gras comprend 26 carbones (Figure 4). Différentes longueurs en carbones pour la chaîne d'acide gras et pour la sphingosine ont pu être testées, et ont révélé que la composition la plus activatrice de l' $\alpha$ GalCer est celle citée précédemment.



**Figure 4** Structure chimique de l' $\alpha$ -galactosylcéramide ( $\alpha$ GalCer ou  $\alpha$ GC) avec le sucre galactose et les deux chaînes lipidiques. Modifiée d'après Koch *et al.*, 2005.

Un an plus tard, l' $\alpha$ GalCer est également identifié comme un ligand fortement activateur ( $K_D \approx 7$   $\mu$ M pour le TCR iNKT vis-à-vis du complexe CD1d- $\alpha$ GalCer, (Gadola et al., 2006)) des cellules iNKT humaines du fait de l'expansion de cellules iNKT par des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC, pour peripheral blood mononuclear cells) ou CPA chargées en  $\alpha$ GalCer (Brossay et al., 1998). L'activation des cellules iNKT médiée par la reconnaissance de ce glycolipide est donc conservée entre les espèces murine et humaine. Le potentiel thérapeutique de l' $\alpha$ GalCer semble donc intéressant et sera abordé dans une autre partie (Troisième partie, II-, page 75).

Cette caractéristique de reconnaissance spécifique du complexe CD1d- $\alpha$ GalCer (Figure 5) par toutes les cellules iNKT a permis l'utilisation d'un nouvel outil pour les étudier : les tétramères fluorescents CD1d- $\alpha$ GalCer. Ces tétramères sont composés de quatre monomères de molécule CD1d chargée avec de l' $\alpha$ GalCer et biotinylés. Les monomères sont ensuite tétramérisés grâce à une molécule de streptavidine, comprenant quatre sites de fixation pour la biotine, et qui est couplée à un fluorochrome. En 2000, Benlagha (Benlagha et al., 2000), et Matsuda (Matsuda et al., 2000) et leurs collaborateurs respectifs mettent en évidence un marquage faible mais spécifique des cellules iNKT par des monomères et dimères CD1d- $\alpha$ GalCer fluorescents. L'intensité de ce marquage est augmentée avec l'utilisation d'une forme tétramérique de cet outil, qui plus est permet un suivi des cellules iNKT *ex vivo*.



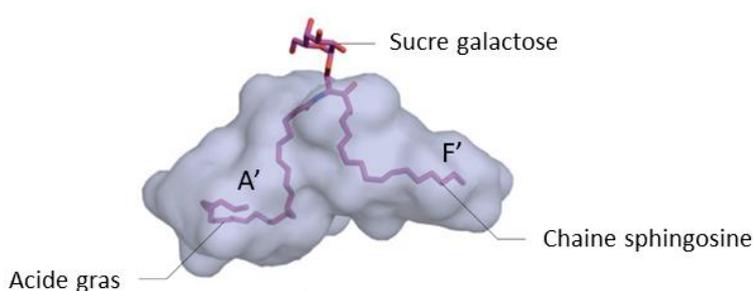
**Figure 5** Structure cristallographique du complexe CD1d humain chargé avec de l' $\alpha$ GalCer (gauche) et vue du dessus du site de fixation de l'antigène avec l' $\alpha$ GalCer (droite). Modifiée d'après Koch *et al.*, 2005.

Cet outil est plus discriminant que toutes les autres stratégies utilisées auparavant pour identifier les cellules iNKT. En effet, les études basées en partie sur l'expression de récepteurs de cellules NK ont pu passer à côté de cellules iNKT n'exprimant pas le récepteur ciblé, puisque comme indiqué précédemment (Première partie, I- 1) a/, page 21) certaines souches de souris n'expriment par exemple pas le récepteur NK1.1. A l'inverse, d'autres études ciblant plutôt les segments du TCR ont pu étudier un répertoire plus large de cellules que les cellules iNKT, avec par exemple des cellules exprimant le segment V $\beta$ 11 (V $\beta$ 2, 7, ou 8 chez la souris) mais pas la chaîne  $\alpha$  invariante, ou des cellules exprimant le segment V $\alpha$ 24 mais pas le segment J $\alpha$ 18 (V $\alpha$ 14<sup>+</sup>J $\alpha$ 18<sup>-</sup> chez la souris), qui ne seraient alors pas mise en évidence avec les tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer.

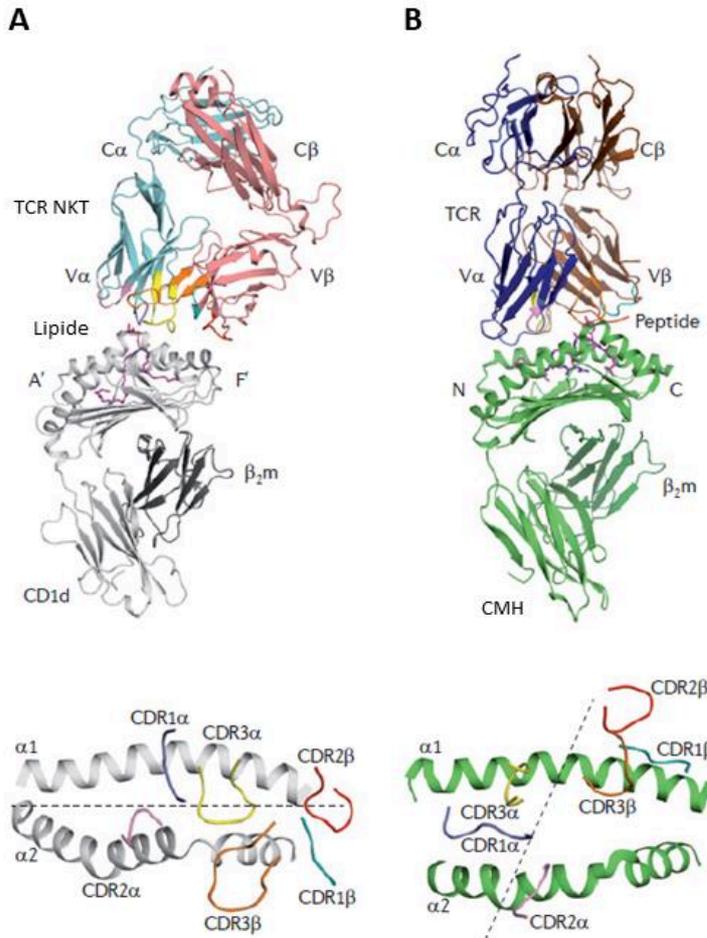
### c/ La présentation antigénique et le mode de reconnaissance par le TCR

Comme décrit précédemment, la molécule CD1d présente un site de fixation de l'antigène comprenant deux poches hydrophobes A' et F'. Cette caractéristique est totalement en adéquation avec la nature lipidique des glycolipides que les cellules iNKT reconnaissent. En effet, pour ce qui est de l' $\alpha$ GalCer par exemple, la chaîne d'acide gras de 26 carbones s'insère parfaitement dans la poche A', et la chaîne sphingosine quant à elle s'insère dans la poche F'. Ce mode d'insertion des chaînes lipidiques engendre une exposition en surface du sucre qui compose l' $\alpha$ GalCer, de manière parallèle à la surface du CD1d, de telle sorte qu'il devient accessible pour établir des contacts avec le TCR iNKT (Figure 6).

**Figure 6** Structure de la cavité du CD1d humain chargé avec de l' $\alpha$ GalCer. Les deux chaînes lipidiques s'insèrent dans les poches hydrophobes A' et F', et le sucre apparaît en surface de manière parallèle au site de fixation de l'antigène. Modifiée d'après Rossjohn *et al.*, 2012.



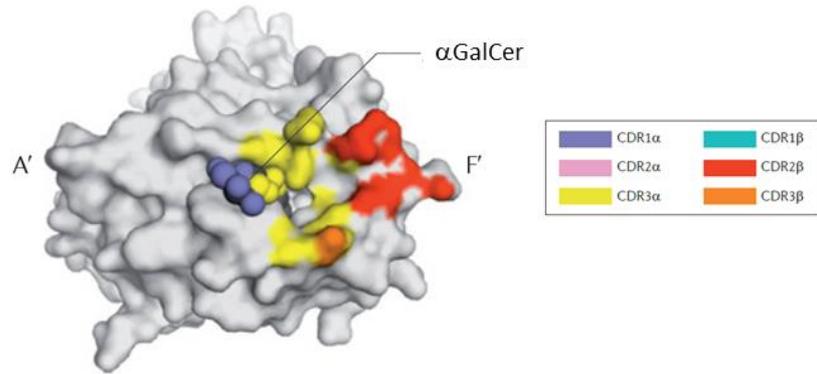
La reconnaissance du complexe CD1d-glycolipide par le TCR iNKT est très originale comparée à celle d'un complexe CMH-peptide par un TCR  $\alpha\beta$  classique. Le TCR iNKT contacte le complexe antigénique parallèlement à l'axe du sillon du CD1d et de manière inclinée sur la poche F', alors qu'un TCR classique contacte son complexe antigénique en diagonale du CMH et de manière plus « centrale » (Figure 7) (Borg *et al.*, 2007). Ce mode de reconnaissance est conservé entre les espèces quel que soit le glycolipide présenté et la chaîne  $\beta$  utilisée pour composer le TCR iNKT murin ( $V\beta 2$ , 7 ou 8).



**Figure 7** Comparaison des structures cristallographiques entre un TCR et son complexe antigénique. **A** Pour un TCR iNKT et le complexe antigénique CD1d-lipide (en haut) et représentation du mode de contact parallèle (en bas). **B** Pour un TCR et le complexe antigénique CMH-peptide (en haut) et représentation du mode de contact en diagonale (en bas). Chaque boucle CDR est identifiée par son numéro (1 à 3) et par la chaîne dont elle est issue ( $\alpha$  ou  $\beta$ ). Modifiée d'après Rossjohn *et al.*, 2012.

Les trois régions hypervariables (boucles CDR1, 2 et 3 pour Complementarity-Determining Region) des deux chaînes du TCR iNKT sont différemment impliquées dans la reconnaissance du complexe antigénique. Dans le cas d'un complexe CD1d- $\alpha$ GalCer, la boucle CDR1 $\alpha$  contacte uniquement l' $\alpha$ GalCer, la boucle CDR3 $\alpha$  contacte le CD1d et l' $\alpha$ GalCer, la boucle CDR2 $\beta$  contacte uniquement le CD1d au niveau de la poche F', et la boucle CDR3 $\beta$  se focalise sur un point de l'hélice du domaine  $\alpha 2$  du CD1d (Figure 8) (Borg *et al.*, 2007). Bien que la chaîne  $\beta$  du TCR n'interagisse qu'avec le CD1d, sa variabilité au niveau du segment J peut tout de même influencer la reconnaissance du glycolipide, en agissant sur la conformation structurale de la chaîne invariante  $\alpha$  qui contacte directement l'antigène (Troisième partie, I- 2), page 73).

**Figure 8** Empreinte des contacts réalisés par le TCR iNKT sur un complexe CD1d- $\alpha$ GalCer pour chaque boucle CDR identifiée par une couleur. Modifiée d'après Rossjohn *et al.*, 2012.



#### 4) Les fonctions des cellules iNKT

Les cellules iNKT ont la particularité d'arborer plusieurs fonctions habituellement décrites pour des effecteurs de l'immunité innée ainsi que de l'immunité adaptative. Tout comme les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et les cellules NK, les cellules iNKT sont des cellules cytotoxiques. A l'instar des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, les cellules iNKT ont la capacité de produire de larges quantités de cytokines (de manière plus rapide et massive que les T CD4<sup>+</sup>), et peuvent agir sur de nombreux effecteurs du système immunitaire.

##### a/ La cytotoxicité

De par l'expression et la production de grandes quantités de granzyme B, perforine et FasL, les cellules iNKT ont un caractère cytotoxique<sup>4</sup>. Cette cytotoxicité a depuis longtemps été mise en évidence, puisqu'en 1994, Arase et ses collègues (Arase et al., 1994) ont démontré que des thymocytes DP (double positif CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) pouvaient être tués par des thymocytes iNKT (NK1.1<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>low</sup>) via la voie Fas-FasL. Par la suite, cette voie a été démontrée comme la voie cytotoxique principale utilisée par les cellules iNKT (Wingender et al., 2010). Mais des cellules iNKT, préalablement activées, peuvent également relarguer des granules cytotoxiques contenant granzymes B et perforines afin

<sup>4</sup> Les voies granzyme B-perforine et Fas-FasL engendrent toutes les deux l'apoptose de la cellule cible. La perforine crée des pores dans la membrane de la cellule cible, laissant entrer le granzyme B qui active la voie des caspases, tout comme l'interaction du récepteur Fas avec son ligand FasL, conduisant ainsi à la mort par apoptose.

de tuer des cellules tumorales (Kawano et al., 1998). De plus, cette cytotoxicité peut être accentuée dans des contextes particuliers. Une augmentation de la production de perforine par des cellules iNKT, issues de PBMC, est par exemple observée en présence d'IL-2 ou d'IL-12, ainsi qu'une augmentation de l'expression de FasL (CD95L) après une stimulation non spécifique PMA/ionomycine (Gumperz et al., 2002).

#### b/ La production de cytokines

Une fois activées, les cellules iNKT peuvent produire une variété de cytokines en grandes quantités. Les deux cytokines les plus étudiées sont l'IL-4 et l'IFN $\gamma$ , mais les cellules iNKT peuvent aussi produire de l'IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, ou encore du TNF $\alpha$ , du TGF $\beta$  et du GM-CSF (Matsuda et al., 2008).

Dans leur étude de 2002, Gumperz et ses collaborateurs (Gumperz et al., 2002) mettent clairement en évidence que des PBMC humains stimulés de manière non spécifique PMA/ionomycine pendant six heures ou avec de l' $\alpha$ GalCer pendant une nuit, contiennent des cellules iNKT (cellules tétramère CD1d- $\alpha$ GalCer<sup>+</sup>) capables de produire des cytokines variées par rapport aux autres cellules T (cellules tétramère CD1d- $\alpha$ GalCer<sup>-</sup>). Parmi les cellules iNKT, deux populations ont pu être définies : les cellules CD4<sup>+</sup> productrices de cytokines de type Th1 (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  et GM-CSF) et Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13), et les cellules CD4<sup>-</sup> principalement productrices de cytokines de type Th1 (IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ ) seulement.

Dans certaines conditions de stimulation, les cellules iNKT ont la capacité de produire une cytokine en particulier. Par exemple, lorsque la stimulation est réalisée en présence d'IL-2 et d'APC non chargées en  $\alpha$ GalCer, environ 30% des clones iNKT CD4<sup>+</sup> testés produisent de l'IL-5 en grande quantité (1500 à 7500 pg/mL) (Sakuishi et al., 2007). Cette étude révèle aussi le caractère autoréactif des cellules iNKT, puisqu'elles reconnaissent dans ce cas un glycolipide d'origine endogène (Troisième partie, page 69).

L'IL-21 est une autre cytokine que les cellules iNKT thymiques et spléniques sont capables de produire en grande quantité après activation CD3/CD28 (respectivement plus de 100

et 350 pg/mL). Cette production est augmentée spécifiquement pour les cellules iNKT lorsque l'activation est réalisée en présence d'IL-12, puisque dans ces conditions, les thymocytes iNKT peuvent produire aux alentours de 200 pg/mL d'IL-21, les cellules iNKT spléniques en produisent jusqu'à 450 pg/mL, alors que les cellules T CD4<sup>+</sup> spléniques n'en produisent pas plus de 50 pg/mL (Coquet et al., 2007).

Après activation avec de l' $\alpha$ GalCer les cellules mononucléées issues de foie de souris, comprenant en moyenne 30% de cellules iNKT, ont la capacité de produire jusqu'à 1,5 ng/mL d'IL-17. Cette production est clairement dépendante de la présence des cellules iNKT, puisque l'IL-17 n'est pas produite par les cellules mononucléées issues de foie de souris J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> ou CD1d<sup>-/-</sup>, donc de souris n'ayant pas de cellules iNKT. La production d'IL-17 est exacerbée en absence des cytokines IFN $\gamma$  et IL-4, car dans ces conditions (souris IFN $\gamma$  KO + anticorps anti-IL-4), les cellules mononucléées de foie peuvent produire jusqu'à 10 ng/mL d'IL-17. En étudiant plus précisément les cellules iNKT (cellules tétramère CD1d- $\alpha$ GalCer<sup>+</sup>) au sein de ces cellules mononucléées de foie, Michel et ses collaborateurs (Michel et al., 2007) ont finalement pu mettre en évidence que seule la sous-population de cellules iNKT NK1.1<sup>-</sup> était productrice d'IL-17 parmi toutes les cellules iNKT étudiées.

### c/ L'effet sur les autres acteurs de l'immunité

Cette caractéristique de production rapide et massive de cytokines par les cellules iNKT a pour effet d'engendrer une régulation des autres effecteurs de l'immunité. Les cellules iNKT pouvant produire une grande variété de cytokines, les effecteurs sur lesquels elles peuvent agir sont donc tout aussi variés comme par exemple les cellules NK, les cellules T, mais également les cellules B ou encore les cellules dendritiques.

La relation entre les cellules iNKT et les autres effecteurs de l'immunité a notamment été étudiée dans une série d'expériences, réalisées *in vivo* chez la souris, et dans lesquelles l'activation des effecteurs a pu être mise en évidence par la surexpression de la molécule d'activation CD69. L'implication des cellules iNKT dans ce processus a été démontrée à l'aide de souris déficientes en ces cellules (CD1d<sup>-/-</sup> ou V $\alpha$ 14<sup>-/-</sup> ou J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>). Dans toutes ces études, de l' $\alpha$ GalCer a été injecté aux animaux afin d'activer les cellules iNKT. Dans ces

conditions, deux groupes de recherche (Carnaud et al., 1999; Eberl and MacDonald, 2000) ont pu constater une prolifération rapide de cellules NK (cellules CD3-NK1.1+) productrices d'IFN $\gamma$  et cytotoxiques, médiée par la production d'IFN $\gamma$  par les cellules iNKT activées. En effet, une inhibition partielle de la prolifération, de la cytotoxicité et de la production d'IFN $\gamma$  par les cellules NK est observée en présence d'anticorps bloquants anti-IFN $\gamma$ . De la même manière Nishimura et ses collaborateurs (Nishimura et al., 2000) ont révélé une activation de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. Cette activation est à nouveau médiée par les cellules iNKT, elles-mêmes activées par les cellules dendritiques CD1d<sup>+</sup> via des interactions CD40-CD40L. Concernant l'activation des cellules B par les cellules iNKT, Kitamura et ses collègues (Kitamura et al., 2000) ont déterminé qu'elle était dépendante de la production d'IL-4 par les cellules iNKT après injection de l' $\alpha$ GalCer.

De plus, dans un modèle *in vitro*, des lymphocytes B purifiés à partir de PBMC humains prolifèrent au contact de cellules iNKT autologues, en présence ou non d' $\alpha$ GalCer (Galli et al., 2003). Cette prolifération est dépendante de la production d'IL-4 et d'IL-13 par les cellules iNKT, puisqu'elle n'est pas observée en présence d'anticorps bloquants dirigés contre ces deux cytokines. Après activation, via le CD3 ou avec de l' $\alpha$ GalCer, la sous-population de cellules iNKT CD4<sup>+</sup> est en plus capable de stimuler la production d'IgG1 (pour Immunoglobuline G1) et d'IgM par des lymphocytes B autologues. Ces résultats mettent clairement en évidence l'aide que les cellules iNKT peuvent apporter dans l'induction des fonctions des lymphocytes B, et ce de manière CD1d dépendante puisque non observée en présence d'anticorps bloquants anti-CD1d. Une fois de plus les premiers résultats de cette étude révèlent le caractère autoréactif des cellules iNKT qui sera abordé plus en détail dans une autre partie (Troisième partie, page 69).

Outre les cellules d'origine lymphoïde, les cellules iNKT peuvent interagir avec des cellules d'origine myéloïde. Dans leur étude de 2003, Fujii et ses collaborateurs (Fujii et al., 2003) démontrent par exemple la maturation *in vivo* de cellules dendritiques spléniques suite à une injection d' $\alpha$ GalCer à des souris. Cette maturation est mise en évidence par la surexpression de molécules impliquées dans la co-stimulation de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (CD40 ou CD86) et de molécules de capture et de présentation d'antigènes (CMH-II), ainsi que par la production de cytokines telles que l'IFN $\gamma$  et l'IL-12

par les cellules dendritiques. L' $\alpha$ GalCer n'agit pas seul sur les cellules dendritiques, puisqu'en absence de cellules iNKT (souris  $J\alpha 18^{-/-}$ ) la maturation des cellules dendritiques n'est pas observée, donc les cellules iNKT jouent clairement un rôle dans ce processus.

Si les cellules iNKT activent certains effecteurs de l'immunité, leur action de régulation peut aussi agir dans l'autre sens et engendrer une inhibition. C'est le cas par exemple des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques d'un peptide issu des cellules  $\beta$  pancréatiques (cellules BDC2.5), dont l'activation et la production de cytokines est inhibée par les cellules iNKT. Cette inhibition est amplifiée en présence d' $\alpha$ GalCer, qui en plus empêche la prolifération de ces cellules T CD4<sup>+</sup>. Des expériences de Transwell ont permis de déterminer que le contact cellulaire est nécessaire dans ce processus de régulation négative des cellules T CD4<sup>+</sup> vers un profil Th1 par les cellules iNKT (Novak et al., 2005). Les cellules iNKT activées avec de l' $\alpha$ GalCer sont aussi capables d'inhiber la différenciation de cellules T CD4<sup>+</sup> vers un profil Th17, via la production des cytokines IL-4, IL-10 et IFN $\gamma$  (Mars et al., 2009).

## II – Les autres cellules NKT

### 1) Les cellules NKT de type II

Les cellules NKT de type II ont été décrites pour la première fois en 1995 par Cardell *et al.* (Cardell et al., 1995) chez des souris déficientes pour l'expression des molécules du CMH-II. Malgré cette déficience, les souris présentaient des cellules CD4<sup>+</sup> capables de réagir contre des cibles exprimant la molécule CD1 sans pour autant exprimer le TCR caractéristique des cellules iNKT composé des segments  $V\alpha 14$  et  $J\alpha 18$  pour la chaîne  $\alpha$ , et  $V\beta 2, 7$  ou  $8$  pour la chaîne  $\beta$ .

Les cellules NKT de type II répondent, tout comme les cellules NKT de type I, à la définition des cellules NKT par l'expression simultanée de récepteurs des cellules NK et d'un TCR, restreint par la molécule CD1d. Néanmoins, contrairement aux cellules iNKT, le TCR des

cellules NKT de type II est bien plus diversifié (Behar et al., 1999) et peut être de type  $\gamma\delta$  (Huber et al., 2003).

Ces cellules sont aussi restreintes par la molécule CD1d mais reconnaissent des glycolipides différents des cellules iNKT. En effet, la reconnaissance du complexe antigénique par les cellules NKT de type II ne nécessite pas que la molécule CD1d passe par les endosomes (Chiu et al., 1999). Les cellules NKT de type II ont la capacité de reconnaître des glycolipides de la famille des sulfatides, mais aussi le  $\beta$ -glucosylceramide ( $\beta$ -GlcCer), le  $\beta$ -galactosylceramide ( $\beta$ -GalCer), la lysophosphatidylcholine, des lipides dérivés de pollen et des petites molécules non lipidiques (Rhost et al., 2012).

Il est important de noter que les cellules NKT de type II ne reconnaissent pas l' $\alpha$ GalCer. Cette dernière caractéristique rend donc plus complexe l'analyse de ces cellules car les tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer ne sont pas exploitables pour les mettre en évidence. De plus, aucun glycolipide reconnu par toutes les cellules NKT de type II n'a encore été découvert, donc aucun tétramère n'est disponible pour les identifier dans leur totalité. Ces cellules sont donc très peu décrites, et on ne connaît pas leur fréquence ni le niveau d'expression du récepteur NK1.1.

Toutefois, l'utilisation de souris déficientes pour l'expression de la molécule CD1d, dont la restriction est une caractéristique commune aux iNKT et NKT de type II, permet l'analyse simultanée de la perte de ces deux types de cellules NKT. C'est ainsi qu'il a pu être déterminé que chez la souris, au moins 80% des cellules T exprimant le récepteur NK1.1 dans le thymus et le foie sont des cellules NKT de type I et II, et que leur fréquence avoisine les 50% dans la moelle osseuse et la rate (Godfrey et al., 2004).

Comme pour les cellules iNKT (Troisième partie, II-, page 75), plusieurs études ont pu mettre en évidence l'implication des cellules NKT de type II dans des contextes pathologiques comme le cancer, l'infection, les maladies auto-immunes, l'obésité ou la maladie du greffon contre l'hôte (Rhost et al., 2012).

## 2) Les cellules NKT-like

Les cellules NKT-like répondent elles aussi à la définition des cellules NKT de par l'expression de récepteurs des cellules NK et d'un TCR. Néanmoins ces cellules semblent bien éloignées des cellules iNKT puisqu'elles n'expriment pas le TCR invariant caractéristique, elles ne sont pas restreintes par la molécule CD1d, et ne reconnaissent pas non plus le ligand  $\alpha$ GalCer. Les cellules NKT-like peuvent correspondre à des cellules T conventionnelles  $\alpha\beta$  qui sur-expriment des récepteurs de cellules NK, tel que le NK1.1 suite à une infection virale (Slifka et al., 2000). Ces cellules peuvent aussi être des cellules T non conventionnelles  $\gamma\delta$ , non restreintes par le CD1d mais exprimant des récepteurs de cellules NK comme le NK1.1 (Vicari et al., 1996).

### III – Tableau bilan des caractéristiques principales des cellules NKT

Le tableau ci-dessous résume les principales caractéristiques des différents types de cellules iNKT décrits dans la première partie de cette introduction. Il met ainsi en évidence les différences entre ces sous-populations, basées notamment sur la restriction au CD1d (cellules NKT I (iNKT) et II), la reconnaissance de l' $\alpha$ GalCer (iNKT) et la variabilité du TCR.

**Tableau I** Tableau bilan des caractéristiques principales des différents types de cellules NKT, modifié d'après Godfrey et al., 2004.

	NKT de type I ou iNKT	NKT de type II	NKT-like
Restriction au CD1d	oui	oui	non
Réactivité vis-à-vis de l' $\alpha$ GalCer	oui	non	non
Chaîne $\alpha$ du TCR	V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 (souris) V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 (Homme)	Variable (peut être $\gamma$ )	Variable (peut être $\gamma$ )
Chaîne $\beta$ du TCR	V $\beta$ 2, V $\beta$ 7 ou V $\beta$ 8 (souris) V $\beta$ 11 (Homme)	Variable (peut être $\delta$ )	Variable (peut être $\delta$ )
Expression du récepteur NK1.1 (CD161)	+/-	+/-	+/-

## Deuxième partie : Développement des cellules iNKT

Les cellules iNKT constituent donc une population particulière de lymphocytes T  $\alpha\beta$ . A ce titre, il paraît important de déterminer l'origine de ces cellules afin de mieux aborder leur rôle au sein du système immunitaire.

### I - Le développement des cellules iNKT murines

Tout comme les lymphocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels, les cellules iNKT se développent au sein du thymus. L'engagement vers la voie de différenciation NKT intervient au stade DP. Une fois la sélection positive passée, les cellules iNKT murines vont se différencier en trois sous-populations distinctes : iNKT1, iNKT2 ou iNKT17.

#### 1) L'origine thymique des cellules iNKT murines

Des souris nude<sup>5</sup> présentent très peu de cellules iNKT (cellules NK1.1<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>) en périphérie (rate et moelle osseuse). Cette observation est donc en faveur d'un développement des cellules iNKT nécessitant le thymus. L'origine thymique des cellules iNKT a en outre été démontrée grâce à des expériences de greffes de thymus, issus de souris donneuses Ly5.2<sup>+</sup>, dans des souris receveuses nude congéniques<sup>6</sup> Ly5.2<sup>-</sup>. Cinq semaines après la greffe, les cellules spléniques des souris receveuses ont été analysées pour les marqueurs Ly5.2, NK1.1 et TCR $\alpha\beta$ . Alors que les cellules NK1.1<sup>+</sup>Ly5.2<sup>+</sup>, issues des souris donneuses, et donc d'origine thymique, sont TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>, les cellules NK1.1<sup>+</sup>Ly5.2<sup>-</sup>, issues des souris receveuses, quant à elles n'expriment pas de TCR $\alpha\beta$  (Levitsky et al., 1991). Le développement des cellules iNKT nécessite donc un passage par le thymus avant qu'elles ne rejoignent la périphérie. Cette étude aurait également pu mettre en évidence la recolonisation des thymus greffés par les cellules des souris receveuses, mais

---

<sup>5</sup> Souris n'exprimant pas ou très peu de lymphocytes T du fait d'un thymus absent ou détérioré.

<sup>6</sup> Souris avec un génome identique sauf pour un gène, ici le gène codant pour la molécule Ly5 (ou CD45) avec des souris receveuses Ly5.2<sup>-</sup> et des souris donneuses Ly5.2<sup>+</sup>.

selon les auteurs l'analyse a été réalisée trop tôt (cinq semaines après greffe) pour que les cellules souches des souris receveuses puissent se différencier au sein des thymus greffés et générer un compartiment iNKT Ly5.2<sup>-</sup>.

Pourtant l'idée que les cellules iNKT puissent ne pas se développer au niveau thymique est apparue dans des études menées par Taniguchi (Koseki et al., 1991; Makino et al., 1993). En étudiant le répertoire de souris nude dans différents tissus (rate, moelle osseuse, épithélium intra-intestinal, plaques de Payer), ils ont pu mettre en évidence la présence de cellules V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281<sup>+</sup>, suggérant donc que l'ontogénie des cellules iNKT pouvait se réaliser indépendamment de la présence du thymus.

Cependant, des souris thymectomisées 3 jours après la naissance montrent très clairement, après 6 à 12 semaines de vie, une baisse plus importante du pourcentage de cellules iNKT en périphérie (rate, moelle osseuse et foie) comparé à celui de lymphocytes T  $\alpha\beta$  classiques. Il est à noter que les cellules iNKT résiduelles retrouvées chez les souris thymectomisées arborent un phénotype particulier avec une expression intermédiaire du co-récepteur CD8 sans expression du CD4, et constituent donc une sous-population de cellules iNKT qui semblent se développer de manière indépendante du thymus. Selon les auteurs, certaines cellules iNKT pourraient donc avoir une origine extra-thymique, bien que la majorité d'entre elles se développent au sein du thymus (Hammond et al., 1998). On peut également émettre l'hypothèse d'un maintien en périphérie de ces cellules iNKT résiduelles qui se seraient initialement développées dans le thymus avant la thymectomie, ce qui exclurait alors la possibilité d'un développement extra-thymique des cellules iNKT.

En 1999, Tilloy et ses collaborateurs (Tilloy et al., 1999) démontrent clairement que le thymus est nécessaire à l'ontogénie des cellules iNKT et qu'il n'existe pas de développement extra-thymique de ces cellules. Dans leur étude, ils ont déterminé, de manière très précise par transcription inverse (RT pour Reverse Transcription) puis amplification par réaction en chaîne par polymérase (PCR pour Polymerase Chain Reaction) quantitative, le nombre de transcrits V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 au sein de la moelle osseuse de souris irradiées de manière létale, thymectomisées et reconstituées avec des cellules souches hématopoïétiques (CSH) de foie fœtal. Leurs résultats mettent en évidence que les souris receveuses non thymectomisées (contrôle) présentent des cellules iNKT au sein

de leur moelle osseuse, alors que ces cellules sont totalement absentes chez les souris receveuses athymiques. Bien que des cellules  $V\alpha 14^+$  aient été retrouvées chez des souris nude dans les études de Taniguchi, elles étaient néanmoins non fonctionnelles car une grande partie des séquences de leur TCR ne se trouvaient pas dans le bon cadre de lecture. En conséquence, il est depuis admis, qu'après la naissance, le thymus constitue l'unique organe du développement des cellules iNKT.

Quelques années plus tard, les travaux de Pellicci et ses collaborateurs (Pellicci et al., 2002) ont permis d'entériner l'hypothèse d'un développement thymique en s'appuyant sur l'utilisation des tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer pour mettre en évidence les cellules iNKT. Comparés au marqueur NK1.1, les tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer constituent de meilleurs outils pour détecter les cellules iNKT (Première partie, I- 3) b/ 3., page 29). Dans cette étude, les cellules de la rate et du foie de souris nude ont à nouveau été analysées pour la présence de cellules iNKT (cellules CD1d- $\alpha$ GalCer $^+$ TCR $\alpha\beta^+$ ). Que les souris soient jeunes (13 jours) ou adultes (11 semaines), aucune cellule iNKT n'a pu être détectée en périphérie des souris nude, alors qu'elles sont présentes à des pourcentages classiques chez les souris contrôles. Le thymus apparaît donc comme le seul et unique organe intervenant dans le développement des cellules iNKT chez la souris.

## 2) Modèle de développement des cellules iNKT

Pour tenter d'élucider le modèle selon lequel les cellules iNKT se développent, il est tout d'abord important de savoir comment et par quel type cellulaire les cellules iNKT sont sélectionnées. Ces cellules étant retraits par la molécule CD1d, il paraît naturel de penser qu'elle soit aussi impliquée dans leur sélection.

Une première étude a pu déterminer que la molécule CD1d était exprimée au sein du thymus au niveau cortical (Bradbury et al., 1990), mais sans définir le type cellulaire porteur de cette molécule.

Par la suite, l'étude du pourcentage de thymocytes DN TCR $\alpha\beta^+$   $V\beta 8^+$ , apparentés aux thymocytes iNKT, entre des souris déficientes pour la  $\beta 2$ -microglobuline ( $\beta 2m^{-/-}$ ) et des

souris sauvages a démontré la nécessité de la  $\beta 2$ -microglobuline dans le développement des cellules iNKT puisque leur pourcentage était nettement réduit chez les souris déficientes (Bix et al., 1993). Des expériences avec des souris chimères ont mis en évidence que des souris receveuses  $\beta 2m^{-/-}$ , irradiées et reconstituées avec des CSH de foie fœtal de souris  $\beta 2m^{+/+}$  présentaient des thymocytes DN  $TCR\alpha\beta^+ V\beta 8^+$ . Bix et ses collaborateurs ont ainsi prouvé que les cellules, exprimant la  $\beta 2$ -microglobuline et par déduction la molécule CD1d, nécessaires et suffisantes à la génération des cellules iNKT, étaient d'origine hématopoïétique, et non des cellules épithéliales thymiques comme c'est le cas pour les cellules T  $\alpha\beta$  classiques.

Enfin en 1995, Albert Bendelac (Bendelac, 1995) a clairement mis en évidence, grâce à des marquages de cytométrie en flux, que les cellules d'origine hématopoïétique  $CD1d^+$  sont des thymocytes DP immatures, issus donc de la colonisation thymique et de la différenciation de CSH. Pour confirmer le rôle de ces thymocytes dans la sélection des lymphocytes iNKT, une analyse de la production d'IL-2 par un hybridome iNKT (DN32.D3, dérivant d'une cellule T  $NK1^+$ , qui exprime les segments  $V\alpha 14$  et  $V\beta 8.2$ , et qui est  $CD1d1$  restreinte) a été réalisée en présence de thymocytes DP, SP4 ( $CD4^+CD8^-$ ) ou SP8 ( $CD8^+CD4^-$ ). Ses résultats montrent que seuls les thymocytes DP sont capables d'activer l'hybridome iNKT avec un relargage dans le surnageant de 20 unités/mL d'IL-2, contre 0,6 et 0,4 en présence de cellules SP4 et SP8 respectivement. Pour définir plus précisément le stade d'immaturité pendant lequel les thymocytes sélectionnent les cellules iNKT, la même expérience a été réalisée cette fois-ci en présence des thymocytes issus de souris  $RAG^{-/-7}$ ,  $TCR\beta^{-/-}$  ou  $TCR\alpha^{-/-}$ , et donc respectivement stoppés au stade DN, DN tardif/DP précoce, et DP. Si les thymocytes issus de souris  $RAG^{-/-}$  sont incapables de stimuler l'hybridome iNKT (0,1 unités/mL d'IL-2), ceux issus des souris  $TCR\alpha^{-/-}$  en sont nettement capables (18 unités/mL d'IL-2) et ceux issus des souris  $TCR\beta^{-/-}$  partiellement (5 unités/mL d'IL-2). Les cellules iNKT sont donc positivement sélectionnées par des thymocytes DP ou éventuellement DN tardifs.

---

<sup>7</sup> Les souris RAG déficientes ( $RAG^{-/-}$ ) sont génétiquement modifiées pour ne plus exprimer les enzymes RAG (pour Recombination Activating Genes) nécessaires au réarrangement du TCR et du BCR (pour B Cell Receptor ou récepteur des cellules B), elles n'expriment donc ni lymphocytes T, ni lymphocytes B.

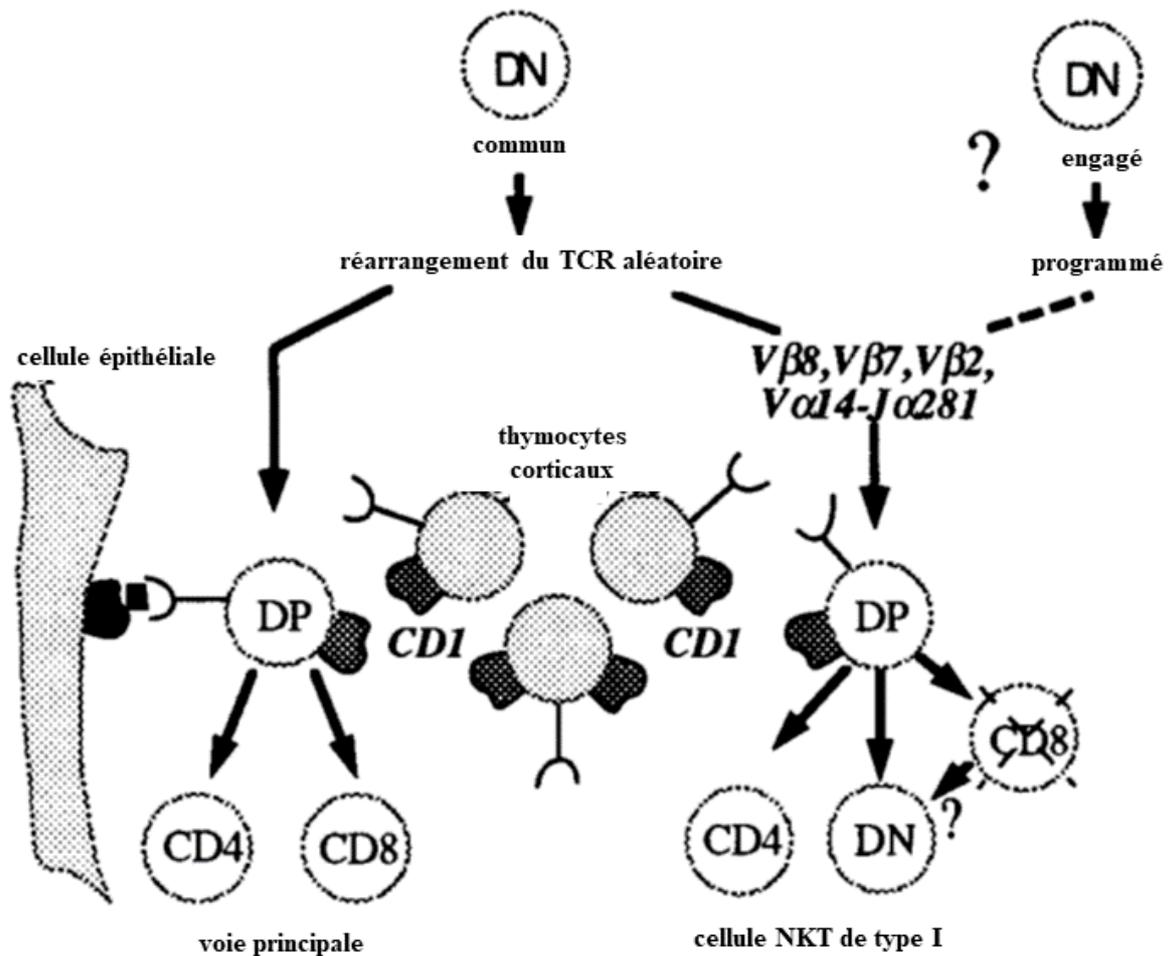
#### a/ Précurseur engagé ou commun aux cellules T $\alpha\beta$ classiques ?

Si les cellules iNKT se développent au sein du thymus, il reste à déterminer de quel type de précurseur elles sont issues. Pour répondre à cette question, deux modèles de développement des cellules iNKT ont été initialement décrits (Bendelac et al., 1997).

Le premier modèle émet l'hypothèse d'un précurseur déjà engagé dans la voie de différenciation des cellules iNKT de par l'expression programmée des chaînes spécifiques du TCR iNKT ( $V\beta 2$ , 7 ou 8 et  $V\alpha 14$ - $J\alpha 281$ ). Ce précurseur suivrait ensuite ses propres règles pour terminer sa différenciation (modèle « engagé »).

Le second modèle défend le partage des premières étapes de différenciation avec un précurseur commun aux cellules T  $\alpha\beta$  conventionnelles, et une divergence vers un programme de différenciation iNKT au cours du développement. Le précurseur iNKT, qui serait le même que pour les lymphocytes T  $\alpha\beta$  classiques, subirait donc un réarrangement aléatoire de sa chaîne  $\beta$  puis de sa chaîne  $\alpha$ , générant ainsi un TCR iNKT ou un TCR  $\alpha\beta$  « conventionnel » (modèle « commun »).

Quel que soit le modèle, les cellules iNKT en cours de maturation passeraient par un stade DP après expression de leur TCR, avant d'être sélectionnées positivement par des thymocytes corticaux DP exprimant la molécule CD1d. Elles perdraient ensuite l'expression du co-récepteur CD8, et aussi éventuellement celle du co-récepteur CD4, pour donner naissance aux cellules iNKT CD4<sup>+</sup> et DN respectivement. Les cellules iNKT DN pourraient également provenir de cellules iNKT CD8<sup>+</sup> ayant perdu l'expression de ce co-récepteur (Figure 9). L'acquisition de récepteurs NK comme le NK1.1 serait plus tardive.



**Figure 9** Modèle de précurseur iNKT commun ou engagé proposé par Bendelac, Rivera, Park et Roark. Dans le modèle commun le réarrangement du TCR iNKT se fait de manière aléatoire, alors que dans le modèle engagé il serait génétiquement programmé. Modifiée d'après Bendelac *et al.*, 1997.

### b/ L'embranchement des cellules iNKT

Les premières études sur la définition du TCR des cellules iNKT étaient en faveur du modèle « commun » dans lequel le TCR de ces cellules était généré de manière aléatoire. En effet, le modèle « engagé » préconisant un réarrangement génétiquement programmé, les chaînes du TCR des cellules iNKT seraient donc complètement fixées, et un seul réarrangement sur un premier allèle serait nécessaire pour générer un TCR iNKT fonctionnel. Pourtant, bien que la chaîne  $\alpha$  du TCR iNKT soit invariante en terme d'acides aminés, elle ne l'est pas au niveau nucléotidique, puisque Lantz et Bendelac ont pu mettre en évidence différentes N additions entre les segments  $V\alpha 14$  et  $J\alpha 18$  (Lantz and Bendelac, 1994), justifiant ainsi la génération aléatoire du TCR iNKT. De plus, en étudiant des

hybridomes de thymocytes iNKT, Shimamura et ses collaborateurs (Michio Shimamura et al., 1997) ont démontré que si une copie du gène codant pour la chaîne  $\alpha$  avait bien subi le réarrangement  $V\alpha 14-J\alpha 281$ , l'autre copie du gène avait également été réarrangée. Ces résultats suggèrent donc qu'un premier réarrangement autre que  $V\alpha 14-J\alpha 281$  et non fonctionnel a été réalisé sur un premier allèle, conduisant ainsi au réarrangement fonctionnel de la chaîne  $\alpha$  invariante du TCR iNKT sur le second allèle. Ces observations ne sont donc pas en faveur du modèle de développement « engagé ».

En 2001, Gapin et ses collaborateurs (Gapin et al., 2001) ont mis en évidence un précurseur iNKT au stade DP. Dans cette étude, l'utilisation de tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer sur des thymocytes, a révélé la présence de cellules iNKT DP<sup>low</sup> dont le pourcentage décroît avec l'âge des souris, contrairement à celui des cellules iNKT DN et CD4<sup>+</sup> qui augmente. Lors du développement des lymphocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels, le stade DP<sup>low</sup> fait suite à la reconnaissance du complexe CMH-peptide par le TCR. De la même manière pour les cellules iNKT, ce stade ferait suite à la reconnaissance du complexe CD1d-glycolipide par le TCR iNKT, puisque les cellules iNKT (tétramère CD1d- $\alpha$ GalCer<sup>+</sup>) DP<sup>low</sup> ne sont pas présentes chez des souris déficientes pour la molécule CD1d (CD1d<sup>-/-</sup>). Après analyse par PCR quantitative, le nombre de transcrits  $V\alpha 14-J\alpha 18$  est plus important dans les sous-populations DN et CD4<sup>+</sup> de souris contrôle, alors qu'il est plus important dans la sous-population DP<sup>high</sup> de souris CD1d<sup>-/-</sup>, dans lesquelles aucun transcrit n'est retrouvé dans la sous-population DN. Ces résultats montrent donc que, de façon similaire aux lymphocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels, la maturation des cellules iNKT passe par un stade DP<sup>high</sup>, puis un stade DP<sup>low</sup>, suite à l'engagement du TCR. Du fait des rapprochements avec les cellules T  $\alpha\beta$  conventionnelles, cette étude soutient le modèle de développement « commun », dans lequel des précurseurs iNKT DP seraient sélectionnés positivement par reconnaissance d'un complexe CD1d-glycolipide présenté par des thymocytes DP.

La présence d'un précurseur iNKT au stade DP est soutenue par l'étude de Bezbradica et ses collègues (Bezbradica et al., 2005). Leurs travaux mettent en évidence l'implication de la molécule ROR $\gamma$ t dans le processus de développement des cellules iNKT, puisqu'aucune cellule iNKT n'est détectée chez des souris déficientes pour ce facteur de transcription. Chez ces mêmes souris, aucun transcrit  $V\alpha 14-J\alpha 18$  n'est détecté, mais leurs thymocytes

DP sont néanmoins capables d'activer un hybridome iNKT. La molécule ROR $\gamma$ t n'est donc pas impliquée dans l'étape de sélection des cellules iNKT, mais est en revanche importante pour le réarrangement de la chaîne  $\alpha$  du TCR iNKT. Etant donné que le facteur de transcription ROR $\gamma$ t est nécessaire au prolongement de la survie des thymocytes DP en général (Guo et al., 2002), et que les segments V $\alpha$ 14 et J $\alpha$ 18 sont très distants l'un de l'autre, les auteurs proposent que la molécule ROR $\gamma$ t favoriserait la survie de thymocytes DP permettant le réarrangement tardif de la chaîne  $\alpha$  invariante iNKT, générant ainsi des précurseurs iNKT DP. Cette hypothèse est en accord avec les études de Gapin et Pellicci (Gapin et al., 2001; Pellicci et al., 2002) puisqu'ils observent une apparition tardive de thymocytes iNKT (tétramère CD1d- $\alpha$ GalCer<sup>+</sup>) chez la souris, 5 à 6 jours après leur naissance, et a été confirmée dans l'étude de Hager *et al.* qui démontre que le réarrangement V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 est un événement tardif nécessitant l'action du facteur de transcription ROR $\gamma$ t (Hager et al., 2007).

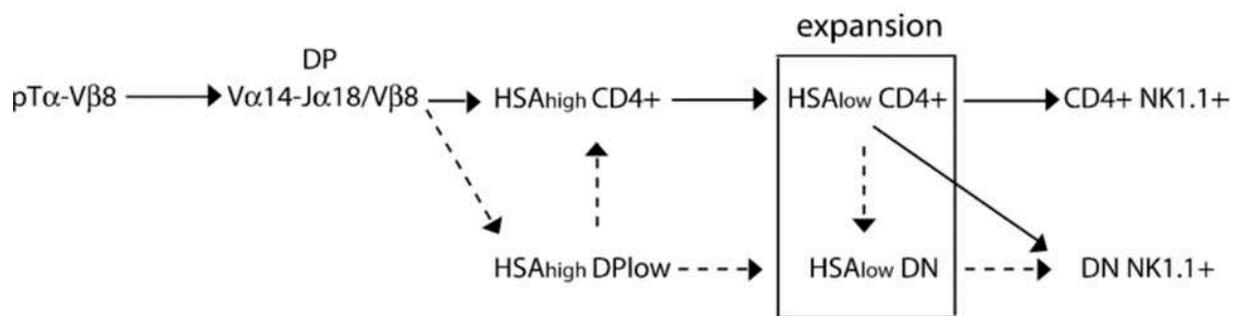
Le précurseur iNKT DP thymique a également été mis en évidence par Egawa et ses collaborateurs (Egawa et al., 2005). Ils ont pour cela utilisé le système Cre-Lox avec d'un côté des souris transgéniques exprimant Cre sous le contrôle du promoteur du gène ROR $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t-Cre), et de l'autre des souris transgéniques exprimant une séquence « stop » flanquée de séquences Lox en amont du gène codant pour la GFP (pour Green Fluorescent Protein, protéine fluorescente de couleur verte) (GFP-Lox) et sous le contrôle d'un promoteur de gène ubiquitaire (Rosa26). ROR $\gamma$ t étant uniquement exprimé dans les thymocytes DP, Cre est donc exclusivement exprimé dans ces cellules chez les souris ROR $\gamma$ t-Cre. En croisant les deux souris transgéniques, ils obtiennent ainsi des souris double-transgéniques où seuls les thymocytes DP et leur descendance seront GFP<sup>+</sup>, puisque le codon stop ne sera éliminé que dans ces cellules. Leurs résultats montrent que les thymocytes iNKT (tétramère CD1d- $\alpha$ GalCer<sup>+</sup>) DN et CD4<sup>+</sup> sont GFP<sup>+</sup> et dérivent donc de précurseurs iNKT thymiques DP. Comme Bezbradica et ses collègues, ils confirment, avec les mêmes expériences, l'implication du facteur de transcription ROR $\gamma$ t dans le développement des cellules iNKT. Les auteurs concluent finalement que le précurseur iNKT est présent au sein d'un pool de thymocytes DP qui réarrangent de manière aléatoire leur TCR, et qu'il sera sélectionné par des thymocytes DP CD1d<sup>+</sup> si les segments utilisés correspondent au TCR iNKT, d'où le terme de modèle « sélectif » qu'ils proposent.

Les premières définitions des cellules iNKT faisant référence au marqueur NK1.1, qu'en est-il de ce récepteur au cours du développement de ces cellules ? Si les cellules iNKT matures expriment pour la plupart le récepteur NK1.1, elles dérivent pourtant d'un précurseur NK1.1<sup>-</sup>. En étudiant des thymocytes iNKT (cellules tétramère CD1d- $\alpha$ GalCer<sup>+</sup>) chez des souris à différents âges, Pellicci et ses collègues (Pellicci et al., 2002) ont mis en évidence une population CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup> qui par la suite devenait NK1.1<sup>+</sup> avec perte ou non du CD4. De la même manière, Benlagha et ses collaborateurs (Benlagha et al., 2005) ont identifié des cellules iNKT à un stade NK1.1<sup>-</sup>CD44<sup>low</sup>, passant ensuite par un stade NK1.1<sup>-</sup>CD44<sup>high</sup>, pour finir par un stade NK1.1<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup>. Dans ces deux études, le transfert de thymocytes NK1.1<sup>-</sup> ou NK1.1<sup>+</sup> à des souris congéniques a mis en évidence l'acquisition, au cours du temps, du récepteur NK1.1 par les thymocytes NK1.1<sup>-</sup>, alors que les thymocytes NK1.1<sup>+</sup> demeuraient positifs pour ce marqueur. Ce résultat indique très clairement que le précurseur iNKT est à l'origine NK1.1<sup>-</sup>. De plus, le suivi des cellules émigrant récemment du thymus démontre qu'une partie des thymocytes iNKT n'acquiert pas l'expression du récepteur NK1.1 et sort donc du thymus avec un phénotype NK1.1<sup>-</sup>, pour ensuite rejoindre la périphérie où elle acquerra l'expression du récepteur. Selon Pellicci *et al.*, étant donné que le précurseur NK1.1<sup>-</sup> est CD4<sup>+</sup> cela signifie qu'il a déjà perdu l'expression du CD8, et que l'acquisition du NK1.1 se fait bien tardivement au cours de l'ontogénie des cellules iNKT, comme proposé par Bendelac. Cette observation est confirmée par l'étude de Gardue et Stein (Gadue and Stein, 2002), où ils démontrent que l'expression du récepteur NK1.1 est en partie dépendante de l'activité de la tyrosine kinase I $\kappa$ k, puisque des cellules iNKT CD4<sup>+</sup> sont bloquées au stade NK1.1<sup>-</sup> chez des souris I $\kappa$ k déficientes.

Ces résultats indiquent, une nouvelle fois, que la stratégie d'identification des cellules iNKT par le marqueur NK1.1 n'est pas optimale. L'utilisation de cette stratégie a par exemple conduit certaines équipes à penser que l'origine des cellules iNKT pouvait être en partie extra-thymique (M. Shimamura et al., 1997).

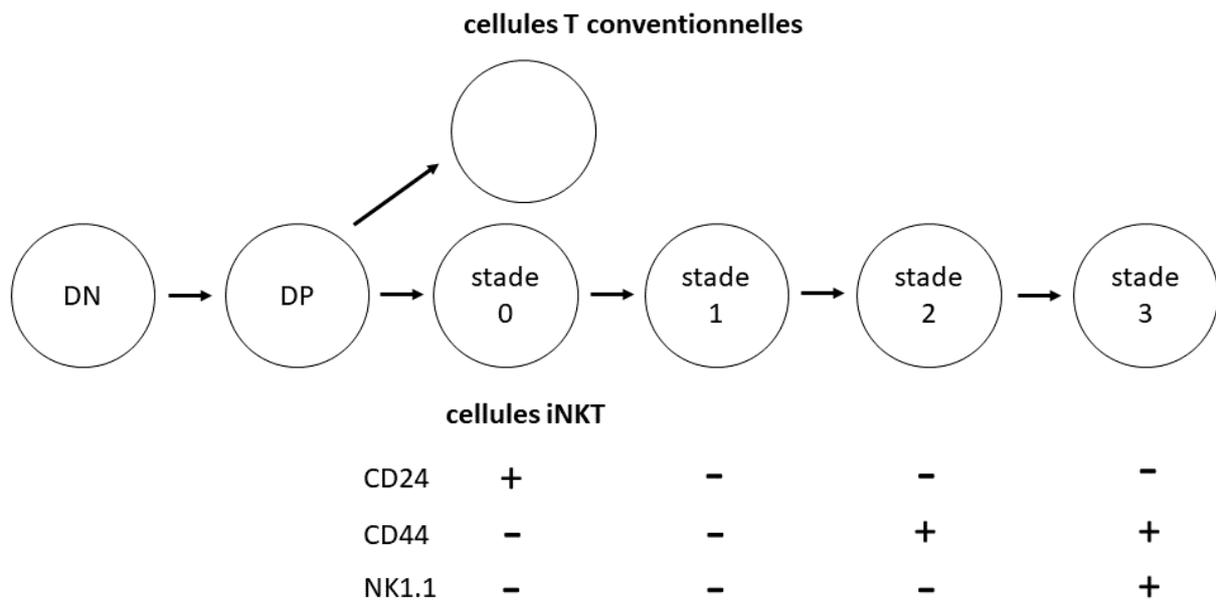
Bien que l'existence de thymocytes iNKT DP<sup>low</sup> ne soit pas acceptée par tous les groupes de recherche (ils ne sont notamment pas identifiés dans le travail de Pellicci (Pellicci et al., 2002) où les cellules iNKT CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup> sont définies comme le précurseur le plus précoce), l'origine des cellules iNKT à partir de thymocytes DP est désormais formellement établie, du fait de la dépendance de l'expression précoce de la chaîne pT $\alpha$  dans l'ontogénie des cellules iNKT (Benlagha et al., 2005). L'étude du marqueur HSA (ou

CD24) par Benlagha et ses collaborateurs a clairement mis en évidence la présence, suite à l'expression du TCR iNKT et à la sélection positive, d'un précurseur iNKT HSA<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup> duquel dérivent ensuite les cellules iNKT DN et CD4<sup>+</sup>. L'existence d'un précurseur HSA<sup>high</sup>DP<sup>low</sup> est quant à elle suggérée, ce dernier pouvant donner naissance à des cellules HSA<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup> qui perdraient par la suite l'expression du HSA, ou directement à des cellules HSA<sup>low</sup>DN qui généreraient seulement des cellules iNKT DN. Une fois encore dans cette étude, les auteurs démontrent l'acquisition tardive du récepteur NK1.1 à des stades HSA<sup>low</sup>CD4<sup>+</sup> ou DN (Figure 10).



**Figure 10** Modèle de développement des cellules iNKT CD4<sup>+</sup> et DN matures selon Benlagha *et al.*, 2005. Les flèches en pointillés indiquent une relation hypothétique.

En se basant sur l'expression des marqueurs CD24, CD44 et NK1.1, une séquence de développement des cellules iNKT suite à leur sélection positive a pu être déterminée. Elle démarre au stade 0 avec le phénotype CD24<sup>high</sup>. L'expression du CD24 sera perdue dans les stades suivants. Vient ensuite le stade 1 avec le phénotype CD44<sup>low</sup>NK1.1<sup>-</sup>, puis le stade 2 avec l'acquisition du CD44 et donc le phénotype CD44<sup>high</sup>NK1.1<sup>-</sup>, et enfin l'acquisition du NK1.1 au stade 3 CD44<sup>high</sup>NK1.1<sup>+</sup> (Matsuda and Gapin, 2005) (Figure 11).



**Figure 11** Stades de développement des cellules iNKT selon les marqueurs CD24, CD44 et NK1.1. Modifiée d'après Matsuda et Gapin, 2005.

### 3) La signature PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger)

La déviation vers l'embranchement iNKT s'opère donc au stade DP, lors de la sélection positive des cellules par reconnaissance d'un complexe CD1d-glycolipide. A cette étape, la forte induction de la voie de signalisation du TCR engendre notamment l'expression du facteur de transcription Egr2 (pour early growth response 2) qui intervient dans la survie des précurseurs iNKT (Lazarevic et al., 2009). Egr2 a la capacité de se fixer sur le promoteur du gène Zbtb16 ce qui induit la transcription de ce gène et ainsi la production de la protéine correspondante appelée PLZF, qui est elle aussi un facteur de transcription. Egr2 étant plus exprimé à tous les stades du développement des cellules iNKT que dans des thymocytes conventionnels, du fait d'une signalisation TCR plus forte, il va donc engendrer l'expression de PLZF par tous les thymocytes iNKT suite à leur sélection positive (Seiler et al., 2012).

Deux études ont démontré le rôle prépondérant de PLZF dans la différenciation iNKT (Kovalovsky et al., 2008; Savage et al., 2008). PLZF est un facteur de transcription exprimé de manière assez restreinte aux cellules iNKT. Mais s'il n'est pas exprimé par la majorité des autres effecteurs de l'immunité (lymphocytes T conventionnels, B, et NK, éosinophiles, neutrophiles, macrophages) il l'est tout de même par les cellules MAIT, une

population proche des cellules iNKT, ainsi que par les ILC (Constantinides et al., 2014). Son expression est la plus forte au stade 1 de développement des cellules iNKT (CD44<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>), puis elle diminue au cours de la différenciation tout en restant à un niveau élevé. Chez la souris, la déficience en PLZF engendre une perte de 90 à 99% des cellules iNKT, un arrêt dans le développement thymique de ces cellules au stade 1, et une distribution différente des cellules iNKT résiduelles. Après stimulation de ces cellules résiduelles par injection d' $\alpha$ GalCer *in vivo* ou lors de tests fonctionnels *in vitro*, une nette diminution de la production des cytokines IL-4 et IFN $\gamma$  est observée, et par conséquent une baisse de l'activation d'autres effecteurs de l'immunité *in vivo* apparaît (pas d'expression de CD69 par les lymphocytes T, B, NK, et les macrophages). En effet, les cellules iNKT résiduelles des souris déficientes en PLZF ne produisent pas de cytokines suite à une première activation, et n'expriment pas non plus les marqueurs NK habituels. L'expression de PLZF est une signature transcriptionnelle des cellules iNKT, permettant leur expansion et l'acquisition d'un phénotype fonctionnel (production de cytokines et propriétés migratoires) au cours de leur développement.

#### 4) La signalisation lors de la sélection positive

Lors de la sélection positive des cellules T  $\alpha\beta$  classiques, la cascade de signalisation Ras/Raf/Mek/MAP kinases est nécessaire en aval de l'engagement du TCR. Pourtant cette voie de signalisation n'est pas effective pour le développement des cellules iNKT (Alberola-Ila et al., 1996). En revanche, la kinase Fyn, protéine associée de manière non covalente au CD3 $\zeta$ , intervient dans l'ontogénie des cellules iNKT mais pas dans celle des lymphocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels. En effet, des souris déficientes pour cette molécule montrent une proportion en cellules iNKT (NK1.1<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> ou V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281<sup>+</sup>) sévèrement diminuée au sein du thymus et en périphérie. Après engagement du TCR iNKT par un complexe CD1d-glycolipide, la présence de Fyn augmenterait la signalisation sous-jacente, diminuant ainsi le seuil d'activation du TCR iNKT qu'il est nécessaire d'atteindre pour que les cellules iNKT soient sélectionnées positivement (Eberl et al., 1999; Gadue et al., 1999). Cette hypothèse crée un lien éventuel entre le seuil d'activation de la signalisation via le TCR iNKT et l'autoréactivité de ces cellules, qui sera abordée dans la troisième partie de cette introduction (Troisième partie, page 69).

Une déficience en molécule SAP (pour SLAM associated protein) chez des souris révèle une absence quasiment complète en cellules iNKT (tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer+TCR $\beta$ +) au niveau thymique et en périphérie (foie, rate, ganglions lymphatiques). Un parallèle peut être fait avec des patients atteints du syndrome XLP (pour X-linked lymphoproliferative), chez qui le gène codant pour la molécule SAP est muté. Chez plusieurs malades, on observe une perte des cellules iNKT (tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer+V $\alpha$ 24+ ou V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+) au niveau du sang périphérique (Chung et al., 2005; Nichols et al., 2005; Pasquier et al., 2005). Il semble donc que la molécule SAP ait un rôle prépondérant dans le développement des cellules iNKT murines et humaines. Or un lien existe entre Fyn et SAP, puisque SAP active la protéine kinase Fyn et engendre son recrutement par les récepteurs SLAM.

Contrairement aux lymphocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels, qui sont sélectionnés par les cellules épithéliales thymiques, les précurseurs thymiques iNKT sont sélectionnés par des thymocytes DP. Cette interaction entre deux thymocytes engendre de manière originale, en plus du signal TCR, un second signal entre deux récepteurs de la famille Slam<sup>8</sup> : Slamf1, aussi appelé SLAM, et Slamf6, aussi appelé Ly108 (Griewank et al., 2007). Ce type de second signal ne peut pas être induit lors de la sélection positive des cellules T  $\alpha\beta$  classiques puisque les molécules Slam ne sont exprimées que par des cellules d'origine hématopoïétique. Pour être activés, les récepteurs Slam ont besoin d'être phosphorylés par des tyrosines kinases Fyn qui sont recrutées via des molécules adaptatrices SAP. Or des souris déficientes en molécules SAP ou Fyn présentent un défaut en cellules iNKT dont la majorité des précurseurs (V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18+) sont bloqués pendant ou juste après la sélection positive (cellules CD24<sup>high</sup>). Chez des souris déficientes en récepteur Slamf1 ou Slamf6, on observe une petite réduction du nombre de cellules iNKT (tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer+) au niveau thymique et en périphérie (rate et foie), avec un défaut de transition CD24<sup>high</sup> vers CD24<sup>low</sup>. Comme pour SAP et Fyn, les récepteurs Slamf1 et Slamf6 jouent un rôle dans le développement des cellules iNKT juste après leur sélection positive. L'activité des récepteurs Slam peut être partiellement redondante, ce qui explique le fait que le nombre

---

<sup>8</sup> La famille de récepteurs Slam, pour Signaling Lymphocytic-Activation Molecule, correspond à des molécules impliquées dans la signalisation suite à l'activation de lymphocytes, et comprend 6 formes avec Slamf1 et Slamf3 à Slamf7 dont les gènes codants sont tous situés sur le même locus.

de cellules iNKT n'est que légèrement diminué chez des souris déficientes pour l'un des deux récepteurs, et c'est pourquoi la génération d'une double déficience pour Slamf1 et Slamf6 serait intéressante. Néanmoins, les gènes codant pour toutes les formes de ces récepteurs étant situés sur le même locus, une double déficience ciblée pour Slamf1 et Slamf6 ne peut être réalisée, et c'est la raison pour laquelle des souris chimères pseudo-déficientes pour ces deux récepteurs ont été générées. Les résultats des différents croisements mettent en évidence la nécessité d'une interaction homotypique des récepteurs Slamf1 ou Slamf6 dans le développement des cellules iNKT.

Le second signal généré par le récepteur Ly108 (Slamf6) semble jouer un rôle dans l'induction du facteur de transcription PLZF. En effet, l'interaction homotypique Slam-Slam de ce récepteur amplifie le signal TCR, ce qui engendre une augmentation de l'expression d'Egr2, qui va pouvoir se fixer sur le promoteur du gène Zbtb16 codant pour le facteur de transcription PLZF. Le récepteur Ly108 contribue donc à l'induction de PLZF suite au signal TCR, conduisant ainsi à la différenciation des cellules iNKT (Dutta et al., 2013).

Très récemment, le rôle de cette interaction entre molécules Slam a été étudié par Lu et ses collaborateurs (Lu et al., 2019). Ils ont clairement mis en évidence l'implication de ces molécules dans le développement des cellules iNKT (tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>), puisqu'une forte diminution (80 à 90%) de leur nombre est observée dans le thymus, la rate et le foie de souris déficientes pour toutes les formes de récepteurs Slam (souris SFR KO), tandis qu'une légère augmentation des cellules T conventionnelles matures CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> est observée chez ces souris. Cette réduction est en outre de plus en plus prononcée au cours du développement thymique, avec aucun impact au stade 0, 50% de perte au stade 1, 75% de perte au stade 2, et l'impact le plus fort avec 90% de perte au stade 3. Si les récepteurs Slam sont importants dans le développement des cellules iNKT, il semble néanmoins qu'ils interviennent seulement après la sélection positive (stade 0) de ces cellules. Un changement dans l'utilisation du segment V $\beta$  a également été observé, avec une augmentation du nombre de cellules iNKT V $\beta$ 7<sup>+</sup> et une diminution des cellules V $\beta$ 8<sup>+</sup>. De plus, les cellules iNKT résiduelles des souris SFR KO présentent une augmentation de leur potentiel de prolifération (marquages BrdU et Ki67), mais leur survie est diminuée par augmentation de leur apoptose.

En croisant des souris SFR KO avec des souris Nur77<sup>GFP</sup>, les auteurs ont pu étudier l'impact de la perte des récepteurs Slam sur la signalisation TCR. En effet, Nur77 est un gène dont l'expression est induite suite à la signalisation TCR dans les thymocytes et les cellules T. Chez les souris Nur77<sup>GFP</sup>, l'expression de la GFP est placée sous le contrôle du promoteur de Nur77, et les taux d'expression de cette protéine fluorescente de couleur verte sont donc corrélés à la force du signal TCR. Leurs résultats montrent une augmentation du nombre de cellules iNKT GFP<sup>+</sup> chez les souris issues du croisement SFR KO x Nur77<sup>GFP</sup> aux stades 1 à 3, mais pas au stade 0, en comparaison avec des souris Nur77<sup>GFP</sup>. Autrement dit, après la sélection positive des cellules iNKT, la signalisation TCR au sein de ces cellules est augmentée en absence de récepteurs Slam. La présence des récepteurs Slam impliquerait donc une diminution de la signalisation TCR iNKT aux stades 1 à 3 du développement. Cette hypothèse est confortée par l'augmentation de l'expression de récepteurs inhibiteurs (comme PD-1 ou Lag-3) par les cellules iNKT résiduelles des souris SFR KO en comparaison avec des souris sauvages, et par la diminution encore plus forte du nombre de cellules iNKT chez des souris double transgéniques SFR et PD-1 KO, notamment aux stades 2 et 3 du développement. Ces observations mettent en évidence une compensation de la perte de l'effet inhibiteur des récepteurs Slam par l'expression de récepteurs inhibiteurs par les cellules iNKT, et donc la nécessité de diminuer le signal TCR dans les stades plus avancés du développement des cellules iNKT.

La restauration de l'expression du récepteur Slam $\beta$  chez des souris SFR KO permet de retrouver un nombre de cellules iNKT classique. Néanmoins, lorsque ce récepteur est muté sur son motif ITSM<sup>9</sup> il n'y a plus de développement correct des cellules iNKT. L'effet des récepteurs Slam sur le développement des cellules iNKT passe donc par son motif ITSM et les molécules qu'il recrute en aval.

Des souris exprimant une version de la molécule SAP pouvant se fixer au motif ITSM des récepteurs Slam, mais ne pouvant pas recruter Fyn ont été générées. Chez ces souris, on observe une réduction de 50% du nombre de cellules iNKT affectant tous les stades du développement, avec une augmentation de la signalisation TCR, sans effet sur l'expression

---

<sup>9</sup> Pour immunoreceptor tyrosine-based switch motifs, correspondant à un motif comprenant des tyrosines et présent sur la partie intracellulaire des récepteurs Slam, qui peut recruter des molécules activatrices (complexe SAP-Fyn) ou inhibitrices (SHP-1).

de PD-1. A l'inverse, des souris déficientes pour la molécule SHP-1<sup>8</sup>, ne présentent aucun défaut dans le nombre et la fréquence des cellules iNKT, ni dans la signalisation TCR, avec tout de même une augmentation de l'expression de PD-1. Ces résultats suggèrent donc que la voie passant par le complexe SAP-Fyn, aurait dans ce cas précis, une activité inhibitrice cruciale dans la diminution de la force de la signalisation du TCR iNKT, et donc dans le maintien du nombre de cellules iNKT. En absence de la voie SHP-1, son effet inhibiteur serait compensé par la surexpression de récepteurs inhibiteurs tel que PD-1. En conclusion, Lu et ses collègues démontrent, eux aussi, que les récepteurs Slam sont impliqués dans le développement des cellules iNKT, mais pour la première fois proposent que ce soit grâce à une activité inhibitrice sur la signalisation TCR suite à la sélection positive des cellules iNKT. Leur présence permet d'augmenter la survie des cellules iNKT, alors que leur absence engendre un changement dans l'utilisation du segment V $\beta$ , ainsi qu'une augmentation de l'expression de récepteurs inhibiteurs afin de compenser l'augmentation du signal TCR. L'effet inhibiteur des récepteurs Slam, révélé dans cette étude, est en contradiction avec les conclusions de Dutta et ses collaborateurs, qui démontraient une augmentation de la signalisation TCR médiée par ces récepteurs. Lu *et al.* expliquent cette contradiction par l'expérimentation *in vitro* et l'activation artificielle des récepteurs dans l'étude de Dutta *et al.* . Lu et ses collègues concluent que les voies SAP-Fyn et SHP-1 travaillent en synergie pour obtenir l'effet inhibiteur des récepteurs Slam, et proposent finalement que le complexe SAP-Fyn puisse avoir une activité inhibitrice et pas seulement activatrice.

Cette étude n'est, néanmoins, pas complètement en contradiction avec les travaux de Dutta *et al.*, notamment sur le lien observé entre les récepteurs Slam et la voie Egr2-PLZF. En effet, Lu et ses collaborateurs observent une diminution de l'expression de PLZF au stade 0 chez des souris SFR KO, ainsi qu'une nette diminution de l'expression d'Egr2 et de PLZF au stade 0 chez des souris déficientes pour la molécule SAP. Il apparaît donc que les récepteurs Slam faciliteraient l'expression de PLZF au moment de la sélection positive des cellules iNKT.

D'après tous ces résultats, les récepteurs Slam pourraient avoir deux rôles dans la différenciation des cellules iNKT en fonction du stade de développement. On peut imaginer que dans les stades les plus précoces (DP), l'implication de ces récepteurs

abaisserait le seuil d'activation des cellules iNKT permettant leur sélection positive, et induirait l'expression du facteur de transcription PLZF, signature moléculaire des cellules iNKT. Puis à l'inverse, dans les stades les plus avancés (stades iNKT 1 à 3), ils inhiberaient la signalisation TCR iNKT afin d'échapper à la sélection négative et augmenteraient ainsi la survie de ces cellules (Figure 12). Bien qu'il reste encore des points à éclaircir, notamment pour expliquer l'effet inhibiteur du complexe SAP-Fyn, pour la première fois proposé par Lu *et al.*, sur la signalisation TCR iNKT, tous ces résultats sont en accord sur l'implication de la voie Slam/SAP/Fyn dans le développement des cellules iNKT. L'utilisation originale de cette voie est possible du fait de la sélection positive des cellules iNKT par des thymocytes DP, et explique en partie la différence dans le programme de développement entre les cellules iNKT et les lymphocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels.

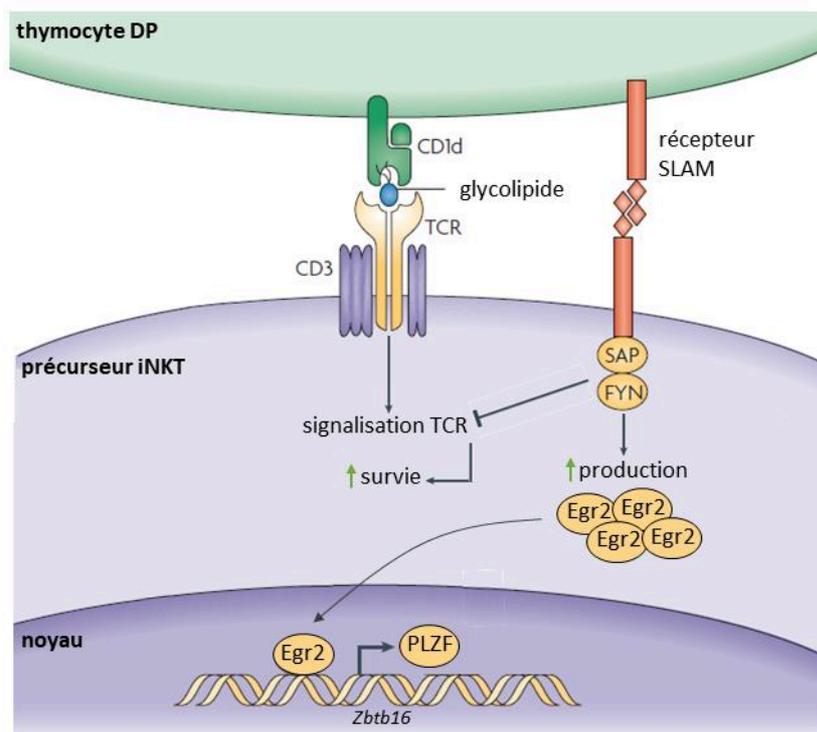


Figure 12 Implication de la voie de signalisation Slam/SAP/Fyn suite à la sélection positive d'un précurseur iNKT par un thymocyte DP selon Lu *et al.*, 2019. Modifiée d'après Godfrey *et al.*, 2007.

A titre informatif, plusieurs autres facteurs, listés ci-après, influençant la différenciation des cellules iNKT ont été mis en évidence, comme la protéine kinase C $\theta$  et le facteur de transcription NF $\kappa$ B, l'IL-15 et l'expression de la chaîne  $\beta$  de son récepteur, le signal de co-stimulation via l'interaction B7-CD28, les facteurs de transcription Ets1 ou Runx1, les protéines TET, ou encore des miRNA (Gapin, 2016).

## 5) La sélection négative

A partir de l'étape de sélection positive, les cellules iNKT suivent leur propre voie de différenciation. A l'instar de celle des cellules T conventionnelles, la voie de différenciation des cellules iNKT comprend-elle un phénomène de sélection négative ? Plusieurs études évoquent différents mécanismes permettant aux cellules iNKT d'échapper à cette sélection négative, justifiant ainsi le caractère autoréactif souvent décrit pour les cellules iNKT (Troisième partie, page 69).

La sélection négative pour les lymphocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels intervient lorsque l'avidité du TCR pour son ligand CMH-peptide est trop élevée. Deux mécanismes permettant de diminuer l'avidité du TCR iNKT pour son ligand CD1d-glycolipide ont été suggérés dans les années 90, afin d'expliquer l'échappement des cellules iNKT au phénomène de sélection négative :

- (i) une faible expression du TCR $\alpha\beta$  chez des cellules NK1.1<sup>+</sup> décrite dans les premières études des cellules iNKT (Arase et al., 1992)
- (ii) la perte d'expression du CD8 au cours de leur différenciation (Bendelac et al., 1994)

Un autre mécanisme pour expliquer l'échappement des cellules iNKT à la sélection négative repose sur leur caractéristique d'expression de récepteurs des cellules NK. Comme décrit précédemment (Première partie, I- 1) b/, page 22), les cellules iNKT peuvent exprimer des récepteurs des cellules NK de la famille Ly49 qui reconnaissent des molécules de CMH-I. Ces récepteurs se trouvent sous deux formes : les activateurs comme Ly49D et Ly49H, et les inhibiteurs comme Ly49A. Il est intéressant de noter que les récepteurs Ly49 activateurs ne sont naturellement pas exprimés par les cellules CD3<sup>+</sup>, incluant donc les cellules iNKT. Afin d'étudier le rôle de ces récepteurs Ly49 dans la différenciation thymique des cellules iNKT, Voyle et ses collègues (Voyle et al., 2003) ont généré des souris doublement transgéniques exprimant le récepteur activateur Ly49D et la molécule DAP12 nécessaire à son activité de signalisation. Après avoir vérifié que les cellules iNKT de ces souris exprimaient bien Ly49D et DAP12, ils ont croisé ces souris avec des souris exprimant le ligand de ce récepteur. Chez les souris issues de ce croisement, ils

ont pu observer une nette réduction du nombre de cellules iNKT thymiques (NK1.1<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>V $\beta$ 8.2<sup>+</sup> ou tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer<sup>+</sup>) par rapport aux souris à l'origine du croisement, indiquant que le développement des cellules iNKT est impacté par l'activité de récepteur Ly49D. De plus, les cellules iNKT résiduelles des souris issues du croisement sont bloquées à des stades plutôt précoces (1 et 2) du développement, et présentent donc un phénotype immature. Pour étudier l'impact de la signalisation par Ly49D sur la différenciation des cellules iNKT, ils ont ensuite généré de nouvelles souris transgéniques exprimant simultanément le récepteur activateur Ly49D et le récepteur inhibiteur Ly49A, ces deux récepteurs possédant le même ligand. Les souris issues du croisement de ces nouvelles souris transgéniques avec des souris exprimant le ligand de ces deux récepteurs montrent un pourcentage de thymocytes iNKT (NK1.1<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup> V $\beta$ 8.2<sup>+</sup>) plus élevé que chez les souris issues du croisement précédent, sans pour autant revenir à des pourcentages retrouvés chez des souris non transgéniques. Chez la souris, il semble donc que l'activité inhibitrice du récepteur Ly49A puisse restaurer en partie la population iNKT. Ces résultats suggèrent que l'absence d'expression de récepteurs NK activateurs par les thymocytes iNKT à des stades précoces de leur développement, leur permet d'échapper à la sélection négative qui serait engendrée par une signalisation trop forte. De plus, l'activité de récepteurs NK inhibiteurs pourrait aussi contrebalancer une signalisation TCR trop importante et ainsi empêcher les cellules iNKT d'être sélectionnées négativement.

Si les précédentes études mettent en évidence les mécanismes par lesquels les cellules iNKT peuvent échapper à la sélection négative, les résultats qui vont suivre démontrent la susceptibilité de ces cellules à ce phénomène dans des conditions non physiologiques.

En effet, les travaux de Chun et ses collaborateurs (Chun et al., 2003) ont mis en évidence qu'*in vitro* les cellules iNKT pouvaient être sujettes à la sélection négative. Pour le démontrer *in vivo*, ils ont créé un modèle de souris transgéniques pour la molécule CD1d sous le contrôle du promoteur du CMH-I (promoteur ubiquitaire). Dans ces souris, où la molécule CD1d est sur-exprimée par tous les types cellulaires l'exprimant habituellement, ils ont observé une diminution de la fréquence des cellules iNKT au niveau thymique et en périphérie. L'analyse de la chaîne  $\beta$  du TCR des cellules iNKT résiduelles a mis en évidence une intégration préférentielle du segment V $\beta$ 2, alors que d'ordinaire ce sont les

segments V $\beta$ 8 et V $\beta$ 7 les plus utilisés. Ces résultats suggèrent que l'intégration du segment V $\beta$ 2 engendrerait une diminution de l'affinité du TCR iNKT pour son ligand (dans ce cas sur-exprimé) afin d'échapper à la sélection négative. Pour déterminer si les cellules dendritiques peuvent être à l'origine de la sélection négative des cellules iNKT comme c'est le cas pour les lymphocytes T  $\alpha\beta$  classiques, des transferts de cellules dérivant de la moelle osseuse avec, soit des cellules dendritiques issues de souris sauvages, soit des cellules dendritiques issues de souris transgéniques, à des souris RAG déficientes et irradiées ont été effectués. Les résultats ont montré une diminution du nombre de cellules iNKT périphériques (rate et foie) lorsque les cellules dendritiques transférées sont issues de souris transgéniques, donc lorsqu'elles sur-expriment le CD1d, les cellules dendritiques peuvent être à l'origine de la sélection négative des cellules iNKT.

Dans la même idée, Williams et ses collègues (Williams et al., 2008) ont démontré qu'une surexpression de la molécule CD28 chez des souris transgéniques entraînait une diminution de la fréquence de thymocytes iNKT (tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer<sup>+</sup>). Une diminution bien plus drastique a été observée lorsque la molécule B7 était sur-exprimée chez des souris transgéniques exprimant la molécule CD28 à un niveau physiologique. Comme dans l'étude précédente, l'analyse de la chaîne  $\beta$  du TCR des cellules iNKT résiduelles de souris transgéniques pour la molécule B7 a mis en évidence une intégration préférentielle du segment V $\beta$ 2. Ces résultats suggèrent à nouveau qu'une trop forte stimulation des thymocytes iNKT lors de leur développement, dans ce cas via le signal de co-stimulation B7-CD28, peut conduire à leur sélection négative.

Finalement, comme pour les lymphocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels, il a été démontré que l'affinité du TCR iNKT pour son ligand CD1d-glycolipide était critique pour échapper à la sélection négative (Bedel et al., 2014). Des souris transgéniques ont été générées pour qu'elles expriment une chaîne  $\beta$  de TCR iNKT hybride. Cette chaîne  $\beta$  hybride inclue le segment V $\beta$ 6, qui ne réagit pas naturellement vis-à-vis du CD1d. Néanmoins, lorsqu'elle est modifiée au niveau du CDR2, et associée à la chaîne  $\alpha$  iNKT invariante, elle est capable de reconnaître le CD1d, même chargé avec des glycolipides faiblement réactifs, comme des glycolipides du Soi (tétramères CD1d-Self). Dans ces souris transgéniques, cette chaîne  $\beta$  iNKT hybride peut s'associer avec n'importe quelle chaîne  $\alpha$  et son expression

n'affecte pas le développement des lymphocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels. Par contre, elle affecte clairement le développement des cellules iNKT, puisqu'une large baisse de la proportion et du nombre total de cellules iNKT (tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer<sup>+</sup>) est observée au sein du thymus et en périphérie (rate et foie). Il reste quelques cellules iNKT résiduelles qui ont néanmoins perdu la capacité de reconnaître des glycolipides du Soi puisqu'elles ne fixent plus de tétramères CD1d-Self. Ces cellules sont bloquées à des stades de développement précoces (0 et 1), leur distribution est changée, et elles ne sont pas fonctionnelles. Si ces cellules expriment pourtant bien la chaîne  $\alpha$  invariante iNKT (V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18), l'analyse plus poussée de la séquence en acides aminés de cette chaîne a mis en évidence l'apparition en position 94 d'un autre acide aminé que l'acide aspartique retrouvé dans la chaîne  $\alpha$  invariante iNKT naturelle. La même analyse a été réalisée sur les thymocytes à différents stades de leur développement et a déterminé que le changement en acide aminé s'opère entre le stade DP et le stade 0, c'est-à-dire au moment de la sélection positive des cellules iNKT. Ce changement en acide aminé dans la chaîne  $\alpha$  diminue l'affinité du TCR iNKT pour des ligands du Soi et ainsi contrebalance la forte affinité de la chaîne  $\beta$  hybride, ce qui permet aux cellules iNKT résiduelles d'échapper à la sélection négative.

Bien que les premières études mettaient en évidence un échappement des cellules iNKT à la sélection négative, expliquant ainsi la présence de cellules iNKT autoréactives en périphérie, les données plus récentes démontrent cependant que ces cellules sont susceptibles à cette étape de sélection. En effet, le bon développement des cellules iNKT au niveau thymique est soumis à un niveau de signalisation précis, régulé par l'affinité du TCR pour son ligand CD1d-glycolipide, par le niveau de co-stimulation activatrice ou inhibitrice, et par la signalisation sous-jacente à ces molécules. A l'instar des cellules T  $\alpha\beta$  conventionnelles, les cellules iNKT subissent donc une sélection négative, qui pourrait toutefois être moins efficace, générant ainsi des cellules iNKT autoréactives.

## 6) Jusqu'aux sous-populations de cellules iNKT

Les descriptions de cellules iNKT font toujours référence à leur forte capacité de production rapide de cytokines. Les premières études ont donc souvent décrit les cellules iNKT en fonction de leur profil cytokinique, plutôt Th1 lorsqu'elles produisent principalement de l'IFN $\gamma$ , ou plutôt Th2 avec la production majeure d'IL-4.

Récemment, une nouvelle classification est apparue, prenant toujours en compte le type de cytokines produites, mais également les facteurs de transcription exprimés par chaque sous-population de cellules iNKT. Par analogie avec les cellules T CD4<sup>+</sup> conventionnelles, cinq principaux types fonctionnels de cellules iNKT ont été définis chez l'Homme et la souris : iNKT1, iNKT2, iNKT17, iNKT<sub>FH</sub> (pour follicular helper) et iNKT10. Chez la souris, les cellules iNKT1, 2 et 17 se différencient au sein du thymus avant leur émigration. L'origine des cellules iNKT<sub>FH</sub> et iNKT10 reste quant à elle à déterminer. Elles pourraient dériver d'un précurseur thymique présent à une très faible fréquence ne permettant pas de les identifier, ou se différencier en périphérie en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent.

### a/ Les cellules iNKT1, iNKT2 et iNKT17

Les travaux de l'équipe de Taniguchi (Terashima et al., 2008) ont permis l'identification d'une sous-population de cellules iNKT spléniques exprimant le récepteur B de l'IL-17 (IL-17RB) et réactives à l'IL-25. Afin d'analyser l'origine et la fonction de ces cellules, des souris déficientes pour le récepteur IL-17RB (IL-17RB<sup>-/-</sup>) ont été générées (Watarai et al., 2012). La cytokine IL-15 étant importante dans le développement des cellules iNKT, Watarai et ses collaborateurs ont également étudié son impact en générant des souris transgéniques pour une version mutée non active de l'IL-15.

Chez les souris IL-17RB<sup>-/-</sup>, ils observent une légère baisse du nombre et du pourcentage de cellules iNKT (dimères CD1d- $\alpha$ GalCer<sup>+</sup>) dans le thymus et la rate, et notamment aux stades 1 (CD44<sup>low</sup> NK1.1<sup>-</sup>) et 2 (CD44<sup>high</sup> NK1.1<sup>-</sup>) de leur développement. Chez les souris déficientes en IL-15, le nombre et le pourcentage de cellules iNKT (dimères CD1d-

$\alpha$ GalCer<sup>+</sup>) sont fortement réduits au niveau thymique et en périphérie (rate et foie), et notamment au stade 3 (CD44<sup>high</sup> NK1.1<sup>-</sup>) lors du développement thymique.

De plus, après activation, les cellules iNKT de souris IL-17RB<sup>-/-</sup> produisent peu de cytokines de type Th2 (IL-9, 10 et 13) et Th17 (IL-17A et IL-22), alors que les cellules iNKT issues de souris déficientes en IL-15 produisent moins d'IFN $\gamma$ .

Les auteurs ont pu définir que les cellules iNKT faisant défaut chez les souris déficientes en IL-15 étaient par contre bien présentes chez les souris IL-17RB<sup>-/-</sup>, et ne nécessitent donc pas l'expression de ce récepteur pour se développer. Lors du développement iNKT, il apparaît donc que deux voies de différenciation se distinguent en fonction de l'expression de l'IL-17RB. Si le précurseur est IL-17RB<sup>+</sup>, il donnera naissance à des cellules iNKT arrêtées au stade 2 et aux profils Th2 ou Th17, alors que s'il est IL-17RB<sup>-</sup> mais réceptif à l'IL-15, il génèrera des cellules iNKT allant jusqu'au stade 3 et au profil Th1 (production d' IFN $\gamma$ ).

Une analyse génétique a ensuite prouvé que les cellules iNKT IL-17RB<sup>-</sup> étaient bien CD122<sup>+</sup> (chaîne  $\beta$  du récepteur à l'IL-15), et leur a permis de caractériser plus précisément cette population avec un niveau de transcrits liés au profil Th1 très élevé, en lien avec une forte production d'IFN $\gamma$  après activation, une expression de CXCR3 et CXCR6, et une réactivité en présence d'IL-12 en lien avec une forte expression de transcrits IL-12R $\beta$ 2 (chaîne  $\beta$ 2 du récepteur à l'IL-12). Parmi les cellules iNKT IL-17RB<sup>+</sup>, on distingue une sous-population CD4<sup>+</sup> et une sous-population CD4<sup>-</sup>. L'analyse génétique de la sous-population CD4<sup>+</sup> IL-17RB<sup>+</sup> montre un niveau plus élevé de transcrits liés au profil Th2. En effet, après activation cette population de cellules iNKT produit de l'IL-4, de l'IL-9, de l'IL10 et de l'IL-13. Elle est également réactive en présence d'IL-25 et exprime CCR4 et CCR7. L'analyse génétique de la sous-population CD4<sup>-</sup> IL-17RB<sup>+</sup> a mis en évidence un niveau plus élevé de transcrits liés au profil Th17, ce qui corrèle avec la production d'IL-17A et d'IL-22 observée après activation de ces cellules. De par l'expression du récepteur à l'IL-23, ces cellules sont réactives en présence de cette cytokine, et expriment CCR4, CCR6 et CCR7.

Cette étude a donc permis de définir trois sous-populations de cellules iNKT, présentes au niveau thymique chez la souris, avec des cellules iNKT Th1 IL-17RB<sup>-</sup> et sensibles à l'IL-15, appelées maintenant iNKT1, des cellules iNKT Th2 IL-17RB<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, appelées maintenant

iNKT2, et des cellules iNKT Th17 IL-17RB<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>, appelées maintenant iNKT17 (Figure 13).

A l'image des cellules T CD4<sup>+</sup> conventionnelles Th1, Th2 et Th17, ces trois sous-populations de cellules iNKT sont maintenant définies en fonction de l'expression de facteurs de transcription et de leur production de cytokines.

Les cellules iNKT1 expriment le facteur de transcription T-bet (Michel et al., 2008) et de manière assez faible PLZF, et sont connues pour produire principalement de l'IFN $\gamma$ .

Les cellules iNKT2 expriment fortement les facteurs de transcription GATA-3 et PLZF, et produisent principalement de l'IL-4 et de l'IL-13. Néanmoins, il est important de noter que le facteur de transcription GATA-3 est nécessaire au développement de toutes les cellules iNKT (P. J. Kim et al., 2006), donc les cellules iNKT2 pourraient être plus précisément définies comme le sous-type GATA-3<sup>+</sup> n'exprimant pas T-bet ni ROR $\gamma$ t.

Des cellules iNKT CD44<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup> productrices d'IL-17 avaient déjà été mises en évidence par Michel et ses collègues (Michel et al., 2008). Si le facteur de transcription ROR $\gamma$ t est impliqué dans les étapes précoces du développement des cellules iNKT (Deuxième partie, I- 2) b/, page 45), ils ont pu démontrer qu'il est aussi spécifiquement important pour le développement des cellules iNKT17. Les cellules iNKT17 sont donc définies comme les cellules iNKT exprimant le facteur de transcription ROR $\gamma$ t et un niveau intermédiaire de PLZF, et sont connues pour produire principalement de l'IL-17 (Figure 13).

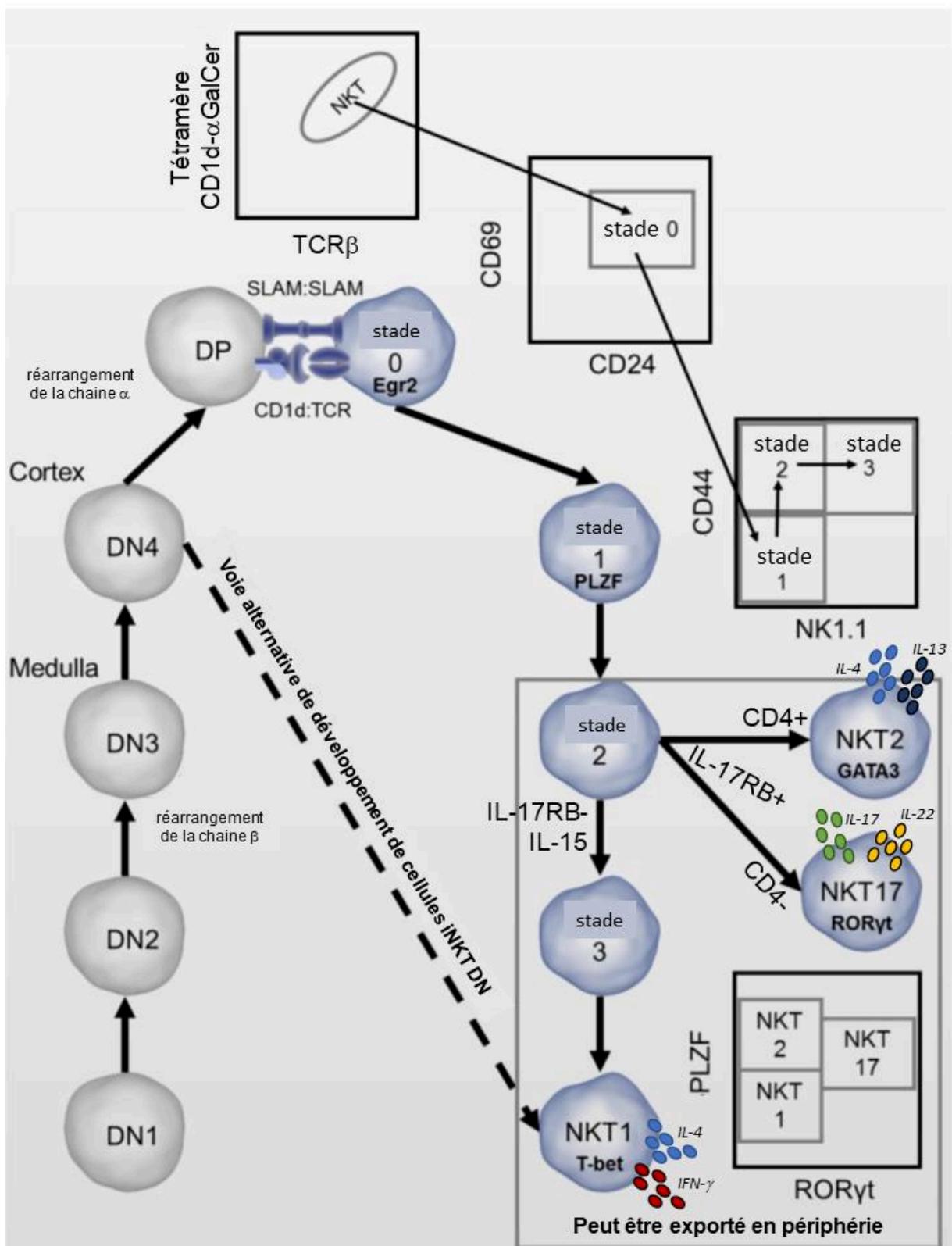


Figure 13 Modèle de développement des cellules iNKT selon les principaux marqueurs et les sous-populations finales. Modifiée d'après Gapin, 2016 et Shissler et Webb, 2018.

## b/ Les cellules iNKT<sub>FH</sub> et iNKT10

Si les trois sous-populations de cellules iNKT décrites précédemment sont maintenant bien définies et étudiées pour leur rôle dans des contextes pathologiques, il existe encore d'autres types de cellules iNKT.

Les cellules iNKT interagissent avec de nombreux effecteurs de l'immunité, et notamment les lymphocytes B (Première partie, I- 4) c/, page 35). Parmi les cellules iNKT, il existe une sous-population de cellules iNKT<sub>FH</sub>, exprimant le facteur de transcription Bcl-6 et produisant de l'IL-21, qui peut tout particulièrement fournir une aide précieuse aux cellules B dans la formation de centres germinatifs (Chang et al., 2012; King et al., 2012).

Les cellules iNKT peuvent s'accumuler dans le tissu adipeux, où elles peuvent représenter 15 à 20% des lymphocytes T. Dans ce tissu, elles ont un rôle régulateur en induisant la polarisation de macrophages vers le phénotype M2, et en activant et régulant la fonction des lymphocytes T régulateurs conventionnels. Ces cellules iNKT régulatrices produisent de l'IL-10 sous l'action du facteur de transcription E4BP4 (ou Nilf3), et de manière originale expriment très peu PLZF (Lynch et al., 2015).

## 7) La voie alternative de développement des cellules iNKT DN

Les cellules iNKT étant pour une grande partie DN, initialement, le modèle de précurseur « engagé » soutenait l'hypothèse qu'elles puissent donc dériver d'un précurseur DN, qui exprimerait le TCR iNKT sans passer par un stade DP, et qui pourrait par la suite exprimer ou non le co-récepteur CD4.

Bien que le modèle « engagé » ait été rejeté, récemment, une voie alternative de développement des cellules iNKT a été identifiée par Dashtsoodol et ses collaborateurs (Dashtsoodol et al., 2017). Dans leur étude, ils utilisent le système Cre-Lox pour déterminer si les cellules iNKT DN peuvent dériver d'un précurseur non DP. Ils ont ainsi généré des souris transgéniques avec expression de Cre sous le contrôle d'un enhancer (E8<sub>III</sub>) actif seulement dans les thymocytes DP (E8<sub>III</sub>-Cre), et des souris transgéniques exprimant une séquence « stop » flanquée de séquences Lox en amont du gène codant

pour la YFP (pour Yellow Fluorescent Protein, protéine fluorescente de couleur jaune) (YFP-Lox) et sous le contrôle d'un promoteur de gène ubiquitaire (Rosa26). En croisant les deux souris transgéniques, ils obtiennent des souris double-transgéniques avec des thymocytes DP YFP<sup>+</sup> et dont la descendance sera également YFP<sup>+</sup>, puisque le codon stop ne sera éliminé que dans ces cellules. L'analyse des splénocytes de ces souris montre que les cellules T conventionnelles CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sont bien YFP<sup>+</sup> et dérivent donc de thymocytes DP, mais révèlent aussi la présence de splénocytes DN TCRβ<sup>+</sup>YFP<sup>-</sup>, s'étant donc développés sans passer par le stade thymique DP. Au niveau thymique, leurs résultats confirment cette observation avec des thymocytes DN TCRβ<sup>+</sup>YFP<sup>-</sup> matures, qui se révèlent être pour 21% d'entre eux des thymocytes iNKT matures (dimères CD1d-αGalCer<sup>+</sup>). Il apparaît donc qu'une partie des cellules iNKT DN matures contourne le stade de développement DP, et se développerait à partir du stade DN immature précédant le stade DP lors de la différenciation thymique. Afin de confirmer cette hypothèse, les auteurs ont croisé les souris E8III-Cre avec des souris transgéniques exprimant le gène RAG2 flanqué de séquences Lox, générant ainsi des souris double-transgéniques avec un blocage du développement au stade DP (forte réduction des thymocytes T conventionnelles CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) du fait de l'impossibilité de réarranger leur TCR, tout en conservant la fraction de thymocytes DN (immatures et matures) intacte. Chez ces souris, l'analyse transcriptionnelle des fractions thymiques DP et DN immatures (TCRβ<sup>low-neg</sup>) a révélé la présence de transcrits Vα14-Jα18 seulement dans la fraction DN, prouvant ainsi que le réarrangement de la chaîne α invariante iNKT s'est effectué sans passer par le stade DP. De plus, parmi les thymocytes DN matures (TCRβ<sup>+</sup>), 67% sont des thymocytes iNKT (dimères CD1d-αGalCer<sup>+</sup>). Ces résultats indiquent donc que les cellules iNKT DN matures peuvent également dériver du stade de développement thymique DN immature le plus tardif (DN4), où la sélection de la chaîne β est réalisée, et donc sans passer par le stade DP (Figure 13). Après activation, ces cellules iNKT d'origine DN présentent un profil cytokinique Th1, avec production d'IFNγ, ainsi qu'une forte cytotoxicité.

## II - Le développement des cellules iNKT humaines

L'accès à des échantillons de thymus humains étant compliqué, le développement des cellules iNKT chez l'Homme est bien plus difficile à étudier que dans des modèles murins. Pourtant comme chez la souris, il a pu être mis en évidence que les cellules iNKT humaines avaient une origine thymique (Baev et al., 2004; Berzins et al., 2005; Sandberg et al., 2004). Les thymocytes iNKT humains sont bien moins fréquents (environ 0,0015% des thymocytes totaux pour Berzins et ses collègues) que les thymocytes iNKT murins (environ 0,5% des thymocytes totaux), ce qui complexifie d'autant plus leur étude.

Sandberg et ses collaborateurs ont pu observer deux populations de thymocytes iNKT (cellules  $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ ), une exprimant fortement le TCR iNKT ( $TCR^{high}$ ) et l'autre l'exprimant faiblement ( $TCR^{low}$ ). Les cellules iNKT  $TCR^{low}$  sont DP, expriment faiblement le CD3 et présentent un profil plutôt immature, alors que les cellules  $TCR^{high}$  sont principalement  $CD4^+$ , expriment fortement le CD3 et ont un profil plutôt mature. Ainsi les cellules iNKT DP pourraient être des précurseurs des cellules iNKT  $CD4^+$ . Les cellules iNKT humaines sont, comme chez la souris, sélectionnées positivement par des thymocytes DP qui expriment la molécule de présentation CD1d. Il existe peu de cellules iNKT thymiques  $CD4^-$ , pourtant on retrouve énormément de cellules iNKT DN dans le sang périphérique (environ 50% des cellules iNKT). Baev et ses collègues ont ainsi étudié le profil des cellules iNKT  $CD4^+$  et  $CD4^-$  en périphérie. Ils ont mis en évidence que la population  $CD4^+$  était réactive à la présence d'IL-7 de par l'expression du CD127 (récepteur à l'IL-7) et effectuait peu de divisions en périphérie, alors que la population  $CD4^-$  (principalement DN et quelques cellules  $CD8\alpha\alpha$ ) exprime le CD122 et est donc réactive à l'IL-15, et présente une forte expansion en périphérie. Si une partie seulement des thymocytes iNKT humains exprime le récepteur NK CD161 (25%), la grande majorité des cellules iNKT périphériques l'exprime (75%). De plus, les thymocytes iNKT humains ne sont pas capables de produire des cytokines et acquièrent cette fonction en périphérie. Il apparaît donc très clairement que les cellules iNKT humaines finissent de maturer en périphérie. De plus, contrairement aux cellules iNKT murines, les cellules iNKT humaines périphériques ont un profil cytokinique dépendant de l'expression du co-récepteur CD4, avec des cellules iNKT  $CD4^+$  plutôt Th0 (production d'IL-4, IL-13 et  $IFN\gamma$ ), et des cellules

iNKT CD4<sup>-</sup> (ou DN) plutôt Th1 (production d'IFN $\gamma$ ) (Gumperz et al., 2002; Lee et al., 2002a).

Il existe donc très peu d'informations concernant la différenciation des cellules iNKT humaines, pourtant quelques indices laissent à penser que le développement de ces cellules chez l'Homme serait soumis aux mêmes facteurs que chez la souris. Par exemple, le site de fixation de Egr2 sur le promoteur du gène de PLZF (Zbtb16) est conservé entre les deux espèces, PLZF pourrait donc aussi être une signature transcriptionnelle des cellules iNKT humaines. Comme décrit précédemment (Deuxième partie, I- 4), page 51), la voie Slam/SAP/Fyn joue un rôle dans le développement des cellules iNKT humaines. En effet une réduction du nombre de cellules iNKT (tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer<sup>+</sup>V $\alpha$ 24<sup>+</sup> ou V $\alpha$ 24<sup>+</sup>V $\beta$ 11<sup>+</sup>) au niveau du sang périphérique est observée chez des patients atteints du syndrome XLP (pour X-linked lymphoproliferative), dont le gène codant pour la molécule SAP est muté (Chung et al., 2005; Nichols et al., 2005; Pasquier et al., 2005). Enfin comme chez la souris, les cellules iNKT humaines peuvent présenter des profils cytokiniques distincts avec comme décrit précédemment des cellules plutôt Th0 ou plutôt Th1, mais également des cellules ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> productrices d'IL-17 (Venken et al., 2019), ou encore des cellules iNKT<sub>FH</sub> (Chang et al., 2012), mais l'étude de ces cellules iNKT n'a été réalisée qu'en périphérie, et aucune donnée n'est actuellement disponible au niveau thymique.

## Troisième partie : Autoréactivité des cellules iNKT

Les études sur la réactivité des cellules iNKT ont depuis longtemps décrit des phénomènes d'autoréactivité de la part de ces cellules. Néanmoins, les bases mécanistiques à l'origine de ce phénomène ne sont à l'heure actuelle pas encore complètement élucidées. Pourtant, la compréhension des mécanismes qui régissent l'autoréactivité des cellules iNKT s'avèrerait cruciale afin de déterminer le rôle de ces cellules dans les nombreux contextes pathologiques dans lesquels elles ont été identifiées.

### I- Les origines de l'autoréactivité

L'autoréactivité se définissant par la reconnaissance de glycolipides endogènes par les cellules iNKT, c'est tout naturellement que plusieurs équipes de recherche ont tenté d'identifier le(s) glycolipide(s) du Soi activateur(s) de ces cellules. Un autre champ d'investigation s'est intéressé aux caractéristiques intrinsèques du TCR iNKT qui pourraient expliquer l'autoréactivité des cellules iNKT. Les travaux dans ces deux domaines de recherche vont maintenant être décrits.

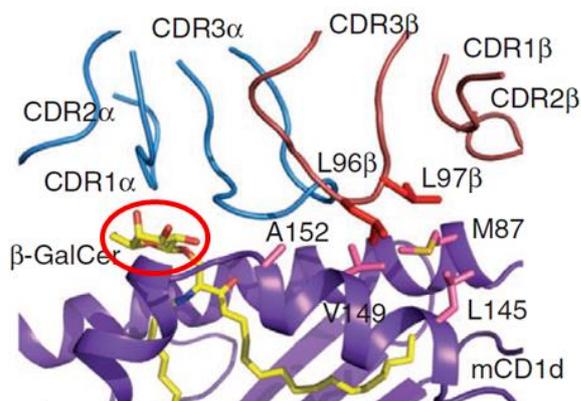
#### 1) Les ligands endogènes

L'identification du ou des ligand(s) endogène(s) activateur(s) des cellules iNKT a fait l'objet de nombreuses études. Des  $\beta$ -glycolipides ont d'abord été mis en évidence, puis des phospholipides (Gapin et al., 2013), et plus récemment des  $\alpha$ -glycolipides, des gangliosides, ainsi que des sulfatides.

Le premier glycolipide endogène des cellules iNKT à avoir été identifié est l'iGb3 (pour isoglobotrihexocylcéramide) d'origine lysosomale. Ce  $\beta$ -glycosphingolipide, sous forme synthétique, peut activer des cellules iNKT d'origine murine et humaine (Zhou et al., 2004). Pourtant l'analyse par HPLC (pour high-performance liquid chromatography) démontre que ce glycolipide n'est naturellement pas présent, ni dans différents organes comprenant le thymus, ni au sein des cellules dendritiques, chez la souris comme chez

l'Homme (Speak et al., 2007). De plus, des souris déficientes en iGb3, par inactivation de l'enzyme iGb3 synthase (iGb3S<sup>-/-</sup>), présentent un développement et un nombre normal de cellules iNKT fonctionnelles (Porubsky et al., 2007). Ces deux dernières études concluent donc que l'iGb3 n'est pas le glycolipide physiologique responsable de la sélection thymique des cellules iNKT, ni de leur activation en périphérie. L'absence d'iGb3 synthase chez l'Homme renforce cette conclusion (Christiansen et al., 2008), ainsi que l'impossibilité structurale de reconnaissance du complexe CD1d humain chargé avec de l'iGb3 par le TCR iNKT humain (Sanderson et al., 2013).

Les glycolipides les mieux reconnus par les cellules iNKT possèdent une liaison en  $\alpha$ , pourtant les mammifères ne peuvent produire que des glycolipides avec une liaison en  $\beta$ , puisque les enzymes impliquées dans leur production sont toutes des  $\beta$ -transférases. La reconnaissance de  $\beta$ -glycolipides est néanmoins possible, puisque lorsque le TCR vient se fixer sur le complexe CD1d- $\beta$ -glycolipide, il engendre une réorganisation structurale du motif sucré, reproduisant une liaison  $\alpha$  avec aplanissement du motif sucré (Figure 14). Pellicci (Pellicci et al., 2011), et Yu (Yu et al., 2011) et leurs collaborateurs respectifs ont ainsi mis en évidence la reconnaissance artificielle du  $\beta$ -GalCer par le TCR iNKT murin et humain, et de l'iGb3 par le TCR iNKT murin.



**Figure 14** Structure cristallographique d'un TCR iNKT murin (boucles en haut) contactant le mCD1d (violet) chargé avec du  $\beta$ -GalCer (jaune). La reconnaissance par le TCR engendre une réorganisation structurale du glycolipide avec aplanissement du motif sucré (entouré en rouge) qui se rapproche alors d'une conformation de glycolipides  $\alpha$ . D'après Pellicci *et al.*, 2011.

Le  $\beta$ -GlcCer est un glycolipide précurseur de la plupart des glycosphingolipides, et peut s'accumuler au sein des CPA après activation par un signal de danger. Dans un modèle *in vitro* d'infection, le  $\beta$ -GlcCer permet l'activation de cellules iNKT, c'est pourquoi il a été proposé comme ligand endogène des cellules iNKT (Brennan et al., 2011). Par la suite, une digestion enzymatique et une séparation par chromatographie des différents constituants d'une fraction de GlcCer a mis en évidence qu'un lipide mineur, l' $\alpha$ -GlcCer, co-purifié avec

le  $\beta$ -GlcCer, était en réalité à l'origine de l'auto-réactivité *in vitro* des cellules iNKT (Brennan et al., 2014). Parmi les composés dérivés du  $\beta$ -GlcCer, les gangliosides GM3 et GD3 ont été identifiés comme ligands endogènes des cellules iNKT murines. L'activation de cellules dendritiques via le TLR9 engendre une augmentation de la production de ces deux gangliosides. Néanmoins, les formes natives de ces deux composés ne sont pas activatrices, et un changement de conformation, grâce à la machinerie cellulaire des cellules dendritiques, est nécessaire pour activer les cellules iNKT *in vitro*. Après inhalation intranasale, ces composés sont également activateurs des cellules iNKT *in vivo* dans un modèle murin d'infection par *Streptococcus pneumoniae* (Paget et al., 2019).

Des extraits lipidiques de cellules murines sont capables d'activer des hybridomes iNKT murins de manière CD1d dépendante. Ces extraits contiennent plusieurs éléments, dont une fraction glycolipidique et une fraction phospholipidique, qui conservent toutes les deux leur capacité d'activer des cellules iNKT après chargement sur le CD1d. Parmi les phospholipides, le PI (pour phosphatidylinositol), le PE (pour phosphatidyléthanolamine) et le PG (pour phosphatidylglycérol) peuvent activer certains hybridomes iNKT, et ont donc été proposés comme de potentiels ligands endogènes activateurs des cellules iNKT murines (Gumperz et al., 2000). Dans la même idée, des extraits de thymocytes murins fractionnés ont mis en évidence les phospholipides pLPE (pour lysophosphatidyléthanolamine plasmalogène) et eLPA (pour acide ether-lysophosphatidique) comme pouvant être des ligands endogènes impliqués dans la sélection des cellules iNKT murines. En effet, on observe une diminution significative du nombre et de la fréquence des cellules iNKT chez des souris déficientes en GNPAT (dihydroxyacétophosphate acyl-transférase), une enzyme clé dans la synthèse de ces phospholipides (Facciotti et al., 2012). D'après ces résultats, il apparaît donc que chez la souris, les cellules iNKT peuvent reconnaître une autre famille de ligands que les glycolipides, à savoir les phospholipides.

Chez l'Homme aussi, des phospholipides ont été mis en évidence comme pouvant activer des cellules iNKT de manière auto-réactive. Des ligands élués à partir de molécules CD1d humaines ont révélé la présence de LPC (pour lysophosphatidylcholine) et LSM (pour lysosphingomyéline) comme phospholipides activateurs de clones iNKT humains (Fox et al., 2009).

Les  $\alpha$ -glycolipides ont d'abord été écartés des ligands endogènes potentiels des cellules iNKT, puisque les cellules de mammifères ne produisent que des enzymes transférases, impliquées dans la génération de glycosylcéramides, de type  $\beta$ , et peuvent de plus dégrader les  $\alpha$ -glycolipides par des enzymes comme l' $\alpha$ -galactosidase ( $\alpha$ -Gal-A). Néanmoins, *in vitro*, des cellules dendritiques déficientes pour cette enzyme ( $\alpha$ -Gal-A<sup>-/-</sup>), et accumulant donc des  $\alpha$ -glycolipides, engendrent la prolifération et l'activation de cellules iNKT murines. Cette réactivité est CD1d dépendante, puisqu'elle n'est pas observée en présence d'anticorps bloquants anti-CD1d ou de cellules dendritiques CD1d<sup>-/-</sup>. Ce résultat est confirmé *in vivo* avec l'activation de cellules iNKT après injection de cellules dendritiques  $\alpha$ -Gal-A<sup>-/-</sup> à des souris, et avec l'expérience inverse où des cellules iNKT, marquées au CFSE et injectées à des souris  $\alpha$ -Gal-A<sup>-/-</sup>, montrent une forte expansion révélée par la diminution de l'intensité de marquage CFSE. Ces résultats démontrent donc que l'abolition de l'activité de  $\alpha$ -galactosidase favorise l'auto-réactivité des cellules iNKT. Cette inhibition de l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -galactosidase est physiologiquement possible, puisqu'elle est observée dans des cellules dendritiques activées via les TLR, mimant ainsi une situation infectieuse dans laquelle on sait que les cellules iNKT sont activées (Darmoise et al., 2010). En lien avec cette étude, il a par la suite été démontré que les thymocytes et cellules dendritiques, d'origine murine, peuvent produire de très faibles quantités d' $\alpha$ -monoglycosylcéramides pouvant sélectionner et activer les cellules iNKT (Kain et al., 2014).

Enfin, une étude récente (Stax et al., 2017) a mis en évidence la reconnaissance de sulfatides par les cellules iNKT humaines. Or ces composés sont abondamment présents chez des patients atteints de leucodystrophie et peuvent être présentés par leurs CPA au sein de molécules CD1d, ce qui active des cellules iNKT. Les sulfatides peuvent donc être des ligands du SoI reconnus par les cellules iNKT, qui sont alors impliquées dans des maladies neuroinflammatoires.

A l'origine, du fait que les séquences  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR iNKT sont très peu variables, il était imaginé que les ligands endogènes des cellules iNKT étaient très peu nombreux, voire même unique, et/ou assez peu diversifiés. Les résultats évoqués précédemment démontrent pourtant un panel varié de ligands potentiels impliqués dans l'auto-réactivité

des cellules iNKT. De plus, il est important de noter que ces ligands peuvent être différents entre l'Homme et la souris, ce qui n'aide pas leur identification et implique que la recherche sur ce sujet n'est pas terminée.

## 2) La chaîne $\beta$ du TCR iNKT

D'après les résultats précédents, la recherche des ligands activateurs des cellules iNKT dans un contexte autoréactif se heurte à de nombreux problèmes (variété, contaminants, différences entre la souris et l'Homme, ...). Néanmoins, l'autoréactivité nécessite non seulement un complexe CD1d-ligand, mais également un TCR capable de reconnaître ce complexe activateur, c'est pourquoi les recherches sur le sujet se sont aussi penchées vers l'identification d'un TCR iNKT autoréactif.

Comme décrit précédemment (Première partie, I- 3) c/, page 31), le TCR iNKT est composé d'une chaîne  $\alpha$  invariante, qui est la seule à contacter l'antigène présenté dans la molécule CD1d, et d'une chaîne  $\beta$  ne variant principalement qu'au niveau de sa boucle CDR3. Bien que la structure du TCR iNKT semble assez figée, il peut néanmoins reconnaître des ligands d'origine différente (bactérienne,  $\alpha$ GalCer, endogène) révélant finalement une certaine forme de plasticité. Il a été démontré que c'est la variabilité présente au niveau de la chaîne  $\beta$  qui permet au TCR iNKT de reconnaître ces différents glycolipides (Florence et al., 2009), en modulant la reconnaissance par la chaîne  $\alpha$  du complexe CD1d-glycolipide (Pellicci et al., 2009) . Plus précisément, certains acides aminés au sein de la boucle CDR2 $\beta$  sont déterminants dans la reconnaissance du complexe CD1d-glycolipide par TCR iNKT, et la boucle CDR3 $\beta$  en module également l'affinité globale (Mallevaey et al., 2009).

Une analyse plus en profondeur de la séquence de la boucle CDR3 $\beta$  a été réalisée afin de déterminer les bases moléculaires régissant l'autoréactivité du TCR iNKT chez la souris (Mallevaey et al., 2011). Mallevaey et ses collaborateurs ont identifié certains CDR3 $\beta$ , au sein d'hybridomes de cellules iNKT murines, capables de conférer une reconnaissance de tétramères CD1d chargés avec des glycolipides endogènes (tétramères CD1d-Self) à ces hybridomes, et suggérant donc une potentielle autoréactivité de la part de ces cellules. Le

séquençage de la boucle CDR3 $\beta$  des clones capables de fixer les tétramères CD1d-Self a mis en évidence l'utilisation préférentielle des acides aminés hydrophobes leucine et/ou isoleucine dans les deux premières positions, en comparaison avec des clones CD1d-Self négatifs. La mutation de ces deux résidus en alanine a confirmé leur importance dans l'interaction du TCR avec les tétramères CD1d-Self, puisqu'aucun marquage n'est observé après le changement en acide aminé. Des analyses fonctionnelles ont ensuite démontré le caractère autoréactif des cellules iNKT CD1d-Self<sup>+</sup> envers des cellules cibles CD1d<sup>+</sup> et non chargées, donc présentant naturellement des glycolipides endogènes. De plus, l'intégration du CDR3 $\beta$  autoréactif dans des chaînes  $\beta$  de clones iNKT non autoréactifs engendre une reconnaissance des tétramères CD1d-Self. Tous ces résultats suggèrent donc que le caractère autoréactif des cellules iNKT murines est contenu dans la boucle CDR3 $\beta$  du TCR.

Chez l'Homme aussi, la séquence de la boucle CDR3 $\beta$  impacte l'affinité du TCR pour son ligand. L'utilisation de tétramères chargés avec un agoniste partiel, l'OCH (tétramères CD1d-OCH), a mis en évidence une diversité d'intensité de marquage de lignées cellulaires iNKT humaines établies ou fraîchement générées à partir de PBMC de donneurs sains. Ce nouvel outil permet donc d'identifier des clones iNKT CD1d-OCH<sup>high</sup> et CD1d-OCH<sup>low</sup> exprimant des séquences de CDR3 $\beta$  variables. Des analyses fonctionnelles pour comparer ces deux types de cellules mettent clairement en évidence un caractère autoréactif pour les cellules iNKT CD1d-OCH<sup>high</sup>, illustré par une prolifération et une activation de ces cellules en présence de cellules cibles CD1d<sup>+</sup> non chargées, donc présentant naturellement des glycolipides endogènes. Ces résultats suggèrent donc que l'autoréactivité des cellules iNKT humaines est elle aussi dirigée par la boucle CDR3 $\beta$  qui influence l'affinité du TCR iNKT pour son ligand (Matulis et al., 2010). Par la suite, Chamoto et ses collègues (Chamoto et al., 2016) ont généré un répertoire de cellules iNKT humaines par transduction du gène codant la chaîne  $\alpha$  invariante humaine dans des lymphocytes T périphériques. La stimulation de ces cellules avec des CPA CD1d<sup>+</sup> et exprimant des molécules de costimulation et des glycolipides endogènes, engendre l'amplification des cellules ayant intégré la chaîne  $\alpha$  iNKT. Après vérification, les cellules amplifiées sont bien des cellules iNKT qui expriment également le segment V $\beta$ 11. L'analyse de la séquence des chaînes  $\beta$  de ces cellules a permis la mise en évidence de trois

motifs liés à l'auto-réactivité : une région VD comprenant au moins deux acides aminés acides, l'utilisation du segment J $\beta$ 2-5, et une longueur de 13 acides aminés pour le CDR3 $\beta$ . En effet, les clones présentant au moins un de ces motifs sont marqués par des tétramères CD1d-Self ou chargés avec des glycolipides proposés comme endogènes ( $\beta$ -GlcCer, LPC et pLPE), et plus il y a de motifs exprimés plus le TCR semble auto-réactif. De plus, des expériences de mutations montrent que la perte d'un de ces motifs abroge l'auto-réactivité, alors que l'acquisition de deux de ces motifs permet au TCR de fixer les tétramères.

## **II- L'implication des cellules iNKT dans des contextes pathologiques**

De nombreuses études ont mis en évidence et analysé le rôle des cellules iNKT dans des contextes pathologiques multiples et variés. En effet, malgré leur faible fréquence, grâce à leurs fonctions de production rapide de cytokines et de cytotoxicité directe, les cellules iNKT agissent sur de nombreux effecteurs de l'immunité et leurs effets ont été identifiés dans les réactions allergiques, la tolérance à la greffe, les réponses anti-tumorale et anti-infectieuse, et les maladies auto-immunes. Ces effets peuvent être bénéfiques ou délétères dans l'apparition de la pathologie, et associés à un contexte spécifique (environnement cytokinique, traitement, ...) ou à une sous-population particulière de cellules iNKT. De plus, en fonction du contexte pathologique, les cellules iNKT peuvent être activées après reconnaissance soit de glycolipides exogènes, soit de glycolipides endogènes illustrant ainsi le concept d'auto-réactivité. Des exemples pour chaque type de pathologie vont être décrits, avec dans certains cas les données obtenues chez l'Homme, et les possibles traitements en lien avec les cellules iNKT.

### **1) Les réactions allergiques**

En 2007 selon l'OMS, l'asthme touchait jusqu'à 300 millions de personnes et engendrait 250 000 morts par an à travers le monde. Cette maladie se développe aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant (Bousquet and Weltgesundheitsorganisation, 2007). L'asthme

est une maladie chronique touchant les voies respiratoires et souvent associée à l'activation de cellules Th2 qui produisent en majorité de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13. L'action commune de ces cytokines engendre les symptômes caractéristiques de l'asthme tels que la production d'IgE, le recrutement et l'activation de basophiles et d'éosinophiles, une inflammation des poumons, une hyperactivité ventilatoire, une sécrétion de mucus, et une fibrose (Lezmi and Leite-de-Moraes, 2018).

Le rôle des cellules iNKT dans cette pathologie a été mis en évidence dans des modèles murins d'asthme allergique à l'ovalbumine (Akbari et al., 2003; Araujo et al., 2004; Lisbonne et al., 2003). Chez des souris susceptibles à l'asthme et déficientes en cellules iNKT (CD1d<sup>-/-</sup> ou J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>), on observe des symptômes de réaction allergique clairement diminués par rapport à des souris sauvages (susceptibles à l'asthme et non déficientes en cellules iNKT) : hyperactivité ventilatoire clairement réduite, baisse du nombre d'éosinophiles dans les fluides de lavages broncho-alvéolaires (BALF pour bronchoalveolar lavage fluid, échantillons prélevés de l'espace alvéolaire) et au niveau pulmonaire, diminution de la concentration en IL-4, IL-5 et IL-13 dans les BALF et de la production de ces cytokines par les lymphocytes T issus de ganglions lymphatiques bronchiques, et forte réduction en IgE sériques. Un transfert adoptif en cellules iNKT aux souris déficientes restaure tous ces symptômes, alors qu'ils peuvent être diminués chez des souris sauvages par un traitement avec des anticorps bloquants anti-CD1d. Ces résultats démontrent clairement le rôle délétère des cellules iNKT dans l'induction de l'asthme allergique. L'effet des cellules iNKT dans cette pathologie serait médié par des cellules iNKT2, puisque c'est la production de cytokines IL-4 et IL-13 principalement, qui potentialiseraient l'activation de cellules CD4<sup>+</sup> Th2 spécifiques des allergènes.

L'asthme peut aussi être induit par une exposition à des extraits de champignons comme *A. fumigatus*, et ce de manière indépendante des cellules T CD4<sup>+</sup>. En revanche, cette induction d'asthme nécessite la présence de cellules iNKT et est médiée par les cytokines IL-4, IL-13 et IL-33, puisqu'on ne l'observe pas chez des souris déficientes en cellules iNKT (CD1d<sup>-/-</sup> ou J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>), en récepteur à l'IL-33 (Il1rl1<sup>-/-</sup>), ou pour les cytokines IL-4 (IL-4<sup>-/-</sup>) et IL-13 (IL-13<sup>-/-</sup>). Il a été mis en évidence que des extraits d'*A. fumigatus* contiennent des glycolipides, comme l'aspéramide B, qui activent les cellules iNKT conduisant à l'asthme (Albacker et al., 2013).

Une exposition répétée à des particules d'ozone peut induire une hyperactivité ventilatoire chez des souris. Cependant, cette hyperactivité n'apparaît pas chez des souris déficientes en cellules iNKT (CD1d<sup>-/-</sup> ou J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>), mettant une nouvelle fois en évidence le rôle délétère des cellules iNKT dans l'induction de ce symptôme de l'asthme. Les cytokines IL-4 et IL-13 sont à nouveau impliquées dans l'apparition de l'hyperactivité ventilatoire. En revanche, dans ce modèle d'induction par l'ozone, la cytokine IL-17 produite par les cellules iNKT pulmonaires est nécessaire, puisque l'hyperactivité ventilatoire est fortement réduite en présence d'anticorps bloquant anti-IL-17 ou chez des souris déficientes pour cette cytokine (IL-17<sup>-/-</sup>) (Pichavant et al., 2008).

Il est donc clairement établi que les cellules iNKT2 et iNKT17 jouent un rôle délétère dans l'induction de l'asthme dans des modèles murins. Néanmoins, plusieurs équipes ont démontré qu'il était possible de contrecarrer l'effet des cellules iNKT dans cette pathologie. Par exemple, l'injection intraveineuse d'Ig, semblent agir sur le récepteur Fc $\gamma$ RIIIA exprimé par ces cellules, et permet d'inhiber leur effet pathologique (Araujo et al., 2011). L'injection préalable d' $\alpha$ GalCer à des souris susceptibles à l'asthme permet d'inverser l'effet des cellules iNKT, avec une abolition de l'hyperactivité ventilatoire, une forte réduction du nombre d'éosinophiles et une nette baisse de la concentration en IL-4, IL-5 et IL-13 dans les BALF, ainsi qu'une diminution d'IgE sériques. Le traitement  $\alpha$ GalCer engendre un changement de phénotype iNKT2 vers iNKT1 qui produisent ainsi de l'IFN $\gamma$ , cytokine essentielle dans le rôle protecteur des cellules iNKT dans l'asthme allergique (Hachem et al., 2005; Matsuda et al., 2005; Morishima et al., 2005). D'autres traitements peuvent également rendre les cellules iNKT protectrices dans l'asthme allergique, comme par exemple la molécule R848 qui active le TLR7 (pour Toll Like Receptor), stimulant ainsi la production d'IFN $\gamma$  par les cellules iNKT en présence d'IL-12 (Grela et al., 2011).

L'étude des cellules iNKT sur le site pathologique chez l'Homme est complexe. Dans le contexte de l'asthme, il est néanmoins possible d'analyser le nombre de cellules iNKT présentes au sein d'échantillons de BALF de patients. Ainsi Thomas et ses collaborateurs (Thomas et al., 2006) ont mis en évidence un très faible pourcentage de cellules iNKT (entre 0,4 et 2,1%) parmi les lymphocytes T chez 5 patients atteints d'asthme allergique, tout comme Pham-Thi et ses collègues (Phamthi et al., 2006) qui ont trouvé en moyenne

0,44% de cellules iNKT parmi les lymphocytes T dans les échantillons de 15 enfants atteints d'asthme sévère. Dans cette dernière étude, la comparaison avec un groupe contrôle de 10 enfants révèle tout de même une augmentation significative du pourcentage de cellules iNKT chez les enfants asthmatiques (0,12% pour les enfants contrôles). Les travaux de Vijayanand et ses collaborateurs (Vijayanand et al., 2007) ont pu confirmer la faible fréquence de cellules iNKT parmi les lymphocytes T chez des patients atteints d'asthme sévère léger ou modéré. Ils ont en effet déterminé que moins de 2% des cellules T étaient des cellules iNKT dans des échantillons de BALF, d'expectorations et de biopsies bronchiques chez ces individus. Cependant, ils n'ont pas pu démontrer une différence significative de fréquence en comparaison avec des échantillons d'individus sains. Cette différence significative du pourcentage de cellules iNKT dans les BALF, entre 5 patients atteints d'asthme sévère et 5 individus sains, est pourtant de nouveau mise en évidence dans l'étude de Matangkasombut et ses collègues (Matangkasombut et al., 2009). Koh et ses collègues (Koh and Shim, 2010) révèlent eux aussi une différence significative dans le nombre de cellules iNKT parmi les lymphocytes T retrouvées au sein d'expectorations entre des individus asthmatiques et sains. En revanche, ils démontrent que la fréquence de cellules iNKT dans le sang de patients asthmatiques est similaire à celle de donneurs sains.

En conclusion, chez l'Homme, des cellules iNKT sont bien retrouvées dans les échantillons de BALF de patients asthmatiques, mais leur fréquence est assez faible (moins de 2% des cellules T). Certaines équipes de recherche ont pu mettre en évidence une augmentation significative de la fréquence des cellules iNKT chez les patients en comparaison avec des individus sains, mais cette significativité n'est pas démontrée dans toutes les études. Ces résultats discordants mettent donc en doute l'implication potentielle des cellules iNKT dans l'asthme chez l'Homme. De nouvelles études semblent donc nécessaires pour lever le voile sur cette controverse, et déterminer les potentiels mécanismes d'action des cellules iNKT humaines dans l'asthme.

Outre les allergies des voies respiratoires, les cellules iNKT sont impliquées dans des allergies de peau comme la dermatite de contact allergique (ACD pour allergic contact dermatitis). En travaillant à partir de biopsies de peau de patients développant cette allergie, Gober et ses collaborateurs (Gober et al., 2008) ont démontré que les cellules

iNKT contribuent à l'infiltrat cellulaire T retrouvé dans l'ACD. Les cellules iNKT représentent en effet 1,72 à 33% des cellules T au sein de ces infiltrats sur le site allergique, alors que leur fréquence ne varie pas dans le sang périphérique des mêmes individus. De plus, ils ont déterminé que ces cellules iNKT infiltrantes sont activées puisqu'elles sont en mesure de produire de l'IL-4 et de l'IFN $\gamma$ .

Il existe un modèle murin d'hypersensibilité de contact (CHS pour contact hypersensitivity) après application cutanée d'un allergène, qui se rapproche de l'ACD. Dans ce modèle, la CHS est due à l'action des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, producteurs d'IFN $\gamma$  et spécifiques de l'allergène, qui engendrent l'inflammation. Des souris déficientes en cellules iNKT (CD1d<sup>-/-</sup> ou J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>) présentent une CHS exacerbée révélant ainsi un rôle régulateur des cellules iNKT dans ce type d'allergie (Goubier et al., 2013). En effet, ces cellules diminuent l'activation des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'allergène dans les ganglions lymphatiques, et abaissent leur recrutement sur le site allergique, réduisant par conséquent l'inflammation. Ces effets seraient dus à la production par les cellules iNKT d'IL-4 et d'IL-13, observable *in vitro* lors d'une co-culture avec des cellules dendritiques CD1d<sup>+</sup> présentant l'allergène, et en présence de l'IFN $\gamma$  produit par les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'allergène. Ces résultats ont été démontrés *in vivo* chez des souris double-déficientes en IL-4 et IL-13 et qui développent une CHS. Pourtant dans ce même modèle, Shimizuhira et ses collègues (Shimizuhira et al., 2014) ont mis en évidence une atténuation de la CHS en absence de cellules iNKT (souris CD1d<sup>-/-</sup> ou J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>), du fait d'une diminution du nombre de cellules T effectrices dans les ganglions lymphatiques. Selon leur étude, les cellules iNKT ont un rôle délétère, en favorisant la migration, l'activation et la survie de cellules dendritiques présentatrices de l'allergène au sein des ganglions lymphatiques drainant la peau. Shimizuhira *et al.* proposent que la mise en évidence de ces deux rôles opposés des cellules iNKT dans la CHS, pourrait provenir de la différence dans la souche de souris utilisée (C57BL/6 pour Goubier et BALB/c pour Shimizuhira). En effet, on sait que la souche BALB/c n'exprime, par exemple, pas le récepteur NK1.1 et par conséquent ne doit pas strictement exprimer le même répertoire de cellules iNKT que la souche C57BL/6, ce qui pourrait à terme générer un environnement cytokinique différent.

Une fois encore de nouvelles études semblent nécessaires pour déterminer le mécanisme d'action des cellules iNKT dans les allergies de peau, chez l'Homme comme chez la souris.

## 2) La tolérance à la greffe

Lorsqu'un organe est défaillant, le dernier recours pour le traiter est son remplacement grâce à une transplantation. Néanmoins, ce traitement comporte des risques dont le principal est le rejet du transplant par l'organisme receveur. Dans ce domaine, les cellules iNKT jouent un rôle dans la tolérance à la greffe. Cet effet bénéfique a pu être démontré dans différents modèles murins de greffe d'organes solides, mais aussi dans le contexte de la greffe de cellules souches hématopoïétiques chez l'Homme.

Les cellules iNKT interviennent dans la tolérance à la xéno greffe d'îlots de Langerhans de rat en intra-hépatique à des souris (Ikehara et al., 2000). Cette greffe nécessite trois injections d'anticorps anti-CD4 après transplantation, dont le dosage est crucial, et qui engendrent une déplétion en cellules CD4<sup>+</sup> (T conventionnels et iNKT). L'effet bénéfique semble associé à une réapparition de cellules iNKT CD4<sup>+</sup> 14 jours après la greffe. Le rôle des cellules iNKT dans la tolérance à la greffe a aussi été démontré dans un modèle d'allogreffe cardiaque entre des souris BALB/c donneuses et des souris C57BL/6 receveuses (Seino et al., 2001). Dans ce modèle, la tolérance est induite par l'injection d'anticorps bloquant l'interaction CD28/B7 ou LFA-A/ICAM-1. Dans ces deux études, l'acceptation de la greffe n'est pas observable chez des souris déficientes en cellules iNKT ( $\alpha 18^{-/-}$ ), mais est restaurée grâce à un transfert adoptif de cellules iNKT chez ces souris avant ou au moment de la greffe, démontrant ainsi le rôle crucial des cellules iNKT dans le maintien de la greffe.

Dans le contexte de la greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques chez l'Homme, la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD pour graft versus host disease) peut se développer de manière aiguë (jusqu'à 50% des cas). Cette maladie est induite par l'activation des cellules T du donneur contre toutes les cellules de l'hôte exprimant du CMH, dont les CPA, et est une cause majeure de mortalité post-transplantation. Néanmoins, l'action de cellules iNKT dans ce type de greffe a un impact bénéfique sur la

survenue de la GVHD. L'étude du ratio cellules iNKT/T dans les 15 jours suivant la greffe permet de prédire l'apparition d'une GVHD aigue (Rubio et al., 2012). En effet, suite à la greffe, la reconstitution rapide par les cellules du donneur, du compartiment iNKT diminue le risque de développement d'une GVHD, et favorise ainsi la survie globale des patients. Le nombre de cellules iNKT présentes dans le greffon avant greffe impacte également l'apparition d'une GVHD (Chaidos et al., 2012). En effet, la faible présence de cellules iNKT CD4<sup>-</sup> est associée à une augmentation du risque de développer une GVHD aigue. Des expériences de MLR (pour mixed lymphocyte reaction), mimant la réaction allogénique, montrent clairement une inhibition de la réactivité des lymphocytes T vis-à-vis de PBMC allogéniques en présence des cellules iNKT CD4<sup>-</sup>. La fonction de ces cellules a plus amplement été étudiée dans un modèle pré-clinique de souris NSG<sup>10</sup> humanisées développant une GVHD xénogénique (Coman et al., 2018). Dans ce modèle, les cellules iNKT CD4<sup>-</sup> inhibent l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> transplantées, ainsi que la production de cytokines de type Th1 et Th17. De plus, ces cellules sont capables de dégranuler après contact avec des cellules dendritiques murines ou humaines, induisant ainsi leur apoptose. En agissant sur les deux principaux acteurs de la GVHD, les CPA du receveur et les cellules T du donneur, les cellules iNKT CD4<sup>-</sup> évitent l'apparition de cette maladie. Les cellules iNKT, et notamment la sous-population CD4<sup>-</sup>, en plus d'être un marqueur prédictif de l'apparition d'une GVHD aigue avant ou après transplantation, constituent une population intéressante à cibler de façon à prévenir la GVHD aigue chez l'Homme.

### 3) La réponse anti-tumorale

Depuis quelques années, le cancer est devenu la première cause de mortalité en France. Une des stratégies développées pour combattre ce type de maladie est l'immunothérapie, et à ce titre les cellules iNKT ont un rôle à jouer. L'immunothérapie est un traitement qui ne s'attaque pas directement aux cellules cancéreuses, mais qui induit des réponses immunitaires chez le patient pour lutter contre la tumeur. On distingue l'immunothérapie active consistant en la stimulation du système immunitaire déjà présent chez le patient,

---

<sup>10</sup> Pour NOD Scid Gamma, souris n'exprimant aucun lymphocyte T, B et NK

et l'immunothérapie passive qui nécessite le transfert de nouvelles cellules ou acteurs immunitaires afin de suppléer le système immunitaire du patient. Dans cette partie, des données chez la souris et chez l'Homme vont être présentées pour un exemple de cancer solide, le neuroblastome, et de cancer liquide, le lymphome B, ainsi que les thérapies possibles incluant les cellules iNKT.

De nombreux modèles murins ont permis de mettre en évidence l'importance des cellules iNKT dans la lutte anti-tumorale, et de déterminer par quels moyens ces cellules agissent. Les cellules iNKT, constituant une population de cellules rares, il est nécessaire de les élargir pour amplifier leur effet. L' $\alpha$ GalCer est donc utilisé comme traitement pour amplifier le nombre de cellules iNKT, mais également pour les activer afin qu'elles produisent des cytokines et activent d'autres effecteurs de l'immunité. L'activité anti-tumorale des cellules iNKT se traduit par différents mécanismes. Ces cellules étant cytotoxiques, elles peuvent directement tuer les cellules tumorales (perforine, granzyme B, FasL) (Figure 15C), mais elles ont également une activité cytotoxique indirecte via leur production d' $IFN\gamma$  qui permet le recrutement d'effecteurs cytotoxiques comme les cellules NK ou les lymphocytes T cytotoxiques (Figure 15A). Les travaux de Li et ses collègues (J. Li et al., 2014) dans le lymphome B ont par exemple établi qu'*in vitro* les cellules iNKT murines étaient activées par des lignées cellulaires de lymphome B après chargement en  $\alpha$ GalCer. Et dans un modèle spontané de MCL (pour mantle cell lymphoma ou lymphome à cellules du manteau), le traitement des souris avec une dose d' $\alpha$ GalCer a permis l'activation du système immunitaire, et notamment des cellules iNKT productrices d' $IFN\gamma$ , retardant ainsi la croissance tumorale. Les cellules iNKT agissent aussi indirectement en ciblant le microenvironnement tumoral, par exemple en activant les cellules dendritiques, ou en s'attaquant aux cellules favorables au développement tumoral comme les TAM (pour tumor-associated macrophages ou macrophages associés aux tumeurs) et les MDSC (pour myeloid-derived suppressor cell ou cellule suppressive d'origine myéloïde) (Figure 15B). Si l' $\alpha$ GalCer a fait ses preuves en étant injecté librement, il est tout de même plus actif quand il est chargé sur des cellules dendritiques ou des cellules tumorales. La quête d'amélioration de son activité a conduit les chercheurs à l'associer à des peptides (de manière mixée ou conjuguée) afin d'augmenter l'activité des cellules T CD8 cytotoxiques, ou à d'autres molécules pour cibler spécifiquement les tumeurs (CAR, évoqués à la fin de

cette partie). Des analogues de l' $\alpha$ GalCer ont aussi été produits dans le but de biaiser la réponse des cellules iNKT vers un profil iNKT1 producteur d' $\text{IFN}\gamma$ , et augmenter ainsi leur activité anti-tumorale (Godfrey et al., 2018).

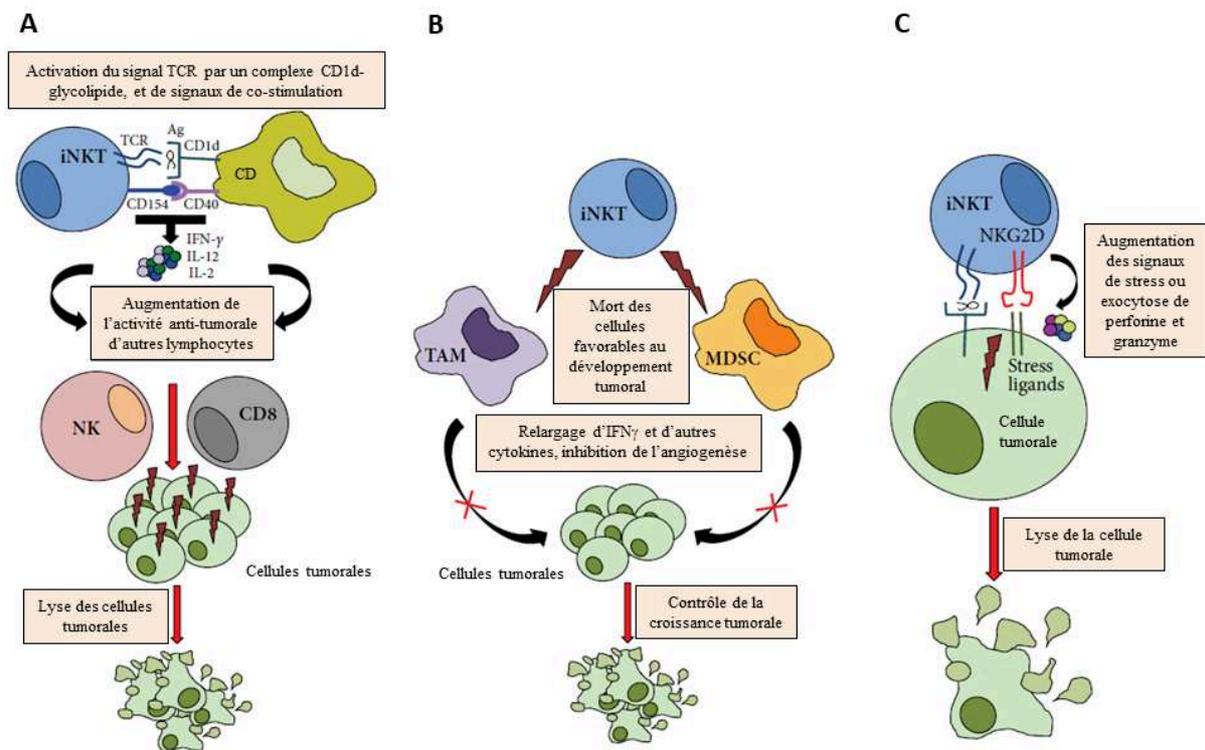


Figure 15 Mécanismes possibles des cellules iNKT dans la réponse anti-tumorale. **A** Cytotoxicité indirecte induite par l'activation des cellules iNKT par des cellules dendritiques (CD), engendrant le relargage de cytokines qui activent d'autres effecteurs de l'immunité. **B** Modulation du microenvironnement tumoral avec lyse des cellules favorables au développement tumoral (TAM et MDSC) et inhibition de l'angiogenèse. **C** Cytotoxicité directe des cellules iNKT après engagement du TCR et de signaux de stress ou relargage de perforine et granzyme. Modifiée d'après Altman *et al.*, 2015.

Plusieurs études chez l'Homme ont mis en évidence un défaut du nombre et de la fonction des cellules iNKT dans différents types de cancer. Ce défaut de fonction engendre une baisse de la production d' $\text{IFN}\gamma$  favorisant l'activité pro-tumorale de cytokines de type Th2. Par conséquent, la faible fréquence de cellules iNKT chez des patients est corrélée avec un faible pronostic de survie (Nair and Dhodapkar, 2017). Par exemple, l'étude de Metelitsa et ses collaborateurs (Metelitsa et al., 2004) montre que chez des patients atteints de neuroblastome et diagnostiqués après l'âge d'un an, la survie à 3 ans et à 5 ans est estimée à 48% et 33% respectivement. L'analyse de l'infiltrat en cellules iNKT au sein des tumeurs, et du taux de survie de ces patients, tend à mettre en évidence une corrélation positive même si elle n'est pas significative. Ces résultats ont néanmoins pu être impactés par les traitements administrés aux patients pouvant influencer le nombre et la fonctionnalité

des cellules iNKT. En revanche, des patients diagnostiqués avant l'âge d'un an et ayant reçu un traitement moins agressif ont tous survécu au-delà de 56 mois après le diagnostic. L'analyse chez l'ensemble des patients met en évidence une augmentation significative du taux de survie à 5 ans pour ceux ayant un infiltrat en cellules iNKT (64% pour la présence de cellules iNKT contre 35% pour l'absence de cellules iNKT dans l'infiltrat). Dans le cas du lymphome B, Li et ses collègues (J. Li et al., 2014) ont mis en évidence une baisse significative du pourcentage de cellules iNKT parmi les PBMC entre des donneurs sains et des patients atteints de différents types de lymphomes B.

Des essais cliniques utilisant des cellules iNKT stimulées avec de l' $\alpha$ GalCer ont été réalisés chez l'Homme contre des tumeurs solides ou liquides. Dans les premières études, l'injection directe d' $\alpha$ GalCer soluble ou de cellules dendritiques chargées avec ce glycolipide ont engendré une expansion de cellules iNKT, une augmentation de la production de cytokines et une activation d'autres effecteurs de l'immunité. Néanmoins, ces stratégies thérapeutiques n'ont eu qu'un effet transitoire sur la stabilisation de la croissance tumorale chez certains patients. Des essais cliniques plus récents, avec injections de cellules dendritiques chargées en  $\alpha$ GalCer en intra-veineuse ou directement dans les tissus tumoraux, ont montré un effet bénéfique du traitement dans la stabilisation des tumeurs, avec parfois même un effet sur la régression tumorale. Une nouvelle stratégie, utilisant toujours des cellules dendritiques chargées en  $\alpha$ GalCer mais injectées en parallèle de cellules dendritiques chargées avec un antigène protéique tumoral, a mis en évidence une meilleure réponse des cellules T CD4 et CD8. La génération d'analogues de l' $\alpha$ GalCer pouvant, dans certains cas, augmenter le potentiel thérapeutique des cellules iNKT constitue une autre piste pour améliorer l'activité anti-tumorale des cellules iNKT. Le potentiel des cellules iNKT en immunothérapie sera certainement mieux défini grâce aux résultats d'essais cliniques qui sont actuellement menés à plus large échelle (Godfrey et al., 2018).

Une nouvelle stratégie anti-tumorale prometteuse est apparue avec la génération de cellules NKT exprimant des CAR (pour chimeric antigen receptor ou récepteur chimérique spécifique d'antigène), aussi appelées cellules CAR NKT. Un CAR est souvent composé, pour sa partie extracellulaire, d'un fragment variable d'une chaîne d'un anticorps monoclonal (scFv pour single-chain variable fragment) qui cible un antigène

potentiellement tumoral. Pour sa partie intracellulaire, le CAR est composé de plusieurs endodomains favorisant l'activation, la prolifération, la survie et l'effet anti-tumoral de la cellule NKT, dont la chaîne  $\zeta$  du TCR et par exemple le CD28 ou le 4-1BB. L'utilisation de cellules CAR NKT en immunothérapie tire avantage des fonctions des cellules iNKT que sont la forte cytotoxicité directe, ainsi que de l'activation d'autres effecteurs de l'immunité (cellules NK, les lymphocytes T cytotoxiques ou cellules dendritiques) pour lutter contre les cellules tumorales. De plus, les cellules iNKT étant restreintes par la molécule CD1d qui est monomorphique, le transfert adoptif de CAR NKT allogéniques n'engendre pas de complication comme une GVHD (Kriegsmann et al., 2018). Les travaux de l'équipe de Metelista font référence en la matière, avec deux études pré-cliniques, et la préparation d'un essai clinique de phase I (NCT03294954) chez l'enfant et le jeune adulte atteint de neuroblastome.

La première étude pré-clinique de CAR NKT a été développée dans un modèle de souris immunodéprimées humanisées (hu-NSG), et greffées avec des cellules métastatiques humaines de neuroblastome (Heczey et al., 2014). Dans cette étude, les cellules iNKT issues de PBMC de donneurs sains sont d'abord amplifiées *ex vivo* après stimulation avec de l' $\alpha$ GalCer. Elles sont ensuite transduites avec un CAR reconnaissant le ganglioside GD2, un antigène fortement exprimé par les cellules de neuroblastome, et composé de la chaîne  $\zeta$  du TCR, et du CD28 et/ou du 4-1BB. Des tests *in vitro* de cytotoxicité au chrome 51 démontrent que les cellules CAR NKT sont spécifiquement cytotoxiques contre des cellules de neuroblastome exprimant le GD2 (mais pas le CD1d), et aussi contre des macrophages M2 exprimant le CD1d (mais pas le GD2) et chargés en  $\alpha$ GalCer. Dans le modèle murin, la présence des domaines intracellulaires de co-stimulation CD28 et 4-1BB favorisent la survie des cellules CAR NKT, et leur production de cytokines de type Th1 (IFN $\gamma$  et GM-CSF) en réponse aux cellules tumorales. Les cellules CAR NKT sont capables de rejoindre le site tumoral et de prolonger la survie de ces souris du fait de leur forte réactivité contre la tumeur et le microenvironnement tumoral (macrophages associés aux tumeurs), sans induire de GVHD. Dans la poursuite de cette étude, l'essai clinique de phase I en cours de développement vise à traiter des enfants et jeunes adultes, atteints de neuroblastome, avec des CAR NKT autologues spécifiques du ganglioside GD2. Ces CAR comprennent l'endodomaine CD28, et les cellules NKT sont également transfectées pour le gène codant l'IL-15 afin de favoriser leur activité anti-tumorale. Le but de cet essai

clinique est de trouver la dose la plus efficace et sûre pour traiter les patients, d'évaluer le temps pendant lequel les CAR NKT perdurent dans le sang des patients, et de déterminer leur effet sur la tumeur. Quatre doses de CAR NKT vont être testées en combinaison avec de la chimiothérapie.

Dans la deuxième étude pré-clinique (Tian et al., 2016), l'expansion *in vitro* de cellules iNKT avec de l' $\alpha$ GalCer engendre une accumulation de cellules NKT exprimant le CD62L. Ces cellules NKT présentent un profil cytokinique Th0, et produisent beaucoup plus de cytokines en comparaison avec les cellules NKT CD62L<sup>-</sup>. Après une seconde stimulation les cellules NKT CD62L<sup>+</sup> prolifèrent et survivent mieux que les cellules CD62L<sup>-</sup>. Cette capacité de survie des cellules exprimant le CD62L est également observée *in vivo* après transfert à des souris NSG. Afin de profiter de ces caractéristiques dans un but immunothérapeutique, les auteurs ont généré un CAR NKT CD62L<sup>+</sup> dirigé contre le CD19, marqueur exprimé par les cellules tumorales dans le lymphome B. Le transfert de ces cellules CAR NKT, comprenant la chaîne  $\zeta$  du TCR et l'endodomaine 4-1BB, engendre une régression tumorale chez des souris NSG développant un lymphome après injection de cellules CD19<sup>+</sup> Daudi, mettant ainsi en évidence un fort potentiel thérapeutique. Dans le but d'expander au maximum et spécifiquement des CAR NKT CD62L<sup>+</sup> pour une utilisation en clinique, des CPA artificielles ont été générées. Les cellules CAR NKT stimulées avec ces CPA présentent un profil cytokinique Th1, et sont plus efficaces dans la lutte anti-tumorale que les cellules CAR NKT stimulées avec des PBMC autologues.

#### 4) Les maladies auto-immunes

Il est clairement établi que les cellules iNKT jouent un rôle dans le développement de nombreuses maladies auto-immunes (MAI). Dans certains cas, comme dans le psoriasis ou l'athérosclérose, ce rôle est plutôt délétère avec une augmentation du nombre de cellules iNKT infiltrantes présentant un profil pro-inflammatoire, et une surexpression du CD1d dans le site pathologique chez les patients. A l'inverse, les cellules iNKT peuvent avoir un effet bénéfique contre le développement de MAI, puisqu'un défaut de présence de ces cellules est observé dans de nombreux cas, comme par exemple dans le diabète de type 1, la sclérose en plaque, l'arthrite rhumatoïde, ou le lupus érythémateux disséminé.

Les cas du psoriasis et du diabète de type 1 vont être plus précisément décrits par la suite (Simoni et al., 2011).

Le psoriasis est une MAI inflammatoire touchant la peau et caractérisée par l'apparition de plaques rouges. Ces lésions sont dues à l'altération de la différenciation et à l'hyperprolifération de kératinocytes, suite au dérèglement de la réponse immunitaire chez les patients. Des lignées cellulaires T exprimant des récepteurs NK (comme le CD161 ou CD94) ont été établies à partir de PBMC issus de patients atteints de psoriasis (Nickoloff et al., 2000). *In vitro* ces lignées cellulaires sont capables de s'activer face à des kératinocytes exprimant le CD1d, et produisent ainsi de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-13. En présence d'anticorps bloquants anti-CD1d, aucune activation n'est observée, indiquant donc que cette dernière est dépendante de la reconnaissance du CD1d par le TCR de ces cellules. Une fois injectées à des souris SCID<sup>11</sup> greffées avec de la peau saine du donneur de PBMC (mais par conséquent susceptible au psoriasis), ces cellules engendrent le développement de tous les symptômes caractéristiques du psoriasis, dont les plaques. L'analyse des lésions met en évidence un important infiltrat en cellules T, ainsi qu'une forte expression du CD1d par les kératinocytes (Gilhar et al., 2002). Ces résultats suggèrent donc un rôle pathologique des cellules iNKT dans cette MAI. Chez l'Homme, on observe une augmentation du nombre de cellules iNKT, ainsi qu'une surexpression du CD1d au sein de lésions de patients atteints de psoriasis (Zhao et al., 2008). Cette augmentation de l'expression du CD1d est médiée par le TNF $\alpha$ , qui active en aval la PKC $\zeta$  (pour protéine kinase C  $\zeta$ ) agissant sur l'expression de l'ARNm codant le CD1d et sur la synthèse de cette molécule au sein des kératinocytes.

En 2014, 422 millions de personnes dans le monde étaient diabétiques, dont 10% étaient atteintes du diabète de type 1, ce qui représente donc plus de 42 millions de personnes (OMS, 2016). Le diabète de type 1, ou diabète insulino-dépendant, est une MAI chronique liée à l'absence de production d'insuline par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans contenus dans le pancréas. Ces cellules  $\beta$  sont en effet détruites sous l'action du système immunitaire, et notamment à cause de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Lehuen et al., 2010). Il en

---

<sup>11</sup> Pour Severe Combined ImmunoDeficiency, ces souris n'expriment ni cellules T, ni cellules B.

résulte de nombreux symptômes tels que l'hyperglycémie, la polyurie (urines excessives), la polydipsie (soif excessive), la polyphagie (faim excessive), et la perte de poids, pouvant conduire jusqu'à la mort en absence de traitement (Simoni et al., 2013).

Chez la souris, la souche NOD mime spontanément le diabète de type 1 humain, avec une infiltration du pancréas par les lymphocytes T destructeurs des îlots de Langerhans et une production d'anticorps anti-insuline. Dans ce modèle, un défaut du nombre de cellules iNKT et de la production d'IL-4 par ces cellules a pu être observé (Gombert et al., 1996; Hammond et al., 2001). De plus l'apparition de la maladie est accélérée chez des souris NOD déficientes en CD1d (CD1d<sup>-/-</sup>) (Shi et al., 2001). En revanche, chez des souris NOD transgéniques pour la chaîne  $\alpha$  invariante du TCR iNKT, ou après transfert de cellules iNKT à des souris NOD, le diabète ne se développe pas ou avec une incidence moins élevée (Lehuen et al., 1998). Ces résultats mettent donc en évidence le rôle protecteur des cellules iNKT dans le développement du diabète de type 1. L'activation des cellules iNKT, par injection d' $\alpha$ GalCer à des souris NOD, engendre également une protection contre l'apparition de la maladie (Chen et al., 2005; Hong et al., 2001; Sharif et al., 2001). Le traitement  $\alpha$ GalCer provoque en effet une augmentation de la fréquence des cellules iNKT, dans la rate et les ganglions lymphatiques proches du pancréas, qui créent un environnement Th2, favorable à la protection contre le diabète de type 1, en stimulant la production d'IL-4 et d'IL-10 et inhibant la production d'IFN $\gamma$  par les splénocytes (Hong et al., 2001; Sharif et al., 2001). Les cellules iNKT activées par l' $\alpha$ GalCer produisent aussi un facteur soluble favorisant la maturation et l'accumulation de cellules dendritiques au sein des ganglions lymphatiques proches du pancréas. Les cellules dendritiques attirent alors les lymphocytes T autoréactifs dans les ganglions lymphatiques proches du pancréas, afin de les rendre tolérogènes ou anergiques, les empêchant ainsi de détruire les cellules  $\beta$  pancréatiques productrices d'insuline (Chen et al., 2005). Dans un modèle de souris NOD, dans lesquelles des cellules T CD4<sup>+</sup> diabétogéniques sont transférées, la présence de lymphocytes iNKT inhibe l'expansion tardive ainsi que la production d'IL-2 et d'IFN $\gamma$  par les cellules pathologiques. Ces cellules présentent alors un phénotype anergique qui les rend incapable de détruire les cellules  $\beta$  du pancréas, protégeant ainsi les animaux du développement d'un diabète de type 1 (Beaudoin et al., 2002).

Si le nombre de cellules iNKT est réduit chez des souris NOD par rapport à une souche C57BL/6, on observe néanmoins une fréquence quatre à six fois plus élevée de cellules iNKT17 chez les souris NOD. Ces cellules iNKT17 infiltrent les ganglions lymphatiques proches du pancréas et expriment fortement l'ARNm codant pour l'IL-17. Afin de déterminer leur rôle dans le développement du diabète de type 1, un transfert de cellules iNKT CD4<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup>, enrichies en cellules iNKT17, a été réalisé dans des souris NOD modifiées pour ne plus exprimer de lymphocytes T, et dans lesquelles il est nécessaire d'injecter des lymphocytes autoréactifs. Les résultats montrent que l'incidence de la maladie est significativement augmentée chez ces souris, avec une augmentation de la fréquence en lymphocytes T autoréactifs. A l'inverse, un transfert de cellules iNKT CD4<sup>+</sup>, contenant très peu de cellules iNKT17, prévient l'apparition de la maladie. En présence d'anticorps bloquants anti-IL-17, l'effet délétère des cellules iNKT17 est aboli, et le traitement  $\alpha$ GalCer protecteur empêche la production de cette cytokine par les cellules iNKT (Simoni et al., 2011). Ces résultats ont été confirmés avec l'étude de Li et ses collègues (S. Li et al., 2014), dans laquelle ils observent une fréquence et un nombre absolu de cellules iNKT17 plus élevés, ainsi qu'une meilleure survie de ces cellules chez des souris NOD en comparaison avec des souris C57BL/6. Ces deux études mettent donc en évidence le rôle délétère de l'IL-17 et de la sous-population de cellules iNKT17 dans le développement du diabète de type 1.

L'ensemble de ces études révèle une dualité fonctionnelle concernant l'implication des cellules iNKT dans le développement du diabète de type 1, avec des cellules iNKT CD4<sup>+</sup> protectrices et des cellules iNKT17 délétères.

Les résultats chez l'Homme sont plus controversés, avec comme exemple marquant l'étude de la fréquence des cellules iNKT chez des jumeaux ou triplés dont un individu est diabétique. Dans un cas, Wilson et ses collaborateurs (Wilson et al., 1998) ont mis en évidence une diminution de la fréquence en cellules iNKT CD4<sup>-</sup> circulantes chez les malades, avec un biais des cellules iNKT résiduelles vers un profil Th1 (productrices d'IFN $\gamma$ ). Dans l'autre cas, Lee et ses collègues (Lee et al., 2002b), en utilisant une technique d'analyse plus précise et incluant toutes les cellules iNKT, n'observent aucune différence significative dans la fréquence et la sécrétion de cytokines par les cellules iNKT circulantes provenant de patients et d'individus sains comprenant des jumeaux. En plus de travailler chez la souris, Li et ses collaborateurs (S. Li et al., 2014) ont aussi analysé la

population iNKT17 chez des patients diabétiques en comparaison avec des individus sains. Bien qu'aucune cellule iNKT17 ne soit détectée parmi les PBMC de patients ou d'individus sains, une expansion *in vitro* des cellules iNKT circulantes en présence d'une cytokine en lien avec le profil Th17, l'IL-1 $\beta$ , est observée. Dans ces conditions pro-inflammatoires, la fréquence en cellules iNKT17, parmi les cellules iNKT amplifiées, est supérieure chez les patients atteints de diabète. De plus, le profil cytokinique de ces cellules est modifié avec une production accrue d'IL-17, constante d'IFN $\gamma$  et moindre d'IL-4 chez les malades, alors que les cellules issues de donneurs sains produisent de l'IL-4 de manière constante, plus d'IL-17, mais en proportion moindre en comparaison avec les cellules issues de patients, et moins d'IFN $\gamma$ . Ces résultats suggèrent donc une implication des cellules iNKT17 dans le développement du diabète de type 1 chez l'Homme, avec une apparition de cette sous-population seulement en conditions inflammatoires, qui engendrent ce changement dans le profil cytokinique des cellules iNKT.

Plus récemment, l'équipe de Gadola (Tocheva et al., 2017), ayant identifié le tétramère CD1d-OCH comme révélateur de cellules iNKT avec une forte affinité et potentiellement autoréactives (Troisième partie, I- 2), page 73), ont étudié le répertoire de ces cellules chez des patients atteints de diabète de type I. De manière surprenante, les cellules iNKT de forte affinité (CD1d-OCH<sup>+</sup>) ne sont pas présentes chez les patients en comparaison avec des individus sains. Ces résultats révèlent donc un rôle régulateur des cellules iNKT de forte affinité, et dont l'absence favoriserait l'apparition de MAI, tel que le diabète de type I. Cette hypothèse est soutenue par l'étude d'Usero et ses collègues (Nel and Lehuen, 2016; Usero et al., 2016), dans laquelle ils mettent en évidence un rôle régulateur des cellules iNKT humaines, médié par leur production d'IL-13, dans la prolifération de cellules T effectrices. Or les cellules iNKT issues de patients atteints de diabète montrent un défaut de production d'IL-13, ne permettant plus aux cellules iNKT d'agir contre les lymphocytes T destructeurs des cellules  $\beta$  pancréatiques.

En conclusion, chez l'Homme aussi, il apparaît donc une dichotomie concernant le rôle des cellules iNKT dans l'apparition du diabète de type 1, avec la présence de cellules iNKT17 délétères, et à l'inverse un défaut de cellules iNKT régulatrices protectrices.

## 5) La réponse anti-infectieuse

Les cellules iNKT sont impliquées dans la défense contre des pathogènes variés et de nature bactérienne, virale ou parasitaire. Suite à une infection bactérienne, les cellules iNKT peuvent être activées par des glycolipides issus des bactéries, mais également par la reconnaissance de glycolipides endogènes surexprimés après activation des CPA (Première partie, I- 3) b/ 1. et 2., pages 27). Les virus n'expriment pas de glycolipides et induisent l'activation des cellules iNKT seulement via les CPA infectées et activées présentant des glycolipides endogènes (Première partie, I- 3) b/ 2., page 27). Par la suite, un exemple pour chaque mode d'activation des cellules iNKT dans la lutte contre l'infection par une bactérie, ainsi que des mécanismes impliqués dans la lutte anti-virale vont être brièvement présentés. Enfin, un exemple plus détaillé de l'implication des cellules iNKT dans la réponse immunitaire contre la bactérie *Streptococcus pneumoniae*, et contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) sera exposé.

Les cellules iNKT ont un rôle important dans la lutte contre l'infection par les bactéries. Elles sont en effet capables de reconnaître directement les glycolipides présents dans la paroi des bactéries Gram<sup>-</sup>, comme les différentes espèces *Sphingomonas*, ou par exemple l' $\alpha$ -monogalactosyldiacylglycerol produit par *Borrelia burgdorferi*. Elles peuvent aussi s'activer sans reconnaître de glycolipides exogènes. Par exemple, lors d'une infection par *Salmonella*, les lipopolysaccharides (LPS) produits par ces bactéries activent les cellules dendritiques via le TLR4, qui vont à leur tour activer les cellules iNKT du fait de la production d'IL-12, et de l'expression en surface de glycolipides endogènes (Tessmer et al., 2009). Concernant la lutte contre l'infection virale, les cellules iNKT peuvent dans certains cas coopérer avec des partenaires afin d'éliminer le pathogène. C'est le cas par exemple lors d'une infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV pour Lymphocytic ChorioMeningitis Virus), où les cellules iNKT engendrent une production d'IFN de type 1 par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), suite à des interactions OX40-OX40L, inhibant ainsi la réplication virale dans le foie et le pancréas (Diana et al., 2009). Il est intéressant de noter que cette coopération entre cellules iNKT et pDC engendre l'accumulation de pDC tolérogènes dans les ganglions lymphatiques proches du pancréas, où elles induisent la conversion de cellules T naïves en cellules T

régulatrices (Treg) productrices de TGF- $\beta$ . Après recrutement au sein du pancréas, ces cellules Treg contrôlent l'activité anti-virale et anti-ilôts pancréatiques de cellules T CD8<sup>+</sup>, permettant ainsi de conserver l'intégrité de l'organe et évitant le développement d'un diabète de type 1 (Diana et al., 2011). Cette protection contre l'apparition du diabète de type 1 par les cellules iNKT s'observe également lors d'une infection virale par le Cocksackievirus B4 (CVB4). Dans ce cas, l'activation des cellules iNKT induit, via leur production d'IFN $\gamma$  et d'IL-13, la génération de macrophages suppresseurs et producteurs d'IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase) infiltrant le pancréas, et inhibant ainsi la prolifération des cellules T diabétogéniques (Ghazarian et al., 2013).

Les cellules iNKT sont, par exemple, nécessaires à l'immunité anti-infectieuse dans les voies respiratoires, et entre autres contre des infections par la bactérie Gram<sup>+</sup> *Streptococcus pneumoniae*. La présence de cette bactérie est asymptomatique chez des individus sains, mais en conditions pathologiques elle peut engendrer des maladies plus ou moins sévères comme des otites ou des sinusites, mais également des pneumonies, des septicémies ou des méningites dans les cas les plus graves (Trottein and Paget, 2018). Des souris déficientes en cellules iNKT (J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>) et soumises à une infection par *Streptococcus pneumoniae* meurent toutes très rapidement du fait de la réduction du nombre de neutrophiles sur le site infectieux. Ces résultats révèlent le rôle primordial des cellules iNKT dans le recrutement de neutrophiles via la synthèse de la chimiokine MIP-2 et de la cytokine TNF $\alpha$ , dont les taux sont réduits chez des souris J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>. En revanche, lorsqu'une injection d'IFN $\gamma$  est administrée à ces mêmes souris, on observe une augmentation significative de leur survie, une diminution du nombre de bactéries vivantes et une augmentation de la concentration en MIP-2 et TNF $\alpha$  dans les poumons des animaux, ainsi qu'une augmentation du nombre de neutrophiles dans les BALF. De plus, un transfert de cellules mononucléées de foie issues de souris sauvages (contenant beaucoup de cellules iNKT) restaure également tous les effets observés avec l'injection d'IFN $\gamma$ , alors que ce n'est pas le cas lorsque les cellules transférées sont issues de souris déficientes en cellules iNKT ou en IFN $\gamma$ . Ces résultats mettent clairement en évidence le rôle de l'IFN $\gamma$ , produit par les cellules iNKT, dans le recrutement de neutrophiles, cellules indispensables à la lutte contre l'infection par *Streptococcus pneumoniae* (Nakamatsu et al., 2007). Dans le cas d'une infection par *Streptococcus pneumoniae*, l'activation des cellules iNKT peut se faire

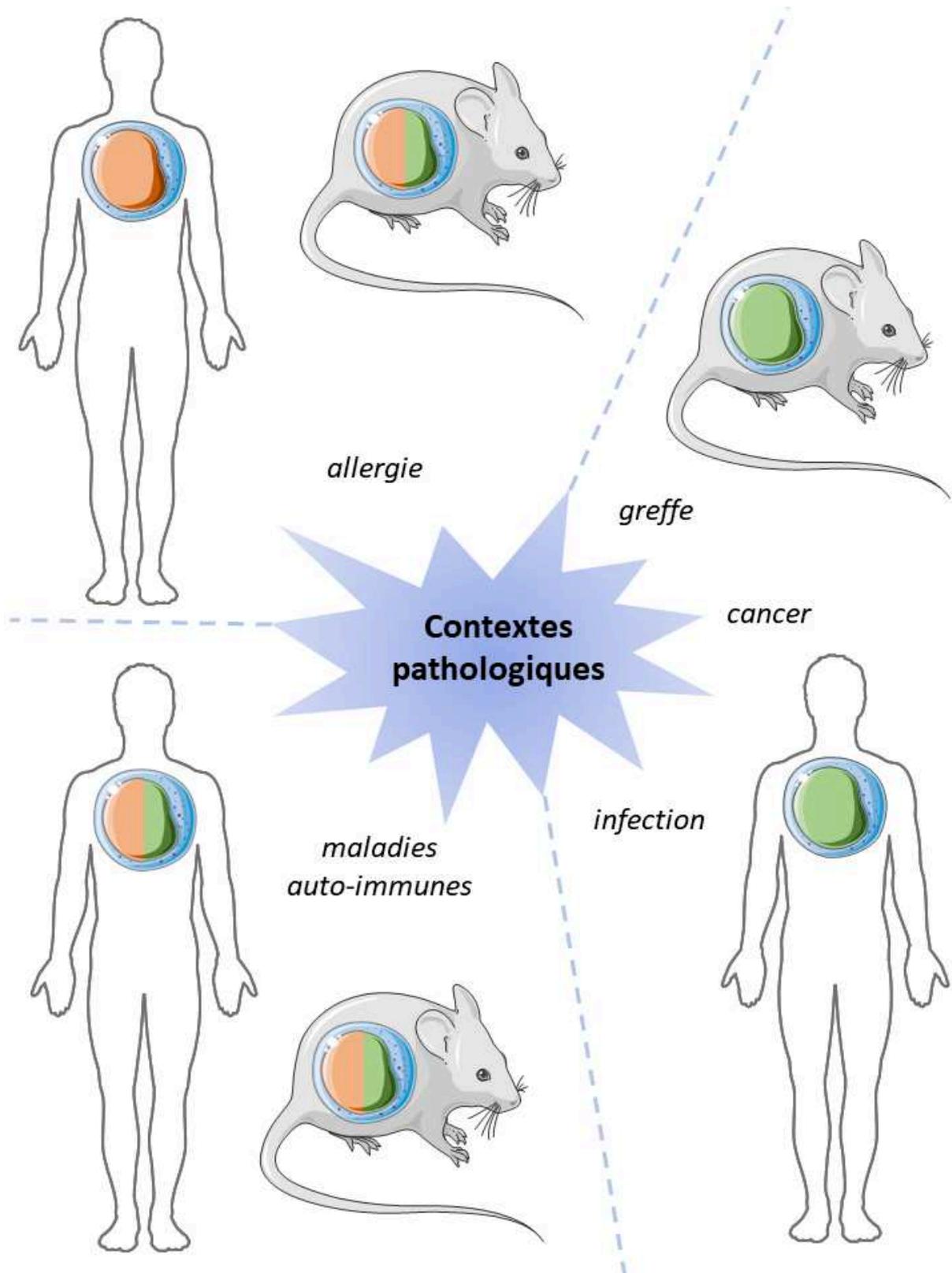
via les deux mécanismes précédemment évoqués (Première partie, I- 3) b/ 1. et 2., pages 27), donc soit par reconnaissance d'antigènes bactériens comme l' $\alpha$ -glucosyldiacylglycérol (Kinjo et al., 2011), ou soit grâce aux cellules dendritiques productrices d'IL-12 (Barthelemy et al., 2017). L'activation exogène de cellules iNKT par injection intra-nasale d' $\alpha$ GalCer, en amont d'une infection par *Streptococcus pneumoniae*, engendre une forte protection contre ce pathogène chez la souris, et constitue une potentielle stratégie vaccinale (Ivanov et al., 2012).

Bien que les virus n'expriment pas de glycolipides, les cellules iNKT peuvent néanmoins être efficaces dans la lutte anti-virale. Cela implique l'activation de cellules dendritiques, qui sur-expriment en surface des glycolipides endogènes et relarguent des cytokines, permettant ainsi l'activation des cellules iNKT. Parmi les virus les plus mortels, on retrouve le VIH avec plus de 35 millions de morts à travers le monde. En 2017, environ 36,9 millions de personnes dans le monde vivaient avec le VIH et 940 000 sont décédées d'une ou des causes liées à cette infection (OMS <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>). Le VIH est un rétrovirus qui infecte les cellules du système immunitaire exprimant le co-récepteur CD4, notamment les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, engendrant à terme le SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise), qui se traduit par une détérioration de la réponse immunitaire contre des infections et maladies opportunistes.

Le nombre de cellules iNKT circulantes est significativement réduit chez des patients atteints du VIH en comparaison avec des individus sains, et décroît au cours de la séroconversion (van der Vliet et al., 2002). Une partie des cellules iNKT expriment le CD4 et constituent donc une cible de choix pour l'entrée et la réplication du VIH, engendrant par la suite la mort de ces cellules. Ces résultats sont confirmés par la corrélation inverse observée entre le nombre de cellules iNKT CD4<sup>+</sup> circulantes et la charge virale des patients infectés (Motsinger et al., 2002; Sandberg et al., 2002). Outre la perte de cellules immunitaires, dont les cellules iNKT, lors d'une infection par le VIH, ce virus met également en place des mécanismes d'échappement à l'activation du système immunitaire restant. Le VIH est par exemple capable de diminuer l'expression en surface de molécules de présentation antigénique comme le CD1d. En effet, la protéine virale Nef se fixe sur la partie intracellulaire du CD1d afin d'accélérer sa réinternalisation, et perturbe également son transport en surface en le retenant au sein de la cellule. Cette

sous-expression de la molécule CD1d engendre donc une diminution de l'activation des cellules iNKT, dont les cellules iNKT CD4<sup>-</sup> qui ne sont pas directement ciblées par le virus (Chen et al., 2006; Cho et al., 2005). La mise en place de traitements anti-rétroviraux hautement actifs (HAART pour highly activated antiretroviral therapy) permet de contrecarrer les effets du virus, en diminuant la charge virale des patients, et en augmentant significativement le nombre de cellules iNKT circulantes, et notamment les cellules iNKT CD4<sup>-</sup>. Ces cellules iNKT sont fonctionnelles, puisqu'*ex vivo* après stimulation, elles sont capables de produire de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-4 (van der Vliet et al., 2006). Une autre thérapie possible contre le VIH est la vaccination ADN qui engendre une forte réponse des cellules Th1 et des lymphocytes T cytotoxiques. Chez la souris, l'ajout d' $\alpha$ GalCer, comme adjuvant à ce traitement, permet d'augmenter et de prolonger son immunogénicité par le biais des cellules iNKT (Huang et al., 2008).

D'après tous les exemples décrits précédemment, on observe une hétérogénéité dans l'implication des cellules iNKT dans les contextes pathologiques, avec pour certains cas une réponse plutôt favorable au développement de la maladie, et pour d'autres une réponse plutôt bénéfique dans la lutte contre l'apparition de la maladie (Figure 16). Cette hétérogénéité de réponse peut être due à l'environnement dans lequel se trouve les cellules iNKT, avec par exemple un contexte inflammatoire propice au développement de réactions allergiques ou de maladies auto-immunes dans lequel les cellules iNKT, en plus des autres effecteurs immunitaires impliqués dans la maladie, deviendraient délétères. L'utilisation de souches de souris différentes dans l'étude d'une même pathologie pourrait aussi expliquer les résultats contradictoires parfois observés, puisque par exemple les sous-populations de cellules iNKT ne sont pas représentées de la même façon dans les différents modèles murins. Enfin, avec la découverte des sous-populations de cellules iNKT, il serait intéressant de réétudier les résultats chez l'Homme en prenant en compte ce critère, puisqu'il est possible, comme dans le diabète, qu'une sous-population puisse avoir l'effet inverse de la population globale de cellules iNKT, et prendre le dessus ou non dans le développement de la maladie.



**Figure 16** Schéma bilan des effets des cellules iNKT observés chez la souris et chez l'Homme dans les différents contextes pathologiques décrits précédemment. Les cellules vertes sont synonymes d'un effet bénéfique, les cellules orangées d'un effet délétère, et les cellules bicolores d'un effet bénéfique ou délétère suivant le contexte et l'étude.

En conclusion, dans la plupart des exemples décrits précédemment, les cellules iNKT agissent sur d'autres effecteurs de l'immunité pour produire leur effet protecteur ou délétère dans les différents cas pathologiques présentés. Néanmoins, la reconnaissance de glycolipides endogènes est possible dans tous les cas, et est même prouvée dans la réponse anti-infectieuse, puisque les cellules iNKT sont capables de s'activer après reconnaissance de glycolipides endogènes surexprimés par les CPA, révélant donc leur caractère autoréactif. Si dans ce dernier cas, toutes les cellules iNKT pourraient alors être autoréactives, il est aussi possible que cette réactivité au Soi dépende de caractéristiques intrinsèques à ces cellules. Selon cette hypothèse, une fraction seulement du répertoire iNKT serait autoréactif. Aucun consensus n'est actuellement établi dans la littérature concernant les bases mécanistiques de l'autoréactivité des cellules iNKT, et ce champ d'investigation reste donc largement ouvert, avec une application directe pour l'identification de cellules iNKT autoréactives dans des contextes pathologiques.

## Projets de recherche

Mon projet de recherche s'est principalement concentré sur l'autoréactivité des cellules iNKT chez l'Homme. Au cours des recherches sur cette population non conventionnelle de lymphocytes T  $\alpha\beta$ , beaucoup d'équipes ont révélé la capacité des cellules iNKT à s'activer en l'absence de glycolipides exogènes, et ont ainsi mis en évidence leur potentiel autoréactif. Deux axes de recherche ont alors émergé, l'un travaillant sur le complexe reconnu par les cellules iNKT et cherchant à identifier le(s) ligand(s) endogène(s) activateur(s) des cellules iNKT autoréactives, et l'autre travaillant sur le lymphocyte iNKT et cherchant à identifier les caractéristiques intrinsèques de cette cellule pouvant lui conférer ce caractère autoréactif. Concernant les cellules iNKT, il existe de nombreuses homologies entre l'Homme et la souris, avec par exemple l'expression d'un TCR très conservé et homologue entre les deux espèces, ou la reconnaissance d'un antigène de nature glycolipidique. Ces observations ont donc fait de la souris un modèle animal de choix pour l'étude des cellules iNKT, permettant ainsi de pallier au manque d'échantillons qu'il est possible d'obtenir chez des individus humains. Néanmoins, dans le domaine de l'autoréactivité des différences entre les deux espèces sont observables, par exemple dans l'expression des glycolipides, révélant ainsi les limites de la transposition à l'Homme de résultats obtenus chez la souris.

C'est dans ce contexte qu'il nous est paru intéressant d'étudier l'autoréactivité des cellules iNKT chez l'Homme, à partir d'échantillons biologiques humains non modifiés, pour tenter de lever le voile sur ce phénomène. Dans un article actuellement soumis, nous avons cherché à identifier des cellules iNKT humaines autoréactives, et déterminer les bases moléculaires à l'origine de cette autoréactivité. Nous avons pour cela utilisé différents tétramères précédemment décrits comme capables de mettre en évidence ce type de cellules iNKT.

Ayant la chance d'avoir accès à des prélèvements de thymus humains, dans un deuxième projet, nous avons cherché à étudier le développement des cellules iNKT chez l'Homme. Pour cela, nous avons analysé l'expression de certains marqueurs par des thymocytes iNKT, et déterminé, si comme chez la souris, les sous-populations de cellules iNKT apparaissent au niveau thymique.

# **RESULTATS**

## **Première partie : l'auto-réactivité des cellules iNKT humaines**

Les travaux réalisés sur la partie concernant l'auto-réactivité des cellules iNKT humaines ont fait l'objet d'un article actuellement soumis. Dans cette étude, nous avons réussi à générer des lignées cellulaires iNKT humaines auto-réactives à partir de sang périphérique d'individus sains. Les cellules iNKT exprimant un TCR ne variant qu'au niveau de la boucle CDR3 $\beta$ , nous avons donc analysé la séquence de cette boucle pour des clones iNKT issus de la même lignée auto-réactive. Les clones générés ne présentaient pas le même profil d'auto-réactivité, avec des clones très peu auto-réactifs et d'autres très auto-réactifs, mais exprimaient pourtant le même TCR au niveau de la séquence nucléotidique. Ces résultats nous ont donc conduit à poursuivre nos recherches pour comprendre d'où venait la différence entre ces clones, et nous avons ainsi analysé le transcriptome par *RNA sequencing* des différents clones générés. Nos derniers résultats ont révélé la possibilité que, l'utilisation d'une voie de signalisation particulière, passant par la protéine kinase SYK, puisse aussi être une source d'auto-réactivité pour les cellules iNKT.

## **The expression of the SYK Tyrosine kinase decreases the reactivity threshold and favors the self-reactivity of iNKT cells**

Jeanne Perroteau<sup>1</sup>, Benjamin Navet<sup>1</sup>, Marie-Claire Devilder<sup>1,2</sup>, Leslie Hesnard<sup>1,3</sup>, Emmanuel Scotet<sup>1</sup>, Laurent Gapin<sup>4</sup>, Xavier Saulquin\*<sup>§1</sup>, Laetitia Gautreau-Rolland\*<sup>§1</sup>

<sup>1</sup> CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France

<sup>2</sup> Centre Hospitalier Universitaire Hôtel Dieu, Nantes, France

<sup>3</sup> Current Address : Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada

<sup>4</sup> Department of Immunology and Microbiology, University of Colorado School of Medicine, Aurora, CO 80045, USA

\* These authors contributed equally to this work

§ Correspondence: Xavier Saulquin, email : Xavier.Saulquin@univ-nantes.fr and Laetitia Gautreau, email : Laetitia.Gautreau@univ-nantes.fr

### **Abstract**

Invariant Natural Killer T (iNKT) cells are particular T lymphocytes, at the frontier between innate and adaptative immunities. They participate in the elimination of pathogens or tumor cells, but also in the development of allergic reactions and autoimmune diseases. From their first descriptions, the phenomenon of self-reactivity has been described. Indeed, they are able to recognize exogenous and endogenous lipids. However, the mechanisms underlying the self-reactivity are still largely unknown, particularly in humans. Using a CD1d tetramer-based sensitive immunomagnetic approach, we generated self-reactive iNKT cell lines from blood circulating iNKT cells of healthy donors. Analysis of their functional characteristics *in vitro* showed that these cells recognized endogenous lipids presented by CD1d molecules through their TCR, that do not correspond to  $\alpha$ -glycosylceramides. TCR sequencing and transcriptomic analysis of T cell clones revealed that a particular TCR signature and an expression of the SYK protein kinase were two mechanisms supporting human iNKT self-reactivity. SYK expression, normally limited to early stages of T-cell development but strongly expressed in the most self-

reactive iNKT clones, decreased the activation threshold of iNKT cells and increased their overall antigenic sensitivity. This study indicates that a modulation of the TCR intracellular signal contributes to iNKT self-reactivity.

## Introduction

Invariant Natural Killer T (iNKT) cells are T lymphocytes that differ from “conventional T cells” in several characteristics. In addition to the expression of NK receptors, the TCR of iNKT cells is semi-invariant, composed of an invariant  $\alpha$  chain, always formed by a rearrangement between the V $\alpha$ 24 and J $\alpha$ 18 segments and paired with a  $\beta$  chain composed of V $\beta$ 11 segment in humans [1, 2]. This particular TCR structure gives iNKT cells the ability to recognize lipid antigens presented by the non-polymorphic MHC class I-like CD1d molecule [3]. Some microorganisms-derived glycolipid antigens have been identified and their recognition by iNKT TCR triggers immune responses against these pathogens. These glycolipids are found in the wall of bacteria and are composed of a glycosyl group conjugated, via an  $\alpha$ -glycosidic linkage, to either a ceramide or to a diacylglycerol base (reviewed in [4]). One of the first foreign lipids discovered was  $\alpha$ -GalactosylCeramide ( $\alpha$ GalCer), a synthetic glycolipid purified from the marine sponge *Agelas mauritanus* [5].  $\alpha$ GalCer has demonstrated powerful activation properties of iNKT cells *in vitro* and *in vivo* [6, 7]. It also has potent antitumor functions [5, 8], hence its use in several clinical trials [9, 10]. Furthermore, the generation of soluble fluorescent  $\alpha$ GalCer-CD1d tetramers has facilitated the detection of iNKT cells [11] and further helped our understanding of iNKT cell biology [12]. In addition to the recognition of foreign glycolipid antigens, iNKT cells can also recognize self-lipids. iNKT cells were shown to respond to CD1d expressing antigen-presenting cells (APCs) under non-inflammatory conditions in the absence of any added exogenous lipids [13, 14]. Although iNKT cell development is completely abrogated in absence of CD1d molecule, the expression, frequency, tissue distribution and functions of iNKT cells are not affected in germ-free mice compared to wild-type mice, suggesting that iNKTs are able to develop through the recognition of endogenous lipids presented by CD1d molecules [15, 16]. It is likely that the interaction between the iNKT TCR and the self-lipid/CD1d complex might induce a weak stimulation. However, this response can be increased in some contexts of infections and/or in presence of inflammatory cytokines

increasing the self-reactivity [17]. Brigl *et al.* proposed that few self-antigens could be recognized by iNKT cells in normal conditions but their expression would be increased in context of inflammation [18]. In addition, it has been reported that a Toll-like receptor (TLR) ligand stimulation increases on the surface of APCs the expression level of self-lipids presenting a higher affinity for iNKT TCR [19]. Other authors have demonstrated that the self-reactivity of iNKT can be linked to the amino-acid composition of the CDR3 $\beta$  loop of the TCR that influences the affinity of this receptor for self-lipid/CD1d complexes [20, 21]. Various self-lipids capable of stimulating iNKT cells have been identified over the years but no consensus has been reached regarding the molecular basis of iNKT cell autoreactivity. Currently, it remains unknown whether all iNKT cells are self-reactive or whether only some subpopulations have such capacity. The lack of relevant tools to detect self-reactive cells limits knowledge of the mechanisms underlying iNKT self-reactivity. We took advantage of our experience in isolating scarce antigen-specific T cells by tetramer-based immunomagnetic sorting and in T cell culture [22-24] to address this issue. Using a variety of CD1d tetramers loaded with lipids of natural or synthetic origin, we were able to generate iNKT cell lines from human PBMC of healthy donors and tested for their self-reactivity. Our data demonstrated that the binding of iNKT cells by CD1d tetramers loaded with self-lipids or with the synthetic partial agonist OCH lipid was not sufficient to systematically identify self-reactive iNKT cells. In addition, we identified two cell lines demonstrating interesting properties since they were activated against human unloaded CD1d<sup>+</sup> target cells in functional assays. Molecular analysis of the self-reactive cell lines showed that autoreactivity was associated with particular characteristics of their TCRs or with the expression of the SYK protein kinase, the latter lowering activation threshold of iNKT cells against self and non-self lipids.

## **Results**

### **Neither the unloaded-CD1d tetramers nor OCH-CD1d tetramers are good tools for identifying self-reactive iNKT cells**

Invariant NKT cells were isolated from PBMCs of healthy donors (n=7) by magnetic enrichment using soluble fluorescent tetramers of  $\alpha$ GalCer-CD1d complexes, followed by flow cytometric

sorting of living cells with the phenotype: CD3<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>V $\alpha$ 24<sup>+</sup> $\alpha$ GalCer-CD1d<sup>+</sup> cells (Fig 1A). iNKT cell lines were subsequently generated by expanding the cells under non-specific polyclonal conditions. Transgenic hybridomas expressing particular iNKT-TCRs and exhibiting self-reactive capacities have already been identified in a mouse system using unloaded-CD1d tetramers [20]. The CD1d molecules that are used to generate such tetramers are likely loaded with endogenous lipids that are naturally produced by HEK293 cells in which the CD1d monomers are produced. We first considered using this tool to determine if unloaded-CD1d tetramer-positive cells could be detected in these human iNKT polyclonal cell lines. Staining of iNKT cells with soluble fluorescent unloaded-CD1d tetramers revealed that a weak but significant fraction of positive cells could be detected for each iNKT cell line ( $1.8\% \pm 0.8$ ,  $n=7$ ; Fig 1B and data not shown). Negative and positive fractions of cells labeled by the unloaded CD1d tetramers were separated by further cell sorting and expanded *in vitro*. The resulting subpopulations were referred to as Self Negative (SN) and Self Positive (SP) iNKT cell lines. Staining with anti-V $\alpha$ 24 and -V $\beta$ 11 antibodies confirmed that these cell lines consisted exclusively of type-I NKT cells (Fig 1C and data not shown). Consistent with these results, all cell lines stained with the  $\alpha$ GalCer-CD1d, while only SP cell lines were labeled with unloaded-CD1d tetramers (Fig 1C and data not shown).

We then determined using different assays the autoreactive potential of each cell line in recognizing human CD1d-expressing APCs loaded or not with  $\alpha$ GalCer. Degranulation assays (CD107 staining, data not shown) and cytokine production (Fig 1D and data not shown) demonstrated that all cell lines were reactive against  $\alpha$ GalCer-loaded target cells, but only two of them were reactive against unloaded target cells, one corresponding to Donor #1 SP cell line and the other to Donor #2 SN cell line. Similar reactivity patterns were obtained by chromium release assays (Fig 1E). Altogether, these results demonstrate that binding to unloaded-CD1d tetramers do not systematically identify self-reactive iNKT cells.

A strong correlation between the staining intensity of iNKT cells with OCH-CD1d tetramers and their autoreactivity potential has also been reported [21]. Although both self-reactive iNKT cell lines that we generated were brightly stained by OCH-CD1d tetramers (Fig 2A), a strong tetramer binding (%OCH-CD1d<sup>+</sup> cells and tetramer staining intensity; Fig 2B and data not shown) was also observed for some non-autoreactive iNKT cell lines (Fig 2B).

Because the previously studied iNKT cell lines may have been biased by sorting cells using unloaded-CD1d tetramers (SN or SP, see above), we decided to generate new bulk cell lines from PBMCs of healthy donors using  $\alpha$ GalCer-CD1d tetramers. Staining of these new cell lines by OCH-CD1d tetramers showed a variable fraction of tetramer positive cells (23.1-83.4%, n=4; Fig 3A). The OCH-CD1d negative and positive fractions were further sorted and amplified *in vitro*. Anti-V $\alpha$ 24, -V $\beta$ 11 antibodies and  $\alpha$ GalCer-CD1d tetramers staining confirmed that cells were type-I NKT cells (Fig 3B and data not shown). OCH-CD1d tetramer staining also showed that OCH-CD1d negative and positive cultured cell lines did not deviate after polyclonal expansion *in vitro*. Functional assays performed by degranulation (data not shown) and cytokine production measurement (Fig 3C, 3D and data not shown) showed that while all cell lines were reactive against  $\alpha$ GalCer-loaded target cells, none were reactive against unloaded CD1d<sup>+</sup> target cells. Thus, the capacity of iNKT to bind OCH-CD1d tetramers was not sufficient to identify self-reactive iNKT cells.

Altogether, these results demonstrate that iNKT cells stained with unloaded-CD1d tetramers and OCH-CD1d tetramers do not systematically identify cells that will demonstrate self-reactivity towards CD1d-expressing APCs.

### Functional characterization of self-reactive iNKT cell lines

Next, we aimed to further characterize the reactivity of the two self-reactive cell lines that we identified. To do so, we repeated the functional assays described above in the presence of an anti-CD1d blocking or an isotype control mAb. The results showed that the reactivity of the self-reactive iNKT cell lines (Donor#1 SP and Donor#2 SN cell lines) towards human CD1d<sup>+</sup> target cells was completely blocked by the addition of anti-CD1d mAb, but was unaffected in presence of an isotype control mAb, (Fig 4A). These results suggest that the observed autoreactivity of these cell lines towards CD1d-expressing APCs involves the TCR-CD1d axis.

While the previous results clearly demonstrate that the autoreactivity of these two cell lines involves the recognition of CD1d molecules by their respective TCR, the nature of the endogenous lipids that might be involved remains unclear. Although mammalian

glycosylceramide synthases are  $\beta$ -transferases and generate  $\beta$ -anomers of glycosylceramides, Kain *et al.* demonstrated that mammalian immune cells constitutively produce small amounts of  $\alpha$ -glycosylceramides and further proposed that  $\alpha$ GalCer might represent one of the endogenous ligands of iNKT lymphocytes [25]. An antibody reacting with  $\alpha$ -glycosylceramides bound to mouse CD1d, in a way that depends on the  $\alpha$ -linked sugar, has been previously developed by Porcelli and colleagues (L363 mAb) [25, 26]. We wanted to test whether the self-reactivity observed with the two iNKT cell lines (Donor#1 SP and Donor#2 SN) would be blocked by the addition to the L363 mAb to the cultures. We analyzed the degranulation of self-reactive cell lines against target cells expressing mouse CD1d molecules (mCD1d) and loaded with different concentrations of  $\alpha$ GalCer (range:0-1  $\mu$ g/mL), in the presence of L363 mAb or an isotype control mAb. Interestingly, the self-reactive cell line isolated from Donor 1 (Donor#1 SP) recognized mCD1d<sup>+</sup> cells presenting endogenous lipids as 60% of the cells were activated against unloaded mCD1d<sup>+</sup> cells (Fig 4B, white circles). This cross-reactivity was not inhibited by L363. Moreover, the addition of L363 mAb decreased but did not completely inhibit the reactivity of this cell line against  $\alpha$ GalCer-loaded mCD1d<sup>+</sup> target cells (Fig 4B, black circles). Indeed, the percentages of CD107<sup>+</sup> cells were identical regardless of whether the iNKT cell line was stimulated by  $\alpha$ GalCer-loaded targets in the presence of a high concentration of L363 mAb or by unloaded target cells. These results demonstrate that the self-antigens presented by mCD1d and recognized by the TCR of this cell line are unlikely to be  $\alpha$ -glycosylceramides. Although the Donor#2 SN cell line also cross-reacted against mCD1d target cells loaded with  $\alpha$ GalCer, no reactivity was observed in the absence of  $\alpha$ GalCer loading, preventing any evaluation of the type of endogenous lipids recognized using L363 mAb.

Our results therefore indicate that the self-reactivity modalities differ between the two iNKT cell lines studied, suggesting that both cell lines might recognize different antigenic complexes, most likely due to the expression of different TCRs.

### **Molecular characterization of self-reactive iNKT cell lines**

To test this hypothesis, we sequenced the TCRs of 4 iNKT cell lines (Donor#1 SN and SP, Donor#2 SN and SP) using paired-end MiSeq technology. Each self-reactive cell line presented

a major sequence (Donor#1 SP, Frequency=93%; Donor#2 SN, Frequency=82.7%) that was not found in any other cell line (Table 1, threshold<0.2%). However, 5 and 2 different sequences were expressed at more than 5% in Donor#1 SN and Donor#2 SP non-self reactive cell lines, respectively.

Our results therefore indicate that the two self-reactive iNKT cell lines express different TCRs. In addition, since these TCRs were not found in non-self-reactive cell lines, a specific iNKT TCR signature could be a prerequisite for iNKT self-reactivity.

The analysis of TCR sequencing showed that both self-reactive cell lines were mainly oligoclonals. In order to carry a thorough analysis of the potential molecular mechanisms implicated in self-reactivity, both cell lines were cloned. Twelve clones were obtained from Donor#2 SN but cloning of the Donor#1 SP iNKT cell line was unsuccessful. The iNKT TCR sequencing revealed strictly identical  $\alpha$  and  $\beta$  sequences between the 12 clones, corresponding to the major sequence found in the parental oligoclonal Donor#2 SN cell line (data not shown). The autoreactivity potential of each clone was first assessed by degranulation against target hCD1d<sup>+</sup> cells loaded with  $\alpha$ GalCer or not (DMSO condition). The results showed that all clones were reactive against  $\alpha$ GalCer-loaded target cells (Fig 5A and data not shown). Surprisingly, the percentage of activated cells triggered by unloaded hCD1d<sup>+</sup> target cells varied among clones, from about 10% of activated cells for clones C20, C13, C29, C4 and C6 to about 75% for the clone C12 (Figure 5). Importantly, the observed variability in self-reactivity between clones was not correlated with variations in TCR expression, as the different clones expressed similar CD3 expression levels (data not shown).

Thus, despite an identical TCR sequence, the different clones presented variable autoreactivity potential, showing that the TCR sequence was not sufficient to explain self-reactivity of these clones and suggesting that other mechanisms probably influenced iNKT cell sensitivity for CD1d molecules presenting endogenous lipids.

### **The expression of the SYK Tyrosine kinase modulates the self-reactivity of iNKT cell lines.**

To address the latter hypothesis, the transcriptome of clones was determined by RNA sequencing. We compared how gene expression differed between a group of the most self-

reactive clones (C12, C5 and C1 clones) and a group of the least self-reactive clones (C13, C6 and C4 clones). The results, plotted as a Volcano Plot in Figure 6, showed that 5 genes (Ier2, Cd69, Btg2, JunB and Dusp2 genes) were over-expressed by C13, C6 and C4 clones compared to the other clones group (Fold Changes>3, FDR<0.05) and 1 gene (Syk) by C12, C5 and C1 clones compared to the less self-reactive clones (Fold Change>20, FDR<0.05). The Syk (Spleen tyrosine kinase) gene encodes a Tyrosine kinase protein implicated in immune receptor signaling [27]. The expression of the SYK protein in the various clones was confirmed by intracellular immunostaining (Fig 7A) and was correlated to the number of reads of Syk gene transcripts determined in each clone (data not shown). For example, less than 0.5% of cells of the clones C13 (30 reads) and C6 (92 reads) were SYK<sup>+</sup>, while more than 99% of cells of the clone C12 (2762 reads) expressed this protein. Importantly, the expression of SYK protein was highly correlated with the autoreactivity potential of the clones (Fig 7B;  $r=0.9286$ ,  $p<0.01$ ). To evaluate if the SYK protein expression could influence the reactivity threshold of iNKT cells, the activation of some prototypical clones in terms of SYK expression (C12, C19 and C6) were evaluated against hCD1d<sup>+</sup> target cells loaded with increasing concentrations of  $\alpha$ GalCer (range: 0-100  $\mu$ g/mL). The percentage of activated cells (Fig 7C) and the half maximal response (TNF $\alpha$  EC50) was determined for each clone (Fig 7D). Interestingly, the means of TNF $\alpha$  EC50 for each clone followed the SYK expression level (C6:  $6.01 \times 10^{-7}$  g/mL; C19:  $1.14 \times 10^{-7}$  g/mL; C12:  $6.75 \times 10^{-8}$  g/mL) and significantly differed between the C6 and the C12 clones ( $p<0.05$ ), respectively slightly and highly autoreactive. Thus, the  $\alpha$ GalCer concentrations required to activate positive SYK clones were lower than those required to activate negative SYK clones, suggesting that SYK expression increases the overall functionality (EC50) of iNKT cells, lowering their activation threshold.

Altogether, these results indicate that the self-reactivity potential of clones derived from the Donor#2 SN cell line is associated with the expression level of SYK kinase.

## Discussion

Immune responses aim to defend organisms against pathogenic antigens. But the cross-reactivity of immune receptors (BCR and TCR for B and T lymphocytes, respectively) can lead

to autoimmune diseases and graft rejection in the context of transplantation. Invariant NKT cells are no exception to the rule. Several authors have already suggested that iNKT cells are able to recognize self-lipids presented by CD1d molecules on the surface of APCs. For example, sulfatide lipid [28] and phospholipids such as lysophosphatidylcholin (LPC) and lysosphingomyelin (LSM) [29, 30] activate human iNKT cells. Nevertheless, the molecular bases of self-reactivity remain poorly defined.

In this study, we generated two self-reactive iNKT cell lines from iNKT cells circulating in the blood of healthy donors and analyzed their molecular and functional characteristics. In both cases, the self-reactive cells did not represent the entire iNKT cell compartment of individuals but only a proportion. Thus, our result indicates that self-reactivity is limited to certain iNKT subsets and is not a feature common to all iNKT cells. Several particular tetramers were used to seek self-reactive iNKT cells. The unloaded-CD1d tetramers stained only one of the two self-reactive iNKT cell lines. Others have already used this tool to identify self-reactive murine iNKT cells. Mallevaey *et al.* generated mouse hybridomas expressing transgenic iNKT TCRs and stained hybridomas with self-mCD1d tetramers. While most of self-mCD1d positive hybridomas recognized unloaded-mCD1d<sup>+</sup> target cells, one self-mCD1d negative hybridoma from this study was also activated by this type of target [20]. Thus, our data are consistent with this study, and indicate that the unloaded-mCD1d tetramer does not allow a systematic identification of self-reactive iNKT cells. Similarly, the OCH-CD1d tetramers were not sufficient to identify self-reactive iNKT cells in our hands, though Matulis *et al.* have demonstrated that human OCH<sup>high</sup> iNKT clones were able to recognize unloaded and OCH-loaded hCD1d<sup>+</sup> target cells, unlike the OCH<sup>low</sup> iNKT clones [21].

Both populations of self-reactive iNKT cells recognize unloaded-hCD1d<sup>+</sup> target cells that express endogenous lipids. This recognition depends on the CD1d molecule and experiments with a blocking  $\alpha$ GalCer-mCD1d antibody (clone L363) showed that the antigens recognized were unlikely to be  $\alpha$ -glycosylceramides, [31]. The self-lipids recognized by the two autoreactive lines are possibly varied and different. Indeed, in functional assays, two types of target cells were used (Hela and C1R cell lines) which do not necessarily express the same lipids. We cannot exclude that the TCR of the self-reactive iNKT cell lines recognize only the CD1d protein, in the absence of direct contact with the lipid, akin to what was recently reported for the autoreactivity of CD1a-reactive T cells [32] and CD1c-reactive T cells [33]. The ignored lipids

would correspond either to small ligands buried in the CD1 cleft or to ligands whose exposed area remains on the far margin of the CD1 surface far from the part recognized by the TCR [34]. Our study was continued by the cloning of a self-reactive cell line (Donor#2 SN). The derived iNKT clones expressing strictly identical TCRs, showed very different self-reactivity profiles, correlating with their SYK expression level. In addition, we demonstrate that this expression of SYK also impacts the iNKT cell activation threshold, as the more iNKT clones express the SYK protein, the lower their EC50 of  $\alpha$ GalCer. Within the SYK family of Tyrosine kinases, the SYK protein has been described as being recruited by phosphorylated ITAM domains of BCR and FcR, while the ZAP70 protein expression is more restricted to the T and NK lineages [27]. These proteins transduce signals for the development, activation, differentiation and migration of immune cells. The SYK expression is however important in the early stages of T-cell development, as it increases from the double negative stage to the stage where the pre-TCR is expressed [35]. SYK plays a key role in pre-TCR signaling, while ZAP-70 is important for TCR signaling [36]. Then, the SYK expression is down-regulated without being completely extinguished in humans [35]. SYK has been shown to be a more active kinase *in vitro*, and to induce stronger activation in T cells than ZAP-70 [37]. Moreover, it has been suggested that the signaling via SYK can compensate for the loss of ZAP-70 function [35] and be involved in several autoimmune diseases in mice [38-40] and humans [41]. In a murine model of antibody-induced arthritis, activated iNKT cells have been shown to express phosphorylated SYK proteins and to be involved in the development of the disease [38]. Therefore, in particular contexts (deficiencies, inflammation, autoimmune diseases), a modification of SYK expression could decrease activation threshold of T lymphocytes notably iNKT cells. Two origins are more likely to be considered for these “hypersensitive” iNKT cells: either they maintain a high SYK expression level after the pre-TCR stage and thymus export, or their SYK expression level is increased in the periphery under specific conditions. In accordance with the latter hypothesis, it has already been described that an inflammatory context can decrease the reactivity threshold for activating iNKT cells against self-antigens [17].

We investigated SYK expression in the self-reactive iNKT cell line Donor#1 SP by flow cytometry, these cells were SYK negative (data not shown). Thus, the properties of self-reactivity in this cell line were not dependent of SYK expression. Each self-reactive iNKT cell line expressed a major non-recurrent TCR sequence, with little sharing between iNKT cells of both donors. The

TCR affinity for a self-lipid/CD1d complex determined by its sequence, or perhaps more precisely by its CDR3 $\beta$  loop as suggested by others [20, 21], seems to have a profound impact on iNKT cell self-reactivity function. Moreover, the TCR signaling pathway could increase this self-reactivity, as demonstrated here with the recruitment of the SYK molecule. As illustrated with the self-reactive iNKT cell line Donor#1 SP, other mechanisms potentially modeling TCR signaling sensitivity might also be involved. Gui *et al.*, have reported that transduction of TCR $\alpha\beta$  chains of a high CD1d autoreactive mouse iNKT cell line generated the  $\alpha$ GalCer/CD1d specificity but not the self-reactivity, suggesting that a CDR3 $\beta$  or TCR sequence is not necessarily sufficient to confer self-reactivity [42]. It would be interesting to clone individually the TCR of the two self-reactive iNKT cell lines into TCR-deficient SYK<sup>-</sup> and SYK<sup>+</sup> cells to further understand the molecular basis of self-reactivity. This would make it possible to separate the impact of TCR sequence from the impact of the SYK molecule expression.

In conclusion, to our knowledge, this is the first time that i) self-reactive iNKT cells have been identified in humans without genetic manipulation and ii) the implication of a TCR-signaling molecule is highlighted in iNKT self-reactivity.

## Materials and Methods

### Blood samples

Human peripheral blood samples were obtained from anonymous healthy adult volunteers after informed consent in accordance with the local ethics committee (Etablissement Français du Sang, EFS, Nantes, France, procedure PLER NTS-2018-21). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll<sup>®</sup> density gradient (LMS, Eurobio) and resuspended in RPMI 1640 medium (ThermoFisher Scientific) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Corning), 2 mM GlutaMAX (ThermoFisher Scientific) and penicillin-streptomycin 0.5% (ThermoFisher Scientific) (here-after referred to as RPMI complete medium) to be counted and immediately used for  $\alpha$ GalCer-CD1d tetramer magnetic enrichment procedure.

### **Glycolipids and CD1d tetramers**

Biotinylated CD1d monomers ( $\alpha$ GalCer (PBS57)-CD1d, OCH-CD1d and unloaded-CD1d), produced in HEK293 cells, were obtained from the National Institutes of Health (NIH) Tetramer Core Facility. Tetramerization of monomers was performed with PE- or APC-labeled streptavidins (Prozyme) at a molar ratio of 4: 1. The  $\alpha$ GalCer (PBS57) synthetic glycolipid used was purchased from Sigma-Aldrich.

### **Tetramer-based immunomagnetic enrichment protocol**

Between  $250 \cdot 10^6$  and  $350 \cdot 10^6$  PBMCs, freshly purified by Ficoll, were incubated in 200  $\mu$ L conjugated  $\alpha$ GalCer-CD1d tetramers diluted to 3,75  $\mu$ g/mL in PBS (Phosphate Buffered Saline) plus 2% FBS for 30 minutes on ice. After washes, cells were incubated with 70  $\mu$ L anti-PE or anti-APC antibodies-coated immunomagnetic beads (Miltenyi Biotec) in 500  $\mu$ L cold sorter buffer (PBS, EDTA 0.02%, BSA 0.5%) for 20 minutes on ice. The tetramer-stained cells were then enriched as previously described [22, 23, 43]. The resulting enriched fractions were stained with anti-human CD14, -CD19, -CD3 (BD Biosciences), -V $\alpha$ 24 (Beckman Coulter) antibodies and Zombie NIR Dye (BioLegend).

### **Generation of iNKT cell lines and clones**

iNKT cell lines were obtained after sorting with a FACS Aria III sorter (BD Biosciences) of enriched  $\alpha$ GalCer-CD1d tetramer<sup>+</sup> cells, also positive for CD3 and V $\alpha$ 24 expression and negative for CD14, CD19 and Zombie NIR Dye. iNKT cell clones were obtained from an iNKT cell line after single cell sorting with a FACS Aria III sorter. Cells were expanded *in vitro* under nonspecific conditions using recombinant human IL-2 (rhIL-2, 300 U/mL, Novartis), leucoagglutinin (1  $\mu$ g/mL, Sigma Aldrich), 35 Gy-irradiated PBMCs and B-lymphoblastoid cells lines. iNKT cell lines and clones were maintained for 3 weeks without restimulation in RPMI 1640 medium supplemented with 8% of human serum, 2 mM GlutaMAX, penicillin-streptomycin 0.5% and 300 U/mL rhIL-2 before analysis. The specificity and purity of iNKT cells were assessed with anti-CD3, -V $\alpha$ 24, and -V $\beta$ 11 (Beckman Coulter) antibodies and appropriate CD1d tetramers.

### Functional assays

100.10<sup>3</sup> iNKT lymphocytes were incubated with target cells (Hela or C1R cell lines) expressing or not human CD1d molecules at an Effector:Target (E:T) ratio of 1:1 during 4 hours at 37°C. Target cells were previously loaded or not with  $\alpha$ GalCer at 1  $\mu$ g/mL overnight and were washed before the coculture. Degranulation assays were performed adding anti-CD107a/b antibodies (BD Biosciences), monensin and BFA (both at 10  $\mu$ g/mL, Sigma Aldrich) during the coculture in RPMI complete medium. When appropriate, target cells were incubated with anti-hCD1d blocking or relevant isotype control antibodies (eBiosciences) at 10  $\mu$ g/mL during 15 minutes at room temperature before adding iNKT cells. SYK expression and TNF $\alpha$  cytokine detection were performed in an intracellular staining protocol, using Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience) and anti-human TNF $\alpha$  or -SYK antibodies (BioLegend). The stained cells were analyzed on a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences). For experiments with anti- $\alpha$ GalCer-mouse CD1d antibody, A20 target cells expressing mouse CD1 molecules were loaded overnight with different concentrations of  $\alpha$ GalCer (range:0-1  $\mu$ g/mL) and cocultures with iNKT lymphocytes was performed at a E:T ratio of 1:1 in presence of blocking anti- $\alpha$ GalCer-mouse CD1d antibody (clone L363) at a final concentration of 10  $\mu$ g/mL (kindly provided by SA Porcelli) or relevant isotype control antibody.

### Cytolytic assays

Cytolytic activity was assessed through standard <sup>51</sup>Cr release assays. Target cells were previously loaded or not with  $\alpha$ GalCer at 1  $\mu$ g/mL overnight. After washing, they were labeled with <sup>51</sup>Cr (75 mCi for 1.10<sup>6</sup> cells) for 1h at 37°C, washed three times with complete culture medium, plated at 3.10<sup>3</sup> cells per well, and iNKT lymphocytes were added at a E:T ratio of 20:1 in 96-well round-bottom plates. After a 4h coculture at 37°C, <sup>51</sup>Cr released activity was measured in supernatants using a scintillation counter (MicroBeta, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Each test was performed in triplicates. The percentage of cytotoxicity was determined with the formula: ((experimental release - spontaneous release)/(maximum release - spontaneous release))\*100. Maximum and spontaneous releases were determined by adding 1% Triton X-100 (Sigma Aldrich) or complete medium respectively, to <sup>51</sup>Cr-labeled target cells in the absence of iNKT lymphocytes.

### **iNKT TCR sequencing**

Total RNA was purified from  $5.10^6$  iNKT clones using NucleoSpin RNA Plus Kit (Macherey-Nagel), according to the manufacturer's recommendations, and total RNA elution product was reverse transcribed using SuperScript III reverse transcriptase (ThermoFisher Scientific) at 10 units/ $\mu$ L. cDNA was subsequently amplified using Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymerase (New England BioLabs) and primers targeting variable region of  $\alpha$  (forward 5'-GAGTCCTCAGTCCCTGATCAT-3' and reverse 5'-GCAGACAGACTTGCTACTGGA-3') and  $\beta$  (forward 5'-CTACCAGACCCCAAGATACCT-3' and reverse 5'-TCTCTGCTTCTGATGGCTCAA-3') chains. Amplified samples were purified from agarose gels with NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit (Macherey-Nagel), according to the manufacturer's recommendations. Purified PCR products were sequenced at Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany). Sequences were analyzed by IMGT/V-Quest to identify V(D)J segments.

To identify the variable region of  $\beta$  chain of iNKT cell lines, the same protocol was performed using forward and reverse primers including target sequences suitable for nextera indexage. Barcodes were further introduced by PCR with indexed nextera and the amplicons were sequenced at the IRIC's Genomics Core Facility at Montreal. Paired-end MiSeq technology (MiSeq Reagent Nano kit v2 (500 cycles) from Illumina, Inc. San Diego, CA, USA) was used, with a 2 x 250 bp setup. Results were analyzed according to the MiXCR documentation.

### **RNA sequencing**

After RNA extraction from  $5.10^6$  iNKT clones, between 0.9  $\mu$ g and 2.7  $\mu$ g of total RNA elution product was sent to the IRIC's Genomics Core Facility at Montreal for the RNAseq analysis with a Next-Seq HighOutput 75 cycles chip in Single-end. For analysis, two groups of three clones were compared: the least autoreactive clones (C13, C4, C6) and the most autoreactive ones (C12, C1, C5). To identify differential gene expression between the two groups, we performed negative binomial tests using the Bioconductor package DESeq on R. Normalization was realized to exclude non-expressed and extreme genes. Differential gene expression analysis was carried out using the statistic test Wald (Fold Change >1 and P-value <0.05 (5% FDR). Data are represented in a VolcanoPlot.

## Statistical analysis

Analyses were performed using Graph Pad Prism software (San Diego, CA). A two-tailed Spearman's test was used to evaluate a correlation between the percentage of protein SYK expression and the autoreactivity potential of the different iNKT clones (percentage of activated (CD107<sup>+</sup> within CD3<sup>+</sup> cells) clones against unloaded hCD1d<sup>+</sup> target cells). A Friedman test, with Dunn's multiple comparison test, was used to compare the EC50 of C6, C12 and C19 clones after normalization of percentages of TNF<sup>+</sup> cells within CD3<sup>+</sup> cells.

## Acknowledgments

We thank the Cytometry Facility "CytoCell" (SFR Santé, Biogenouest, Nantes) for expert technical assistance. We thank also the staff of radioactivity platform (INSERM 1232, SFR Santé, Nantes) for their technical support. We thank the NIH Tetramer Core Facility for providing us  $\alpha$ GalCer-, OCH- and unloaded-CD1d monomers and SA Porcelli for providing us blocking  $\alpha$ GalCer-mCD1d antibody (L363). This work was supported by grant from the Ligue Contre le Cancer (Comité de Loire Atlantique et de Maine et Loire). This work was realized in the context of the LabEX IGO program supported by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01. JP, MCD, LH and LGR performed experiments. BN analyzed RNA sequencing and TCR sequencing of iNKT cells. JP, ES, LG, XS and LGR wrote the manuscript. XS and LGR supervised the working program.

## Conflict of interest

Authors declare no financial or commercial conflict of interest.

## References

- 1 **Exley, M., Garcia, J., Balk, S. P. and Porcelli, S.,** Requirements for CD1d recognition by human invariant V $\alpha$ 24<sup>+</sup> CD4-CD8- T cells. *J Exp Med* 1997. **186**: 109-120.
- 2 **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<sup>+</sup> and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med* 1994. **180**: 1097-1106.
- 3 **Bendelac, A., Lantz, O., Quimby, M. E., Yewdell, J. W., Bennink, J. R. and Brutkiewicz, R. R.,** CD1 recognition by mouse NK1<sup>+</sup> T lymphocytes. *Science* 1995. **268**: 863-865.

- 4 **Rossjohn, J., Pellicci, D. G., Patel, O., Gapin, L. and Godfrey, D. I.,** Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells. *Nat Rev Immunol* 2012. **12**: 845-857.
- 5 **Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., Koseki, H. and Taniguchi, M.,** CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997. **278**: 1626-1629.
- 6 **Burdin, N., Brossay, L., Degano, M., Iijima, H., Gui, M., Wilson, I. A. and Kronenberg, M.,** Structural requirements for antigen presentation by mouse CD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000. **97**: 10156-10161.
- 7 **Burdin, N., Brossay, L., Koezuka, Y., Smiley, S. T., Grusby, M. J., Gui, M., Taniguchi, M., Hayakawa, K. and Kronenberg, M.,** Selective ability of mouse CD1 to present glycolipids: alpha-galactosylceramide specifically stimulates V alpha 14+ NK T lymphocytes. *J Immunol* 1998. **161**: 3271-3281.
- 8 **Hayakawa, Y., Rovero, S., Forni, G. and Smyth, M. J.,** Alpha-galactosylceramide (KRN7000) suppression of chemical- and oncogene-dependent carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003. **100**: 9464-9469.
- 9 **Waldowska, M., Bojarska-Junak, A. and Rolinski, J.,** A brief review of clinical trials involving manipulation of invariant NKT cells as a promising approach in future cancer therapies. *Cent Eur J Immunol* 2017. **42**: 181-195.
- 10 **Wolf, B. J., Choi, J. E. and Exley, M. A.,** Novel Approaches to Exploiting Invariant NKT Cells in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 2018. **9**: 384.
- 11 **Gumperz, J. E., Miyake, S., Yamamura, T. and Brenner, M. B.,** Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* 2002. **195**: 625-636.
- 12 **Bendelac, A., Savage, P. B. and Teyton, L.,** The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007. **25**: 297-336.
- 13 **Brossay, L., Tangri, S., Bix, M., Cardell, S., Locksley, R. and Kronenberg, M.,** Mouse CD1-autoreactive T cells have diverse patterns of reactivity to CD1+ targets. *J Immunol* 1998. **160**: 3681-3688.
- 14 **Park, S. H., Roark, J. H. and Bendelac, A.,** Tissue-specific recognition of mouse CD1 molecules. *J Immunol* 1998. **160**: 3128-3134.

- 15 **Chiu, Y. H., Park, S. H., Benlagha, K., Forestier, C., Jayawardena-Wolf, J., Savage, P. B., Teyton, L. and Bendelac, A.,** Multiple defects in antigen presentation and T cell development by mice expressing cytoplasmic tail-truncated CD1d. *Nat Immunol* 2002. **3**: 55-60.
- 16 **Park, S. H., Benlagha, K., Lee, D., Balish, E. and Bendelac, A.,** Unaltered phenotype, tissue distribution and function of Valpha14(+) NKT cells in germ-free mice. *Eur J Immunol* 2000. **30**: 620-625.
- 17 **Gapin, L.,** iNKT cell autoreactivity: what is 'self' and how is it recognized? *Nat Rev Immunol* 2010. **10**: 272-277.
- 18 **Brigl, M., Tatituri, R. V., Watts, G. F., Bhowruth, V., Leadbetter, E. A., Barton, N., Cohen, N. R., Hsu, F. F., Besra, G. S. and Brenner, M. B.,** Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. *J Exp Med* 2011. **208**: 1163-1177.
- 19 **Salio, M., Speak, A. O., Shepherd, D., Polzella, P., Illarionov, P. A., Veerapen, N., Besra, G. S., Platt, F. M. and Cerundolo, V.,** Modulation of human natural killer T cell ligands on TLR-mediated antigen-presenting cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007. **104**: 20490-20495.
- 20 **Mallevaey, T., Clarke, A. J., Scott-Browne, J. P., Young, M. H., Roisman, L. C., Pellicci, D. G., Patel, O., Vivian, J. P., Matsuda, J. L., McCluskey, J., Godfrey, D. I., Marrack, P., Rossjohn, J. and Gapin, L.,** A molecular basis for NKT cell recognition of CD1d-self-antigen. *Immunity* 2011. **34**: 315-326.
- 21 **Matulis, G., Sanderson, J. P., Lissin, N. M., Asparuhova, M. B., Bommineni, G. R., Schumperli, D., Schmidt, R. R., Villiger, P. M., Jakobsen, B. K. and Gadola, S. D.,** Innate-like control of human iNKT cell autoreactivity via the hypervariable CDR3beta loop. *PLoS Biol* 2010. **8**: e1000402.
- 22 **Hesnard, L., Legoux, F., Gautreau, L., Moyon, M., Baron, O., Devilder, M. C., Bonneville, M. and Saulquin, X.,** Role of the MHC restriction during maturation of antigen-specific human T cells in the thymus. *Eur J Immunol* 2016. **46**: 560-569.
- 23 **Legoux, F., Debeaupuis, E., Echasserieau, K., De La Salle, H., Saulquin, X. and Bonneville, M.,** Impact of TCR reactivity and HLA phenotype on naive CD8 T cell frequency in humans. *J Immunol* 2010. **184**: 6731-6738.

- 24 **Legoux, F., Gautreau, L., Hesnard, L., Leger, A., Moyon, M., Devilder, M. C., Bonneville, M. and Saulquin, X.,** Characterization of the human CD4(+) T-cell repertoire specific for major histocompatibility class I-restricted antigens. *Eur J Immunol* 2013. **43**: 3244-3253.
- 25 **Kain, L., Webb, B., Anderson, B. L., Deng, S., Holt, M., Costanzo, A., Zhao, M., Self, K., Teyton, A., Everett, C., Kronenberg, M., Zajonc, D. M., Bendelac, A., Savage, P. B. and Teyton, L.,** The identification of the endogenous ligands of natural killer T cells reveals the presence of mammalian alpha-linked glycosylceramides. *Immunity* 2014. **41**: 543-554.
- 26 **Yu, K. O., Im, J. S., Illarionov, P. A., Ndonge, R. M., Howell, A. R., Besra, G. S. and Porcelli, S. A.,** Production and characterization of monoclonal antibodies against complexes of the NKT cell ligand alpha-galactosylceramide bound to mouse CD1d. *J Immunol Methods* 2007. **323**: 11-23.
- 27 **Mocsai, A., Ruland, J. and Tybulewicz, V. L.,** The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* 2010. **10**: 387-402.
- 28 **Stax, A. M., Tuengel, J., Girardi, E., Kitano, N., Allan, L. L., Liu, V., Zheng, D., Panenka, W. J., Guillaume, J., Wong, C. H., van Calenbergh, S., Zajonc, D. M. and van den Elzen, P.,** Autoreactivity to Sulfatide by Human Invariant NKT Cells. *J Immunol* 2017. **199**: 97-106.
- 29 **Fox, L. M., Cox, D. G., Lockridge, J. L., Wang, X., Chen, X., Scharf, L., Trott, D. L., Ndonge, R. M., Veerapen, N., Besra, G. S., Howell, A. R., Cook, M. E., Adams, E. J., Hildebrand, W. H. and Gumperz, J. E.,** Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes. *PLoS Biol* 2009. **7**: e1000228.
- 30 **Lopez-Sagaseta, J., Sibener, L. V., Kung, J. E., Gumperz, J. and Adams, E. J.,** Lysophospholipid presentation by CD1d and recognition by a human Natural Killer T-cell receptor. *EMBO J* 2012. **31**: 2047-2059.
- 31 **Yu, E. D., Girardi, E., Wang, J., Mac, T. T., Yu, K. O., Van Calenbergh, S., Porcelli, S. A. and Zajonc, D. M.,** Structural basis for the recognition of C20:2-alphaGalCer by the invariant natural killer T cell receptor-like antibody L363. *J Biol Chem* 2012. **287**: 1269-1278.

- 32 **Birkinshaw, R. W., Pellicci, D. G., Cheng, T. Y., Keller, A. N., Sandoval-Romero, M., Gras, S., de Jong, A., Uldrich, A. P., Moody, D. B., Godfrey, D. I. and Rossjohn, J.,** alphabeta T cell antigen receptor recognition of CD1a presenting self lipid ligands. *Nat Immunol* 2015. **16:** 258-266.
- 33 **Wun, K. S., Reijneveld, J. F., Cheng, T. Y., Ladell, K., Uldrich, A. P., Le Nours, J., Miners, K. L., McLaren, J. E., Grant, E. J., Haigh, O. L., Watkins, T. S., Suliman, S., Iwany, S., Jimenez, J., Calderon, R., Tamara, K. L., Leon, S. R., Murray, M. B., Mayfield, J. A., Altman, J. D., Purcell, A. W., Miles, J. J., Godfrey, D. I., Gras, S., Price, D. A., Van Rhijn, I., Moody, D. B. and Rossjohn, J.,** T cell autoreactivity directed toward CD1c itself rather than toward carried self lipids. *Nat Immunol* 2018. **19:** 397-406.
- 34 **Cotton, R. N., Shahine, A., Rossjohn, J. and Moody, D. B.,** Lipids hide or step aside for CD1-autoreactive T cell receptors. *Curr Opin Immunol* 2018. **52:** 93-99.
- 35 **Chu, D. H., van Oers, N. S., Malissen, M., Harris, J., Elder, M. and Weiss, A.,** Pre-T cell receptor signals are responsible for the down-regulation of Syk protein tyrosine kinase expression. *J Immunol* 1999. **163:** 2610-2620.
- 36 **Weiss, A. and Littman, D. R.,** Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 1994. **76:** 263-274.
- 37 **Chu, D. H., Morita, C. T. and Weiss, A.,** The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol Rev* 1998. **165:** 167-180.
- 38 **Kim, H. Y., Kim, S. and Chung, D. H.,** FcgammaRIII engagement provides activating signals to NKT cells in antibody-induced joint inflammation. *J Clin Invest* 2006. **116:** 2484-2492.
- 39 **Nemeth, T., Futosi, K., Szilveszter, K., Viliinovszki, O., Kiss-Papai, L. and Mocsai, A.,** Lineage-Specific Analysis of Syk Function in Autoantibody-Induced Arthritis. *Front Immunol* 2018. **9:** 555.
- 40 **Samavedam, U. K., Mitschker, N., Kasprick, A., Bieber, K., Schmidt, E., Laskay, T., Recke, A., Goletz, S., Vidarsson, G., Schulze, F. S., Armbrust, M., Schulze Dieckhoff, K., Pas, H. H., Jonkman, M. F., Kalies, K., Zillikens, D., Gupta, Y., Ibrahim, S. M. and Ludwig, R. J.,** Whole-Genome Expression Profiling in Skin Reveals SYK As a Key Regulator of Inflammation in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. *Front Immunol* 2018. **9:** 249.

- 41 **Enyedy, E. J., Nambiar, M. P., Liossis, S. N., Dennis, G., Kammer, G. M. and Tsokos, G. C.,** Fc epsilon receptor type I gamma chain replaces the deficient T cell receptor zeta chain in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001. **44:** 1114-1121.
- 42 **Gui, M., Li, J., Wen, L. J., Hardy, R. R. and Hayakawa, K.,** TCR beta chain influences but does not solely control autoreactivity of V alpha 14J281T cells. *J Immunol* 2001. **167:** 6239-6246.
- 43 **Moon, J. J., Chu, H. H., Pepper, M., McSorley, S. J., Jameson, S. C., Kedi, R. M. and Jenkins, M. K.,** Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* 2007. **27:** 203-213.

## Figures Legends

**Figure 1.** Generation of iNKT cell lines and use of soluble fluorescent unloaded-CD1d tetramers to identify self-reactive iNKT cells. (A) Gating strategy for flow cell sorting of iNKT cells. After magnetic enrichment with  $\alpha$ GalCer-CD1d tetramers from human PBMCs, enriched cells were stained with anti-CD14, -CD19, -CD3, -V $\alpha$ 24 antibodies and Zombie NIR Dye. Lymphocytes were identified by their scatter properties (FSC-A x SSC-A plot) and iNKT lymphocytes as living CD3<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>V $\alpha$ 24<sup>+</sup> $\alpha$ GalCer-CD1d<sup>+</sup> cells were sorted by FACSARIA III flow cell sorter. Representative images from one donor out of 7 are shown (number of replicates per donor=1). The same gating strategy was used for the 6 other donors. (B) After *in vitro* expansion under non-specific polyclonal conditions, iNKT cell lines were stained with fluorescent unloaded-CD1d tetramers. A representative image from one iNKT cell line out of 7 is shown (number of replicates per iNKT cell line=1). In this example, 1.6% of iNKT cells were unloaded-CD1d<sup>+</sup>. The mean  $\pm$  SEM obtained with the 7 total iNKT cell lines was about **1.8%  $\pm$  0.8**. (C) Unloaded-CD1d<sup>-</sup> (Self Negative, SN) and unloaded-CD1d<sup>+</sup> (Self Positive, SP) cells were sorted by FACS ARIA III flow cell sorter and expanded. The iNKT phenotype and the purity of sorted cell lines were assessed by staining with anti-CD3, -V $\alpha$ 24, -V $\beta$ 11 antibodies and with  $\alpha$ GalCer and unloaded-CD1d tetramers. Representative images from SN and SP cell lines obtained from Donor 2 (a donor out of 7) are shown and are from a single experiment representative of 3 independent

experiments (number of replicates per experiment=1). The MFI for tetramer stainings are indicated in the dot plots. (D-E) Functional assays were performed to determine the self-reactivity potential of SN (white bars) and SP (black bars) iNKT cell lines generated from the 7 donors. Target cells were previously loaded with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of  $\alpha\text{GalCer}$  or not (DMSO condition). (D) After 4h-coculture with human  $\text{CD1d}^+$  ( $\text{hCD1d}^+$ ) target cells,  $\text{TNF}\alpha$  production by iNKT cells was evaluated by intracellular staining and data were collected by FACSCANTO II cytometer. Data are shown as means + SEM of percentages of  $\text{TNF}\alpha^+$  cells within  $\text{CD3}^+$  cells and are obtained from 3 independent experiments for each of the 14 iNKT cell lines (number of replicates per experiment=1). (E) After 4h-coculture between  $^{51}\text{Cr}$ -stained  $\text{hCD1d}^+$  or  $\text{hCD1d}^-$  target cells and SN or SP iNKT cell lines from Donor#1 and Donor#2, cytolytic activity was evaluated by  $^{51}\text{Cr}$  release. Data are shown as means + SEM of percentages of cytotoxicity and are obtained from 3 independent experiments (number of replicates per experiment=3).

**Figure 2.** Binding capacity of OCH-CD1d tetramers by self-reactive cell lines and correlation with self-reactivity. (A) The two self-reactive cell lines (Donor#1 SP and Donor#2 SN) were stained with soluble fluorescent OCH-CD1d tetramers. The data were collected by FACSCANTO II cytometer and show that >94% of cells were OCH-CD1d<sup>+</sup> in both cell lines. Representative images from one independent experiment out of 3 are shown (number of replicates per experiment=1). (B) Correlation was analyzed between self-reactivity of the 14 iNKT cell lines (SN and SP cell lines from 7 donors) and their OCH-CD1d binding capacity. The self-reactivity potential was evaluated by the percentage of  $\text{TNF}\alpha^+$  cells within  $\text{CD3}^+$  cells obtained in cytokine production assays against unloaded target cells. The OCH-CD1d tetramer binding capacity corresponds to the percentage of OCH-CD1d<sup>+</sup> cells obtained after tetramer staining of the iNKT cell line. Data are shown as percentages of OCH-CD1d<sup>+</sup> cells from a single experiment representative of 3 independent experiments (number of replicates per experiment=1) and means  $\pm$  SEM of percentages of self-reactivity obtained from 2 independent experiments (number of replicates per experiment=1).

**Figure 3.** Use of soluble fluorescent OCH-CD1d tetramers to identify self-reactive iNKT cells. (A) After expansion under non-specific polyclonal conditions, newly generated iNKT cell lines (see Figure 1 and Material & Methods) were stained with fluorescent OCH-CD1d tetramers. A

representative image of an iNKT cell line out of 4 is shown (number of replicates per iNKT cell line=1). In this example, 46.6% of iNKT cells were OCH-CD1d<sup>+</sup>. The range obtained with the 4 total iNKT cell lines was about 23.1-83.4%, n=4. (B) OCH-CD1d negative and OCH-CD1d positive cells were sorted by FACS ARIA III flow cell sorter and expanded. The iNKT phenotype and the purity of sorted cell lines were assessed by staining with anti-CD3, -V $\alpha$ 24, -V $\beta$ 11 antibodies and  $\alpha$ GalCer- and OCH-CD1d tetramers. Representative images of an OCH-CD1d negative and an OCH-CD1d positive cell lines out of the 8 obtained are shown and are from a single experiment representative of 3 independent experiments (number of replicates per experiment=1). The MFI for tetramer stainings are indicated in the dots plots. (C-D) Functional assays were performed to determine the self-reactivity potential of OCH-CD1d<sup>+</sup> (black bars) and OCH-CD1d<sup>-</sup> (white bars) iNKT cell lines. Human CD1d<sup>+</sup> target cells were loaded with 1  $\mu$ g/mL of  $\alpha$ GalCer or not (DMSO condition). After 4h-coculture with target cells, TNF $\alpha$  production by iNKT cells was evaluated by intracellular staining and data were collected by FACSCANTO II cytometer. (C) Representative images of an OCH-CD1d negative and an OCH-CD1d positive cell lines derived from Donor 4 (a donor out of 4) are shown and are from a single experiment representative of 2 independent experiments (number of replicates per experiment=1). (D) Data are shown as means + SEM of percentages of TNF $\alpha$ <sup>+</sup> cells within CD3<sup>+</sup> cells for each of the 8 iNKT cell lines and are obtained from 2 independent experiments (number of replicates per experiment=1).

**Figure 4.** Activation modalities of self-reactive iNKT cell lines. (A) Functional assays were performed to determine the implication of TCR/CD1d interaction in self-reactivity. After 4h-coculture with unloaded hCD1d<sup>+</sup> or hCD1d<sup>-</sup> target cells in presence of an anti-human CD1d blocking mAb or an isotype control Ab, TNF $\alpha$  production by SN or SP iNKT cell lines from Donor#1 and Donor#2 was evaluated by intracellular staining and data were collected by FACSCANTO II cytometer. Data are shown as means + SEM of percentages of TNF $\alpha$ <sup>+</sup> cells within CD3<sup>+</sup> cells for each of the 4 iNKT cell lines and are obtained from 3 independent experiments (number of replicates per experiment=1). (B) Functional assays were performed to analyze the type of lipid recognized. Mouse CD1d<sup>+</sup> target cells were loaded with different concentrations of  $\alpha$ GalCer (range:0-1  $\mu$ g/mL). After 4h-coculture with target cells in the presence of an anti- $\alpha$ GalCer-mCD1d blocking mAb (clone L363, black symbols) or an isotype control mAb (white symbols), degranulation (CD107 staining) by self-reactive Donor#1 SP and Donor#2 SN iNKT cell

lines was evaluated by extracellular staining and data were collected by FACSCANTO II cytometer. Data are shown as means of percentages of CD107<sup>+</sup> cells within CD3<sup>+</sup> cells for each of the 2 iNKT cell lines and for each  $\alpha$ GalCer concentration and are obtained from 3 independent experiments (number of replicates per experiment=1). Data from Donor#1 SP iNKT cell line are represented with circles and data from Donor#2 SN with squares.

**Figure 5.** Reactivity of cell clones derived from a self-reactivity iNKT cell line. Functional assays were assessed to determine the self-reactivity potential of 12 clones generated from Donor#2 SN iNKT cell line. Human CD1d<sup>+</sup> target cells were loaded with 1  $\mu$ g/mL of  $\alpha$ GalCer or not (DMSO condition). After 4h-coculture with target cells, degranulation (CD107 staining) by iNKT cells was evaluated by extracellular staining and data were collected by FACSCANTO II cytometer. (A) Representative images of C20 and C12 clones (two clones out of 12) against  $\alpha$ GalCer or unloaded target cells are shown and are from a single experiment representative of 3 independent experiments (number of replicates per experiment=1). (B) Percentages of CD107<sup>+</sup> cells obtained after stimulation by unloaded hCD1d<sup>+</sup> cells are normalized with respect to that observed after stimulation by  $\alpha$ GalCer-loaded hCD1d<sup>+</sup> cells. Data are shown as means + SEM of percentages of relative CD107<sup>+</sup> cells within CD3<sup>+</sup> cells for each of the 12 clones and the parental Donor#2 SN iNKT cell line and are obtained from 3 independent experiments (number of replicates per experiment=1).

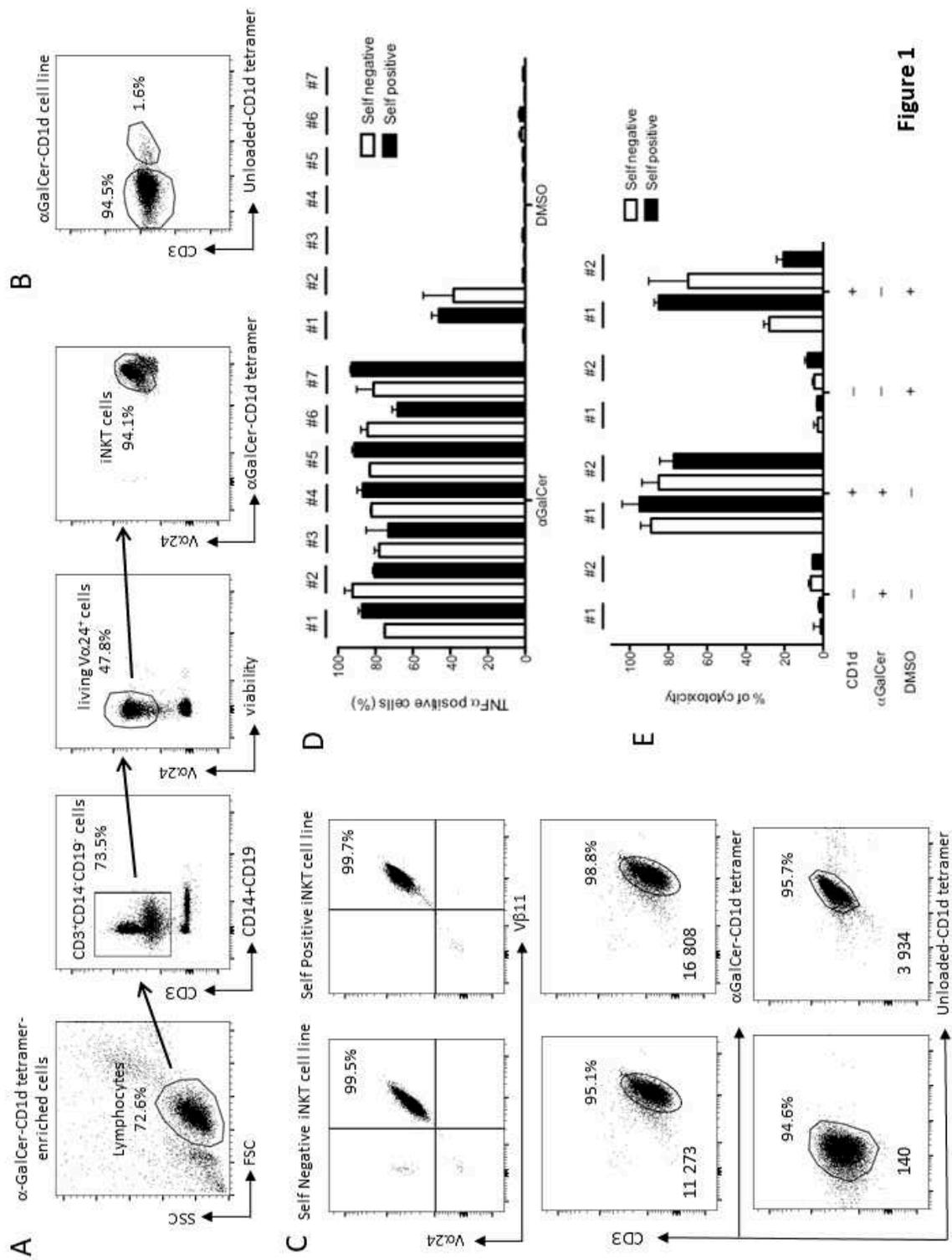
**Figure 6.** Transcriptome analysis of 6 clones derived from the self-reactive iNKT cell line Donor#2 SN. RNA sequencing was performed with a Next-Seq HighOutput 75 cycles chip in Single-end. Two groups of three clones were compared: the least self-reactive clones (C13, C4, C6) and the most self-reactive ones (C12, C1, C5) by negative binomial tests. Data are represented in a VolcanoPlot. Genes indicated by a green circle correspond to differentially expressed genes by one of the two groups compared to the other group (Fold Change >1 and P-value <0.05). Data are obtained from one sample for each of the 6 clones.

**Figure 7.** Analysis of the role of SYK Tyrosine kinase in self-reactivity. (A) The expression of SYK protein was evaluated by intracellular staining in clones derived from the self-reactive iNKT cell line Donor#2 SN. Cells were stained with an isotype control antibody (grey histograms) or an

anti-SYK antibody (white histograms) and data were collected by FACSCANTO II cytometer. Data are obtained for each of the 7 clones from a single experiment representative of 3 independent experiments (number of replicates per experiment=1). (B) Correlation between the SYK protein expression and the self-reactivity potential of iNKT clones. Each point corresponds to the percentage of SYK positive cells plotted against the means  $\pm$  SEM of percentage of activated (CD107<sup>+</sup>) cells within CD3<sup>+</sup> cells assessed with unloaded hCD1d<sup>+</sup> target cells in a given clone. The *r* and *p* values were calculated using a Spearman's test (n=7). Data are obtained for each of the 7 clones from a single experiment representative of 3 independent experiments (number of replicates per experiment=1) of SYK expression and from 3 independent experiments of self-reactivity assay (number of replicates per experiment=1). (C) Functional assays were assessed to determine the EC50 of C12, C19 and C6 clones. Human CD1d<sup>+</sup> target cells were loaded with different concentrations of  $\alpha$ GalCer (range: 0-100  $\mu$ g/mL). After 4h-coculture with target cells, TNF $\alpha$  production by iNKT cells was evaluated by intracellular staining and data were collected by FACSCANTO II cytometer. Data are shown as means  $\pm$  SEM of percentages of TNF $\alpha$ <sup>+</sup> cells within CD3<sup>+</sup> cells depending on the logarithm of  $\alpha$ GalCer concentration for each of the 3 clones and are obtained from 3 independent experiments (number of replicates per experiment=1). (D) EC50 values were calculated after normalization of activated (TNF $\alpha$ <sup>+</sup> cells within CD3<sup>+</sup> cells) iNKT cells and compared by a Friedman's test with a Dunn's multiple comparison test. Data are shown as means  $\pm$  SEM of TNF $\alpha$  EC50 for each of the 3 clones and obtained from 3 independent experiments (number of replicates per experiment=1).

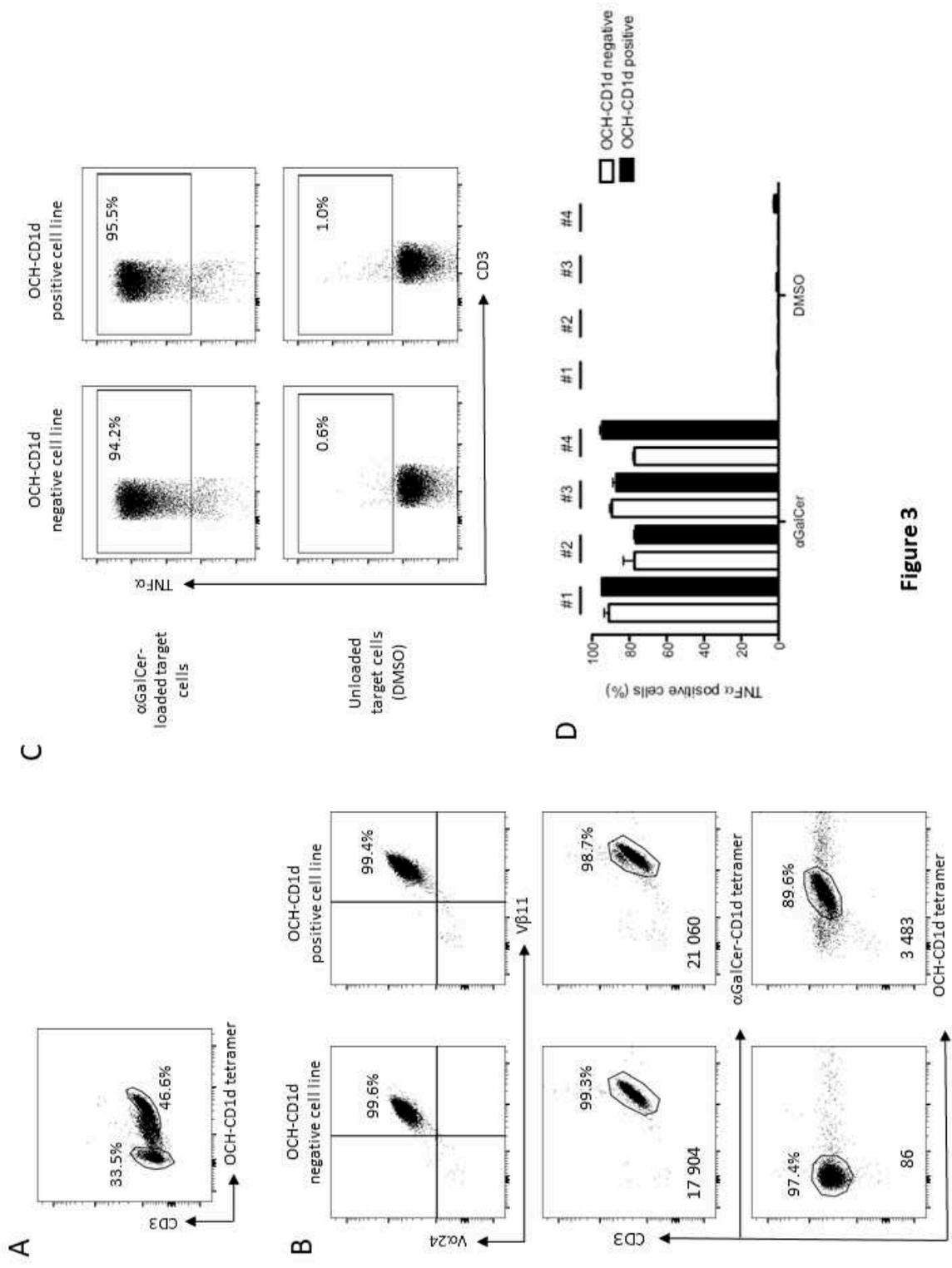
**Table 1. TCR sequence analysis of two self-reactive iNKT cell lines (Donor#1 SP and Donor#2 SN) and two non self-reactive iNKT cell lines (Donor#1 SN and Donor#2 SP).** TCR sequencing was performed by paired-end MiSeq technology. Results present CDR3 $\beta$  nucleotide sequences expressed at more than 5% in the respective iNKT cell lines and the corresponding percentages of reads.

iNKT cell line	CDR3 $\beta$ nucleotide sequence	Percentages of reads
Donor#1 SN	TGTGCCAGCAGTGAAGGTCCATCGGGAGTCCATGGCTACACCTTC	27.2
	TGTGCCAGCGGCCAGGGGGCAAGCGGGGGATACGAGCAGTACTTC	16.5
	TGTGCCAGCAGTGACGACAGGGGGCGAAGGGAGACCCAGTACTTC	10.7
	TGTGCCAGCGGAGAGGGGAACATTCACTACTTC	10.3
	TGTGCCAGCAGTGAACGGAACACTACGAGCAGTACTTC	5.5
	Others (n=105)	29.8
Donor#1 SP	TGTGCCAGCAGCTCTCTTTGGCCGAGCTCTACAATGAGCAGTTCTTC	93.0
	Others (n=12)	7.0
Donor#2 SN	TGTGCCAGCACCCCCAGAACGGAGGGGAGTGAAAACTGTTTTTT	82.7
	Others (n=23)	17.3
Donor#2 SP	TGTGCCAGCAGGGACAGGGGCCCTAATGAAAACTGTTTTTT	82.2
	TGTGCCAGCAGTGAACGAGACAGACCGAACACTGAAGCTTTCTTT	8.3
	Others (n=10)	9.5



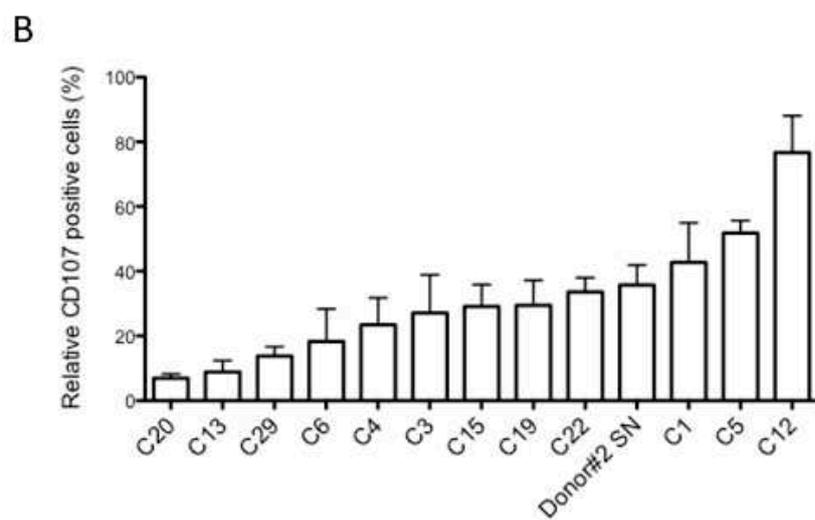
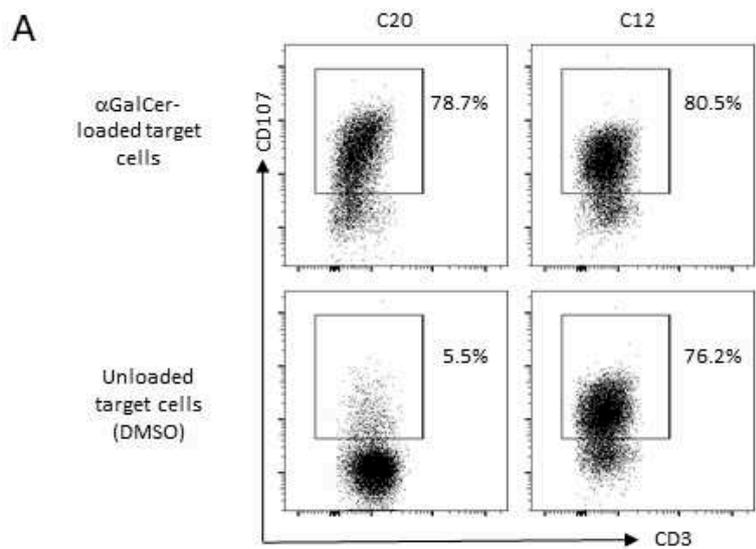
**Figure 1**



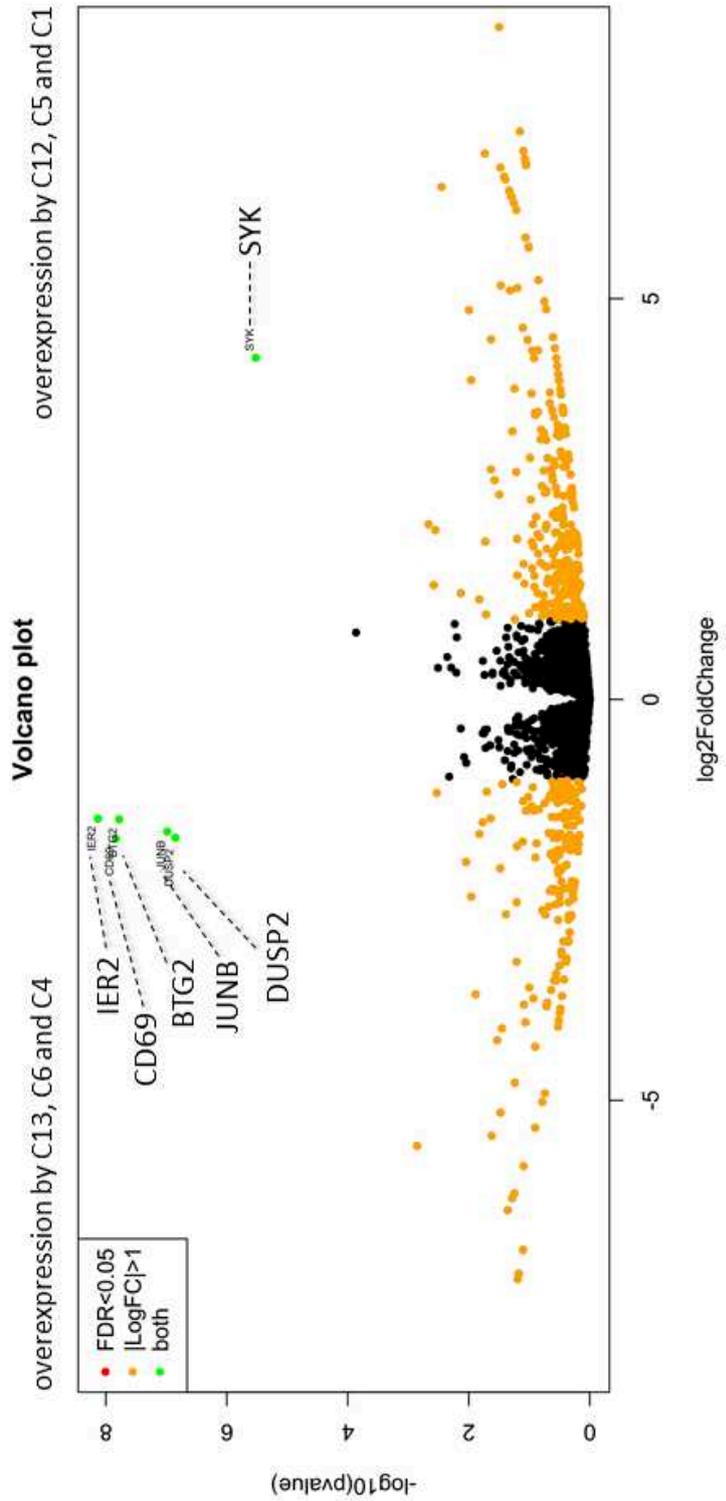


**Figure 3**

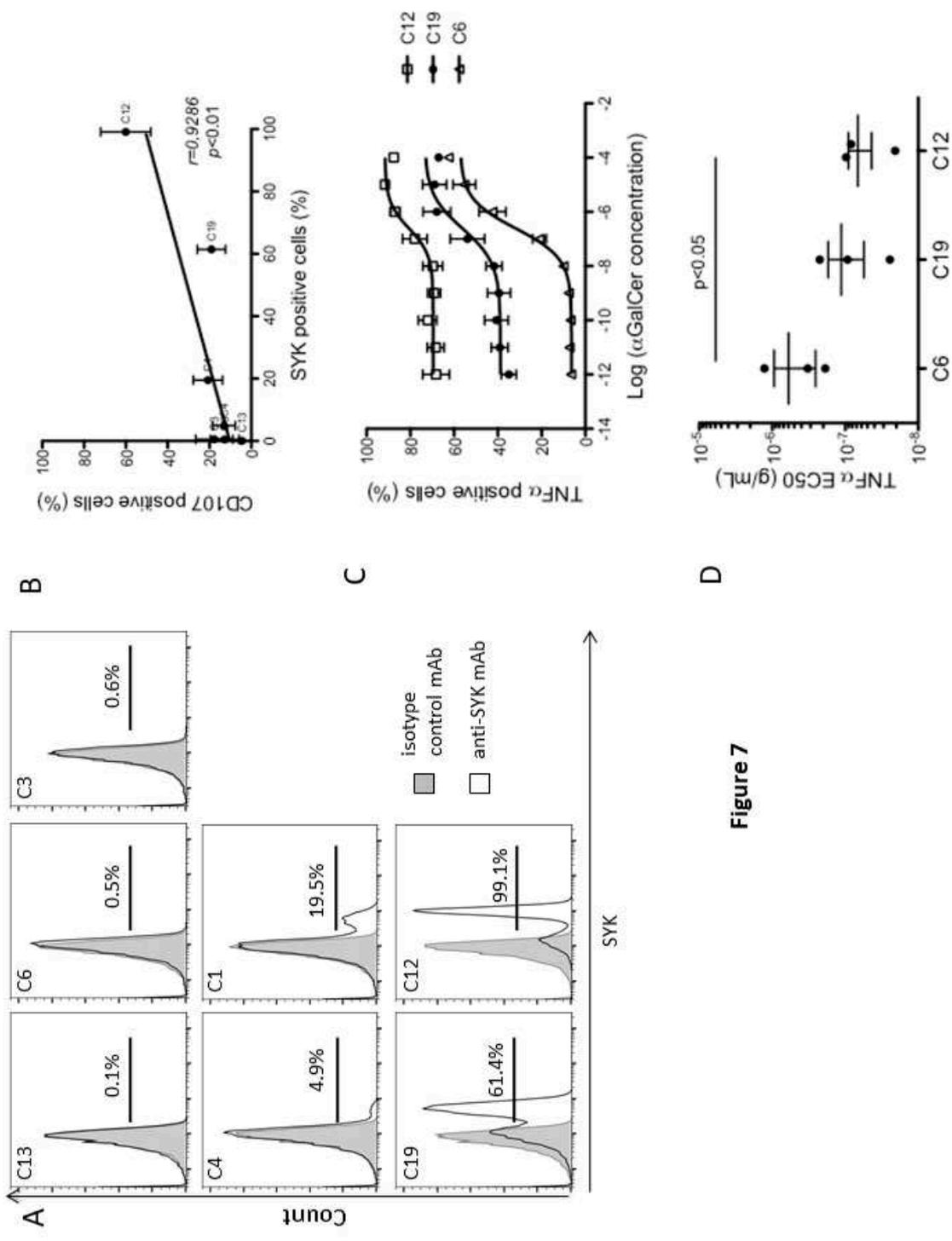




**Figure 5**



**Figure 6**



**Figure 7**

## **Deuxième partie : Le développement des cellules iNKT humaines**

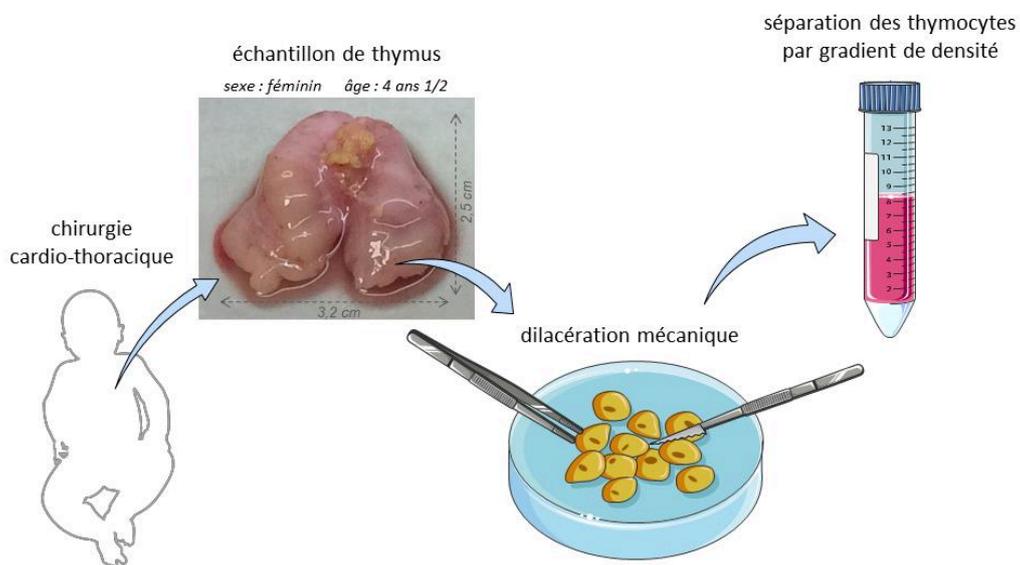
Comme chez la souris, les cellules iNKT humaines se développent dans le thymus. Néanmoins, l'étude de la différenciation de ces cellules chez l'Homme est très complexe d'une part du fait de l'accès restreint aux échantillons thymiques humains, et d'autre part du fait de la rareté de ces cellules. Très peu de données sont donc disponibles à ce sujet, et à notre connaissance, rien n'est encore déterminé par exemple concernant la progression du phénotype des thymocytes iNKT humains, ni concernant la différenciation terminale en sous-populations distinctes. Grâce à une collaboration avec l'équipe du professeur en chirurgie cardiaque pédiatrique Olivier Baron, nous avons pu obtenir des échantillons de thymus d'enfants opérés pour une défaillance cardiaque. Pendant l'enfance, le thymus étant volumineux, il est gênant pour accéder au cœur, c'est pourquoi il est retiré afin de réaliser l'opération. Ayant accès à ces échantillons rares, nous avons donc cherché à décrire le processus de développement des cellules iNKT au sein de cet organe. Avec l'utilisation de tétramères révélant les cellules iNKT autoréactives, nous pensions pouvoir observer des phénomènes de sélection positive et/ou négative. Malheureusement, les tétramères que nous avons testés dans la première partie de mon projet de thèse sur l'autoréactivité ne se sont pas révélés être utilisables à ces fins. Néanmoins grâce aux tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer, nous avons pu identifier des thymocytes iNKT humains et étudier la fréquence de la population totale et des différents compartiments définis par les marqueurs CD4 et CD8. Nous avons également étudié l'expression de marqueurs membranaires révélant la progression de ces cellules, ainsi que des facteurs de transcription définissant les sous-populations de cellules iNKT. Pour finir, nous avons trié des thymocytes iNKT et après stimulation et mise en culture, nous avons testé leur potentiel autoréactif et déterminé leur expression en protéine SYK.

## Matériel et Méthodes

### Thymus et protocole de dilacération

Des thymus d'enfants, âgés de quelques jours à 6 ans, séronégatifs pour le HCMV, HCV et HIV, nous ont été fournis par le bloc de chirurgie cardiaque pédiatrique du CHU de Nantes (Pr Olivier Baron). Cette étude a été approuvée par les comités éthiques, local (Comité de Protection des Personnes Ouest IV 42/10), et national (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche DC-2010-1227).

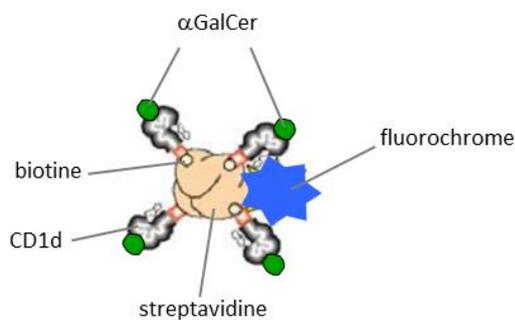
Les prélèvements ont été récupérés le jour même de l'opération et ont été conservés à 4°C dans du milieu RPMI 1640 (Gibco) supplémenté à 8% en SVF (Corning), 2 mM en glutamine (GlutaMAX, Gibco) et 0,5% en antibiotiques (pénicilline et streptomycine, Gibco) jusqu'à dilacération (maximum 12h). La dilacération s'est effectuée de manière mécanique à l'aide d'un scalpel dans du milieu RPMI seul. Les cellules récoltées ont été filtrées à 70 µm à l'aide d'un tamis cellulaire (Falcon), puis les thymocytes ont été séparés par gradient de densité (LMS, Eurobio) (Figure 17). Ces thymocytes ont ensuite pu être énumérés sur cellule de Malassez (NanoEnTek) et conservés en milieu RPMI supplémenté en SVF, glutamine et antibiotiques à 4°C avant d'être manipulés dans la journée.



**Figure 17** Schéma explicatif du protocole de dilacération mécanique des échantillons de thymus humains avec photo d'un échantillon avant dilacération. Les échantillons de thymus proviennent d'enfants âgés de quelques jours à 6 ans et qui doivent subir une chirurgie cardiaque. Ils sont récupérés le jour même de l'opération et conservés à 4°C dans du milieu RPMI supplémenté en SVF, antibiotiques et glutamine. La dilacération s'effectue sous maximum 12 heures, de manière mécanique à l'aide d'un scalpel dans du milieu RPMI seul. Les cellules récoltées sont ensuite filtrées à 70 µm avant d'être séparées par gradient de densité.

## Tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer et MR1-5-OP-RU

Les tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer ont été générés à partir de monomères biotinylés de molécule CD1d humaine chargé avec de l' $\alpha$ GalCer. Ces monomères ont été produits par la plateforme Tetramere Core Facility du NIH, et gracieusement fournis à notre équipe. La tétramérisation a été effectuée à l'aide de streptavidine, comprenant quatre sites de fixation pour la biotine, et couplée au fluorochrome PE (PhycoErythrin) ou APC (AlloPhycoCyanin) (Prozyme) dans un ratio molaire 4:1 (Figure 18). Ces tétramères ont été utilisés à une concentration finale de 3,75  $\mu$ g/mL.



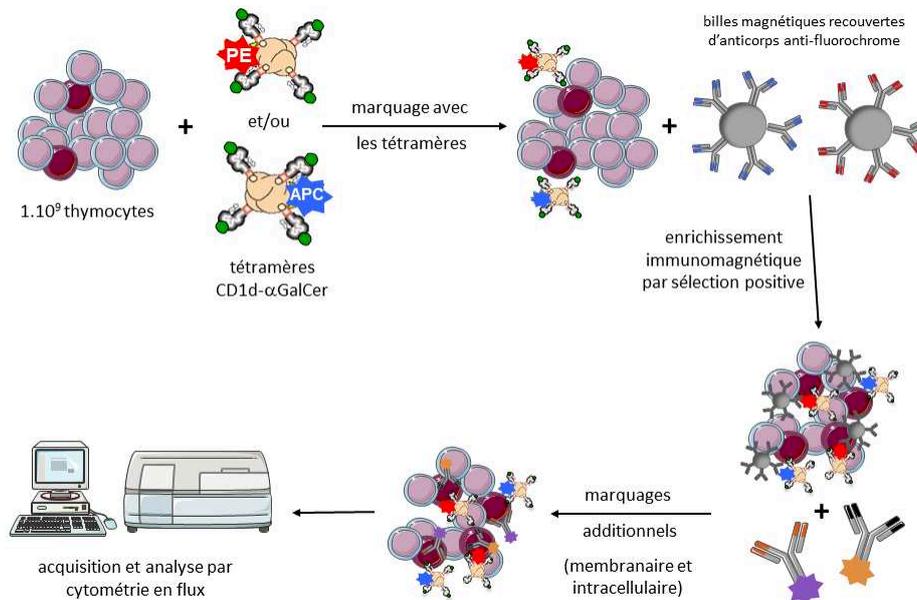
**Figure 18** Schéma représentatif d'un tétramère CD1d- $\alpha$ GalCer. Le tétramère CD1d- $\alpha$ GalCer est composé de quatre monomères biotinylés de molécules CD1d humaine (gris) chargé avec de l' $\alpha$ GalCer (vert). Ces monomères sont tétramérisés à l'aide de streptavidine (orange), qui comprend quatre sites de fixation pour la biotine, et qui est couplé à un fluorochrome (bleu).

Les tétramères MR1-5-OP-RU ont été générés de la même manière que les tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer à partir de monomères de MR1 humain chargés avec du 5-OP-RU (TCF, NIH), et utilisés à une concentration finale de 5  $\mu$ g/mL.

## Enrichissement immunomagnétique des thymocytes iNKT ou MAIT, et de cellules iNKT à partir de sang périphérique

Les cellules iNKT et MAIT étant rares, des enrichissements immunomagnétiques à l'aide des tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer et MR1-5-OP-RU respectivement ont été réalisés pour étudier ces deux types cellulaires. Chaque enrichissement immunomagnétique a été réalisé à partir de  $1.10^9$  thymocytes totaux récoltés à l'issue du gradient de densité, ou  $250.10^6$  PBMC récoltés à partir de sang périphérique. Les cellules ont été marquées pendant 30 minutes sur glace avec le tétramère couplé au fluorochrome PE ou APC, ou les deux dans le cas d'un double enrichissement, dans 300  $\mu$ L de PBS supplémenté à 2% en SVF. Après lavage, les cellules ont ensuite été incubées pendant 20 minutes sur glace avec 50  $\mu$ L de billes magnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques des fluorochromes (PE

et/ou APC) (Miltenyi) dans du PBS supplémenté à 0,02% en EDTA et 0,5% en BSA. Après lavage, les cellules sont passées sur des colonnes de séparation LS surmontées d'un filtre de 30  $\mu\text{m}$  et posées sur un aimant (Miltenyi). Seules les cellules marquées par les tétramères et ayant fixé des billes magnétiques restent dans la colonne sous l'effet de l'aimant. Après plusieurs lavages, les cellules sont éluées par action mécanique à l'aide d'un piston dans du PBS supplémenté en EDTA et BSA. La fraction éluée est ainsi enrichie en cellules d'intérêt reconnaissant les tétramères, et peut subir des marquages additionnels dans le but d'être analysée par cytométrie en flux (Figure 19).



**Figure 19** Schéma explicatif du protocole d'enrichissement immunomagnétique en cellules iNKT avec des tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer à partir d'échantillons de thymus humains. Suite au gradient de densité,  $1.10^9$  thymocytes récoltés sont ensuite utilisés pour réaliser un enrichissement immunomagnétique. Les cellules sont d'abord marquées par le tétramère CD1d- $\alpha$ GalCer (deux tétramères dans le cas d'un double enrichissement), puis incubées avec des billes magnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques du fluorochrome associé au tétramère. L'échantillon est ensuite enrichi par sélection positive sur des colonnes de séparation aimantées ne retenant que la fraction marquée par les tétramères. Après élution, les cellules sont ensuite marquées avec des anticorps ciblant des antigènes membranaires ou intracellulaires afin d'être analysées par cytométrie en flux.

### Marquages membranaires et intracellulaires

Différents marquages ont été réalisés sur des échantillons de thymocytes et de PBMC enrichis ou non, ainsi que sur des lignées cellulaires d'origine thymique. Les marquages membranaires ont été réalisés pendant 20 minutes à 4°C ou sur glace dans du PBS supplémenté en SVF. Les anticorps utilisés ciblaient des segments de TCR et des antigènes

membranaires, et sont listés dans le tableau II. Lorsque des tétramères étaient utilisés, le temps de marquage était augmenté à 30 minutes. Un marqueur de viabilité est également ajouté afin d'exclure les cellules mortes (Zombie NIR Dye, BioLegend). Les marquages intracellulaires nécessitent en amont une fixation et perméabilisation des cellules pendant 30 minutes à température ambiante dans du tampon prévu à cet effet et selon les recommandations du fournisseur (Foxp3 Staining Buffer Set, eBioscience). Puis le marquage est effectué dans du tampon de perméabilisation à 4°C ou sur glace pendant 30 minutes. Les anticorps utilisés ciblaient des facteurs de transcription, une molécule de signalisation, et une cytokine TNF $\alpha$ , et sont listés dans le tableau II.

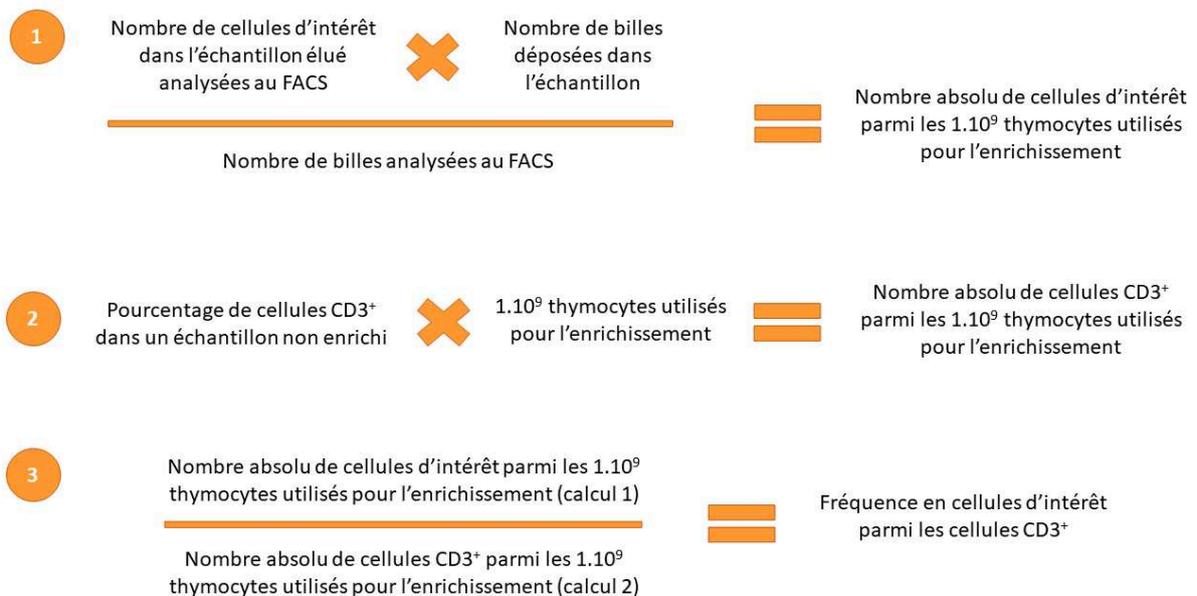
**Tableau II** Liste des différents anticorps utilisés lors des marquages membranaires et intracellulaires, avec le type d'antigène ciblé, le fournisseur et le clone.

Anticorps anti-	Type d'antigène	Fournisseur	Clone
V $\alpha$ 7.2	segment du TCR	Beckman Coulter	3C10
V $\alpha$ 24	segment du TCR	Beckman Coulter	C15
V $\beta$ 11	segment du TCR	Beckman Coulter	C21
CD1a	membranaire	BD Biosciences	HI149
CD1d	membranaire	eBioscience	51.1
CD3	membranaire	BD Biosciences	UCHT1
CD4	membranaire	BD Biosciences	RPA-T4
CD5	membranaire	BD Biosciences	UCHT2
CD8	membranaire	Beckman Coulter	SFC121Thy2D3
CD44	membranaire	BD Biosciences	G44-26
CD69	membranaire	BD Biosciences	FN50
CD107a	membranaire	BD Biosciences	H4A3
CD107b	membranaire	BD Biosciences	H4B4
PLZF	facteur de transcription	BD Biosciences	R17-809
T-bet	facteur de transcription	BioLegend	4B10
GATA-3	facteur de transcription	BD Biosciences	L50-823
ROR $\gamma$ t	facteur de transcription	BD Biosciences	Q21-559
Bcl-6	facteur de transcription	BD Biosciences	K112-91
SYK	molécule de signalisation	BD Biosciences	4D10
TNF $\alpha$	cytokine	BioLegend	MAb11

### Calcul des fréquences en cellules enrichies

Comme son nom l'indique, l'enrichissement immunomagnétique, nécessaire pour étudier des populations rares, enrichit les échantillons élués en cellules d'intérêt et engendre ainsi un biais dans les fréquences observées. Il ne permet donc pas d'analyser les fréquences

des cellules d'intérêt de façon directe. De plus, la cytométrie en flux engendre une perte de cellules et ne permet donc pas d'analyser la totalité des cellules de l'échantillon récolté suite à l'élution. L'ajout d'un nombre connu de billes de numération (BioLegend) permet néanmoins de déterminer le nombre absolu de cellules d'intérêt dans l'échantillon enrichi. Ceci est réalisé en rapportant le nombre de cellules d'intérêt analysées (détectées par cytométrie en flux) au nombre de billes analysées par rapport au nombre de billes déposées dans l'échantillon (calcul 1 ci-dessous). Les fréquences en cellules d'intérêt sont ensuite déterminées en divisant leur nombre absolu dans la fraction enrichie, par le nombre absolu d'une population cellulaire parente de référence (calcul 3 ci-dessous), par exemple la population CD3<sup>+</sup>, déterminée parallèlement avec un échantillon non enrichi et contenant la totalité de la population d'intérêt (calcul 2 ci-dessous).



### Tri cellulaire des thymocytes iNKT, amplification et génération de lignées iNKT d'origine thymique

Suite à l'enrichissement immunomagnétique avec les tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer, la fraction éluée est marquée avec des anticorps ciblant le segment V $\alpha$ 24 et le CD3. L'échantillon est ensuite passé au cytomètre trieur (Aria III, BD Biosciences) afin de récolter les cellules CD3<sup>+</sup> V $\alpha$ 24<sup>+</sup> CD1d- $\alpha$ GalCer<sup>+</sup> dans du milieu RPMI, supplémenté à 8% en sérum humain, 300 U/mL d'IL-2 humaine recombinante (Novartis), glutamine et

antibiotiques. Les cellules récoltées sont ensuite amplifiées de manière non spécifique avec un mélange de cellules nourricières irradiées à 35 Gy (lymphocytes B transformés par le virus de l'EBV et des PBMC allogéniques) dans un milieu contenant 1 µg/mL de PHA (Sigma Aldrich) et de l'IL-2. Les lignées iNKT d'origine thymiques ainsi générées ont été utilisées dans des tests fonctionnels après trois semaines de culture.

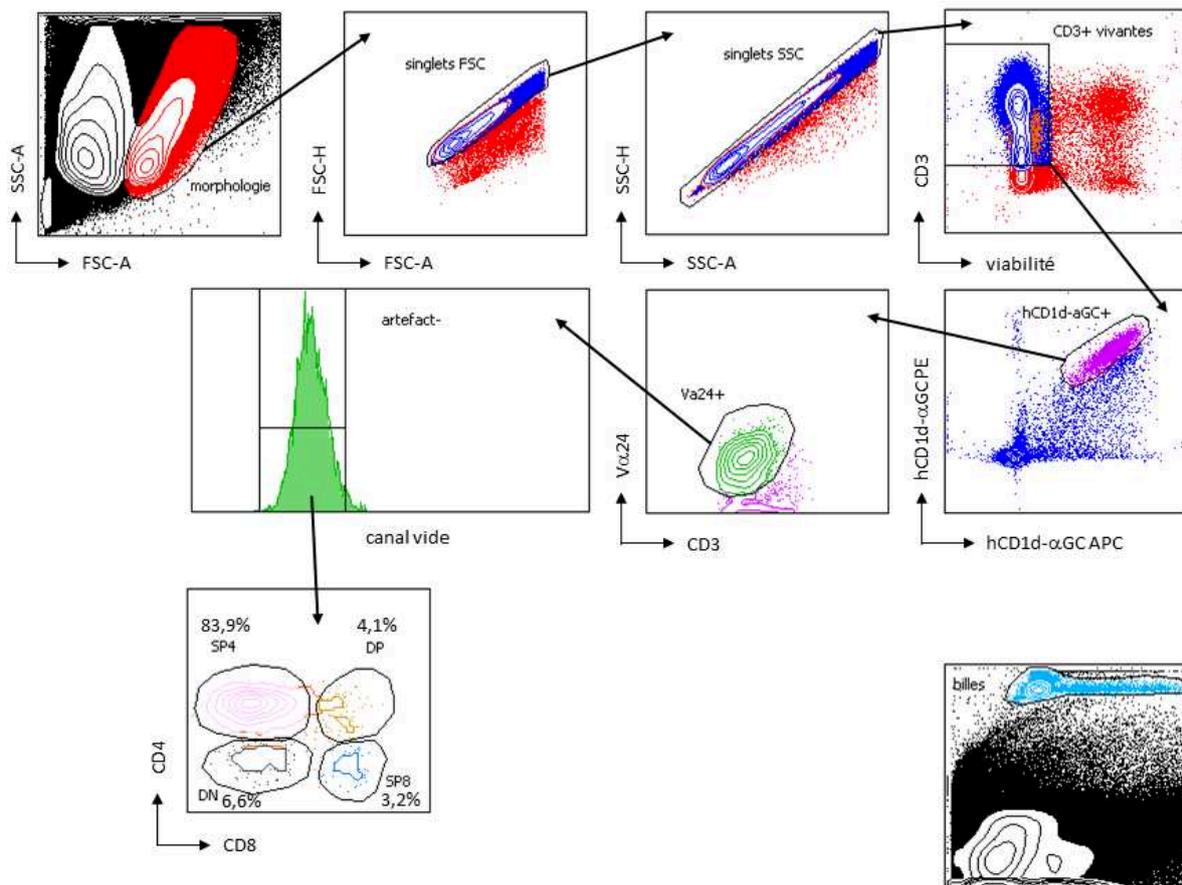
### **Tests fonctionnels de dégranulation et de production de cytokines**

Pour tester la réactivité des lignées thymiques iNKT, elles sont mises en contact avec des cellules cibles Hela transfectées pour exprimer la molécule CD1d. Les cellules cibles ont été préalablement chargées sur la nuit avec de l' $\alpha$ GalCer à 1 µg/mL (Sigma Aldrich) ou non, dans ce dernier cas elles présentent alors des glycolipides endogènes. Après lavage des cellules cibles, les cellules iNKT sont incubées avec les cibles à un ratio 1:1 pendant 4 heures à 37°C dans du milieu RPMI supplémenté en SVF et antibiotiques, et contenant des anticorps fluorescents ciblant le CD107a et b révélateurs de la dégranulation, de la monensine et de la bréfeldine A à 10 µg/mL final chacune (Sigma Aldrich). Ces deux derniers agents bloquent le transport intracellulaire des protéines ce qui conduit à l'accumulation des cytokines produites à l'intérieur des cellules iNKT activées. Après lavage, les cellules sont marquées avec l'anticorps anti-CD3 afin de repérer les thymocytes iNKT, puis elles sont fixées et perméabilisées pour être marquées avec un anticorps anti-TNF $\alpha$ .

## **Résultats**

### **Identification des thymocytes iNKT humains**

A partir de dix échantillons de thymus humains, nous avons réalisé un double enrichissement immunomagnétique à l'aide de tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer sur les cellules issues de la dilacération mécanique de ces thymus. Nous avons ensuite réalisé un marquage additionnel sur la fraction enrichie avec des anticorps ciblant des antigènes membranaires et un marqueur de viabilité, pour finalement passer les échantillons au cytomètre en flux. La figure 20 illustre la stratégie de sélection utilisée pour cibler la population de thymocytes iNKT. Après sélection des cellules selon leur morphologie (morphologie), nous éliminons les doublets en fonction de la taille (singlets FSC) et de la granulosité (singlets SSC), puis nous ciblons les thymocytes (CD3<sup>+</sup>) viables (non marqués par le marqueur de viabilité). Parmi ces thymocytes, nous identifions les cellules iNKT grâce au double marquage par les tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer fluorescents en PE et en APC (hCD1d- $\alpha$ GC<sup>+</sup>), et par l'expression du segment V $\alpha$ 24 (V $\alpha$ 24<sup>+</sup>). Le marquage par l'anticorps anti-V $\alpha$ 24 n'est pas très fort, du fait d'un encombrement stérique du au double marquage par les tétramères, mais aussi à cause de la faible intensité de fluorescence du fluorochrome FITC couplé à l'anticorps. Etant donné que nous travaillons sur des échantillons d'organe entier, il est possible que des débris puissent engendrer un marquage non spécifique. Pour pallier à cette éventualité, nous avons ouvert un canal de fluorescence pour lequel nous n'avons pas utilisé d'anticorps (canal vide), et nous avons sélectionné les cellules négatives dans cette fluorescence (artefact -) évitant ainsi d'analyser des débris ou autres contaminants. Comme d'autres avant nous, nous avons été en mesure d'identifier des cellules iNKT au sein d'échantillons de thymus humains, justifiant ainsi de la nécessité de cet organe dans le développement de ces cellules chez l'Homme. La population CD3<sup>+</sup> vivante hCD1d- $\alpha$ GC<sup>+</sup> V $\alpha$ 24<sup>+</sup> artefact - constitue donc la population totale de thymocytes iNKT sur laquelle nous avons ensuite analysé différents paramètres.



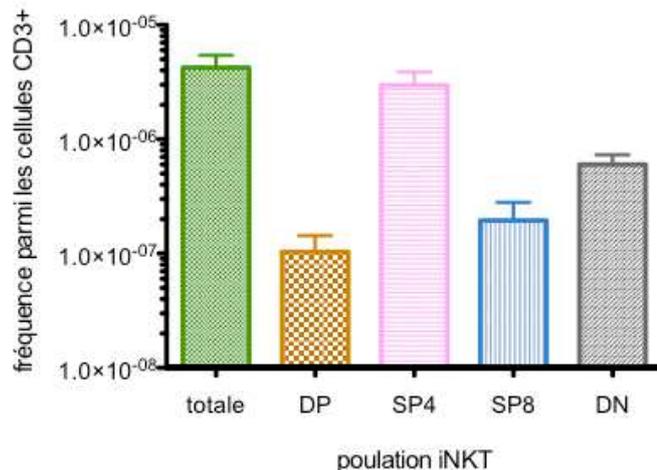
**Figure 20** Stratégie de sélection des thymocytes iNKT après double enrichissement immunomagnétique et marquages additionnels. Les cellules sont d'abord sélectionnées selon leur morphologie en taille (FSC) et en granulosité (SSC) (dot-plot FSC-A/SSC-A), puis les doublets sont éliminés selon ces deux mêmes paramètres (dot-plots FSC-A/FSC-H et SSC-A/SSC-H). Les thymocytes CD3<sup>+</sup> viables (dot-plot viabilité/CD3) sont ensuite ciblés, puis les cellules iNKT sont identifiées grâce au double marquage tétramère (dot-plot hCD1d-αGC/hCD1d-αGC) et Va24 (dot-plot CD3/Vα24). Un canal vide a été ouvert (histogramme canal vide) afin d'éliminer les artefacts de marquage. Différents paramètres sont finalement analysés sur les cellules CD3<sup>+</sup> vivantes hCD1d-αGC<sup>+</sup> Va24<sup>+</sup> artefact- correspondant aux cellules iNKT, comme par exemple les marqueurs CD4 et CD8 (dot-plot CD8/CD4) pour lesquels les pourcentages de cellules positives sont indiqués. Des billes de numération (dot-plot en bas à droite) ont été ajoutées à l'échantillon pour déterminer le nombre exact de cellules d'intérêt récupérées suite à l'élution selon les calculs décrits dans le matériel et méthodes. Une image représentative de dix expériences est présentée.

### Fréquence des thymocytes iNKT totaux et des compartiments DP, SP4, SP8 et DN parmi les cellules CD3<sup>+</sup>

A l'aide d'un marquage membranaire ciblant les antigènes CD4 et CD8, nous avons analysé la répartition des thymocytes iNKT totaux dans les compartiments DP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), SP4 (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>), SP8 (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) et DN (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) (Figure 20). L'enrichissement immunomagnétique ne permet pas d'analyser les fréquences réelles des cellules d'intérêt.

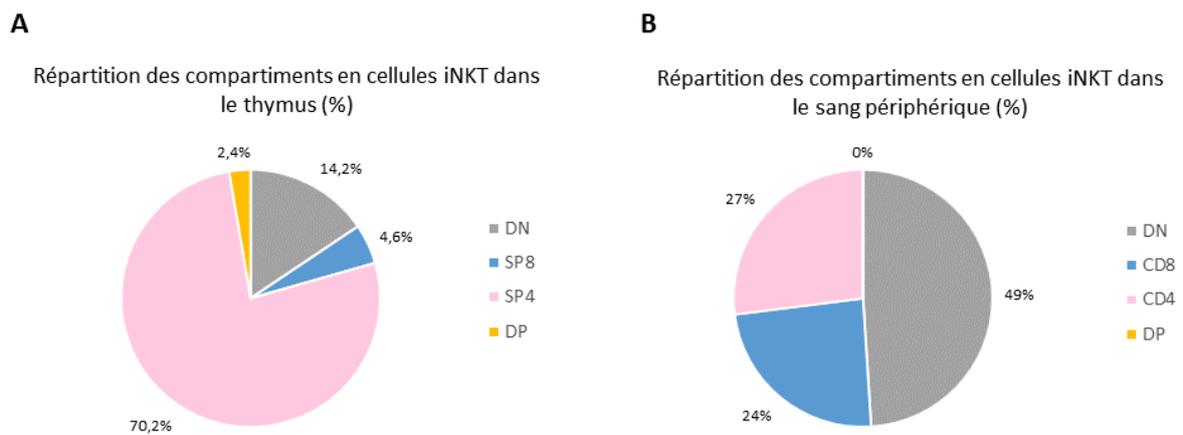
Néanmoins, grâce à l'utilisation de billes de numération (Figure 20), et l'analyse d'un échantillon non enrichi, nous avons pu calculer les fréquences en cellules iNKT parmi les cellules CD3<sup>+</sup> (voir le Matériel et Méthodes pour les calculs réalisés). Nous avons ainsi déterminé une moyenne de  $4,23 \cdot 10^{-6}$  ( $\pm 2,2 \cdot 10^{-6}$ , n=10) thymocytes iNKT totaux parmi les thymocytes (Figure 21). Cette très faible fréquence justifie la nécessité de réaliser un enrichissement immunomagnétique en cellules iNKT, puisque sans cela il serait impossible de les visualiser par cytométrie en flux. Au niveau thymique, le compartiment SP4 (rose) est majoritaire avec un pourcentage de 70,2% et une fréquence de  $2,97 \cdot 10^{-6}$ , puis vient le compartiment DN (gris) avec un pourcentage de 14,2% et une fréquence de  $6,02 \cdot 10^{-7}$ , et enfin les compartiments SP8 (bleu) et DP (jaune) très peu représentés avec des pourcentages respectifs de 4,6% et 2,4% et des fréquences respectives de  $1,94 \cdot 10^{-7}$  et  $1,03 \cdot 10^{-7}$  (Figure 21 et 22A).

**Figure 21** Fréquences des thymocytes iNKT totaux humains parmi les cellules CD3<sup>+</sup>, et des compartiments iNKT DP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), SP4 (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>), SP8 (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) et DN (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>). Les résultats sont représentés par les moyennes  $\pm$  SEM et ont été obtenus à partir de 10 échantillons de thymus humains. Les calculs ont été réalisés selon le matériel et méthodes.

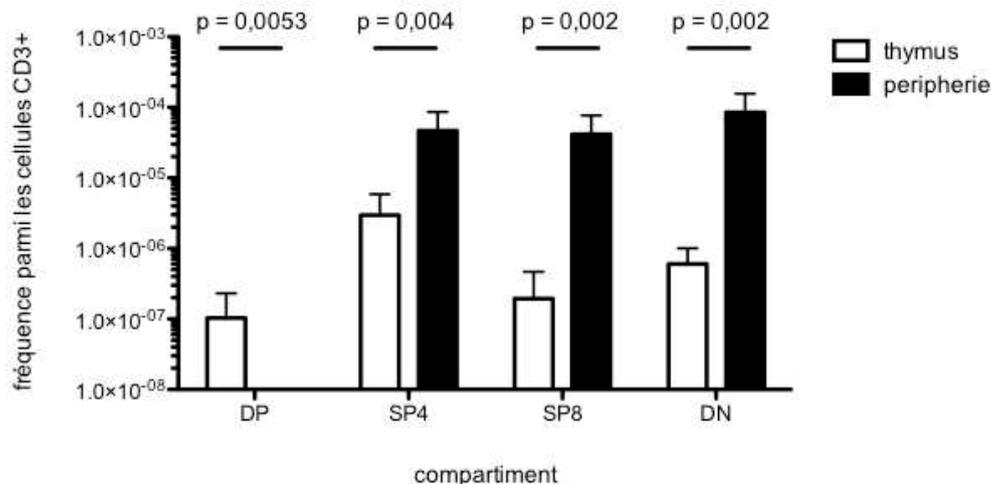


En accord avec les résultats de Berzins et ses collaborateurs (Berzins et al., 2005), nos résultats mettent en évidence un compartiment majoritaire de cellules iNKT CD4<sup>+</sup>, et peu de cellules iNKT CD4<sup>-</sup> au niveau thymique chez l'enfant (Figure 22A). A l'inverse, il a été montré que dans le sang périphérique, la population majoritaire correspond aux cellules iNKT DN (Figure 22B d'après (Kim et al., 2002)). Nous avons pu déterminer, à partir d'échantillons de sang périphérique d'adultes, une fréquence moyenne de  $1,73 \cdot 10^{-4}$  ( $\pm 1,1 \cdot 10^{-4}$ , n=4) cellules iNKT parmi les cellules CD3<sup>+</sup> (mêmes calculs de fréquence que décrits précédemment mais à partir de PBMC). En rapportant cette fréquence au pourcentage de chaque compartiment en cellules iNKT déterminé au niveau sanguin par Kim et ses collègues ((Kim et al., 2002), Figure 22B), nous avons ainsi calculé une fréquence de cellules iNKT périphériques CD4<sup>+</sup> de  $4,67 \cdot 10^{-5}$ , CD8<sup>+</sup> de  $4,15 \cdot 10^{-5}$ , DN de

$8,48.10^{-5}$  et nulle pour les cellules DP (Figure 23, histogrammes noirs). En comparant ces dernières avec les fréquences que nous avons déterminées au niveau thymique, on observe une perte complète du compartiment DP en périphérie du fait de la sélection de ces cellules dans le thymus. Bien que le compartiment CD4<sup>+</sup> soit bien moins représenté en périphérie qu'au niveau thymique, il se trouve tout de même amplifié d'un facteur 15. Néanmoins, les plus fortes amplifications entre le thymus et la périphérie s'observent pour les compartiments CD8<sup>+</sup> et DN avec des facteurs respectifs de 200 et 140 (Figure 23).



**Figure 22** Répartition des différents compartiments iNKT DP, SP4, SP8 et DN au niveau thymique et en périphérie. **A** La répartition (en %) des compartiments iNKT dans le thymus a été obtenue à partir des fréquences calculées pour 10 échantillons de thymus d'enfants. **B** La répartition (en %) des compartiments dans le sang périphérique d'adultes a été décrite par Kim *et al.*, 2002.

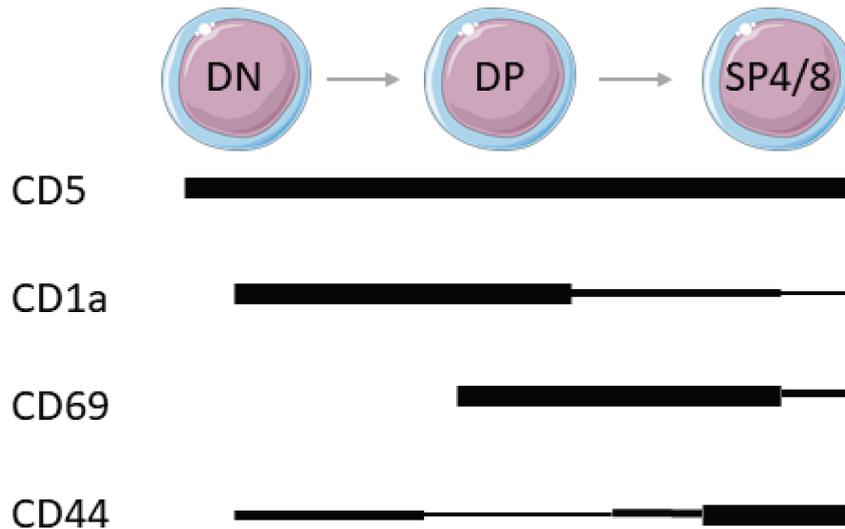


**Figure 23** Fréquences des compartiments iNKT humains DP, SP4, SP8 et DN parmi les cellules CD3<sup>+</sup> dans le thymus et le sang périphérique. Les résultats concernant le thymus (blanc) ont été obtenus à partir de 10 échantillons de thymus humains, et ceux concernant le sang périphérique (noir) ont été obtenus à partir de fréquences en cellules iNKT totales calculées pour 4 échantillons (selon le matériel et méthodes) et rapportés aux pourcentages établis par Kim *et al.*, 2002. Les résultats sont représentés par les moyennes  $\pm$  SEM, et les valeurs exactes des p-value sont indiquées pour chaque test et ont été calculées avec un test de Mann-Whitney (thymus n=10 ; périphérie n=4).

### Modèle de développement des cellules iNKT humaines

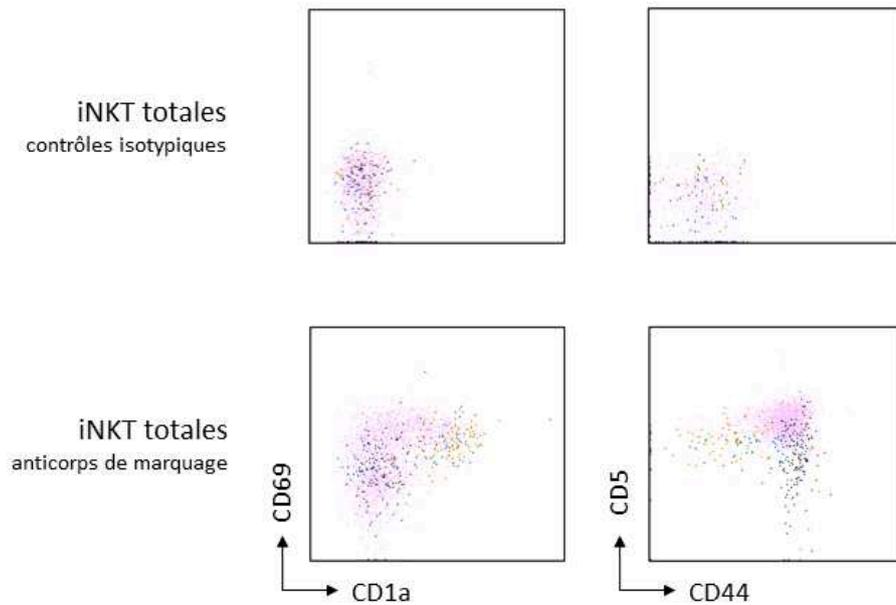
Nous avons ensuite cherché à déterminer le cheminement que les thymocytes iNKT pourraient suivre lors de leur développement, après l'acquisition d'un TCR fonctionnel pouvant reconnaître le tétramère CD1d- $\alpha$ GalCer. Quatre marqueurs, dont l'expression est séquentielle au cours de la différenciation thymique des lymphocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels, ont été étudiés. Le marqueur CD5 est exprimé dès le stade DN immature, donc avant même l'acquisition d'un TCR mature. Son niveau d'expression au sein des thymocytes DP et SP est ensuite corrélé avec la capacité de signalisation du TCR et son avidité pour son ligand (Azzam et al., 1998), un complexe CD1d-glycolipide dans le cas des cellules iNKT. Le marqueur CD1a est lui aussi exprimé à partir du stade DN immature, mais après le marqueur CD5. Son expression est ensuite progressivement perdue après l'étape de sélection positive, au cours de la maturation fonctionnelle des thymocytes DP et SP (Res et al., 1997). La sélection positive des thymocytes DP engendre l'expression du marqueur CD69, qui peut donc être co-exprimé avec le marqueur CD1a (Swat et al., 1993). Pour finir, le marqueur CD44 est exprimé de manière intermédiaire dans les premiers stades DN immatures, puis il est perdu au moment de l'engagement du thymocyte vers la différenciation T  $\alpha\beta$ . Nous ne pouvons pas étudier les stades DN immatures, puisqu'à ces stades les précurseurs de thymocytes iNKT n'ont pas encore acquis un TCR iNKT mature

reconnaissant le tétramère CD1d- $\alpha$ GalCer. Néanmoins, ce marqueur est ensuite réexprimé progressivement au cours de la maturation des thymocytes avec une forte expression au stades SP (Canté-Barrett et al., 2017) (Figure 24).



**Figure 24** Schéma représentatif de l'expression séquentielle de différents marqueurs membranaires lors du développement thymique de cellules T  $\alpha\beta$  conventionnelles humaines, et analysés pour le développement des thymocytes iNKT humains. Les thymocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels se différencient selon le schéma suivant : DN, puis DP et enfin SP (4 ou 8). Lors de ce processus, le marqueur CD5 est exprimé dès le stade DN puis il y a des variations en fonction de la capacité de signalisation du TCR pleinement acquis au stade DP. Le marqueur CD1a est exprimé en fin de stade DN, pendant le stade DP, puis est progressivement perdu. Le marqueur CD69 est exprimé au stade DP juste après la sélection positive. Le marqueur CD44 est exprimé dès le stade DN, mais est ensuite perdu, pour être finalement progressivement réexprimé dans les stades les plus matures (SP4 et SP8).

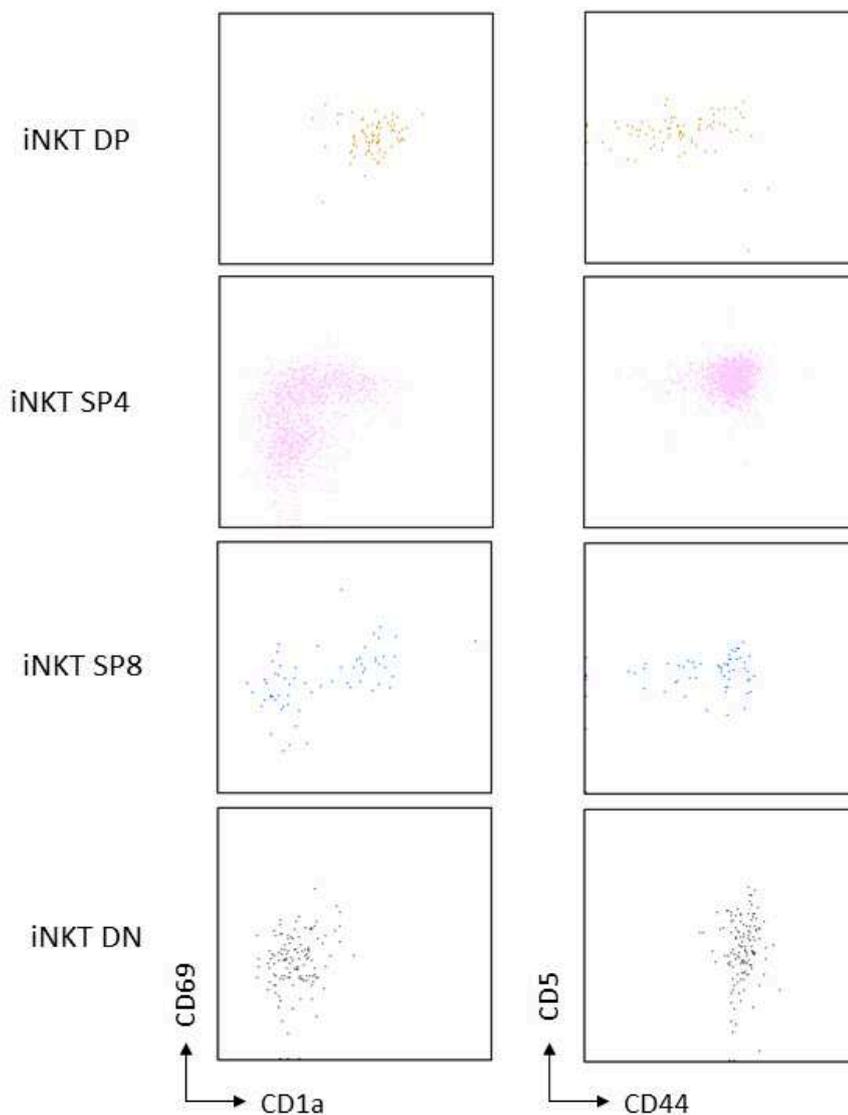
L'analyse de ces quatre marqueurs sur la population iNKT totale (Figure 25) met en évidence un marquage hétérogène avec des cellules faiblement ou fortement marquées.



**Figure 25** Marquage membranaire sur des thymocytes iNKT humains totaux. Les quatre marqueurs CD5, CD1a, CD69 et CD44, identifiés lors du développement des thymocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels ont été analysés sur les thymocytes iNKT. Une image représentative de trois expériences est présentée avec les contrôles isotypiques (haut) et les anticorps (bas). Les couleurs des différents compartiments DP, SP4, SP8 et DN ont été conservés par rapport à la figure 20.

Nous avons ensuite analysé les quatre compartiments iNKT DP, SP4, SP8 et DN séparément pour ces marqueurs (Figure 26). Les thymocytes iNKT DP sont majoritairement CD5<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> CD44<sup>low</sup>, leur sélection positive est donc engagée et révélée par la forte expression du CD1a et du CD69. Le marqueur CD44 semble être en cours de réacquisition avec une majorité de cellules CD44<sup>low</sup> et quelques cellules CD44<sup>+</sup>. Les thymocytes iNKT SP4 expriment fortement le marqueur CD5, signe d'une forte avidité entre le TCR et son ligand. Les marqueurs CD1a et CD69 sont exprimés de manière hétérogène par ce compartiment, révélant une maturation progressive de ces cellules commençant avec un phénotype CD1a<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, puis CD1a<sup>-</sup>CD69<sup>+</sup>, et enfin CD1a<sup>-</sup>CD69<sup>-</sup>. Le marqueur CD44 est en cours de réacquisition avec quelques cellules CD44<sup>low</sup> mais une majorité de cellules matures CD44<sup>+</sup>. Les thymocytes iNKT SP8 expriment tous de manière intermédiaire le marqueur CD5, mais présentent deux profils bien distincts avec des cellules CD1a<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, et des cellules CD1a<sup>-</sup>CD69<sup>low</sup>. Cette dichotomie est aussi observée pour le marqueur CD44, avec une partie des cellules l'exprimant fortement et une autre partie plus faiblement. Après vérification (non présentée sur la figure), les thymocytes iNKT SP8 exprimant faiblement le CD44 sont CD1a<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, ressemblant ainsi aux thymocytes iNKT DP, et viendraient donc d'être sélectionnés positivement. Les

thymocytes iNKT SP8 exprimant fortement le CD44 sont CD1a-CD69<sup>low</sup>, et seraient déjà bien avancés dans leur maturation. Les cellules iNKT DN expriment le CD5 de manière hétérogène, ce qui pourrait être le signe que la rencontre avec le ligand serait assez lointaine en terme de temps, d'où la perte progressive de ce marqueur. Ces cellules sont CD1a<sup>-</sup> CD69<sup>low</sup> CD44<sup>+</sup>, révélant ainsi leur fort degré de maturation.

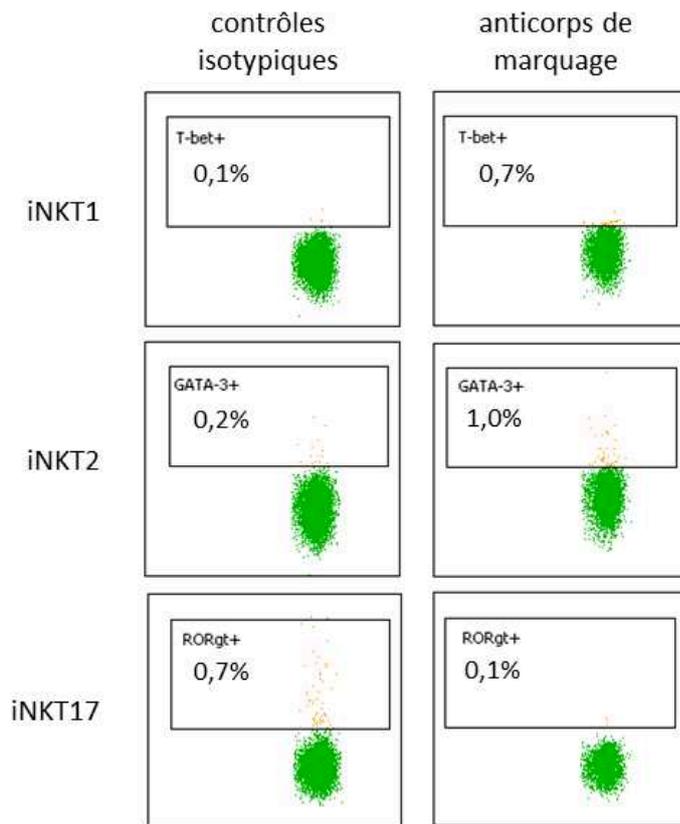


**Figure 26** Marquage membranaire sur les différents compartiments de thymocytes iNKT humains DP, SP4, SP8 et DN. Les quatre marqueurs CD5, CD1a, CD69 et CD44, identifiés lors du développement des thymocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels ont été analysés sur les compartiments de thymocytes iNKT. Une image représentative de trois expériences est présentée.

D'après notre analyse, il semblerait que les cellules iNKT les plus immatures que nous puissions observer fassent partie du compartiment DP. Au cours de leur maturation, elles perdraient ensuite l'expression d'un des co-récepteurs, donnant naissance aux compartiments SP4 et SP8. Ce schéma correspond donc à celui observé pour la différenciation des lymphocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels. Néanmoins, les cellules iNKT présentent aussi un compartiment DN, qui semble être à un stade très avancé de maturation, suggérant qu'il puisse dériver d'un autre compartiment plus immature, comme les compartiments SP4 ou SP8, dont une partie des cellules perdraient alors respectivement l'expression du CD4 ou du CD8.

### **Les sous-populations de cellules iNKT**

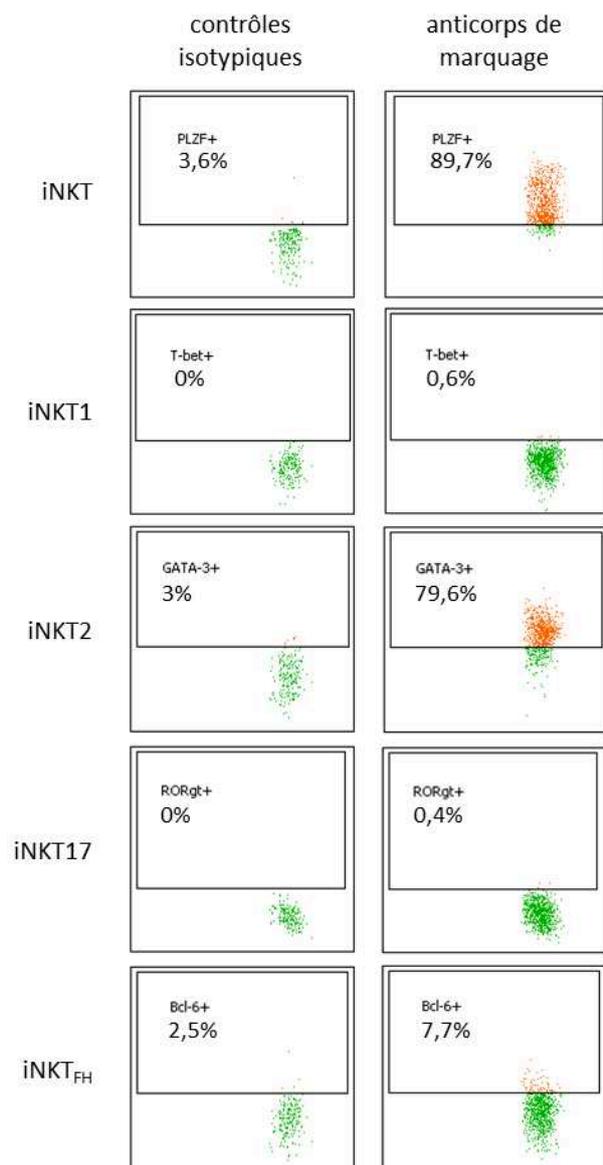
Certaines études ont pu mettre en évidence des profils d'expression de facteurs de transcription et de production de cytokines distincts concernant les cellules iNKT humaines périphériques, avec par exemple des cellules T-bet<sup>+</sup> (Gutierrez-Arcelus et al., 2019; Knox et al., 2014), ou productrices principalement d'IFN $\gamma$  (Gumperz et al., 2002; Lee et al., 2002a), qui peuvent dans ces deux cas s'apparenter aux cellules iNKT1, ou des cellules productrices d'IL-17 (Venken et al., 2019), pouvant s'apparenter aux cellules iNKT17 retrouvées chez la souris. Suite à l'enrichissement immunomagnétique et au marquage membranaire de PBMCs provenant de donneurs sains, nous avons fixé et perméabilisé les cellules afin de réaliser un marquage intracellulaire avec des anticorps ciblant les facteurs de transcription clés des différentes sous-populations de cellules T helper CD4<sup>+</sup> conventionnelles et de cellules iNKT murines, à savoir T-bet pour les iNKT1, GATA-3 pour les iNKT2, ROR $\gamma$ t pour les iNKT17. Contrairement aux études citées précédemment, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'expression de ces facteurs de transcription au sein des cellules iNKT des individus testés (Figure 27). Il est donc possible que les sous-populations de cellules iNKT ne soient pas présentes en périphérie chez tous les individus, et qu'elles pourraient apparaître en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent.



**Figure 27** Marquages intracellulaires sur des cellules iNKT totales issues de sang périphérique humain. Les trois facteurs de transcriptions T-bet, GATA-3, et ROR $\gamma$ t identifiés lors du développement de cellules murines iNKT1, iNKT2, et iNKT17 respectivement ont été analysés chez l'Homme. Une image représentative de cinq expériences est présentée avec les contrôles isotypique (gauche) et les anticorps de marquage (droite). Les pourcentages de cellules positives sont indiqués pour chaque facteur de transcription.

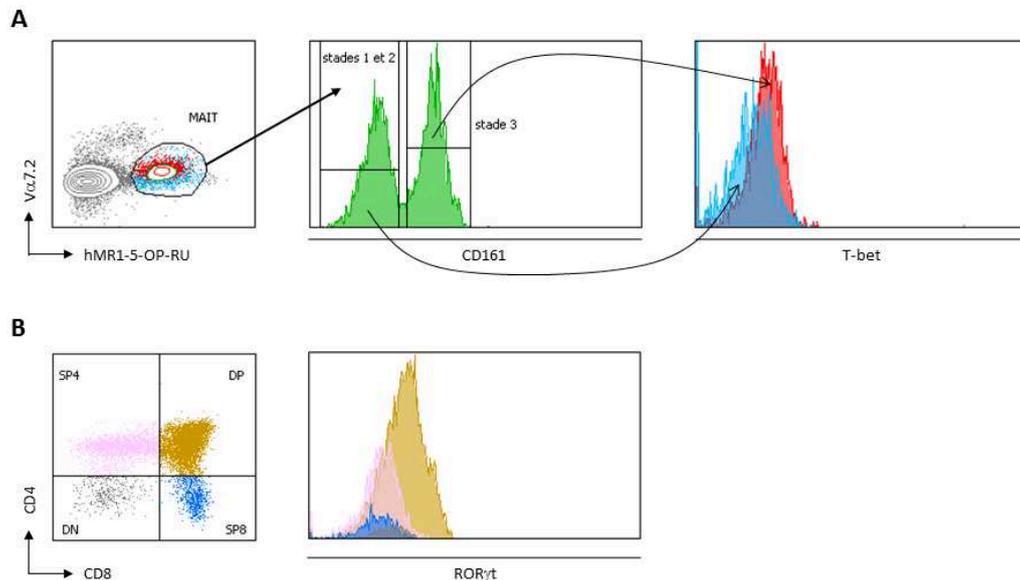
Nous avons ensuite cherché à savoir si, comme chez la souris, les sous-populations de cellules iNKT pouvaient exister au niveau thymique chez l'Homme. Suite à l'enrichissement immunomagnétique et au marquage membranaire, nous avons fixé et perméabilisé des thymocytes afin de réaliser un marquage intracellulaire avec le même panel que pour les PBMCs, plus un anticorps ciblant le facteur de transcription Bcl-6 pour identifier les iNKT<sub>FH</sub>. Nous avons également utilisé un anticorps ciblant PLZF, pour déterminer si, chez l'Homme aussi, ce facteur de transcription était une signature moléculaire de l'engagement vers la voie de différenciation iNKT (Kovalovsky et al., 2008; Savage et al., 2008). Comme le montre la figure 28, les thymocytes iNKT expriment en grande majorité PLZF (89,7%). Il semblerait donc que ce facteur de transcription soit aussi impliqué dans le développement des cellules iNKT humaines. En revanche, en ce qui concerne l'expression des facteurs de transcription définissant les sous-populations de cellules iNKT, seul le facteur GATA-3 est exprimé par une grande partie des thymocytes iNKT (79,6%), et le facteur Bcl-6 par une toute petite partie de ces cellules (7,7%).

**Figure 28** Marquages intracellulaires sur des thymocytes iNKT totaux humains. Les cinq facteurs de transcriptions PLZF, T-bet, GATA-3, ROR $\gamma$ t et Bcl-6 identifiés lors du développement de cellules murines iNKT, iNKT1, iNKT2, iNKT17 et iNKT<sub>FH</sub> respectivement ont été analysés chez l'Homme. Une image représentative de trois expériences est présentée avec les contrôles isotypique (gauche) et les anticorps de marquage (droite). Les pourcentages de cellules positives sont indiqués pour chaque facteur de transcription.



N'observant aucun marquage pour les facteurs T-bet et ROR $\gamma$ t, nous nous sommes assurés que les anticorps utilisés étaient bien fonctionnels en marquant des populations connues pour exprimer chacun de ces deux facteurs. Concernant T-bet, nous avons ainsi cherché à reproduire les résultats de Koay et ses collaborateurs (Koay et al., 2016), en travaillant sur des thymocytes enrichis en cellules MAIT grâce à des tétramères MR1-5-0P-RU avec le même protocole que pour les cellules iNKT. Comme dans leur étude, nous avons pu mettre en évidence des cellules MAIT thymiques humaines (tétramères MR1-5-0P-RU<sup>+</sup> V $\alpha$ 7.2<sup>+</sup>) aux stades de développement 1 et 2 (CD161<sup>-</sup>, en bleu sur l'histogramme de droite) négatives pour l'expression de T-bet, alors que les cellules au stade 3 (CD161<sup>+</sup>, en rouge sur l'histogramme de droite) montrent un léger décalage positif pour ce marqueur

(Figure 29A). Pour ROR $\gamma$ t, nous avons travaillé sur les thymocytes totaux et pu mettre en évidence que les cellules DP sont ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> contrairement à tous les autres compartiments (Figure 29B).

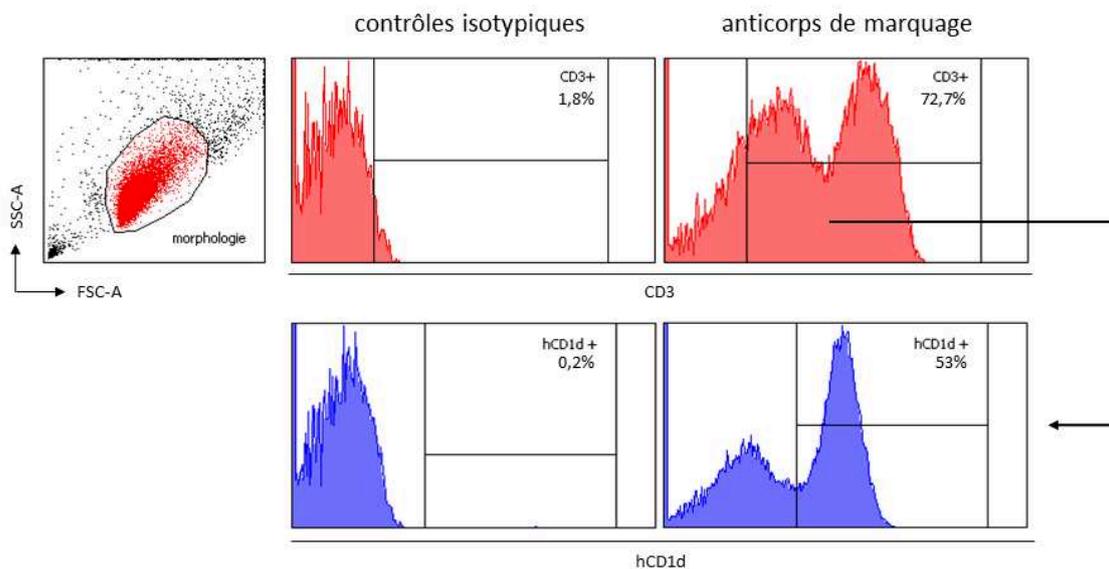


**Figure 29** Contrôles de marquage des anticorps anti-T-bet et ROR $\gamma$ t. **A** Le marquage par l'anticorps anti-T-bet a été vérifié sur des cellules thymiques MAIT humaines hMR1-5-OP-RU<sup>+</sup> V $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> (dot-plot hMR1-5-OP-RU/V $\alpha$ 7.2) triées à partir d'un donneur selon le même protocole que celui décrit dans le matériel et méthodes pour les cellules iNKT. Les trois stades de développement décrits par Koay *et al.*, 2016 pour les cellules MAIT sont mis en évidence par un marquage ciblant le CD161 (histogramme en haut au centre). Le marquage T-bet est finalement analysé pour les stades 1 et 2 (bleu) et 3 (rouge) (histogramme en haut à droite). **B** Le marquage par l'anticorps anti-ROR $\gamma$ t (histogramme en bas au centre) a été vérifié sur des thymocytes totaux issus d'un donneur et compartimentés selon les marqueurs CD4 et CD8 (dot-plot CD8/CD4).

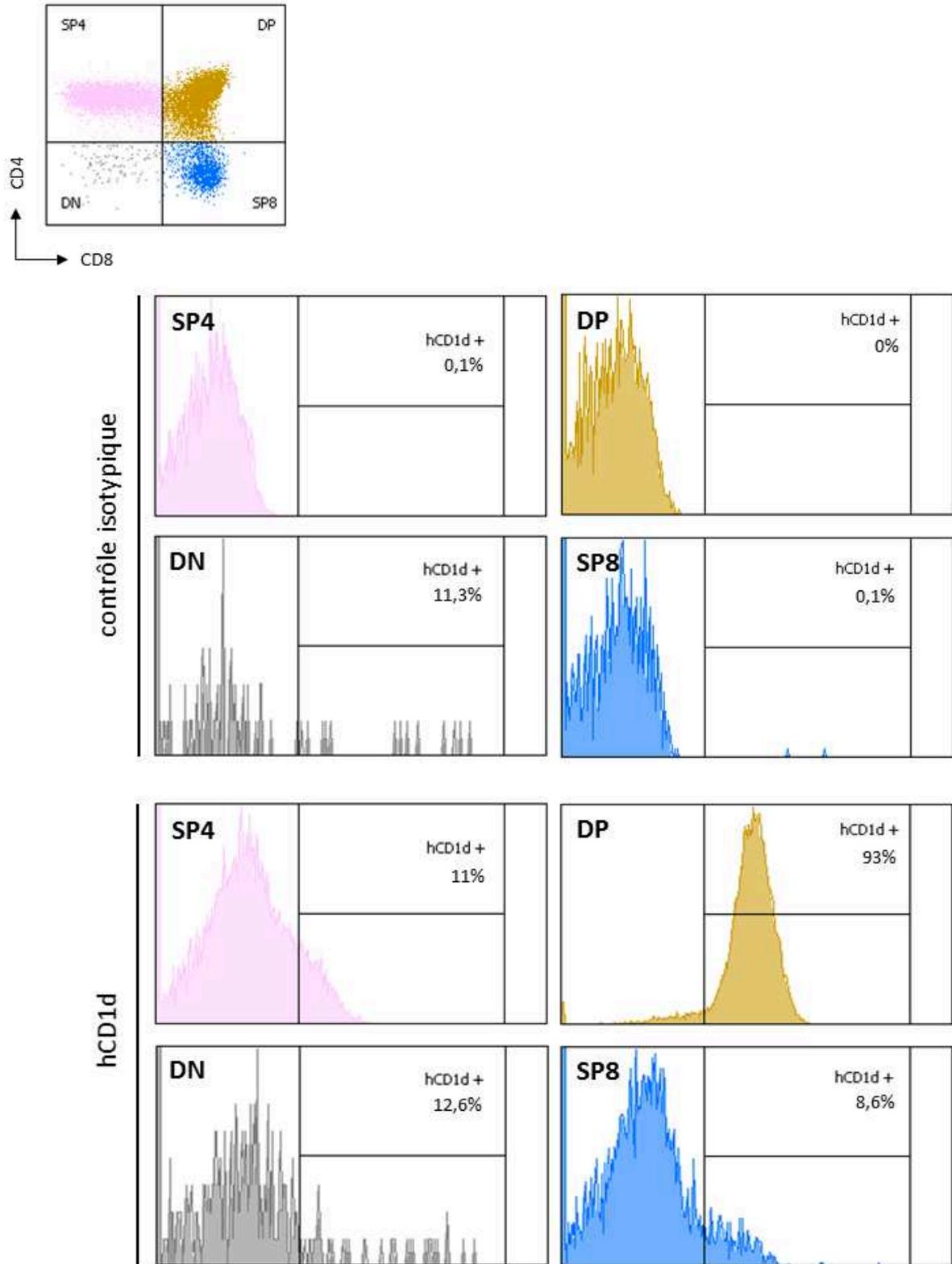
Nos résultats indiquent donc que PLZF est bien une signature moléculaire de la lignée iNKT, mais contrairement à chez la souris, les sous-populations de cellules iNKT ne sont pas définies au niveau thymique. Il semblerait donc que, chez l'Homme, comme pour les cellules T helper CD4<sup>+</sup> conventionnelles, ces sous-populations n'apparaissent qu'en périphérie en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent. Néanmoins, le facteur GATA-3 est tout de même exprimé par une grande partie des cellules iNKT. Or ce facteur est connu pour jouer un rôle crucial dans les premiers stades de développement des lymphocytes T conventionnels (Ho et al., 2009). Il semblerait donc que GATA-3 soit impliqué dans le développement des cellules iNKT, et de manière plus générale dans le développement des lymphocytes T. Cette observation constitue un argument supplémentaire en faveur d'une différenciation des cellules iNKT à partir d'un précurseur commun aux cellules T conventionnelles.

## Cellules CD1d positives

Nous avons finalement cherché à savoir si, comme chez la souris, les thymocytes DP humains exprimaient eux aussi le CD1d, et pouvaient être le type cellulaire support de la sélection positive des cellules iNKT. La figure 30 indique que la moitié des thymocytes CD3<sup>+</sup>, peu importe le niveau d'expression du CD3 (CD3<sup>low</sup> et CD3<sup>high</sup>), exprime la molécule CD1d. Une analyse de ces cellules CD3<sup>+</sup> en fonction des co-récepteurs CD4 et CD8 (Figure 31) montre ensuite que ce sont majoritairement les thymocytes DP qui expriment cette molécule de CMH non classique (93%). Nos résultats suggèrent donc qu'il est possible que les cellules iNKT thymiques humaines soient sélectionnées positivement par les thymocytes DP CD1d<sup>+</sup>.



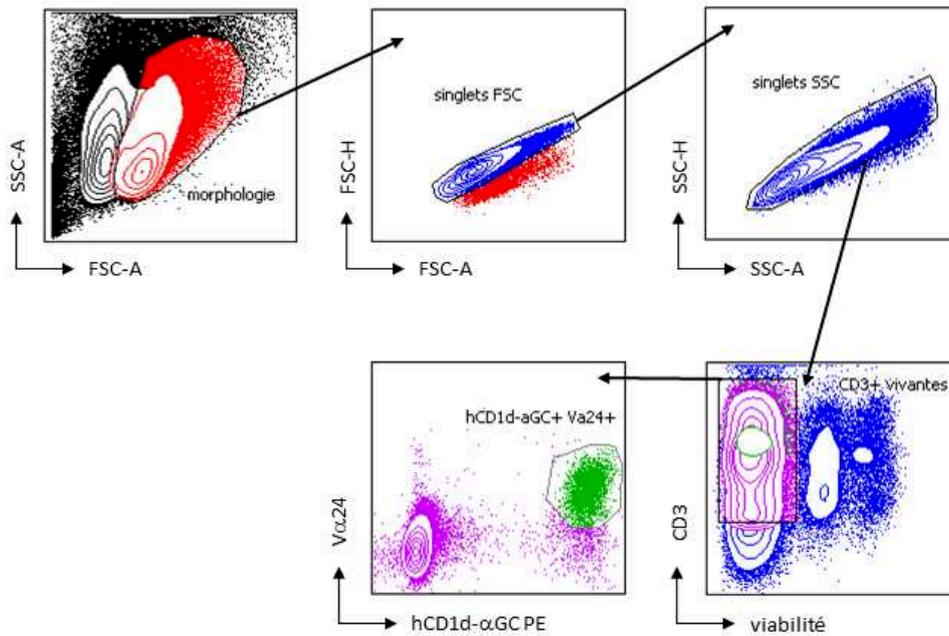
**Figure 30** Marquage CD1d sur des thymocytes totaux humains. Suite à la dilacération et à la récupération des cellules thymique d'un donneur (dot-plot FSC-A/SSC-A), les cellules CD3<sup>+</sup> (contrôle isotypique sur l'histogramme en haut au centre ; anticorps de marquage sur l'histogramme en haut à droite) ont été sélectionnées, et analysées pour l'expression du hCD1d (contrôle isotypique sur l'histogramme en bas au centre ; anticorps de marquage sur l'histogramme en bas à droite).



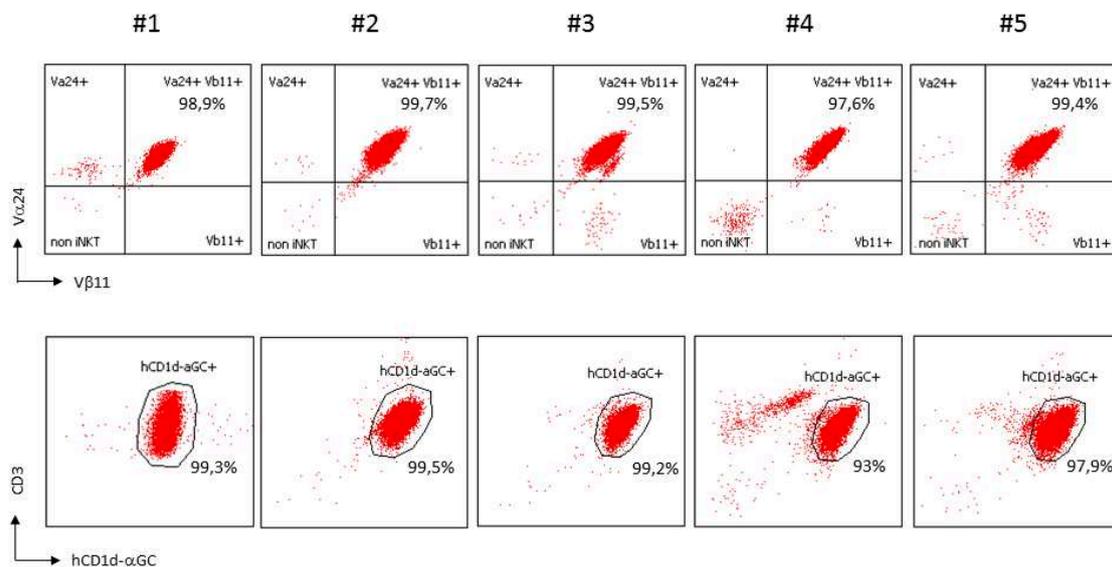
**Figure 31** Marquage CD1d sur les différents compartiments DP, SP4, SP8 et DN à partir de thymocytes humains d'un donneur. Les marqueurs CD4 et CD8 (dot-plot CD8/CD4 en haut à gauche) ont été analysés sur les cellules CD3<sup>+</sup> afin d'identifier les compartiments DP, SP4, SP8 et DN, pour lesquels l'expression du hCD1d (contrôle isotypique sur quatre premiers histogrammes ; anticorps de marquage sur quatre derniers histogrammes) a été analysée.

## **Génération de lignées cellulaires à partir de thymocytes iNKT**

N'ayant pas d'outils pour identifier les thymocytes iNKT autoréactifs *ex vivo* (conclusion de l'article Perroteau et al., 2019, soumis), nous avons trié par cytométrie en flux, à partir de cinq thymus, des thymocytes iNKT enrichis immunomagnétiquement à l'aide du tétramère CD1d- $\alpha$ GalCer, puis généré des lignées cellulaires après amplification afin de tester leur réactivité. Comme la figure 32 le montre, après avoir sélectionné les cellules sur leur morphologie (morphologie), nous éliminons les doublets en taille (singlets FSC) et en granulosité (singlets SSC), puis nous ciblons les thymocytes (CD3<sup>+</sup>) viables (non marqués par le marqueur de viabilité). Parmi ces thymocytes, nous identifions les cellules iNKT grâce au double marquage par le tétramère CD1d- $\alpha$ GalCer et l'anticorps anti-V $\alpha$ 24 (hCD1d- $\alpha$ GC<sup>+</sup> V $\alpha$ 24<sup>+</sup>). Nous avons ensuite amplifié de manière non spécifique les cellules triées avec un mélange de cellules nourricières irradiées (lymphocytes B transformés par le virus de l'EBV et de PBMC allogéniques) dans un milieu contenant de la PHA et de l'IL-2. Après trois semaines en culture avec renouvellement du milieu contenant de l'IL-2, nous avons pu vérifier que le phénotype de nos cinq lignées cellulaires correspondait bien à celui de cellules iNKT, grâce à des marquages ciblant les segments V $\alpha$ 24 et V $\beta$ 11 (plus de 97% de cellules doublement marquées), et le CD3 en combinaison avec le tétramère CD1d- $\alpha$ GalCer (plus de 93% de cellules doublement marquées) (Figure 33).



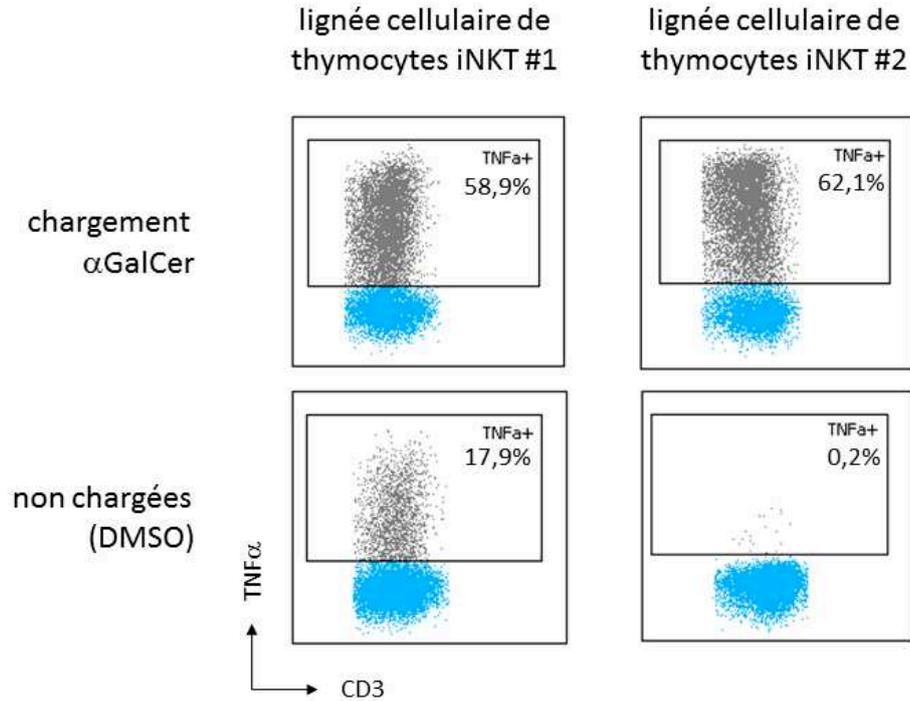
**Figure 32** Stratégie de sélection des thymocytes iNKT après enrichissement immunomagnétique et marquages additionnels pour tri cellulaire par cytométrie en flux. Les cellules sont d'abord sélectionnées selon leur morphologie en taille (FSC) et en granulosité (SSC) (dot-plot FSC-A/SSC-A), puis les doublets sont éliminés selon ces deux mêmes paramètres (dot-plots FSC-A/FSC-H et SSC-A/SSC-H). Les thymocytes CD3+ viables (dot-plot viabilité/CD3) sont ensuite ciblés, puis les cellules iNKT sont identifiées grâce au marquage tétramère et Vα24 (dot-plot hCD1d-αGC/Vα24). Une image représentative de cinq expériences est présentée.



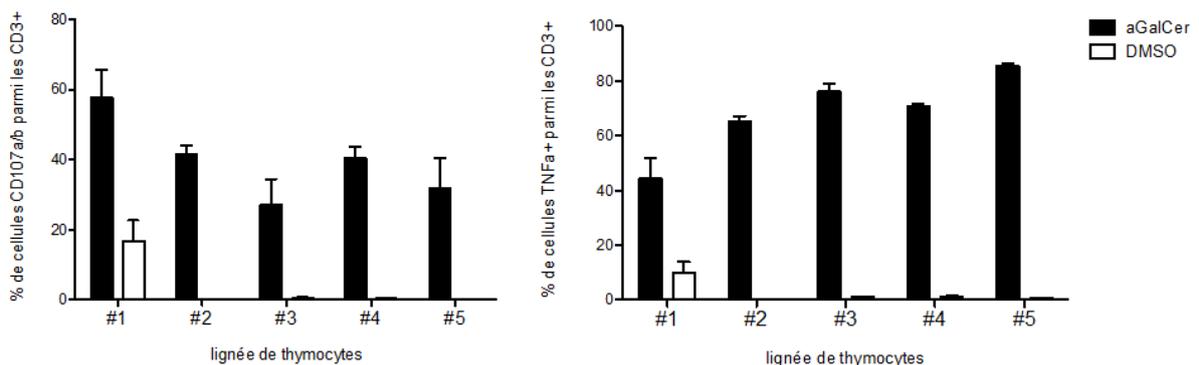
**Figure 33** Vérification du phénotype iNKT des cinq lignées cellulaires de thymocytes générées. L'expression des segments Vα24 et Vβ11 (dot-plots en haut) a été analysée pour chaque lignée de thymocytes générée (n=5). Le pourcentage de cellules positives pour ces deux marqueurs est indiqué dans le quadrant en haut à droite. La capacité de fixation du tétramère hCD1d-αGalCer pour chaque lignée cellulaire de thymocytes générée a également été analysée en parallèle de l'expression du CD3 (dot-plots en bas) (n=5). Le pourcentage de cellules positives pour ces deux marqueurs est indiqué à côté de la fenêtre de sélection.

## **Réactivité des lignées cellulaires de thymocytes iNKT**

Nous avons ensuite analysé chaque lignée cellulaire de thymocytes iNKT dans des tests fonctionnels de dégranulation et de production de cytokines, contre des cibles Hela transfectées pour exprimer la molécule CD1d. Nous avons testé deux conditions de chargement des cellules cibles : un chargement en  $\alpha$ GalCer afin de vérifier que nos lignées cellulaires correspondent bien à des lignées de cellules iNKT réactives, et des cellules cibles dites « non chargées », présentant donc des glycolipides endogènes, afin de tester leur autoréactivité (Figure 34). Nos résultats mettent en évidence que toutes les lignées cellulaires générées sont capables de s'activer lorsque les cibles sont chargées en  $\alpha$ GalCer (en moyenne  $39,7\% \pm 8,2\%$  de cellules CD107<sup>+</sup> et  $68,3\% \pm 10,8\%$  de cellules TNF $\alpha$ <sup>+</sup>, n=5), et sont donc bien des lignées de cellules iNKT (Figure 35). En revanche, lorsque les cibles ne sont pas chargées, seule la lignée cellulaire iNKT 1 est capable de dégranuler ( $16,8\%$  de cellules CD107<sup>+</sup> en moyenne) et de produire du TNF $\alpha$  ( $9,6\%$  de cellules TNF $\alpha$ <sup>+</sup> en moyenne), et est donc autoréactive (Figure 35). Ces résultats indiquent que la présence de thymocytes iNKT autoréactifs est dépendante du donneur, comme nous l'avons déjà mis en évidence avec les lignées cellulaires iNKT générées à partir de PBMC.



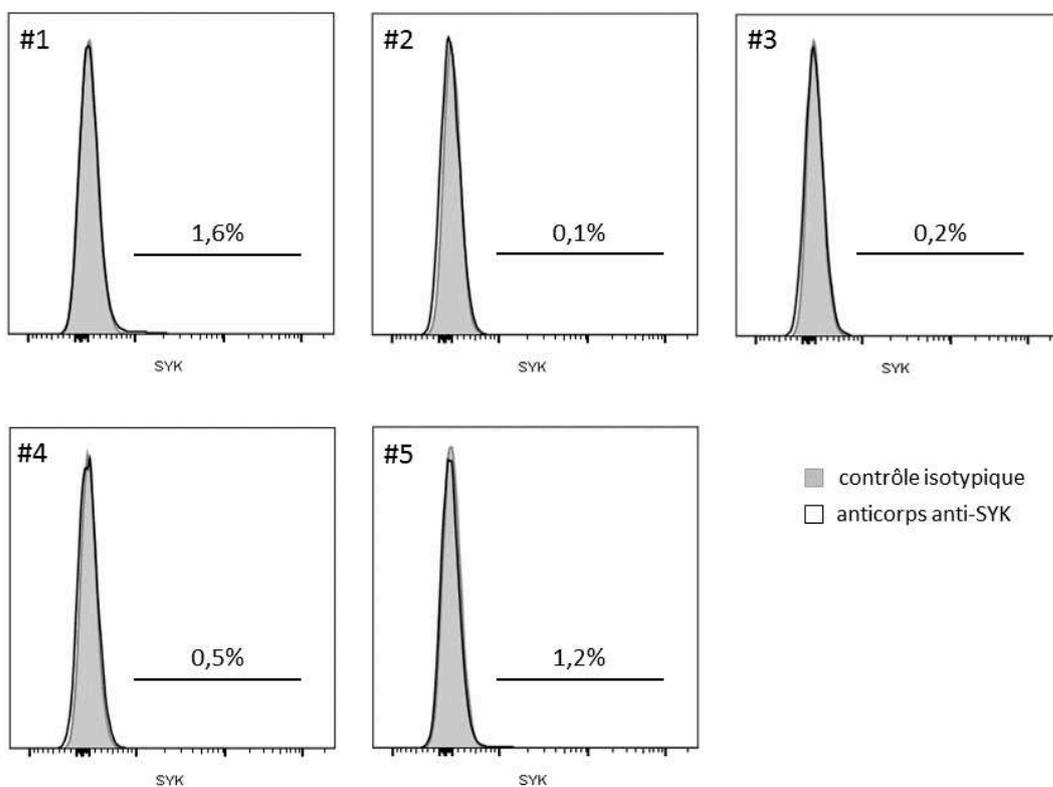
**Figure 34** Analyse fonctionnelle de la production de  $TNF\alpha$  par les lignées de thymocytes iNKT #1 (dot-plots à gauche) et #2 (dot-plots à droite). Des cibles Hela hCD1d<sup>+</sup> ont été préalablement chargées avec 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d' $\alpha\text{GalCer}$  (dot-plots en haut) ou non (dot-plots en bas) afin d'étudier respectivement la réactivité iNKT et l'auto-réactivité. Après 4 heures de co-culture avec chaque lignée cellulaire de thymocytes iNKT (identifiée par le marquage CD3) à un ratio 1:1, la production de  $TNF\alpha$  a été analysée par marquage intracellulaire. Une image représentative des trois expériences réalisées est présentée pour les lignées cellulaires de thymocytes #1 et #2. Les pourcentages de cellules  $TNF\alpha^+$  sont indiqués dans chaque fenêtre.



**Figure 35** Réactivité des cinq lignées de thymocytes iNKT. La dégranulation (CD107 a/b, gauche) et la production de  $TNF\alpha$  (droite) ont été analysées pour chaque lignée cellulaire de thymocytes iNKT co-cultivée pendant 4 heures avec des cibles Hela hCD1d<sup>+</sup> préalablement chargées (noir) ou non (blanc) avec 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d' $\alpha\text{GalCer}$  à un ratio de 1:1. après trois tests fonctionnels en présence de cibles chargées en  $\alpha\text{GalCer}$  (noir) ou non chargées (blanc). Les résultats sont représentés par les moyennes  $\pm$  SEM à partir de trois expériences.

## Expression de SYK par les thymocytes iNKT

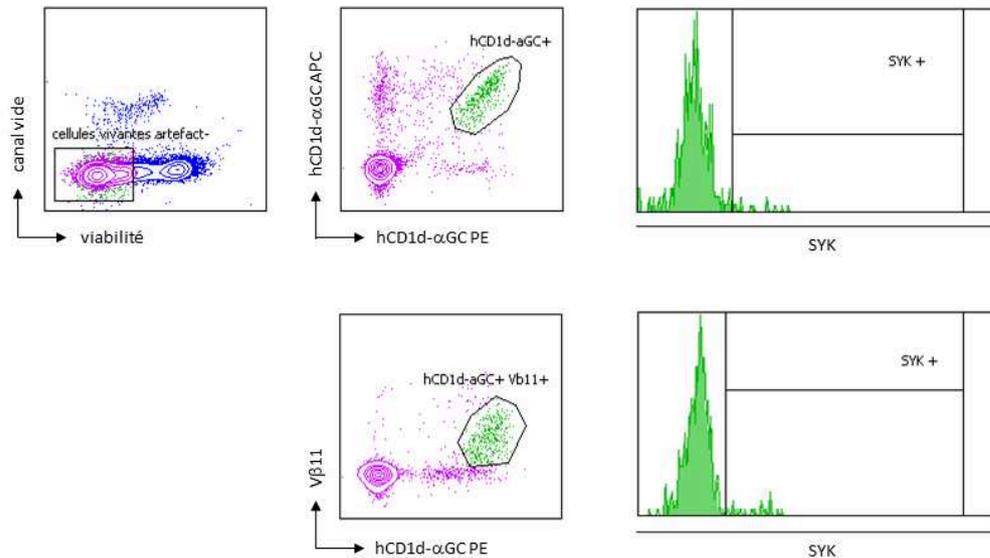
Ayant mis en évidence que l'auto-réactivité de cellules iNKT pouvait être liée à l'expression de la molécule de signalisation SYK par les lymphocytes iNKT périphériques, nous avons donc testé nos lignées de thymocytes iNKT pour la présence de cette molécule. Après fixation et perméabilisation des thymocytes issus des cinq lignées générées, nous avons réalisé un marquage intracellulaire avec un anticorps spécifique de SYK. Nos résultats indiquent qu'aucune des cinq lignées générées n'expriment fortement la molécule SYK (Figure 36), et suggèrent donc que l'auto-réactivité de la lignée 1 de thymocytes iNKT n'est pas due à la présence de cette molécule de signalisation.



**Figure 36** Marquage SYK sur les cinq lignées de thymocytes iNKT. Après fixation et perméabilisation les lignées de thymocytes iNKT sont marquées en intracellulaire afin d'identifier les cellules exprimant la tyrosine kinase SYK. Les résultats présentent le marquage par le contrôle isotypique (gris) et l'anticorps anti-SYK (blanc). Les pourcentages en cellules SYK<sup>+</sup> sont indiqués pour chaque lignée cellulaire de thymocytes iNKT dans l'histogramme correspondant.

Nous avons finalement réalisé le même marquage sur des thymocytes iNKT *ex vivo* enrichis immunomagnétiquement et identifiés, soit avec un double marquage par des tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer, ou soit à l'aide du double marquage tétramère CD1d- $\alpha$ GalCer

et anticorps anti-V $\beta$ 11 (Figure 37). Dans cette expérience, nous n'avons, une nouvelle fois, pas pu mettre en évidence de thymocytes iNKT exprimant très fortement la molécule SYK.



**Figure 37** Marquage SYK sur des thymocytes iNKT *ex vivo*. Après enrichissement immunomagnétique selon le protocole décrit dans le matériel et méthodes, les thymocytes CD3<sup>+</sup> viables (dot-plot viabilité/CD3) sont d'abord ciblés, puis les cellules iNKT sont identifiées grâce au double marquage tétramère (dot-plot hCD1d- $\alpha$ GC/hCD1d- $\alpha$ GC en haut au centre) ou hCD1d- $\alpha$ GC et V $\beta$ 11 (dot-plot hCD1d- $\alpha$ GC/V $\beta$ 11 en bas au centre). L'expression de la protéine kinase SYK a été analysée sur les cellules CD3<sup>+</sup> vivantes hCD1d- $\alpha$ GC<sup>+</sup> et éventuellement V $\beta$ 11<sup>+</sup> correspondant aux cellules iNKT thymiques (histogrammes SYK à droite).

L'ensemble des résultats de nos deux études semble indiquer que l'expression de SYK n'est pas nécessaire pour engendrer l'autoréactivité de toutes les cellules iNKT, et que d'autres mécanismes peuvent être à l'origine de ce phénomène. Bien que nous n'ayons pas pu mettre en évidence de thymocytes iNKT exprimant fortement la molécule SYK, son expression par des cellules iNKT en périphérie pourrait tout de même être acquise au niveau thymique. Ces thymocytes seraient alors potentiellement autoréactifs et devraient donc être éliminés par sélection négative, c'est pourquoi ils seraient présents à une faible fréquence ne nous permettant pas de les identifier. Néanmoins, chez certains individus (comme le donneur 2 de l'article Perroteau et al., 2019, soumis), il est possible que les cellules iNKT autoréactives SYK positives aient échappé à la sélection négative et pour ensuite rejoindre la périphérie. Une autre possibilité serait l'acquisition en périphérie de l'expression de cette molécule par certains lymphocytes iNKT ce qui diminuerait leur seuil d'autoréactivité.

# **DISCUSSION**

Les cellules iNKT ont été mises en évidence il y a maintenant 30 ans, et depuis les chercheurs n'ont eu de cesse de définir cette population de lymphocytes T  $\alpha\beta$  non conventionnels. Au cours de ma thèse, nous nous sommes tout particulièrement intéressés au phénomène d'auto-réactivité depuis longtemps décrit pour ces cellules. Si de nombreuses équipes ont tenté d'identifier le ligand à l'origine de cette réactivité spontanée des cellules iNKT, d'autres, comme nous, se sont plutôt penchées sur les caractéristiques intrinsèques pouvant rendre ces cellules auto-réactives.

Notre premier objectif était de tester si le tétramère murin CD1d-unloaded (mCD1d-Self) permettait de mettre en évidence des cellules iNKT humaines auto-réactives. A l'origine, cet outil, chargé en glycolipides du Soi, est utilisé comme tétramère *irrelevant* (contrôle) pour l'étude des cellules iNKT murines. Néanmoins, les molécules CD1d sont relativement conservées entre l'Homme et la souris, avec une identité de séquences en acides aminés supérieure à 60% au niveau du domaine de fixation de l'antigène entre les deux espèces. De plus, il existe une cross-réactivité entre le TCR iNKT murin et le CD1d humain, mais également entre le TCR iNKT humain et le CD1d murin, révélant ainsi une « conservation phylogénétique » de la reconnaissance de son ligand par le TCR iNKT (Brossay et al., 1998). C'est ainsi que Guo et ses collaborateurs (Guo et al., 2016) ont mis en évidence la reconnaissance du tétramère humain CD1d-unloaded (hCD1d-Self) par des cellules iNKT murines auto-réactives. Afin d'étudier l'auto-réactivité des cellules iNKT chez l'Homme, nous avons, dans l'autre sens, marqué des lignées cellulaires iNKT humaines avec le tétramère mCD1d-Self, et trié les cellules positives supposées être auto-réactives, ainsi que les cellules négatives supposées non-auto-réactives et utilisées comme contrôle. Si chez un donneur, la lignée mCD1d-Self positive s'est révélée être auto-réactive contre des cibles humaines CD1d<sup>+</sup>, chez un autre donneur, c'est la lignée mCD1d-Self négative qui était auto-réactive. Le même type d'expériences réalisées avec le tétramère hCD1d-OCH, identifié comme marqueur des cellules iNKT humaines auto-réactives par Matulis et ses collègues (Matulis et al., 2010), ne nous a pas permis, dans notre cas, de mettre en évidence de telles cellules. Nous avons également testé des tétramères hCD1d-Self afin d'isoler des cellules iNKT humaines potentiellement auto-réactives, mais nous avons constaté que les cellules purifiées à l'aide de cet outil ne correspondaient pas à des cellules iNKT. Nos résultats indiquent donc que les tétramères mCD1d-Self ne permettent pas d'identifier des cellules iNKT humaines auto-réactives de façon systématique, et que le

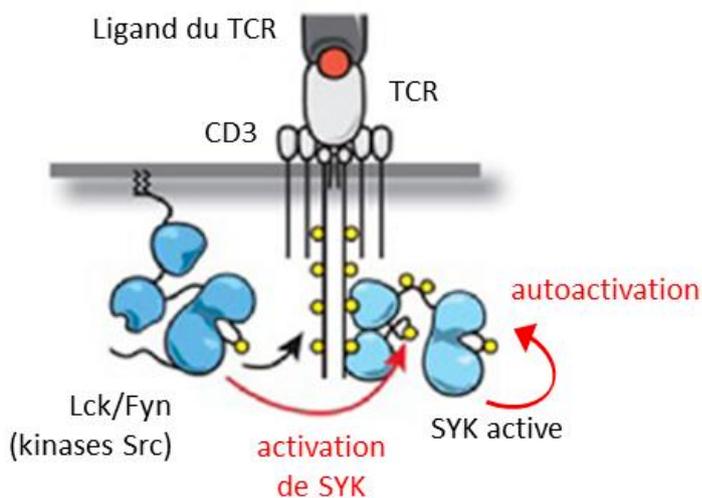
tétramère hCD1d-OCH n'est pas non plus suffisant pour les révéler, puisque certaines lignées iNKT positives pour ce tétramère ne sont pas autoréactives.

N'ayant pas pu identifier un outil tétramère capable de révéler des cellules iNKT humaines autoréactives de manière systématique, il est possible que ces cellules ne soient présentes que chez certains donneurs. Nous avons tout de même généré deux lignées cellulaires possédant cette caractéristique, et avons pu cloner une de ces lignées et mettre en évidence un profil d'autoréactivité variable selon les clones. Comme Matulis (Matulis et al., 2010), et Chamoto (Chamoto et al., 2016) et leurs collaborateurs respectifs, nous nous sommes intéressés à la séquence du TCR de ces clones, et plus particulièrement au CDR3 $\beta$ , seule région variable du TCR iNKT humain. Selon ces deux études, cette séquence aurait un impact sur l'affinité du TCR iNKT pour son ligand, et la présence de motifs particuliers favoriserait l'autoréactivité des cellules. Chamoto *et al.* ont en effet mis en évidence que l'expression d'un CDR3 $\beta$  de 13 acides aminés, l'intégration du segment J $\beta$ 2-5, et la présence d'au moins deux acides aminés acides au sein du CDR3 $\beta$ , constituent trois motifs pouvant conférer une autoréactivité aux cellules iNKT. De manière étonnante, nos résultats montrent que tous les clones que nous avons générés, et issus de la même lignée autoréactive, expriment un TCR identique, qui comprend un motif identifié par Chamoto *et al.*, puisque le CDR3 $\beta$  est composé de deux acides aminés acides. Néanmoins la séquence du TCR la plus exprimée par les cellules de notre autre lignée iNKT autoréactive n'intègre aucun des trois motifs (segment J $\beta$ 2-1 et CDR3 $\beta$  de 16 acides aminés dont un seul acide). Nos résultats indiquent donc que la séquence du TCR iNKT, à elle seule, ne peut pas expliquer des profils d'autoréactivité différents, et que les trois motifs décrits ne confèrent pas systématiquement une autoréactivité aux cellules iNKT.

Ces derniers résultats nous ont donc conduit à poursuivre nos recherches, et à analyser nos clones en RNA *sequencing* afin d'identifier les gènes différemment exprimés et pouvant ainsi conduire aux profils d'autoréactivité observés. La comparaison des résultats entre les trois clones les moins autoréactifs et les trois clones les plus autoréactifs, a notamment mis en évidence la surexpression de l'ARN codant pour la molécule SYK (Spleen Tyrosine Kinase) par les clones les plus autoréactifs. Ces résultats

ont ensuite pu être confirmés par une analyse en cytométrie en flux de l'expression de la protéine SYK par les différents clones.

Cette protéine tyrosine kinase (PTK) est une molécule de signalisation exprimée principalement par les lymphocytes B (Chan et al., 1994). En effet, les souris déficientes pour SYK présentent un important défaut en cellules B, alors que le nombre et la composition en lymphocytes T restent relativement normaux. Cette observation suggère donc un rôle moindre de cette protéine dans la signalisation du TCR. Au premier abord, cette conclusion de Chan *et al.* est en accord avec le fait que les lymphocytes T matures n'expriment peu ou pas de molécules SYK, mais en réalité, si cette observation est vraie pour la majorité des cellules T, une petite partie des lymphocytes T l'exprime néanmoins de manière variable. Au sein de cette population de cellules T SYK positives, cette molécule pourrait notamment favoriser la signalisation TCR de manière co-récepteur indépendante pour les lymphocytes T DN, qui pourraient donc comprendre des cellules iNKT. De manière plus générale, lorsqu'elle est exprimée par les lymphocytes T, la molécule SYK peut s'autophosphoryler et s'autoactiver, permettant ainsi aux premiers événements de la signalisation TCR d'apparaître sans nécessité d'action d'autres molécules, comme les PTKs de la famille Src (Lck et Fyn) (Chu et al., 1998) (Figure 38).



**Figure 38** Schéma de la signalisation TCR via la protéine kinase SYK. Lorsque que le TCR reconnaît son ligand, les protéines kinases de la famille Src (Lck ou Fyn) s'activent et phosphorylent les chaînes du CD3 associé au TCR. Cette phosphorylation permet le recrutement de la protéine kinase SYK, au niveau de ces chaînes du CD3, qui est activée après phosphorylation par les PTK Src ou par autophosphorylation. Modifiée à partir de Courtney *et al.*, 2018.

Il semble donc que la forte expression de la protéine SYK par certains de nos clones iNKT, phénomène normalement inhabituel pour des lymphocytes T, soit en lien avec l'autoréactivité observée pour ces clones. La signalisation TCR de ces clones serait donc favorisée par l'expression de SYK, permettant ainsi la reconnaissance et l'activation de ces cellules iNKT, par abaissement du seuil de réactivité de leur TCR, potentiellement de faible

affinité, face à des glycolipides du Soi faiblement exprimés. En accord avec cette hypothèse, nos résultats montrent qu'il existe une corrélation entre le niveau d'expression de SYK et l'autoréactivité des clones, et que l'expression de cette PTK permet d'abaisser le seuil de réactivité requis contre l' $\alpha$ GalCer (facteur 10 entre les EC50 d'un clone faiblement autoréactif et fortement autoréactif).

En conclusion, l'autoréactivité des cellules iNKT est un phénomène depuis longtemps observé mais dont les bases mécanistiques restent encore mal définies. Deux thématiques de recherche ont alors émergé, l'une visant à identifier les glycolipides du Soi activateurs, et l'autre cherchant à définir des caractéristiques moléculaires intrinsèques aux cellules iNKT pouvant les rendre autoréactives. Si ce type de glycolipide n'a pas encore été clairement identifié, il semble que la séquence du CDR3 $\beta$  du TCR iNKT puisse avoir un impact sur l'apparition de l'autoréactivité. En plus de ces deux propositions, nos résultats mettent en évidence un nouveau facteur pouvant influencer l'autoréactivité des cellules iNKT, à savoir la signalisation intracellulaire médiée par la PTK SYK. Cette nouvelle proposition pour expliquer l'autoréactivité des cellules iNKT n'est pas exclusive des deux autres, puisque l'expression de glycolipides et/ou d'un TCR particuliers, par les CPA et les cellules iNKT respectivement, pourrait être nécessaire en plus d'une signalisation TCR favorisée par l'expression de SYK (Figure 39). L'implication d'une voie de signalisation dans l'autoréactivité des cellules iNKT ne paraît pas si surprenante lorsqu'on sait que, par exemple, en plus de sa nécessité dans le développement des cellules iNKT, la voie de signalisation passant par le récepteur Ly108, de la famille Slam, est aussi impliquée dans l'activation de ces cellules en périphérie (Baglaenko et al., 2017). En outre, si nos résultats mettent en évidence l'importance de la signalisation TCR dans l'autoréactivité des cellules iNKT, il a déjà été démontré chez la souris, que la force du signal TCR avait un impact dans la différenciation terminale des cellules iNKT en sous-populations, à la faveur des cellules iNKT2 et 17 lorsque cette signalisation est forte (Tuttle et al., 2018). Néanmoins, l'analyse de l'expression de SYK sur notre deuxième lignée autoréactive s'est révélée négative, tout comme la présence d'un motif conférant l'autoréactivité décrit par Chamoto *et al.* . Concernant cette lignée, il reste encore la possibilité qu'elle puisse reconnaître des glycolipides endogènes particuliers, ou qu'un autre mécanisme soit à l'origine de son caractère autoréactif. L'ensemble de ces données illustre donc la possibilité que plusieurs

mécanismes puissent intervenir dans l'autoréactivité des cellules iNKT, et ce de manière non exclusive (Figure 39).

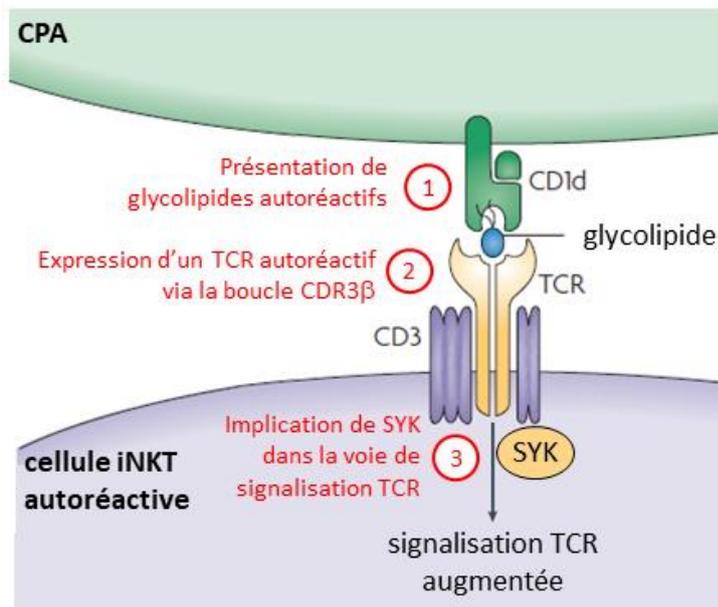
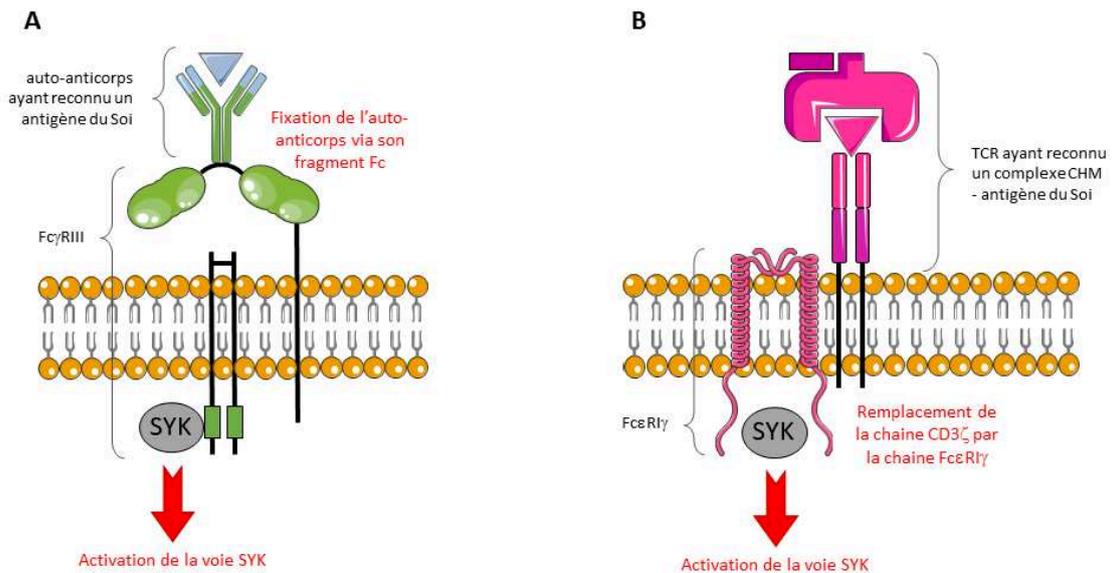


Figure 39 Schéma des différents mécanismes, non exclusifs, identifiés comme étant impliqués dans l'autoréactivité des cellules iNKT. (1) Les CPA peuvent présenter des glycolipides endogènes particuliers. (2) Les caractéristiques intrinsèques du TCR iNKT peuvent lui conférer une autoréactivité, avec la présence de motifs particuliers au sein de la boucle CDR3 $\beta$ . (3) La voie de signalisation du TCR peut être augmentée par l'implication de la protéine tyrosine kinase SYK.

Le rôle de SYK dans l'apparition de maladies autoimmunes a récemment été démontré dans des modèles d'épidermolyse bulleuse acquise (EBA) ou d'arthrite induite par des auto-anticorps. Dans l'EBA, l'inflammation et les cloques qui apparaissent sur l'épiderme sont dues à l'action d'auto-anticorps dirigés contre le collagène. En comparant l'expression de gènes entre des souris développant l'EBA et des souris saines, Samavedam et ses collaborateurs (Samavedam et al., 2018) ont identifié le gène codant pour SYK comme étant surexprimé dans les échantillons de peau des souris malades. Ils ont ensuite pu déterminer que l'apparition de la maladie était liée à l'expression de cette molécule dans des cellules d'origine myéloïde, et non lymphoïde. Ils proposent donc un modèle dans lequel les auto-anticorps dirigés contre le collagène induiraient une inflammation, conduisant au recrutement de cellules myéloïdes, dont les neutrophiles, sur le site inflammatoire au niveau de la peau. Ces cellules myéloïdes fixeraient les auto-anticorps via les Fc $\gamma$ R, ce qui activerait la voie de signalisation impliquant SYK, conduisant à la production de ROS (Reactive Oxygen Species) et de protéases à l'origine de la formation des cloques sur la peau. Il a également été démontré, par Németh et ses collègues (Németh et al., 2018), que l'expression de SYK par les neutrophiles était liée au développement de la maladie dans le modèle murin d'arthrite induite par l'injection d'auto-anticorps, sans pour l'instant avoir pu mettre en évidence le mécanisme. Si dans ces deux exemples, ce

sont les neutrophiles exprimant SYK qui sont impliqués dans l'induction de la maladie auto-immune, il existe des cas de MAI où SYK est impliquée en étant exprimée, cette fois-ci, par des cellules d'origine lymphoïde. En effet, chez des patients atteints de lupus systémique érythémateux, un dysfonctionnement des cellules T a été observé avec des défauts à plusieurs niveaux dans la signalisation TCR, dont l'expression du FcεRIγ associé à la PTK SYK, à la place de la chaîne ζ du CD3 associée à la PTK Zap-70 normalement exprimées par les lymphocytes T (Enyedy et al., 2001). Ce changement engendre une amplification de la signalisation TCR avec une augmentation des phosphorylations sous-jacentes, du relargage de calcium en intracellulaire, et de la production d'IL-2, signes que les lymphocytes T sont suractivés dans la maladie (Nambiar et al., 2003). Concernant les cellules iNKT, il a été démontré que l'expression du FcγRIII pouvait être à l'origine de l'activation des cellules iNKT dans le modèle murin d'arthrite induite par l'injection d'auto-anticorps (H. Y. Kim et al., 2006). Cette injection d'anticorps, reconnus par le FcγRIII, engendre l'activation de la voie de signalisation impliquant Lyn et SYK. Bien que dans plusieurs exemples qui viennent d'être décrits, l'activation des cellules pathologiques (neutrophiles ou iNKT) est dépendante de l'expression de FcγR et de la production d'auto-anticorps (Figure 40A), il n'en reste pas moins que la protéine SYK peut être impliquée dans l'apparition de MAI. Si le modèle d'auto-réactivité que nous avons utilisé n'implique pas d'anticorps, l'ensemble de ces données renforcent tout de même l'idée que la protéine SYK puisse véritablement être impliquée dans des phénomènes d'auto-réactivité des cellules iNKT, dans notre cas via la favorisation de la signalisation TCR, comme cela a été décrit pour les lymphocytes T pathologiques dans le lupus (Enyedy et al., 2001; Nambiar et al., 2003) (Figure 40B).



**Figure 40** Schéma de l'implication de la voie de signalisation SYK dans l'apparition de MAI. **A** Dans les MAI impliquant des auto-anticorps, ces derniers fixent des antigènes du Soi et sont alors reconnus par des FcγR, comme le FcγRIII. L'implication de ce récepteur Fc engendre l'activation de la voie de signalisation SYK dans les neutrophiles ou cellules iNKT par exemple. **B** Dans le lupus, la chaîne ζ du CD3 est remplacée par la chaîne FcεRIγ qui est associée à la voie de signalisation SYK. Dès lors que le TCR reconnaît un complexe CMH-antigène du Soi, la voie de signalisation SYK est activée.

En perspective de ces travaux, il serait intéressant d'étudier l'expression de la PTK SYK par les cellules iNKT dans le contexte de maladies autoimmunes ou de l'allergie (modèles animaux et patients). On peut en effet envisager que dans ce type de maladies, où les cellules iNKT peuvent avoir un rôle délétère, ces dernières exprimeraient la molécule SYK les rendant ainsi plus sensibles et réactives à des glycolipides impliqués dans la pathologie. De plus, si on considère la signalisation TCR comme une balance entre des facteurs activateurs et inhibiteurs, il paraîtrait alors intéressant d'étudier l'expression de phosphatases par les cellules iNKT, afin de déterminer si une sous-expression de protéines inhibitrices pourrait également être impliquée dans une réactivité accrue de ces cellules. Si nos résultats de séquençage ARN sur les clones issus d'une de nos lignées autoréactives a mis en évidence une surexpression de SYK par les clones les plus autoréactifs (en moyenne vingt fois plus que pour les moins autoréactifs), elle a également révélé une surexpression de DUSP2 (pour dual specificity phosphatase 2) par les clones les moins autoréactifs (en moyenne plus de trois fois plus que pour les clones les plus autoréactifs). Cette phosphatase est principalement exprimée dans les cellules d'origine hématopoïétique, dont les lymphocytes T, au sein desquels on observe, suite à une activation, une surexpression transitoire de l'ARN codant pour cette molécule. Cette

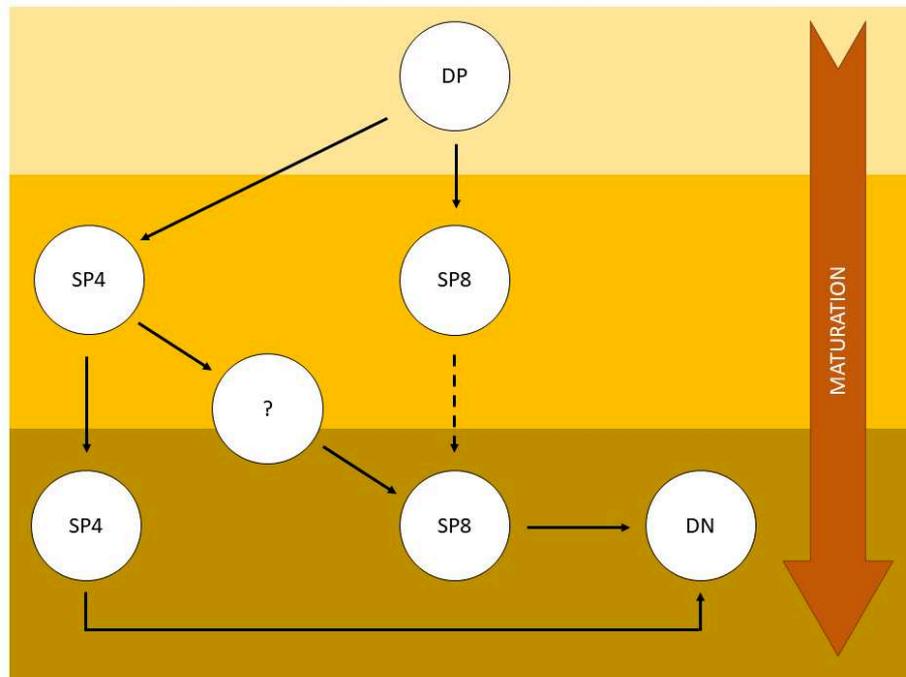
surexpression de DUSP2 permet de moduler l'activation et la prolifération des cellules T, en réprimant par exemple leur production d'IL-2 (Lu et al., 2015). De plus, dans cette même étude, un modèle murin de colite ulcéreuse montre une exacerbation de la maladie en absence d'expression de DUSP2 (souris *Dusp2<sup>-/-</sup>*), liée à une accumulation en cellules Th17 et à une augmentation de l'inflammation au niveau du colon des animaux. Enfin, une analyse de l'expression du gène codant pour cette phosphatase au sein des PBMC de patients atteints de colite ulcéreuse montre une diminution d'expression en comparaison avec des donneurs sains. Tous ces résultats révèlent le rôle de l'absence de phosphatases DUSP2 dans l'apparition de phénomènes pathologiques impliquant les lymphocytes T, et invitent à étudier l'expression de cette protéine dans le contexte de l'autoactivité des cellules iNKT. L'implication d'autres phosphatases pourrait également être étudiée, comme DUSP22 qui est clairement identifiée comme molécule inhibitrice de la signalisation TCR et du développement de l'autoimmunité. En effet, après activation via le CD3, les lymphocytes T de souris déficientes pour DUSP22 (DUSP22 KO), en comparaison avec ceux de souris sauvages, présentent une augmentation de la phosphorylation des premières molécules activées lors de la signalisation TCR, ce qui engendre une augmentation de l'activation, de la prolifération, et de la production de cytokines (IL-2 et IFN $\gamma$ ) par ces lymphocytes. Ce phénotype d'hyperactivité des lymphocytes au sein des souris DUSP22 KO, les conduit à être plus susceptibles au développement de MAI, telle que l'encéphalomyélite induite expérimentalement par l'injection de peptides glycoprotéiques dérivés de la myéline (J.-P. Li et al., 2014). Tout comme DUSP2, l'expression de DUSP22 pourrait donc être altérée au sein des cellules iNKT autoréactives. L'ensemble de ces données renforce notre hypothèse selon laquelle des variations de la balance de signalisation TCR pourrait en partie être à l'origine de l'autoactivité des cellules iNKT.

Outre le fait que nous n'ayons pas pu mettre en évidence un outil tétramère capable d'identifier des cellules iNKT autoréactives, l'absence d'un tel tétramère ne nous a pas non plus permis d'analyser directement les phénomènes de sélection des cellules iNKT à partir d'échantillons de thymus humains. En effet, ce type d'outil nous aurait permis de déterminer si les cellules iNKT autoréactives, ou une partie d'entre elles, subissent ou non une sélection négative, et s'il existe une variation du nombre de ces cellules en fonction des donneurs ou de leur âge. Néanmoins, grâce aux tétramères CD1d- $\alpha$ GalCer nous avons

tout de même pu étudier le profil des cellules iNKT au cours de leur développement chez l'Homme, jusqu'à analyser le stade terminal de différenciation en sous-populations iNKT1, 2 et 17 pour l'instant seulement identifiés chez la souris.

Notre analyse, à l'aide de marqueurs exprimés séquentiellement au cours du développement, a révélé un schéma de maturation des cellules iNKT correspondant à celui observé pour les lymphocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels. Cependant, dans le cas des cellules iNKT, il existe un compartiment DN, que nous avons pu identifier au niveau thymique et caractériser comme étant très avancé dans le processus de maturation. Cette observation nous laisse à penser que ce compartiment pourrait dériver, au sein du thymus, à partir du compartiment SP4 et/ou SP8 qui perdraient l'expression de leur co-récepteur restant (Figure 41). La comparaison des fréquences des différents compartiments, entre le thymus et la périphérie, révèle une perte complète du compartiment DP en périphérie suite à l'engagement complet de ces cellules dans le thymus vers les compartiments CD4 et CD8 (et aussi à terme DN). Les trois autres compartiments sont enrichis en périphérie, mais à des degrés différents, à savoir bien plus fortement pour les compartiments SP8 et DN. Cette observation suggère donc que les compartiments SP4, SP8 et DN ont été amplifiés suite à leur sortie du thymus. En outre, s'il est possible que les cellules DN dérivent d'un autre compartiment au niveau thymique, il est aussi envisageable qu'elles puissent dériver en périphérie du compartiment CD4 ou CD8, avec une faveur pour le compartiment CD4, ce qui pourrait expliquer un facteur d'amplification plus faible observé pour ce dernier. Lors de l'analyse thymique des cellules iNKT, nous avons pu observer une dualité au sein du compartiment SP8, avec des cellules se rapprochant du profil plus immature DP et d'autres du profil plus mature SP4. Il est aussi intéressant de noter que l'on n'observe pas de perte progressive du marquage CD1a au sein du compartiment SP8. Cette observation pourrait suggérer, comme il a déjà été décrit pour les lymphocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels (Vanhecke et al., 1997), qu'il existerait un intermédiaire iNKT CD4<sup>+</sup> suite au stade DP, qui donnerait naissance aux compartiments SP4 et SP8, dans notre cas les cellules SP8 avec un profil mature. Cette hypothèse expliquerait ainsi l'absence de transition dans le marquage CD1a, avec une partie du compartiment SP8 qui dériverait directement du compartiment DP d'où leur phénotype SP8 CD1a<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, et une autre partie qui dériverait d'un intermédiaire plus mature CD4<sup>+</sup> ayant déjà perdu l'expression du CD1a, d'où leur phénotype SP8 CD1a-

CD69<sup>low</sup>. Cette dernière voie de maturation du compartiment SP8 pourrait comprendre un intermédiaire entre le stade SP4 et SP8, avec pourquoi pas une réexpression progressive du CD8 avant la perte du CD4, donnant ainsi naissance à un phénotype CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup> (Figure 41).



**Figure 41** Modèle de différenciation des cellules iNKT humaines au niveau thymique. Les cellules iNKT dériveraient toutes du stade immature DP. Ce compartiment pourrait donner naissance à un compartiment SP8 avec un niveau de maturation intermédiaire, dont on ne peut pas exclure qu'il pourrait être à l'origine du compartiment SP8 mature (flèche en pointillés). Le compartiment SP4 dériverait également du stade DP avec une maturation progressive. Un intermédiaire SP4, pas complètement mature, pourrait aussi donner naissance au compartiment SP8 mature, avec entre les deux un intermédiaire dont le phénotype n'est pas établi (?), mais pourrait être CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup>. Enfin le compartiment DN mature dériverait des compartiments SP4 et SP8 matures.

En plus d'essayer de déterminer le cheminement des cellules iNKT au sein du thymus, nous avons également pu analyser, au sein des thymocytes iNKT humains, l'expression de facteurs de transcription décrits chez la souris. Nous avons ainsi mis en évidence que chez l'Homme aussi, le facteur PLZF est exprimé par la quasi-totalité des thymocytes iNKT, et constitue donc une signature moléculaire de cette sous-population de lymphocytes T. Comme chez la souris, l'expression de ce facteur pourrait dépendre de la molécule Egr2, dont un site de fixation est retrouvé au sein du promoteur du gène codant PLZF (Zbtb16) chez les deux espèces (Seiler et al., 2012). En revanche, l'analyse des facteurs de transcription, mis en évidence dans les différentes sous-populations de cellules iNKT murines au niveau thymique (T-bet pour iNKT1, GATA-3 pour iNKT2, et ROR $\gamma$ t pour

iNKT17), ne s'est pas révélée concluante en ce qui concerne les thymocytes iNKT humains. Nous avons réalisé cette même expérience à partir de PBMCs provenant de donneurs sains, et une fois encore, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'expression de ces facteurs de transcription au sein des cellules iNKT des individus testés. Pourtant en périphérie, des cellules iNKT avec des profils cytokiniques distincts, à l'image des sous-populations murines, ont pu être mises en évidence (Chang et al., 2012; Gutierrez-Arcelus et al., 2019; Knox et al., 2014; Venken et al., 2019). Il apparaît donc que chez l'Homme, à l'instar des cellules T conventionnelles CD4<sup>+</sup> helper, les sous-populations de cellules iNKT ne semblent pas se définir au niveau thymique, et qu'elles apparaîtraient plutôt en périphérie en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent (cytokines, inflammation, contexte pathologique (Venken et al., 2019)). Ces sous-populations distinctes de cellules iNKT se trouveraient donc en faible fréquence chez des individus sains, ou pourraient être confinées dans des organes particuliers (autre que le sang, (Chang et al., 2012)), d'où nos résultats sur l'analyse des facteurs de transcription sur les PBMCs d'individus sains.

Nos premiers travaux sur l'auto-réactivité des cellules iNKT, ont mis en évidence l'implication de la PTK SYK dans l'apparition de ce phénomène. Il semblait donc pertinent de s'intéresser à l'expression de cette molécule au niveau thymique, afin de déterminer si elle pouvait être acquise lors du développement de ces cellules. Nous avons d'abord généré des lignées cellulaires de thymocytes iNKT que nous avons ensuite testées pour leur auto-réactivité. Une seule de ces lignées s'est révélée réactive face à des cibles CD1d<sup>+</sup> présentant des glycolipides endogènes. Néanmoins, cette lignée n'exprimait pas la PTK SYK, signe que l'auto-réactivité des cellules iNKT n'est pas systématiquement engendrée par le mécanisme que nous avons mis en évidence. La stimulation et la culture pouvant engendrer un biais sur nos lignées d'origine thymique, nous avons ensuite analysé l'expression de cette molécule par des thymocytes iNKT directement *ex vivo*. Nos résultats indiquent que les thymocytes iNKT, exprimant donc un TCR capable de reconnaître le tétramère CD1d- $\alpha$ GalCer et comprenant le segment V $\beta$ 11, n'expriment en revanche pas la PTK SYK. Ce résultat est en accord avec le modèle de développement des lymphocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels concernant l'expression de SYK. En effet, cette PTK est exprimée très précocement lors de la différenciation thymique, aux stades DN et iSP4 (stade intermédiaire SP4 entre le stade DN et DP) où le pré-TCR (chaines  $\beta$  et pT $\alpha$ ) délivre des

signaux, puis son expression diminue dans les stades suivants (Chu et al., 1999). Or dans notre étude, nous analysons des thymocytes iNKT exprimant le TCR iNKT mature donc déjà bien avancés dans leur processus de développement, d'où l'absence d'expression de SYK au sein de ces cellules. Néanmoins, nous avons identifié des cellules iNKT périphériques autoréactives, qui devraient normalement être éliminées lors de la sélection négative, et qui sont SYK<sup>+</sup>. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène : i) ces cellules auraient échappé à la sélection négative pour ensuite rejoindre la périphérie, or leur fréquence étant certainement très faible, nous ne serions pas en mesure de les identifier directement *ex vivo*, ii) ces cellules auraient acquis l'expression de SYK en périphérie dans un contexte spécifique, comme lors de la rencontre avec un glycolipide endogène, ou dans un environnement cytokinique particulier.

Etant donné que l'autoréactivité de notre lignée de thymocytes iNKT ne semble pas due à l'expression de SYK, il serait intéressant d'étudier plus en profondeur cette lignée afin d'identifier le mécanisme associé. Le séquençage des TCR exprimés par ces thymocytes serait une première piste pour déterminer si, dans ce cas, l'expression d'un TCR particulier, et notamment d'une boucle CDR3 $\beta$  serait à l'origine de l'autoréactivité de ces cellules.

En conclusion, si beaucoup d'informations concernant les cellules iNKT sont disponibles chez la souris, nos deux projets de recherche ont pu mettre en évidence des données sur cette population chez l'Homme. Il apparaît ainsi que le développement des cellules iNKT humaines semble suivre le schéma établi pour les lymphocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels, avec la présence en plus d'un compartiment DN. Nous avons également identifié un nouveau mécanisme moléculaire, impliquant la signalisation TCR, et pouvant conduire à l'autoréactivité des cellules iNKT. Néanmoins cette nouvelle voie n'est pas systématiquement à l'origine d'une autoréactivité, et les recherches dans ce domaine restent donc à poursuivre.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Adachi, Y., Koseki, H., Zijlstra, M., Taniguchi, M., 1995. Positive selection of invariant V alpha 14+ T cells by non-major histocompatibility complex-encoded class I-like molecules expressed on bone marrow-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 1200–1204. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.1200>
- Akbari, O., Stock, P., Meyer, E., Kronenberg, M., Sidobre, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Grusby, M.J., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T., 2003. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* 9, 582–588. <https://doi.org/10.1038/nm851>
- Albacker, L.A., Chaudhary, V., Chang, Y.-J., Kim, H.Y., Chuang, Y.-T., Pichavant, M., DeKruyff, R.H., Savage, P.B., Umetsu, D.T., 2013. Invariant natural killer T cells recognize a fungal glycosphingolipid that can induce airway hyperreactivity. *Nat. Med.* 19, 1297–1304. <https://doi.org/10.1038/nm.3321>
- Alberola-Ila, J., Hogquist, K.A., Swan, K.A., Bevan, M.J., Perlmutter, R.M., 1996. Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *J. Exp. Med.* 184, 9–18. <https://doi.org/10.1084/jem.184.1.9>
- Arase, H., Arase, N., Kobayashi, Y., Nishimura, Y., Yonehara, S., Onoé, K., 1994. Cytotoxicity of fresh NK1.1+ T cell receptor alpha/beta+ thymocytes against a CD4+8+ thymocyte population associated with intact Fas antigen expression on the target. *J. Exp. Med.* 180, 423–432. <https://doi.org/10.1084/jem.180.2.423>
- Arase, H., Arase, N., Ogasawara, K., Good, R.A., Onoé, K., 1992. An NK1.1+ CD4+8- single-positive thymocyte subpopulation that expresses a highly skewed T-cell antigen receptor V beta family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6506–6510. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.14.6506>
- Araujo, L.M., Chauvineau, A., Zhu, R., Diem, S., Bourgeois, E.A., Levescot, A., Huerre, M., Gombert, J.-M., Bayry, J., Daëron, M., Bruhns, P., Kaveri, S.V., Herbelin, A., 2011. Cutting Edge: Intravenous Ig Inhibits Invariant NKT Cell-Mediated Allergic Airway Inflammation through FcγRIIIA-Dependent Mechanisms. *J. Immunol.* 186, 3289–3293. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003076>
- Araujo, L.M., Lefort, J., Nahori, M.-A., Diem, S., Zhu, R., Dy, M., Leite-de-Moraes, M.C., Bach, J.F., Vargaftig, B.B., Herbelin, A., 2004. Exacerbated Th2-mediated airway inflammation and hyperresponsiveness in autoimmune diabetes-prone NOD mice: a critical role for CD1d-dependent NKT cells. *Eur. J. Immunol.* 34, 327–335. <https://doi.org/10.1002/eji.200324151>
- Azzam, H.S., Grinberg, A., Lui, K., Shen, H., Shores, E.W., Love, P.E., 1998. CD5 Expression Is Developmentally Regulated By T Cell Receptor (TCR) Signals and TCR Avidity. *J. Exp. Med.* 188, 2301–2311. <https://doi.org/10.1084/jem.188.12.2301>
- Baev, D.V., Peng, X.-H., Song, L., Barnhart, J.R., Crooks, G.M., Weinberg, K.I., Metelitsa, L.S., 2004. Distinct homeostatic requirements of CD4+ and CD4- subsets of Vα24-invariant natural killer T cells in humans. *Blood* 104, 4150–4156. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1629>
- Baglaenko, Y., Cruz Tleugabulova, M., Gracey, E., Talaei, N., Manion, K.P., Chang, N.-H., Ferri, D.M., Mallevaey, T., Wither, J.E., 2017. Invariant NKT Cell Activation Is Potentiated by Homotypic trans-Ly108 Interactions. *J. Immunol.* 198, 3949–3962. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601369>

- Barthelemy, A., Ivanov, S., Fontaine, J., Soulard, D., Bouabe, H., Paget, C., Faveeuw, C., Trottein, F., 2017. Influenza A virus-induced release of interleukin-10 inhibits the anti-microbial activities of invariant natural killer T cells during invasive pneumococcal superinfection. *Mucosal Immunol.* 10, 460–469. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.49>
- Beaudoin, L., Laloux, V., Novak, J., Lucas, B., Lehuen, A., 2002. NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells. *Immunity* 17, 725–736. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00473-9](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00473-9)
- Beckman, E.M., Porcelli, S.A., Morita, C.T., Behar, S.M., Furlong, S.T., Brenner, M.B., 1994. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature* 372, 691–694. <https://doi.org/10.1038/372691a0>
- Bedel, R., Berry, R., Mallevaey, T., Matsuda, J.L., Zhang, J., Godfrey, D.I., Rossjohn, J., Kappler, J.W., Marrack, P., Gapin, L., 2014. Effective functional maturation of invariant natural killer T cells is constrained by negative selection and T-cell antigen receptor affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E119–128. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320777110>
- Behar, S.M., Podrebarac, T.A., Roy, C.J., Wang, C.R., Brenner, M.B., 1999. Diverse TCRs recognize murine CD1. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 162, 161–167.
- Bendelac, A., 1995. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J. Exp. Med.* 182, 2091–2096. <https://doi.org/10.1084/jem.182.6.2091>
- Bendelac, A., Killeen, N., Littman, D., Schwartz, R., 1994. A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science* 263, 1774–1778. <https://doi.org/10.1126/science.7907820>
- Bendelac, A., Lantz, O., Quimby, M., Yewdell, J., Bennink, Brutkiewicz, R., 1995. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* 268, 863–865. <https://doi.org/10.1126/science.7538697>
- Bendelac, A., Rivera, M.N., Park, S.H., Roark, J.H., 1997. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 535–562. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.535>
- Bendelac, A., Savage, P.B., Teyton, L., 2007. The Biology of NKT Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 297–336. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711>
- Benlagha, K., Wei, D.G., Veiga, J., Teyton, L., Bendelac, A., 2005. Characterization of the early stages of thymic NKT cell development. *J. Exp. Med.* 202, 485–492. <https://doi.org/10.1084/jem.20050456>
- Benlagha, K., Weiss, A., Beavis, A., Teyton, L., Bendelac, A., 2000. In Vivo Identification of Glycolipid Antigen-Specific T Cells Using Fluorescent Cd1d Tetramers. *J. Exp. Med.* 191, 1895–1904. <https://doi.org/10.1084/jem.191.11.1895>
- Berzins, S.P., Cochrane, A.D., Pellicci, D.G., Smyth, M.J., Godfrey, D.I., 2005. Limited correlation between human thymus and blood NKT cell content revealed by an ontogeny study of paired tissue samples. *Eur. J. Immunol.* 35, 1399–1407. <https://doi.org/10.1002/eji.200425958>
- Bezbradica, J.S., Hill, T., Stanic, A.K., Van Kaer, L., Joyce, S., 2005. Commitment toward the natural T (iNKT) cell lineage occurs at the CD4+8+ stage of thymic ontogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 5114–5119. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408449102>
- Bix, M., Coles, M., Raulet, D., 1993. Positive selection of V beta 8+ CD4-8- thymocytes by

- class I molecules expressed by hematopoietic cells. *J. Exp. Med.* 178, 901–908. <https://doi.org/10.1084/jem.178.3.901>
- Borg, N.A., Wun, K.S., Kjer-Nielsen, L., Wilce, M.C.J., Pellicci, D.G., Koh, R., Besra, G.S., Bharadwaj, M., Godfrey, D.I., McCluskey, J., Rossjohn, J., 2007. CD1d–lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor. *Nature* 448, 44–49. <https://doi.org/10.1038/nature05907>
- Bousquet, J., Weltgesundheitsorganisation (Eds.), 2007. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach. WHO, Geneva.
- Bradbury, A., Calabi, F., Milstein, C., 1990. Expression of CD1 in the mouse thymus. *Eur. J. Immunol.* 20, 1831–1836. <https://doi.org/10.1002/eji.1830200830>
- Brennan, P.J., Tatituri, R.V.V., Brigl, M., Kim, E.Y., Tuli, A., Sanderson, J.P., Gadola, S.D., Hsu, F.-F., Besra, G.S., Brenner, M.B., 2011. Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. *Nat. Immunol.* 12, 1202–1211. <https://doi.org/10.1038/ni.2143>
- Brennan, P.J., Tatituri, R.V.V., Heiss, C., Watts, G.F.M., Hsu, F.-F., Veerapen, N., Cox, L.R., Azadi, P., Besra, G.S., Brenner, M.B., 2014. Activation of iNKT cells by a distinct constituent of the endogenous glucosylceramide fraction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 13433–13438. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415357111>
- Brigl, M., Brenner, M.B., 2004. CD1: Antigen Presentation and T Cell Function. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 817–890. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104608>
- Brossay, L., Chioda, M., Burdin, N., Koezuka, Y., Casorati, G., Dellabona, P., Kronenberg, M., 1998. CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J. Exp. Med.* 188, 1521–1528. <https://doi.org/10.1084/jem.188.8.1521>
- Canchis, P.W., Bhan, A.K., Landau, S.B., Yang, L., Balk, S.P., Blumberg, R.S., 1993. Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d. *Immunology* 80, 561–565.
- Canté-Barrett, K., Mendes, R.D., Li, Y., Vroegindewij, E., Pike-Overzet, K., Wabeke, T., Langerak, A.W., Pieters, R., Staal, F.J.T., Meijerink, J.P.P., 2017. Loss of CD44dim Expression from Early Progenitor Cells Marks T-Cell Lineage Commitment in the Human Thymus. *Front. Immunol.* 8, 32. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00032>
- Cardell, S., Tangri, S., Chan, S., Kronenberg, M., Benoist, C., Mathis, D., 1995. CD1-restricted CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *J. Exp. Med.* 182, 993–1004. <https://doi.org/10.1084/jem.182.4.993>
- Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S.H., Beavis, A., Koezuka, Y., Bendelac, A., 1999. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 163, 4647–4650.
- Chaidos, A., Patterson, S., Szydlo, R., Chaudhry, M.S., Dazzi, F., Kanfer, E., McDonald, D., Marin, D., Milojkovic, D., Pavlu, J., Davis, J., Rahemtulla, A., Rezvani, K., Goldman, J., Roberts, I., Apperley, J., Karadimitris, A., 2012. Graft invariant natural killer T-cell dose predicts risk of acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 119, 5030–5036. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-389304>

- Chamoto, K., Guo, T., Imataki, O., Tanaka, M., Nakatsugawa, M., Ochi, T., Yamashita, Y., Saito, A.M., Saito, T.I., Butler, M.O., Hirano, N., 2016. CDR3 $\beta$  sequence motifs regulate autoreactivity of human invariant NKT cell receptors. *J. Autoimmun.* 68, 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.12.005>
- Chan, A.C., Leeansyah, E., Cochrane, A., d' Udekem d' Acoz, Y., Mittag, D., Harrison, L.C., Godfrey, D.I., Berzins, S.P., 2013. Ex-vivo analysis of human Natural Killer T cells demonstrates heterogeneity between tissues and within established CD4+ and CD4- subsets: Heterogeneity within human NKT cell subsets. *Clin. Exp. Immunol.* 172, 129–137. <https://doi.org/10.1111/cei.12045>
- Chan, A.C., van Oers, N.S., Tran, A., Turka, L., Law, C.L., Ryan, J.C., Clark, E.A., Weiss, A., 1994. Differential expression of ZAP-70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 152, 4758–4766.
- Chandra, S., Zhao, M., Budelsky, A., de Mingo Pulido, A., Day, J., Fu, Z., Siegel, L., Smith, D., Kronenberg, M., 2015. A new mouse strain for the analysis of invariant NKT cell function. *Nat. Immunol.* 16, 799–800. <https://doi.org/10.1038/ni.3203>
- Chang, P.-P., Barral, P., Fitch, J., Pratama, A., Ma, C.S., Kallies, A., Hogan, J.J., Cerundolo, V., Tangye, S.G., Bittman, R., Nutt, S.L., Brink, R., Godfrey, D.I., Batista, F.D., Vinuesa, C.G., 2012. Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. *Nat. Immunol.* 13, 35–43. <https://doi.org/10.1038/ni.2166>
- Chen, H., Huang, H., Paul, W.E., 1997. NK1.1+ CD4+ T cells lose NK1.1 expression upon in vitro activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 158, 5112–5119.
- Chen, N., McCarthy, C., Drakesmith, H., Li, D., Cerundolo, V., McMichael, A.J., Screaton, G.R., Xu, X.-N., 2006. HIV-1 down-regulates the expression of CD1d via Nef. *Eur. J. Immunol.* 36, 278–286. <https://doi.org/10.1002/eji.200535487>
- Chen, Y.-G., Choisy-Rossi, C.-M., Holl, T.M., Chapman, H.D., Besra, G.S., Porcelli, S.A., Shaffer, D.J., Roopenian, D., Wilson, S.B., Serreze, D.V., 2005. Activated NKT Cells Inhibit Autoimmune Diabetes through Tolerogenic Recruitment of Dendritic Cells to Pancreatic Lymph Nodes. *J. Immunol.* 174, 1196–1204. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.3.1196>
- Chiu, Y.-H., Jayawardena, J., Weiss, A., Lee, D., Park, S.-H., Dautry-Varsat, A., Bendelac, A., 1999. Distinct Subsets of CD1d-restricted T Cells Recognize Self-antigens Loaded in Different Cellular Compartments. *J. Exp. Med.* 189, 103–110. <https://doi.org/10.1084/jem.189.1.103>
- Cho, S., Knox, K.S., Kohli, L.M., He, J.J., Exley, M.A., Wilson, S.B., Brutkiewicz, R.R., 2005. Impaired cell surface expression of human CD1d by the formation of an HIV-1 Nef/CD1d complex. *Virology* 337, 242–252. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.04.020>
- Christiansen, D., Milland, J., Mouhtouris, E., Vaughan, H., Pellicci, D.G., McConville, M.J., Godfrey, D.I., Sandrin, M.S., 2008. Humans Lack iGb3 Due to the Absence of Functional iGb3-Synthase: Implications for NKT Cell Development and Transplantation. *PLoS Biol.* 6, e172. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060172>
- Chu, D.H., Morita, C.T., Weiss, A., 1998. The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol. Rev.* 165, 167–180. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1998.tb01238.x>

- Chu, D.H., van Oers, N.S., Malissen, M., Harris, J., Elder, M., Weiss, A., 1999. Pre-T cell receptor signals are responsible for the down-regulation of Syk protein tyrosine kinase expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 2610–2620.
- Chun, T., Page, M.J., Gapin, L., Matsuda, J.L., Xu, H., Nguyen, H., Kang, H.-S., Stanic, A.K., Joyce, S., Koltun, W.A., Chorney, M.J., Kronenberg, M., Wang, C.-R., 2003. CD1d-expressing Dendritic Cells but Not Thymic Epithelial Cells Can Mediate Negative Selection of NKT Cells. *J. Exp. Med.* 197, 907–918. <https://doi.org/10.1084/jem.20021366>
- Chung, B., Aoukaty, A., Dutz, J., Terhorst, C., Tan, R., 2005. Cutting Edge: Signaling Lymphocytic Activation Molecule-Associated Protein Controls NKT Cell Functions. *J. Immunol.* 174, 3153–3157. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3153>
- Coman, T., Rossignol, J., D'Aveni, M., Fabiani, B., Dussiot, M., Rignault, R., Babdor, J., Bouillé, M., Herbelin, A., Coté, F., Moura, I.C., Hermine, O., Rubio, M.-T., 2018. Human CD4- invariant NKT lymphocytes regulate graft versus host disease. *Oncoimmunology* 7, e1470735. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1470735>
- Constantinides, M.G., McDonald, B.D., Verhoef, P.A., Bendelac, A., 2014. A committed precursor to innate lymphoid cells. *Nature* 508, 397–401. <https://doi.org/10.1038/nature13047>
- Coquet, J.M., Kyparissoudis, K., Pellicci, D.G., Besra, G., Berzins, S.P., Smyth, M.J., Godfrey, D.I., 2007. IL-21 Is Produced by NKT Cells and Modulates NKT Cell Activation and Cytokine Production. *J. Immunol.* 178, 2827–2834. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2827>
- Darmoise, A., Teneberg, S., Bouzonville, L., Brady, R.O., Beck, M., Kaufmann, S.H.E., Winau, F., 2010. Lysosomal  $\alpha$ -Galactosidase Controls the Generation of Self Lipid Antigens for Natural Killer T Cells. *Immunity* 33, 216–228. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.003>
- Dashtsoodol, N., Shigeura, T., Aihara, M., Ozawa, R., Kojo, S., Harada, M., Endo, T.A., Watanabe, T., Ohara, O., Taniguchi, M., 2017. Alternative pathway for the development of V $\alpha$ 14+ NKT cells directly from CD4–CD8– thymocytes that bypasses the CD4+CD8+ stage. *Nat. Immunol.* 18, 274–282. <https://doi.org/10.1038/ni.3668>
- Dellabona, P., Padovan, E., Casorati, G., Brockhaus, M., Lanzavecchia, A., 1994. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J. Exp. Med.* 180, 1171–1176. <https://doi.org/10.1084/jem.180.3.1171>
- Diana, J., Brezar, V., Beaudoin, L., Dalod, M., Mellor, A., Tafuri, A., von Herrath, M., Boitard, C., Mallone, R., Lehuen, A., 2011. Viral infection prevents diabetes by inducing regulatory T cells through NKT cell-plasmacytoid dendritic cell interplay. *J. Exp. Med.* 208, 729–745. <https://doi.org/10.1084/jem.20101692>
- Diana, J., Griseri, T., Lagaye, S., Beaudoin, L., Autrusseau, E., Gautron, A.-S., Tomkiewicz, C., Herbelin, A., Barouki, R., von Herrath, M., Dalod, M., Lehuen, A., 2009. NKT cell-plasmacytoid dendritic cell cooperation via OX40 controls viral infection in a tissue-specific manner. *Immunity* 30, 289–299. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.12.017>
- Dougan, S.K., Kaser, A., Blumberg, R.S., 2007. CD1 expression on antigen-presenting cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 314, 113–141.
- Dutta, M., Kraus, Z.J., Gomez-Rodriguez, J., Hwang, S., Cannons, J.L., Cheng, J., Lee, S.-Y.,

- Wiest, D.L., Wakeland, E.K., Schwartzberg, P.L., 2013. A Role for Ly108 in the Induction of Promyelocytic Zinc Finger Transcription Factor in Developing Thymocytes. *J. Immunol.* 190, 2121–2128. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202145>
- Eberl, G., Lowin-Kropf, B., MacDonald, H.R., 1999. Cutting edge: NKT cell development is selectively impaired in Fyn- deficient mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 4091–4094.
- Eberl, G., MacDonald, H.R., 2000. Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells. *Eur. J. Immunol.* 30, 985–992. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(200004\)30:4<985::AID-IMMU985>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(200004)30:4<985::AID-IMMU985>3.0.CO;2-E)
- Egawa, T., Eberl, G., Taniuchi, I., Benlagha, K., Geissmann, F., Hennighausen, L., Bendelac, A., Littman, D.R., 2005. Genetic Evidence Supporting Selection of the V $\alpha$ 14i NKT Cell Lineage from Double-Positive Thymocyte Precursors. *Immunity* 22, 705–716. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.03.011>
- Enyedy, E.J., Nambiar, M.P., Liossis, S.N., Dennis, G., Kammer, G.M., Tsokos, G.C., 2001. Fc epsilon receptor type I gamma chain replaces the deficient T cell receptor zeta chain in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 44, 1114–1121. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200105\)44:5<1114::AID-ANR192>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200105)44:5<1114::AID-ANR192>3.0.CO;2-B)
- Exley, M., Garcia, J., Balk, S.P., Porcelli, S., 1997. Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. *J. Exp. Med.* 186, 109–120. <https://doi.org/10.1084/jem.186.1.109>
- Facciotti, F., Ramanjaneyulu, G.S., Lepore, M., Sansano, S., Cavallari, M., Kistowska, M., Forss-Petter, S., Ni, G., Colone, A., Singhal, A., Berger, J., Xia, C., Mori, L., De Libero, G., 2012. Peroxisome-derived lipids are self antigens that stimulate invariant natural killer T cells in the thymus. *Nat. Immunol.* 13, 474–480. <https://doi.org/10.1038/ni.2245>
- Florence, W.C., Xia, C., Gordy, L.E., Chen, W., Zhang, Y., Scott-Browne, J., Kinjo, Y., Yu, K.O.A., Keshipeddy, S., Pellicci, D.G., Patel, O., Kjer-Nielsen, L., McCluskey, J., Godfrey, D.I., Rossjohn, J., Richardson, S.K., Porcelli, S.A., Howell, A.R., Hayakawa, K., Gapin, L., Zajonc, D.M., Wang, P.G., Joyce, S., 2009. Adaptability of the semi-invariant natural killer T-cell receptor towards structurally diverse CD1d-restricted ligands. *EMBO J.* 28, 3579–3590. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.286>
- Fowlkes, B.J., Kruisbeek, A.M., Ton-That, H., Weston, M.A., Coligan, J.E., Schwartz, R.H., Pardoll, D.M., 1987. A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. *Nature* 329, 251–254. <https://doi.org/10.1038/329251a0>
- Fox, L.M., Cox, D.G., Lockridge, J.L., Wang, X., Chen, X., Scharf, L., Trott, D.L., Ndonge, R.M., Veerapen, N., Besra, G.S., Howell, A.R., Cook, M.E., Adams, E.J., Hildebrand, W.H., Gumperz, J.E., 2009. Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes. *PLoS Biol.* 7, e1000228. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000228>
- Fujii, S., Shimizu, K., Smith, C., Bonifaz, L., Steinman, R.M., 2003. Activation of Natural Killer T Cells by  $\alpha$ -Galactosylceramide Rapidly Induces the Full Maturation of Dendritic Cells In Vivo and Thereby Acts as an Adjuvant for Combined CD4 and CD8 T Cell Immunity to a Coadministered Protein. *J. Exp. Med.* 198, 267–279. <https://doi.org/10.1084/jem.20030324>
- Gadola, S.D., Koch, M., Marles-Wright, J., Lissin, N.M., Shepherd, D., Matulis, G., Harlos, K.,

- Villiger, P.M., Stuart, D.I., Jakobsen, B.K., Cerundolo, V., Jones, E.Y., 2006. Structure and binding kinetics of three different human CD1d- $\alpha$ -galactosylceramide-specific T cell receptors. *J. Exp. Med.* 203, 699–710. <https://doi.org/10.1084/jem.20052369>
- Gadue, P., Morton, N., Stein, P.L., 1999. The Src Family Tyrosine Kinase Fyn Regulates Natural Killer T Cell Development. *J. Exp. Med.* 190, 1189–1196. <https://doi.org/10.1084/jem.190.8.1189>
- Gadue, P., Stein, P.L., 2002. NK T Cell Precursors Exhibit Differential Cytokine Regulation and Require I $\kappa$ k for Efficient Maturation. *J. Immunol.* 169, 2397–2406. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.5.2397>
- Galli, G., Nuti, S., Tavarini, S., Galli-Stampino, L., De Lalla, C., Casorati, G., Dellabona, P., Abrignani, S., 2003. CD1d-restricted Help To B Cells By Human Invariant Natural Killer T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* 197, 1051–1057. <https://doi.org/10.1084/jem.20021616>
- Gao, Y., Williams, A.P., 2015. Role of Innate T Cells in Anti-Bacterial Immunity. *Front. Immunol.* 6, 302. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00302>
- Gapin, L., 2016. Development of invariant natural killer T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 39, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.01.001>
- Gapin, L., Godfrey, D.I., Rossjohn, J., 2013. Natural Killer T cell obsession with self-antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.01.002>
- Gapin, L., Matsuda, J.L., Surh, C.D., Kronenberg, M., 2001. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat. Immunol.* 2, 971–978. <https://doi.org/10.1038/ni710>
- Ghazarian, L., Diana, J., Beaudoin, L., Larsson, P.G., Puri, R.K., van Rooijen, N., Flodström-Tullberg, M., Lehuen, A., 2013. Protection against type 1 diabetes upon Cocksackievirus B4 infection and iNKT-cell stimulation: role of suppressive macrophages. *Diabetes* 62, 3785–3796. <https://doi.org/10.2337/db12-0958>
- Gilhar, A., Ullmann, Y., Assy, B., Shalaginov, R., Serafimovich, S., Kerner, H., Kalish, R.S., 2002. Psoriasis is Mediated by a Cutaneous Defect Triggered by Activated Immunocytes: Induction of Psoriasis by Cells with Natural Killer Receptors. *J. Invest. Dermatol.* 119, 384–391. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01812.x>
- Gober, M.D., Fischelevich, R., Zhao, Y., Unutmaz, D., Gaspari, A.A., 2008. Human Natural Killer T Cells Infiltrate into the Skin at Elicitation Sites of Allergic Contact Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 128, 1460–1469. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701199>
- Godfrey, D.I., Le Nours, J., Andrews, D.M., Uldrich, A.P., Rossjohn, J., 2018. Unconventional T Cell Targets for Cancer Immunotherapy. *Immunity* 48, 453–473. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.009>
- Godfrey, D.I., MacDonald, H.R., Kronenberg, M., Smyth, M.J., Kaer, L.V., 2004. NKT cells: what's in a name? *Nat. Rev. Immunol.* 4, 231–237. <https://doi.org/10.1038/nri1309>
- Gombert, J.M., Herbelin, A., Tancrède-Bohin, E., Dy, M., Carnaud, C., Bach, J.F., 1996. Early quantitative and functional deficiency of NK1+/-like thymocytes in the NOD mouse. *Eur. J. Immunol.* 26, 2989–2998. <https://doi.org/10.1002/eji.1830261226>
- Goubier, A., Vocanson, M., Macari, C., Poyet, G., Herbelin, A., Nicolas, J.-F., Dubois, B., Kaiserlian, D., 2013. Invariant NKT Cells Suppress CD8+ T-Cell-Mediated Allergic Contact Dermatitis Independently of Regulatory CD4+ T Cells. *J. Invest. Dermatol.* 133, 980–987.

<https://doi.org/10.1038/jid.2012.404>

Grela, F., Aumeunier, A., Bardel, E., Van, L.P., Bourgeois, E., Vanoirbeek, J., Leite-de-Moraes, M., Schneider, E., Dy, M., Herbelin, A., Thieblemont, N., 2011. The TLR7 Agonist R848 Alleviates Allergic Inflammation by Targeting Invariant NKT Cells To Produce IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.* 186, 284–290. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001348>

Griewank, K., Borowski, C., Rietdijk, S., Wang, N., Julien, A., Wei, D.G., Mamchak, A.A., Terhorst, C., Bendelac, A., 2007. Homotypic Interactions Mediated by Slamf1 and Slamf6 Receptors Control NKT Cell Lineage Development. *Immunity* 27, 751–762. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.020>

Gumperz, J.E., Miyake, S., Yamamura, T., Brenner, M.B., 2002. Functionally Distinct Subsets of CD1d-restricted Natural Killer T Cells Revealed by CD1d Tetramer Staining. *J. Exp. Med.* 195, 625–636. <https://doi.org/10.1084/jem.20011786>

Gumperz, J.E., Roy, C., Makowska, A., Lum, D., Sugita, M., Podrebarac, T., Koezuka, Y., Porcelli, S.A., Cardell, S., Brenner, M.B., Behar, S.M., 2000. Murine CD1d-Restricted T Cell Recognition of Cellular Lipids. *Immunity* 12, 211–221. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80174-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80174-0)

Guo, J., Hawwari, A., Li, H., Sun, Z., Mahanta, S.K., Littman, D.R., Krangel, M.S., He, Y.-W., 2002. Regulation of the TCR $\alpha$  repertoire by the survival window of CD4+CD8+ thymocytes. *Nat. Immunol.* 3, 469–476. <https://doi.org/10.1038/ni791>

Guo, T., Chamoto, K., Nakatsugawa, M., Ochi, T., Yamashita, Y., Anczurowski, M., Butler, M.O., Hirano, N., 2016. Mouse and Human CD1d-Self-Lipid Complexes Are Recognized Differently by Murine Invariant Natural Killer T Cell Receptors. *PLOS ONE* 11, e0156114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156114>

Gutierrez-Arcelus, M., Teslovich, N., Mola, A.R., Polidoro, R.B., Nathan, A., Kim, H., Hannes, S., Slowikowski, K., Watts, G.F.M., Korsunsky, I., Brenner, M.B., Raychaudhuri, S., Brennan, P.J., 2019. Lymphocyte innateness defined by transcriptional states reflects a balance between proliferation and effector functions. *Nat. Commun.* 10, 687. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08604-4>

Hachem, P., Lisbonne, M., Michel, M.-L., Diem, S., Roongapinun, S., Lefort, J., Marchal, G., Herbelin, A., Askenase, P.W., Dy, M., Leite-de-Moraes, M.C., 2005.  $\alpha$ -Galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: Role of IFN- $\gamma$ . *Eur. J. Immunol.* 35, 2793–2802. <https://doi.org/10.1002/eji.200535268>

Hager, E., Hawwari, A., Matsuda, J.L., Krangel, M.S., Gapin, L., 2007. Multiple Constraints at the Level of TCR $\alpha$  Rearrangement Impact V $\alpha$ 14i NKT Cell Development. *J. Immunol.* 179, 2228–2234. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2228>

Hameg, A., Gouarin, C., Gombert, J.M., Hong, S., Van Kaer, L., Bach, J.F., Herbelin, A., 1999. IL-7 up-regulates IL-4 production by splenic NK1.1+ and NK1.1- MHC class I-like/CD1-dependent CD4+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 7067–7074.

Hammond, K., Cain, W., van Driel, I., Godfrey, D., 1998. Three day neonatal thymectomy selectively depletes NK1.1+ T cells. *Int. Immunol.* 10, 1491–1499. <https://doi.org/10.1093/intimm/10.10.1491>

Hammond, K.J.L., Pellicci, D.G., Poulton, L.D., Naidenko, O.V., Scalzo, A.A., Baxter, A.G., Godfrey, D.I., 2001. CD1d-Restricted NKT Cells: An Interstrain Comparison. *J. Immunol.* 167, 1164–1173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.3.1164>

- Heczey, A., Liu, D., Tian, G., Courtney, A.N., Wei, J., Marinova, E., Gao, X., Guo, L., Yvon, E., Hicks, J., Liu, H., Dotti, G., Metelitsa, L.S., 2014. Invariant NKT cells with chimeric antigen receptor provide a novel platform for safe and effective cancer immunotherapy. *Blood* 124, 2824–2833. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-541235>
- Ho, I.-C., Tai, T.-S., Pai, S.-Y., 2009. GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 125–135. <https://doi.org/10.1038/nri2476>
- Hong, S., Wilson, M.T., Serizawa, I., Wu, L., Singh, N., Naidenko, O.V., Miura, T., Haba, T., Scherer, D.C., Wei, J., Kronenberg, M., Koezuka, Y., Van Kaer, L., 2001. The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat. Med.* 7, 1052–1056. <https://doi.org/10.1038/nm0901-1052>
- Huang, Y., Chen, A., Li, X., Chen, Z., Zhang, W., Song, Y., Gurner, D., Gardiner, D., Basu, S., Ho, D.D., Tsuji, M., 2008. Enhancement of HIV DNA vaccine immunogenicity by the NKT cell ligand, alpha-galactosylceramide. *Vaccine* 26, 1807–1816. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.02.002>
- Huber, S., Sartini, D., Exley, M., 2003. Role of CD1d in Coxsackievirus B3-Induced Myocarditis. *J. Immunol.* 170, 3147–3153. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3147>
- Ikehara, Y., Yasunami, Y., Kodama, S., Maki, T., Nakano, M., Nakayama, T., Taniguchi, M., Ikeda, S., 2000. CD4+ Vα14 natural killer T cells are essential for acceptance of rat islet xenografts in mice. *J. Clin. Invest.* 105, 1761–1767. <https://doi.org/10.1172/JCI8922>
- Ivanov, S., Fontaine, J., Paget, C., Macho Fernandez, E., Van Maele, L., Renneson, J., Maillet, I., Wolf, N.M., Rial, A., Leger, H., Ryffel, B., Frisch, B., Chabalgoity, J.A., Sirard, J.C., Benecke, A., Faveeuw, C., Trottein, F., 2012. Key Role for Respiratory CD103+ Dendritic Cells, IFN-γ, and IL-17 in Protection Against *Streptococcus pneumoniae* Infection in Response to α-Galactosylceramide. *J. Infect. Dis.* 206, 723–734. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis413>
- Kain, L., Webb, B., Anderson, B.L., Deng, S., Holt, M., Costanzo, A., Zhao, M., Self, K., Teyton, A., Everett, C., Kronenberg, M., Zajonc, D.M., Bendelac, A., Savage, P.B., Teyton, L., 2014. The Identification of the Endogenous Ligands of Natural Killer T Cells Reveals the Presence of Mammalian α-Linked Glycosylceramides. *Immunity* 41, 543–554. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.08.017>
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., Koseki, H., Taniguchi, M., 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278, 1626–1629. <https://doi.org/10.1126/science.278.5343.1626>
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Sato, H., Kondo, E., Harada, M., Koseki, H., Nakayama, T., Tanaka, Y., Taniguchi, M., 1998. Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Vα14 NKT cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 5690–5693. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5690>
- Kenna, T., Mason, L.G., Porcelli, S.A., Koezuka, Y., Hegarty, J.E., O'Farrelly, C., Doherty, D.G., 2003. NKT Cells from Normal and Tumor-Bearing Human Livers Are Phenotypically and Functionally Distinct from Murine NKT Cells. *J. Immunol.* 171, 1775–1779. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.4.1775>
- Kim, C.H., Johnston, B., Butcher, E.C., 2002. Trafficking machinery of NKT cells: shared and

differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* 100, 11–16. <https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0196>

Kim, H.Y., Kim, S., Chung, D.H., 2006. FcγRIII engagement provides activating signals to NKT cells in antibody-induced joint inflammation. *J. Clin. Invest.* 116, 2484–2492. <https://doi.org/10.1172/JCI27219>

Kim, P.J., Pai, S.-Y., Brigl, M., Besra, G.S., Gumperz, J., Ho, I.-C., 2006. GATA-3 Regulates the Development and Function of Invariant NKT Cells. *J. Immunol.* 177, 6650–6659. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.6650>

King, I.L., Fortier, A., Tighe, M., Dibble, J., Watts, G.F.M., Veerapen, N., Haberman, A.M., Besra, G.S., Mohrs, M., Brenner, M.B., Leadbetter, E.A., 2012. Invariant natural killer T cells direct B cell responses to cognate lipid antigen in an IL-21-dependent manner. *Nat. Immunol.* 13, 44–50. <https://doi.org/10.1038/ni.2172>

Kinjo, Y., Illarionov, P., Vela, J.L., Pei, B., Girardi, E., Li, X., Li, Y., Imamura, M., Kaneko, Y., Okawara, A., Miyazaki, Y., Gómez-Velasco, A., Rogers, P., Dahesh, S., Uchiyama, S., Khurana, A., Kawahara, K., Yesilkaya, H., Andrew, P.W., Wong, C.-H., Kawakami, K., Nizet, V., Besra, G.S., Tsuji, M., Zajonc, D.M., Kronenberg, M., 2011. Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat. Immunol.* 12, 966–974. <https://doi.org/10.1038/ni.2096>

Kitamura, H., Ohta, A., Sekimoto, M., Sato, M., Iwakabe, K., Nakui, M., Yahata, T., Meng, H., Koda, T., Nishimura, S., Kawano, T., Taniguchi, M., Nishimura, T., 2000. α-Galactosylceramide Induces Early B-Cell Activation through IL-4 Production by NKT Cells. *Cell. Immunol.* 199, 37–42. <https://doi.org/10.1006/cimm.1999.1602>

Knox, J.J., Cosma, G.L., Betts, M.R., McLane, L.M., 2014. Characterization of T-bet and eomes in peripheral human immune cells. *Front. Immunol.* 5, 217. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00217>

Koay, H.-F., Gherardin, N.A., Enders, A., Loh, L., Mackay, L.K., Almeida, C.F., Russ, B.E., Nold-Petry, C.A., Nold, M.F., Bedoui, S., Chen, Z., Corbett, A.J., Eckle, S.B.G., Meehan, B., d’Udekem, Y., Konstantinov, I.E., Lappas, M., Liu, L., Goodnow, C.C., Fairlie, D.P., Rossjohn, J., Chong, M.M., Kedzierska, K., Berzins, S.P., Belz, G.T., McCluskey, J., Uldrich, A.P., Godfrey, D.I., Pellicci, D.G., 2016. A three-stage intrathymic development pathway for the mucosal-associated invariant T cell lineage. *Nat. Immunol.* 17, 1300–1311. <https://doi.org/10.1038/ni.3565>

Koh, Y.-I., Shim, J.-U., 2010. Association between Sputum Natural Killer T Cells and Eosinophilic Airway Inflammation in Human Asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 153, 239–248. <https://doi.org/10.1159/000314364>

Koseki, H., Asano, H., Inaba, T., Miyashita, N., Moriwaki, K., Lindahl, K.F., Mizutani, Y., Imai, K., Taniguchi, M., 1991. Dominant expression of a distinctive V14+ T-cell antigen receptor alpha chain in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7518–7522. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7518>

Kovalovsky, D., Uche, O.U., Eladad, S., Hobbs, R.M., Yi, W., Alonzo, E., Chua, K., Eidson, M., Kim, H.-J., Im, J.S., Pandolfi, P.P., Sant’Angelo, D.B., 2008. The BTB–zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions. *Nat. Immunol.* 9, 1055–1064. <https://doi.org/10.1038/ni.1641>

- Kriegsmann, K., Kriegsmann, M., von Bergwelt-Baildon, M., Cremer, M., Witzens-Harig, M., 2018. NKT cells - New players in CAR cell immunotherapy? *Eur. J. Haematol.* 101, 750–757. <https://doi.org/10.1111/ejh.13170>
- Lantz, O., Bendelac, A., 1994. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4- T cells in mice and humans. *J. Exp. Med.* 180, 1097–1106. <https://doi.org/10.1084/jem.180.3.1097>
- Lazarevic, V., Zullo, A.J., Schweitzer, M.N., Staton, T.L., Gallo, E.M., Crabtree, G.R., Glimcher, L.H., 2009. The gene encoding early growth response 2, a target of the transcription factor NFAT, is required for the development and maturation of natural killer T cells. *Nat. Immunol.* 10, 306–313. <https://doi.org/10.1038/ni.1696>
- Lee, P.T., Benlagha, K., Teyton, L., Bendelac, A., 2002a. Distinct Functional Lineages of Human V $\alpha$ 24 Natural Killer T Cells. *J. Exp. Med.* 195, 637–641. <https://doi.org/10.1084/jem.20011908>
- Lee, P.T., Putnam, A., Benlagha, K., Teyton, L., Gottlieb, P.A., Bendelac, A., 2002b. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 110, 793–800. <https://doi.org/10.1172/JCI15832>
- Lehuen, A., Diana, J., Zaccane, P., Cooke, A., 2010. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 501–513. <https://doi.org/10.1038/nri2787>
- Lehuen, A., Lantz, O., Beaudoin, L., Laloux, V., Carnaud, C., Bendelac, A., Bach, J.-F., Monteiro, R.C., 1998. Overexpression of Natural Killer T Cells Protects V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 281 Transgenic Nonobese Diabetic Mice against Diabetes. *J. Exp. Med.* 188, 1831–1839. <https://doi.org/10.1084/jem.188.10.1831>
- Levitsky, H.I., Golumbek, P.T., Pardoll, D.M., 1991. The fate of CD4-8- T cell receptor-alpha beta+ thymocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 146, 1113–1117.
- Lezmi, G., Leite-de-Moraes, M., 2018. Invariant Natural Killer T and Mucosal-Associated Invariant T Cells in Asthmatic Patients. *Front. Immunol.* 9, 1766. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01766>
- Li, J., Sun, W., Subrahmanyam, P., Page, C., Younger, K., Tiper, I., Frieman, M., Kimball, A., Webb, T., 2014. NKT Cell Responses to B Cell Lymphoma. *Med. Sci.* 2, 82–97. <https://doi.org/10.3390/medsci2020082>
- Li, J.-P., Yang, C.-Y., Chuang, H.-C., Lan, J.-L., Chen, D.-Y., Chen, Y.-M., Wang, X., Chen, A.J., Belmont, J.W., Tan, T.-H., 2014. The phosphatase JKAP/DUSP22 inhibits T-cell receptor signalling and autoimmunity by inactivating Lck. *Nat. Commun.* 5, 3618. <https://doi.org/10.1038/ncomms4618>
- Li, S., Joseph, C., Becourt, C., Klibi, J., Luce, S., Dubois-Laforgue, D., Larger, E., Boitard, C., Benlagha, K., 2014. Potential Role of IL-17-Producing iNKT Cells in Type 1 Diabetes. *PLoS ONE* 9, e96151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096151>
- Lisbonne, M., Diem, S., de Castro Keller, A., Lefort, J., Araujo, L.M., Hachem, P., Fourneau, J.-M., Sidobre, S., Kronenberg, M., Taniguchi, M., Van Endert, P., Dy, M., Askenase, P., Russo, M., Vargaftig, B.B., Herbelin, A., Leite-de-Moraes, M.C., 2003. Cutting Edge: Invariant V $\alpha$ 14 NKT Cells Are Required for Allergen-Induced Airway Inflammation and Hyperreactivity in an Experimental Asthma Model. *J. Immunol.* 171, 1637–1641. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.4.1637>

- Lu, D., Liu, L., Ji, X., Gao, Y., Chen, X., Liu, Yu, Liu, Yang, Zhao, X., Li, Yan, Li, Yunqiao, Jin, Y., Zhang, Y., McNutt, M.A., Yin, Y., 2015. The phosphatase DUSP2 controls the activity of the transcription activator STAT3 and regulates TH17 differentiation. *Nat. Immunol.* 16, 1263–1273. <https://doi.org/10.1038/ni.3278>
- Lu, Y., Zhong, M.-C., Qian, J., Calderon, V., Cruz Tleugabulova, M., Mallevaey, T., Veillette, A., 2019. SLAM receptors foster iNKT cell development by reducing TCR signal strength after positive selection. *Nat. Immunol.* 20, 447–457. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0334-0>
- Lynch, L., Michelet, X., Zhang, S., Brennan, P.J., Moseman, A., Lester, C., Besra, G., Vomhof-Dekrey, E.E., Tighe, M., Koay, H.-F., Godfrey, D.I., Leadbetter, E.A., Sant'Angelo, D.B., von Andrian, U., Brenner, M.B., 2015. Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of Treg cells and macrophages in adipose tissue. *Nat. Immunol.* 16, 85–95. <https://doi.org/10.1038/ni.3047>
- Makino, Y., Kanno, R., Ito, T., Higashino, K., Taniguchi, M., 1995. Predominant expression of invariant V alpha 14+ TCR alpha chain in NK1.1+ T cell populations. *Int. Immunol.* 7, 1157–1161. <https://doi.org/10.1093/intimm/7.7.1157>
- Makino, Y., Yamagata, N., Sasho, T., Adachi, Y., Kanno, R., Koseki, H., Kanno, M., Taniguchi, M., 1993. Extrathymic development of V alpha 14-positive T cells. *J. Exp. Med.* 177, 1399–1408. <https://doi.org/10.1084/jem.177.5.1399>
- Mallevaey, T., Clarke, A.J., Scott-Browne, J.P., Young, M.H., Roisman, L.C., Pellicci, D.G., Patel, O., Vivian, J.P., Matsuda, J.L., McCluskey, J., Godfrey, D.I., Marrack, P., Rossjohn, J., Gapin, L., 2011. A Molecular Basis for NKT Cell Recognition of CD1d-Self-Antigen. *Immunity* 34, 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.01.013>
- Mallevaey, T., Scott-Browne, J.P., Matsuda, J.L., Young, M.H., Pellicci, D.G., Patel, O., Thakur, M., Kjer-Nielsen, L., Richardson, S.K., Cerundolo, V., Howell, A.R., McCluskey, J., Godfrey, D.I., Rossjohn, J., Marrack, P., Gapin, L., 2009. T Cell Receptor CDR2 $\beta$  and CDR3 $\beta$  Loops Collaborate Functionally to Shape the iNKT Cell Repertoire. *Immunity* 31, 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.010>
- Mars, L.T., Araujo, L., Kerschen, P., Diem, S., Bourgeois, E., Van, L.P., Carrie, N., Dy, M., Liblau, R.S., Herbelin, A., 2009. Invariant NKT cells inhibit development of the Th17 lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 6238–6243. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809317106>
- Matangkasombut, P., Marigowda, G., Ervine, A., Idris, L., Pichavant, M., Kim, H.Y., Yasumi, T., Wilson, S.B., DeKruyff, R.H., Faul, J.L., Israel, E., Akbari, O., Umetsu, D.T., 2009. Natural killer T cells in the lungs of patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 1181–1185. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.02.013>
- Matsuda, H., Suda, T., Sato, J., Nagata, T., Koide, Y., Chida, K., Nakamura, H., 2005.  $\alpha$ -Galactosylceramide, a Ligand of Natural Killer T Cells, Inhibits Allergic Airway Inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33, 22–31. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2004-00100C>
- Matsuda, J.L., Gapin, L., 2005. Developmental program of mouse V $\alpha$ 14i NKT cells. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.01.002>
- Matsuda, J.L., Mallevaey, T., Scott-Browne, J., Gapin, L., 2008. CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 358–368.

<https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.03.018>

Matsuda, J.L., Naidenko, O.V., Gapin, L., Nakayama, T., Taniguchi, M., Wang, C.-R., Koezuka, Y., Kronenberg, M., 2000. Tracking the Response of Natural Killer T Cells to a Glycolipid Antigen Using Cd1d Tetramers. *J. Exp. Med.* 192, 741–754. <https://doi.org/10.1084/jem.192.5.741>

Matulis, G., Sanderson, J.P., Lissin, N.M., Asparuhova, M.B., 2010. Innate-Like Control of Human iNKT Cell Autoreactivity via the Hypervariable CDR3 $\beta$  Loop. *PLoS Biol.* 8, 12.

Metelitsa, L.S., Wu, H.-W., Wang, H., Yang, Y., Warsi, Z., Asgharzadeh, S., Groshen, S., Wilson, S.B., Seeger, R.C., 2004. Natural Killer T Cells Infiltrate Neuroblastomas Expressing the Chemokine CCL2. *J. Exp. Med.* 199, 1213–1221. <https://doi.org/10.1084/jem.20031462>

Michel, M.-L., Keller, A.C., Paget, C., Fujio, M., Trottein, F., Savage, P.B., Wong, C.-H., Schneider, E., Dy, M., Leite-de-Moraes, M.C., 2007. Identification of an IL-17-producing NK1.1neg iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J. Exp. Med.* 204, 995–1001. <https://doi.org/10.1084/jem.20061551>

Michel, M.-L., Mendes-da-Cruz, D., Keller, A.C., Lochner, M., Schneider, E., Dy, M., Eberl, G., Leite-de-Moraes, M.C., 2008. Critical role of ROR- $\gamma$  t in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 19845–19850. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806472105>

Morishima, Y., Ishii, Y., Kimura, T., Shibuya, A., Shibuya, K., Hegab, A.E., Iizuka, T., Kiwamoto, T., Matsuno, Y., Sakamoto, T., Nomura, A., Taniguchi, M., Sekizawa, K., 2005. Suppression of eosinophilic airway inflammation by treatment with  $\alpha$ -galactosylceramide. *Eur. J. Immunol.* 35, 2803–2814. <https://doi.org/10.1002/eji.200525994>

Motsinger, A., Haas, D.W., Stanic, A.K., Van Kaer, L., Joyce, S., Unutmaz, D., 2002. CD1d-restricted Human Natural Killer T Cells Are Highly Susceptible to Human Immunodeficiency Virus 1 Infection. *J. Exp. Med.* 195, 869–879. <https://doi.org/10.1084/jem.20011712>

Nair, S., Dhodapkar, M.V., 2017. Natural Killer T Cells in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* 8, 1178. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01178>

Nakamatsu, M., Yamamoto, N., Hatta, M., Nakasone, C., Kinjo, T., Miyagi, K., Uezu, K., Nakamura, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Iwakura, Y., Kaku, M., Fujita, J., Kawakami, K., 2007. Role of interferon- $\gamma$  in V $\alpha$ 14+ natural killer T cell-mediated host defense against *Streptococcus pneumoniae* infection in murine lungs. *Microbes Infect.* 9, 364–374. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.12.003>

Nambiar, M.P., Fisher, C.U., Kumar, A., Tsokos, C.G., Warke, V.G., Tsokos, G.C., 2003. Forced Expression of the Fc Receptor  $\gamma$ -Chain Renders Human T Cells Hyperresponsive to TCR/CD3 Stimulation. *J. Immunol.* 170, 2871–2876. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.2871>

Nel, I., Lehuen, A., 2016. Defective Invariant Natural Killer T-Cell Suppression in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes* 65, 2121–2123. <https://doi.org/10.2337/dbi16-0021>

Németh, T., Futosi, K., Szilveszter, K., Vilinovszki, O., Kiss-Pápai, L., Mócsai, A., 2018. Lineage-Specific Analysis of Syk Function in Autoantibody-Induced Arthritis. *Front. Immunol.* 9, 555. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00555>

Nichols, K.E., Hom, J., Gong, S.-Y., Ganguly, A., Ma, C.S., Cannons, J.L., Tangye, S.G., Schwartzberg, P.L., Koretzky, G.A., Stein, P.L., 2005. Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nat. Med.* 11, 340–345. <https://doi.org/10.1038/nm1189>

Nickoloff, B.J., Bonish, B., Huang, B.B., Porcelli, S.A., 2000. Characterization of a T cell line bearing natural killer receptors and capable of creating psoriasis in a SCID mouse model system. *J. Dermatol. Sci.* 24, 212–225. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(00\)00120-1](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(00)00120-1)

Nishimura, T., Kitamura, H., Iwakabe, K., Yahata, T., Ohta, A., Sato, M., Takeda, K., Okumura, K., Van Kaer, L., Kawano, T., Taniguchi, M., Nakui, M., Sekimoto, M., Koda, T., 2000. The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol.* 12, 987–994. <https://doi.org/10.1093/intimm/12.7.987>

Novak, J., Beaudoin, L., Griseri, T., Lehuen, A., 2005. Inhibition of T Cell Differentiation into Effectors by NKT Cells Requires Cell Contacts. *J. Immunol.* 174, 1954–1961. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.4.1954>

Paget, C., Deng, S., Soulard, D., Priestman, D.A., Specia, S., von Gerichten, J., Speak, A.O., Saroha, A., Pewzner-Jung, Y., Futerman, A.H., Mallevaey, T., Faveeuw, C., Gu, X., Platt, F.M., Sandhoff, R., Trottein, F., 2019. TLR9-mediated dendritic cell activation uncovers mammalian ganglioside species with specific ceramide backbones that activate invariant natural killer T cells. *PLOS Biol.* 17, e3000169. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000169>

Park, S.H., Benlagha, K., Lee, D., Balish, E., Bendelac, A., 2000. Unaltered phenotype, tissue distribution and function of Valpha14(+) NKT cells in germ-free mice. *Eur. J. Immunol.* 30, 620–625. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200002\)30:2<620::AID-IMMU620>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200002)30:2<620::AID-IMMU620>3.0.CO;2-4)

Pasquier, B., Yin, L., Fondanèche, M.-C., Relouzat, F., Bloch-Queyrat, C., Lambert, N., Fischer, A., de Saint-Basile, G., Latour, S., 2005. Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J. Exp. Med.* 201, 695–701. <https://doi.org/10.1084/jem.20042432>

Pellicci, D.G., Clarke, A.J., Patel, O., Mallevaey, T., Beddoe, T., Le Nours, J., Uldrich, A.P., McCluskey, J., Besra, G.S., Porcelli, S.A., Gapin, L., Godfrey, D.I., Rossjohn, J., 2011. Recognition of  $\beta$ -linked self glycolipids mediated by natural killer T cell antigen receptors. *Nat. Immunol.* 12, 827–833. <https://doi.org/10.1038/ni.2076>

Pellicci, D.G., Hammond, K.J.L., Uldrich, A.P., Baxter, A.G., Smyth, M.J., Godfrey, D.I., 2002. A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. *J. Exp. Med.* 195, 835–844. <https://doi.org/10.1084/jem.20011544>

Phamthi, N., Deblic, J., Lebourgeois, M., Dy, M., Scheinmann, P., Leitedemoraes, M., 2006. Enhanced frequency of immunoregulatory invariant natural killer T cells in the airways of children with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 217–218. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.09.052>

Pichavant, M., Goya, S., Meyer, E.H., Johnston, R.A., Kim, H.Y., Matangkasombut, P., Zhu, M., Iwakura, Y., Savage, P.B., DeKruyff, R.H., Shore, S.A., Umetsu, D.T., 2008. Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural

killer T cells and IL-17. *J. Exp. Med.* 205, 385–393. <https://doi.org/10.1084/jem.20071507>

Porcelli, S., Yockey, C.E., Brenner, M.B., Balk, S.P., 1993. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J. Exp. Med.* 178, 1–16. <https://doi.org/10.1084/jem.178.1.1>

Porubsky, S., Speak, A.O., Luckow, B., Cerundolo, V., Platt, F.M., Grone, H.-J., 2007. Normal development and function of invariant natural killer T cells in mice with isoglobotrihexosylceramide (iGb3) deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 5977–5982. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611139104>

Prigozy, T.I., Naidenko, O., Qasba, P., Elewaut, D., Brossay, L., Khurana, A., Natori, T., Koezuka, Y., Kulkarni, A., Kronenberg, M., 2001. Glycolipid antigen processing for presentation by CD1d molecules. *Science* 291, 664–667. <https://doi.org/10.1126/science.291.5504.664>

Res, P., Blom, B., Hori, T., Weijer, K., Spits, H., 1997. Downregulation of CD1 Marks Acquisition of Functional Maturation of Human Thymocytes and Defines a Control Point in Late Stages of Human T Cell Development. *J. Exp. Med.* 185, 141–152. <https://doi.org/10.1084/jem.185.1.141>

Rhost, S., Sedimbi, S., Kadri, N., Cardell, S.L., 2012. Immunomodulatory type II natural killer T lymphocytes in health and disease. *Scand. J. Immunol.* 76, 246–255. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2012.02750.x>

Rubio, M.-T., Moreira-Teixeira, L., Bachy, E., Bouillie, M., Milpied, P., Coman, T., Suarez, F., Marcais, A., Sibon, D., Buzyn, A., Caillat-Zucman, S., Cavazzana-Calvo, M., Varet, B., Dy, M., Hermine, O., Leite-de-Moraes, M., 2012. Early posttransplantation donor-derived invariant natural killer T-cell recovery predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease and overall survival. *Blood* 120, 2144–2154. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-404673>

Sakuishi, K., Oki, S., Araki, M., Porcelli, S.A., Miyake, S., Yamamura, T., 2007. Invariant NKT Cells Biased for IL-5 Production Act as Crucial Regulators of Inflammation. *J. Immunol.* 179, 3452–3462. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3452>

Samavedam, U.K., Mitschker, N., Kasprick, A., Bieber, K., Schmidt, E., Laskay, T., Recke, A., Goletz, S., Vidarsson, G., Schulze, F.S., Armbrust, M., Schulze Dieckhoff, K., Pas, H.H., Jonkman, M.F., Kalies, K., Zillikens, D., Gupta, Y., Ibrahim, S.M., Ludwig, R.J., 2018. Whole-Genome Expression Profiling in Skin Reveals SYK As a Key Regulator of Inflammation in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. *Front. Immunol.* 9, 249. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00249>

Sandberg, J.K., Fast, N.M., Palacios, E.H., Fennelly, G., Dobroszycki, J., Palumbo, P., Wiznia, A., Grant, R.M., Bhardwaj, N., Rosenberg, M.G., Nixon, D.F., 2002. Selective loss of innate CD4(+) V alpha 24 natural killer T cells in human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 76, 7528–7534. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.15.7528-7534.2002>

Sandberg, J.K., Stoddart, C.A., Brilot, F., Jordan, K.A., Nixon, D.F., 2004. Development of innate CD4+ -chain variable gene segment 24 (V 24) natural killer T cells in the early human fetal thymus is regulated by IL-7. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 7058–7063. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305986101>

- Sanderson, J.P., Brennan, P.J., Mansour, S., Matulis, G., Patel, O., Lissin, N., Godfrey, D.I., Kawahara, K., Zähringer, U., Rossjohn, J., Brenner, M.B., Gadola, S.D., 2013. CD1d protein structure determines species-selective antigenicity of isoglobotrihexosylceramide (iGb3) to invariant NKT cells. *Eur. J. Immunol.* 43, 815–825. <https://doi.org/10.1002/eji.201242952>
- Savage, A.K., Constantinides, M.G., Han, J., Picard, D., Martin, E., Li, B., Lantz, O., Bendelac, A., 2008. The Transcription Factor PLZF Directs the Effector Program of the NKT Cell Lineage. *Immunity* 29, 391–403. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.011>
- Seiler, M.P., Mathew, R., Liszewski, M.K., Spooner, C.J., Barr, K., Meng, F., Singh, H., Bendelac, A., 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. <https://doi.org/10.1038/ni.2230>
- Seino, K. -i, Fukao, K., Muramoto, K., Yanagisawa, K., Takada, Y., Kakuta, S., Iwakura, Y., Van Kaer, L., Takeda, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Bashuda, H., Yagita, H., Okumura, K., 2001. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 2577–2581. <https://doi.org/10.1073/pnas.041608298>
- Sharif, S., Arreaza, G.A., Zucker, P., Mi, Q.S., Sondhi, J., Naidenko, O.V., Kronenberg, M., Koezuka, Y., Delovitch, T.L., Gombert, J.M., Leite-De-Moraes, M., Gouarin, C., Zhu, R., Hameg, A., Nakayama, T., Taniguchi, M., Lepault, F., Lehuen, A., Bach, J.F., Herbelin, A., 2001. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat. Med.* 7, 1057–1062. <https://doi.org/10.1038/nm0901-1057>
- Shi, F.-D., Flodstrom, M., Balasa, B., Kim, S.H., Van Gunst, K., Strominger, J.L., Wilson, S.B., Sarvetnick, N., 2001. Germ line deletion of the CD1 locus exacerbates diabetes in the NOD mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 6777–6782. <https://doi.org/10.1073/pnas.121169698>
- Shimamura, Michio, Ohteki, T., Beutner, U., Robson MacDonald, H., 1997. Lack of directed V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 281 rearrangements in NK1+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 27, 1576–1579. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270638>
- Shimamura, M., Ohteki, T., Launois, P., Garcia, A.M., MacDonald, H.R., 1997. Thymus-independent generation of NK1+ T cells in vitro from fetal liver precursors. *J. Immunol. Baltim. Md* 158, 3682–3689.
- Shimizuhira, C., Otsuka, A., Honda, T., Kitoh, A., Egawa, G., Nakajima, S., Nakashima, C., Watarai, H., Miyachi, Y., Kabashima, K., 2014. Natural Killer T Cells Are Essential for the Development of Contact Hypersensitivity in BALB/c Mice. *J. Invest. Dermatol.* 134, 2709–2718. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.200>
- Sidobre, S., Naidenko, O.V., Sim, B.-C., Gascoigne, N.R.J., Garcia, K.C., Kronenberg, M., 2002. The V $\alpha$ 14 NKT Cell TCR Exhibits High-Affinity Binding to a Glycolipid/CD1d Complex. *J. Immunol.* 169, 1340–1348. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.3.1340>
- Simoni, Y., Diana, J., Ghazarian, L., Beaudoin, L., Lehuen, A., 2013. Therapeutic manipulation of natural killer (NK) T cells in autoimmunity: are we close to reality? *Clin. Exp. Immunol.* 171, 8–19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04625.x>
- Simoni, Y., Gautron, A.-S., Beaudoin, L., Bui, L.-C., Michel, M.-L., Coumoul, X., Eberl, G., Leite-de-Moraes, M., Lehuen, A., 2011. NOD mice contain an elevated frequency of iNKT17 cells that exacerbate diabetes. *Eur. J. Immunol.* 41, 3574–3585.

<https://doi.org/10.1002/eji.201141751>

Sköld, M., Cardell, S., 2000. Differential regulation of Ly49 expression on CD4+ and CD4-CD8- (double negative) NK1.1+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 30, 2488–2496. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200009\)30:9<2488::AID-IMMU2488>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200009)30:9<2488::AID-IMMU2488>3.0.CO;2-F)

Slifka, M.K., Pagarigan, R.R., Whitton, J.L., 2000. NK Markers Are Expressed on a High Percentage of Virus-Specific CD8+ and CD4+ T Cells. *J. Immunol.* 164, 2009–2015. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.4.2009>

Speak, A.O., Salio, M., Neville, D.C.A., Fontaine, J., Priestman, D.A., Platt, N., Heare, T., Butters, T.D., Dwek, R.A., Trottein, F., Exley, M.A., Cerundolo, V., Platt, F.M., 2007. Implications for invariant natural killer T cell ligands due to the restricted presence of isoglobotrihexosylceramide in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 5971–5976. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607285104>

Stax, A.M., Tuengel, J., Girardi, E., Kitano, N., Allan, L.L., Liu, V., Zheng, D., Panenka, W.J., Guillaume, J., Wong, C.-H., van Calenbergh, S., Zajonc, D.M., van den Elzen, P., 2017. Autoreactivity to Sulfatide by Human Invariant NKT Cells. *J. Immunol.* 199, 97–106. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601976>

Swat, W., Dessing, M., Boehmer, H.V., Kisielow, P., 1993. CD 69 expression during selection and maturation of CD4+8+ thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 23, 739–746. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230326>

Sykes, M., 1990. Unusual T cell populations in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and alpha beta TCR+NK1.1+ cells. 8.

Terashima, A., Watarai, H., Inoue, S., Sekine, E., Nakagawa, R., Hase, K., Iwamura, C., Nakajima, H., Nakayama, T., Taniguchi, M., 2008. A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. *J. Exp. Med.* 205, 2727–2733. <https://doi.org/10.1084/jem.20080698>

Tessmer, M.S., Fatima, A., Paget, C., Trottein, F., Brossay, L., 2009. NKT cell immune responses to viral infection. *Expert Opin. Ther. Targets* 13, 153–162. <https://doi.org/10.1517/14712590802653601>

Thomas, S.Y., Lilly, C.M., Luster, A.D., 2006. Invariant natural killer T cells in bronchial asthma. *N. Engl. J. Med.* 354, 2613–2616; author reply 2613–2616. <https://doi.org/10.1056/NEJMc066189>

Tian, G., Courtney, A.N., Jena, B., Heczey, A., Liu, D., Marinova, E., Guo, L., Xu, X., Torikai, H., Mo, Q., Dotti, G., Cooper, L.J., Metelitsa, L.S., 2016. CD62L+ NKT cells have prolonged persistence and antitumor activity in vivo. *J. Clin. Invest.* 126, 2341–2355. <https://doi.org/10.1172/JCI83476>

Tilloy, F., Di Santo, J.P., Bendelac, A., Lantz, O., 1999. Thymic dependence of invariant V alpha 14+ natural killer-T cell development. *Eur. J. Immunol.* 29, 3313–3318. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199910\)29:10<3313::AID-IMMU3313>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199910)29:10<3313::AID-IMMU3313>3.0.CO;2-8)

Tocheva, A.S., Mansour, S., Holt, T.G.H., Jones, S., Chancellor, A., Sanderson, J.P., Eren, E., Elliott, T.J., Holt, R.I.G., Gadola, S.D., 2017. The Clonal Invariant NKT Cell Repertoire in People with Type 1 Diabetes Is Characterized by a Loss of Clones Expressing High-Affinity TCRs. *J. Immunol.* 198, 1452–1459. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600255>

- Trottein, F., Paget, C., 2018. Natural Killer T Cells and Mucosal-Associated Invariant T Cells in Lung Infections. *Front. Immunol.* 9, 1750. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01750>
- Tuttle, K.D., Krovi, S.H., Zhang, J., Bedel, R., Harmacek, L., Peterson, L.K., Dragone, L.L., Lefferts, A., Halluszczak, C., Riemondy, K., Hesselberth, J.R., Rao, A., O'Connor, B.P., Marrack, P., Scott-Browne, J., Gapin, L., 2018. TCR signal strength controls thymic differentiation of iNKT cell subsets. *Nat. Commun.* 9, 2650. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05026-6>
- Usero, L., Sánchez, A., Pizarro, E., Xufré, C., Martí, M., Jaraquemada, D., Roura-Mir, C., 2016. Interleukin-13 Pathway Alterations Impair Invariant Natural Killer T-Cell-Mediated Regulation of Effector T Cells in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 65, 2356–2366. <https://doi.org/10.2337/db15-1350>
- van der Vliet, H.J.J., van Vonderen, M.G.A., Molling, J.W., Bontkes, H.J., Reijm, M., Reiss, P., van Agtmael, M.A., Danner, S.A., van den Eertwegh, A.J.M., von Blomberg, B.M.E., Scheper, R.J., 2006. Cutting Edge: Rapid Recovery of NKT Cells upon Institution of Highly Active Antiretroviral Therapy for HIV-1 Infection. *J. Immunol.* 177, 5775–5778. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.9.5775>
- van der Vliet, H.J.J., von Blomberg, B.M.E., Hazenberg, M.D., Nishi, N., Otto, S.A., van Benthem, B.H., Prins, M., Claessen, F.A., van den Eertwegh, A.J.M., Giaccone, G., Miedema, F., Scheper, R.J., Pinedo, H.M., 2002. Selective Decrease in Circulating  $V\alpha 24+$   $V\beta 11+$  NKT Cells During HIV Type 1 Infection. *J. Immunol.* 168, 1490–1495. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.3.1490>
- Vanhecke, D., Verhasselt, B., De Smedt, M., Leclercq, G., Plum, J., Vandekerckhove, B., 1997. Human thymocytes become lineage committed at an early postselection CD69+ stage, before the onset of functional maturation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 159, 5973–5983.
- Venken, K., Jacques, P., Mortier, C., Labadia, M.E., Decruy, T., Coudenys, J., Hoyt, K., Wayne, A.L., Hughes, R., Turner, M., Van Gassen, S., Martens, L., Smith, D., Harcken, C., Wahle, J., Wang, C.-T., Verheugen, E., Schryvers, N., Varkas, G., Cypers, H., Wittoek, R., Piette, Y., Gyselbrecht, L., Van Calenbergh, S., Van den Bosch, F., Saeys, Y., Nabozny, G., Elewaut, D., 2019. ROR $\gamma$ t inhibition selectively targets IL-17 producing iNKT and  $\gamma\delta$ -T cells enriched in Spondyloarthritis patients. *Nat. Commun.* 10, 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07911-6>
- Vicari, A.P., Mocci, S., Openshaw, P., O'Garra, A., Zlotnik, A., 1996. Mouse  $\gamma\delta$  TCR+NK1.1+ thymocytes specifically produce interleukin-4, are major histocompatibility complex class I independent, and are developmentally related to  $\alpha\beta$  TCR+NK1.1+ thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 26, 1424–1429. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260704>
- Vijayanand, P., Seumois, G., Pickard, C., Powell, R.M., Angco, G., Sammut, D., Gadola, S.D., Friedmann, P.S., Djukanović, R., 2007. Invariant Natural Killer T Cells in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N. Engl. J. Med.* 356, 1410–1422. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa064691>
- Voyle, R.B., Beermann, F., Lees, R.K., Schümann, J., Zimmer, J., Held, W., MacDonald, H.R., 2003. Ligand-dependent Inhibition of CD1d-restricted NKT Cell Development in Mice Transgenic for the Activating Receptor Ly49D. *J. Exp. Med.* 197, 919–925. <https://doi.org/10.1084/jem.20021615>
- Watarai, H., Sekine-Kondo, E., Shigeura, T., Motomura, Y., Yasuda, T., Satoh, R., Yoshida, H., Kubo, M., Kawamoto, H., Koseki, H., Taniguchi, M., 2012. Development and Function of

- Invariant Natural Killer T Cells Producing TH2- and TH17-Cytokines. *PLoS Biol.* 10, e1001255. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001255>
- Williams, J.A., Lumsden, J.M., Yu, X., Feigenbaum, L., Zhang, J., Steinberg, S.M., Hodes, R.J., 2008. Regulation of Thymic NKT Cell Development by the B7-CD28 Costimulatory Pathway. *J. Immunol.* 181, 907–917. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.2.907>
- Wilson, S.B., Kent, S.C., Patton, K.T., Orban, T., Jackson, R.A., Exley, M., Porcelli, S., Schatz, D.A., Atkinson, M.A., Balk, S.P., Strominger, J.L., Hafler, D.A., 1998. Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 391, 177–181. <https://doi.org/10.1038/34419>
- Wingender, G., Krebs, P., Beutler, B., Kronenberg, M., 2010. Antigen-Specific Cytotoxicity by Invariant NKT Cells In Vivo Is CD95/CD178-Dependent and Is Correlated with Antigenic Potency. *J. Immunol.* 185, 2721–2729. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001018>
- Yu, E.D., Girardi, E., Wang, J., Zajonc, D.M., 2011. Cutting Edge: Structural Basis for the Recognition of  $\beta$ -Linked Glycolipid Antigens by Invariant NKT Cells. *J. Immunol.* 187, 2079–2083. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101636>
- Zeng, Z., Castaño, A.R., Segelke, B.W., Stura, E.A., Peterson, P.A., Wilson, I.A., 1997. Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* 277, 339–345. <https://doi.org/10.1126/science.277.5324.339>
- Zhao, Y., Fischelevich, R., Petrali, J.P., Zheng, L., Anatolievna, M.A., Deng, A., Eckert, R.L., Gaspari, A.A., 2008. Activation of Keratinocyte Protein Kinase C $\zeta$  in Psoriasis Plaques. *J. Invest. Dermatol.* 128, 2190–2197. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.81>
- Zhou, D., Mattner, J., Cantu, C., Schrantz, N., Yin, N., Gao, Y., Sagiv, Y., Hudspeth, K., Wu, Y.-P., Yamashita, T., Teneberg, S., Wang, D., Proia, R.L., Levery, S.B., Savage, P.B., Teyton, L., Bendelac, A., 2004. Lysosomal Glycosphingolipid Recognition by NKT Cells. *Science* 306, 1786–1789. <https://doi.org/10.1126/science.1103440>

# **ANNEXES**

METHODOLOGY ARTICLE

Open Access



# Ex vivo evolution of human antibodies by CRISPR-X: from a naive B cell repertoire to affinity matured antibodies

Marie-Claire Devilder<sup>1,2,3</sup>, Melinda Moyon<sup>1,2</sup>, Laetitia Gautreau-Rolland<sup>1,2</sup>, Benjamin Navet<sup>1,2</sup>, Jeanne Perroteau<sup>1,2</sup>, Florent Delbos<sup>4</sup>, Marie-Claude Gesnel<sup>1,2,3</sup>, Richard Breathnach<sup>1,2\*</sup> and Xavier Saulquin<sup>1,2\*</sup> 

**Keywords:** Human antibodies, SHM, CRISPR, CRISPR-X, AID, Tetramers, HLA, Cytofluorimetry

**Background** Somatic hypermutation promotes affinity maturation of antibodies by targeting the cytidine deaminase AID to antibody genes, followed by antigen-based selection of matured antibodies. Given the importance of antibodies in medicine and research, developing approaches to reproduce this natural phenomenon in cell culture is of some interest.

**Results** We use here the CRISPR-Cas 9 based *CRISPR-X* approach to target AID to antibody genes carried by expression vectors in HEK 293 cells. This directed mutagenesis approach, combined with a highly sensitive antigen-associated magnetic enrichment process, allowed rapid progressive evolution of a human antibody against the Human Leucocyte Antigen A\*02:01 allele. Starting from a low affinity monoclonal antibody expressed on Ag-specific naïve blood circulating B cells, we obtained in approximately 6 weeks antibodies with a two log increase in affinity and which retained their specificity.

**Conclusion** Our strategy for in vitro affinity maturation of antibodies is applicable to virtually any antigen. It not only allows us to tap into the vast naive B cell repertoire but could also be useful when dealing with antigens that only elicit low affinity antibodies after immunization.

## Background

The human B cell repertoire constitutes a source of antibodies capable of recognizing virtually any antigen (Ag).

This is the result of a complex B lymphocyte maturation process. Newly produced B cells express B cell receptors (BCRs) generated by random somatic recombination of V (Variable), D (Diversity) and J (Junction) gene segments and which generally have a low affinity for their cognate Ag [1]. After exposure to an Ag, naïve B cells with Ag-specific BCRs undergo somatic hypermutation (SHM) catalyzed by the enzyme Activation induced cytidine deaminase (AID) [2–4]. This enzyme is targeted to the Ig-loci in B cells and deaminates cytosines, thus provoking point mutations, insertions and deletions in the variable domains of both the heavy and light chains. This process ultimately leads to antibody diversification and is followed by the selection of a matured B cell repertoire with higher affinity and specificity for the Ag. This allows the overall diversity of the BCR / antibody molecules to reach theoretically about  $10^{13}$  different receptors in humans [5]. The repertoire thus constitutes an almost unlimited resource of antibodies.

For several decades, monoclonal antibodies (mAb) have been crucial tools in the treatment of diseases such as autoimmune diseases and cancer, or for the control of graft rejection. It is important to generate fully human mAbs because they have a lower risk of immune response induction in humans than the mouse, chimeric or humanized mAbs generally used hitherto. Various methods have been developed for isolating antibodies directly from a natural repertoire of human B lymphocytes. In general, they derive from two main approaches. The first of these is the high-throughput screening of mAb produced by B cell cultures or plasma cells [6, 7]. This is a very effective method for obtaining mAb against Ag to which an individual is exposed naturally or by vaccination. However, many Ag of therapeutic interest are

\* Correspondence: [Richard.Breathnach@univ-nantes.fr](mailto:Richard.Breathnach@univ-nantes.fr); [xavier.saulquin@univ-nantes.fr](mailto:xavier.saulquin@univ-nantes.fr)

<sup>1</sup>CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France

Full list of author information is available at the end of the article



not encountered sufficiently frequently naturally, or exploitable in vaccine strategies in humans, to profit from this type of methodology. The second technique consists in isolating single Ag-specific B cells using fluorescent-tagged Ag, followed by cloning of their immunoglobulin genes and expression of recombinant antibodies in a cell line. This technique allows interrogation of both the immune/matured B cell repertoire and the naïve/germline repertoire of an individual with respect to any Ag available in purified form [8–10]. There is a limitation to the interrogation of a naïve B cell repertoire however: the generally limited affinity of the corresponding recombinant antibodies, requiring identification of mutations that enhance affinity while maintaining specificity.

Antibody optimization currently relies heavily on the use of libraries generated by mutagenesis of antibody chains using error-prone PCR or degenerate primers. Libraries are screened using techniques such as ribosome, phage, yeast or mammalian display [11]. Co-expression of AID and antibody or non-antibody genes in various mammalian cell lines has also been used to initiate a mutagenic process mimicking SHM [12–20]. This approach circumvents the need to construct mutant libraries, but does not allow targeting of the AID enzyme to sequences encoding the antibody. In B cells, AID is targeted to the immunoglobulin locus by complex mechanisms not yet fully elucidated [21].

We wanted to develop a simple strategy for AID-targeting to antibody sequences in non-B cells to obtain mutated antibodies with increased affinity. Various CRISPR Cas9-based approaches using guide RNAs to target base editors such as APOBEC or AID fused to dead Cas9 (dCas9) to specific DNA sequences have been described recently [22, 23]. These approaches generally lead to mutations limited to a small part of the sequences corresponding to the guide RNA binding site. A variant approach (CRISPR-X) uses a complex containing dCas9 and a guide RNA containing bacteriophage MS2 coat protein binding sites to recruit a coat-AID fusion to DNA [24]. This leads to more extensive mutagenesis covering a window of approximately 100 bp around the guide RNA binding site.

In this work, we present a CRISPR-X based strategy for targeted *in cellulo* affinity maturation of low affinity human mAbs. We apply it to a low affinity mAb named A2Ab against HLA-A\*02:01 which shows some cross-reactivity against other HLA-A alleles. A2Ab was isolated from circulating B cells of a naïve individual using a procedure recently developed by our group [8, 10]. We used CRISPR-X with multiplexed guide RNAs to target AID to the VDJ segment encoding the A2Ab heavy chain variable domain in HEK 293 cells co-expressing the light chain. This directed-mutagenesis approach, combined with mammalian surface expression display and a very

sensitive Ag-associated magnetic enrichment process, allowed us to identify mAbs with increased affinity and a sharpening of their specificity for HLA-A\*02:01. Overall we describe a novel procedure for generation of high-affinity/optimized human mAbs that is applicable to both naïve and mature circulating human B cells, raising the possibility of generation of private antibodies from a particular individual.

## Methods

### Donors

Human peripheral blood samples were obtained from anonymous adult donors after informed consent in accordance with the local ethics committee (Etablissement Français du Sang, EFS, Nantes, procedure PLER NTS-2016-08).

### Cell lines and culture conditions

Human embryonic kidney 293A cells were obtained from Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA (R70507). Cells were grown as adherent monolayers in DMEM (4.5 g/l glucose) supplemented with 10% FBS, 1% Glutamax (Gibco) and 1% penicillin (10,000 U/ml)/streptomycin (10,000 U/ml) (a mixture from Gibco). The BLCL cell lines HEN (HLA-A\*02:01/ HLA-A\*0101), B721.221 and stably transfected HLA-A2 B721.221 (B721.221 A2) were grown in suspension in RPMI medium supplemented with 10% FBS, 1% Glutamax (Gibco) and 1% penicillin (10,000 U/ml)/streptomycin (10,000 U/ml) (a mixture from Gibco).

### Plasmid constructions

Plasmids for mutagenesis were obtained from Addgene: pGH335\_MS2-AID\*Δ-Hygro (catalogue n° 85.406), pX330S-2 to 7 from the Multiplex CRISPR/Cas9 Assembly System kit (n° 1.000.000.055) and pX330A\_dCas9-1 × 7 from the multiplex CRISPR dCas9/Fok-dCas9 Accessory pack (n° 1.000.000.062). The sgRNA scaffolds in the seven latter plasmids were replaced by the sgRNA\_2MS2 scaffold from pGH224\_sgRNA\_2xMS2\_Puro (Addgene n° 85.413) and guide sequences then introduced into their BbsI sites before Golden Gate assembly. SgRNA design was performed online using Sequence Scan for CRISPR software (<http://crispr.dfci.harvard.edu/SSC/>). Final plasmids for mutagenesis thus obtained contain expression cassettes for dCas9 and seven sgRNAs. For production of antibodies, VH and VL regions from human antibodies were subcloned respectively in an IgG-Abvec expression vector (FJ475055) and an Iglambda -AbVec expression vector (FJ51647) as previously described [8]. For mammalian display of antibodies as IgG1, VH and VL regions were subcloned into home-made expression vectors derived from the OriP/EBNA1 based episomal vector pCEP4. The VH and VL expression vectors contain a

hygromycin B or Zeocin resistance marker respectively, and a transmembrane region encoding sequence exists in the C gamma constant region sequence.

### IgG1 mammalian cell display

Heavy and light chain expression vectors were co-transfected into the 293A cell line at a 1:1 ratio using JetPEI (PolyplusTransfection, Cat. 101–10 N) and cultured for 48 h. Selection of doubly transfected cells was performed using Hygromycin B and Zeocin. Antibody surface expression on the selected cells was confirmed by flow cytometry analysis after staining with a PE-labeled goat-anti-human IgG Fc (Jackson ImmunoResearch).

### Peptide MHC tetramer

The HLA-A\*02:01-restricted peptides Pp65<sub>495</sub> (human CMV [HCMV], NLVPMVATV) and MelA27 (melanoma Ag, ELAGIGILTV) and the HLA-B\*0702-restricted UV-sensitive peptide (AARGJTLAM; where J is 3-amino-3-(2-nitro)phenyl-propionic acid) were purchased from GL Biochem (Shanghai, China). Soluble peptide MHC monomers used in this study carried a mutation in the  $\alpha 3$  domain (A245V), that reduces CD8 binding to MHC class I. Biotinylated HLA-A\*02:01/MelA<sub>27</sub> (HLA-A2/MelA), HLA-A\*02:01/Pp65<sub>495</sub> (HLA-A2/Pp65), HLA-B\*0702/UV sensitive peptide (HLA-B7/pUV) monomers were tetramerized with allophycocyanin (APC)-labeled premium grade streptavidins (Molecular Probes, Thermo Fischer Scientific, ref. S32362) at a molar ratio of 4:1. When applicable, the avidity of the tetramer for its specific antibody was decreased by mixing specific (ie peptide HLA-A2) and un-specific (ie peptide UV-sensitive HLA-B7) biotinylated monomers before tetramerization with APC-labeled streptavidins at different molar ratios.

### Ag-specific B cell sorting from PBMC

B cell isolation was performed as previously described [8, 10]. Briefly, PBMCs were obtained by Ficoll density gradient centrifugation and incubated with PE-, APC and BV421-conjugated tetramers (10  $\mu$ g/mL in PBS plus 2% FBS, for 30 min at room temperature). The tetramer-stained cells were enriched using anti-PE and-APC Ab-coated paramagnetic beads and then stained with anti-CD19-PerCpCy5.5 (BD Biosciences) mAbs. Stained samples were collected on an ARIA Cell Sorter Cytometer (BD Biosciences) and single CD19<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> PE<sup>+</sup> APC<sup>+</sup> BV421<sup>-</sup> tetramer cells were collected in individual PCR tubes.

### Flow cytometry analysis

The specificity and avidity of IgG expressing HEK 293 cells was analysed by flow cytometry. Cells were first stained in PBS containing 0.5% BSA with Ag tetramers for 30 min at room temperature. Anti-PE human IgG

was then added at a 1/500 dilution for 15 min on ice without prior washing. The binding of mutant antibodies was evaluated on 150,000 BLCL cells. Cells were incubated with various concentrations of large-scale purified mAbs diluted in 25 ml of PBS containing 0.5% BSA for 30 min at room temperature. Anti-PE goat anti-human IgG was then added at a 1/500 dilution for 15 min on ice without prior washing.

### Mutagenesis

$4 \times 10^6$  anti HLA-A2 IgG-expressing cells were seeded the day before transfection in a 175 cm flask. For each round of mutation, cells were transiently transfected using JET-PRIME (PolyplusTransfection, Cat. 101–10 N) with pGH335\_MS2-AID\* $\Delta$ -Hygro together with two other plasmids allowing expression of a total of 9 different sgRNAs along with dCas9 at a ration 1: 1: 1.

### Affinity-based cell selection and immunomagnetic enrichment

After a round of mutagenesis, transfected cells were expanded until confluency over a week. For selection,  $10\text{--}20 \times 10^6$  cells were washed, resuspended in 0.2 mL of PBS containing 2% BSA and the antigen (i.e. APC HLA-A2 tetramers or mixed APC HLA-A2/HLA-B7 tetramers) and incubated for 30 min at room temperature. The tetramer-stained cells were then positively enriched using anti APC Ab-coated immunomagnetic beads and columns as previously described [8]. The resulting enriched fraction was stained with an anti human IgG-PE. IgG PE<sup>+</sup> and tetramer APC<sup>+</sup> cells were collected on an ARIA cell sorter. The adopted strategy for evolution of mAb A2Ab was as follows: 1) three rounds of mutagenesis; 2) magnetic enrichment with 3A2/1B7 tetramer; 3) FACS sorting of positive cells. Positively selected and sorted mutated HEK 293 underwent two new rounds of mutation using the same sgRNAs before selection with the 1A2/3B7 tetramer.

### Antibody production

Antibody production was performed as previously described [8]. Briefly, 293A cell lines were transiently transfected with VH and VL expression vectors and cultured for 5 days in serum free medium in 175 cm<sup>2</sup> flasks. Recombinant antibodies produced were purified from cell supernatant by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) using a protein A column, and their concentration determined by absorbance measurement at 280 nm.

### Elisa

96-well ELISA plates (Maxisorp, Nunc) were coated with HLA-A2 monomers (overnight at 4 °C, final concentration 2  $\mu$ g/mL in a coating buffer 1X (Affymetrix)), saturated with a 10% FBS DMEM blocking buffer (Thermo

Fischer Scientific) for 2 h at 37 °C and (iii) incubated with serial dilutions of purified mAbs for 2 h at room temperature. Binding of mAbs was detected with an anti-human IgG-HRP Ab (BD Bioscience, 1 µg/mL, 1 h) and addition of a chromogenic substrate for 20 min at room temperature (Maxisorp, Nunc).

#### Anti-HLA antibody testing (Luminex)

A Single Antigen Flow Bead assay (LabScreen single-antigen LS1A04, One Lambda, Inc., Canoga Park, CA), was used to detect anti-HLA antibodies in donors and test the specificity of antibodies against 97 MHC-class I alleles. Analysis was performed with a Luminex 100 analyser (Luminex, Austin, TX) after removal of the background as previously described [10].

#### Surface Plasmon resonance

Surface Plasmon Resonance (SPR) experiments were performed on a Biacore 3000 apparatus (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) on CM5 chips (GE Healthcare) as previously described [10]. Briefly, mAbs were immobilized at 10 µg/mL. The sensor chip surface was then deactivated and various dilutions of HLA-A\*02:01 peptide monomers were injected for 180 s at 40 µL/min.

#### Bioinformatics analysis

**Amplicon preparation:** total RNA was purified from 5 × 10<sup>6</sup> HEK 293 cells and 1 µg of total RNA was reverse transcribed using Superscript reverse transcriptase III (ThermoFisher). cDNA was subsequently amplified using Q5 DNA polymerase and primers targeting VH sequences. Sense and antisense primers include target sequences suitable for Nextera indexage. Barcodes were further introduced by PCR with indexed nextera and the amplicons were sequenced at the IRIC's Genomics Core Facility at Montreal. Paired-end MiSeq technology (MiSeq Reagent Nano kit v2 (500 cycles) from Illumina, Inc. San Diego, CA, USA) was used, with a 2 × 250 bp setup.

#### Pretreatment and sequence clustering

For each chip generated, approximately one million reads were obtained for all the samples. The quality and length distribution of the reads were checked using the FASTQ tool (v0.11.7). After that, for each sample, the paired-end sequences were assembled using the PEAR software (v0.9.6) while keeping only the sequences whose Phred score was greater than 33 and whose overlap was at least 10 nucleotides. Then 30,000 sequences were randomly selected to normalize samples. Next, for each sample, full length VH sequences were grouped according to their identity and counted and clusters were formed as described in the text. Mutations observed in the mock control (gRNA only) experiment were then

eliminated in order to distinguish site-directed mutations from RT-PCR or sequence errors. Only clusters representing more than 0.1% of the total number of sequences were retained.

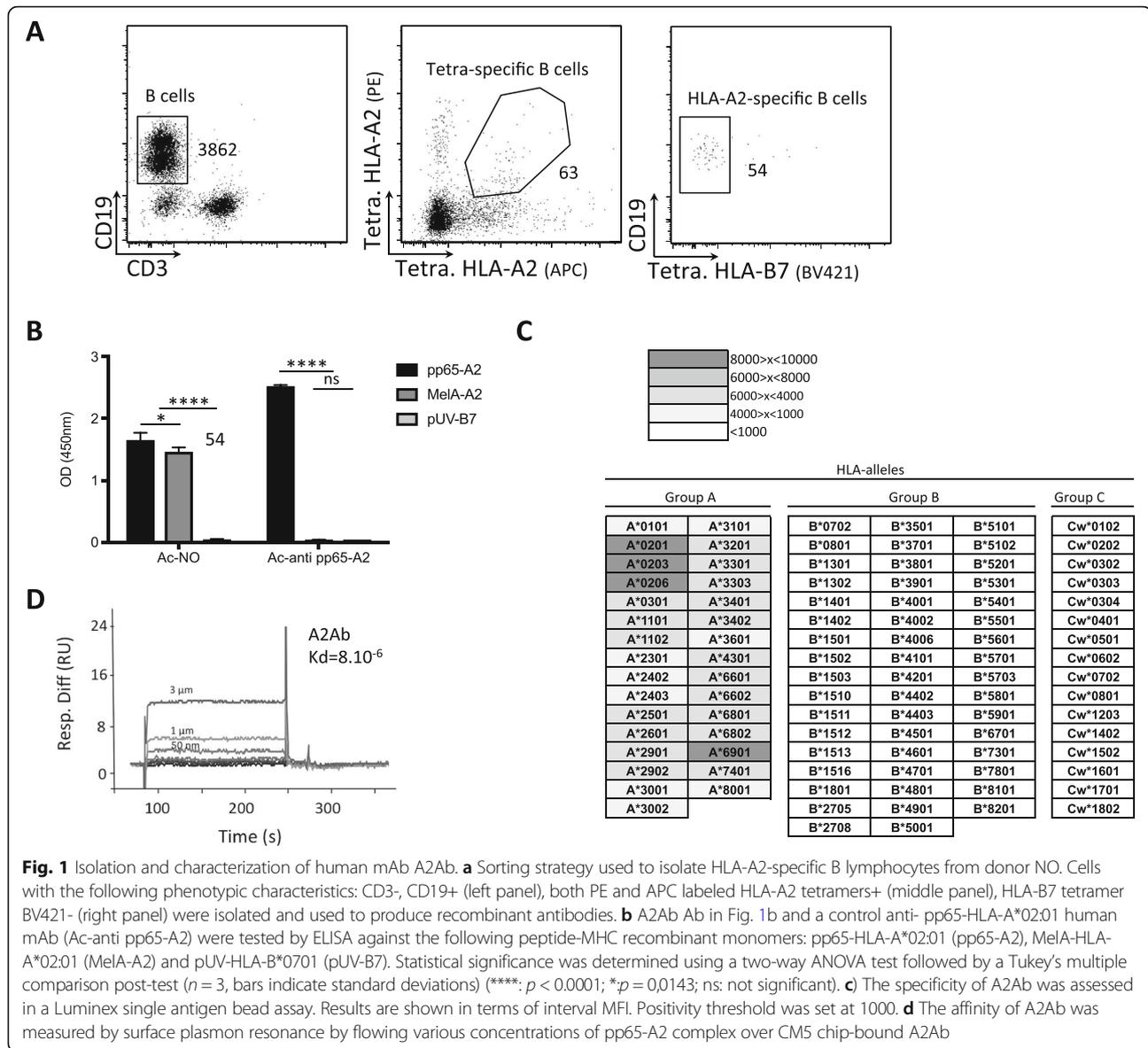
#### Alignment and mutation analysis

For each sample, the generated clusters were annotated by aligning each sequence cluster against the reference sequence using Biostring library (v2.48.0) in a custom R script, to generate a counting table. The generated data were filtered by subtracting the mutations detected in the mock sample. A position matrix was then generated to create a Weblogo using the ggseqlogo library (v0.1). The data processing was performed using a custom R script.

## Results

### Isolation of a low affinity human antibody against HLA-A\*02:01

A human HLA-A\*02:01 molecule (hereafter referred to as HLA-A2) was selected as a target for antibody discovery and maturation as it is easy to obtain blood samples from donors not previously immunized against this MHC allele. In addition, various recombinant HLA molecules were readily available in our laboratory. PBMCs from three HLA-A2-negative donors with negative serology for HLA-A2 circulating antibodies (Additional file 1: Table S1) were tested for the presence of blood circulating B cells specific for HLA-A2. This was done by flow cytometry sorting of B cells that bound HLA-A2 tetramers labeled with two different fluorochromes but did not bind HLA-B7 tetramers, using a technique described previously [8, 10]. B lymphocytes stained specifically by HLA-A2 tetramers could be identified in PBMC from all three donors (see Fig. 1a for an example) and were isolated as single cells. We attempted RT-PCR amplification of sequences coding for the variable regions of the heavy and light chains of four B lymphocytes isolated from one donor (NO) using a recently published protocol [8, 10]. A pair of heavy and light chain V region coding sequences was obtained for one of the four cells. After cloning these gene segments into eukaryotic expression vectors in phase with human heavy and light chain constant domains, the corresponding antibody (A2Ab) was successfully produced in the supernatant of transfected HEK cells and tested for its specificity. A2Ab recognizes HLA-A2 but not HLA-B7 in ELISA tests and this recognition does not depend on the peptide loaded into the HLA pocket (Fig. 1b). A single HLA antigen flow bead assay analysis confirmed that A2Ab can recognize HLA-A\*02:01, but also showed that A2Ab recognizes closely related alleles belonging to the HLA-A\*02 supertype (HLA-A\*02:03, A\*02:06 and A\*69:01) and weakly cross-reacts with other MHC A

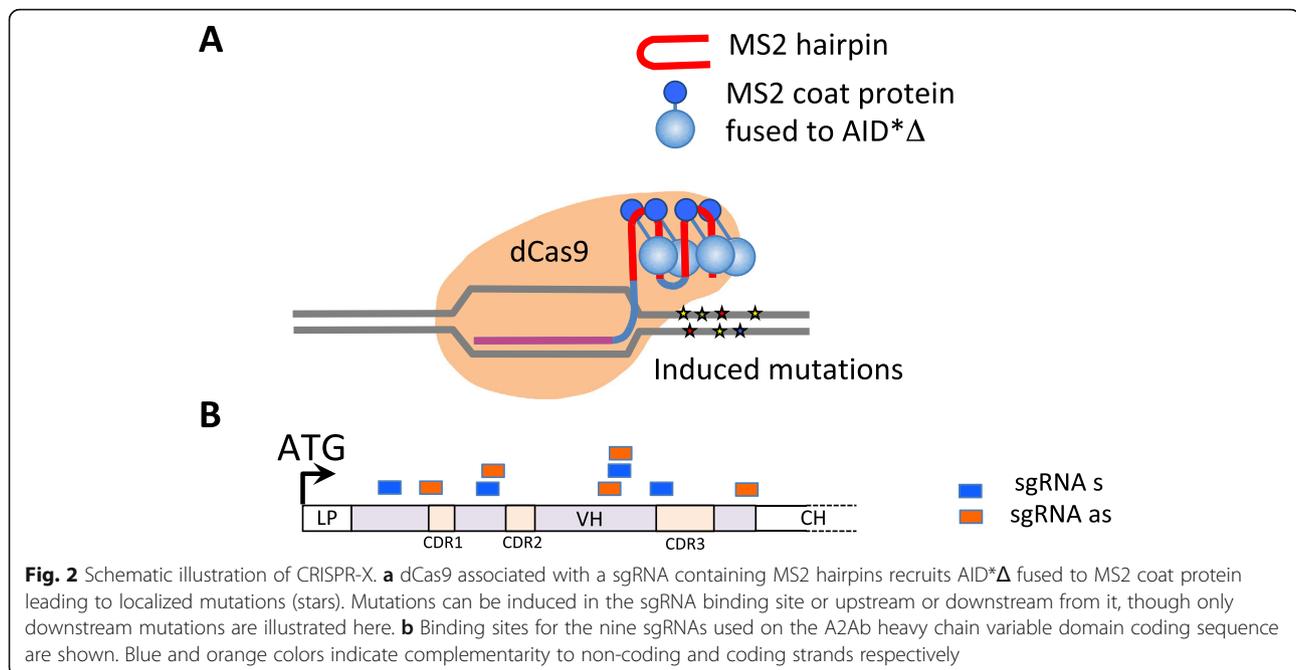


alleles. However, B or C alleles are not recognized (data not shown, results summarized in Fig. 1c). Finally, the affinity of A2Ab for the pp65/HLA-A2 complex was determined by surface plasmon resonance (SPR) to be in the low micromolar range ( $K_d = 8.10^{-6}$ , Fig. 1d). This is consistent with the HLA-A2-specific B cells being isolated from a naive/non-immune blood circulating B cell repertoire. The full nucleotide sequences of the heavy and light chains are provided in Additional file 1: Table S2.

#### CRISPR-X targeted mutagenesis of A2Ab and screening for higher avidity antibodies

We used the CRISPR-X approach [24] (Fig. 2a) to mutate the A2Ab sequence. Our overall procedure using iterative mutation and selection is summarized in Fig. 3a.

HEK 293 cells were engineered to express cell surface A2Ab by stable transfection of episomal vectors expressing its heavy and light chains (HC and LC, respectively). For induction of mutations, these cells were then transiently transfected with a plasmid coding for AID\* $\Delta$  fused to MS2 coat protein, and plasmids coding for dCas9 and nine different sgRNAs (Additional file 1: Table S3) spanning the sequence coding for the A2Ab HC variable domain (Fig. 2b). AID\* $\Delta$  is an AID mutant with increased SHM activity whose Nuclear Export Signal (NES) has been removed [24]. It has significantly increased mutation activity compared to wild-type AID without a NES [24]. Three successive transient transfections were performed before cells were screened for expression of mutant antibodies with increased avidity for HLA-A2.



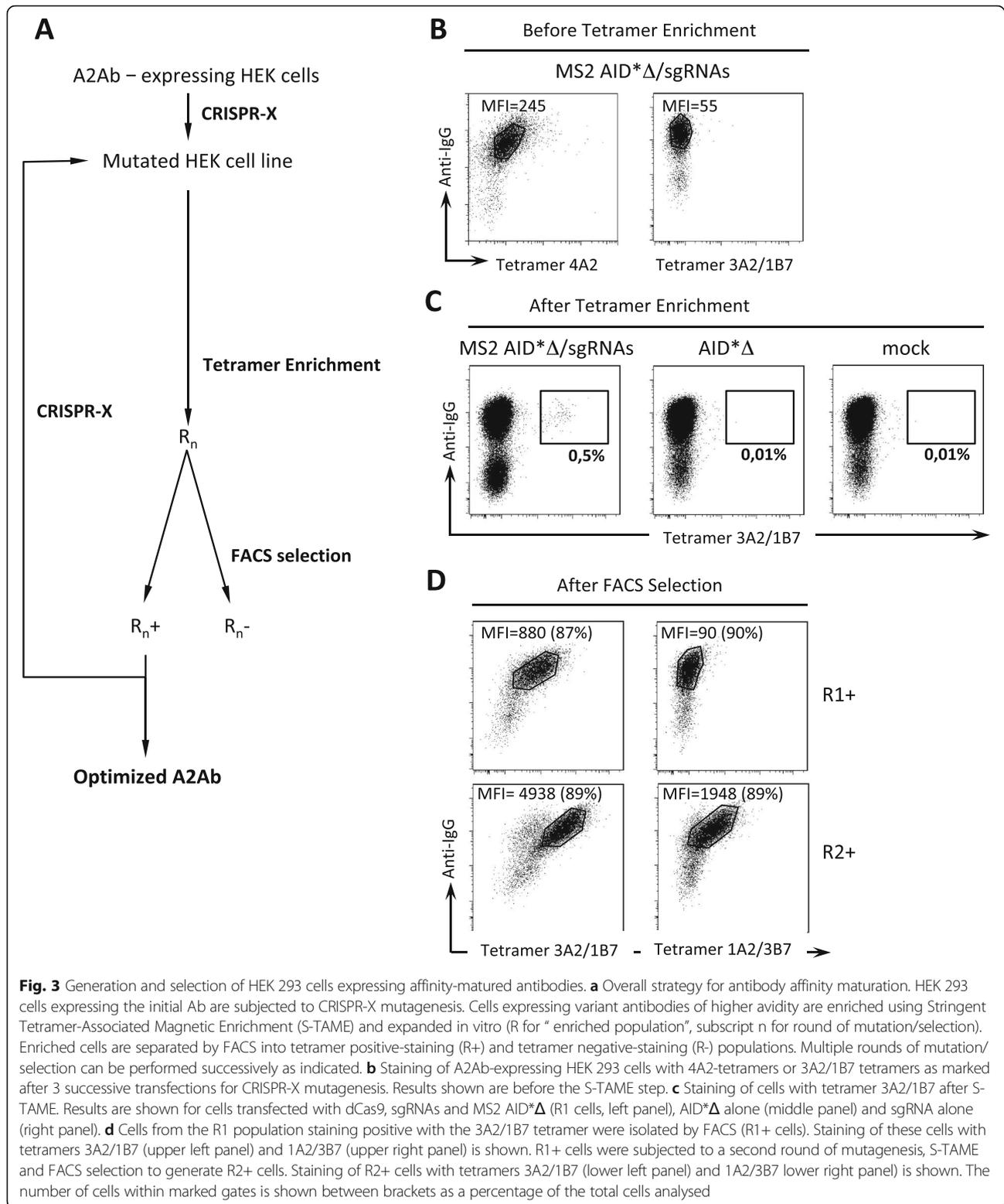
Cells we started from stably expressed cell surface A2Ab and thus were able to bind tetramers comprising four HLA-A2 molecules. These cells were subjected to three successive transfections. We expected cells expressing higher avidity antibodies post-mutagenesis to be able to bind tetramers containing fewer HLA-A2 molecules. We thus sought to identify cells in the mutated polyclonal population using labeling with a tetramer made up of 3 HLA-A2 molecules and one B7 molecule (3A2/1B7). As shown in Fig. 3b, we were unable to detect any 3A2/1B7-labeled cells in the mutated polyclonal population by flow cytometry, while all cells expressing IgG were labeled with the initial tetramer (4A2) as expected.

We suspected that 3A2/1B7-labeled cells might be too rare to be detectable in the fraction of the mutated polyclonal population we tested, so we tried to enrich them before analysis. The mutated polyclonal population was first incubated with the 3A2/1B7 tetramer coupled to APC, then subjected to positive selection using paramagnetic beads coupled to anti-APC antibodies. After magnetic enrichment, we observed a small proportion of cells clearly labeled by the 3A2/1B7 tetramer (Fig. 3c, left dot-plot). Notably, no such cells were detected when our protocol was carried out using A2Ab-expressing HEK 293 cells transfected with a hyperactive non-guided AID (Fig. 3c, middle dot-plot), or with guide RNAs alone (“mock”, Fig. 3c, right dot-plot). This first “positive” population (R1) was purified by cell sorting and expanded *in vitro* to yield population R1+ (> 95% pure). In marked contrast to the starting population, the R1+ population bound tetramers with just 3 HLA-A2 molecules (3A2/1B7, Fig. 3d, upper left dot-plot).

To complete a further round of mutagenesis/selection, we exposed the R1+ population to two successive transfections for mutagenesis using the same batch of sgRNAs as above, before selection was performed. This time we used a more stringent enrichment process with tetramers containing only one HLA-A2 molecule (1A2/3B7). A new population of tetramer positive cells was obtained (R2+), with a 2.2 fold increase in the 3A2/1B7 tetramer mean fluorescence intensity compared to R1+ (Fig. 3d, bottom left dot-plot). The R2+ population was also stained by tetramer 1A2/3B7, in marked contrast to R1+ cells (Fig. 3d, compare upper and lower right dot-plots). Each round of mutation and selection thus increases the avidity of the antibodies.

#### Antibody sequence evolution during mutagenesis and selection rounds

As described above, we were unable to detect cells capable of binding to the 3A2/1B7 tetramer after one round of mutagenesis until we used magnetic enrichment. This enrichment generated the R1 population. FACS sorting of this population yielded the R1+ population capable of binding 3A2/1B7 tetramers and the R1- population incapable of binding this tetramer. We used next generation sequencing (NGS) to search for heavy chain sequences enriched in the R1+ population relative to the R1- population and which could contain mutations responsible for the increased affinity of the R1+ population antibodies. 30,000 randomly selected reads from each population were analyzed. Reads represented more than 50 times were placed into a read-specific cluster, while



reads represented less than 50 times were grouped together in a category we termed “small clusters”. For the R1+ population, two large clusters representing together 42.5% of reads were detected, in addition to a third large cluster representing WT sequences (Table 1). Six other clusters representing together 5.2% of reads were also detected, together with numerous reads in the small cluster category. Seven of these eight non-WT clusters were clearly under-represented in the R1- population, where the WT cluster and small clusters predominated. Mutations observed in the seven clusters were located in the FRW3 and CDR3 regions (Fig. 4). They were often shared between different clusters, suggesting that they contribute to the increased affinity of R1+ population antibodies.

That WT and small cluster sequences represent 52.6% of R1+ reads might seem surprising. However, in the HEK 293 cells subjected to mutagenesis, antibody genes are present on episomal vectors, with several vector copies per cell [25]. Cells selected with the 3A2/1B7 tetramer may contain only one gene copy with a mutation leading to an antibody of increased affinity. All the other copies could contain either no mutation or neutral or even deleterious mutations, yet they will be co-enriched with the copy carrying the affinity-increasing mutation.

The second round of mutation/selection led to a drastic decline in WT reads (from 13.6% for R1+, to 0% for R2+), while in the R2+ population a cluster representing nearly half of the NGS reads emerged, corresponding to HCs accumulating six mutated amino acids: D74H/S80 T/W102 L/M112I/G121D/R124P (Table 2, Fig. 4). Interestingly, the CDR2 D74H mutation was not detected in the R1+ population. Nine of the thirteen R2+ clusters (a cluster contains more than 50 reads of the cluster-specific sequence) differ only very slightly from this main sequence, underlining a strong convergence of most of the R2+ clusters. The W102, M112I, G121D and R124P mutations were already well represented in the R1+ population (Table 1). The second round of mutation/selection led to emergence of two new R2+ -specific mutations: D74H in the CDR2 and S80 T in the FRW3 region.

#### Characterization of evolved antibodies against HLA-A2

The R2+ antibodies C4.4 and C4.18 (Tables 1 and 2) were produced as recombinant proteins for comparison of their affinity and specificity to those of the initial A2Ab. As shown in Fig. 5a, C4.4 and C4.18 mAbs show clearly increased reactivity against HLA-A\*02:01 compared to A2Ab in an ELISA. We next determined C4.18's affinity for HLA-A\*02:01 by SPR:  $K_d = 10^{-7}$  (Fig. 5b). This is an almost two log increase over that of the initial A2Ab ( $K_d = 8 \times 10^{-6}$ ). We were unable to make enough C4.4 for SPR studies.

These results demonstrate that our matured antibodies bind with higher affinity to antigen than A2Ab in fully

**Table 1** CRISPR-X-mediated evolution of A2Ab: NGS analysis, round 1

R1			
Cluster name	mAb name	%R1+ (counts)	%R1- (counts)
G121E	C3.2	31.8 (9542)	0.3 (94)
WT	A2Ab	13.6 (4103)	52.6 (15788)
W102 L//M112I//G121D//R124P	C3.9	10.7 (3197)	0
G121E//V140 L		1.1 (340)	0
G121D	C3.3	1.1 (316)	0.3 (95)
S103 N//G121D	C3.5	0.9 (261)	0
W102 L//D109A//M112I//G121D//R124P		0.8 (239)	0
M112I//G121D//R124P		0.7 (209)	0
V140 L		0.6 (168)	1.5 (448)
R117S		0	0.5 (148)
Y114S		0	0.4 (124)
D109A		0	0.4 (119)
S103R		0	0.2 (67)
S108A		0	0.2 (66)
G137R		0	0.2 (61)
R119S		0	0.2 (60)
P60A		0	0.2 (54)
V123G		0	0.2 (54)
small clusters R1+ (number)	C3.4	38.7 (11625)	
small clusters R1- (number)			42.7 (12817)
total		100 (30000)	100 (30000)

in vitro tests. But can they bind to antigen expressed on the surface of cells, a prerequisite for biological activity? The initial A2Ab was not of sufficient affinity to bind to two HLA-A2 expressing cell lines tested, 721.221 B cells made HLA-A2 positive by transfection (721.221(A2)), and naturally HLA-A2 expressing BLCL HEN. However, the increased affinity of C4.4 and C4.18 led to ready detection of such binding (Fig. 5c). Binding to 721.221(A2) B cells was HLA-A2 dependent, as no binding was observed to the parental HLA-A2 negative 721.221 B cells. A single HLA antigen flow bead assay analysis confirmed that C4.4 and C4.18 had higher affinity than A2Ab for HLA-A\*02:01 and also showed a gain in specificity, as they had significantly less crossreactivity against other HLA-A alleles (compare Fig. 5d to Fig. 1c).

#### Discussion

We show that starting from a low affinity antibody, CRISPR-X targeting of AID to antibody genes can be used to obtain affinity-matured human antibodies *in cellulo* in about 6 weeks. Thus we increased the affinity of a



fully human anti-HLA-A\*02:01 mAb to sufficient levels for biological activity and without loss of specificity in just 2 cycles of mutation/selection (each cycle consisting of several successive mutagenesis transfections prior to the selection steps). The low affinity antibody we started from was expressed by naive B cells. Our procedure thus mimics in vitro antibody maturation in secondary lymphoid organs, where naive B lymphocytes stimulated by Ag recognition via specific BCRs of limited affinity go on to generate receptors optimized for Ag recognition.

Using SHM for in vitro affinity maturation of antibodies is an attractive strategy and has been used previously in a variety of cell lines [2, 26–29]. Some recently described technologies to affinity-mature antibodies in vitro rely on the integration of a library of CDR3 domains using CRISPR Cas9 technology [30] or mutagenesis of only the most permissive CDR positions [31]. Prior to these approaches, the Bowers group pioneered the coupling of AID-induced somatic hypermutation with mammalian cell surface display in the easily transfectable HEK 293 cells for in vitro maturation of mAbs [15]. We have extended this latter approach to include specific targeting of AID to the immunoglobulin genes to be mutated using a combination of dCas9-AID fusions and specific guide RNAs. We have also introduced a magnetic enrichment step prior to FACS sorting of mutated cells to facilitate isolation of cells expressing higher affinity antibodies. These modifications proved necessary to obtain our affinity matured anti-HLA antibodies after only 2 rounds of mutation/selection. Indeed, we were unable to detect any cells carrying higher affinity antibodies when AID activity was not targeted to the Ig sequences, and we could only detect and isolate them after the first mutation round if magnetic enrichment preceded FACS sorting.

While this manuscript was in preparation, Liu et al. described a variety of diversifying base editors and showed that they retained their intrinsic nucleotide preferences when recruited to DNA as MS2 coat fusions [32]. They also demonstrated that it was possible to use diversifying base editors to affinity mature a previously studied murine anti-4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl (NP) antibody called B1–8 [32]. The matured antibodies they obtained contained various mutations that had already been observed after subjecting B1–8 to SHM in a mouse in vivo immunization model. The effect of these point mutations was tested separately, and it was not clear whether any of their antibodies contained multiple mutations. In our study, we define previously unknown combination of mutations that are required to increase the affinity of a human antibody against HLA-A2, without loss of specificity. As might be expected, “beneficial” mutations could be found in the CDR2 and CDR3. Interestingly, CDR3 mutations appeared after the first round of mutation/selection, while CDR2 mutations only appeared after the second round. In addition to the CDR2 and CDR3 mutations, some mutations also appeared in the FRW3. In particular, the C4.18 mAb obtained after the second round of mutagenesis differs from the first round C3.9 mAb by only two additional mutated amino acids located in FRW3. This is interesting as antibody in vitro evolution studies have suggested that mutations leading to higher affinity often correspond to residues distant from the antigen binding site and that affinity maturation of antibodies occurs most effectively by changes in second sphere residues rather than contact residues [33, 34]. It is also interesting to note that increasing the affinity of our antibodies for HLA-A\*02:01 also led to an increase in their

**Table 2:** CRISPR-X-mediated evolution of A2Ab: NGS analysis, round 2

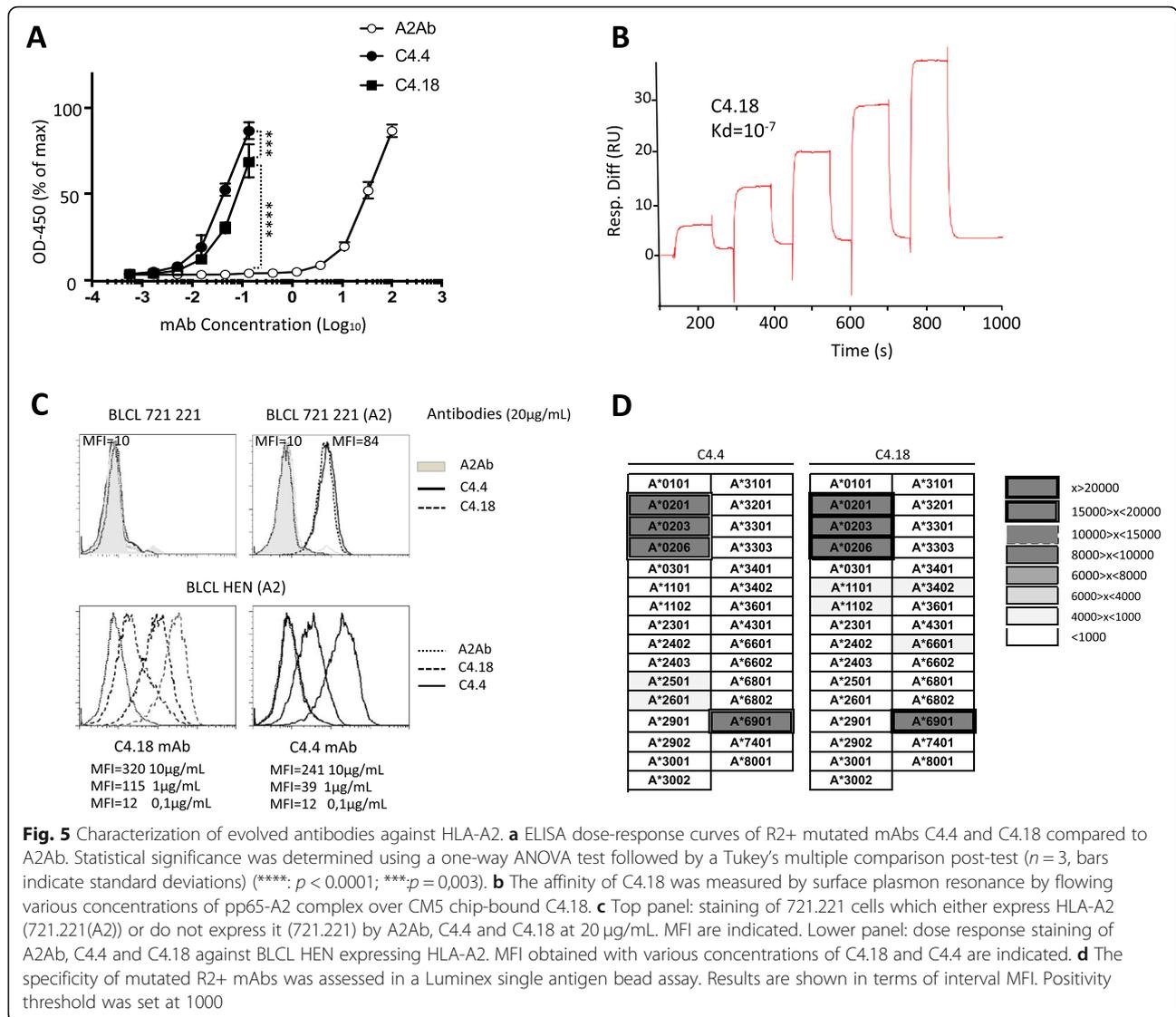
R2			
Cluster name	mAb name	%R2+ (counts)	%R2- (counts)
D74H//S80 T//W102 L//M112I//G121D//R124P	C4.4	49.2 (14755)	9.2 (2756)
D74H//S80 T//W102 L//D109A//M112I//G121D//R124P		2.4 (733)	0.2 (73)
D74H//S80 T//M112I//G121D//R124P		2.2 (650)	0
G121E		1.7 (496)	38.9 (11670)
D74H//S80 T//F83S//W102 L//M112I//G121D//R124P		0.7 (223)	0.4 (112)
D74H//S80 T//A98P//W102 L//M112I//G121D//R124P		0.6 (182)	0
D74H//S80 T//W102 L//M112I//G121D//R124P//V140 L		0.6 (173)	0
D74H//W102 L//M112I//G121D//R124P	C4.18	0.5 (163)	0
G121D//R124P		0.2 (74)	0.9 (274)
D74H//S80 T//W102 L//S104 T//M112I//G121D//R124P		0.2 (72)	0
D74H//S80 T//W102 L//G121E		0.2 (68)	0
W102 L//M112I//G121D//R124P		0.2 (63)	4.2 (1247)
D74H//S80 T//W102 L//L105R//M112I//G121D//R124P		0.2 (59)	0
W52C//G121E		0	1.1 (333)
G121E//V140 L		0	0.7 (209)
R47S//R57H//G121E		0	0.7 (204)
W102 L//G121E		0	0.7 (203)
WT		0	0.6 (193)
M112I//G121D//R124P	A2Ab	0	0.5 (137)
W102 L//M112I//G121E		0	0.4 (128)
H101Q//G121E		0	0.4 (122)
I39M//H101Q//G121E		0	0.4 (119)
P60S//G121E		0	0.4 (81)
C41Y//G121E		0	0.2 (66)
I39M//G121E		0	0.2 (56)
W102C//G121E		0	0.2 (56)
small clusters R2+ (number)		41 (12289)	
small clusters R2- (number)			39.9 (11961)
total		100 (30000)	100 (30000)

specificity: they progressively lost their crossreactivity against non-HLA-A\*02 alleles.

The progressive evolution of A2Ab we observed, with a gradual accumulation of combinations of mutations, is probably necessary for the maturation of the affinity of most antibodies. The combination of CDR and FRW mutations could result from CRISPR-X allowing simultaneous targeting of multiple sites all along the Ig variable sequence and potentially represents an important advantage over other recently described technologies limiting mutagenesis to the CDR3 [30] or to the most permissive CDR positions [31].

Our CRISPR-X based approach can readily be developed further to increase the potential for antibody diversification. We used the same 9 gRNAs for both rounds

of mutagenesis. Further rounds of mutagenesis could be carried out using different gRNAs. The CRISPR-X approach using *S. pyogenes* dCas9 requires the presence of an NGG PAM immediately downstream from the gRNA binding site. Cas9 variants with relaxed PAM requirements could also be used in this approach, including the recently described variant using a PAM reduced to NG. This would lift almost all constraints on gRNA choice. We focused on mutating the Ig heavy chain gene alone, but both heavy and light chain genes were present in cells subjected to mutagenesis. We did not detect any light chain mutations after transfection of the heavy chain gRNAs (data not shown), demonstrating the specificity of the targeting approach. However, AID could be targeted simultaneously to both heavy and light chain



genes by cotransfecting cells with a mixture of heavy and light chain gRNAs, increasing the diversification possibilities by association of mutated heavy and light chains in different combinations.

The A2Ab mAb used here served as an initial proof of concept for antibody maturation in vitro using CRISPR-X. However, the fully human mAbs specific for the HLA-A\*02:01 allele we generated could have direct clinical applications, notably in the context of mismatch HLA-A2 organ transplantation. Two recent studies described the efficacy of anti-HLA-A2-specific CARs of murine origin in the control of graft rejection in animal models [35, 36]. Using fully human antibodies could be an important step forward for implementation of such strategies to humans. Furthermore, the availability of a series of mAbs of increasing affinity (derived from different rounds of

mutation/selection) could be useful to study the impact of CAR affinity on biological activity and could also help to improve predictive algorithms for antibody maturation.

### Conclusions

We describe here a new approach for progressive and controlled antibody evolution. This procedure should allow us to obtain antibodies of high affinity and specificity against virtually any Ag, if available in a recombinant form, starting directly from circulating naïve B cells, which represent a vast pool of Ag-specific antibodies to tap into. Our approach may prove particularly useful when fully human antibodies are required: when first isolated from non-immunized individuals, they are often of insufficient affinity for therapeutic or research purposes. Many Ag of interest for the treatment of

pathologies such as cancer are in this category and thus represent potential targets for this approach. In addition, our approach can be adapted to optimize antibody specificity by addition of a simple negative selection step to eliminate antibodies with undesired interactions. This could be useful for improving the specificity of currently existing murine, chimeric or humanized antibodies.

## Additional file

**Additional file 1: Table S1.** Isolation of human anti-HLA-A2 B lymphocytes from the PBMC of grafted patients. This table indicates the number of HLA-A2-specific B cells isolated from each donor. **Table S2.** Full nucleotide sequences. This table indicates the nucleotide sequences of the variable segments of the heavy and light chains of A2Ab and of the heavy chain of the various R1+ or R2+ mutants. **Table S3.** gRNA sequences binding to the Ig gene sense (s) or antisense (as) strands. This table indicates the nucleotide sequence of the gRNAs which are numbered according to their position from the ATG (A corresponding to nucleotide number 1) of the A2Ab variable heavy chain sequence (see Additional file 1: **Table S2**). (DOCX 51 kb)

## Abbreviations

Ag: Antigen; APC: Allophycocyanin; BCR: B-cell receptor; BV: Brilliant violet; CDR: Complementarity determining region; FRW: Framework region; HC: Heavy chain; LC: Light chain; mAbs: Monoclonal antibodies; PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; PE: Phycoerythrin; pMHC: Peptide-major histocompatibility complex; SPR: Surface plasmon resonance

## Acknowledgments

We thank the Cytometry Facility "CytoCell" (SFR Santé, Biogenouest, Nantes) for expert technical assistance. We thank also all the staff of recombinant protein production (P2R) and of IMPACT platforms (UMR-S892, SFR Santé, Biogenouest, Nantes) for their technical support. We thank Dr. Anne Cesbron, head of the HLA laboratory (EFS, Nantes) where luminex were performed. We thank Dr. Magali Giral for access to the DIVAT cohort.

## Funding

This work was financially supported by the IHU-Cesti project funded by the « Investissements d'Avenir » French Government program, managed by the French National Research Agency (ANR) (ANR-10-IBHU-005). The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Métropole and Région Pays de la Loire. This work was realized in the context of the LabEX IGO program supported by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01. These funds were used for the design of the study, the generation and analysis of mutant antibodies, the interpretation and the writing/publication of the manuscript.

## Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its additional file.

## Authors' contributions

MCD, MM, LG, MCG, JP performed the experiments. BN performed the bioinformatic studies. FD performed the luminex analysis. MCD, RB and XS wrote the manuscript, designed the experiments, analyzed and interpreted the data and supervised the working program. All authors read and approved the final manuscript.

## Ethics approval and consent to participate

Blood samples were collected from donors with written informed consents. The procedure and the cohort of donors (named « DIVAT ») was approved by the local ethic committee « CPP Grand Ouest IV » reference number: MESR DC-2017-2987.

## Consent for publication

Not applicable.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Author details

<sup>1</sup>CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France. <sup>2</sup>LabEx IGO "Immunotherapy, Graft, Oncology", Nantes, France. <sup>3</sup>Centre Hospitalier Universitaire Hôtel-Dieu, Nantes, France. <sup>4</sup>HLA Laboratory, EFS Centre Pays de la Loire, Nantes, France.

Received: 20 November 2018 Accepted: 5 February 2019

Published online: 18 February 2019

## References

- Schatz DG, Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(4):251–63.
- Martin A, Scharff MD. Somatic hypermutation of the AID transgene in B and non-B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(19):12304–8.
- Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell.* 2000;102(5):553–63.
- Williams SC, Fripiat JP, Tomlinson IM, Ignatovich O, Lefranc MP, Winter G. Sequence and evolution of the human germline V lambda repertoire. *J Mol Biol.* 1996;264(2):220–32.
- Calis JJ, Rosenberg BR. Characterizing immune repertoires by high throughput sequencing: strategies and applications. *Trends Immunol.* 2014;35(12):581–90.
- Corti D, Langedijk JP, Hinz A, Seaman MS, Vanzetta F, Fernandez-Rodriguez BM, Silacci C, Pinna D, Jarrossay D, Balla-Jhaghoorsingh S, et al. Analysis of memory B cell responses and isolation of novel monoclonal antibodies with neutralizing breadth from HIV-1-infected individuals. *PLoS One.* 2010;5(1):e8805.
- Corti D, Voss J, Gambliin SJ, Codoni G, Macagno A, Jarrossay D, Vachieri SG, Pinna D, Minola A, Vanzetta F, et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science.* 2011;333(6044):850–6.
- Devilder MC, Moyon M, Saulquin X, Gautreau-Rolland L. Generation of discriminative human monoclonal antibodies from rare antigen-specific B cells circulating in blood. *J Vis Exp.* 2018;(132).
- Franz B, May KF Jr, Dranoff G, Wucherpfennig K. Ex vivo characterization and isolation of rare memory B cells with antigen tetramers. *Blood.* 2011;118(2):348–57.
- Ouisse LH, Gautreau-Rolland L, Devilder MC, Osborn M, Moyon M, Visentin J, Halary F, Bruggemann M, Buelow R, Anegón I, et al. Antigen-specific single B cell sorting and expression-cloning from immunoglobulin humanized rats: a rapid and versatile method for the generation of high affinity and discriminative human monoclonal antibodies. *BMC Biotechnol.* 2017;17(1):3.
- Hoogenboom HR. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol.* 2005;23(9):1105–16.
- Akamatsu Y, Pakabunto K, Xu Z, Zhang Y, Tsurushita N. Whole IgG surface display on mammalian cells: application to isolation of neutralizing chicken monoclonal anti-IL-12 antibodies. *J Immunol Methods.* 2007;327(1–2):40–52.
- Al-Qaisi TS, Su YC, Roffler SR. Transient AID expression for in situ mutagenesis with improved cellular fitness. *Sci Rep.* 2018;8(1):9413.
- An L, Chen C, Luo R, Zhao Y, Hang H. Activation-induced cytidine deaminase aided in vitro antibody evolution. *Methods Mol Biol.* 2018;1707:1–14.
- Bowers PM, Horlick RA, Neben TY, Toobian RM, Tomlinson GL, Dalton JL, Jones HA, Chen A, Altobelli L 3rd, Zhang X, et al. Coupling mammalian cell surface display with somatic hypermutation for the discovery and maturation of human antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(51):20455–60.
- Ho M, Nagata S, Pastan I. Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(25):9637–42.

17. Ho M, Pastan I. Display and selection of scFv antibodies on HEK-293T cells. *Methods Mol Biol.* 2009;562:99–113.
18. McConnell AD, Do M, Neben TY, Spasojevic V, MacLaren J, Chen AP, Altobelli L 3rd, Macomber JL, Berkebile AD, Horlick RA, et al. High affinity humanized antibodies without making hybridomas; immunization paired with mammalian cell display and in vitro somatic hypermutation. *PLoS One.* 2012;7(11):e49458.
19. Su YC, Al-Qaisi TS, Tung HY, Cheng TL, Chuang KH, Chen BM, Roffler SR. Mimicking the germinal center reaction in hybridoma cells to isolate temperature-selective anti-PEG antibodies. *mAbs.* 2014;6(4):1069–83.
20. Wang L, Jackson WC, Steinbach PA, Tsien RY. Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(48):16745–9.
21. Hwang JK, Alt FW, Yeap LS: Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Microbiol Spectr* 2015, 3(1):MDNA3–0037-2014.
22. Hess GT, Tycko J, Yao D, Bassik MC. Methods and applications of CRISPR-Mediated Base editing in eukaryotic genomes. *Mol Cell.* 2017;68(1):26–43.
23. Rees HA, Liu DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet.* 2018;19(12):770–88.
24. Hess GT, Fresard L, Han K, Lee CH, Li A, Cimprich KA, Montgomery SB, Bassik MC. Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells. *Nat Methods.* 2016;13(12):1036–42.
25. Yates JL, Warren N, Sugden B. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature.* 1985;313(6005):812–5.
26. Cumbers SJ, Williams GT, Davies SL, Grenfell RL, Takeda S, Batista FD, Sale JE, Neuberger MS. Generation and iterative affinity maturation of antibodies in vitro using hypermutating B-cell lines. *Nat Biotechnol.* 2002;20(11):1129–34.
27. Delker RK, Fugmann SD, Papavasiliou FN. A coming-of-age story: activation-induced cytidine deaminase turns 10. *Nat Immunol.* 2009;10(11):1147–53.
28. Maul RW, Gearhart PJ. AID and somatic hypermutation. *Adv Immunol.* 2010;105:159–91.
29. Seo H, Hashimoto S, Tsuchiya K, Lin W, Shibata T, Ohta K. An ex vivo method for rapid generation of monoclonal antibodies (ADLib system). *Nat Protoc.* 2006;1(3):1502–6.
30. Mason DM, Weber CR, Parola C, Meng SM, Greiff V, Kelton WJ, Reddy ST. High-throughput antibody engineering in mammalian cells by CRISPR/Cas9-mediated homology-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(14):7436–49.
31. Tiller KE, Chowdhury R, Li T, Ludwig SD, Sen S, Maranas CD, Tessier PM. Facile affinity maturation of antibody variable domains using natural diversity mutagenesis. *Front Immunol.* 2017;8:986.
32. Liu LD, Huang M, Dai P, Liu T, Fan S, Cheng X, Zhao Y, Yeap LS, Meng FL: Intrinsic nucleotide preference of Diversifying Base editors guides antibody ex vivo affinity maturation. *Cell Rep* 2018, 25(4):884–892 e883.
33. Boder ET, Midelfort KS, Wittrup KD. Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(20):10701–5.
34. Persson H, Kirik U, Thornqvist L, Greiff L, Levander F, Ohlin M. In vitro evolution of antibodies inspired by in vivo evolution. *Front Immunol.* 2018;9:1391.
35. MacDonald KG, Hoeppli RE, Huang Q, Gillies J, Luciani DS, Orban PC, Broady R, Levings MK. Alloantigen-specific regulatory T cells generated with a chimeric antigen receptor. *J Clin Invest.* 2016;126(4):1413–24.
36. Noyan F, Zimmermann K, Hardtke-Wolenski M, Knoefel A, Schulde E, Geffers R, Hust M, Huehn J, Galla M, Morgan M, et al. Prevention of allograft rejection by use of regulatory T cells with an MHC-specific chimeric antigen receptor. *Am J Transplant.* 2017;17(4):917–30.

**Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:**

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

**At BMC, research is always in progress.**

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



2 **NKG2D controls natural reactivity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes against mesenchymal**  
3 **glioblastoma cells**

4

5 Cynthia Chauvin<sup>1,2#</sup>, Noémie Joalland<sup>1,2#</sup>, Jeanne Perroteau<sup>1,2</sup>, Ulrich Jarry<sup>1,2</sup>, Laura  
6 Lafrance<sup>1,2</sup>, Catherine Willem<sup>1,5</sup>, Christelle Retière<sup>1,5</sup>, Lisa Oliver<sup>1,3</sup>, Catherine Gratas<sup>1,3</sup>,  
7 Laetitia Gautreau-Rolland<sup>1,2</sup>, Xavier Saulquin<sup>1,2</sup>, François M. Vallette<sup>1,2,4</sup>, Henri Vié<sup>1,2</sup>,  
8 Emmanuel Scotet<sup>1,2§</sup> and Claire Pecqueur<sup>1,2§</sup>

9

10 <sup>1</sup> CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France

11 <sup>2</sup> LabEx IGO “Immunotherapy, Graft, Oncology”, Nantes 44007 France

12 <sup>3</sup> Centre Hospitalier-Universitaire (CHU) de Nantes, Nantes 44007 France

13 <sup>4</sup> Institut de Cancérologie de l'Ouest (ICO), St Herblain, France

14 <sup>5</sup> Etablissement Français du Sang, Nantes, France

15 <sup>#, §</sup> Authors contributed equally to this work

16

17 **Running title:** V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes react against mesenchymal glioblastoma

18

19 **Keywords:** Human, glioblastoma, immunotherapy, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes, molecular  
20 subtype

21

22 **Additional information**

23 This work was supported by INSERM, CNRS, Université de Nantes, Association pour la  
24 Recherche contre le Cancer, Institut National du Cancer (INCa#PLBio2013-201,  
25 #PLBio2014-155), Ligue Nationale contre le Cancer. This work was realized in the context of  
26 the LabEX IGO and the IHU-Cesti programs, supported by the National Research Agency  
27 Investissements d'Avenir via the programs ANR-11-LABX-0016-01 and ANR-10-IBHU-  
28 005, respectively. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays  
29 de la Loire Region.

30

31 **Correspondence to**

32 • Claire Pecqueur, ORCID# 0000-0002-7612-1672; [claire.pecqueur@univ-nantes.fr](mailto:claire.pecqueur@univ-nantes.fr)

33 Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers, INSERM  
34 UMR1232 CNRS ERL6001, Université de Nantes, 8 quai Moncoussu, 44007 Nantes,  
35 France ; phone: +33 2 2808 0302; Fax: +33 2 2808 0204

36 •Emmanuel Scotet, ORCID# 0000-0001-8010-9556; emmanuel.scotet@univ-nantes.fr  
37 Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers, INSERM  
38 UMR1232 CNRS ERL6001, Université de Nantes, 8 quai Moncoussu, 44007 Nantes,  
39 France; phone : +33 2 2808 0222; Fax: +33 2 2808 0204

40 The authors declare no competing financial interests.

41

## 42 **Statement of translational relevance**

43 Glioblastoma representing the majority of primary malignant brain tumors display a dismal  
44 prognosis with a recurrence rate of more than 90%. Therapeutic immunotherapies, including  
45 the emerging use of adoptive cell therapy, has shown promising anti-tumor efficacy. In this  
46 work, we clearly show that the more resistant subset of glioblastoma cells are spontaneously  
47 killed by non-alloreactive allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte effectors. This natural  
48 reactivity process, mediated by the  $\gamma\delta$  TCR and tightly regulated by cellular stress-associated  
49 NKG2D pathway, led to the identification of highly reactive allogeneic V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T  
50 lymphocyte subsets. Importantly, we provide evidence of allogeneic V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte  
51 immunotherapy efficacy *in vivo*, in absence of any prior tumor cell sensitization. Our study  
52 brings new insights into novel immunotherapeutic options for therapy directed at the  
53 recurrence of GBM based on adoptive transfer of allogeneic V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes at the  
54 tumor bed.

55

56 **Abstract**

57

58 Purpose: Cellular immunotherapies are currently being explored to eliminate highly invasive  
59 and chemoradioresistant glioblastoma (GBM) cells involved in rapid relapse. We recently  
60 showed that concomitant stereotactic injections of non-alloreactive allogeneic V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T  
61 lymphocytes eradicate zoledronate-primed human GBM cells. In the present study, we  
62 investigated the spontaneous reactivity of allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes toward  
63 primary human GBM cells, *in vitro* and *in vivo*, in absence of any prior sensitization.

64 Experimental Design: Through functional and transcriptomic analyses, we extensively  
65 characterized the immunoreactivity of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes against various primary  
66 GBM cultures directly derived from patient tumors.

67 Results: We evidence that GBM cells displaying a mesenchymal subtype signature are  
68 spontaneously eliminated by allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes, a reactivity process  
69 being mediated by  $\gamma\delta$  TCR and tightly regulated by cellular stress-associated NKG2D  
70 pathway. This led to the identification of highly-reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte populations,  
71 independently of a specific TCR repertoire signature. Moreover, we finally provide evidence  
72 of immunotherapeutic efficacy *in vivo*, in absence of any prior tumor cell sensitization.

73 Conclusions: By identifying pathways implicated in the selective natural recognition of  
74 mesenchymal GBM cell subtypes, accounting for 30% of primary diagnosed and 60% of  
75 recurrent GBM, our results pave the way for novel targeted cellular immunotherapies.

76

77

## 78 **Introduction**

79 Glioblastoma (GBM) are the most frequent primary brain tumors in adult with an incidence of  
80 5 per 100,000 people. Current standard therapy, defined by the Stupp protocol, includes  
81 surgery followed by radiotherapy with concomitant and adjuvant chemotherapy (1). Despite  
82 such aggressive treatments, the median survival does not exceed 18 months, with less than  
83 5% of patients alive at 5 years. This dismal prognosis might be explained by deep invasive  
84 tumor growth, limited surgical efficiency, poor drug delivery across the Blood Brain Barrier  
85 and a high degree of GBM tumor heterogeneity. First, GBM display inter-tumor  
86 heterogeneity mostly characterized by distinct genetic alterations occurring in individual  
87 tumors and leading to various responses in identical patients. The genetic landscape of GBM  
88 has been performed through Genome Wide Association Studies (GWAS) allowing the  
89 identification of up to four molecular subtypes with relative prognostic or predictive  
90 significance (2,3). There are marked differences between the mesenchymal subtype (MES)  
91 and the three other ones (defined here as CNP, referring to Classical, Neural and Proneural  
92 subtypes). MES subtype is associated with poor survival, in contrast to CNP subtype which  
93 are generally associated with a more favorable outcome (2,4,5). Second, spatial heterogeneity  
94 within the same tumor, including active tumor zones as well as hypoxic and necrotic zones, is  
95 common in GBM (6,7). Importantly, hypoxic zones constitute cellular niches for MES GBM  
96 cells and also cancer stem-*like* cells (CSC) with singular phenotypic properties including  
97 transient quiescence, self-renewal, resistance to radiation-induced DNA damages and the  
98 ability to reconstitute the initial tumor. Thus, new strategies targeting highly resistant cancer  
99 cells, including mesenchymal GBM cells and CSC, may significantly improve patients'  
100 outcomes.

101 In line with their spectacular effects evidenced in various solid and circulating cancer  
102 indications (8–11), immunotherapies have also been proposed for treating GBM patients (12),  
103 including adoptive transfer of immune cells. Among attractive immune effectors, peripheral  
104 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes, mostly present in primates and representing 5-10% of blood CD3<sup>+</sup>  
105 lymphocytes in healthy adults, are important players in natural host defenses against infection  
106 and malignancies (13). These transitional T lymphocytes are selectively activated in a TCR-  
107 dependent, but MHC-independent manner, by non-peptidic small molecules (hereafter called  
108 phosphoantigens (PAg)), such as isopentenyl pyrophosphate (IPP). Accordingly, target cells  
109 sensitization by pharmacological aminobisphosphonate (NBP) compounds, such as  
110 zoledronate, inhibiting a key enzyme of the mammalian mevalonate pathway that degrades

111 Pag and upregulate the reactivity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes. We have described a mandatory  
112 role played by BTN3A/CD277 butyrophilins which are type I glycoproteins from the B7  
113 superfamily in this still unclear reactivity process (14–16). Besides TCR-dependent  
114 mechanism, cell recognition and subsequent V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte activation also involves  
115 the engagement of Natural Killer (NK) receptors, such as the activating NKG2D (*natural*  
116 *killer group 2, member D*) receptor (17). This receptor recognizes stress-induced molecular  
117 determinants that are barely expressed by healthy cells while often upregulated by infected or  
118 transformed cells. Importantly, given the absence of MHC restriction, the injection of  
119 allogeneic V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes within the surrounding cerebral parenchyma following  
120 tumor resection represents a unique opportunity to deliver elevated quantities of tumor-  
121 reactive T lymphocytes in the vicinity of residual malignancy. In line with this, we showed  
122 that concomitant stereotactic injections of allogeneic V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes and zoledronate  
123 eradicate human GBM cells *in vivo* (18). This study also showed that V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes  
124 display unexpected efficient and natural cytotoxicity against some human GBM cells (19).

125

126 In the present study, we investigated the molecular mechanisms regulating the spontaneous  
127 reactivity of allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes toward some human GBM cells.  
128 Using primary GBM cells from patients, we demonstrate that allogeneic V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T  
129 lymphocytes specifically and spontaneously react against GBM cells with a mesenchymal  
130 signature. This work next showed that highly reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes, that are  
131 engaged through both TCR and NKG2D pathways, but independently of a specific TCR  
132 signature. Finally, we provided evidence of allogeneic V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte immunotherapy  
133 efficacy *in vivo*, in absence of any prior sensitization.

134

## 135 **Materials and Methods**

### 136 **Human primary GBM cultures**

137 Human primary GBM cultures were obtained after mechanical dissociation of surgical  
138 resection tumor samples from patients (n=17). All procedures involving human patients were  
139 performed in accordance with the ethical standards of the ethic national research committee  
140 and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical  
141 standards. Informed consent was obtained from all individual patients included in this study.  
142 Primary cultures were established and stored at -180°C. Cell frozen vials were grown in  
143 define medium (DMEM/Ham F12 (Gibco, Cergy Pontoise, France), 2 mM L-glutamine

144 (Gibco), N2- and B27-supplement (Gibco), 2 µg/ml heparin (Sigma Aldrich, Saint Louis,  
145 MO), 20 ng/ml EGF and 25 ng/ml bFGF (Peprotech, Rocky Hill, NJ), 100 IU/ml penicillin  
146 and 100 mg/ml streptomycin (Gibco)) at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. All  
147 experiments were performed with GBM cells in culture for less than 3 months (passages<7)  
148 and cells were regularly checked for mycoplasma contamination. There are 5 MES cultures  
149 (GBM-1, 4, 8, 11 and 12) and 12 CNP (GBM-3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 17, 18 and 19).  
150 For pilot studies, GBM-1 and GBM-10 were used as representative of human mesenchymal  
151 and CNP tumor cells, respectively.

152

### 153 **Generation and expansion of allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes**

154 After informed consent was obtained, human peripheral-blood mononuclear cells (PBMC)  
155 were isolated from blood samples of healthy adult volunteers recruited at the Etablissement  
156 Français du Sang (EFS, Nantes, France). For specific expansions of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes,  
157 PBMC were incubated with 5 µM of zoledronic acid monohydrate (#82712, Sigma-Aldrich)  
158 or with 3 µM of BrHPP (bromohydin pyrophosphate, kindly provided by Innate Pharma  
159 (Marseille, France)) in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10 % heat inactivated  
160 FCS, 2 mM L-glutamine, 100 mg/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin (all from Gibco) and  
161 100 IU/mL recombinant human IL-2 (rhIL-2) (Proleukin, Novartis, Basel, Switzerland). After  
162 4 days of culture, cells were supplemented with rhIL-2 (300 IU/mL). After 3 weeks, a non-  
163 specific expansion was performed using PHA-feeders: Leucoagglutinin PHA-L (#L4144,  
164 Sigma-Aldrich) and 35 Gy-irradiated allogeneic feeder cells mixing human PBMC and  
165 Epstein-Barr virus-transformed B-lymphoblastoid cell lines. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes were  
166 incubated in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10 % heat inactivated FCS, 2  
167 mM L-glutamine, 100 mg/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin (all from Gibco) and 300  
168 IU/mL rhIL-2. After three weeks, purity (> 85 %) of amplified V $\delta$ 2<sup>+</sup> T lymphocyte cultures  
169 was checked by flow cytometry. Clones were obtained by flow cytometry sorting or seeding  
170 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes (0.3 cells/well) in RPMI 1640 medium containing rhIL-2,  
171 leucoagglutinin (0.5 mg/mL), and irradiated allogeneic feeder cells (5x10<sup>4</sup> PBL mixed with  
172 5x10<sup>3</sup> transformed human B lymphocytes/well). After expansion, cells were checked for V $\delta$ 2  
173 TCR chain expression (purity>99 %) and further expanded using PHA-feeders, as described  
174 above.

175

### 176 **Transcriptomic analysis**

177 Primary GBM cells were washed twice in PBS, then total RNA was isolated using the  
178 RNeasy MiniKit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions  
179 with DNase I treatment. The quantity and quality of RNA were, respectively, checked using  
180 NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)  
181 and Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent, Santa Clara, CA, USA). RNA (1.5 mg) was processed  
182 and hybridized to the Genechip Human Genome U133 Plus 2.0 Expression array (Affymetrix,  
183 CA, USA), which contains over 54,000 probe sets analyzing the expression levels of over  
184 47,000 transcripts and variants. This roughly corresponds to 29,500 distinct Unigene  
185 identifiers. The processing was performed according to the recommendations of the  
186 manufacturer. The raw signals of each probes for all the arrays were normalized against a  
187 virtual median chip (median raw intensity per row) using a local weighted scattered plot  
188 smoother analysis. The data were filtered to remove probes with low intensity values by  
189 sample category in order to keep the signature of little class of sample. The hierarchical  
190 clustering used to detect groups of correlated genes supported by a statistical method (limma)  
191 to detect differential expression among biological conditions, was computed on median-gene-  
192 centered and log-transformed data using average linkage and uncentered correlation distances  
193 with the Cluster program (20). Functional annotations of gene clusters and differential  
194 expressed genes were performed using GoMiner software (21) and the Gene Ontology  
195 database (22). Raw and normalized data have been deposited in the GEO database under  
196 accession number (GSE83626). For RNAseq analysis, library construction was performed  
197 using 500 ng of total RNA with SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep for Illumina  
198 Multiplexed kit (5190-6410, Agilent Technologies), according to Agilent\_PrepLib\_G9691-  
199 90010\_juillet2015\_vD protocol. Purifications were carried out with NucleoMag NGS Clean-  
200 up and Size Select (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Fragments size of libraries was  
201 controlled on D1000 ScreenTape with 2200 TapeStation system (Agilent Technologies).  
202 Libraries with P5-P7 adaptors were specifically quantified on LightCycler® 480 Instrument II  
203 (Roche Life Science) and normalized with DNA Standards (1-6) (# KK4903,  
204 KAPABIOSYSTEMS, CliniSciences). 12 pM of each library was pooled and prepared  
205 according to denaturing and diluting libraries protocol for the Hiseq and GAIIX,  
206 part#15050107 v02 (Illumina) for cluster generation on cBot™ system. Paired-end  
207 sequencing (2 x 100 cycles) was carried out in 4 lanes on HiSeq® 2500 system (Illumina) in  
208 TruSeq v3 chemistry, according to the instructions of HiSeq® 2500 System Guide,  
209 part#15035786 v01 (Illumina). After demultiplexing and quality control with fastQC\_0.11.2  
210 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), Illumina adapter were trimmed

211 with Cutadapt-1.2.1 (Martin, 2011) and reads with Phred quality score below 30 were filtered  
212 with prinseq-lite-0.20.3. Reads were aligned against human HG19 reference genome with  
213 Tophat2.0.10 and counted with HTseq-count from HTSeq-0.5.4p5 and differential analysis  
214 with DESeq2.

215

### 216 **V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR sequencing**

217 Total RNA was purified from indicated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte clones using NucleoSpin  
218 RNA Plus Kit (Macherey-Nagel), according to the manufacturer's recommendations (Gratas  
219 et al, 2017). 500 ng RNA was reverse-transcribed using the Maxima First strand cDNA  
220 synthesis kit (Thermoscientific, UK ) and cDNA (50ng) was subsequently amplified using Q5  
221 Hot Start High-Fidelity DNA polymerase and primers targeting variable region of  $\gamma$  (forward  
222 5'-GGTCACCTAGAGCAACCTC-3' and reverse 5'-GTATGTTCCAGCCTTCTGG-3') and  
223  $\delta$  (forward 5'-GTCATGTCAGCCATTGAGTTG-3' and reverse 5'-  
224 CCTTACCAGACAAGCGAC-3') chains. After checking for single product amplification  
225 on agarose gel, samples were purified using PCR Clean-Up Kit (Macherey-Nagel, Germany),  
226 according to the manufacturer's recommendations. Purified PCR products were sequenced  
227 (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany). Sequences were analyzed by IMGT/V-Quest to  
228 identify V(D)J segments.

229

### 230 **CD107a cell surface mobilization**

231 GBM cells were cocultured with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes (E:T ratio 1) in define culture  
232 medium containing 5  $\mu$ M monensin (Sigma-Aldrich) and APC-labeled anti-human CD107a  
233 mAb (#H4A3 from BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA and BioLegend, San Diego,  
234 CA, USA) for 4h at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes  
235 were then stained with FITC-labeled anti-human V $\delta$ 2 TCR mAb (#IMMU389; Beckman  
236 Coulter, Fullerton, CA) and analyzed by flow cytometry. Acquisition was performed using  
237 FACSCalibur or Accuri C6Plus flow cytometer (BD Biosciences) and the events were  
238 analyzed using the FlowJo software 10 (Treestar, Ashland, OR).

239

### 240 **Cytolytic activity**

241 Cytolytic activity was assessed through standard <sup>51</sup>Cr -release assays. Primary GBM cultures  
242 were labeled with <sup>51</sup>Cr (75 mCi for 1x10<sup>6</sup> cells) for 1h at 37°C, washed four times with define  
243 culture medium, plated at 3x10<sup>3</sup> cells per well, and T lymphocytes were added at the indicated  
244 E:T ratios in 96-well round-bottom plates. When indicated, tumor cells were pretreated

245 overnight with zoledronate at 20 mM. For blocking assays, cells were preincubated 30min at  
246 37°C with mouse anti-human CD277/BTN3A1 mAbs (#103.2; ImCheck Therapeutics,  
247 Marseille, France) for primary GBM cultures, and mouse anti-human NKG2D (#1D11;  
248 BioLegend) for V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes. After a 4h coculture at 37°C, <sup>51</sup>Cr released activity  
249 was measured in supernatants using a scintillation counter (MicroBeta, Perkin Elmer,  
250 Courtaboeuf, France). Each test was performed in triplicate. Percentage of tumor target cell  
251 lysis = ((experimental release-spontaneous release)/(maximum release-spontaneous  
252 release))\*100. Maximum and spontaneous release were determined by adding 1 % Triton X-  
253 100 (Sigma) or medium respectively, to <sup>51</sup>Cr-labeled tumor target cells in the absence of T  
254 lymphocytes.

255

### 256 **Cell surface phenotyping**

257 Primary GBM cell surface phenotype was determined by flow cytometry using the following  
258 mouse anti-human mAbs: anti-ULBP2, 5, 6-PE (#165903), anti-ULBP3-PE (#166510), anti-  
259 ULBP1-AF488 (#170818; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), anti-MICA/B-PE (#6D4;  
260 BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and associated isotype controls. To assess the  
261 whole NKG2D ligand expression, primary GBM cultures were incubated with FcR-blocking  
262 Reagent (Miltenyi Biotec), washed, labelled with 10 mg/ml recombinant human  
263 NKG2D/CD134 Fc Chimera protein (R&D Systems) or isotype control, incubated with 1  
264 mg/ml of goat anti-human IgG Biotin (EFS, Nantes, France) followed with Streptavidin-  
265 FITC staining (EFS, Nantes, France). V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell surface phenotype was determined using  
266 anti-human NKG2D-PE (#ID11; BD Biosciences), anti-NKG2A-PE (#Z199; Beckman  
267 Coulter Immunotech, Marseille, France) or corresponding isotype-matched control mAbs.  
268 Data were collected using FACSCalibur (BD Biosciences) cytometer and analyzed using  
269 Flowjo 7.6.1 and 8 software (TreeStar).

270

### 271 **Videomicroscopy**

272 Primary GBM cells were incubated in define medium overnight in Ibidi chamber slides  
273 (Martinsried, Germany) coated with fibronectin (Merck, Darmstadt, Germany). For  
274 intracellular Ca<sup>2+</sup> measurements, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes were loaded with 1 mM Fura-2/AM  
275 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco)  
276 supplemented with HEPES (Sigma). Recording was performed using a DMI 6000B  
277 microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Cells were illuminated every 10 s with  
278 a 300 W xenon lamp by using 340/10 nm and 380/10 nm excitation filters. Emission at 510

279 nm was captured using a Cool Snap HQ2 camera (Roper, Tucson, AZ, USA) and ratio  
280 measurements were performed with Metafluor software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA,  
281 USA).

282

### 283 **Stereotaxic implantation of GBM cells and transfer of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes in mice**

284 NSG (*NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ*) mice (Charles River Laboratories; Wilmington,  
285 MA, USA) mice were bred in the animal facility of the University of Nantes (UTE, SFR F.  
286 Bonamy) under SPF status and used at 8–12 weeks of age, accordingly to institutional  
287 guidelines (*Agreement #00186.02*; Regional ethics committee of the Pays de la Loire  
288 (France)). Primary M1 or CNP1 cultures ( $1 \times 10^4$  in 2  $\mu$ L PBS) were injected using a  
289 stereotactic frame (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) at 2 mm right lateral of the mediane suture  
290 and 0.5 mm anterior of the Bregma, depth: 2.5 mm. For adoptive T lymphocyte transfer  
291 assays,  $2 \times 10^7$  allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes in 15-20  $\mu$ L sterile PBS were  
292 stereotaxically injected into the GBM tumor bed at 7, 14 and 21 days (3 injections) after  
293 tumor implantation (23).

294

### 295 **Statistical analysis**

296 Data are expressed as mean  $\pm$  SD/SEM and were analyzed using GraphPad Prism 6.0  
297 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). The difference between groups was  
298 analyzed by either Sidak, Wilcoxon, ANOVA, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney or Log-rank  
299 tests (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

300

## 301 **Results**

### 302 **Selective and spontaneous reactivity of allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes against** 303 **primary mesenchymal human GBM cultures**

304 We previously reported an unexpected spontaneous activation of allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T  
305 lymphocytes against some GBM cells as shown in **Fig. 1A**. We first aimed at extending this  
306 observation by analyzing reactivity of peripheral allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes  
307 from various healthy donors against a broad panel of primary human GBM cell cultures,  
308 directly dissociated from distinct patient tumors ( $n=17$ ). Of note, primary GBM cultures  
309 display single or multiple alterations such as EGFR and/or PDGFR amplification,  
310 INK4a/ARF/PTEN loss (**Table T1**). The reactivity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes against GBM  
311 cells, pretreated or not with NBP, was analyzed after a 4 hours-coculture (**Fig. 1B** and **Fig.**

312 **S1A**). When primary GBM cells were sensitized with NBP, all V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes  
313 strongly upregulated CD107a expression (**Fig. S1A**). Importantly, 5 out of the 17 primary  
314 GBM cells spontaneously activated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes (**Fig. 1B**). A supervised  
315 hierarchical transcriptomic analysis based on the Verhaak transcriptional signatures using our  
316 previously published database (GEO GSE83626), identified the spontaneously recognized  
317 GBM cells as the mesenchymal subtype and non-naturally recognized ones as the CNP  
318 subtype, as shown in the volcano plot (**Fig. 1C**). Accordingly, allogeneic V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T  
319 lymphocytes reacted stronger against mesenchymal GBM cells grouped according to this  
320 molecular signature, as compared to the other subtypes (**Fig. 1D**). <sup>51</sup>Cr-release assays were  
321 performed using a representative primary GBM cells from either mesenchymal or CNP  
322 subtypes, respectively GBM-1 and GBM-10 cells. As shown in **Fig. 1E**, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T  
323 lymphocytes spontaneously killed only GBM-1 cells, but not GBM-10 cells, in a E/T-  
324 dependent manner. Altogether, these results showed that allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T  
325 lymphocytes spontaneously recognize and eliminate mesenchymal human GBM cells, in the  
326 absence of any treatment.

327

### 328 **V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes display heterogeneous spontaneous reactivity against** 329 **mesenchymal GBM cells**

330 Besides this selective and spontaneous reactivity against mesenchymal GBM cells,  
331 heterogeneous CD107a expression levels observed in activated T lymphocytes also suggested  
332 intrinsic activation abilities of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes. Therefore, we analyzed the reactivity  
333 of a panel of allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes (n=44), generated from distinct  
334 healthy donor samples, against either GBM-1 or GBM-10 cells. Whereas a weak CD107a  
335 expression was detected in the majority of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte populations cocultured with  
336 GBM-10 cells, this expression level was significantly higher upon coculture with GBM-1  
337 cells (**Fig. 2A**). Interestingly, this assay identified highly reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte  
338 populations (CD107a positive cells >20%). Of note, the selective and spontaneous recognition  
339 of mesenchymal GBM cells was detected in both highly and poorly reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T  
340 lymphocyte lines (**Fig. 2B**) and was accompanied by the selective lysis of mesenchymal  
341 GBM tumor cells, for highly reactive lymphocytes (**Fig. 2C**). Sensitization of GBM cells with  
342 elevated doses of NBP overcame the various levels of reactivity (**Fig. S1B**). These results  
343 indicated that, besides their ability to selectively and spontaneously react against  
344 mesenchymal GBM cells, allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte subsets display various  
345 functional reactivity abilities toward tumor cells.

346

347 **V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-mediated reactivity is not driven by a specific TCR repertoire**

348 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR contribution was assessed in cytotoxicity assays using BTN3A/CD277  
349 blocking mAb (#103.2, **Fig. 3A** and **Fig. S1C**). To further investigate whether a specific  
350 repertoire is linked to this TCR-mediated activation process, T lymphocyte clones were first  
351 isolated from 3 highly reactive polyclonal V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte lines with similar natural  
352 reactivities (named L1, L2, and L3) from different healthy donors, and next analyzed at  
353 transcriptomic/phenotypic (TCR repertoire) and functional (cytotoxicity) levels. Of note, only  
354 25 clones sufficiently expanded among more than hundred clones that emerged in this  
355 process. <sup>51</sup>Cr-release assays were performed using mesenchymal GBM-1 cells to determine  
356 and compare the relative cytotoxic abilities of each V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte clones (**Fig. 3B**). 4  
357 clones displayed a cytotoxic activity against GBM-1 cells significantly higher than the  
358 polyclonal population whereas only 2 clones were significantly less reactive. To next  
359 determine whereas such an elevated cytotoxic activity was associated with a specific TCR  
360 repertoire, V $\gamma$ 9 and V $\delta$ 2 gene segments were sequenced and analyzed (nomenclature of (24)).  
361 The majority of clones expressed a similar V $\gamma$ 9 sequence (TRGV9\*01-TRG1P\*01), with 2  
362 clones (#L3-19, #L2-9) expressing different V $\gamma$ 9 rearrangements (TRGV9\*01-TRGJP1\*01  
363 and TRGV9\*02-TRGJ1\*02, respectively). As expected, more diversity was observed with the  
364 V $\delta$ 2 TCR repertoire since 6 signatures were detected. For technical reasons, we could not  
365 determine the V $\delta$ 2 TCR repertoire for a third of the clones (**Fig. 3C**, *group #nd*).  
366 Nevertheless, these results indicated that the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR repertoire was composed of, at  
367 least, 4 distinct clonotypes and that no specific V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR signature was assigned to highly  
368 reactive T lymphocyte clones (**Fig. 3D**). Altogether, these results show that selective  
369 spontaneous elimination of mesenchymal GBM cells involved TCR engagement,  
370 independently of a specific V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR repertoire.

371

372 **Spontaneous elimination of human mesenchymal GBM cells by allogeneic V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T**  
373 **lymphocytes involves NKG2D activating receptors**

374 Besides  $\gamma\delta$  TCR engagement, inhibitory or activating surface molecules are also involved in  
375 the reactivity tuning of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes. Accordingly, single-cell videomicroscopy  
376 analyses of early intracellular Ca<sup>2+</sup> responses in activated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes showed  
377 that cell-to-cell contacts with NBP-sensitized GBM cells triggered rapid and sustained Ca<sup>2+</sup>  
378 responses, characteristic of simultaneous engagement of both TCR and receptors interacting  
379 with tumor-expressed molecules (**Fig. S1D**). Importantly, in the absence of any NBP

380 sensitization, higher levels of intracellular  $Ca^{2+}$  responses were measured in activated  
381  $V\gamma 9V\delta 2$  T lymphocytes cocultured with mesenchymal GBM-1 cells, as compared to GBM-10  
382 cells (**Fig. 4A**). Surface phenotyping of selected activating (DNAM-1, NKG2C, NKG2D,  
383 NKp30, NKp44) and inhibitory (NKG2A, ILT2) receptors was performed in various  $V\gamma 9V\delta 2$   
384 T lymphocyte lines. As shown in **Fig. 4B**, an elevated expression of CD226/DNAM-1 and  
385 CD314/NKG2D (*Natural Killer group 2D receptor*) was detected in all the analyzed lines.  
386 Importantly, cytometric analysis showed that NKG2D receptors were expressed at  
387 significantly higher levels on mesenchymal GBM-reactive  $V\gamma 9V\delta 2$  T lymphocytes, as  
388 compared to their poorly reactive lymphocyte counterparts (**Fig. 4C**). The involvement of  
389 NKG2D axis in the spontaneous reactivity was next demonstrated by the results showing the  
390 blocking effect of NKG2D mAb (**Fig. 4D**). The combination of NKG2D and BTN3A (clone  
391 #103.2) blocking mAbs completely abolished this effect. Of note, NKG2D mAb did not  
392 significantly affect the reactivity of  $V\gamma 9V\delta 2$  T lymphocytes against GBM cells sensitized  
393 with elevated doses of NBP (**Fig. S1E**). Altogether, these results show that NKG2D, which is  
394 highly expressed in GBM-reactive  $V\gamma 9V\delta 2$  T lymphocytes, is strongly involved with the  
395 TCR in the spontaneous reactivity of allogeneic  $V\gamma 9V\delta 2$  T lymphocytes against mesenchymal  
396 GBM cells.

397

### 398 **Mesenchymal primary GBM cultures express high levels of NKG2D ligands**

399 As spontaneous recognition of human mesenchymal GBM cells by allogeneic  $V\gamma 9V\delta 2$  T  
400 lymphocytes involves NKG2D receptors expressed by  $V\gamma 9V\delta 2$  T lymphocytes, expression  
401 profiles of NKG2D ligands in GBM cells were analyzed through transcriptomic and  
402 cytometric analyses. Gene analysis using the PANTHER software showed that immune  
403 system process, immune response and response to stress represented 3 of the 6 most  
404 differentiated pathways between mesenchymal and CNP GBM cells (**Fig. 5A**). Binding of  
405 recombinant human NKG2D Fc chimera protein indicated that NKG2D ligands were  
406 expressed at a higher level by mesenchymal GBM cells, as compared to CNP GBM cells  
407 (**Fig. 5B**). Accordingly, levels of RNA encoding for MICA/B (*MHC class I Chain related*  
408 *protein A and B*) and ULBP2 (*UL16 binding protein 2*) molecules, which are well-known  
409 NKG2D ligands, were detected at significantly higher levels in mesenchymal GBM cultures,  
410 as compared to CNP cultures (**Fig. 5C**). No significant expression of other NKG2D ligands,  
411 such as ULBP 4, 5 and 6 molecules, and no significant differential expression for other  
412 ligands were detected at the mRNA level (*data not shown* and **Fig. S2**). Accordingly,  
413 expression of ULBP2 and MICA/B proteins was significantly increased at the surface of

414 mesenchymal GBM cells, as compared to CNP cultures (**Fig. 5D**). These results show that  
415 mesenchymal GBM cells highly express several NKG2D ligands, as compared to their CNP  
416 counterparts, which might favor their recognition by immune effectors, such as human  
417 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes.

418

### 419 **Allogeneic V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes control the development of human mesenchymal** 420 **GBM tumors *in vivo***

421 Finally, the ability of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes to spontaneously control the growth of  
422 mesenchymal GBM tumor cells was investigated *in vivo* using preclinical orthotopic mouse  
423 models. Human tumor cells from either GBM-1 (mesenchymal) or GBM-10 (CNP) primary  
424 cultures were orthotopically implanted into the cerebral subventricular zone of  
425 immunodeficient NSG mice. Tumor-bearing mice were then treated with three successive  
426 stereotactic injections of allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes performed at days 7, 14  
427 and 21 following tumor implantation (**Fig. 6A**). As shown in **Fig. 6B**, untreated GBM-1-  
428 tumor bearing mice displayed a median survival of 27 days (*none, solid line*). Three injections  
429 of poorly reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes (*Poorly reactive, dotted line*) in GBM-1 mice  
430 modestly reduced tumor growth *in vivo*. Strikingly, a clear anti-tumor activity was measured  
431 after 3 administrations of highly reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes (*Highly reactive, dashed*  
432 *line*). As shown in the table below the survival graph, this latter group could further be  
433 divided in poor and good responders with significantly different median survival values of 32  
434 and 58 days, respectively. Importantly, two mice from the good responders group were  
435 considered as long-term survivors (> 150 days) suggesting a complete elimination of the  
436 tumor. Of note, the tumor progression was also delayed in non-mesenchymal GBM-10 tumor-  
437 bearing mice after injection of either poorly or highly reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes but to  
438 a lesser extent (e.g., absence of long-term survivors) (**Fig. S3**). Altogether these results show  
439 that adoptive transfer of allogeneic human PBMC-derived PBL-V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes  
440 significantly increased GBM-bearing mouse lifespan, in particular when tumors displayed a  
441 mesenchymal signature.

442

## 443 **Discussion**

444 This study uncovers an unexpected spontaneous reactivity involving both TCR and  
445 NKG2D activating receptors displayed by human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes against human  
446 primary mesenchymal GBM tumor cells.

447 Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes are antigenically activated in a cell-to-cell contact and a  
448 TCR-dependent manner. It is currently proposed that non-peptidic PAg metabolites interact  
449 intracellularly with BTN3A1/CD277 butyrophilin molecules, rather than being directly  
450 detected by the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR (15,25), these interactions then specifically triggering T  
451 lymphocyte reactivity. Here, we demonstrated spontaneous recognition of some GBM cells  
452 by allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes, in absence of any NBP-sensitization. This  
453 process involves V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR, as indicated by the results of experiments showing the impact  
454 of anti-BTN3A/CD277 blocking mAbs on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte activation. Structural  
455 diversity of  $\gamma\delta$  TCR depends on both combinatorial usage of different sets of V, D and J  
456 segments and junctional diversification processes associated with the addition, or loss, of  
457 variable numbers of nucleotides at the V–J  $\gamma$ , V–D  $\delta$  or D–J  $\delta$  junctions. In agreement with  
458 previous studies showing an intermediate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 V(D)J TCR diversity (reviewed by (26)),  
459 TCR repertoire analysis of the GBM-reactive T lymphocyte clones provided evidences for a  
460 frequent expression of TCR heterodimers comprising rather conserved recombined V $\gamma$ 9  
461 chains (mainly TRGV9\*01-TRG1P\*01 segments), associated to more diverse V $\delta$ 2 chains.  
462 Importantly, no V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR signatures could be specifically assigned to reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T  
463 lymphocytes. To illustrate this point, some highly reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes had a  
464 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR signature similar to poorly reactive T lymphocytes.

465 Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes sense stress-induced molecules through both TCR and  
466 non-TCR molecules (e.g., NK receptors) that act separately, synergistically or additively to  
467 activate particular T lymphocyte effector functions through the generation of signals of  
468 appropriate strength, duration and quality (reviewed by (17)). In line with previous reports,  
469 our study showed that NKG2D homodimers were highly expressed among activating  
470 receptors on human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes and account for this differential reactivity  
471 process against human GBM cells. This finding was drawn from a set of complementary  
472 observations: (i) the fast kinetics and the intensity of early intracellular Ca<sup>2+</sup> flux patterns in  
473 activated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes; (ii) the elevated expression levels of several NKG2D  
474 ligands in mesenchymal GBM cells, as compared to other GBM subtypes; (iii) the impact of  
475 anti-NKG2D blocking mAbs on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes reactivity. The importance of this  
476 pathway has been previously reported in anti-tumor reactivities of  $\gamma\delta$  T lymphocytes in other  
477 cancer cells (27). NKG2D ligands has recently been detected in glioblastoma stem cells *in*  
478 *situ* (28) and implicated in the reactivity of Temozolomide-resistant GBM cell lines by  
479 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes (29,30). Here, we demonstrate for the first time that allogeneic

480 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes can spontaneously react against human primary GBM cells  
481 displaying a mesenchymal signature through high expression of several NKG2D ligands such  
482 as ULBP 2 and MICA/B surface stress proteins.

483 GBM is an archetypical example of heterogeneous cancer with a strong histological,  
484 molecular and cellular heterogeneity both between patients and within the same individual  
485 tumor (31,32). GBM heterogeneity has been recently extended based on tumor bioenergetic  
486 requirements (33). Metabolic changes in tumor cells go beyond the classical tumoral  
487 glycolytic avidity. In fact, dysregulation of the mevalonate pathway leading to PAg  
488 metabolites accumulation has been reported in tumor cells, including cancer stem cells  
489 (34,35). The ability of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes to sense tumor cells has been  
490 extensively studied *in vivo* against a variety of tumors, including GBM, in particular after  
491 NBP-sensitization (19,23,36). In this study, we demonstrated a spontaneous recognition of the  
492 primary GBM mesenchymal subtype by allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes, in  
493 absence of any NBP-sensitization, both *in vitro* and *in vivo*. Whereas bioinformatic analyses  
494 did not reveal differences in the expression levels of enzymes of the mevalonate pathway  
495 between GBM cell subsets (*data not shown*), using human primary cultures enriched in  
496 cancer stem cells, mesenchymal tumor cells clearly exhibit a singular metabolic profile as  
497 compare to CNP tumor cells (33). Importantly, in patients, the mesenchymal subtype,  
498 representing 30% of *de novo* GBM and 60% of recurrent GBM, has been associated with the  
499 worst prognosis (37). In agreement with this dismal prognosis, mesenchymal GBM stem cells  
500 are more resistant to radiation and chemotherapy. Thus, the natural and selective eradication  
501 of mesenchymal GBM cells, containing highly resistant and infiltrative cancer stem cells, by  
502 allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes represents a particularly attractive strategy as the  
503 dismal prognosis of GBM is mainly due to tumor recurrence. At the time of recurrence, which  
504 usually occurs within the first year of the initial diagnosis, treatment options remain  
505 extremely limited, usually depend on medical center expertise as well as patients' individual  
506 characteristics, such as age, performance status, tumor location, time to recurrence, and  
507 modestly improve the outcome of the disease (38). Based on our study, we propose  
508 stereotactic administrations of allogeneic human PBL-amplified V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes after  
509 first line GBM treatments to specifically track and eliminate mesenchymal GBM tumors, in  
510 the absence of NBP sensitization. Importantly, previous publications have reported that  
511 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell therapy is safe for brain tumor patients (39). Of note, limited brain homing of  
512 allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells was observed after systemic injections in NSG mice (UJ,  
513 NJ and ES, *unpublished data*). Furthermore, Halliday *et al.* have shown that radiation

514 promote a proneural-mesenchymal shift (40), in line with increased mesenchymal frequencies  
515 in GBM relapse (37). Radiation as well as temozolomide have been shown to increase  
516 NKG2D ligands expression on tumor cells (39,41). Finally, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte reactivity  
517 is not restricted by MHC molecules, thus eliminating any risk of deleterious direct  
518 alloreactive responses towards non-transformed surrounding cells (39,42). Therefore, the  
519 constitution of selected clinical allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte banks, established  
520 from PBL of healthy donors, would represent a unique opportunity for designing efficient  
521 adoptive transfer immunotherapies in GBM patients.

522 In this regard, this study highlights novel immunotherapeutic options directed at  
523 recurrence of GBM tumors based on adoptive transfer of allogeneic V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes  
524 at tumor bed. This work also reinforces molecular subtype identification as a fundamental  
525 basis for GBM patient stratification and provides a proof-of-principle of immunotherapeutic  
526 options based on adoptive transfer of allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes, independent  
527 of patient immune system status.

528

529

## 530 **Acknowledgments**

531 We thank the Cytocell, MicroPicell and UTE facilities (SFR. F. Bonamy, Université de  
532 Nantes, France) and staff for technical help. We would like to thank Sylvia Lambot, Pierre  
533 Autin, Lucie Lebreuilly and Fanny Geraldo for technical help. We would like to thank Dr.  
534 Richard Hellman for proofreading the manuscript.

535

## 536 **Author contributions**

537 C. Chauvin and N. Joalland designed, performed the majority of experiments and analyses  
538 were achieved with help from L. Lafrance. J. Perroteau and C. Gratas performed and analyzed  
539 the sequencing experiments. L. Oliver prepared human glioma primocultures under the  
540 supervision of F. M. Vallette. Tumor mice models and immunotherapies were established by  
541 C. Chauvin, N. Joalland and L. Lafrance under the supervision of U. Jarry, E. Scotet and C.  
542 Pecqueur. Phenotyping and cytometric analysis of glioblastoma cells were performed by C.  
543 Chauvin, C. Willem and C. Retière. L. Gautreau-Rolland and X. Saulquin supervised analysis  
544 of sequencing data. E. Scotet and C. Pecqueur designed and supervised the study. C. Chauvin,  
545 N. Joalland, E. Scotet and C. Pecqueur prepared figures, wrote and edited the article.

546

547

548 **References**

549

- 550 1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al.  
551 Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*.  
552 2005;352:987–96.
- 553 2. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, et al. Molecular  
554 subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression,  
555 and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. 2006;9:157–73.
- 556 3. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al.  
557 Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma  
558 characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*.  
559 2010;17:98–110.
- 560 4. Huse JT, Phillips HS, Brennan CW. Molecular subclassification of diffuse gliomas:  
561 seeing order in the chaos. *Glia*. 2011;59:1190–9.
- 562 5. Zheng S, Chheda MG, Verhaak RGW. Studying a complex tumor: potential and  
563 pitfalls. *Cancer J Sudbury Mass*. 2012;18:107–14.
- 564 6. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, et al.  
565 Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc*  
566 *Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:4009–14.
- 567 7. Patel VN, Gokulrangan G, Chowdhury SA, Chen Y, Sloan AE, Koyutürk M, et al.  
568 Network signatures of survival in glioblastoma multiforme. *PLoS Comput Biol*.  
569 2013;9:e1003237.
- 570 8. Brudno JN, Kochenderfer JN. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for  
571 lymphoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15:31–46.
- 572 9. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small  
573 cell lung cancer. *Nature*. 2018;553:446–54.
- 574 10. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell  
575 immunotherapy for human cancer. *Science*. 2018;359:1361–5.
- 576 11. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint  
577 Blockade Therapy. *Cancer Discov*. 2018;8:1069–86.
- 578 12. Lim M, Xia Y, Bettegowda C, Weller M. Current state of immunotherapy for  
579 glioblastoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15:422–42.
- 580 13. Silva-Santos B, Serre K, Norell H.  $\gamma\delta$  T cells in cancer. *Nat Rev Immunol*.  
581 2015;15:683–91.
- 582 14. Boutin L, Scotet E. Towards Deciphering the Hidden Mechanisms That Contribute to  
583 the Antigenic Activation Process of Human  $V\gamma 9V\delta 2$  T Cells. *Front Immunol*. 2018;9:828.
- 584 15. Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, Peigné C-M, Mönkkönen H, Mönkkönen J, et al.  
585 Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major  
586 human  $\gamma\delta$  T-cell subset. *Blood*. 2012;120:2269–79.
- 587 16. Sandstrom A, Peigné C-M, Léger A, Crooks JE, Konczak F, Gesnel M-C, et al. The  
588 intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation  
589 of human  $V\gamma 9V\delta 2$  T cells. *Immunity*. 2014;40:490–500.
- 590 17. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend  
591 of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:467–78.
- 592 18. Jarry U, Chauvin C, Joalland N, Léger A, Minault S, Robard M, et al. Stereotaxic  
593 administrations of allogeneic human  $V\gamma 9V\delta 2$  T cells efficiently control the development of  
594 human glioblastoma brain tumors. *Oncoimmunology*. 2016;5:e1168554.
- 595 19. Joalland N, Chauvin C, Oliver L, Vallette FM, Pecqueur C, Jarry U, et al. IL-21  
596 Increases the Reactivity of Allogeneic Human  $V\gamma 9V\delta 2$  T Cells Against Primary Glioblastoma

597 Tumors. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. 2018;41:224–31.

598 20. de Hoon MJL, Imoto S, Nolan J, Miyano S. Open source clustering software.

599 *Bioinforma Oxf Engl*. 2004;20:1453–4.

600 21. Zeeberg BR, Feng W, Wang G, Wang MD, Fojo AT, Sunshine M, et al. GoMiner: a

601 resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol*.

602 2003;4:R28.

603 22. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene

604 ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*.

605 2000;25:25–9.

606 23. Jarry U, Joalland N, Chauvin C, Clemenceau B, Pecqueur C, Scotet E. Stereotactic

607 Adoptive Transfer of Cytotoxic Immune Cells in Murine Models of Orthotopic Human

608 Glioblastoma Multiforme Xenografts. *J Vis Exp JoVE*. 2018;

609 24. Lefranc MP, Rabbitts TH. A nomenclature to fit the organization of the human T-cell

610 receptor gamma and delta genes. *Res Immunol*. 1990;141:615–8.

611 25. Sandstrom A, Peigné C-M, Léger A, Crooks JE, Konczak F, Gesnel M-C, et al. The

612 intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation

613 of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. *Immunity*. 2014;40:490–500.

614 26. Hoeres T, Smetak M, Pretscher D, Wilhelm M. Improving the Efficiency of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2

615 T-Cell Immunotherapy in Cancer. *Front Immunol*. 2018;9:800.

616 27. Wrobel P, Shojaei H, Schitteck B, Gieseler F, Wollenberg B, Kalthoff H, et al. Lysis of

617 a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells: involvement of

618 NKG2D ligands and T-cell receptor- versus NKG2D-dependent recognition. *Scand J*

619 *Immunol*. 2007;66:320–8.

620 28. Flüh C, Chitadze G, Adamski V, Hattermann K, Synowitz M, Kabelitz D, et al.

621 NKG2D ligands in glioma stem-like cells: expression in situ and in vitro. *Histochem Cell*

622 *Biol*. 2018;149:219–33.

623 29. Chitadze G, Lettau M, Luecke S, Wang T, Janssen O, Fürst D, et al. NKG2D- and T-

624 cell receptor-dependent lysis of malignant glioma cell lines by human  $\gamma\delta$  T cells: Modulation

625 by temozolomide and A disintegrin and metalloproteases 10 and 17 inhibitors.

626 *Oncoimmunology* [Internet]. 2015 [cited 2018 Dec 5];5. Available from:

627 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4839372/>

628 30. Lamb LS, Bowersock J, Dasgupta A, Gillespie GY, Su Y, Johnson A, et al.

629 Engineered Drug Resistant  $\gamma\delta$  T Cells Kill Glioblastoma Cell Lines during a Chemotherapy

630 Challenge: A Strategy for Combining Chemo- and Immunotherapy. *PLoS ONE* [Internet].

631 2013 [cited 2018 Dec 5];8. Available from:

632 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3543433/>

633 31. Patel M, Vogelbaum MA, Barnett GH, Jalali R, Ahluwalia MS. Molecular targeted

634 therapy in recurrent glioblastoma: current challenges and future directions. *Expert Opin*

635 *Investig Drugs*. 2012;21:1247–66.

636 32. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, et al.

637 Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc*

638 *Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:4009–14.

639 33. Oizel K, Chauvin C, Oliver L, Gratas C, Geraldo F, Jarry U, et al. Efficient

640 Mitochondrial Glutamine Targeting Prevails Over Glioblastoma Metabolic Plasticity. *Clin*

641 *Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017;23:6292–304.

642 34. Ginestier C, Monville F, Wicinski J, Cabaud O, Cervera N, Josselin E, et al.

643 Mevalonate metabolism regulates Basal breast cancer stem cells and is a potential therapeutic

644 target. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2012;30:1327–37.

645 35. Gober H-J, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, De Libero G. Human T cell

646 receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J*

647 Exp Med. 2003;197:163–8.  
648 36. Fisher JP, Heuvelink J, Yan M, Gustafsson K, Anderson J.  $\gamma\delta$  T cells for cancer  
649 immunotherapy: A systematic review of clinical trials. *Oncoimmunology*. 2014;3:e27572.  
650 37. Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, et al. Tumor evolution of  
651 glioma intrinsic gene expression subtype associates with immunological changes in the  
652 microenvironment. *Cancer Cell*. 2017;32:42–56.e6.  
653 38. van Linde ME, Brahm CG, de Witt Hamer PC, Reijneveld JC, Bruynzeel AME,  
654 Vandertop WP, et al. Treatment outcome of patients with recurrent glioblastoma multiforme:  
655 a retrospective multicenter analysis. *J Neurooncol*. 2017;135:183–92.  
656 39. Pereboeva L, Harkins L, Wong S, Lamb LS. The safety of allogeneic innate  
657 lymphocyte therapy for glioma patients with prior cranial irradiation. *Cancer Immunol*  
658 *Immunother* CII. 2015;64:551–62.  
659 40. Halliday J, Helmy K, Pattwell SS, Pitter KL, LaPlant Q, Ozawa T, et al. In vivo  
660 radiation response of proneural glioma characterized by protective p53 transcriptional  
661 program and proneural-mesenchymal shift. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:5248–53.  
662 41. Weiss T, Schneider H, Silgner M, Steinle A, Pruschy M, Polić B, et al. NKG2D-  
663 Dependent Antitumor Effects of Chemotherapy and Radiotherapy against Glioblastoma. *Clin*  
664 *Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2018;24:882–95.  
665 42. Lamb LS, Musk P, Ye Z, van Rhee F, Geier SS, Tong JJ, et al. Human gammadelta(+)   
666 T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic  
667 response. *Bone Marrow Transplant*. 2001;27:601–6.  
668  
669

670 **Legends to figures**

671

672 **Figure 1. Selective natural cytotoxicity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes toward mesenchymal**  
673 **GBM cells.**

674 (A) Representative flow cytometry analysis of CD107a cell surface protein expression of  
675 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes cocultured with primary GBM-1 or GBM-10 cells (E:T ratio 1:1). (B)  
676 Frequency of CD107a<sup>+</sup> cells among V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes cocultured with 17 primary  
677 GBM cultures (E:T ratio 1:1). (C) Volcano plot of CNP vs MES GBM cells showing the fold  
678 ratio and odds ratio. Each dot represents distinct V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell line. (D) Mean frequency of  
679 CD107a<sup>+</sup> cells among V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes depending on the molecular subtype of  
680 primary GBM cells. (E) Cytotoxicity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes against primary GBM cells  
681 using <sup>51</sup>Cr release assays. Results are expressed as % of cytotoxicity (mean  $\pm$  SD, n=2 in  
682 triplicates from two different V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte lines, Sidak's multiple comparison test,  
683 \*\*\*p<0.001).

684

685 **Figure 2. Heterogeneous reactivity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes against mesenchymal**  
686 **GBM cells.**

687 (A) Frequency of CD107a<sup>+</sup> cells among TCRV $\delta$ 2<sup>+</sup> lymphocytes (%) after coculture with  
688 either the mesenchymal GBM-1 (*empty*) or CNP GBM-10 (*black*) cells. Each point  
689 corresponds to an individual allogeneic PBMC-derived V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte lines (n=44,  
690 mean  $\pm$  SD, Wilcoxon matched-pairs signed Rank test, \*\*\*p<0.001). (B) CD107a expression  
691 in 4 representative V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte lines after coculture with either mesenchymal  
692 (empty spot) or CNP (black spot) GBM cells (2-way ANOVA test, \*p<0.05 and \*\*p<0.01).  
693 (C) Natural cytotoxicity of 2 representative V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte lines (L2 and L7) against  
694 either mesenchymal GBM-1 or CNP GBM-10 cells in <sup>51</sup>Cr-release assays (E:T ratio 10:1).  
695 Results are expressed as % of cytotoxicity (n=3 in triplicates, mean  $\pm$  SD, 2-way ANOVA test,  
696 \*\*\*p<0.001).

697

698 **Figure 3. Spontaneous elimination of mesenchymal GBM cells through V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR**  
699 **engagement independently of a particular TCR repertoire signature.**

700 (A) Natural cytotoxicity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes in the presence of blocking mAb against  
701 BTN3A/CD277 (clone #103.2). <sup>51</sup>Cr-release assays (E:T ratio 10:1) were performed using

702 either highly or poorly reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte lines against GBM-1 cells. Relative  
703 cytotoxicities of highly (n=3) and poorly (n=2) reactive T cells were normalized to  
704 cytotoxicity in absence of blocking antibody (mean  $\pm$  SD; n $\geq$ 2 in triplicates, Kruskal-Wallis  
705 test, \*\*\*p<0.001). **(B)** Cytotoxicity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte clones generated from 3 distinct  
706 highly reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte lines (L1, L2 and L3) against GBM-1 cells.  
707 Cytotoxicity was analyzed for each clone using <sup>51</sup>Cr-release assays and normalized to  
708 respective polyclonal cytotoxicity (E:T ratio: 10:1). Results are expressed as relative  
709 cytotoxicity (n=3 in triplicates, mean  $\pm$  SD). **(C)** TCR repertoires of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte  
710 clonotypes. V $\gamma$ 9 and V $\delta$ 2 TCR chain sequences are indicated with their respective frequencies  
711 among analyzed clonotypes. Undetermined gene segments are indicated as *nd*. **(D)**  
712 Frequencies of TCR repertoire based on their respective immunoreactivity (IR) profiles.

713

714 **Figure 4. Spontaneous elimination of GBM cells by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes is tuned by**  
715 **NKG2D.**

716 **(A)** Intracellular Ca<sup>2+</sup> levels monitored with the Fura-2/AM probe in V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes  
717 after coculture with either GBM-1 or GBM-10 cells. **(B)** Expression of activating and  
718 inhibiting NK receptor was analyzed using flow cytometry in highly (n=4) and poorly (n=14)  
719 reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte lines. Results are expressed as % of positive cells. **(C)** Highly  
720 (n=4) and poorly (n=14) reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte lines were analyzed by flow  
721 cytometry for NKG2D receptor expression. Results are expressed as specific median  
722 fluorescence intensity (MFI) (MFI test - MFI isotype control) (mean  $\pm$  SD; Mann-Whitney  
723 test \*\*\*p<0.001). **(D)** Relative cytotoxicity V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell against GBM-1 cells (E:T ratio  
724 10:1) in presence of NKG2D blocking antibody, alone or in combination with BTN3A/CD277  
725 blocking antibody. Relative cytotoxicities of highly (n=3) and poorly (n=2) reactive T cells  
726 were normalized to cytotoxicity in absence of blocking antibody (mean  $\pm$  SD; n $\geq$ 2 in  
727 triplicates, Kruskal-Wallis test, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

728

729 **Figure 5. Mesenchymal primary GBM cell cultures highly express NKG2D ligands.**

730 **(A)** Up-regulated pathways in MES primary GBM cultures compared to CNP. Clusters  
731 obtained after transcriptomic analysis (DNA microarrays) followed by functional annotations  
732 of differentially expressed genes (GO: Gene Ontology) with indicated number of changed  
733 genes. **(B)** Tumor cell surface phenotyping performed by flow cytometry with a recombinant  
734 human NKG2D-Ig fusion protein to assess whole NKG2D ligands expression. *Left panel:*

735 grey and white histograms correspond respectively to CNP and MES GBM cultures. *Right*  
736 *panel*: Results are expressed as specific median fluorescence intensity (MFI) (mean  $\pm$  SD;  
737 Mann-Whitney test, \*\*\*p<0.001). (C) Transcriptomic expression analysis of known V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  
738 T cell ligands in mesenchymal (n=5) and CNP primary cells (n=12). (Tumor cell surface  
739 phenotyping performed by flow cytometry using specific antibodies against ULBP 1, ULBP  
740 2/5/6, ULBP 3 and MIC A/B expression. Histograms correspond to, respectively, CNP and  
741 MES GBM cultures as in (B). Results are expressed as specific median fluorescence intensity  
742 (MFI) (mean  $\pm$  SD; 2-way ANOVA test, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001).

743  
744 **Figure 6. Allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes efficiently eliminate primary**  
745 **mesenchymal GBM cells *in vivo*.**

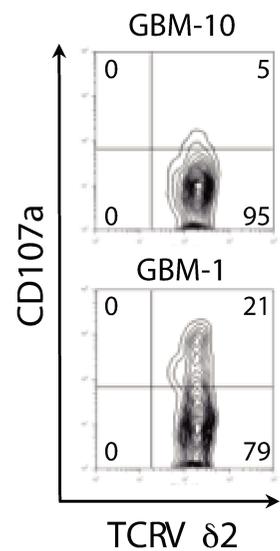
746 *Top panel* Survival curves of GBM-1 tumor-bearing mice untreated (solid line) or treated  
747 with poorly (dotted line) or highly (dashed line) reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes. Allogeneic  
748 human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes were injected at the tumor site at days 7, 14 and 21 after  
749 tumor cell implantation. *Bottom panel* Relative number of subjects at risk for each group and  
750 median survival of GBM-1 tumor-bearing mice treated with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes are  
751 indicated in the table. Mice treated with highly reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes were divided  
752 in poor and good responders (R) (n=15 mice treated with poorly or highly reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T  
753 lymphocytes, n=8 for poor responders and n=7 for good responders; Log-rank Test, \*p<0.05  
754 and \*\*\*p<0.001).

755

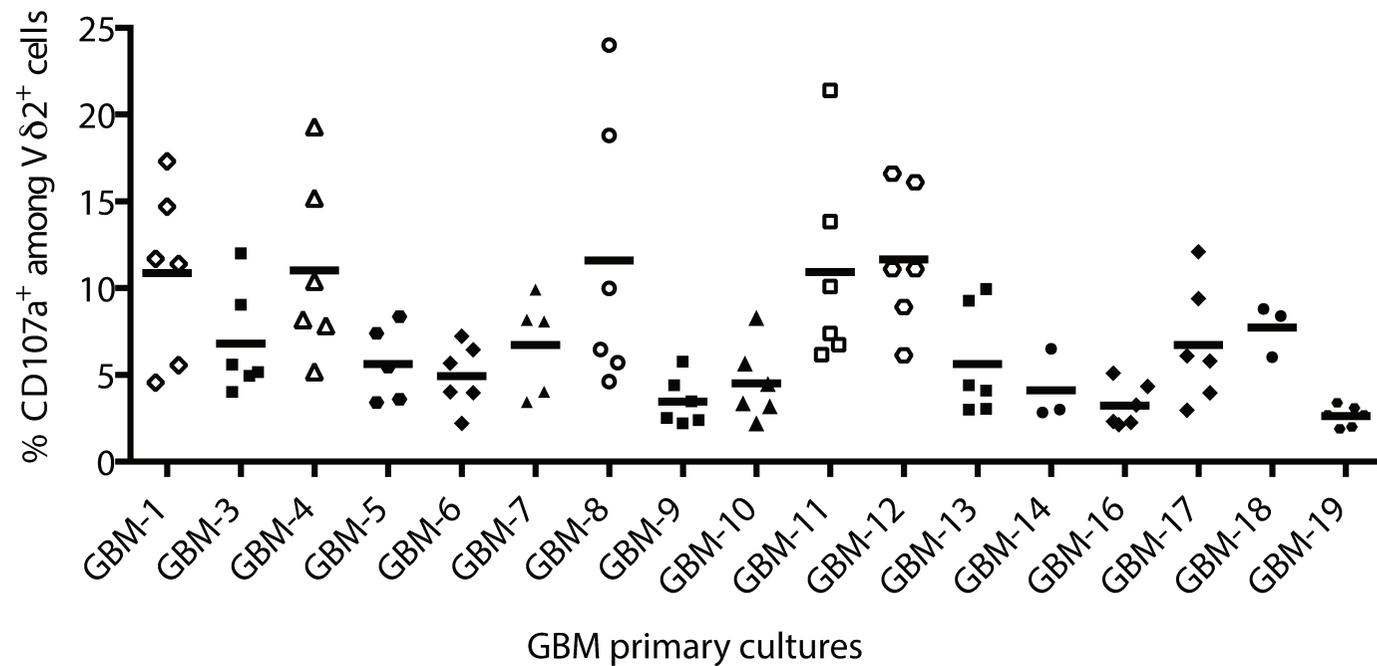
756

757

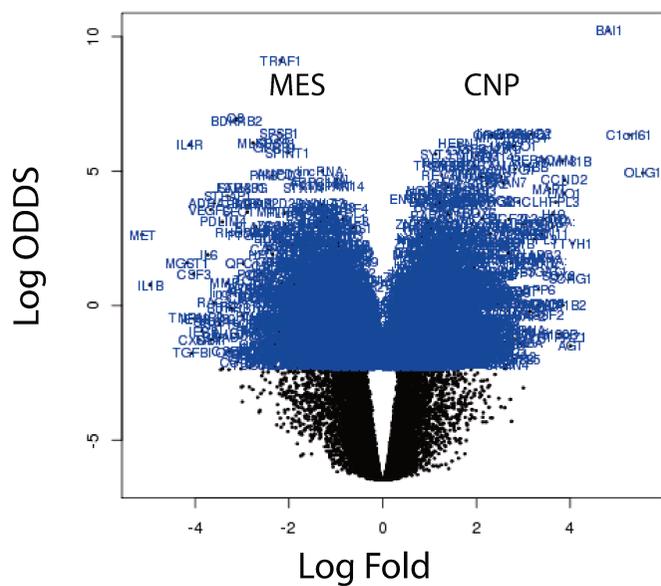
A



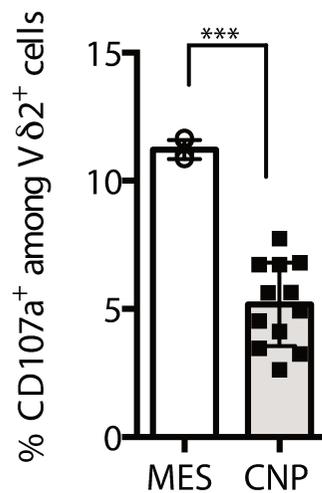
B



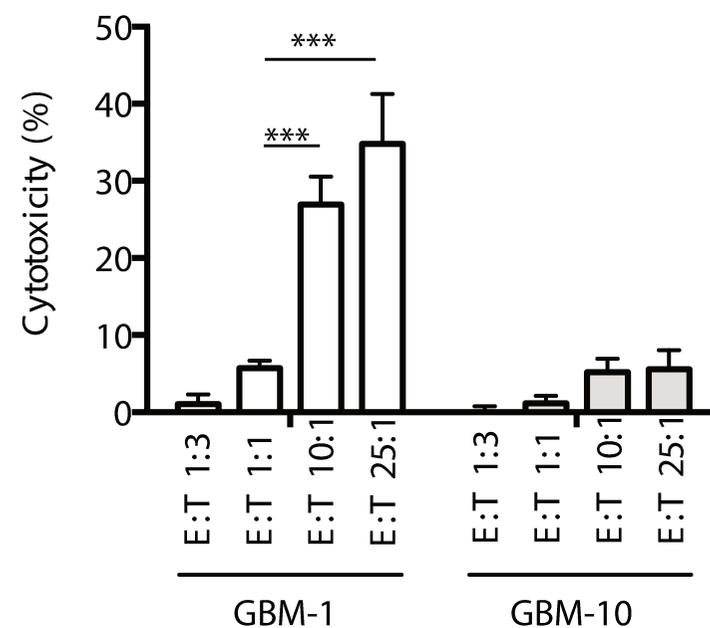
C



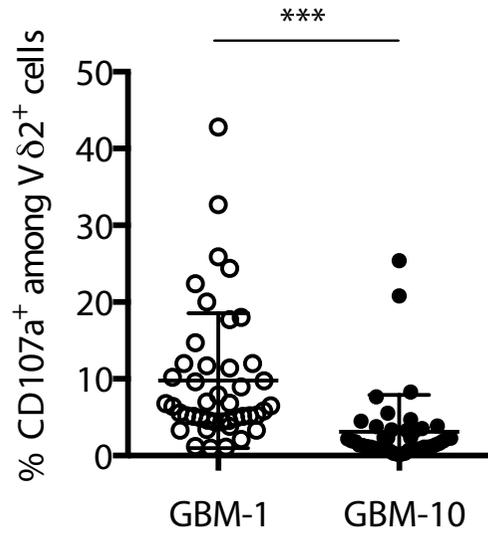
D



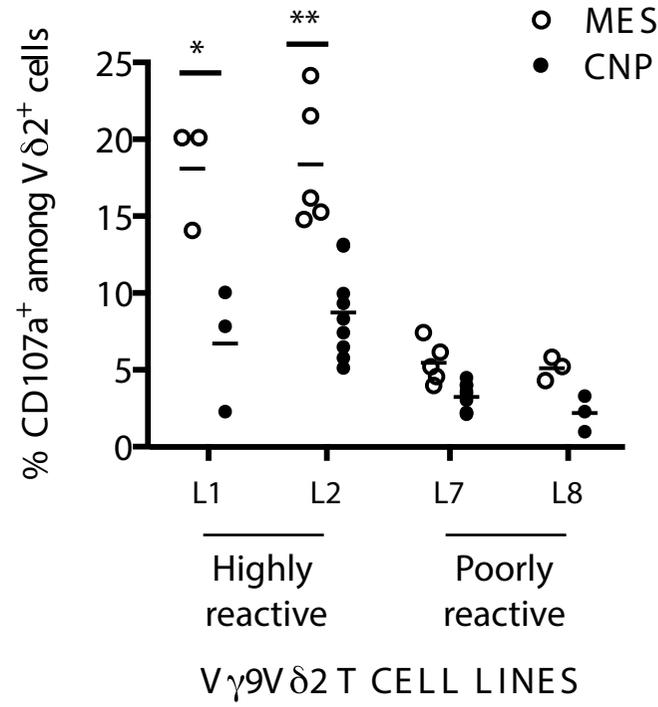
E



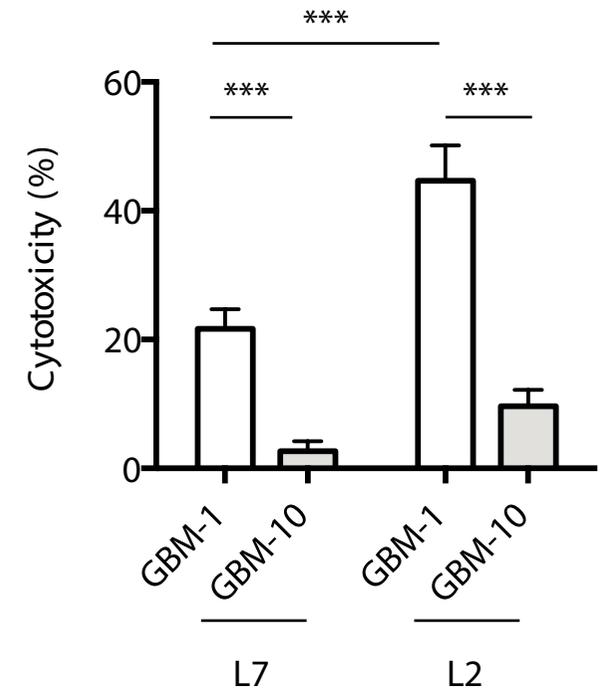
A

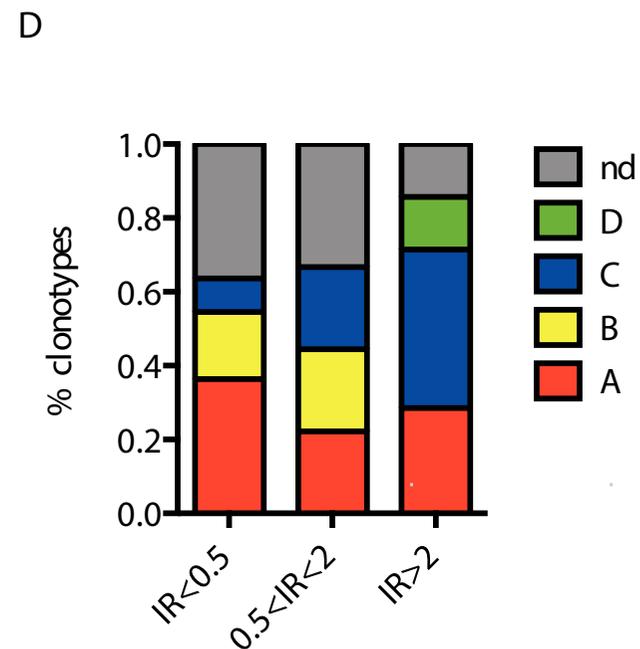
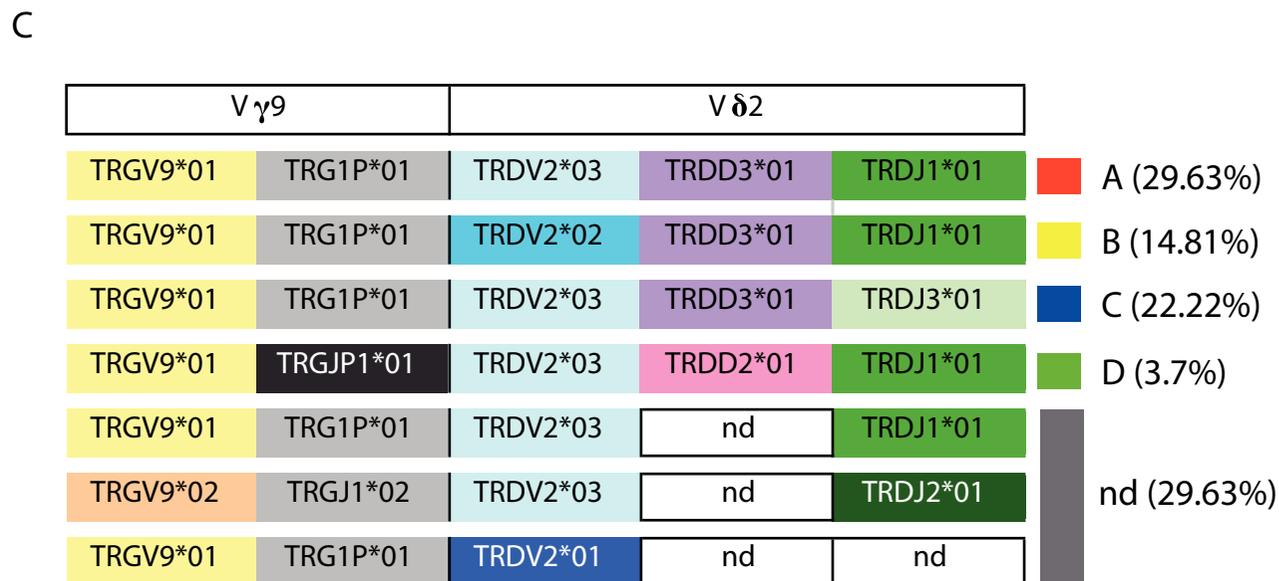
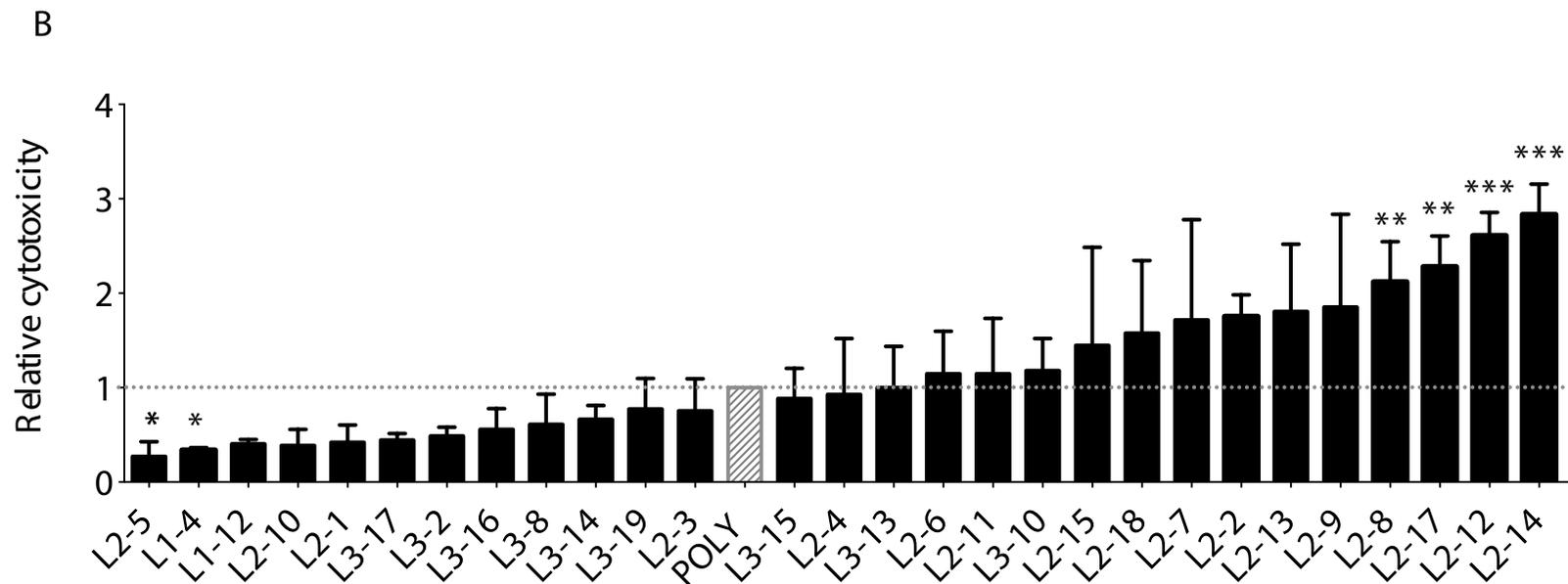
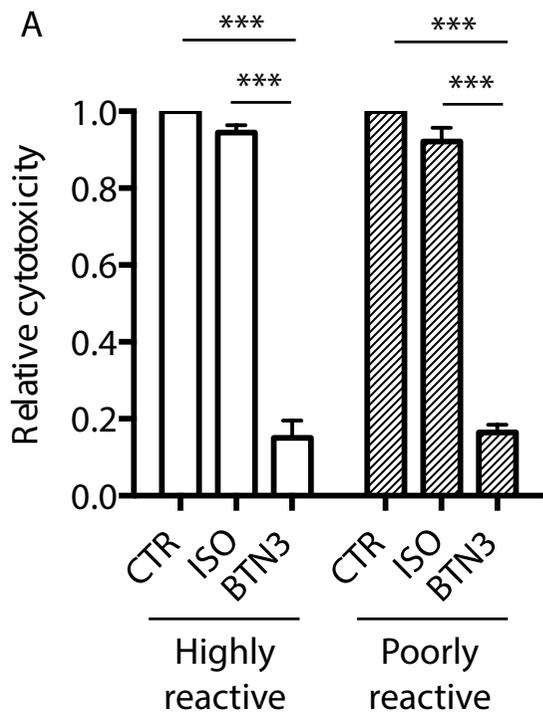


B

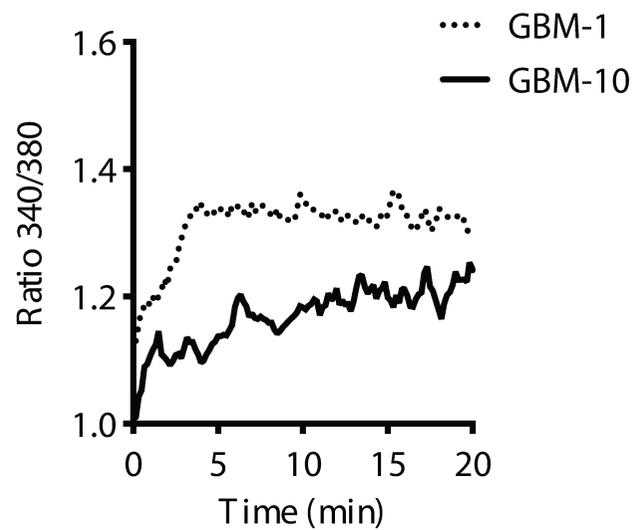


C

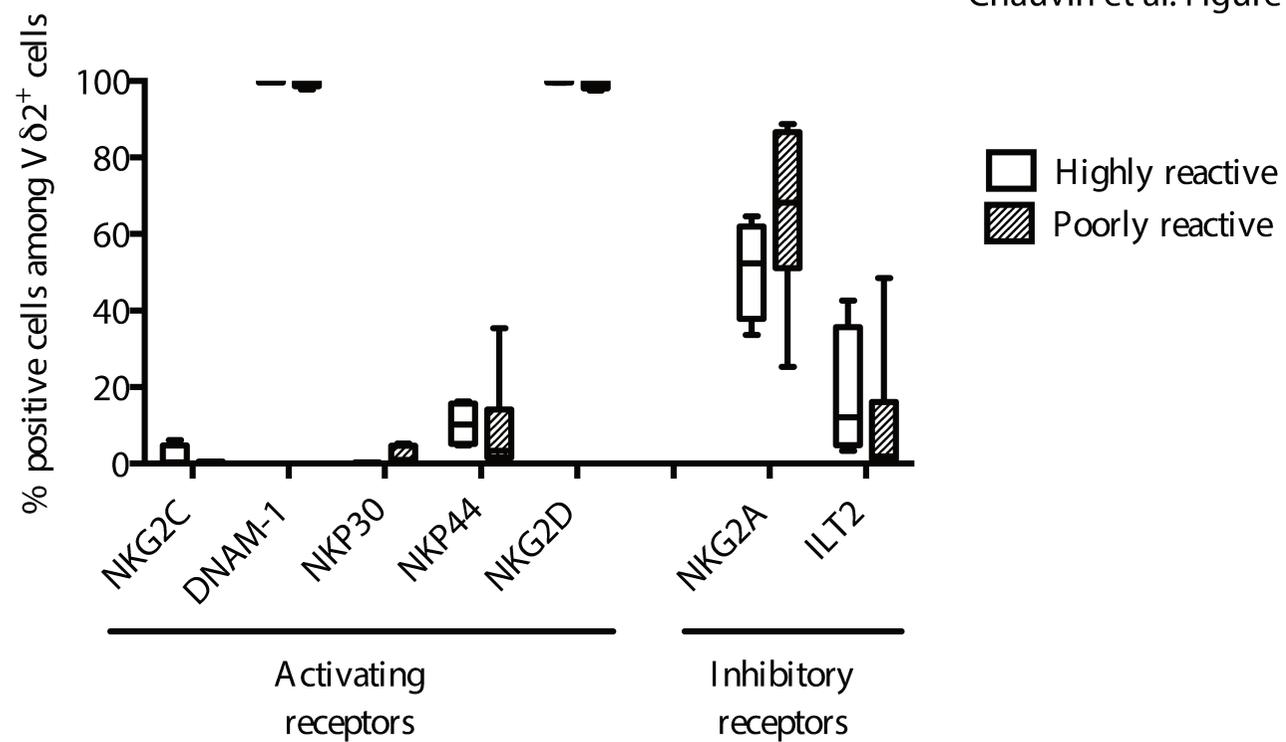




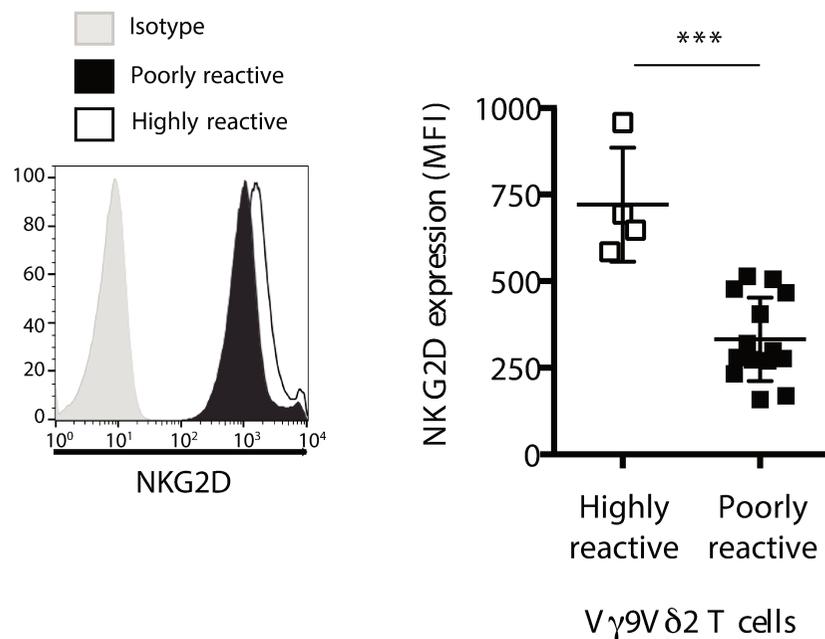
A



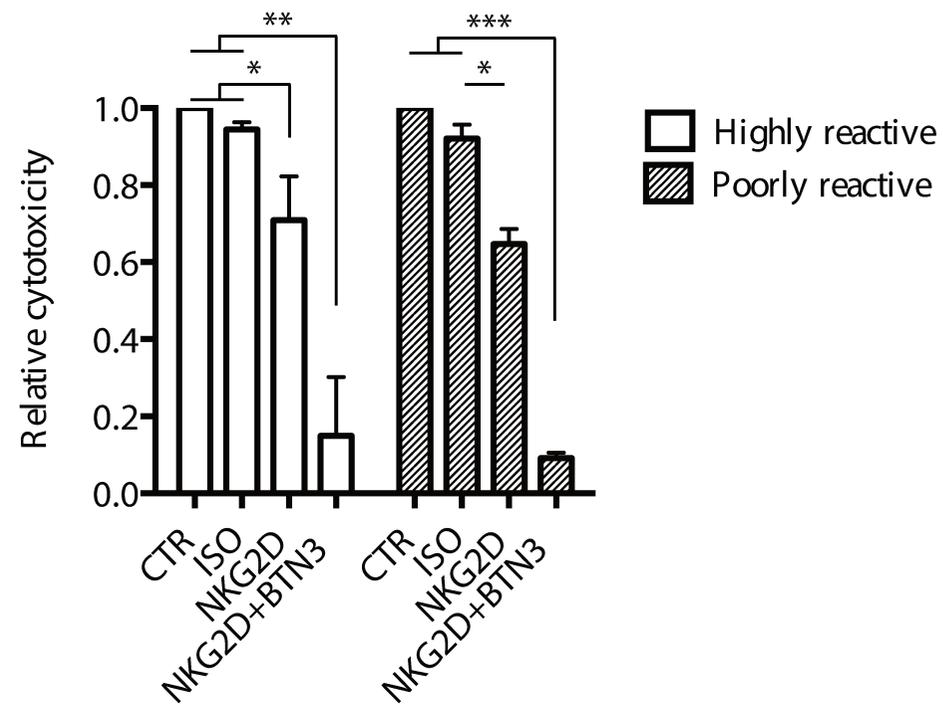
B



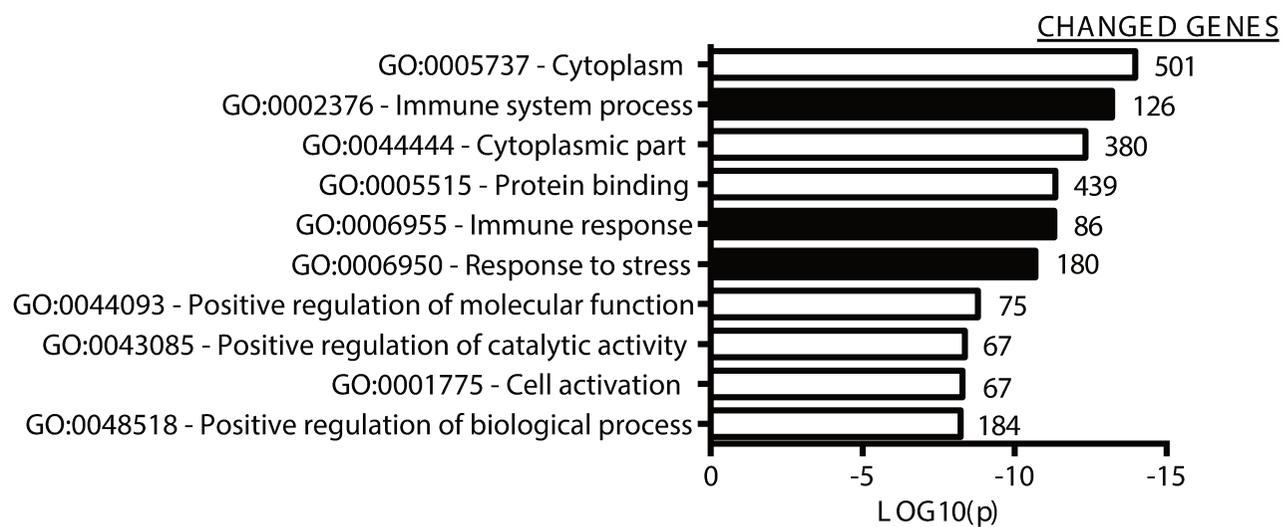
C



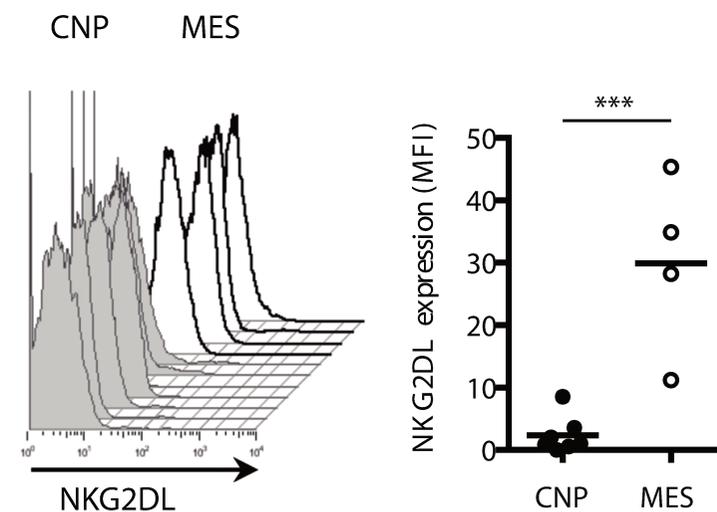
D



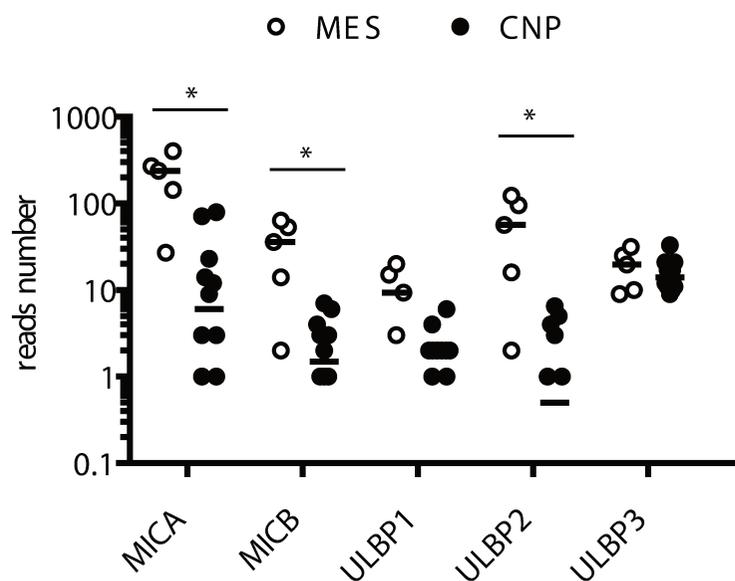
A



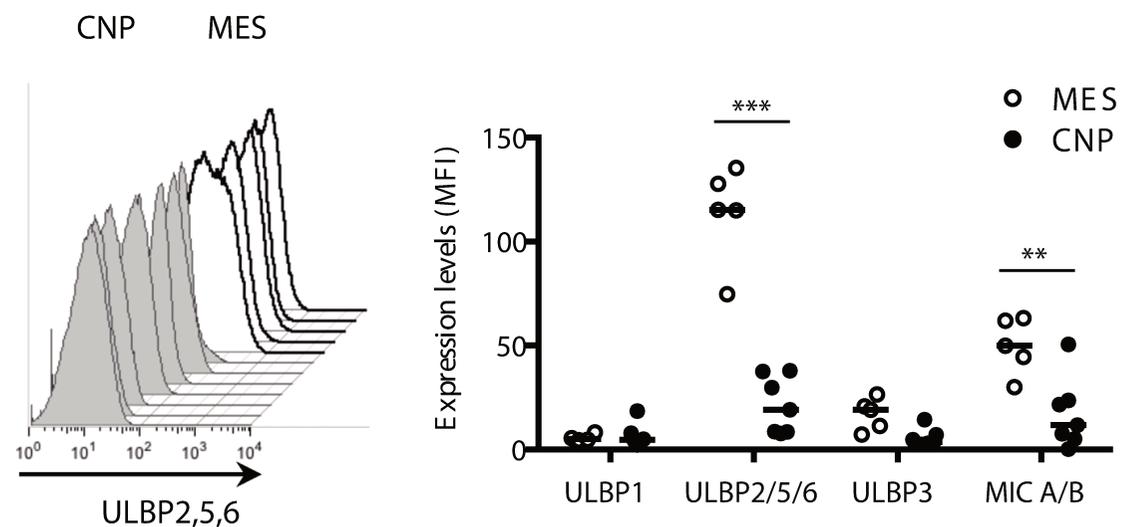
B



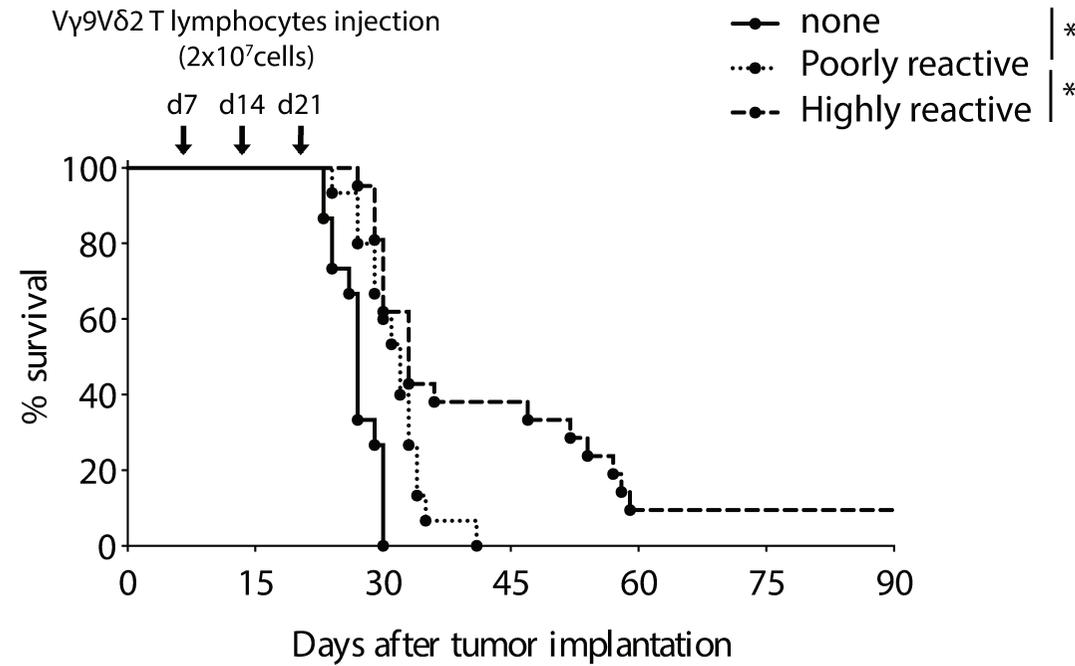
C



D



GBM-1

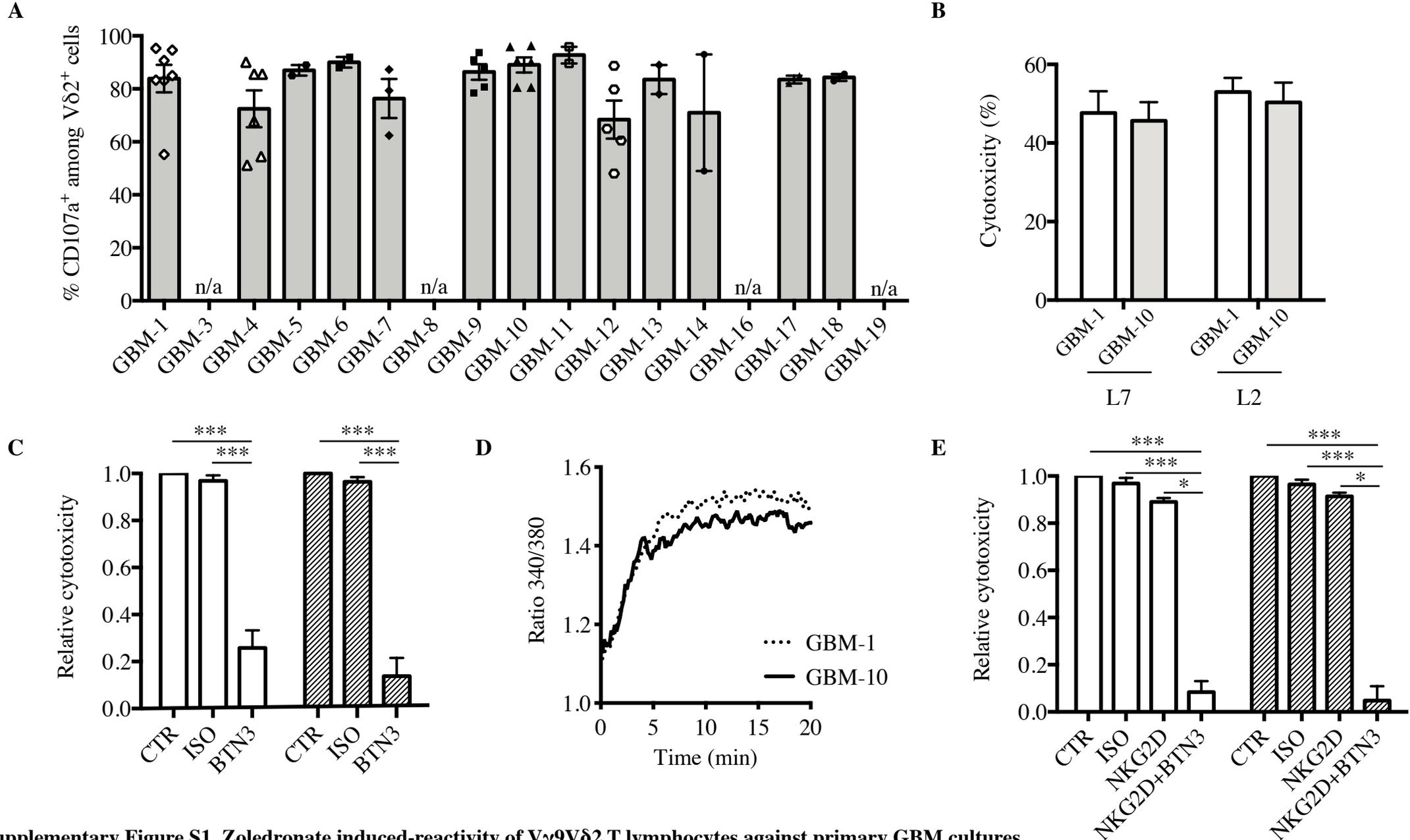


Days	0	15	30	45	60	75	90	Median Survival
none	100	100	27	0	0	0	0	27 d
Poorly reactive	100	100	67	7	0	0	0	32 d
Highly reactive	Poor R	100	100	69	8	0	0	32 d
	Good R	100	100	100	100	38	25	25

	GBM-1	GBM-3	GBM-4	GBM-5	GBM-6	GBM-7	GBM-8	GBM-9	GBM-10	GBM-11	GBM-12	GBM-13	GBM-14	GBM-16	GBM-17	GBM-18	GBM-19
<b>TP53</b>	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present
<b>EGFR</b>	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	<i>amplified</i>	<i>amplified</i>	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
<b>PDGFR</b>	normal	normal	normal	normal	normal	<i>amplified</i>	normal	<i>amplified</i>	<i>amplified</i>	normal	normal	<i>amplified</i>	normal	normal	normal	normal	normal
<b>PTEN</b>	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	<i>loss</i>	normal	normal
<b>INK4a/ARF</b>	<i>loss</i>	<i>loss</i>	<i>loss</i>	present	<i>loss</i>	<i>loss</i>	present	<i>loss</i>	<i>loss</i>	present	<i>loss</i>	<i>loss</i>	<i>loss</i>	<i>loss</i>	<i>loss</i>	<i>loss</i>	present
<b>IDH1</b>	wild-type	wild-type	wild-type	wild-type	wild-type	wild-type	wild-type	wild-type	wild-type	wild-type	wild-type	wild-type	wild-type	wild-type	wild-type	wild-type	wild-type
<b>MGMT</b>	absent	<i>expressed</i>	absent	absent	absent	absent	absent	absent	absent	<i>expressed</i>	absent	<i>expressed</i>	absent	absent	absent	<i>expressed</i>	absent
<b>Molecular subtype</b>	<b><i>MES</i></b>	CNP	<b><i>MES</i></b>	CNP	CNP	CNP	<b><i>MES</i></b>	CNP	CNP	<b><i>MES</i></b>	<b><i>MES</i></b>	CNP	CNP	CNP	CNP	CNP	CNP

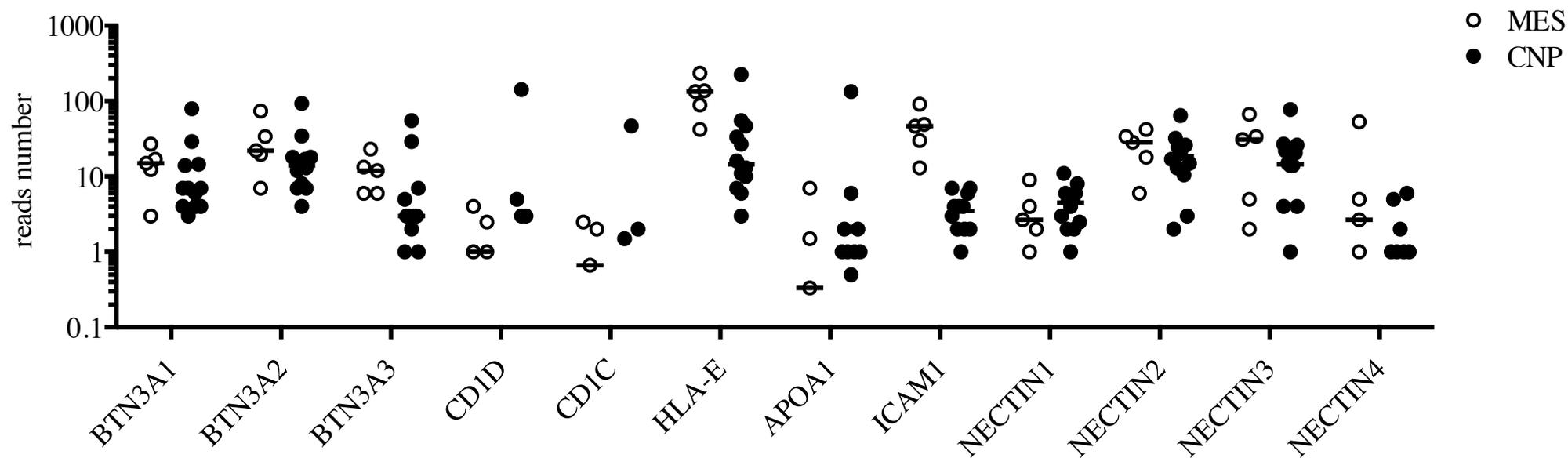
### Supplementary Table 1. Genomic information of primary GBM cultures.

Each primary culture are derived from a distinct GBM patient following surgical resection. Major genomic alterations reported in GBM are presented for each primary cultures, as well as their molecular signature. MES stands for mesenchymal and CNP for Classical, Neural and Proneural.



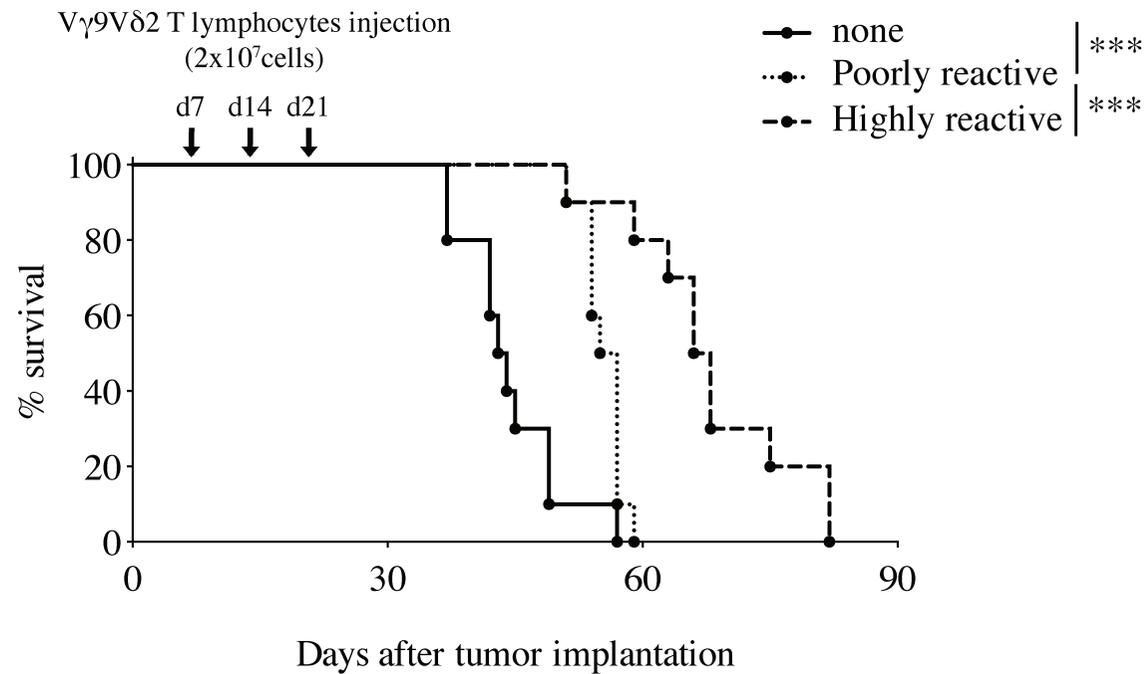
**Supplementary Figure S1. Zoledronate induced-reactivity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes against primary GBM cultures.**

**A.** Frequency of CD107a<sup>+</sup> cells among V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes cocultured with each of the primary GBM cultures (n=17) after overnight zoledronate sensitization (E:T ratio 1:1). **B.** Cytotoxicity (<sup>51</sup>Cr release assays) of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes against primary GBM cells, after overnight zoledronate sensitization (E:T ratio 10:1; mean  $\pm$ SD; n=3 in triplicates). **C.** Relative cytotoxicity (<sup>51</sup>Cr release assays) of either highly (white; n=3) or poorly (grey; n=2) reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte lines against GBM-1 cells in presence of blocking mAb against BTN3A/CD277 (#103.2). Relative cytotoxicities of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes were normalized to cytotoxicity in absence of blocking mAbs (E:T ratio: 10:1; mean  $\pm$  SD; n $\geq$ 2 in triplicates). **D.** Ca<sup>2+</sup> activation profiles of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes measured during coculture with either GBM-1 or GBM-10 cells, previously sensitized overnight with zoledronate. **E.** Relative cytotoxicity of highly (white; n=3) and poorly (grey; n=2) reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes against zoledronate sensitized GBM-1 cells (E:T ratio 10:1) in presence of NKG2D (#1D11) alone or in combination with BTN3A/CD277 (#103.2) blocking mAbs. Relative cytotoxicities were normalized to cytotoxicity in absence of blocking mAbs (mean $\pm$ SD; n $\geq$ 2 in triplicates). Kruskal-Wallis test: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.



**Supplementary Figure S2. Expression of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell ligands in primary GBM cultures.**

Analysis of transcriptomic expression of known  $\gamma\delta$  TCR and NKG2D ligands in MES (n=5) and CNP primary human GBM cells (n=12).



	Days	0	15	30	45	60	75	90	<i>Median Survival</i>
none	10	10	10	4	0	0	0	0	<i>44 d</i>
Poorly reactive	10	10	10	10	0	0	0	0	<i>56 d</i>
Highly reactive	10	10	10	10	8	3	0	0	<i>67 d</i>

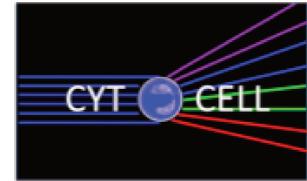
**Supplementary Figure S3. Allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes reduce CNP tumor progression *in vivo*.**

*Top panel* Survival curves of GBM-10 tumor-bearing mice untreated (solid line) or treated with either poorly (dotted line) or highly (dashed line) reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes.

*Bottom panel* Relative number of subjects at risk for each group as well as the median survival (n=10 mice per group ; Log-rank Test, \*\*\*p<0.001).

## La cytométrie, c'est mon quotidien !

Reportage au cœur d'une plateforme de biologie nantaise : Cytocell. On y quantifie et qualifie parfois plusieurs milliards de cellules de toutes sortes par jour, dans le cadre de recherches portant aussi bien sur la cancérologie que l'immunologie ou d'autres disciplines.



Le logo de la plateforme.

Bienvenue dans la pièce 317, située au 3<sup>ème</sup> étage de l'Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes. Je vous l'accorde il y fait un peu frais... C'est la climatisation qui tourne à fond pour compenser la chaleur dégagée par les machines de la plate-forme Cytocell. Relativement grande, cette pièce contient 7 cytomètres en flux, soit la moitié des engins que compte la plateforme créée il y a sept ans. Pour vous donner un ordre d'idée de l'ambiance, un cytomètre fait la taille d'une à deux machines à laver et chacun génère le bruit, d'une cafetière entartrée marchant en continu !

L'entretien et les réglages de chaque appareil sont réalisés tous les lundis matins par Juliette, la responsable technique de la plateforme, et Nadège qui est ingénieure.

### Au fait, c'est quoi la cytométrie en flux ?

« La cytométrie signifie littéralement la mesure (« métrie ») des cellules (« cyto ») » intervient Nadège, en plein travail. Cette technique permet d'analyser différents paramètres, comme la taille, la granulosité, l'expression de protéines ou l'état dans lequel se trouve une cellule. Pour cela, les cellules, qu'elles soient saines, cancéreuses ou même un peu modifiées, sont conduites via un flux liquide, d'où le terme de « cytométrie en flux », dans une chambre en quartz où elles sont frappées par un faisceau laser

les unes à la suite des autres. Une des forces de cette technique, est qu'elle permet d'analyser plusieurs paramètres en même temps, sur chacune des cellules présentes dans l'échantillon que le biologiste souhaite étudier. Or, un échantillon peut contenir plusieurs millions, voire même milliards de cellules ! « *Le plus performant de nos cytomètres permet l'analyse de 17 paramètres en simultané* », indique Juliette. Donc si on calcule rapidement, pour un million de cellules, ça fait dix-sept millions de paramètres acquis et enregistrés. Et en terme de temps ça correspond à quoi ? « *Le cytomètre le plus performant peut enregistrer jusqu'à 20 000 cellules en une seconde* », répond Nadège. Cela peut donc aller très vite comme prendre plusieurs heures si on a plein d'échantillons à analyser ou s'ils sont très peu concentrés. Il faut aussi prendre en compte le temps pour le marquage à réaliser en amont, c'est-à-dire 20 à 30 minutes minimum.

### Un matériel de pointe qui exige de savoir s'en servir !

« Les utilisateurs de la plateforme (chercheurs, ingénieurs, techniciens, étudiants) peuvent y accéder après avoir suivi une formation sur l'appareil choisi en fonction des paramètres à analyser », insiste Juliette. Nos cytomètres n'ont pas tous les mêmes capacités, certains peuvent analyser 4 paramètres, d'autres 17. Ainsi, une fois formé, chacun d'entre

nous peut venir « passer ses tubes » en autonomie. Mais avant cela, il faut faire son marquage. C'est-à-dire qu'il faut prélever le nombre de cellules nécessaire pour l'expérience, et les incuber avec un anticorps qui va se fixer sur la molécule qu'on souhaite analyser. Cet anticorps est couplé à ce qu'on appelle un fluorochrome, qui lorsqu'il est frappé par le laser va émettre un rayonnement à une longueur d'onde précise. C'est ce rayonnement que capte la machine avant de le retranscrire en image sur l'ordinateur.

Au final, une fois qu'elles ont livrées leurs informations, les cellules vont... à la poubelle !



*Parcours d'une cellule au sein d'un cytomètre en flux : 1 la cellule est aspirée par une aiguille, 2 elle est frappée par le laser qui excite les fluorochromes, 3 le cytomètre récupère les différentes longueurs d'onde émises par les fluorochromes excités et les transforme en image, 4 la cellule se dirige vers la poubelle.*

## **Faire parler les cellules iNKT**

Dans le cadre de ma thèse, j'utilise la cytométrie en flux quasiment au quotidien pour étudier des cellules immunitaires appelées iNKT. J'essaie de comprendre pourquoi certaines de ces cellules peuvent réagir contre des cellules saines de notre corps. On dit alors qu'elles sont auto-réactives.

Avec mon équipe, nous avons identifié un marqueur à la surface de certaines cellules iNKT qui pourrait indiquer qu'il s'agit d'une cellule auto-réactive. Grâce au cytomètre en flux, nous pouvons trier efficacement les cellules iNKT porteuses du marqueur au sein d'échantillons de sang de donneurs sains. Seules ces cellules d'intérêt sont alors conservées ; les autres sont jetées. Après ce premier tri, nous mettons en contact les cellules iNKT avec des cellules saines pour voir si elles les attaquent ou non. Là encore, j'utilise la cytométrie en flux pour détecter une molécule exprimée seulement par les cellules iNKT activées, ce qui me permet de déterminer le nombre de cellules auto-réactives parmi celles que nous avons triées au préalable.

Pour connaître la suite de mes travaux, je vous donne rendez-vous à ma soutenance de thèse. En espérant, d'ici là, avoir compris pourquoi ces cellules iNKT auto-réactives existent.

Jeanne PERROTEAU  
2<sup>ème</sup> année de thèse  
Centre de Recherche  
en Cancérologie et Immunologie  
Nantes-Angers (CRCINA)  
Nantes





**Titre :** Du développement des cellules iNKT humaines, à l'analyse de populations périphériques autoréactives.

**Mots clés :** iNKT, autoréactivité, développement, Homme

**Résumé :** Il y a 30 ans, une nouvelle population de cellules T  $\alpha\beta$  a été décrite. Elle se situe à la frontière entre l'immunité innée et l'immunité adaptative, de par l'expression simultanée de récepteurs des cellules NK et d'un récepteur des cellules T (TCR) invariant. De ces caractéristiques découle le nom de cette population : iNKT pour « invariant Natural Killer T ». Les cellules iNKT se différencient des cellules T  $\alpha\beta$  conventionnelles par l'expression d'un TCR restreint à la molécule de présentation antigénique CD1d, reconnaissant des antigènes de nature glycolipidique, et composé systématiquement des segments géniques germinaux V $\alpha$ 24 et J $\alpha$ 18 pour la chaîne  $\alpha$ , et V $\beta$ 11 pour la chaîne  $\beta$ . Après activation, ces cellules peuvent être directement cytotoxiques, et peuvent également produire de grandes quantités de cytokines et chimiokines, qui sont à l'origine de la régulation d'autres

effecteurs de l'immunité (cellules dendritiques, lymphocytes T, B, et NK, ...) par les cellules iNKT.

Depuis leur découverte, de nombreuses thématiques de recherche ont émergé afin de mieux caractériser ces cellules. Parmi elles, on retrouve l'identification des mécanismes à l'origine de l'autoréactivité de ces cellules, phénomène souvent observé, et décrit dès les premières études sur cette population. Néanmoins, à ce jour, aucun consensus n'est encore établi pour expliquer cette réactivité des cellules iNKT face à des glycolipides du Soi. La recherche du modèle de développement de ces cellules a aussi fait l'objet de nombreuses études, notamment à l'aide de modèles murins. Mon travail de thèse s'est concentré sur ces deux thématiques, avec la volonté de mieux comprendre ces phénomènes chez l'Homme.

**Title:** From the development of human iNKT cells, to the analysis of peripheral autoreactive populations.

**Keywords :** iNKT, autoreactivity, development, humans

**Abstract :** Thirty years ago, a new population of T  $\alpha\beta$  lymphocytes was described. It is at the frontier between innate and adaptive immunities, as it simultaneously expresses receptors from NK cells and a T cell receptor (TCR), which is invariant. Therefore, the name of this population comes from these characteristics: iNKT for « invariant Natural Killer T ». iNKT cells are different from conventional T  $\alpha\beta$  cells, as they express a TCR restricted by the antigenic presenting molecule CD1d, recognizing glycolipid antigens, and always composed of the germinal gene segments V $\alpha$ 24 and J $\alpha$ 18 for the  $\alpha$  chain, and V $\beta$ 11 for the  $\beta$  chain. After activation, these cells can be directly cytotoxic, and can also produce large amounts of cytokines and chemokines, which can regulate the cross-talk

of iNKT cells with other immune effector cells (dendritic cells, T, B or NK lymphocytes, ...).

Since their discovery, many research fields have emerged in order to better characterize these cells. Among them, there is the identification of underlying mechanisms of iNKT cells' autoreactivity, a phenomenon often seen, and described in the first studies about these population. However, at this time, no consensus has been reached to explain the reactivity of iNKT cells against self-glycolipids. The research field about iNKT cells development model includes many studies using, to a large extent, murine models. My PhD work has focused on these two areas, with the desire to better understand these phenomena in humans.