

# ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2006 - Thèse n° 27

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA MOLECULE PRESENTATRICE D'ANTIGENES  
CD1d.

ETUDE *IN VITRO* DE LA PRODUCTION D'INTERLEUKINES PAR LES  
KERATINOCYTES DE L'HOMME APRES OLIGOMERISATION DE CETTE  
PROTEINE TRANSMEMBRANAIRE.

## THÈSE

Présentée à l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I  
(Médecine - Pharmacie)  
et soutenue publiquement le 9 février 2006  
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Jean-Philippe GERMAIN  
Né le 11 mai 1975  
à Rognac (Bouches-du-Rhône)



# DEPARTEMENTS ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Directeur : Stéphane MARTINOT

Au 1er JANVIER 2005

DEPARTEMENT	PREX	PRI	PR2	MC	Contractuel, Associé, IPAC ET ISPV	AERC	Chargés de consultations et d'enseignement
<b>DEPART. SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE</b> Microbiologie, Immunologie, Pathologie Générale	Y. RICHARD		A. LACHERETZ M. ARTOIS	V. GUERIN-FAUBLEE 90 % A. KODJO D. GREZEL J. VIALARD			
Pathologie infectieuse							
Parasitologie & Maladies parasitaires	MC. CHAUVE	G. BOURDOISEAU		MP. CALLAIT CARDINAL L. ZENNER			
Qualité et Sécurité des Aliments		G. CHANTEGRELET	P. DEMONT C. VERNZOY	A. GONTHIER	S. COLARDELLE	ISPV	
Législation & Jurisprudence			A. LACHERETZ	P. SABATIER M.L. DELIGNETTE 80 % K. CHALVET-MONFRAY			
Bio-Mathématiques							
<b>DEPART. DES ANIMAUX DE COMPAGNIE</b>							
Anatomie		E. CHATELAIN	T. ROGER	S. SAWAYA	R. DA ROCHA CARARO	MCC	BENREDOUANE K. N. GAY I. GOUJON
Chirurgie et Anesthésiologie		J.P. GENEVOIS	D. FAU E. VIGUIER D. REMY		G. CHANOIT S. JUNOT K. PORTIER C. DECOSNE-JUNOT	MCC MCC MCC MCC	
Anatomie-pathologique/Dermatologie-Cancérologie/ Hématologie		J.P. MAGNOL C. FOURNEL	C. FLEURY	T. MARCHAL	D. WATRELOT-VIRIEUX P. BELLI D. PIN	MCC MCA MCA	I. BUBLOT C. GALET C. ESCRIOU
Médecine interne		J.L. CADORE		L. CHABANNE F. PONCE	M. HUGONNARD	MCC	
				E. CAUVIN	J. SONET	MCC	F. DURIEUX
Imagerie médicale							
<b>DEPART. DES PRODUCTIONS ANIMALES</b> Zootechnie, Ethologie & Economie rurale		M. FRANCK		P. LETERME		L. MOUNIER	
Nutrition et Alimentation			M. RACHAIL-BRETIN	D. GRANCHER L. ALVES de OLIVEIRA G. EGRON-MORAND S. BUFF P. GUERIN			
Biol & Patho de la Reproduction		F. BADINAND		R. FRIKHA M.A. ARCANGIOLI D. LE GRAND	D. LAURENT	MCA	N. GIRAUD P. DEBARNOT D. LAURENT
Patho Animaux de Production		P. BEZILLE	T. ALOGNINOIWA				
<b>DEPART. SCIENCES BIOLOGIQUES</b> Physiologie/thérapeutique	R. BOVIN			J.J. THIEBAULT J.M. BONNET-GARIN 90 % T. BURONFOSSE V. LAMBERT			
Biophysique/Biochimie		F. GARNIER	E. BENOIT F. GRAIN				
Génétique et Biologie moléculaire		G. KECK	P. JAUSSAUD P. BERNY		C. FARMER R. SULLIVAN	IPAC IPAC	
Pharmacie / Toxicologie Législation du Médicament							
Langues							
<b>DEPART. HIPPIQUE</b> Pathologie équine Clinique équine Expertise nécropsique		J.L. CADORE O. LEPAGE	C. FLEURY	A. LEBLOND A. BENAMOU-SMITH			

*A celles et ceux qui nous apprennent, nous aident ou nous soutiennent*

*A notre jury,*

*Monsieur le Professeur Denis Jullien*

*Monsieur le Docteur Thierry Marchal*

*Madame le Docteur Delphine Grezel*

*En témoignage de notre profonde reconnaissance*

# Sommaire

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE : CD1d, UNE AUTRE MOLECULE PRESENTATRICE D'ANTIGENES**

### I. GÉNÉTIQUE DU COMPLEXE CD1

#### A. Organisation génomique du complexe CD1

##### 1. Chez l'homme

##### 2. Le complexe génique CD1 dans les autres espèces

#### B. Evolution du complexe génique CD1

#### C. Transcription du gène CD1D

### II. STRUCTURE ET EXPRESSION DES PROTEINES CD1d

#### A. Structure moléculaire de CD1d

#### B. Distribution tissulaire et régulation de l'expression cellulaire de CD1d

### III. FONCTION DE CD1d DANS LA PRESENTATION ANTIGENIQUE

#### A. Les cellules T CD1d-restreintes sont une population lymphocytaire hétérogène

##### 1. Lymphocytes NKT invariants

##### 2. Lymphocytes T CD1d-restreints diversifiés

#### B. Le site de liaison de CD1d lie des lipides plus ou moins antigéniques.

##### 1. Nature des ligands de CD1d

##### 2. Analyse fonctionnelle et structurale de l'interaction CD1d:lipide

#### C. Le TCR des lymphocytes NKT reconnaît l'Ag en association avec CD1d

D. Les ligands des TCR sont générés dans des vésicules intracellulaires acidifiées

1. Assemblage des molécules CD1d
2. Localisation et itinéraire intracellulaires
3. Prise en charge et apprêtement des Ag glycolipides par les CPA
4. Chargement des Ag lipidiques dans le sillon de CD1d

#### IV. IMPLICATIONS IMMUNOLOGIQUES ET PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA VOIE DE PRESENTATION ANTIGENIQUE CD1d

- A. Biologie des lymphocytes T CD1d-restreints
- B. Place des lymphocytes T CD1d-restreints en pathologie infectieuse
- C. Place des lymphocytes T CD1d-restreints dans l'immunologie des tumeurs
- D. Lymphocytes T CD1d-restreints & Hypersensibilités

<b>PARTIE EXPÉRIMENTALE : CD1d ACTIVE LE KÉRATINOCYTE</b>
---

Introduction	76
Matériels & Méthodes	79
Résultats	86
Discussion & Perspectives	92
<b>CONCLUSION</b>	<b>97</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>99</b>

# Principales abréviations utilisées

(ordre alphabétique)

$\alpha$ GalCer :	$\alpha$ -galactosyl céramide
$\alpha$ GalUCer :	$\alpha$ -galacturonosyl céramide
Ac :	anticorps
Ag :	antigène
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA :	Cellule Présentatrice d'Antigènes
CTL :	<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>
GAPDH :	Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
GSL :	GlycoSphingoLipide
DC :	<i>Dendritic Cell</i>
DN :	lymphocyte T double négatif (i.e. CD4 <sup>-</sup> , CD8 <sup>-</sup> )
DP :	lymphocyte T double positif (i.e. CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> )
Ig :	immunoglobuline
iGb3:	isoglobotrihexosylcéramide
IL :	interleukine
NK :	<i>Natural Killer lymphocyte</i>
NKT inv :	lymphocyte T CD1d-restreint exprimant la chaîne TCR $\alpha$ invariante V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 chez la souris, V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 chez l'homme.
RE :	réticulum endoplasmique
RT-PCR :	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
TCR :	<i>T-Cell Receptor</i>

# Liste des illustrations

Figure 1 :	Cartographie du complexe CD1 humain en 1q23.1 et représentation schématique du gène CD1D, de son ARNm mature et de la protéine	p 14
Tableau 1 :	Diversité de la taille de la famille CD1 dans les espèces étudiées	p 17
Figure 2 :	Régions synténiques relatives aux loci CD1 entre la souris et l'homme	p 19
Figure 3 :	Relation entre les isoformes CD1 de divers Mammifères	p 20
Figure 4 :	Structure tridimensionnelle de la molécule CD1d murine	p 25
Figure 5 :	Relation structure-fonction de la molécule CD1d	p 27
Tableau 2 :	Les lymphocytes NKT partagent des caractéristiques à la fois avec les T $\alpha\beta$ conventionnels et les NK mais font aussi preuve d'une grande originalité	p 33
Tableau 3 :	Lipides antigéniques présentés par CD1d	p 35
Figure 6 :	Voies intracellulaires de présentation antigénique par CD1d chez la souris	p 46
Tableau 4 :	La queue cytoplasmique de CD1d contrôle sa distribution intracellulaire	p 47
Tableau 5 :	Molécules impliquées dans l'apprêtement et la présentation des Ag glycolipidiques par CD1d chez la souris et conséquences de leurs mutations	p 48
Figure 7 :	Exemples d'apprêtement de la partie glycosidique des glycosphingolipides par les hydrolases lysosomiales	p 50
Figure 8 :	Différenciation des lymphocytes CD1d-restreints NKT invariants	p 55
Figure 9 :	Conséquences <i>in vivo</i> de l'activation des lymphocytes CD1d-restreints NKT inv par l' $\alpha$ GalCer	p 60
Figure 10 :	Deux stratégies de détection des infections bactériennes par les lymphocytes NKT inv	p 63
Photographie :	Immunomarquage membranaire CD1d des kératinocytes de l'épiderme humain normal	p 77
Tableau 6 :	Séquences des amorces et conditions de la PCR	p 83
Figure 11 :	L'engagement de CD1d induit une augmentation de transcription du gène de l'IL-15 par le kératinocyte	p 86
Figure 12 :	L'engagement de CD1d à la surface des kératinocytes induit la transcription des gènes de l'IL-12p35 et de l'IL-12p40	p 87
Figure 13 :	Induction de la sécrétion d'IL-12p70 par les kératinocytes activés	p 88
Figure 14 :	Les cellules HaCaT expriment constitutivement l'IL-15 reliée à la membrane	p 89
Figure 15 :	Cinétique d'engagement de CD1d à la surface des kératinocytes en présence de génistéine	p 91





La reconnaissance antigénique par des lymphocytes T spécifiques constitue un pilier fondamental de l'immunité comprise comme l'ensemble des mécanismes permettant à un organisme vivant de maintenir la cohérence de ses cellules et tissus et d'assurer son intégrité en éliminant ses propres constituants altérés et les agents infectieux ainsi qu'en neutralisant des agressions physico-chimiques. La compréhension des modalités de la présentation à ces lymphocytes de fragments protéiques en association avec une molécule de classe I ou de classe II codée par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est à l'origine de notre compréhension de la réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire. Cependant, les modalités de cette reconnaissance se sont progressivement érigées en dogme à tel point qu'il était encore récemment difficile de concevoir que la reconnaissance d'une entité autre qu'un complexe peptide:CMH puisse jouer un rôle significatif dans la réponse immunitaire spécifique d'antigène (Ag). Il est aujourd'hui démontré que des lymphocytes T spécifiques de glucides ou de lipides participent à l'immunité [1].

Divers Ag lipidiques sont présentés en association avec les molécules transmembranaires de la famille CD1 à des lymphocytes T restreints par ces dernières. Cette famille comprend chez l'homme cinq isoformes relativement conservées au cours de l'évolution. Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'isoforme CD1d exprimée par les cellules de plusieurs Mammifères. Quels sont les mécanismes moléculaires et cellulaires qui permettent la présentation d'Ag lipidiques par CD1d ? Quels sont leurs effets sur la réponse immunitaire ? Ce sont ces questions auxquelles nous essayerons de répondre dans la première partie de ce mémoire.

Dans une seconde partie, nous présenterons les résultats d'une étude expérimentale réalisée en collaboration avec les Professeurs A. Claudy et D. Jullien, au sein de l'unité INSERM 346 dirigée par D. Schmitt. Ce travail porte sur l'étude de la fonction de la molécule CD1d exprimée à la surface du kératinocyte humain normal.



**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE :  
CD1d, UNE AUTRE MOLECULE PRESENTATRICE  
D'ANTIGENES**



L'un des premiers Ac monoclonaux dirigés contre un Ag de surface cellulaire produit par la technique des hybridomes était spécifique de la molécule CD1a. Ce fut la définition de la première classe de différenciation (*cluster of differentiation* CD). Par la suite, d'autres Ac monoclonaux permirent de subdiviser la classe CD1 en plusieurs entités sérologiques montrant ainsi que les molécules CD1 constituent une famille de protéines. Ceci fut confirmé par l'introduction de la biologie moléculaire et le séquençage des gènes codant ces protéines [2-4].

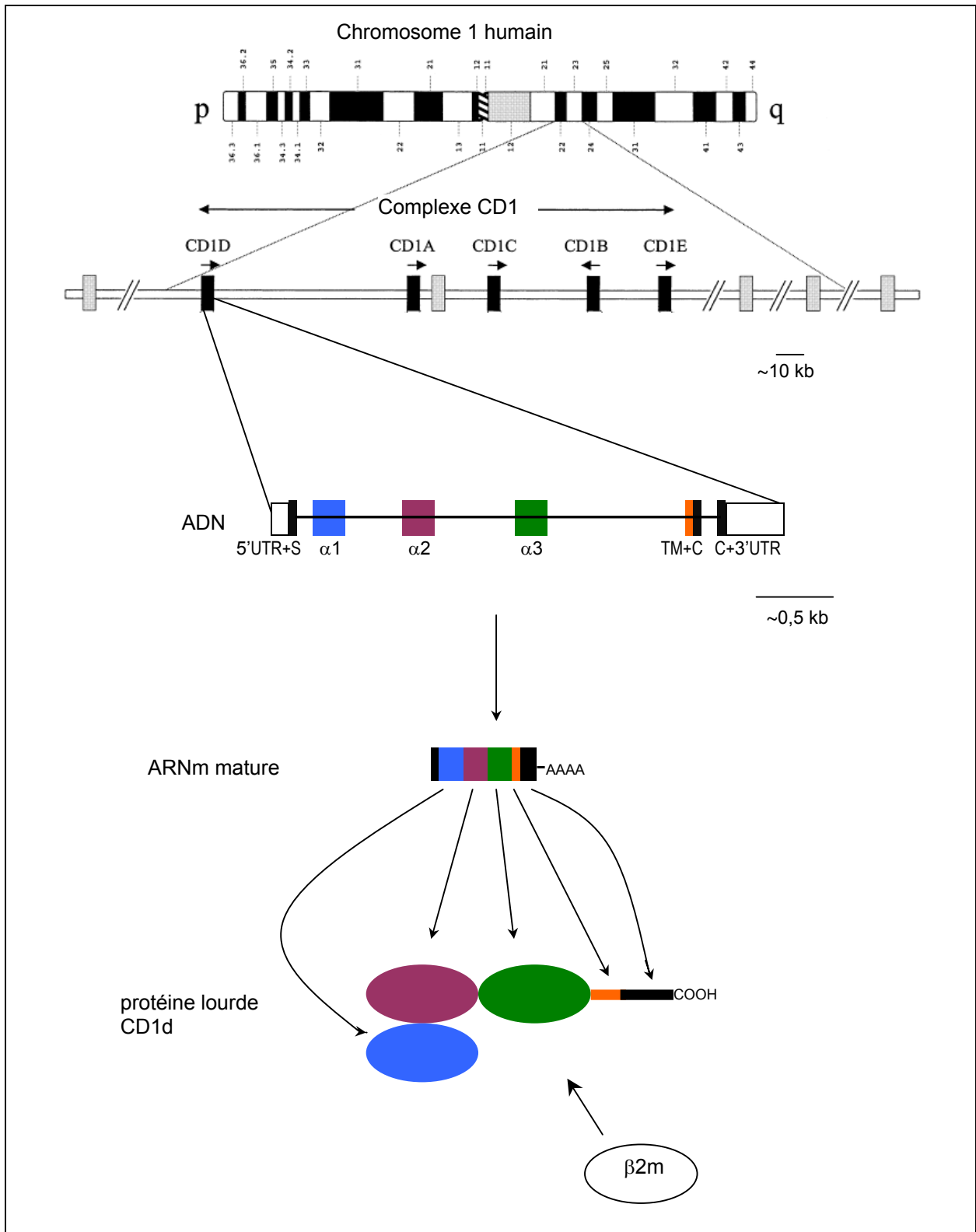
## I. GÉNÉTIQUE DU COMPLEXE CD1

### A. Organisation génomique du complexe CD1

#### 1. Chez l'homme

##### a) Les loci CD1

Le gène codant la protéine CD1d fait partie chez l'homme d'un complexe de cinq gènes apparentés localisés sur le bras long du chromosome 1 (bande 1q23.1) donc en dehors du complexe majeur d'histocompatibilité situé sur le chromosome 6. Ce complexe génique s'étend sur environ 175 kb avec des distances intergéniques courtes témoignant d'une forte liaison génétique. Les gènes sont organisés dans l'ordre suivant : CD1D, CD1A, CD1C, CD1B, CD1E et sont transcrits dans le même sens sauf CD1B [5]. Par convention, les gènes CD1 sont désignés par une lettre capitale après CD1 et les protéines par une minuscule.



**Figure 1: Cartographie du complexe CD1 humain en 1q23.1 et représentation schématique du gène CD1D, de son ARNm mature et de la protéine.**

organisation introns/exons de CD1D et structure tertiaire en domaine de la protéine  
 UTR : *untranslated region*, S : séquence signal, TM : transmembranaire, C : cytoplasmique.

## b) Structure des gènes CD1

Les gènes CD1 ont tous la même organisation morcelée composée de six exons comparable à celle des gènes du CMH de classe I et, hormis CD1E, chacun code une protéine transmembranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Le premier exon code la séquence de tête non traduite (5'UTR) et le peptide signal, les exons 2, 3 et 4 codent respectivement les domaines extracellulaires nommés  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ , un cinquième exon code le domaine transmembranaire et une partie de la région cytoplasmique, l'information pour le reste de la séquence cytoplasmique et la région terminale non traduite (3'UTR) étant contenue dans l'exon 6 [6].

## c) Comparaison des séquences géniques et protéiques

L'étude des séquences nucléotidiques et peptidiques montrent que ces cinq gènes présentent une homologie partielle entre eux ainsi qu'avec ceux du CMH.

Le domaine  $\alpha 3$  est le plus conservé avec 71 à 88% d'acides aminés identiques entre les différentes isoformes CD1 [7]. En revanche, les séquences nucléiques et aminées des domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  présentent une plus grande divergence. C'est d'ailleurs sur la base de ces différences de séquences que Calabi et Milstein ont initialement proposé de répartir les gènes CD1 et à leur suite les protéines en deux groupes : le groupe 1 qui comprend les gènes CD1A, B et C et le groupe 2 défini par le gène CD1D [8]. En effet, au sein des domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ , les protéines du groupe 1 partagent entre elles 48 à 56% d'homologie alors qu'elles n'ont avec CD1d (groupe 2) que 37 à 40% d'homologie [6]. Comme nous le verrons par la suite dans ce mémoire, cette classification est confortée par l'étude des homologues des gènes CD1 humains dans d'autres espèces, ainsi que par la distribution cellulaire et la fonction des deux groupes de molécules CD1. La séquence de CD1E et de ses homologues présente des caractéristiques intermédiaires qui font que certains auteurs les classent parfois dans un troisième groupe [9, 10].

L'homologie de séquence avec les gènes du CMH bien que réelle, est plus limitée. Ainsi, si le complexe CD1 et le CMH ont fortement divergé au niveau du domaine  $\alpha 1$ , les molécules CD1 conservent tout de même 21% d'identité autant avec le domaine  $\alpha 3$  des molécules du CMH de classe I qu'avec le domaine  $\beta 2$  des molécules du CMH de classe II.

Notons que cette homologie est du même ordre que celle existant entre les domaines  $\alpha 3$  et  $\beta 2$  des molécules du CMH de classe I et II [3].

#### d) Polymorphisme du gène CD1D

L'étude des SSCP (polymorphismes de conformation de l'ADN simple brin) des exons 2 et 3 chez 110 donneurs sains non apparentés a révélé que les cinq gènes CD1 humains sont tous, à des fréquences diverses, bialléliques. Ces variations alléliques se réduisent à une ou deux (CD1A) substitutions mononucléotidiques qui, lorsqu'elles donnent lieu à des protéines variantes, ne semblent pas avoir de répercussions fonctionnelles. Ainsi, en position 46 de l'exon 2 de CD1D, une substitution nucléotidique se traduit par le changement d'une thréonine en une sérine, deux acides aminés aux propriétés biochimiques similaires. Il n'existe pas d'individu homozygote pour cet allèle variant qui n'est retrouvé dans la population humaine qu'à une fréquence de 0,01 [11, 12]. Les caractères conservatif et très limité de ce polymorphisme comparable à celui de la majorité des protéines expliquent que CD1D est couramment considéré comme non polymorphe. Cette situation est équivalente pour l'ensemble des gènes CD1 tant chez l'homme que chez les autres espèces [13-15].

## 2. Le complexe génique CD1 dans les autres espèces

Des gènes et des protéines appartenant à la famille CD1 ont été identifiés chez toutes les espèces de Mammifères testés et récemment chez les Oiseaux. Tandis que l'Homme possède un exemplaire unique de chaque gène CD1 (i.e. CD1A, CD1B, CD1C, CD1D et CD1E), ces isoformes sont dupliquées ou délétées chez les autres espèces d'où des différences notables entre les espèces quant au nombre de loci CD1 (Tableau 1). Chaque gène CD1 non humain peut être considéré comme orthologue de l'un des cinq gènes humains ; deux gènes orthologues sont des gènes homologues ayant évolué dans des espèces différentes à partir d'un gène ancestral commun.

Le complexe CD1 de la souris (*Mus musculus*) est le mieux caractérisé après celui de l'homme. Il comprend deux gènes situés sur le chromosome 3, tous deux orthologues du CD1D humain. Tête-bêche et séparés par seulement 6 kb, ces deux gènes (appelés CD1D1 et



CD1D2) présentent 95% d'identité entre eux, ce qui suggère une duplication génique récente [13, 16].

Le rat (*Rattus norvegicus*) ne possède qu'un gène CD1 qui présente une forte homologie avec les gènes murins, il est donc également orthologue du CD1D humain [14]. L'existence d'un seul gène chez le rat est en accord avec la date avancée pour la duplication à l'origine du second gène CD1 murin, il y a 6 millions d'années c'est-à-dire après la séparation du rat et de la souris, il y a 10 millions d'années [16].

En revanche, toujours au sein de l'ordre des Rongeurs, le cobaye (*Cavia porcellus*) possède au moins huit gènes CD1 du groupe 1 [17]. Cependant, la technique d'hybridation moléculaire utilisée n'a pas permis de détecter de gènes orthologues du CD1D humain (i.e. du groupe 2).

	Nombre total de gènes CD1	Nombre de gènes CD1 du groupe 1				Nb de gènes du groupe 2 i.e. CD1D
		CD1A	CD1B	CD1C	CD1E	
Homme	5	1	1	1	1	1
Souris	2	0	0	0	0	2
Rat	1	0	0	0	0	1
Cobaye	8(5)	?	4	3	1	?
Lapin	~8	2	1		1	1
Cochon	>4	1	1		?	?
Mouton	~7	?	3	?	1	1
Macaque	~4		1	1	1	1
Vache	~12		1	1		1
Cheval		1	1			
Chien	~11	1	1	1		
Chat		1				
Poulet	2					

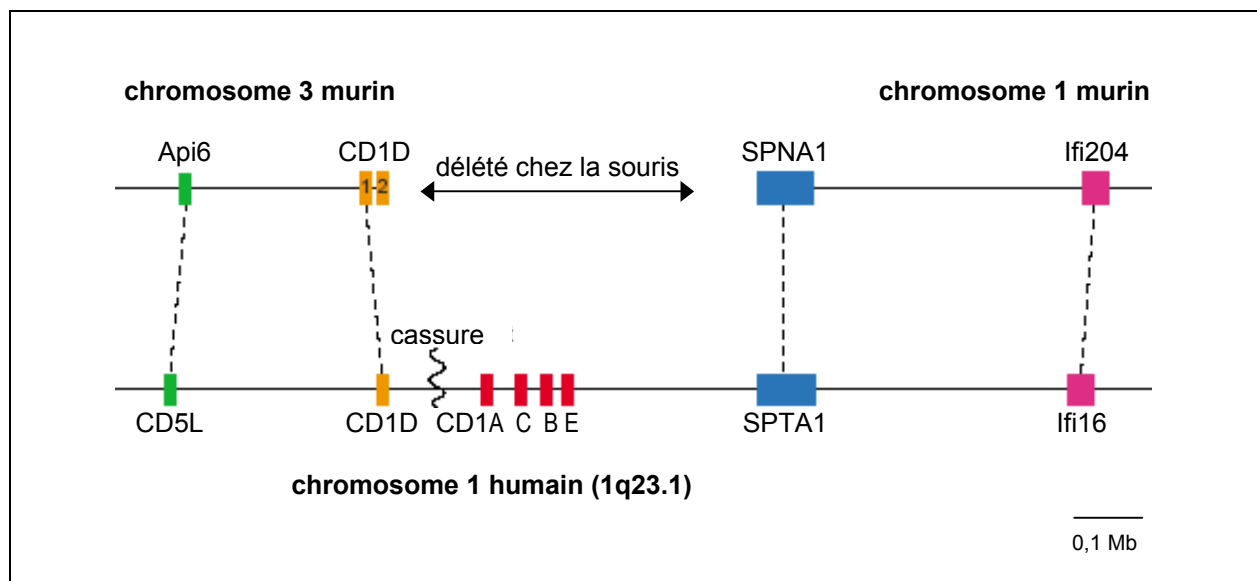
**Tableau 1 : Diversité de la taille de la famille CD1 dans les espèces étudiées.**

Entre parenthèses sont mentionnés les pseudogènes éventuels. ? signifie que le gène n'a pas été identifié par la méthode utilisée. Dans certaines espèces, les données sont insuffisantes pour discriminer la présence et le nombre des différentes isoformes (mis à jour d'après Calabi, 2000 [18]).

Chez les Lagomorphes, le système CD1 du lapin aussi est multigénique avec à la fois plusieurs gènes du groupe 1 et un gène orthologue du CD1D humain [19, 20].

Ainsi, du point de vue de la systématique, les Rongeurs myomorphes (dont la souris et le rat) ne possèdent pas de gènes du groupe 1 contrairement aux Rongeurs hystricomorphes (cobaye) et aux Lagomorphes. Or, il semble peu vraisemblable aux phylogénéticiens que les gènes du groupe 1 aient émergé indépendamment chez le cobaye et le lapin mais plutôt qu'ils ont été conservés depuis l'ancêtre commun aux Rongeurs et aux Lagomorphes [21]. Donc, l'hypothèse la plus plausible est que cet ancêtre commun possédait des gènes des deux groupes. Mais alors, pourquoi la souris et le rat actuels n'ont-ils pas de gènes du groupe 1 ?

La superposition de la région du chromosome 1 humain comprenant le complexe CD1 avec les chromosomes murins 3 (qui porte les gènes CD1D) et 1 indique une relation de synténie (i.e. d'homologie entre des régions chromosomiques de l'homme et de la souris où les gènes homologues sont localisés dans un ordre conservé) (Fig.2). Ces données de cartographie génétiques mettent de plus en évidence chez la souris une discontinuité de cette synténie (autrement dit un trou dans le génome murin) précisément au niveau de la région qui, chez l'Homme contient les gènes du groupe 1. Ainsi au cours de l'évolution phylogénétique des Myomorphes (sous-ordre auquel appartiennent la souris et le rat), une cassure est intervenue dans le chromosome 1 au sein même de complexe CD1, entre CD1D et CD1A. Cette cassure a eu pour conséquence la translocation du bout chromosomique porteur de CD1D sur ce qui allait devenir le chromosome 3 murin (ce qui rend compte de la synténie entre ce chromosome et le chromosome 1 humain) et la délétion, peut-être au cours du processus de réparation, de la région contenant les gènes du groupe 1 [21]. Cette délétion s'est vraisemblablement produite après la séparation d'avec les Hystricomorphes (dont le cobaye) car eux, ont conservé des gènes du groupe 1.



**Figure 2 : Régions synténiques relatives aux loci CD1 entre la souris et l'homme.**

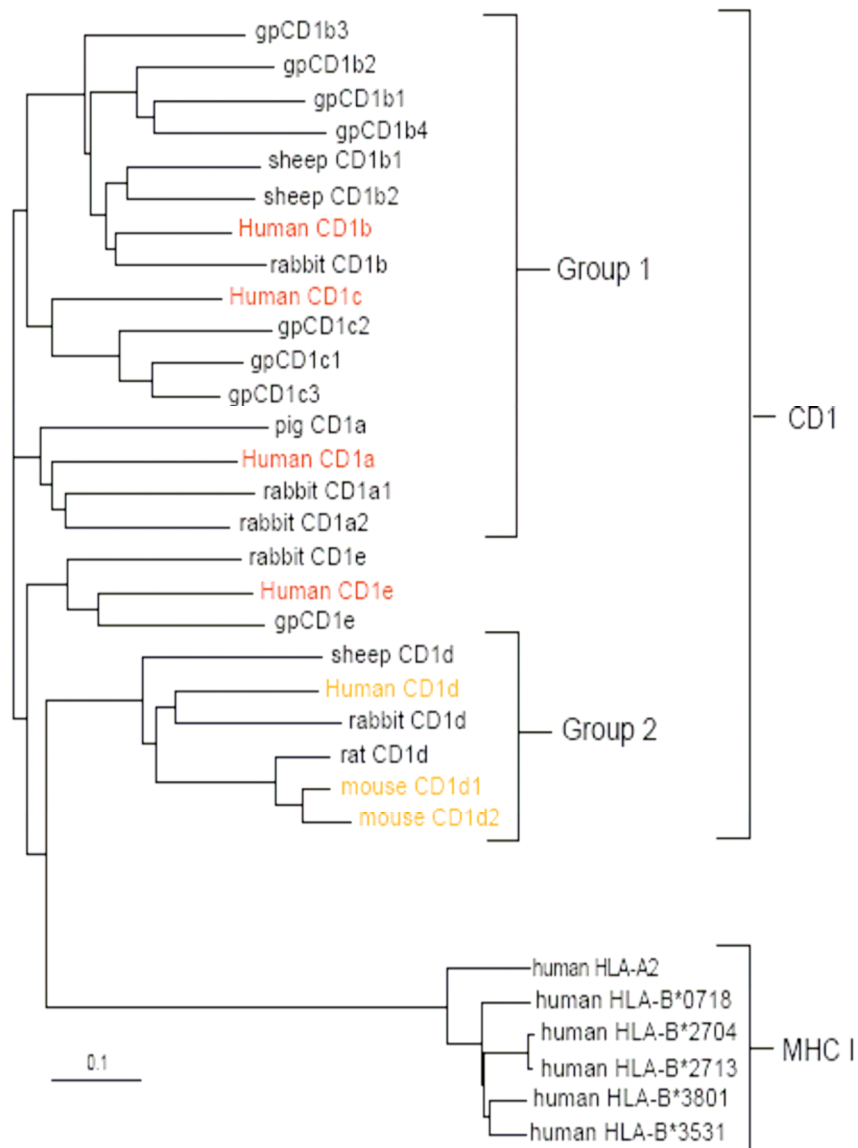
Cette cartographie chromosomique met en évidence une discontinuité de la synténie située dans la région contenant chez l'homme les gènes CD1 du groupe 1.

D'après Dascher CC, *Trends Immunol.* 2003, 24: 412 [21] (avec l'aimable autorisation du Dr Dascher).

Parmi les Ongulés, le porc (*Sus scrofa ssp domestica*) n'a fait l'objet que d'une étude de biologie moléculaire caractérisant un gène pCD1.1, homologue du CD1A humain [22]. Le mouton (*Ovis aries*) possède lui, environ 7 gènes CD1 dont 3 homologues du CD1B h et un homologue du CD1D h séquencés [23, 24]. Enfin, deux gènes du groupe 1 ont été récemment identifiés chez le cheval (*Equus caballus*) [25].

Des techniques immunochimiques ont également révélé la présence de protéines CD1 chez la vache [24, 26], le chat [27, 28] et le chien [29].

Au sein des Primates non humains, un gène CD1D et un CD1E ont été séquencés chez le Macaque rhésus [10, 30].



**Figure 3 : Relation entre les isoformes CD1 de divers Mammifères.**

Cet arbre phylogénétique a été construit à partir de l'alignement des séquences primaires des protéines CD1 . L'échelle indique le nombre moyen de substitutions par position d'acide aminé.

*Reproduit avec l'aimable autorisation du Dr Christopher Dascher [21].*

Jusqu'à peu, les gènes CD1 n'avaient donc été décrits que chez des Mammifères mais viennent d'être isolés chez le poulet, deux gènes codant des protéines aux nombreuses caractéristiques biochimiques et structurales communes avec les protéines CD1 des Mammifères [15, 31]. Ces deux protéines présentent toutefois, une faible homologie de séquence avec les protéines CD1 des Mammifères (23 à 25% dans les domaines extracellulaires) et ne peuvent pas être rapprochées plus particulièrement de l'une ou l'autre des isoformes humaines. Cette divergence résulte vraisemblablement de la grande période écoulée (environ 310 millions d'années) depuis la séparation des Mammifères et des Oiseaux. Néanmoins, ces deux gènes sont plus proches des gènes CD1 des Mammifères que des gènes du CMH du poulet et leur appartenance à la famille CD1 ne fait pas de doute [31]. D'autres Oiseaux ont aussi des gènes CD1 et la taille de leurs complexes CD1 semble plus restreinte que chez les Mammifères : en effet, toutes les espèces testées ont entre 2 (comme le pinson et l'aigle) et 4 (la dinde) gènes CD1 [15]. Il est à noter que contrairement à la situation rencontrée chez les Mammifères, les deux gènes CD1 du poulet sont localisés sur le même chromosome et à proximité du CMH.

## **B. Evolution du complexe génique CD1**

La famille CD1 semble être relativement ancienne du point de vue de l'évolution. Le complexe CD1 partage avec les deux classes du CMH à la fois des niveaux d'homologie de séquence comparables et, comme nous le verrons, des caractéristiques structurales et fonctionnelles. Cette égale distance phylogénétique séparant les trois complexes géniques CD1, CMH de classe I et CMH de classe II implique que CD1 a divergé du CMH simultanément à la séparation des CMH de classe I et de classe II [32]. De plus, la présence de gènes CD1 dans chacune des espèces de Mammifères et d'Oiseaux où ils ont été recherchés indique que cette famille faisait partie du génome du dernier ancêtre commun aux deux groupes (daté il y a au moins 300 millions d'années, à la fin de l'ère primaire) [33].

Compte tenu des localisations chromosomiques relatives du complexe CD1 et du CMH dans les différents groupes, le modèle évolutif le plus plausible serait le suivant : chez un Vertébré primitif, avant la séparation des Oiseaux et des Mammifères, une duplication, suivie d'une translocation sur un autre chromosome, du CMH ancestral (contenant à la fois le CMH et le complexe CD1) auraient résulté en deux régions paralogues (i.e. homologues dans une même espèce). Ensuite, chez les Mammifères, la délétion du CMH serait intervenue sur l'un

des chromosome paralogues, laissant place au seul complexe CD1, et inversement sur l'autre chromosome. En revanche, chez les Oiseaux, le fait que le complexe CD1 et le CMH soient situés sur le même chromosome suggère que c'est l'une des régions paralogues entière qui a été délétée, laissant le CMH et CD1 liés sur l'autre chromosome paralogue [33].

La question de l'émergence du complexe CD1 reste à élucider : dérive-t-il du CMH, ces deux complexes ont-ils émergé simultanément, voire le CD1 est-il antérieur au CMH ? La recherche de gènes de la famille CD1 chez des Vertébrés plus primitifs tels que les Poissons cartilagineux où le CMH a été décrit, permettra d'avancer dans cette thématique.

Autre point intéressant à considérer, l'homologie entre les séquences d'une isoforme donnée dans différentes espèces est plus grande que l'homologie entre les différentes isoformes CD1 dans une espèce donnée. Prenons l'exemple de l'isoforme CD1d du mouton : l'étude de sa séquence montre qu'elle est plus apparentée aux CD1d des autres espèces (souris, rat, lapin et homme ; 59 à 65% d'identité) qu'aux autres isoformes CD1 du mouton (45% d'identité) (observation établie à partir des séquences publiées dans la référence [23]) (Fig.3). Cette conservation des différentes isoformes CD1 au cours de l'évolution suggère une évolution relativement lente et une forte pression de sélection probablement pour maintenir leur structure et donc leur fonction.

### C. Transcription du gène CD1D

Les mécanismes de contrôle de l'expression des gènes CD1 commencent seulement à être élucidés. Une étude récente a identifié chez l'Homme, deux promoteurs en amont de la région codante du CD1D contenant de multiples sites d'initiation de la transcription. Les mécanismes de régulation de leur activité sont mal connus, aucun ne possédant de boîte TATA pour initier l'assemblage du complexe basal de transcription. Toutefois, le promoteur proximal contient une séquence consensus (GGGCGG) spécifique de l'activateur SP1 (*Stimulator Protein 1*) indispensable à son fonctionnement *in vitro* et d'autres séquences régulatrices potentiellement pertinentes –telles que la séquence consensus de réponse à l'IFN- $\gamma$  ( $\gamma$ IRE) et celle du facteur de transcription induit par l'IL-6 (NF-IL6)– sont également retrouvées en amont de la région codante du CD1D [34].

Chez la souris, un promoteur également dépourvu de boîte TATA et contenant trois sites d'initiation de la transcription est régulé *in vivo* par les facteurs de transcription de la famille Ets. Ces derniers ont des effets opposés et restreints à certains types cellulaires : ainsi,

la transcription de CD1D1 requiert Elf-1 dans les lymphocytes B et est inhibée par PU.1 dans les cellules myéloïdes [35].

Chez l'Homme comme chez l'animal, lors de la maturation des transcrits primaires des gènes CD1, des épissages alternatifs produisent des ARNm distincts [36, 37]. Dans le cas de CD1D, au moins huit formes d'ARNm épissées alternativement sont exprimées dans les cellules mononucléées du sang humain, en plus de l'ARNm complet [37]. Bien qu'il n'y ait pas de preuve que ces formes aboutissent à des ARNm matures, on peut déduire de leurs séquences que certaines sont susceptibles de générer des protéines CD1d secrétées par excision de l'exon codant le domaine transmembranaire, et d'autres, des protéines de surface dépourvues du site de liaison à l'Ag. Dans tous les cas, la pertinence physiologique de ces protéines tronquées potentielles demeure inconnue.

## II. STRUCTURE ET EXPRESSION DES PROTEINES CD1d

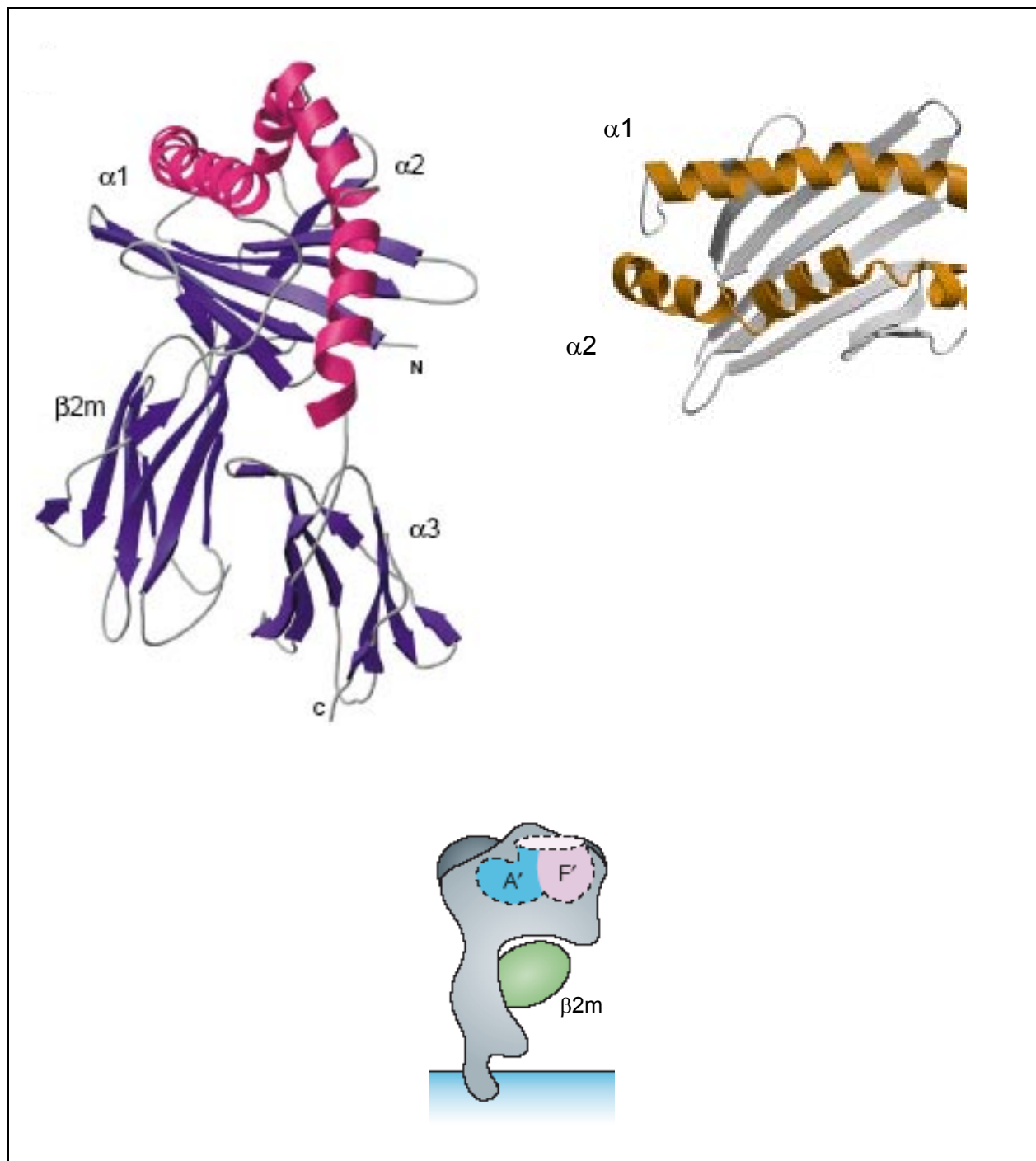
### A. Structure moléculaire de CD1d

Les molécules CD1 sont des hétérodimères formés par l'association non covalente d'une chaîne dite lourde codée par un gène du complexe CD1 et de la  $\beta$ 2-microglobuline ( $\beta$ 2m). Les chaînes lourdes sont des glycoprotéines transmembranaire de type I consistant en trois domaines extracellulaires ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 et  $\alpha$ 3), un segment transmembranaire et une courte queue cytoplasmique. La chaîne lourde de CD1d a, sous sa forme native une masse moléculaire de 37 kDa puis elle est N-glycosylée sur 4 sites. Ainsi, la plupart des molécules CD1d sont exprimées à la surface cellulaire sous la forme d'une glycoprotéine d'environ 50 kDa liée à la  $\beta$ 2m [38]. Cependant, les entérocytes humains et murins expriment des protéines CD1d majoritairement indépendantes de la  $\beta$ 2m et non- ou incomplètement glycosylées. Il semble que l'association à la  $\beta$ 2m soit nécessaire à la régulation du processus de glycosylation dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi [39, 40].

Cette ultrastructure (organisation en domaines et liaison à la  $\beta$ 2m) analogue à celle des molécules de classe I du CMH contribua à faire suspecter une fonction présentatrice d'Ag pour les molécules CD1 [8]. Ceci fut confirmé par l'étude de leur structure tridimensionnelle déduite de la diffraction de rayons X par des cristaux de protéines. Les molécules CD1 et notamment CD1d, possèdent des structures secondaire, tertiaire et quaternaire remarquablement similaires aux molécules du CMH.

Le domaine  $\alpha$ 3 de la chaîne lourde de CD1d, homologue du domaine constant des Ig est lié à la  $\beta$ -2m. Les domaines  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 forment une cavité constituée par deux hélices  $\alpha$  surmontant un plancher de six (ou huit selon les études) feuillets  $\beta$  plissés, semblable au site accepteur d'Ag des molécules du CMH (Fig.4) [41, 42]. La superposition de la structure tertiaire de CD1d avec celles des molécules du CMH montre que les hélices  $\alpha$  sont plus proches l'une de l'autre dans la molécule CD1d (14 Å vs 18 à 20 dans les molécules du CMH) d'où une entrée de la cavité plus étroite. De même, l'hélice  $\alpha$ 1 de CD1d est surélevée au-dessus du plancher  $\beta$  de 4 à 6 Å de plus que dans les molécules du CMH d'où une cavité plus profonde [41]. Cette différence est due à des acides aminés aromatiques (Phe18, Trp40, Phe49) situés à la base de l'hélice  $\alpha$ 1 et conservés entre toutes les isoformes CD1 (Fig.5). Alors que la cavité de liaison au peptide des molécules du CMH peut être divisée en 6 à 9 poches, les chaînes latérales des acides aminés tapissant la cavité de CD1d ne modèlent que deux vastes poches, A' et F'. La poche A' est une large cavité semi-circulaire, incurvée par un





**Figure 4 : Structure tridimensionnelle de la molécule CD1d murine.**

En haut, à gauche : Diagramme en ruban des domaines extracellulaires ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  et la  $\beta 2m$ ), vue latérale. Les hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  sont fushia.

En haut, à droite : Vue plongeante sur la cavité (ou sillon) de liaison au lipide. Les hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  sont ocre et le plancher  $\beta$  gris.

En bas : Schématisation des deux poches constituant la cavité de liaison au lipide et de son entrée.

*Reproduit avec l'aimable autorisation du Dr D. Branch Moody et la permission de Nature Reviews Immunology (2005, 5 : 387-399) copyright (2005) Macmillan Magazines Ltd.*

axe vertical perpendiculaire au plancher  $\beta$  formé par la proximité des chaînes latérales de la Cys12 au plancher et de la Phe70 au plafond. Au-dessus de cette poche, des interactions de Van der Waals entre les deux hélices  $\alpha$  établissent un toit recouvrant la cavité de telle sorte que la poche A' est complètement enfouie dans la structure tridimensionnelle de CD1d. A l'autre extrémité, la poche F', plus courte est orientée d'abord verticalement puis s'étire en direction de l'extrémité C-terminale de l'hélice  $\alpha 1$  ; son entrée, qui est l'unique entrée de la cavité, raccorde la surface externe de CD1d, exposée au solvant, à l'intérieur de la cavité (Fig.4 et 5). Cet intérieur de la cavité (i.e. les deux poches) est revêtu de chaînes latérales d'acides aminés très majoritairement hydrophobes, ce qui réduit les possibilités d'établir des liaisons hydrogènes avec un ligand (Fig.5) [41-44].

Koch *et al.* sont parvenus à co-cristalliser dans un unique cristal, une molécule CD1d humaine liée à un ligand lipidique et une autre non liée. Le sillon de liaison à l'Ag de la molécule liée est plus étroit (d'environ 1 Å) que celui de la structure vide qui a donc une conformation « ouverte », prompt à être se lier à un lipide [43].

Au bilan, la cavité ménagée par les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  de CD1d a une longueur totale (A'+F') de 30 Å (vs 25 Å dans le CMH I) et un volume nettement supérieur au volume des molécules du CMH : les CD1d murin et humain ont une cavité de 1400 Å<sup>3</sup> lorsqu'elle est occupée par un lipide de synthèse tandis que la molécule murine vide a une cavité de 1650 Å<sup>3</sup> [41-43]. Comme pour les molécules du CMH de classe I, ce sillon est fermé aux deux extrémités et n'est accessible que par une étroite ouverture (18×7 Å) allant du milieu du sillon au milieu de la poche F'.



## **B. Distribution tissulaire et régulation de l'expression cellulaire de CD1d**

La recherche systématique de l'expression des molécules CD1 du groupe 2 au sein des différents organes a confirmé la classification initialement basée sur des différences de séquences des molécules CD1 en 2 groupes distincts, en montrant que celle-ci recoupe également des différences de distribution tissulaire.

Ces études phénotypiques ont été essentiellement menées chez l'homme et la souris, par cytométrie de flux et immunohistochimie.

### **1. Thymus et lignée T**

Chez l'homme, l'étude immunohistochimique du thymus révèle un marquage intense des thymocytes corticaux et une nette diminution d'expression de CD1d au niveau de la jonction corticomédullaire avec peu de cellules positives dans la médullaire aboutissant à des lymphocytes T matures négatifs au repos [45]. La stimulation de ces lymphocytes T au moyen de la phytohémagglutinine induit une accumulation cytoplasmique de la protéine CD1d et une légère expression à la surface cellulaire [46].

Chez la souris, la répression de l'expression au cours de la maturation intrathymique est moins franche : thymocytes corticaux et médullaires sont marqués de façon équivalente et CD1d est encore mis en évidence à la surface des lymphocytes T matures périphériques même si l'intensité d'expression est réduite de moitié par rapport aux thymocytes double positifs CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> [38, 47, 48].

Bien que les deux gènes CD1D murins soient fortement paralogues, leurs expressions sont régulées différemment et la protéine CD1d2 ne peut être détectée dans tout l'organisme qu'à un faible niveau à la surface des thymocytes [49]. Par conséquent, l'ensemble des données sur l'expression de CD1d chez la souris concernent la molécule CD1d1.

Notons que les cellules épithéliales thymiques, déterminantes pour la sélection des lymphocytes T restreints par le CMH, sont CD1d<sup>-</sup>.

### **2. Lignée B**

Chez l'homme, au contraire des lymphocytes T, les lymphocytes B du sang circulant expriment CD1d de façon constitutive. Au sein des organes lymphoïdes secondaires, les

cellules B au repos des zones du manteau sont fortement marquées tandis que les cellules positives sont rares dans les centres germinatifs [45, 50].

Chez la souris, le profil d'expression de CD1d par la lignée B est similaire (sang circulant, ganglions lymphatiques, rate, plaques de Peyer, péritoine), le niveau d'expression le plus élevé de l'organisme étant observé sur les cellules B des zones marginales dans la rate (CD1d<sup>fort</sup>, CD21<sup>fort</sup>, CD22<sup>fort</sup>, CD23<sup>faible</sup>, IgM<sup>fort</sup>, IgD<sup>faible</sup>) [38, 47, 51].

Chez le mouton aussi, l'ARNm de CD1d a été détecté par hybridation *in situ* dans les cellules B des nœuds lymphatiques [24].

### 3. Autres cellules myéloïdes CD1d<sup>+</sup>

Les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques matures expriment CD1d constitutivement chez la souris [38, 47, 48], le mouton [24] et l'homme [45, 52]. Le niveau d'expression basal est faible mais suffisant pour activer les lymphocytes CD1d-restreints [52].

L'expression de CD1d sur les cellules de la lignée monocyttaire est régulée différemment chez la souris et l'homme et, à l'intérieur de chaque espèce différemment de l'expression des molécules du groupe 1 et du CMH.

Chez l'homme, le niveau d'expression des monocytes diminue au cours de la culture en présence de GM-CSF et IL-4 [52]. Au contraire, chez la souris, ces conditions induisent une augmentation de l'intensité de fluorescence en cytométrie sur les macrophages [48]. Alors que l'IFN- $\gamma$  et le TNF séparément n'ont aucun effet sur l'expression de CD1d par les macrophages murins, on observe, *in vitro* et *in vivo*, un effet synergique de ces deux cytokines pro inflammatoires. L'expression optimale de CD1d par les macrophages requiert deux signaux : l'un impérativement délivré par l'IFN- $\gamma$ , l'autre par le TNF ou un composé bactérien ligand des TLR-2 ou -4 (*Toll-like receptors*) [53].

Il apparaît donc que les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles expriment la molécule CD1d de manière constitutive ce qui leur permet d'activer rapidement les effecteurs de l'immunité lors de conditions pathologiques. De plus, elles augmentent leur niveau d'expression dans les conditions inflammatoires afin d'accroître l'avidité de leur interaction avec les lymphocytes et ainsi, de délivrer un signal de danger plus efficacement.

#### 4. Cellules non hématopoïétiques

Chez l'homme, CD1d possède aussi une large distribution dans de nombreux organes, sur des cellules épithéliales, parenchymateuses et/ou stromales. Ainsi, au sein de la peau humaine normale qui nous intéressera plus particulièrement dans la partie expérimentale de ce mémoire, CD1d est exprimé par tous les kératinocytes et par les cellules dendritiques dermiques [54, 55]. Même si nous ne sommes pas parvenus à reproduire cette observation, une étude mentionne que la culture *in vitro* de kératinocytes humains normaux en présence d'IFN- $\gamma$  induit une surexpression significative de CD1d à la surface de ces cellules [54]. Notons que les cellules de Langerhans n'expriment pas CD1d, vraisemblablement en raison d'une inhibition due au TGF- $\beta$  sécrété par les kératinocytes environnants [56].

Les cellules de l'épithélium gastrointestinal humain expriment CD1d. L'expression n'est pas détectée dans les cryptes mais apparaît progressivement au cours de la migration et de la différenciation des entérocytes, pour devenir maximale au sommet des villosités [50, 57]. Là aussi, lors de culture de lignée d'entérocytes, l'IFN- $\gamma$  induit une augmentation de l'expression basale de CD1d, de même que la protéine de choc thermique hsp110 [58].

On retrouve aussi CD1d, dans de nombreux autres organes tels que le foie (hépatocytes), le pancréas (cellules acineuses), le rein (tube contourné proximal), l'utérus (épithélium), l'épididyme (épithélium), la conjonctive (épithélium), ainsi que sur les cellules musculaires lisses de la média de nombreux vaisseaux sanguins [57]. Il apparaît donc que CD1d est généralement exprimé par les cellules épithéliales humaines sauf, de façon notable, par l'épithélium thymique.

En revanche, chez les rongeurs, la distribution de CD1d semble plus restreinte puisqu'en dehors du système hématopoïétique, cette protéine n'a été mise en évidence sans controverse qu'à la surface des hépatocytes. Deux études, l'une chez la souris [59] et l'autre chez le rat [60] rapportent l'expression de CD1d par l'épithélium intestinal mais elles n'ont pu être confirmées plus récemment [47]. Ces divergences d'observation sont vraisemblablement dues à l'utilisation d'anticorps monoclonaux de spécificités différentes.

Chez le mouton, l'ARNm de CD1d a été détecté dans l'intestin (épithélium et lymphocytes des plaques de Peyer), dans les hépatocytes et dans le système nerveux central (péricaryon des neurones et macrophages de la microglie) [24].

### III. FONCTION DE CD1d DANS LA PRESENTATION ANTIGENIQUE

#### A. Les cellules T CD1d-restreintes sont une population lymphocytaire hétérogène

Les cellules qui reconnaissent CD1d sont des lymphocytes CD3<sup>+</sup> que plusieurs caractéristiques originales distinguent des lymphocytes T conventionnels, restreints par le CMH (Tableau 2) ; la plus radicale étant, comme nous le verrons en détail ultérieurement la reconnaissance de lipides en association avec CD1d.

##### 1. Les lymphocytes NKT invariants

Une première sous population de cellules T CD1d-restreintes peut être précisément étudiée de par son usage exclusif d'une unique chaîne TCR $\alpha$ . Chez la souris, le segment variable V $\alpha$ 14 est invariablement réarrangé avec le segment de jonction J $\alpha$ 18 et l'unique gène constant et ce TCR $\alpha$  ainsi formé s'associe préférentiellement avec une chaîne  $\beta$  qui utilise les segments V $\beta$ 8, V $\beta$ 7 ou V $\beta$ 2. Ce réarrangement  $\alpha$  invariant forme de plus des boucles CDR3 $\alpha$  sans addition ni délétion de régions N [61]. Ces cellules T CD1d-restreintes n'ont donc ni diversité combinatoire, ni diversité jonctionnelle de leur TCR $\alpha$ .

Des populations similaires de lymphocytes ont été identifiées pour l'heure chez l'homme, le macaque et le rat [30, 62, 63]. Chez l'homme, ces cellules CD1d-restreintes expriment une chaîne invariante V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 le plus souvent associée à V $\beta$ 11, qui sont respectivement les homologues des segments murins V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 et V $\beta$ 8.

En outre, ces lymphocytes partagent plusieurs récepteurs avec les cellules NK tels que CD161 (lectine de type C sans ligand connu, appelée NK1.1 chez la souris), CD122 (IL-2/15R $\beta$ ) et des récepteurs régulateurs de cytotoxicité appartenant aux familles NKC (*Natural Killer Complex*) et Ly49 chez la souris, NKC et KIR (*Killer cell Ig-like Receptors*) chez l'homme [64, 65].

En raison de la co-expression d'un récepteur T semi-invariant et de récepteurs NK, ces lymphocytes CD1d-restreints sont communément appelés lymphocytes NKT invariants (NKT inv). C'est le terme que nous employerons ici en gardant toutefois à l'esprit qu'il n'est pas totalement satisfaisant car d'une part, il n'y a que le TCR $\alpha$  qui est véritablement invariant (même si le répertoire V $\beta$  est biaisé, les chaînes TCR $\beta$  possèdent des régions diversifiées) et d'autre part, il existe des stades de différenciation où les lymphocytes NKT sont CD161<sup>-</sup> (au

cours de la maturation intrathymique et après activation en périphérie). De plus, la référence au marqueur NK1.1 n'est valable chez les souris que dans la lignée C57BL/6 (B6), les autres lignées couramment utilisées (telles que BALB/c ou NOD) n'exprimant pas NK1.1.

Une autre caractéristique des lymphocytes NKT inv est leur phénotype mémoire et activé acquis avant la naissance. Chez la souris, la plupart sont :  $CD44^{\text{fort}}$ ,  $CD69^{\text{fort}}$ ,  $CD45RB^{\text{fort}}$ ,  $CD62L^-$ ,  $CCR7^-$ ,  $CD122^{\text{fort}}$  et, chez l'homme :  $CD45RA^-$ ,  $CD45RO^+$ ,  $CD62L^-$ ,  $CD25^+$ ,  $CCR7^-$ . Ce phénotype remarquable est aussi observé sur les cellules obtenues à partir de sang de cordon et de souris axéniques [7, 66, 67].

Chez la souris, les lymphocytes NKT inv sont soit  $CD4^+$ , soit double négatifs (DN)  $CD4^-$ ,  $CD8^-$  mais le rôle de CD4 sur ces cellules classe II-indépendantes reste incompris [68]. En revanche, 50% des NKT inv humains expriment la sous-unité  $\alpha$  de CD8 même si aucun n'exprime  $CD8\beta$  [64]. Les NKT du macaque et du rat sont également  $CD8^+$  [63, 69].

Du point de vue fonctionnel, de nombreuses études démontrent la contribution des lymphocytes NKT inv aux réponses immunitaires anti-microbienne et anti-tumorale ainsi qu'au maintien de l'équilibre entre tolérance et autoimmunité. Ces implications physiopathologiques sont médiées par la forte capacité de synthèse de cytokines tant de type 1 que de type 2, très rapidement après l'activation.

## 2. Lymphocytes T CD1d-restreints diversifiés

Outre les NKT inv, une seconde sous population de lymphocytes T CD1d-restreints, également apparentée aux cellules NK et capable de produire de grande quantité de cytokines a été mise en évidence chez la souris [70, 71]. Elle n'exprime pas le réarrangement invariant  $V\alpha14-J\alpha18$  et utilise un répertoire de segments V nettement plus diversifié que les NKT inv. Cependant, cette sous population est tout de même enrichie en cellules exprimant un TCR $\alpha$  composé des segments  $V\alpha3-J\alpha9$  ou  $V\alpha8$ , préférentiellement associé à un TCR $\beta$   $V\beta8^+$  [72]. Cette sous population CD1d-restreinte inclut aussi des lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\gamma4^+$  [73].

De tels lymphocytes CD1d-restreints à TCR diversifiés ont également été isolés chez l'homme [74].



Lymphocytes	T $\alpha\beta$ conventionnels	NKT CD1d-restreints		NK
		Invariants	Diversifiés	
Elément de restriction	CMH I (CD8 <sup>+</sup> ) CMH II (CD4 <sup>+</sup> )	CD1d	CD1d	Inapproprié
TCR $\alpha$ *	Extrême diversité	V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 (souris) V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 (homme)	Diversifiés, certains V $\alpha$ 3.2-J $\alpha$ 9, V $\alpha$ 8 (souris)	–
TCR $\beta$ *	Extrême diversité	V $\beta$ 8, 7, 2 (souris) V $\beta$ 11 (homme)	Diversifiés, certains V $\beta$ 8 (souris)	–
CD4/CD8	CD4 <sup>+</sup> ou CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> ou DN (souris) CD4 <sup>+</sup> ou 8 <sup>+</sup> ou DN (homme)	CD4 <sup>+</sup> ou DN (souris)	CD8 <sup>+</sup> ou DN
NK1.1 (CD161)	–	+ (mature au repos) – (immature ou activé)	+ ou –	+
Autoréactivité	Non	Oui	Oui	
Réactivité à l' $\alpha$ GalCer	Non	Forte	Non	Non
Cytokines sécrétées	Type 1 ou 2 (Th CD4 <sup>+</sup> ) Type 1 (Tc)	Type 1 et 2	Type 1 et 2	Type 1
Lymphopoïèse thymo-dépendante	Oui	Oui	Oui	Non

**Tableau 2 : Les lymphocytes NKT partagent des caractéristiques à la fois avec les T $\alpha\beta$  conventionnels et les cellules NK mais font aussi preuve d'une grande originalité**

\* quand le segment J (de jonction) n'est pas spécifié, la chaîne TCR est diversifiée (en particulier diversité N) même si le répertoire des segments V (variables) peut être biaisé.

$\alpha$ GalCer :  $\alpha$ -galactosylcéramide, glycosphingolipide synthétique, analogue de lipides bactériens, capable d'activer fortement les NKT inv quand il est présenté par CD1d et utilisé *in vitro* pour identifier spécifiquement cette sous population (tétramères CD1d: $\alpha$ GalCer).

Au laboratoire, NKT inv et lymphocytes CD1d-restreints à TCR diversifiés peuvent être distingués *in vitro* au moyen de tétramères CD1d chargés d' $\alpha$ GalCer. En effet, seul le TCR des NKT inv reconnaît ce glycolipide que nous présenterons dans la prochaine partie. *In vivo*, les implications physiopathologiques des deux sous populations de lymphocytes T CD1d-restreints peuvent aussi être différenciées grâce aux souris *knock-out* : CD1d<sup>-/-</sup> ou J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> (cf. *infra*).

## **B. Le site de liaison de CD1d lie des lipides plus ou moins antigéniques.**

### **1. Nature des ligands de CD1d**

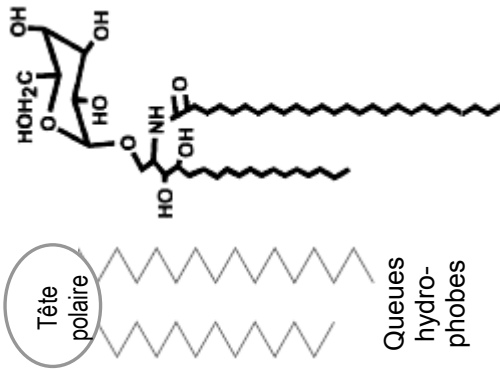
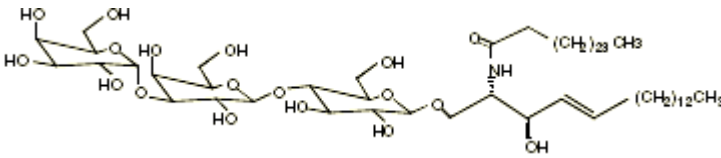
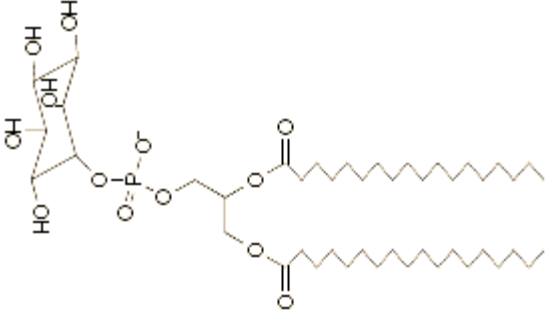
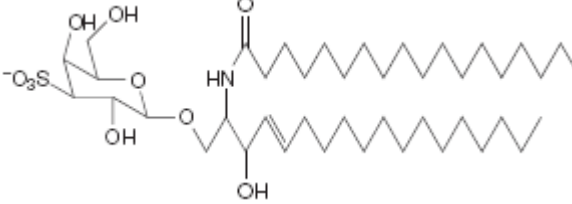
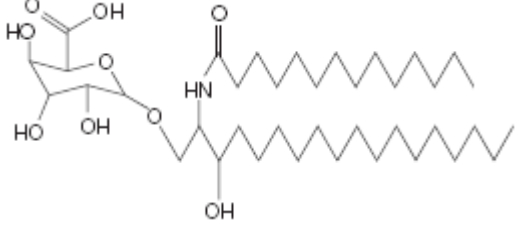

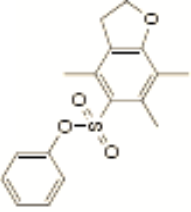
L'aspect le plus original des molécules CD1 est certainement la nature lipidique des Ag qu'elles fixent et présentent aux lymphocytes T. Les molécules lipidiques ne sont pas solubles dans l'eau et sont toujours intégrés aux membranes cellulaires ou conjuguées à des protéines de liaison dans les tissus. Cette caractéristique biochimique rend la biologie et l'immunologie des lipides différentes de celles des protéines, solubles dans les milieux aqueux.

L'ensemble des lipides que CD1d est capable de lier appartiennent à deux classes : les glycosphingolipides et les glycérophospholipides. Leur comparaison met en évidence une structure biochimique amphipathique commune : à savoir, un groupement polaire (hydrophile) substitué par deux chaînes aliphatiques (i.e. succession de  $-CH_2-$ ) apolaires (hydrophobes), plus ou moins longues (Tableau 3).

#### **a) $\alpha$ GalCer et ligands synthétiques**

Parmi les ligands de CD1d, les mieux caractérisés sur le plan immunogénique sont des glycosylcéramides synthétiques et en particulier, une  $\alpha$ -galactosylcéramide communément appelée  $\alpha$ GalCer. Elle est construite à partir d'un squelette de phytosphingosine (C18) lié à un acide gras (C26) par une liaison amide (formant ainsi une céramide) et à l' $\alpha$ -D-galactose (Tableau 3). Initialement identifiée par criblage d'extraits d'une éponge marine (*Agelas mauritanus*) en raison de son activité anti-métastatique [75], l' $\alpha$ GalCer ne ressemble que partiellement aux glycosphingolipides rencontrés chez les Mammifères : d'une part, la liaison O-glycosidique entre le carbone anomérique (position 1') du galactose et le carbone C<sub>1</sub> de la céramide est dans une configuration  $\alpha$  alors que les Mammifères utilisent exclusivement la configuration  $\beta$  et d'autre part, la double liaison C<sub>4</sub>=C<sub>5</sub> de la sphingosine des céramides de Mammifères est hydroxylée pour obtenir la phytosphingosine de l' $\alpha$ GalCer.

Quoiqu'il en soit, chez l'homme et chez la souris, cet Ag présenté par CD1d est reconnu par les lymphocytes NKT inv qui répondent en proliférant et en produisant rapidement de grandes quantités de cytokines de type 1 et de type 2. De par cette capacité à activer spécifiquement les NKT inv, l' $\alpha$ GalCer est devenue un outil très utilisé tant en recherche fondamentale que thérapeutique comme agent pharmacologique et à ce jour, deux essais cliniques de phase I en cancérologie ont été publiés [76, 77].

Antigène :	$\alpha$ GalCer i.e. Gal( $\alpha$ 1,1)Cer	iGb3	Phospholipides (ici un phosphatidylinositol)	Sulfatide (3'-sulfo- $\beta$ -GalCer)	$\alpha$ GalUCer (et $\alpha$ GlcUCer)	PIM <sub>4</sub>	LPG	GD3	Sulfonate de phényl benzofurane
	 <p>Tête polaire</p> <p>Queues hydro-phobes</p>								
Origine :	synthétique (peut-être bactérienne)	endogène	endogènes	endogène	bactérie	Mycobactérie	parasite	tumeur	synthétique
Type de cellules T CD1d-restreintes activées :	tous les NKT inv	tous les NKT inv	ss pop d'inv ou diversifiées	diversifiées	ss pop d'inv	ss pop d'inv	ss pop d'inv	ss pop d'inv	diversifiées (V $\alpha$ 2/V $\beta$ 21)
Agoniste :	puissant	puissant	faibles à puissants						

**Tableau 3 : Antigènes présentés par CD1d**

$\alpha$ GalCer :  $\alpha$ -galactosylcéramide,  $\alpha$ GalUCer :  $\alpha$ -galacturonosylcéramide ; PIM<sub>4</sub> : phosphatidylinositol tétramamide ; LPG : lipophosphoglycane ; GD3 : disialoganglioside  
ss pop : sous population

Il est à noter que l'hypothèse que l' $\alpha$ GalCer provienne des bactéries symbiotes qui colonisent les éponges a été récemment avancée [42].

## b) Lipides du soi

Le phénotype mémoire (i.e. activé) des lymphocytes NKT chez les souris axéniques et dans le sang de cordon humain et la démonstration *in vitro* que les NKT sont activés par des CPA CD1d<sup>+</sup> en l'absence d'Ag exogènes suggèrent qu'ils répondent en périphérie à des Ag endogènes présentés par CD1d [67, 78].

D'après des expériences d'élution, les phosphatidylinositols glycosylés et non-glycosylés présents dans les membranes cellulaires des Mammifères sont les principaux (sinon les uniques) ligands de CD1d dans le réticulum endoplasmique [79-81]. Cependant, ils ne sont pas antigéniques pour les lymphocytes T CD1d-restreints. *In vitro*, d'autres phospholipides ubiquitaires tels des phosphatidyléthanolamines, des phosphatidylinositols et des phosphatidylglycérols sont reconnus en association avec CD1d par plusieurs hybridomes T CD1d-restreints (invariants ou diversifiés) mais là encore, les lymphocytes spécifiques correspondants n'ont pas été isolés *in vivo* [82, 83].

Certains GSLs du soi aussi sont reconnus par des lymphocytes NKT. L'équipe d'A. Bendelac a identifié l'isoglobotrihexosylcéramide (iGb3) de formule : Gal( $\alpha$ 1,3)Gal( $\beta$ 1,4)Glc( $\beta$ 1,1)Cer, comme un puissant agoniste pour les lymphocytes NKT inv humains et murins, induisant une stimulation comparable à celle de l'aGC. Ce GSL dont le rôle était jusqu'alors inconnu est donc un ligand de CD1d et bien qu'il n'ait pas encore été formellement décrit chez la souris et chez l'homme (alors qu'il l'a été chez le rat, le chat et le chien), plusieurs arguments immunologiques et biochimiques soutiennent l'hypothèse que l'iGb3 est endogène dans ces deux espèces [84].

Un sulfatide, un  $\beta$ -galactosylcéramide estérifié en 3' du galactose par une molécule d'acide sulfurique, constitutif dans toutes les membranes cellulaires et abondant dans la gaine de myéline, est présenté par CD1d *in vivo* chez la souris à des NKT à TCR diversifiés, V $\alpha$ 14<sup>-</sup> [85].

Enfin, le disialoganglioside (glycosylcéramide comprenant deux acides sialiques) GD3 exprimé par les tumeurs d'origine neuroectodermique mais absent des tissus sains, stimule *in vivo* la prolifération d'une sous population de NKT inv. En effet, les souris immunisées par des cellules de mélanome humain développent une réponse anti-GD3 dépendante de CD1d [86].

Il convient de signaler que si l'iGb3 présenté par CD1d est reconnu par la totalité des NKT inv, alors que le GD3 et le PIM<sub>4</sub> ne sont eux reconnus que par des sous populations de ces lymphocytes.

### c) Lipides microbiens

Même si le glycoposphatidylinositol intégré à la paroi cellulaire de protozoaires tels que les Trypanosomes et les Plasmodies comme celui des cellules mammifères est capable de se lier à CD1d, ce phospholipide n'est ni immunogène ni antigénique et l'immunité dirigée contre ces parasites est indépendante de CD1d et des lymphocytes T CD1d-restreints [87-89].

En revanche, deux GSL immunogènes ont été isolés de la paroi (Gram-négative) d' $\alpha$ -Protéobactéries appartenant aux genres *Sphingomonas* et *Ehrlichia* [90, 91]. Ces composés bactériens sont particulièrement intéressants en raison de leur pertinence lors d'infections *in vivo* mais aussi parce que leur structure biochimique est très proche de celle de l' $\alpha$ GalCer, le puissant agoniste des NKT inv. En effet, comme l' $\alpha$ GalCer, ce sont des stéréoisomères  $\alpha$  et ils se caractérisent par la présence d'un acide uronique (ose oxydé en C6) d'où leur nom : l' $\alpha$ -galacturonosylcéramide ( $\alpha$ GalUCer) et l' $\alpha$ -glucuronosylcéramide ( $\alpha$ GlcUCer). *In vivo*, ces lipides étrangers se lient à CD1d pour stimuler fortement les NKT inv, ce qui participe, au moins chez la souris, à la clairance bactérienne [91].

Les Mycobactéries sont également reconnues par le système CD1d. *In vitro*, des clones NKT inv sont activés de manière CD1d-restreinte par des CPA mises en présence de phosphatidylinositol tétramannoside (PIM<sub>4</sub>), un phospholipide inséré dans les membranes interne et externe des Mycobactéries et qui diffuse dans les lysosomes lors de l'infection des macrophages [92].

Ainsi, il apparaît que CD1d est capable de lier des lipides composés de deux chaînes aliphatiques de longueur comprise entre 12 et 26 C, i.e. relativement courtes en comparaison de l'ensemble des lipides rencontrés dans le monde vivant.

Le lipophosphoglycane (LPG) représente une exception à la structure générale des ligands de CD1d formés d'une tête hydrophile et de deux queues aliphatiques hydrophobes. Ce composant majeur du glycocalyx des Leishmanies est bâti à partir d'un glycérophospholipide dans lequel le glycérol n'est substitué que par un seul acide gras (i.e. une seule queue hydrophobe). *In vitro*, le LPG se lie à CD1d et active *in vivo* des lymphocytes intrahépatiques de souris naïves de manière dépendante de CD1d. Cependant, *in vitro*, ni les

hybridomes NKT inv ni les NKT inv spléniques ne répondent pas au complexe LPG:CD1d [93].

#### d) Autres ligands antigéniques

Le spectre des Ag présentés par CD1d semble excéder le cadre des lipides aliphatiques et pourrait notamment inclure de petites molécules sulfonées polyaromatiques. En effet, *in vitro*, le sulfonate de phénylpentaméthylhydrobenzofurane, une petite molécule de synthèse non lipidique, se lie à CD1d au niveau du sillon de liaison à l'Ag et ce complexe active un clone T CD1d-restreint humain V $\alpha$ 24<sup>-</sup> (V $\alpha$ 2/V $\beta$ 21) de manière spécifique [94].

De plus, bien qu'il soit aujourd'hui largement admis que les lipides sont les Ag majeurs présentés par CD1d, d'anciens travaux avaient identifiés par criblage de banques de peptides un motif peptidique de liaison à CD1d. Ce motif se compose de trois résidus d'ancrage occupés par des acides aminés aromatiques ou hydrophobes et volumineux [95] et des lymphocytes T CD1d-restreints spécifiques ont été isolés ce qui tend à montrer la pertinence immunologique de ces peptides liant CD1d [96].

## 2. Analyse fonctionnelle et structurale de l'interaction CD1d:lipide

#### a) Affinité et cinétique de la liaison CD1d:lipide

Les études de l'interaction CD1d:lipide menées *in vitro* sont parfois en désaccord. La technique biophysique de résonance plasmonique de surface (suivant la fixation de molécules CD1d solubles à des lipides immobilisés sur une lame de verre recouverte d'or) révèle une constante de dissociation à l'équilibre ( $K_D$ ) de  $0,34 \cdot 10^{-6}$  M entre l' $\alpha$ GalCer et CD1d avec une courte demi-vie (30 s) i.e. une liaison relativement forte et une rapide dissociation du complexe [97, 98]. En contradiction, les études utilisant des tétramères CD1d chargés d' $\alpha$ GalCer sont en faveur d'une dissociation plus lente et donc d'une demi-vie beaucoup plus longue, de l'ordre de 1 jour [98, 99]. Une troisième approche par électrophorèse à pH<sub>i</sub> et titration calorimétrique indique un  $K_D$  compris entre  $1 \cdot 10^{-6}$  et  $9,7 \cdot 10^{-6}$  M, plus en accord avec les informations apportées par les tétramères [98]. Ces divergences notables entre les techniques utilisées sont peut-être dues à la formation de micelles par les lipides en phase aqueuse. De plus, la technique de résonance des plasmons de surface ne serait pas adaptée à

l'étude de la liaison CD1d:lipide en raison d'interactions non spécifiques entre CD1d et la surface métallique de la lame, également hydrophobe [98]. Au bilan, il semble que CD1d fixe les lipides avec une affinité faible à modérée (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ), équivalente à la force de liaison entre toutes les protéines dont le rôle est de lier des lipides et ces derniers.

### b) Cristallographie

Les cristallisations récentes de CD1d lié à une molécule d' $\alpha\text{GalCer}$  ou à un phospholipide permettent de mieux comprendre les fondements moléculaires de cette interaction CD1d:lipide. Comme les études fonctionnelles utilisant des variants structuraux de divers ligands glycolipidiques de CD1d le laissaient suspecter, c'est leur moitié lipidique qui se loge dans la cavité de CD1d. Les deux chaînes alkyles du ligand, qui occupent chacune une poche de la cavité, pénètrent d'abord perpendiculairement au plancher  $\beta$  puis s'orientent parallèlement à ce dernier, vers le fond de leur poche respective. Dans la liaison  $\alpha\text{GalCer}$ :CD1d, la phytosphingosine occupe la poche F' tandis que la chaîne acyle s'insère dans la poche A' en s'enroulant autour de l'axe vertical, dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (selon une vue plongeante sur la cavité).

Ainsi, la tête polaire du glyco- ou phospho-lipide est située à la jonction des deux poches et émerge entre les hélices  $\alpha$ , à la surface de la molécule CD1d [42-44]. Les épitopes présentés aux TCR des cellules T CD1d-restreintes sont donc plus compacts que ceux des peptides, étendus tout au long du sillon des molécules du CMH.

### c) Réceptivité de la cavité de CD1d

Etant donné l'absence de polymorphisme de CD1d, il est important d'expliquer comment cette molécule peut lier différents types de lipides. En fait, son site accepteur de ligand fait preuve d'une faible sélectivité de liaison pour les différentes chaînes lipidiques. En particulier, la longueur des chaînes alkyles des GSL n'est pas un critère décisif pour la liaison à CD1d. La troncature progressive des chaînes de l' $\alpha\text{GalCer}$  entraîne une diminution de la stabilité du complexe CD1d:lipide (vitesse de dissociation plus grande) traduisant la perte proportionnelle des interactions hydrophobes et de van der Waals [100, 101]. En effet, à l'intérieur de la cavité, les acides aromatiques Tyr73 (A'), Phe77 et Trp133 (F') établissent de

nombreuses liaisons de van der Waals avec chacune des chaînes lipidiques, ce qui contribue à stabiliser le ligand [42].

La poche A' peut accueillir une chaîne aliphatique comprenant jusqu'à 26 C et la poche F', jusqu'à 18 C, ce qui correspond aux longueurs des chaînes de l' $\alpha$ GalCer. Ceci explique pourquoi l'affinité de liaison entre l' $\alpha$ GalCer et CD1d est la plus forte observée parmi tous les ligands identifiés de CD1d.

Zajonc *et al.* ont déterminé la structure de CD1 en association avec un analogue de l' $\alpha$ GalCer à chaîne acyle raccourcie à 8 C au lieu de 26 dans l' $\alpha$ GalCer. Malgré cette différence, ce variant possède une affinité pour CD1d identique à celle de l' $\alpha$ GalCer. Cette caractéristique est vraisemblablement due à la présence établie, au fond de la poche A', d'une molécule supplémentaire de nature et d'origine encore incertaines mais dont la densité électronique indique qu'elle est longue de 16 C. Cette molécule, ajoutée à la chaîne acyle du variant de l' $\alpha$ GalCer reconstitue une chaîne de longueur voisine de celle de l' $\alpha$ GalCer d'où les affinités identiques. Par conséquent, ce ligand supplémentaire, sans doute hydrophobe, pourrait stabiliser la cavité de CD1d en l'absence d'un ligand comblant l'intégralité de la poche A' tel que l' $\alpha$ GalCer [42].

Au contraire de la longueur, le degré d'insaturation des chaînes lipidiques semble être un paramètre favorisant la présentation antigénique par CD1d puisque l'introduction de doubles liaisons augmente la force de la liaison lipide:CD1d et la reconnaissance par les NKT [83, 102]. La configuration de ces doubles liaisons aussi est importante : seules les phosphatidyléthanamines ayant des doubles liaisons en cis sont antigéniques [83]. Les récentes informations apportées par la cristallographie aux rayons X nous permettent d'avancer quelques paramètres susceptibles de justifier ces observations : ces liaisons insaturées se situent sur les queues lipidiques des Ag, elles pénètrent donc profondément dans la cavité hydrophobe de CD1d où leurs nuages électroniques doivent contribuer à l'établissement de liaisons de van der Waals et donc, à la stabilisation du complexe. De plus, puisque la chaîne lipidique occupant la poche A' s'enroule autour de l'axe vertical, la configuration cis des doubles liaisons concourt certainement à lui donner une courbure idoine.

Par ailleurs, tous les phospholipides antigéniques sont, à 37°C dans un état physique appelé cristal liquide, caractérisé par une relative fluidité. Or, l'état physique d'un lipide dépend directement du degré d'insaturation des résidus d'acides gras et de la configuration des doubles liaisons. En favorisant l'état fluide de cristal liquide par rapport à l'état gelifié plus rigide, les doubles liaisons cis faciliteraient le chargement du lipide dans la cavité de CD1d [83].



Même si, comme nous venons de le voir, une grande partie de l'énergie de liaison entre les lipides et CD1d résulte des interactions de van der Waals entre les queues lipidiques et les acides aminés à l'intérieur de la cavité, la tête polaire aussi interagit avec CD1d au niveau de résidus situés plus en surface. D'ailleurs, les sites des ligands (GSL ou phospholipides) critiques pour la présentation antigénique se situent à proximité de la tête.

Concernant l' $\alpha$ GalCer, ces caractéristiques critiques sont la configuration  $\alpha$  de la liaison O-glycosidique, la présence d'un groupe hydroxyle ( $-OH$ ) sur le carbone 2' du galactose en position équatoriale et sur le C<sub>3</sub> de la phytosphingosine. En effet, le  $\beta$ GalCer en association avec CD1d n'est pas reconnu par les NKT [100, 103]. De même, ni l' $\alpha$ -mannosylcéramide (isomère dont l' $OH$  en 2' est en position axiale) ni la substitution du groupe  $OH$  en 2' du galactose par tout autre groupe ne sont antigéniques. Enfin, la délétion de l'hydroxyle en C<sub>3</sub> de la phytosphingosine se traduit par une nette diminution de la stimulation des NKT [100, 104-106].

Ces caractéristiques structurales résultent chacune de l'engagement de liaisons hydrogène avec des résidus d'acides aminés de CD1d qui stabilisent l'interaction. Les études cristallographiques identifient trois liaisons hydrogène entre l' $\alpha$ GalCer et le CD1d humain : l'hydroxyle en 2' du galactose et l'oxygène de la liaison  $\alpha$ -glycosidique sont stabilisés respectivement par Asp151 et Thr154 situés sur l'hélice  $\alpha$ 2, tandis que l'hydroxyle en C<sub>3</sub> de la phytosphingosine interagit avec Asp80 sur l'hélice  $\alpha$ 1 [43]. La perte de ces liaisons stabilisatrices entre CD1d et les divers variants cités plus haut explique leur déficit d'antigénicité.

La cristallographie suggère aussi que le groupement galactose du  $\beta$ GalCer a une position perpendiculaire par rapport à l'anomère  $\alpha$  ce qui constitue une réorientation susceptible de perturber radicalement la géométrie du complexe CD1d:glycolipide et d'entraîner la perte de la liaison hydrogène du galactose avec Asp151. En revanche, nous avons vu qu'un anomère  $\beta$ , un sulfatidate, le 3'-sulfo- $\beta$ GalCer peut tout de même être reconnu pour les lymphocytes CD1d-restreints, ceci est vraisemblablement expliqué par l'établissement d'une nouvelle liaison stabilisatrice entre l'acide sulfurique et Arg79 [42, 85].

Soulignons la rigoureuse conservation de ces acides aminés engageant ce réseau de liaisons hydrogène avec l'Ag entre les molécules CD1d humaine et murine (Fig.5) [42, 43].

#### d) Changement de conformation induit par le ligand

Comme nous l'allons déjà mentionné, la liaison de l' $\alpha$ GalCer entraîne un changement de position relative des hélices  $\alpha$  qui se rapprochent de telle sorte que la cavité se referme sur le ligand après l'avoir fixé [42] [43]. Un subtil changement de conformation de la Leucine 84 est également observé dans le CD1d murin au moins, à la suite de la liaison de l' $\alpha$ GalCer. La chaîne latérale de cet acide aminé vient se positionner au dessus de la poche F' formant un toit qui recouvre la sphingosine et ferme l'accès au sillon. C'est l'interaction avec le lipide qui provoque la fermeture du sillon [42].

### C. Le TCR des lymphocytes NKT reconnaît l'Ag en association avec CD1d

La structure du complexe CD1d:lipide étant mieux perçue, il reste à savoir comment elle interagit avec le récepteur de cellules NKT. Dans l'attente de la cristallisation d'un complexe trimoléculaire, les expériences de mutagenèse dirigée prouvent que le TCR entre en contact direct à la fois avec la tête polaire de l'Ag et avec le sommet de CD1d. Les contacts identifiés de la chaîne TCR $\beta$  avec des acides aminés situés à l'extrémité C-terminale de l'hélice  $\alpha 1$  sont compatibles avec une orientation du TCR en diagonale par rapport à l'axe longitudinal de CD1d, analogue à celle du TCR des cellules T conventionnelles vis-à-vis du complexe peptide:CMH [107]. Les chaînes TCR $\alpha$  et  $\beta$  surplomberaient respectivement la poche A' et la poche F', les deux boucles hypervariables CDR3 $\alpha$  et  $\beta$  se rejoignant au-dessus du centre du sillon. Vu que la poche A' est fermée par des interactions entre les deux hélices, les boucles CDR1 $\alpha$  et CDR2 $\alpha$  n'ont pas accès à l'Ag et ne « voient » que CD1d ; en revanche, CDR3 $\alpha$  interagit avec la tête polaire de l'Ag i.e. dans le cas de la présentation de l' $\alpha$ GalCer, avec les hydroxyles en 4' et 2' du galactose. De même, la fermeture de F' induite par sa liaison à la sphingosine semble interdire les contacts entre au moins les CDR1 et 2 du TCR $\beta$  et l'Ag [42] [43]. Mais l'exacte topographie des interactions TCR:lipide:CD1d reste encore à préciser, notamment le rôle de la boucle CDR3 $\beta$ .

La forte corrélation observée par les expériences de transfection entre la réactivité à l' $\alpha$ GalCer et l'expression de la chaîne V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 quelque soit la chaîne  $\beta$  utilisée soutient le fait que c'est principalement le TCR $\alpha$  des NKT inv qui reconnaît cet Ag [82, 108].

En revanche, les hybridomes CD1d-restreints invariants (i.e. V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18<sup>+</sup>) font preuve d'une plus grande hétérogénéité de réponse aux Ag du soi [82]. Etant donné qu'il expriment tous la même chaîne  $\alpha$  (V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18) et que leur activation est indépendante de tout signal de costimulation, nous pouvons en déduire que la chaîne TCR $\beta$  participe à la spécificité des lymphocytes NKT inv pour certains Ag. De même, *in vivo* chez la souris, c'est assurément le TCR $\beta$  qui confère à une sous population NKT inv la réactivité au ganglioside GD3 [86].

Toutes les études biophysiques indiquent que le TCR des NKT inv interagit avec le complexe  $\alpha$ GalCer:CD1d selon un mode particulier, distinct de celui des TCR conventionnels avec les peptides présentés par le CMH. D'abord, l'affinité de la liaison est très forte : évaluée par la technique de résonance plasmonique de surface utilisant un flux de TCR solubles sur des CD1d immobilisés chargés de lipides, la constante de dissociation à l'équilibre ( $K_D$ ) est comprise entre 30 et 350 nM [98, 105, 109, 110]. De même, les marquages de clones NKT inv par des polymères CD1d: $\alpha$ GalCer révèlent une forte avidité des complexes ( $K_D$ =1 nM) [109, 110]. Ces constantes traduisent une demi-vie du complexe TCR: $\alpha$ GalCer:CD1d très longue (variant de 85 à 230 s) et une liaison beaucoup plus forte que celle des TCR conventionnels avec l'association CMH:peptide, peut-être nécessaires à l'activation des NKT fréquemment double négatifs CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>. Notons que l'affinité des TCR<sub>inv</sub> est influencée par leur segment V $\beta$ , V $\beta$ 8.2 conférant une plus forte affinité que V $\beta$ 7 [111].

En outre, la thermodynamique suggère un mode de reconnaissance de type clé-serrure : en effet, l'interaction du TCR des NKT avec les Ag glycolipidiques présentés par CD1d est indépendante de la température ce qui est en faveur d'un mécanisme rigide, ne nécessitant pas d'accommodation de la part du TCR des NKT, contrairement à ce qui est observé avec les TCR conventionnels restreints par le CMH [98, 105].

Quoiqu'il en soit, ce mode de reconnaissance est remarquablement conservé chez les Mammifères. La molécule CD1d murine peut en effet présenter l' $\alpha$ GalCer aux lymphocytes NKT inv humains et réciproquement, le CD1d humain aux NKT inv de la souris [112].

Pour autant, les études de mutagenèse dirigée ciblée sur des résidus situés à l'intérieur de la cavité de liaison à l'Ag, confirmées par la cristallographie aux rayons X, ont écarté l'hypothèse selon laquelle l' $\alpha$ GalCer se comporterait comme un superantigène en activant les NKT inv indépendamment du lipide présenté par CD1d [107].

## **D. Les ligands des TCR sont générés dans des vésicules intracellulaires acidifiées**

### **1. Assemblage des molécules CD1d**

Les chaînes CD1 nouvellement synthétisées possèdent un peptide signal dirigeant leur insertion dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) de telle sorte que les domaines  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  se trouvent dans la lumière. Là, cette chaîne lourde encore partiellement repliée s'associe à deux protéines chaperonnes, la calnexine et la calréticuline qui recrutent la thiol oxydoréductase ERp57. Ce complexe permet le repliement complet de la structure tertiaire de CD1d grâce à la formation de ponts disulfures intrachaînes. C'est seulement alors que la liaison à la  $\beta 2m$  a lieu (Fig.6) [113].

Dans le RE, le site de liaison à l'Ag de CD1d se lie également à des phosphatidylinositols glycosylés. Ces lipides du soi non antigéniques semblent jouer un rôle de chaperon, analogue à celui de la chaîne invariante Ii vis-à-vis des molécules du CMH de classe II, en bloquant le sillon de CD1d jusqu'à la rencontre de lipides plus antigéniques [79, 80]. On ne sait pas précisément comment au niveau du RE, ces phospholipides sont chargés dans le site de liaison à l'Ag de CD1d mais la MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*), une protéine également impliquée dans l'insertion de l'apoprotéine B dans les lipoprotéines de très basse densité, participe à cette étape, au moins dans les hépatocytes et les entérocytes [114].

### **2. Localisation et itinéraire intracellulaires**

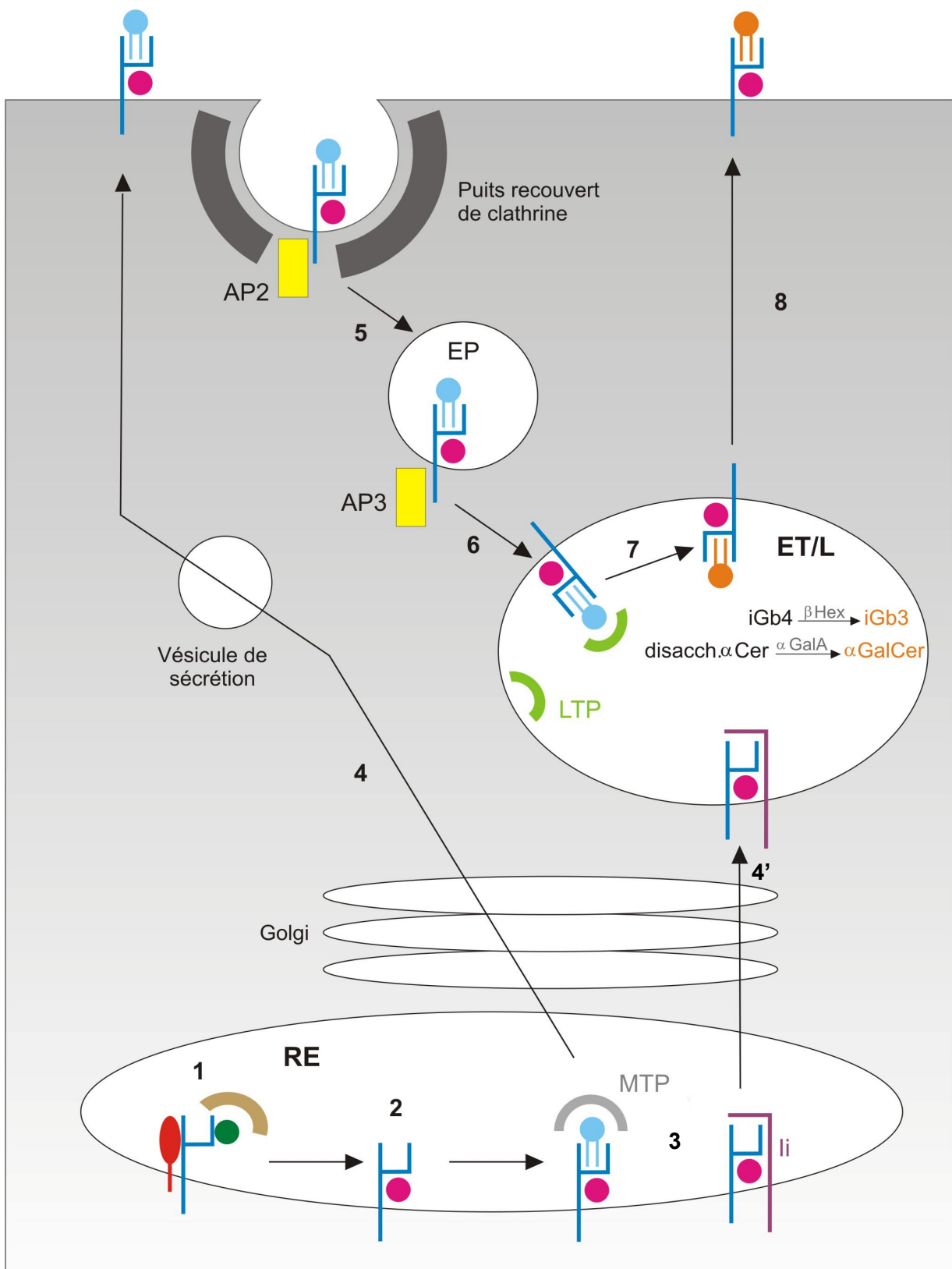
Les connaissances relatives aux voies intracellulaires suivies par CD1d et à l'apprêtement des Ag lipidiques découlent essentiellement d'études chez la souris. Ainsi, nous nous concentrerons sur les phénomènes intracellulaires chez cet animal et mentionnerons les différences observées dans l'espèce humaine.

Les marquages intracellulaires des cellules murines exprimant CD1d révèlent une large distribution cytoplasmique de cette molécule. Outre le RE, lieu de sa biosynthèse, et sur la membrane plasmique, CD1d est répartie dans tout le compartiment endosomal : en effet, on observe une co-localisation de CD1d tant avec LAMP-1 (*lysosomal associated- membrane protein-1*, CD107a), marqueur des endosomes tardifs et des lysosomes qu'avec le récepteur de la transferrine, marqueur des endosomes précoces et de recyclage. En revanche, seule une petite proportion des molécules CD1d humaines atteint le stade des lysosomes, la majorité restant localisée dans les endosomes [115-117].

A partir du RE, les molécules CD1d peuvent emprunter deux voies distinctes aboutissant chacune à leur accumulation dans les endosomes tardifs. La plupart accèdent d'abord à la surface cellulaire avant d'être réinternalisées dans la voie endosomale. Une population plus réduite de protéines CD1d suit une autre voie en se liant dans le RE à la chaîne invariante Ii qui les dirigent directement (i.e. sans passage par la membrane plasmique) vers les endosomes (Fig. 6) [115, 116].

Les protéines CD1d qui suivent la voie principale sont rapidement exprimées à la surface cellulaire, en pratique, une heure après l'acquisition de la résistance au clivage par l'endoglycosidase H, ce qui prouve qu'elles ont été glycosylées dans l'appareil de Golgi et qu'elles accèdent immédiatement à la membrane plasmique. Au cours de l'heure suivante, la moitié du pool CD1d est endocytée et subit plusieurs cycles d'internalisation-réexpression entre les endosomes de recyclage et la membrane plasmique [115]. L'internalisation et l'aiguillage vers les endosomes de CD1d est sous le contrôle des protéines de la famille des adaptines (AP, *adaptor protein complex*) du manteau de clathrine, exprimée à la face cytoplasmique des membranes cellulaires. La queue du CD1d murin possède en effet une séquence YQDI dans laquelle on reconnaît le « motif tyrosine » YXXΦ (où X est un acide aminé quelconque et Φ un gros acide aminé hydrophobe) capable de se lier aux adaptines. Ce motif tyrosine interagit avec AP-2 connue pour son implication dans l'internalisation des protéines à partir de la membrane plasmique [118] puis avec AP-3 qui dirige CD1d vers les endosomes tardifs et les lysosomes [119, 120].

Cette voie principale est dite intrinsèque car c'est un motif propre à CD1d qui lui permet d'accéder au compartiment endosomal. L'autre itinéraire est dit extrinsèque car c'est par le biais de sa liaison à la chaîne invariante Ii chez la souris (aux complexes Ii:CMH II chez l'homme) que CD1d atteint les endosomes tardifs et les lysosomes dans les cellules qui expriment ces molécules, à savoir les CPA professionnelles [115, 116]. Ii possède un motif IL (i.e. un motif di-Leucine modifié) qui lui permet de diriger CD1d comme les molécules du CMH de classe II vers les vésicules endosomales.



**Figure 6 : Voies intracellulaires de présentation antigénique par CD1d chez la souris**

La chaîne lourde de CD1d (bleu) est synthétisée dans le RE puis repliée grâce aux interactions avec la calnexine (rouge), la calréticuline (vert) et ERp57 (brun) ce qui permet (2) la liaison à la  $\beta$ 2-m (rose). (3) Le sillon de CD1d est alors bloqué par la chaîne invariante li (violet) ou par un phospholipide endogène (bleu ciel) chargé par MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*) (gris). Selon la voie intrinsèque, CD1d est rapidement exprimé à la surface cellulaire (4) via la voie de sécrétion puis internalisé (5) dans les endosomes précoces (EP) grâce à son interaction avec AP-2 et enfin dans les lysosomes (L) grâce à AP-3 (6). Alternativement (4'), CD1d peut être dirigé directement vers les lysosomes (L) par li. Dans les L (7), CD1d est chargé d'un lipide antigénique (orange) endogène (tel que l'iGb3) ou étranger (tel certains  $\alpha$ -glycosyl céramides) par les LTP (*lipid-transfer proteins*) dont les saposines. (8) Les complexes CD1d:lipide antigénique sont transportés à la surface cellulaire où ils sont reconnus par les lymphocytes CD1d-restreints.

Dans les cellules humaines, CD1d est internalisé à partir de la membrane plasmique dans les endosomes précoces grâce à un motif di-Leucine modifié (VL) qui interagit vraisemblablement avec AP-2. En revanche, à la différence de la molécule murine, le CD1d humain possède un motif tyrosine incomplet (YQGVL) qui ne lui permet pas de se lier à AP-3 pour suivre la voie intrinsèque jusqu'aux lysosomes ; la petite proportion de molécules CD1d qui accèdent aux lysosomes y est conduite par li directement à partir du RE (Tableau 4) [116, 121].

CD1d	Queue cytoplasmique YxxΦ	Liaison à AP-2	Liaison à AP-3	Distribution cellulaire
Homme	KRQTSY <u>QGV</u> L	supposée	non	MP+ E++/L+
Souris CD1d1	RRRSAY <b>QDI</b> R	Oui	oui	MP+ E+/L++
Rat	KRRRS <b>YQDI</b> M			
Lapin	I <b>YPVL</b> G			
Mouton	RKHRR <b>YQDI</b> S			

**Tableau 4 : La queue cytoplasmique de CD1d contrôle sa distribution intracellulaire**

La molécule murine possède un motif Tyrosine YxxΦ (où x est un acide aminé quelconque et Φ un volumineux acide aminé hydrophobe) qui lui permet d'interagir avec AP-2 (pour être internalisée à partir de la membrane plasmique dans les endosomes précoces) puis avec AP-3 (pour atteindre les lysosomes). Le CD1d humain dispose d'un motif di-leucine modifié (souligné), supposé interagir avec AP-2 et d'un motif Tyrosine incomplet qui ne peut se lier à AP-3. Voir texte pour les références.

A notre connaissance, aucune étude intracellulaire n'a été réalisée dans les espèces autres que l'homme et la souris mais la conservation d'un motif Tyrosine YxxΦ complet (gras) chez la souris, le rat, le lapin et le mouton nous permet de supposer que les molécules CD1d ont des distributions intracellulaires similaires dans ces espèces.

MP : membrane plasmique, E : endosomes, L : lysosomes

Notons que les souris déficientes en AP-3 ou dont la queue cytoplasmique de CD1d a été délétée présentent, en plus d'une localisation intracellulaire de CD1d remaniée (CD1d n'atteignant que partiellement les lysosomes du fait de l'invalidation de la voie intrinsèque), une réduction du nombre de lymphocytes NKT inv (Tableau 5). Ceci suggère que la localisation de CD1d dans les lysosomes est nécessaire pour la présentation d'un ligand impliqué dans la sélection positive des NKT inv [119, 120, 122].

Souris mutantes	Effet par rapport aux souris sauvages sur :			Réf.
	la distribution intracellulaire de CD1d	la présentation antigénique/ réactivité des NKT inv	le développement des NKT inv V $\alpha$ 14 <sup>+</sup>	
CD1d à queue cytoplasmique déletée	MP : ↗ endosomes : ↘	$\alpha$ GalCer : ↘ disacch. $\alpha$ Cer : ↘ Ag du soi : ↘	Réduction de 75 à 90%	[122, 123]
Mutants de AP-3 (lignées <i>pearl</i> et <i>mocha</i> )	MP : ↗ endosomes : ↘	disacch. $\alpha$ Cer : ↘	Réduction de 30 à 80%	[119, 120]
li <sup>-/-</sup>	MP : ↗ (LyB, DC uniquement)	Ag du soi : ↘	Normal	[115, 119]
MTP <sup>-/-</sup>	RE : ↗ MP : ↘	$\alpha$ GalCer : ↘ Ag du soi : ↘		[114]
$\alpha$ -GalactosidaseA <sup>-/-</sup>		disacch. $\alpha$ Cer : ↘	Réduction de 50%	[123]
$\beta$ -Hexosaminidase <sup>-/-</sup>		Ag du soi : ↘	Absence	[84]
CathepsineL <sup>-/-</sup>	Normale	Ag du soi : ↘	Absence	[124]
Prosaposine <sup>-/-</sup>	Normale	Ag du soi : ↘ disacch. $\alpha$ Cer : ↘	Absence	[125]
ApoE <sup>-/-</sup> ou LDL-R <sup>-/-</sup>		disacch. $\alpha$ Cer : ↘	Normal	[126]

**Tableau 5 : Molécules impliquées dans l'apprêtement et la présentation des Ag glycolipidiques par CD1d chez la souris et conséquences de leurs mutations.**

↗ signifie que l'expression de CD1d ou la réactivité des NKT inv à l'Ag est augmentée

↘ : diminuée

MP : membrane plasmique, RE : réticulum endoplasmique, ND : non déterminé

Disacch. $\alpha$ Cer : disaccharide $\alpha$ Céramides étrangers tels que Gal( $\alpha$ 1,2)Gal( $\alpha$ 1,1)Cer ou Gal( $\beta$ 1,3)Gal( $\alpha$ 1,1)Cer nécessitant un apprêtement dans les lysosomes afin de générer un molécule antigénique.

ApoE : Apoprotéine E et son principal récepteur, LDL-R (*Low Density Lipoprotein-Receptor*).

### 3. Prise en charge et apprêtement des Ag glycolipides par les CPA

Des expériences classiques de fixation des CPA avant ou après leur exposition à des lipides ont montré que certains glycolipides doivent, comme les protéines, être apprêtés dans les cellules présentatrices pour pouvoir être reconnus à la surface cellulaire par les lymphocytes T CD1d-restreints.

L'activité des enzymes impliquées dans la génération des Ag présentés par CD1d est sous la dépendance de l'acidification progressive dans les vésicules endosomales, ce qui explique l'importance de la localisation de CD1d dans les lysosomes pour la présentation de certains Ag glycolipidiques.

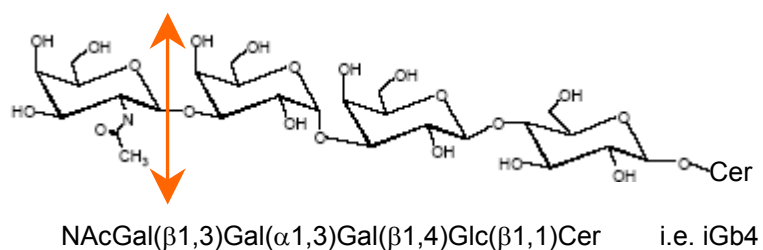
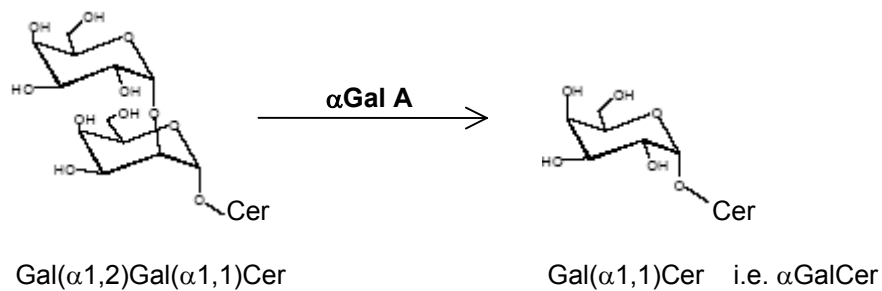


Les GSL synthétiques ou bactériens sur lesquels sont fixés plusieurs oses ne deviennent antigéniques qu'à la condition que ces oses soient clivés pour ne laisser qu'une tête monosaccharidique [123, 127]. Les enzymes responsables de ce clivage telles que l' $\alpha$ -galactosidase A qui dégrade le Gal( $\alpha$ 1,2)Gal( $\alpha$ 1,1)Cer en  $\alpha$ GalCer, sont actives dans les lysosomes (Fig.7) [123].

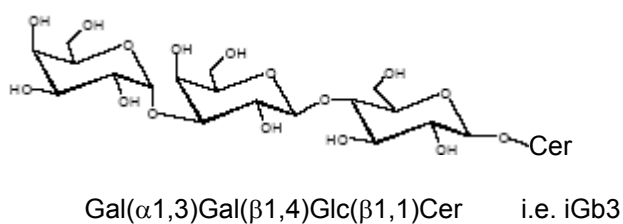
L'apprêtement de l'iGb4 en iGb3 par la  $\beta$ -hexosaminidase, une hydrolase lysosomale est indispensable à l'activation des hybridomes NKT inv autoréactifs par cette série de lipides endogènes présentés par les CPA ou les thymocytes CD1d<sup>+</sup>. De plus, les souris dont le gène de la  $\beta$ -hexosaminidase a été invalidé ne développent pas de NKT inv. Il apparaît donc que l'iGb3 est un Ag du soi nécessaire à la sélection positive des NKT inv dans le thymus (Fig.7) [84].

De façon similaire, les souris déficientes en cathepsine L, une cystéine protéase lysosomale participant au clivage de la chaîne invariante Ii liée aux molécules de classe II du CMH dans le thymus ne développent pas de NKT inv. *In vitro*, les thymocytes de ces souris n'activent pas les hybridomes NKT inv autoréactifs. Cet effet est limité aux thymocytes car les cellules dendritiques et les lymphocytes B cathepsine L<sup>-/-</sup> stimulent normalement les NKT. La cathepsine L est donc, elle aussi impliquée dans la présentation CD1d-restreinte d'auto-Ag participant à la sélection positive des NKT inv. Cependant, le substrat de cette protéase n'a pas été précisément identifié ; la cathepsine L pourrait directement générer un ligand de CD1d par clivage d'une lipoprotéine ou d'une glycoprotéine, ou réguler l'activité d'une autre enzyme lysosomale [124].

Les queues lipidiques des glycolipides sont aussi la cible d'un apprêtement. En effet, l'antigénicité des phospholipides cellulaires avec plus de deux chaînes acyles comme la cardiolipine (qui en contient 4) augmente après déacylation par la phospholipase A2 lysosomale [92].



$\beta$ -Hex



**Figure 7 : Exemples d'apprêtement de la partie glycosidique des glycosphingolipides par les hydrolases lysosomiales.**

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

La  $\beta$ -Hexosaminidase ( $\beta$ -Hex) clive spécifiquement les résidus N-acétylgalactosamine (NAcGal) en liaison  $\beta$  de divers glycosphingolipides. Parmi ses produits, seul l'isoglobotrihexosylcéramide (iGb3) est antigénique.

Avant d'être apprêtés et présentés, les lipides antigéniques doivent être internalisés par les CPA. Vu qu'ils sont rarement libres dans l'organisme, les mécanismes d'infection des cellules par les bactéries sont importants pour la prise en charge des lipides étrangers. Les mycobactéries utilisent la lectine DC-SIGN (CD209) pour pénétrer dans les cellules dendritiques humaines et le récepteur du mannose (CD206) pour entrer dans les macrophages [128]. Très récemment, une voie exogène de présentation des lipides microbiens a été décrite. Des complexes formés de lipides exogènes et d'apoprotéine E (ApoE) sécrétée par diverses CPA sont endocytés par les cellules dendritiques. Cette endocytose médiée par les récepteurs de l'ApoE permet la concentration des lipides dans les endosomes où ils sont apprêtés et croisent la voie intracellulaire empruntée par CD1d. *In vivo*, cela a lieu au site infectieux soit par endocytose de complexes sécrétés par les cellules infectées, soit par sécrétion par les cellules dendritiques d'ApoE qui capte les lipides microbiens dans le milieu extracellulaire puis endocytose de ces complexes ou dans les organes lymphoïdes, par endocytose de complexes VLDL-ApoE-lipides microbiens issus de la circulation [126].

Pour les lipides endogènes, un mécanisme de présentation croisée a été décelé chez des souris immunisées par des cellules de mélanomes exprimant le ganglioside GD3. Ces cellules étant CD1d<sup>-</sup>, un mécanisme inconnu permet aux CPA la prise en charge *in vivo* du GD3 afin de le présenter en association avec CD1d et d'ainsi, initier la réponse immunitaire [86].

#### 4. Chargement des Ag lipidiques dans le sillon de CD1d

Une dernière étape intracellulaire nécessaire à l'immunogénicité des lipides est leur chargement dans le sillon de liaison à l'Ag de CD1d ; concomitamment, celui-ci doit être libéré des lipides chaperons qui l'occupent et le bloquent depuis le RE. Cette étape est catalysée par les LTP (*lipid-transfer proteins*). Ces protéines captent des lipides spécifiques et facilitent ainsi leur solubilisation et leur transport dans les espaces intracellulaires aqueux. Parmi les LTP, les saposines sont une famille de quatre protéines générées dans les endosomes par protéolyse d'un précurseur commun, la prosaposine. Elles se lient de la tête hydrophile des lipides, qu'elles sont capables d'extraire de la membrane endosomale ou des microorganismes endocytés pour les exposer à l'action des hydrolases hydrosolubles. Outre cette facilitation de l'apprêtement, notamment démontrée pour les disaccharide- $\alpha$ Céramides étrangers, les saposines coopèrent *in vitro*, avec G<sub>M2</sub>A (*G<sub>M2</sub> ganglioside activator protein*), une autre LTP endosomale afin d'échanger les lipides liés à CD1d. G<sub>M2</sub>A extrait les lipides du sillon de CD1d qui est alors libre pour le chargement d'autres lipides, étrangers ou endogènes, par les

saposines (Fig.6) [81, 125]. En accord avec ce modèle, les CPA issues de souris prosaposine *knock-out* ont une présentation altérée des lipides antigéniques. De plus, chez ces animaux, on ne détecte pas de NKT inv ce qui indique une implication des saposines dans la génération d'un ligand de CD1d responsable de la sélection positive de ces cellules (Tableau 5) [125].

La MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*), déjà évoquée pour son action sur le chargement des phospholipides dans CD1d dès le RE, appartient aussi à la famille des LTP.

## IV. IMPLICATIONS IMMUNOLOGIQUES ET PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA VOIE DE PRESENTATION ANTIGENIQUE CD1d

### A. Biologie des lymphocytes T CD1d-restreints

#### 1. Développement intrathymique

Faute de marqueurs spécifiques permettant d'isoler des lymphocytes T CD1d-restreints diversifiés, les études de développement portent essentiellement sur les lymphocytes NKT inv.

L'utilisation des tétramères CD1d:αGalCer a montré que la différenciation des précurseurs hématopoïétiques en NKT inv a lieu dans le thymus. Les souris *Nude* ou thymectomisées à la naissance ont un net déficit en lymphocytes NKT inv et ces cellules peuvent aussi se différencier dans les cultures *in vitro* de thymus fœtaux [129-131].

Les précurseurs des NKT inv sont issus des thymocytes conventionnels et suivent un développement commun avec eux au moins jusqu'au stade DP (CD4+, CD8+). En effet, les NKT matures se développent suite à l'injection intrathymique de thymocytes DP ce qui démontre que leurs précurseurs appartiennent bien à cette population [129]. De plus, le réarrangement du TCR des NKT inv comme celui des lymphocytes T conventionnels se fait au hasard ce qui est mis en évidence par un second locus TCRA réarrangé au hasard.

Alors que les lymphocytes T conventionnels sont soumis à une sélection positive permettant la survie de ceux dont le TCR interagit avec les molécules du CMH de l'épithélium thymique, la sélection positive des NKT inv requiert la présentation de glycolipides du soi par les thymocytes corticaux DP exprimant CD1d [132]. Cette sélection a elle-même lieu à un stade DP [133]. L'absence de précurseurs des NKT inv dans le thymus des souris déficientes en β-hexosaminidase suggère que l'iGb3 est le principal de ces glycolipides impliqués dans le développement des NKT inv [84] (Fig.8). Le rôle de CD1d est confirmé par l'absence de tout lymphocyte T CD1d-restreints chez les souris CD1d<sup>-/-</sup> [134]. Le rôle de CD4 et CD8 dans cette sélection positive n'est pas connu mais les thymocytes DP délivrent probablement des signaux nécessaires à la bifurcation vers la lignée NKT inv.

L'addition d'αGalCer dans les cultures de thymus fœtaux inhibe la différenciation des NKT inv de façon dose-dépendante [135, 136]. De plus, la surexpression de CD1d par les cellules dendritiques de souris transgéniques entraîne une diminution du nombre de NKT inv et les lymphocytes résiduels ont un répertoire Vβ altéré et une sensibilité réduite à l'Ag [136]. Ainsi, les lymphocytes NKT inv subissent une sélection négative quand ils engagent dans le

thymus un Ag de forte avidité (I $\alpha$ GalCer) ou un Ag du soi en grande quantité, présentés par les cellules dendritiques.

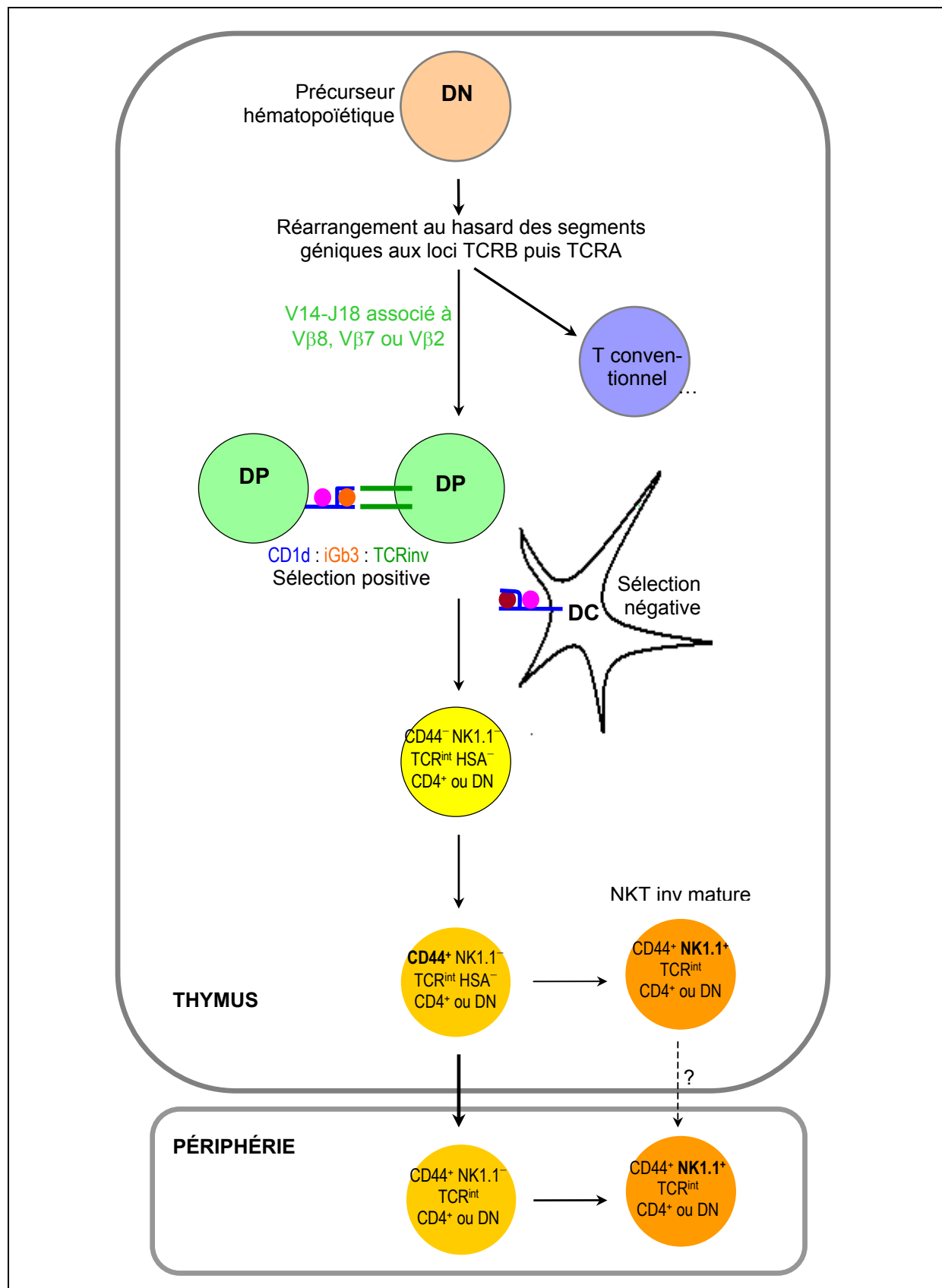
La différenciation intrathymique s'accompagne de modifications phénotypiques définissant des stades successifs (Fig.8).

Les thymocytes NKT inv les plus précoces détectés par les tétramères CD1d: $\alpha$ GalCer (i.e. TCRinv<sup>+</sup>) sont CD44<sup>-</sup>, NK1.1<sup>-</sup> et ont déjà réprimé l'expression de HSA (*heat stable antigen*) ; or, sur les thymocytes conventionnels, la diminution de HSA coïncide avec la perte de susceptibilité à la sélection négative, il semble donc que les étapes de sélection des NKT inv soient des phases assez brèves, synchrones de l'expression du TCR. Les thymocytes NKT inv CD44<sup>-</sup>, NK1.1<sup>-</sup> prolifèrent et sont détectés au 5<sup>e</sup> jour après la naissance [130, 131].

Un deuxième stade est marqué par l'acquisition de CD44 et reflète un changement dans la réponse à la stimulation antigénique. Jusqu'à présent, les thymocytes produisaient essentiellement de l'IL4, désormais ils sécrètent aussi de l'IFN- $\gamma$  [130, 131]. Ainsi, au contraire des thymocytes conventionnels, les NKT inv sont immunocompétents dans le thymus.

Enfin, les expressions concomitantes de NK1.1, d'autres récepteurs NK (dont les récepteurs activateur Ly49D et inhibiteur Ly49A) et de CD122 (IL2/15R $\beta$ ) sont accompagnées de l'arrêt de la prolifération et marquent la maturité des NKT inv. Cependant, la majorité des NKT inv quittent le thymus au stade NK1.1<sup>-</sup> ce qui implique pour ces cellules, une phase tardive de maturation en périphérie [130, 131].

Plusieurs mutations invalidant des voies de signalisation intracellulaire affectent spécifiquement le développement intrathymique des lymphocytes NKT inv. Ainsi, les tyrosine-kinases Fyn et Itk et les facteurs de transcription AP-1 (*Activator protein 1*), de la famille NF $\kappa$ B (dont p50 et RelB) et T-bet (*T-box expressed in T cells*) permettent leur progression d'un stade à l'autre ou leur survie [137-139]. Implicitement, toute la machinerie intracellulaire permettant la présentation lipidique par CD1d est aussi requise.



**Figure 8 : Différenciation des lymphocytes CD1d-restreints NKT invariants**

Dans le thymus, un précurseur issu de la moelle osseuse réarrange et exprime un TCRα invariant associé à un TCRβ Vβ8, 7 ou 2 au stade DP. Il est alors sélectionné positivement par un thymocyte cortical DP CD1d<sup>+</sup> qui lui présente un glycolipide du soi (tel que l'αGalCer) et négativement par une cellule dendritique (DC) de la jonction corticomédullaire. Les thymocytes qui survivent se différencient en CD4<sup>+</sup> ou DN. Les tétramères CD1d:αGalCer permettent de les détecter au stade CD44<sup>+</sup> NK1.1<sup>-</sup> HSA<sup>-</sup> (jaune paille). Ils acquièrent d'abord CD44 puis NK1.1, considéré comme un marqueur de maturité même si la majorité quitte le thymus et migrent vers la rate ou le foie au stade NK1.1<sup>-</sup>.

DP : double positif (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>), DN : double négatif, int : niveau d'expression intermédiaire.

Au cours de l'ontogénie de l'animal, les lymphocytes T CD1d-restreints commencent à être détectés dans le thymus au 5<sup>e</sup> jour après la naissance, puis au 8<sup>e</sup> jour dans la rate et le foie, où leurs nombres et proportions atteignent un plateau entre la 4<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> semaine [131].

## 2. Localisation tissulaire et fréquence

Chez la souris, dans les conditions physiologiques, les NKT inv détectés par tétramères CD1d:αGalCer, représentent 0,5 à 1% des lymphocytes T dans le thymus, 1 à 2% dans la rate, 0,5% dans les nœuds lymphatiques, 35% dans le foie, 0,5% dans la moëlle osseuse et 1% des lymphocytes intraépithéliaux [68]. Cette répartition est à peu près la même que celle retrouvée chez l'homme, dans des proportions semblables, à l'exception du foie où les NKT inv sont moins fréquents que chez la souris [64]. Du fait de l'absence de marqueur spécifique permettant d'identifier les lymphocytes T CD1d-restreints diversifiés, leur fréquence demeure mal connue.

La localisation des lymphocytes CD1d-restreints est contrôlée par l'expression de récepteurs de chimiokines et de domiciliation plus généralement associés à un profil de migration vers les tissus non lymphoïdes ou vers les sites inflammatoires. Ainsi, chez l'homme, la plupart des NKT inv sont CXCR3<sup>+</sup>, CXCR4<sup>+</sup>, CXCR6<sup>+</sup>, CCR2<sup>+</sup>, CCR5<sup>+</sup>, CCR6<sup>+</sup> et peu expriment CD62L, CCR7 ou CXCR5 (i.e. les récepteurs permettant le recrutement des lymphocytes dans les zones T et B des organes lymphoïdes via les veinules post-capillaires à endothélium épais) [140, 141]. Des fractions importantes de NKT inv sont aussi CLA<sup>+</sup> (*Cutaneous Lymphocyte Antigen*, adressine associé au homing cutané) ou α<sub>4</sub>β<sub>7</sub><sup>+</sup> (intégrine associée à l'adressage vers l'intestin grêle) [64, 140].

## 3. Homéostasie

Comme pour les lymphocytes T conventionnels mémoire et en accord avec leur phénotype mémoire, la survie des NKT inv en périphérie est indépendante des signaux délivrés par l'interaction TCR:molécule présentatrice d'Ag (CMH ou CD1d). L'IL-15 est nécessaire à l'homéostasie des NKT inv périphériques qui entrent vraisemblablement en compétition avec les cellules NK et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoire pour cette cytokine [142, 143].



Même si les NKT inv expriment un répertoire V $\beta$  très réduit, la diversité des boucles CDR3 $\beta$  est considérable. Si on considère un clone comme étant un groupe de cellules possédant la même chaîne  $\beta$  (donc le même TCR, puisque la chaîne  $\alpha$  est invariante), il existe donc un grand nombre de clones NKT inv mais, chez la souris, chacun de ces clones contient seulement 5 à 10 cellules [144].

#### 4. Activation et fonctions effectrices

##### a) Mécanismes d'activation

L'activation antigénique des lymphocytes T CD1d-restreints et ses conséquences ont été essentiellement étudiées suite à la présentation d' $\alpha$ GalCer par les cellules présentatrices d'Ag (CPA) et sont actuellement un sujet de nombreuses controverses. Les études les plus récentes s'accordent pour démontrer que la production de cytokines par les NKT inv après stimulation antigénique est indépendante des signaux de costimulation délivrés par CD28 et CD40L, requis par les lymphocytes T naïfs [145, 146]. Cette indépendance est en accord avec le phénotype activé des NKT inv. Cependant, d'autres équipes privilégient un mécanisme plus classique selon lequel la reconnaissance par le TCR du complexe CD1d: $\alpha$ GalCer et la liaison des molécules de la famille CD28 (CD28 et ICOS) (sur les NKT inv) aux molécules B7 (sur les CPA) induisent l'expression de CD40L sur les lymphocytes et leur production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 [147-149]. Quoiqu'il en soit, les NKT inv périphérique sont rapidement activés *in vivo* après injection intraveineuse ou intrapéritonéale d' $\alpha$ GalCer.

Les NKT inv expriment constitutivement le récepteur à l'IL-12 (IL-12R) et cette expression augmente de manière dépendante de l'IL-12 et de l'IFN- $\gamma$  [150]. L'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  présents dans le milieu, bien que non nécessaires à la production initiale de cytokines par les lymphocytes T CD1d-restreints peuvent l'amplifier [150, 151].

Les radeaux lipidiques sont des régions spécialisées de la membrane plasmique, riches en cholestérols et en glycosphingolipides, dans lesquelles se concentrent les molécules de costimulation et présentatrices d'Ag, y compris CD1d. La localisation de CD1d dans ces radeaux facilite la présentation de faibles concentrations d' $\alpha$ GalCer aux NKT inv [152].

## b) Production de cytokines

Les lymphocytes T CD1d-restreints (humains et murins) se distinguent par leur capacité à sécréter, dans les minutes suivant l'activation antigénique initiale et sans expansion préalable, de grandes quantités d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 mais aussi d'IL-2, TNF $\alpha$ , IL-5, IL-10, IL-13, GM-CSF et TGF- $\beta$  [64] (Fig.9). Les NKT inv expriment constitutivement les ARNm de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-4 ce qui rend compte de la sécrétion rapide lors de la stimulation [145, 153]. Cependant, comment les NKT inv exercent-ils une activité immunologique intégrée en libérant à la fois des cytokines de type 1 (telles que l'IFN- $\gamma$ , l'IL-2, le TNF $\alpha$ ) et de type 2 (telles que les IL-4, 5 et 13) qui peuvent avoir des effets antagonistes?

Le profil de cytokines synthétisées est déterminé par la qualité du signal délivré par le TCR aux NKT inv. Par analogie avec les réponses des lymphocytes T conventionnels aux peptides agonistes partiels, une corrélation entre la longueur des chaînes lipidiques de l'Ag et le profil cytokinique sécrété a été mise en évidence suite à la synthèse d'analogues de l' $\alpha$ GalCer aux queues lipidiques tronquées [102, 154]. Ainsi, l'analogue connu sous le nom d'OCH, dont la base phytosphingosine est en C9 (vs C18 pour l' $\alpha$ GalCer) induit, *in vivo* chez la souris, un biais Th2 de la réponse des NKT inv du fait d'un complexe OCH:CD1d moins stable et donc d'un signal médié par le TCR de plus courte durée [101, 104]. De même, le variant à chaîne acyle tronquée et insaturée en C20:2 (vs C26:0 pour l' $\alpha$ GalCer) est un agoniste des NKT inv aussi puissant que l' $\alpha$ GalCer pour la synthèse d'IL-4 mais n'induit pas la production d'IFN- $\gamma$  d'où un biais Th2 [102]. La synthèse *de novo* d'IL-4 requiert un niveau d'activation inférieur à celui nécessaire à l'induction d'IFN- $\gamma$  [101].

L' $\alpha$ -C-GalCer est un autre dérivé de l' $\alpha$ GalCer avec une liaison C-glycosidique (vs O-glycosidique pour l' $\alpha$ GalCer) ; *in vivo*, ce ligand de CD1d induit une réponse Th1 et un ratio IFN- $\gamma$ /IL-4 augmenté par rapport à l' $\alpha$ GalCer [155]. L' $\alpha$ -C-GalCer, résistant à la déglycosylation est à ce titre supposé former un complexe plus stable avec CD1d et interagir plus longtemps avec le TCR.

Le contexte de présentation de l'Ag et en particulier, le type de CPA sont aussi capables d'influencer la réponse des lymphocytes CD1d-restreints. Des expériences de déplétion *in vivo* ont montré que, parmi les nombreuses cellules CD1d<sup>+</sup>, ce sont essentiellement les cellules dendritiques qui activent les NKT inv dans la rate et les cellules de Küpffer dans le foie [156]. Par ailleurs, chez la souris, le transfert adoptif de cellules dendritiques chargées d' $\alpha$ GalCer induit une synthèse d'IFN- $\gamma$  prolongée par rapport à

l'injection d' $\alpha$ GalCer soluble [157]. Les lymphocytes B CD1d<sup>+</sup> présentant l' $\alpha$ GalCer stimulent une production d'IL-4 plus faible que les cellules dendritiques et inhibent l'activation des NKT inv médiée par les cellules dendritiques [158].

D'autres facteurs connus pour polariser la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (tels que la présence d'IL-4 ou d'IL-12 ou la concentration d'Ag) n'influent pas sur le profil cytokinique libéré par les NKT inv [145, 154].

Outre la stimulation via le TCR, l'activité des lymphocytes NKT inv est aussi régulée par les récepteurs codé par le NKC (*Natural Killer Complex*).

#### c) Cytotoxicité et activité microbicide directe

Les lymphocytes T CD1d-restreints activés sont aussi capables de cytotoxicité à l'encontre de cellules infectées ou néoplasiques. Cette cytotoxicité est médiée par la famille des récepteurs de TNF (FasL et TRAIL) ou par l'exocytose de granules contenant la perforine et des granzymes [159-161]. Chez l'homme, ces granules contiennent aussi des peptides antimicrobiens tels que la granulysine [162].

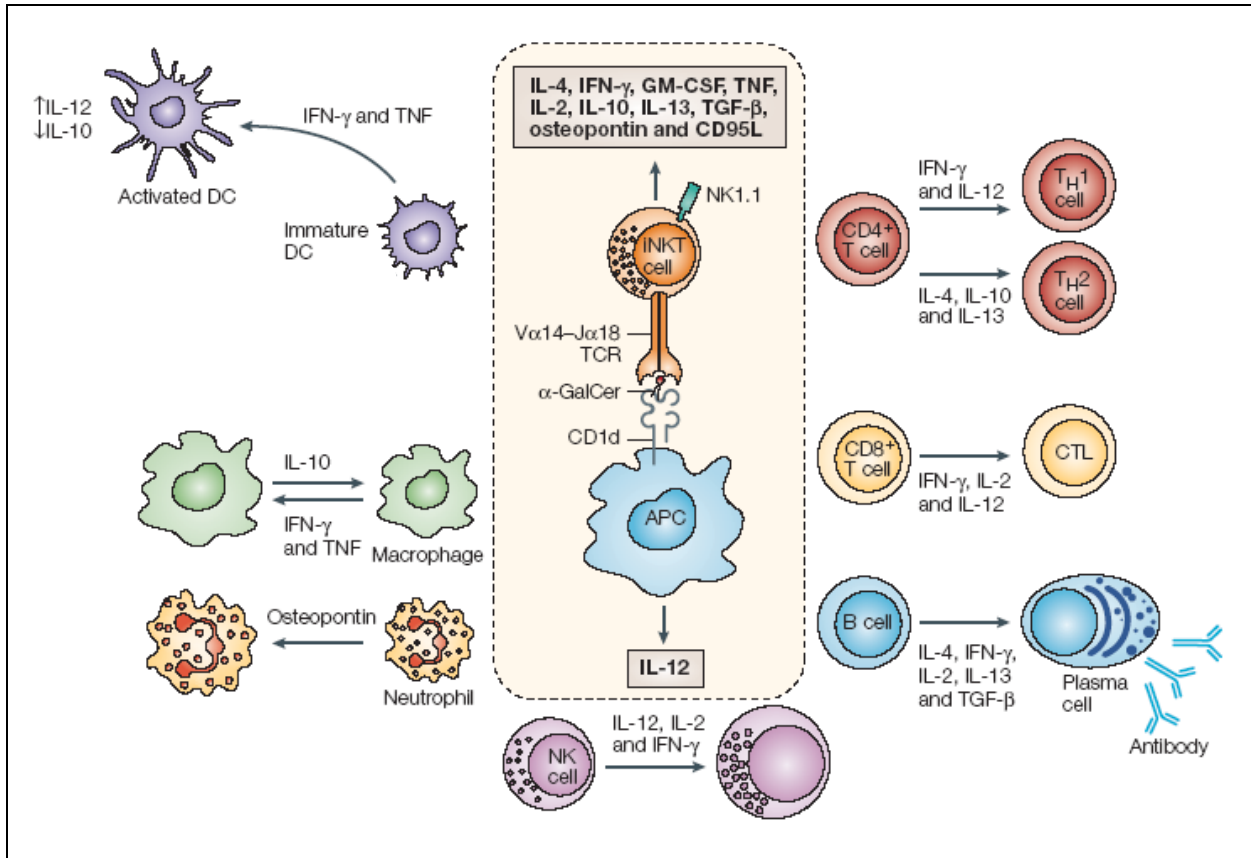
#### d) Activation d'autres types cellulaires par les lymphocytes T CD1d-restreints

Les lymphocytes T CD1d-restreints exercent une activité immunomodulatrice via leur capacité à activer en cascade de nombreux types cellulaires dont les DC, les macrophages, les cellules NK, les lymphocytes T et B et les polynucléaires neutrophiles (Fig.9).

*In vivo*, dans le dialogue entre les NKT inv et les DC, les NKT inv sont activés et augmentent leur niveau d'expression de CD40L. L'interaction CD40L:CD40 sur les DC présentatrice d'Ag, conjuguée à l'IFN- $\gamma$  issu des NKT inv activés induit la maturation des DC et leur sécrétion d'IL-12 [150, 163, 164]. Ceci a d'importantes répercussions sur le développement de l'immunité :

L'IL-12 issue des DC, en synergie avec l'IFN- $\gamma$  libéré par les NKT inv permet l'activation des cellules NK qui deviennent alors la principale source d'IFN- $\gamma$  sérique [165]. L'IL-2 produite par les lymphocytes CD1d-restreints induit directement la cytotoxicité des NK [161].

Ces différentes sources d'IFN- $\gamma$  accroissent rapidement l'activité phagocytaire et bactéricide des macrophages tissulaires [166].



**Figure 9 : Conséquences *in vivo* de l'activation des lymphocytes CD1d-restreints NKT inv par l' $\alpha$ GalCer.** Chez la souris, l'injection IV ou IP d' $\alpha$ GalCer entraîne la présentation restreinte par CD1d de cet Ag glycolipidique par les cellules présentatrices d'Ag (APC) aux lymphocytes NKT inv (iNKT cell). L'activation réciproque et rapide des NKT inv et des APC induit la sécrétion de plusieurs cytokines immunorégulatrices et l'expression de FasL (CD95L) par les NKT inv. Ces cytokines provoquent à leur tour l'activation de nombreuses cellules de l'immunité à la fois innée et adaptative. Reproduit avec l'aimable autorisation du Dr Luc Van Kaer [167].

La maturation des DC suite à la présentation d' $\alpha$ GalCer rend aussi possible l'effet auxiliaire des NKT inv sur le développement de réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dirigées contre des protéines co-administrées avec l' $\alpha$ GalCer. Cette potentialisation requiert la présentation à la fois du peptide par le CMH et de l' $\alpha$ GalCer par CD1d sur la même DC ce qui traduit le conditionnement des DC par les NKT inv (via l'interaction CD40:CD40L) [164, 168, 169].

*In vivo*, les lymphocytes B CD1d<sup>+</sup> présentent des Ag étrangers et endogènes aux NKT inv et sont activés en retour (expression des marqueurs d'activation CD69 et CD86,

prolifération et production d'Ig) [165, 170-172]. Cet effet auxiliaire à l'égard des cellules B est suspecté avoir lieu dans les nœuds lymphatiques pour les rares lymphocytes CD1d-restreints CCR7<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup> y ayant accès ou dans des follicules lymphoïdes ectopiques fréquemment constitués lors d'inflammations chroniques [172].

Enfin, les NKT inv hépatiques synthétisent de l'ostéopontine, une protéine de la matrice extracellulaire ayant des propriétés immunorégulatrices. Lors d'hépatite induite par la concanavaline A chez la souris, l'ostéopontine issue des NKT inv recrute et active les polynucléaires neutrophiles qui participent aux lésions inflammatoires [173].

Au bilan et collectivement, ces interactions cellulaires expliquent les vagues de cytokines détectées dans le sérum des souris après injection d' $\alpha$ GalCer. On observe successivement : un pic d'IL-4, essentiellement produite par les NKT inv, atteint 2 heures après l'injection, puis l'IL-12, issue des diverses CPA, culmine à H6 et enfin, un pic d'IFN- $\gamma$ , surtout issu des cellules NK, culminant à H24 [174].

## B. Place des lymphocytes T CD1d-restreints en pathologie infectieuse

Notons de façon liminaire que la contribution des lymphocytes T CD1d-restreints au système immunitaire est principalement étudiée par l'observation de l'évolution des maladies autoimmunes, inflammatoires, allergiques, des tumeurs ou des infections chez les souris CD1d<sup>-/-</sup> ou Jα18<sup>-/-</sup>. Etant donné que la sélection positive centrale des NKT inv et des lymphocytes T CD1d-restreints à TCR diversifiés nécessite l'expression de CD1d, les animaux CD1d<sup>-/-</sup> sont dépourvus de tous les lymphocytes T CD1d-restreints. En revanche, les souris Jα18<sup>-/-</sup> sont, elles, dépourvues uniquement des NKT inv (qui expriment la chaîne TCR Vα14-Jα18).

Les lymphocytes CD1d-restreints sont impliqués dans les réponses immunitaires dirigées contre les bactéries, les virus, les parasites et les champignons. Ils établissent un pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative et peuvent, selon les cas, faciliter la destruction des micro-organismes ou participer aux effets immunopathogènes.

### 1. Infections bactériennes

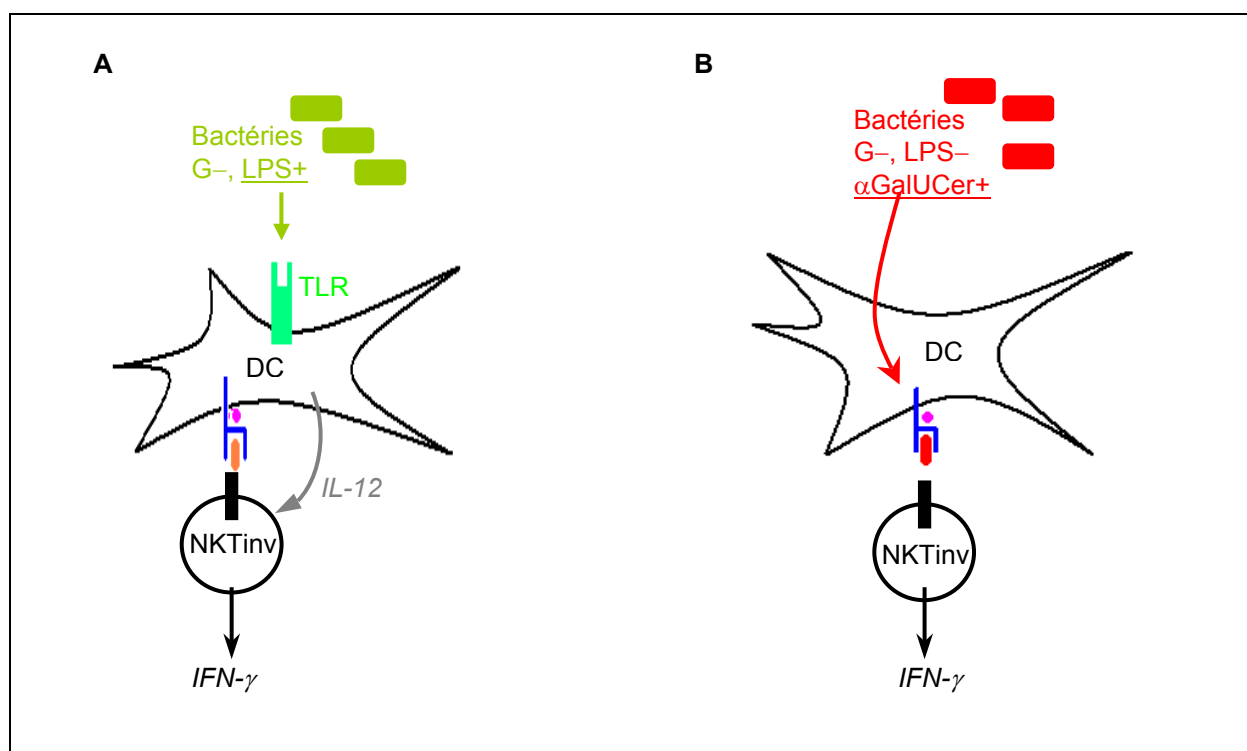
#### a) Activation des lymphocytes T CD1d-restreints au cours des infections bactériennes

De par les récepteurs de chimiokines qu'ils expriment, les NKT inv sont préférentiellement recrutés dans les tissus périphériques extra-lymphoïdes.

Une fois parvenus au foyer infectieux, plusieurs études révèlent l'importance de la sécrétion d'IFN-γ par les NKT inv dans l'immunité dirigée contre les bactéries intracellulaires. En effet, l'IFN-γ favorise l'activité bactéricide des macrophages et active d'autres cellules effectrices de l'immunité innée telle que les lymphocytes NK et enfin, oriente la réponse adaptative vers le type 1.

Deux stratégies de détection des bactéries sont utilisées par les NKT inv selon qu'ils reconnaissent un Ag du soi ou bactérien. Au cours de l'infection par la bactérie Gram- *Salmonella typhimurium*, la réponse immunitaire innée est déclenchée par l'activation des DC par les LPS (lipopolysaccharides de certaines bactéries Gram-). L'activation de la voie des TLR (*Toll-like receptors*) par les LPS des salmonelles induit la sécrétion d'IL-12 par les DC. Secondairement, cette cytokine, combinée à la reconnaissance de l'Ag endogène iGb3

présenté par CD1d à la surface des DC active les NKT inv qui produisent de grandes quantités d'IFN- $\gamma$  (Fig.10A) [91, 175]. Les deux signaux (l'un délivré par la reconnaissance d'un Ag endogène par le TCR, l'autre par la costimulation par l'IL-12) sont indispensables à la réponse des NKT inv *in vivo* [175]. Cette stratégie d'activation des NKT inv, indépendante de la reconnaissance de tout Ag microbien, est vraisemblablement mise en jeu lors d'autres situations à l'origine de sécrétion d'IL-12. Cependant, les NKT inv ne sont ici qu'une petite fraction du pool de cellules activées et productrices d'IFN- $\gamma$  d'où le fait que les souris privées de NKT inv aient la même sensibilité aux salmonelloses que les souris sauvages ; ce sont les lymphocytes NK qui constituent la majorité des cellules productrices d'IFN- $\gamma$  [175].



**Figure 10 : Deux stratégies de détection des infections bactériennes par les lymphocytes NKT inv.**

**A.** Les bactéries Gram $^-$ , LPS $^+$  agissent principalement en activant les DC via la voie des TLR (*Toll-like receptors*) impliquant les molécules adaptatrices intracellulaires *MyD88* et *Trif*. Secondairement, les DC sécrètent l'IL-12 qui, combinée à la présentation d'IgB3 (orange) par CD1d (bleu) induit l'activation des NKT inv (production d'IFN- $\gamma$ ). Etant donné les effets pléiotropes de cette cytokine, les NKT inv ne sont qu'un type cellulaire parmi d'autres activés suite à ce type d'infection [91, 175].

**B.** En revanche, les bactéries Gram $^-$ , LPS $^-$  des genres *Sphingomonas* et *Ehrlichia* activent les NKT inv via la présentation directe d' $\alpha$ GalUCer et d' $\alpha$ GlcUCer bactériens (rouge) par CD1d sur les DC [90, 91]. Les NKT inv activent en retour les DC, probablement via l'interaction CD40L:CD40.

Une autre stratégie d'activation des NKT inv est mise en œuvre lors d'infections par les bactéries Gram<sup>-</sup> dépourvues de LPS telles que les  $\alpha$ -Protéobactéries des genres *Ehrlichia* et *Sphingomonas*. L'événement à l'origine de la réponse immunitaire est la présentation par les DC d' $\alpha$ -glycosphingolipides bactériens ( $\alpha$ GalUCer et  $\alpha$ GlcUCer) aux NKT inv (Fig.10B) [90, 91, 127]. L'activation des NKT inv est ici indépendante de la voie des TLR et ne requiert pas la reconnaissance de l'iGb3 [91]. Les DC sont secondairement activées par les lipides et l'interaction CD40:CD40L, comme c'est le cas avec l' $\alpha$ GalCer [91]. Cette activation directe et spécifique des NKT inv est cruciale pour la destruction de ce type de microorganismes puisque lors d'infections expérimentales par de faibles doses de *Sphingomonas* ou d'*Ehrlichia*, les souris déficientes en NKT inv ont une clairance bactérienne retardée par rapport aux souris sauvages [90, 91]. En revanche, les infections par de fortes doses de ces bactéries Gram<sup>-</sup>, LPS<sup>-</sup> provoquent la mort rapide des souris sauvages par choc infectieux alors que la majorité des souris déficientes en NKT inv survivent. Cette issue fatale chez les souris sauvages traduit la libération massive d'IFN- $\gamma$  et d'IL-12 par les NKT inv et les DC dans le sérum tandis que les souris NKT inv<sup>-</sup> produisent moins de ces deux cytokines [91]. Il apparaît donc que, selon l'ampleur de l'activation des NKT inv, ces derniers peuvent avoir des effets bénéfiques ou délétères.

Ainsi, les deux stratégies nécessitent la reconnaissance par le TCR des NKT inv de glycolipides en association avec CD1d et induisent une activation rapide de ces lymphocytes.

#### b) Infections à *Mycobacterium*

Les souris CD1D-*knock-out* ou déficientes en NKT inv ont la même sensibilité à l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* et *M. bovis* BCG que les souris sauvages ce qui tend à montrer que les lymphocytes CD1d-restreints ne sont pas impliqués dans l'immunité contre la tuberculose [176, 177]. Cependant, l'injection sous-cutanée de lipides de la paroi cellulaire de mycobactéries, particulièrement de phosphatidylinositol mannosides, à des souris sauvages induit la formation de granulomes. De plus, la plupart des cellules de l'infiltrat inflammatoire sont des NKT inv et dans les mêmes conditions, les souris dépourvues de NKT inv ne développent pas de granulomes [178]. En revanche, le recrutement de ces lymphocytes est indépendant de CD1d et de la stimulation via le TCR et semble être déterminé par la libération précoce au site inflammatoire de TNF- $\alpha$  [179].



Chez l'homme aussi, plusieurs arguments sont en faveur d'une implication du système CD1d : outre la production d'IFN- $\gamma$ , l'activation spécifique *in vitro* des NKT inv par l' $\alpha$ GalCer induit la lyse CD1d-dépendante des phagocytes infectés par *M. tuberculosis* et une activité antimicrobienne directe via la libération par ces lymphocytes de granulysine [162].

Dans un autre modèle murin, l'infection intra-veineuse par *M. bovis* BCG provoque la prolifération rapide des NKT inv dans le poumon, le foie et la rate et les souris NKT inv<sup>-</sup> développent des granulomes plus nombreux avec des infiltrats leucocytaires massifs et une importante nécrose caséuse centrale [177]. Ce modèle suggère donc un rôle régulateur de la réponse inflammatoire pour les NKT inv.

Bien que le recrutement des NKT inv soit indépendant de CD1d, la présentation de glycolipides mycobactériens par CD1d conduit à l'activation de ces lymphocytes. Ainsi, les NKT inv humains et murins reconnaissent un phosphatidylinositol tétramannoside (PIM<sub>4</sub>) de la paroi des Mycobactéries présenté par CD1d, ce qui déclenche *in vitro*, production d'IFN- $\gamma$  et cytotoxicité des CPA [92].

#### c) Infection à *Pseudomonas aeruginosa*

Lors de pneumonie provoquée par *Pseudomonas aeruginosa*, les lymphocytes T CD1d-restreints interviennent précocement via la production d'IFN- $\gamma$  pour stimuler l'activité bactéricide des macrophages alvéolaires et la synthèse par ces mêmes macrophages de MIP-2 chimiotactique pour les neutrophiles. Ce rôle est mis en évidence par l'éradication nettement réduite des bactéries chez les souris CD1d<sup>-/-</sup> lors d'infection aiguë. De façon cohérente, l'administration d' $\alpha$ GalCer entraîne une clairance pulmonaire rapide associée à une phagocytose accrue des bactéries par les macrophages [166].

#### d) Infections à *Borrelia*

Même si leur rôle est encore peu compris, la molécule CD1d et/ou les lymphocytes T CD1d-restreints sont également impliqués dans l'immunité protectrice vis-à-vis de certaines infections à bactéries extracellulaires telles que les borrélioses. Des souris de lignées résistantes à *Borrelia burgdorferi*, l'agent étiologique de la maladie de Lyme développent des signes d'arthrite et ont une charge bactérienne augmentée lorsqu'elles sont rendues CD1d<sup>-/-</sup>. Parallèlement, on observe une réponse humorale altérée : le titre en Ac spécifiques du

pathogène est augmenté et des IgG2a sont synthétisés alors que cet isotype, associé à une réponse de type 1, n'est généralement produit que par les lignées de souris sensibles à la maladie [180].

Dans un modèle d'infection à *Borrelia hermsii*, un agent des fièvres récurrentes, les cellules B de la zone marginale de la rate (CD1d<sup>fort</sup>) synthétisent rapidement des IgM spécifiques mais chez les souris CD1d<sup>-/-</sup>, cette réponse est réduite et la charge bactérienne reste élevée. De plus, la déplétion des cellules B de la zone marginale se traduit par une diminution du titre en Ac chez les souris sauvages et reste sans effet chez les souris CD1d<sup>-/-</sup> ce qui suggère un rôle de CD1d dans l'activation de ce type de cellules B [181].

Ainsi CD1d et/ou les lymphocytes T CD1d-restreints sont capables de réguler la synthèse précoce d'Ac dans certains contextes infectieux.

## 2. Infections virales

Plusieurs modèles murins ont mis en évidence une implication des lymphocytes T CD1d-restreints lors d'infections virales, à la fois dans l'immunité innée, dans la mise en place de l'immunité adaptative et dans les mécanismes immunopathologiques.

Les lymphocytes T CD1d-restreints et plus précisément peut-être, les NKT interviennent lors de différentes herpès viroses. Comparées à leurs congénères sauvages, les souris CD1d<sup>-/-</sup> et les souris J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> témoignent d'une sensibilité accrue à l'*Herpes virus simplex* de type 1 (HSV-1), caractérisée par une dissémination plus rapide du virus dans le système nerveux périphérique, une clairance virale retardée dans la peau et le système nerveux et des vésicules cutanées plus étendues [182]. Le rôle déterminant des lymphocytes T conventionnels dans l'éradication de ce virus étant établi, cette clairance prolongée au-delà de 7 jours après l'infection suggère un mécanisme CD1d-dépendant de mise en place de l'immunité adaptative [182].

Les souris CD1d<sup>-/-</sup> présentent également une immunité défectueuse avec une mortalité accrue vis-à-vis du virus de l'herpès génital (HSV-2). Il a été mis en évidence que, lors de cette infection, les cellules T CD1d-restreintes sont une source précoce d'IFN- $\gamma$  qui contribue à la fois à l'activité antivirale directe de ces lymphocytes et à l'activation des cellules NK, autres acteurs majeurs de l'immunité innée antivirale [183].

Une démonstration plus directe de l'induction d'une réponse antivirale adaptative et spécifique par les lymphocytes T CD1d-restreints vient de l'étude de l'infection par le virus

respiratoire syncytial (VRS). Cependant, l'immunologie des lymphocytes T CD1d-restreints est complexifiée dans ce modèle par l'influence du fond génétique des lignées murines utilisées. Ainsi, chez les souris BALB/c.CD1d<sup>-/-</sup> et B6.CD1d<sup>-/-</sup>, le nombre et l'activité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques spécifiques du VRS dans les poumons sont diminués entre le 7<sup>e</sup> et le 10<sup>e</sup> jour après l'infection par rapport aux souris contrôles [184]. En accord avec cette observation, chez les souris B6.CD1d<sup>-/-</sup>, la clairance virale est retardée par rapport aux souris B6 contrôles ; toutefois, la clairance n'est pas altérée chez les souris BALB/c.CD1d<sup>-/-</sup> ce qui traduit un mécanisme de compensation de l'absence de CD1d et des lymphocytes T CD1d-restreints, vraisemblablement, par les cellules NK [184].

L'infection par le VRS révèle également un rôle délétère des lymphocytes T CD1d-restreints. Lors de l'histoire naturelle de la maladie, les symptômes sont dus à la réponse immunitaire dirigée contre le VRS plutôt qu'à un effet cytopathogène direct de ce virus. Comme nous l'avons dit, l'intensité de la réponse des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques spécifiques du VRS dans les poumons est liée à la présence des lymphocytes T CD1d-restreints. Or, bien que cette réponse cytotoxique soit nécessaire à l'éradication du virus (au moins chez les souris B6), elle est aussi à l'origine de la maladie. Par conséquent, en l'absence de lymphocytes T CD1d-restreints (i.e. chez les souris CD1d<sup>-/-</sup>), la pathologie est moins marquée [184].

Ce rôle immunopathogène des lymphocytes T CD1d-restreints s'exprime aussi lors de l'infection par le virus coxsackie B3 (variant H3). Ce dernier provoque une myocardite sévère chez les souris BALB/c mais pas chez leurs congénères CD1d<sup>-/-</sup> [73]. La charge virale dans le muscle cardiaque étant la même chez les deux lignées après 7 jours d'infection, il apparaît donc que les lymphocytes T CD1d-restreints ne sont pas impliqués dans le contrôle de l'infection mais qu'ils participent aux lésions inflammatoires. De plus, les souris BALB/c.Jα18<sup>-/-</sup> sont également atteintes de myocardite d'où la déduction que cette pathologie implique des lymphocytes T CD1d-restreints à TCR diversifié (i.e. autres que les NKT inv). En effet, *in vitro*, des lymphocytes T Vγ4<sup>+</sup> sont doués d'une action cytotoxique dépendante de CD1d sur les myocytes CD1d<sup>+</sup> infectés [73].

Les lymphocytes T CD1d-restreints sont aussi impliqués lors d'infections virales dans d'autres espèces. Ainsi, chez l'homme et le singe, la co-expression des récepteurs CD4 et CCR5 par des sous populations de NKT inv les rend sensibles à l'infection par le VIH-1 (souche R5) et le VIS (virus de l'immunodéficience simienne) [69, 185]. Au cours de l'histoire naturelle de l'infection par le VIH-1, le nombre de ces lymphocytes T CD1d-restreints est fortement diminué dans le sang des patients dès la première année suivant la

séroconversion [185]. Les conséquences de cette diminution ne sont pas connues mais elles pourraient inclure une participation au développement de l'immunodéficience acquise.

Toujours chez l'homme, la pertinence des lymphocytes T CD1d-restreints dans l'immunité dirigée contre les herpès virus a été confortée par la description d'un déficit spécifique du nombre et de l'activité des NKT inv chez une fillette atteinte d'une forme sévère de varicelle suite à la vaccination avec une souche atténuée de l'herpès virus de la varicelle et du zona (VZV) [186].

Enfin, plusieurs études récentes montrent que certaines protéines virales interfèrent avec l'expression et la fonction de CD1d. Nef et gp120<sup>env</sup> du VIH-1 interagissent avec CD1d et causent une nette réduction du niveau d'expression membranaire de CD1d [187, 188]. De même, les protéines MIR (*modulators of immune recognition*) codées par le génome de l'herpès virus associé au sarcome de Kaposi induisent l'ubiquitination de la queue cytoplasmique de CD1d et accélère ainsi son endocytose [189]. A chaque fois, l'internalisation de CD1d induite par le virus se traduit par une activation diminuée des lymphocytes T CD1d-restreints *in vitro*. Une perturbation du trafic intracellulaire de CD1d provoquée par les virus de la stomatite vésiculaire et de la vaccine inhibe aussi la présentation antigénique par CD1d [190]. Le fait que des virus ciblent la voie de présentation antigénique par CD1d pour l'inhiber et ainsi échapper au système immunitaire est un argument en faveur de l'importance physiologique de cette voie.

### 3. Parasitoses

La participation du système CD1d aux mécanismes de défense dirigés contre les protozoaires est démontrée dans plusieurs modèles expérimentaux murins. Bien qu'il ait été décrit que le glycosphatidylinositol inclus dans la membrane de nombreux protozoaires (*Plasmodium* spp. et *Trypanosoma* spp. notamment) est un Ag reconnu par les NKT inv de façon CD1d-restreinte et que cette reconnaissance est à l'origine de la production d'IgG spécifiques du parasite [87], ces observations ont été infirmées plusieurs fois [88, 89]. Une hypothèse séduisante serait que ce glycolipide, ligand connu du TLR-2, active les lymphocytes T CD1d-restreints indirectement après stimulation des cellules dendritiques selon un mécanisme analogue à celui décrit dans l'immunité contre les bactéries Gram<sup>-</sup>, LPS<sup>+</sup> (cf. *supra*) voire directement, l'expression de TLR fonctionnels par les NKT inv ayant tout récemment été mise en évidence [191].

Quoiqu'il en soit, la lignée murine BALB/c est naturellement résistante au paludisme. Or, en l'absence de CD1d, ces souris développent un neuropaludisme léthal suite à l'infection expérimentale par des globules rouges parasités par *Plasmodium berghei* ; cette sensibilité des souris CD1d<sup>-/-</sup> est associée à une augmentation des niveaux sériques de cytokines proinflammatoires (IFN- $\gamma$  et TNF $\alpha$ ) et à une absence de commutation de la réponse T du type 1 vers le type 2 protecteur, normalement observée chez les souris contrôles 7 jours après l'inoculation [192].

De même, lors de schistosomiase murine, la présentation par CD1d de glycoconjugués indéterminés exprimés par les œufs du parasite contribue à l'amplification de la réponse T de type 2 et à son corollaire, la réaction granulomateuse qui s'établit autour des œufs dans le foie des souris [193]. En effet, les lymphocytes T des animaux CD1d<sup>-/-</sup> infestés produisent moins d'IL-4, IL-5 et IL-13 ainsi que d'Ac spécifiques IgG1 (isotype associé aux réponses de type 2) que les contrôles. En conséquence, les animaux CD1d<sup>-/-</sup> développent des granulomes paucicellulaires (moins d'éosinophiles sont recrutés), moins fibreux et moins nécrotiques par rapport aux contrôles. Toutefois, le système CD1d n'influence pas la survie des vers ni leur fécondité [193].

Ces modèles illustrent donc la capacité des lymphocytes T CD1d-restreints à orienter les réponses immunitaires adaptatives cellulaires et humorales dirigées contre les parasites.

Les lymphocytes T CD1d-restreints favorisent aussi la réponse granulomateuse lors de leishmaniose viscérale. Cette réponse, médiée ici par des cytokines de type 1 (principalement l'IFN- $\gamma$ ) est protectrice chez les souris B6 et son altération chez les souris CD1d<sup>-/-</sup> contribue à leur sensibilité augmentée à *Leishmania donovani* [93]. En effet, deux heures après l'inoculation expérimentale des souris sauvages, une petite sous population de lymphocytes tétramères CD1d: $\alpha$ GalCer<sup>+</sup> hépatiques prolifèrent et synthétisent de l'IFN- $\gamma$  de manière CD1d-dépendante ; c'est un composant majeur du glycocalyx du protozoaire, un lipophosphoglycane qui se lie à CD1d mais un doute persiste concernant le mécanisme de reconnaissance par les lymphocytes (TCR vs une autre voie toutefois indépendante de l'IL-12) [93]. La protection des souris au cours des premières semaines suivant l'inoculation de promastigotes de *Leishmania major* est également corrélée à la prolifération des NKT inv dans le ganglion lymphatique régional [194].

## C. Place des lymphocytes T CD1d-restreints dans l'immunologie des tumeurs

Dans de nombreux modèles murins, les lymphocytes T CD1d-restreints sont des acteurs importants du rejet tumoral induit par l'immunothérapie utilisant l' $\alpha$ GalCer ou l'IL-12. Ils participent aussi à l'immunité antitumorale spontanée (i.e. en l'absence de stimulation exogène) qu'ils peuvent favoriser ou supprimer selon le type de tumeur.

L'administration d' $\alpha$ GalCer a une efficacité démontrée contre plusieurs tumeurs expérimentales de diverses origines, prévenant les métastases de mélanomes malins, de carcinomes du colon, du poumon, de la prostate et du sein et de lymphomes, et inhibant la transformation primaire de tumeurs spontanées chez les souris p53<sup>-/-</sup> ou induites par des carcinogènes [195]. Cette efficacité est médiée par la sécrétion rapide d'IFN- $\gamma$  par les NKT inv activés et l'activation réciproque des DC qui sécrètent de l'IL-12. La synergie IL-12/IFN- $\gamma$  active alors les cellules effectrices antitumorales : lymphocytes NK et possiblement, T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> [196]. In vivo, tout cet IFN- $\gamma$  inhibe directement l'angiogenèse tumorale et stimule l'expression de TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) sur les cellules NK et donc, la lyse des cellules tumorales sensibles [197, 198]. Étrangement, in vivo, l'activité antitumorale de l' $\alpha$ GalCer est indépendante des autres mécanismes cytotoxiques tels que l'exocytose de granules contenant la perforine et la synthèse des autres ligands des récepteurs à domaines de mort (tels que FasL ou TNF) [196].

Notons que l'administration à des souris de DC chargées en  $\alpha$ GalCer induit une production accrue et prolongée d'IFN- $\gamma$  et ainsi, une résistance renforcée aux métastases en comparaison de l'activité de l' $\alpha$ GalCer soluble [157]. C'est également dans le but de renforcer l'immunité cellulaire de type 1 que l' $\alpha$ -C-GalCer a été mis au point.

Une autre voie d'immunothérapie antitumorale ciblant les NKT inv utilise l'IL-12. Après transplantation de diverses tumeurs (mélanome B16, carcinome pulmonaire, leucémie FBL), l'administration d'IL-12 inhibe la croissance et les métastases de ces tumeurs chez les souris sauvages mais pas chez les souris J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> [199]. Ainsi cette étude tend à prouver que les NKT inv sont des médiateurs déterminants des effets antitumoraux de l'IL-12. Cependant, selon une autre étude, les cellules NK sont nécessaires et suffisantes au rejet tumoral médié par l'IL-12 [200]. En fait, les contributions relatives des lymphocytes NKT inv et NK dépendraient de la dose d'IL-12 utilisée, les faibles doses d'IL-12 révélant un rôle prépondérant des NKT inv et de l'IFN- $\gamma$  tandis que de plus fortes doses agissent via les cellules NK et la perforine [195, 201].

Les NKT inv exercent une activité antitumorale physiologique et spontanée contre certains types de tumeurs. Ceci est clairement démontré par les études de mutagenèse par le méthylcholanthrène ; le traitement des souris  $J\alpha 18^{-/-}$  (i.e. déficientes en NKT inv) par ce carcinogène chimique induit des fibrosarcomes plus rapidement et avec une plus grande incidence que chez les souris sauvages [202]. De plus, le transfert adoptif de NKT inv provenant de souris sauvages à des souris  $J\alpha 18^{-/-}$  restaure leur capacité à rejeter ce type de tumeur. Comme pour l'activité de l' $\alpha$ GalCer, l'IFN- $\gamma$  issu à la fois des NKT inv mais aussi d'autres lymphocytes est nécessaire, ce qui suggère que cette cytokine agit à plusieurs étapes du processus antitumoral [203]. En fait, l'IFN- $\gamma$  issu des NKT inv est vraisemblablement important pour l'activation de cellules effectrices (la participation des NK et CTL CD8<sup>+</sup> au rejet est démontrée) qui libèrent à leur tour de l'IFN- $\gamma$  aux effets antitumoraux propres et de la perforine qui lyse les cellules tumorales [203].

A ce stade, nous pouvons nous demander pourquoi les NKT inv nécessitent un stimulus exogène ( $\alpha$ GalCer ou IL-12) pour répondre à certaines tumeurs alors qu'une activation endogène suffit dans d'autres cas. Des expériences de transfert adoptif ayant montré que l'expression de CD1d par le receveur est requise pour l'activité antitumorale des NKT inv indiquent que ces lymphocytes sont activés de manière TCR-dépendante [203]. Le type de glycolipide présenté par CD1d pourrait donc expliquer ces différences de réponse des NKT inv. Cette hypothèse est soutenue par la caractérisation d'un Ag CD1d-restreint spécifique des tumeurs d'origine neuroectodermique, le disialoganglioside GD3. Des CPA ayant pris en charge des extraits tumoraux présentent ce glycolipide en association avec CD1d et stimulent une sous population de NKT inv [86].

Au contraire des études précédentes, les souris CD1d<sup>-/-</sup> peuvent montrer une résistance accrue à d'autres tumeurs. Dans ces modèles expérimentaux, les lymphocytes T CD1d-restreints exercent donc un effet immunosuppresseur. Lors de l'inoculation de cellules du fibrosarcome 15-12RM à des souris sauvages, après une phase de croissance initiale, la tumeur régresse grâce à la mise en place de la réponse T CD8<sup>+</sup> cytotoxique, puis récidive en raison d'une inhibition des CTL. Cette immunosuppression est vraisemblablement initiée par la reconnaissance d'un glycolipide dérivé de la tumeur par des lymphocytes T CD1d-restreints CD4<sup>+</sup> et aux réactions en chaîne qui s'ensuivent : les lymphocytes T CD1d-restreints CD4<sup>+</sup> activés produisent de l'IL-13 qui induit la synthèse de TGF- $\beta$  par des cellules myéloïdes CD11b<sup>+</sup>, Gr-1<sup>+</sup>. Le TGF- $\beta$ , connu pour son action immunosuppressive inhibe alors l'activité cytotoxique des CTL, d'où la récurrence du fibrosarcome [204, 205]. Il reste à définir de quel

type de lymphocytes T CD1d-restreints il s'agit (invariants vs diversifiés) et à mieux caractériser ces cellules myéloïdes répondant à l'IL-13.

De même, des lymphocytes NKT inv sont les médiateurs du phénomène de immunosuppression induite par les ultra-violets (UV). Leur activation consécutive à l'exposition chronique aux UV inhibe chez la souris, le rejet de carcinomes cutanés photo-induits [206]. Parallèlement, les souris CD1d<sup>-/-</sup> témoignent d'une plus grande résistance à ces cancers corrélée à une plus grande sensibilité des kératinocytes et des fibroblastes de ces animaux à l'apoptose UV-induite [207]. Ces données sont en faveur d'un rôle de CD1d dans l'inhibition de l'apoptose, empêchant ainsi l'élimination des cellules cutanées malignes.

Chez l'homme, des déficits numériques ou fonctionnels des lymphocytes NKT inv ont été décrits en association avec diverses tumeurs (mélanome malin, carcinomes pulmonaire, prostatique, myélome multiple) [195]. Cependant, on ne sait pas si ces déficits en sont la cause ou la conséquence.

## **D. Lymphocytes T CD1d-restreints & Hypersensibilités**

La capacité des NKT inv à produire de grandes quantités d'IL-4 rapidement après activation suggère une place importante de ces lymphocytes dans les réactions d'hypersensibilité. En effet, via l'IL-4, les NKT inv ont une action synergique avec les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels sur la commutation isotypique vers les IgE induite par l'IL-18 [208]. De plus, l'hyperréactivité des voies respiratoires inférieures induite par divers allergènes, un signe cardinal de l'asthme, ne se développe pas chez les souris CD1D-*knock-out* [209]. Il est démontré par transfert adoptif que l'induction de cette pathologie requiert la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 par les NKT inv et les Ac anti-CD1d inhibent l'aptitude des NKT inv à amplifier le recrutement des polynucléaires éosinophiles dans les poumons [210]. Les auteurs formulent l'hypothèse que les allergènes perturberaient l'environnement muqueux, provoquant ainsi l'exposition d'Ag glycolipidiques endogènes encore indéterminés.

D'autre part, les NKT inv concourent au recrutement des cellules T effectrices lors du déclenchement des réactions d'hypersensibilité de contact. En effet, chez les souris sensibilisées, l'immunisation percutanée avec des haptènes induit l'activation rapide des NKT inv hépatiques et leur production préférentielle d'IL-4 [211]. Cette cytokine, en association avec les complexes haptène:protéine porteuse, active les lymphocytes B1 du péritoine qui migrent vers la rate où ils libèrent des IgM dans la circulation sanguine. Ces IgM



spécifiques permettent alors le recrutement des lymphocytes T au site de contact avec l'haptène et, ainsi, le développement des lésions inflammatoires. Ces observations sont déduites d'expériences utilisant des animaux *knock-out* et de reconstitution par transfert adoptif. Là encore, les auteurs soupçonnent la libération dans la circulation sanguine de glycolipides du soi à partir de la peau.



**PARTIE EXPÉRIMENTALE :  
CD1d ACTIVE LE KÉRATINOCYTE**



Organe situé à l'interface avec l'environnement extérieur, la peau est capable de réagir aux agressions –de nature physique, chimique ou biologique- et de s'adapter à cet environnement. Le système immunitaire cutané est, de ce fait, particulièrement raffiné. Les cellules de Langerhans, les dendrocytes dermiques, les lymphocytes ayant un tropisme cutané mais aussi les kératinocytes sont des cellules-clés de ce système. Sous la protection du système immunitaire, la peau en est aussi parfois la cible et de nombreuses dermatoses ont une étiologie immune.

La démonstration sans équivoque de la participation de l'axe CD1d/lymphocytes T CD1d-restreints au système immunitaire nous a conduit à considérer quelles peuvent être les conséquences immunologiques de l'expression de la molécule CD1d au sein de l'épiderme, chez l'homme.

En effet, dans la peau humaine normale, la majorité des kératinocytes exprime la molécule CD1d. Le marquage immunohistochimique est essentiellement membranaire et débute dès les faces latérales des kératinocytes basaux pour se poursuivre jusqu'à la couche granuleuse, réalisant un marquage en maille de filet (Photographie 1). Le niveau d'expression est faible dans le stratum germinatum puis augmente progressivement pour devenir maximal dans le stratum granulosum, juste sous le très lipidique stratum corneum qui n'est pas marqué. Cette distribution de CD1d au sein de l'épiderme suggère une corrélation entre le niveau d'expression de la molécule et l'état de différenciation des kératinocytes [54, 212]. Notons que les kératinocytes spontanément immortalisés de la lignée HaCaT, couramment utilisée en laboratoire, expriment aussi CD1d [54].



**Photographie 1 : Immunomarquage membranaire CD1d des kératinocytes épidermiques humains (x20). Présence d'un gradient d'expression de la molécule CD1d.**

Dans le derme, les kératinocytes des gaines folliculaires internes et externes présentent un marquage membranaire intense, notamment dans l'épiderme du cuir chevelu [213]. Un gradient d'expression est parfois observé des couches externes vers les couches internes de ces gaines. En outre, les follicules présentent une expression accrue au cours de la phase anagène et réduite lors des phases catagène et télogène [212, 213]. En marge de l'expression par les kératinocytes, la molécule CD1d a également été révélée dans d'autres structures cutanées telles que les glandes sudoripares eccrines, le marquage restant constant sur toute la hauteur du canal excréteur, y compris l'acrosyringium. Au sein des glandes sébacées, on observe un marquage diffus, membranaire et cytosolique des cellules de l'assise germinative. Ce marquage disparaît au cours de la différenciation spumeuse [212]. Enfin, CD1d est exprimée par les cellules dendritiques dermiques [55].

L'expression de CD1d au sein de la peau humaine est donc maintenant solidement démontrée mais sa fonction, en particulier sur les kératinocytes reste inexplorée et ses implications en physiopathologie cutanée mal comprises. Une étude a montré que l'interaction entre kératinocytes et lymphocytes T CD1d-restreints induit une forte sécrétion par ces derniers de cytokines telles que l'IFN- $\gamma$  et l'IL-13 [214]. Ces cytokines pro-inflammatoires sont susceptibles de perturber l'homéostasie cutanée et de participer à la survenue de dermatoses inflammatoires chroniques. D'ailleurs, un modèle murin a permis d'établir que des lymphocytes T CD1d-restreints isolés chez un patient psoriasique induisent le développement de plaques de psoriasis au sein d'un greffon de peau saine provenant de ce même patient [214]. L'objet de ce travail a été d'explorer une autre voie permettant au système CD1d de moduler la physiologie cutanée, via une action sur le kératinocyte. Nous nous sommes demandés si l'engagement spécifique et l'oligomérisation de CD1d à la surface du kératinocyte est capable de communiquer des signaux à cette cellule et d'induire une réponse ; l'hypothèse sous-jacente étant que l'expression de CD1d doit conférer aux kératinocytes –considérés comme CPA– la faculté de réagir lors de l'interaction avec des lymphocytes T CD1d-restreints. Nous avons donc tenté de miner la présence de ces lymphocytes en incubant, *in vitro*, des kératinocytes en présence d'anticorps anti-CD1d. Ne disposant pas des techniques de criblage systématique des modifications d'expression génique induites par un stimulus exogène dans une population cellulaire (telles que les *DNA chip arrays*), nous avons dû déterminer, de façon raisonnée, quels critères de réponse des kératinocytes il était pertinent d'évaluer. Notre choix s'est arrêté sur deux cytokines produites par les kératinocytes : l'interleukine (IL)-12, en raison de sa capacité à réguler la réponse immunitaire, y compris au niveau cutané, et l'IL-15, du fait de son rôle dans l'homéostasie des lymphocytes T CD1d-restreints.

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 1. CULTURE CELLULAIRE

### 1.1. Kératinocytes humains normaux

Les cultures de kératinocytes humains normaux ont été établies à partir de prépuces de nouveau-nés provenant du service de chirurgie pédiatrique de l'hôpital Edouard Herriot de Lyon. Après circoncision, les prépuces sont conservés quelques heures dans une solution de Hank's (Hank's Buffered Saline Solution, GIBCO BRL) additionnée d'antibiotiques (pénicilline 100 U/mL- streptomycine 100 µg/mL, GIBCO BRL). Après avoir séparé aux ciseaux courbes, la muqueuse, l'hypoderme et une partie du derme, nous réalisons de petits lambeaux d'épiderme encore solidaires d'une partie du derme sous-jacent. Ces lambeaux sont placés à 4°C pendant une nuit dans une solution de trypsine à 0,05%. L'épiderme est alors délicatement dissocié du derme à l'aide de pinces fines et déposé dans une solution de Hank's complétée de 10% de sérum de veau fœtal (GIBCO BRL) afin d'inhiber l'action de la trypsine. Une agitation douce par pipetages répétés permet alors d'individualiser mécaniquement les kératinocytes. La suspension cellulaire ainsi obtenue est filtrée sur une compresse stérile afin d'éliminer les lambeaux de couche cornée.

Les cellules épidermiques sont dénombrées au bleu Trypan puisensemencées dans une flasque de 75 cm<sup>2</sup> (COSTAR) à raison de 3.10<sup>6</sup> par flasque. Le milieu de culture utilisé est du K-SFM (GIBCO BRL) complété de 1% de solution antibiotique et d'extrait de pituitaire bovine (50 µg/mL). Les cultures sont maintenues dans une étuve à 37°C en atmosphère humide enrichie de 5% de CO<sub>2</sub>. 24 heures après l'ensemencement, on ajoute 5 ng/mL de facteur de croissance épidermique (EGF) au milieu de culture qui est alors renouvelé toutes les 36 heures.

Lorsque la culture arrive à subconfluence (80% de la surface colonisée), les cellules adhérentes sont récoltées par trypsination : en pratique, après avoir soigneusement lavé les cellules avec du PBS sans Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> (GIBCO BRL), on laisse agir une solution de trypsine 0,05%-EDTA 0,02% (GIBCO BRL) à 37°C que l'on inhibe au bout d'environ 10 minutes par ajout de SVF. Après numération, on réensemence les cellules qui seront ainsi passées 4 à 5 fois afin de sélectionner les kératinocytes et d'éliminer les autres populations cellulaires.

Notre étude a porté sur des kératinocyte humains normaux différenciés *in vitro*. Le parallélisme histologique entre le gradient d'expression baso-apical de la molécule CD1d et le gradient de différenciation des kératinocytes au sein de l'épiderme humain normal, les données préalablement établies dans notre laboratoire concernant l'expression de CD1d par les kératinocytes humains normaux induite par des concentrations calciques physiologiques (1 à

1,2 mM) et l'influence *in vitro* de telles concentrations sur la différenciation de ces cellules [215] nous ont conduit à cultiver les kératinocytes en K-SFM complémenté à 1,2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  pendant 5 jours à partir de la subconfluence. Ces conditions permettent d'observer un début de stratification des monocouches de kératinocytes et de reproduire ainsi le niveau d'expression de la molécule CD1d observé *in vivo* au sein de l'épiderme.

## 1.2. Cellules HaCaT

Les cellules HaCaT, lignée de kératinocytes humains spontanément immortalisés, nous ont gracieusement été données par le Pr. Fusenig (German Cancer Research Center, Heideberg) et sont cultivées en DMEM (GIBCO BRL), complémenté de 10% de SVF et de 1% de pénicilline-streptomycine.

## 2. ACTIVATION DES KERATINOCYTES HUMAINS VIA CD1d

L'activation des kératinocytes via CD1d a été réalisée en plaques 6 puits par un protocole classique d'oligomérisation des molécules CD1d membranaires. Un anticorps anti-CD1d (IgG de souris) est incubé pendant 1 h à 37°C ; en pratique, deux anticorps primaires ont été testés : l'anticorps issu du clone NOR3.2 (10  $\mu\text{g/mL}$ ) commercialisé par le laboratoire BIOSOURCE ainsi que l'anticorps issu du clone 51.1 (30  $\mu\text{g/mL}$ ) fourni par le Dr Porcelli (Albert Einstein College of Medicine, New York). Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS stérile puis un anticorps secondaire dirigé contre le fragment Fc des IgG de souris (Rabbit Anti-Mouse, DAKO, 14  $\mu\text{g/mL}$ ) est incubé pendant des durées croissantes (de 0 à 24 h) afin de réaliser une cinétique de l'oligomérisation des molécules CD1d à la surface du kératinocyte. Au terme de ces différents temps d'activation, les surnageants sont recueillis et les cellules lavées puis lysées en vue d'extraire les protéines ou les ARN totaux. Certaines expériences ont été réalisées en présence d'un inhibiteur non spécifique des tyrosine-kinases, la génistéine (SIGMA) à une faible concentration afin de nous affranchir de la potentielle cytotoxicité de cette molécule. En pratique, les kératinocytes différenciés ont été pré-incubés pendant 30 minutes à 37°C puis stimulés avec les anticorps, en présence de 10  $\mu\text{M}$  de génistéine.



### 3. QUANTIFICATION DES ARNm DE CYTOKINES PAR RT-PCR

#### 3.1. Extraction des ARN totaux

Les extractions d'ARN ont été effectuées sur cultures cellulaires en plaques 6 puits préalablement rincées avec du PBS, à l'aide d'un kit d'extraction (Total RNA isolation system, PROMEGA). L'ensemble du protocole est réalisé dans la glace afin de ralentir la dégradation des ARN. On laisse agir une solution dénaturante (citrate de sodium 26 mM, N-lauryl sarcosine 0,5%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 0,125 M, thiocyanate de guanidine 4 M) pendant 5 minutes puis les cellules sont décrochées au moyen d'un grattoir, transvasées dans un tube eppendorf 2 mL et vortexées. On ajoute une suspension d'acétate de sodium 2 M, pH4. Les ARN sont ensuite extraits grâce au phénolchloroforme qui est ajouté à la suspension. Après avoir remué vigoureusement le tube, celui-ci est laissé 15 minutes au repos à 4°C puis centrifugé pendant 20 minutes à 12000 tpm, à 4°C. On récupère alors le surnageant et on précipite les ARN par addition d'isopropanol à froid (-20°C) pendant 30 minutes. Après une nouvelle centrifugation (12000 tpm, 4°C, 20 minutes), le culot obtenu est lavé 2 fois à l'éthanol à 75° glacial puis remis en suspension dans 20  $\mu$ L d'eau dépourvue de ARNase et conservé à -20°C.

#### 3.2. Traitement à l'ADNase

Les 20  $\mu$ L d'ARN totaux ainsi extraits sont portés 30 minutes à 37°C avec 3  $\mu$ L de Buffer ADNase 10x + 2  $\mu$ L de DNase + 2  $\mu$ L de *RNase inhibitor* (PROMEGA) + 3  $\mu$ L d'eau sans ARNase. Lorsque les échantillons sont encore à 37°C, 2 mL de *DNase stop* (PROMEGA) sont ajoutés puis les extraits sont soumis 10 minutes à 65°C puis conservés à 4°C. Une nouvelle extraction est effectuée en ajoutant 100  $\mu$ L de phénol-chloroforme-isoamylalcool au 30  $\mu$ L récoltés puis les tubes sont centrifugés 20 minutes à 4°C et 14000 rpm. Le surnageant est récupéré et précipité par 500  $\mu$ L d'éthanol pur + 50  $\mu$ L d'acétate de sodium 2M puis gardé une nuit à -20°C. Après une nouvelle centrifugation (12000 rpm, 4°C, 10 minutes), le culot obtenu est lavé 2 fois à l'éthanol à 75% glacial puis remis en suspension dans 20  $\mu$ L d'eau sans ARNase et conservé à -20°C. La concentration en ARN total des extraits est calculée après mesure de l'absorbance à 260 nm par spectrophotométrie (1 unité d'absorbance à 260 nm = 40  $\mu$ g/mL d'ARN totaux).

### 3.3. Electrophorèse des ARN totaux.

A ce stade, nous avons effectué une séparation des ARN totaux (2  $\mu$ L) par électrophorèse en gel d'agarose 1% afin de vérifier leur intégrité et l'absence de contamination par de l'ADN génomique.

### 3.4. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)

Elle est réalisée par une transcription inverse à partir des ARN totaux extraits. Nous avons effectué les synthèses à partir d'une quantité fixe d'ARN total (5  $\mu$ g), le volume réactionnel étant de 20  $\mu$ L. Elle se déroule en 2 étapes :

✧ hybridation des oligonucléotides de désoxyThymidine avec la queue polyAdénosine des ARNm :

- OligodT Primer 12-18 au 1/5 (0,5  $\mu$ g/mL, GIBCO BRL) 5  $\mu$ L
- extrait d'ARN totaux : volume correspondant à 5  $\mu$ g
- eau stérile sans RNase (Water PCR Reagent, SIGMA) qsp 10  $\mu$ L

le mélange est placé 10 minutes à 70°C, puis 2 minutes à 4°C.

✧ on rajoute ensuite :

- tampon de la Reverse Transcriptase : First Strand Buffer (GIBCOBRL) 4  $\mu$ L
- mélange de désoxyribonucléotides : dNTP Mix 10 mM (GIBCO BRL) 1  $\mu$ L
- Dithiothreitol 0,1 M (GIBCO BRL) 4  $\mu$ L
- addition de l'enzyme : SuperScript II RT 200 UI/ $\mu$ L (GIBCO BRL) 0,5  $\mu$ L

Puis le mélange est porté à 42°C pendant 55 minutes afin de permettre l'élongation des monobrs d'ADNc puis à 70°C pendant 15 minutes pour détruire la transcriptase inverse encore active, afin qu'elle n'interfère pas avec la Taq polymérase au cours des PCR ultérieures.

### 3.5. PCR

Nous avons procédé à l'amplification de fragments d'ADNc au moyen d'amorces spécifiques des ARNm de l'IL-15, des chaînes p35 et p40 de l'IL-12 et de la GAPDH (témoin interne) (tableau1). La séquence de chacune de ces amorces a été testée quant à sa spécificité d'hybridation avec l'ARNm correspondant par comparaison avec la banque de séquences nucléiques : GenBank Primates, à l'aide du logiciel BLASTN (INFOBIOGENE, [www.infobiogene.fr](http://www.infobiogene.fr)).

(N°accession GenBank)	Séquence	Taille du fragment amplifié	Température d'hybridation retenue	Nombre de cycles
IL-15 (U14407)	s 5'-GGC TTT GAG TAA TGA GAA TTT CGA-3'	510 pb	52°C	30
	as 5'-ATC AAT TGC AAT CAA GAA GTG TTG-3'			
IL-12p35 (M65291)	s 5'-TCC AGA CCC AGG AAT GTT CCC A-3'	587 pb	53°C	35
	as 5'-GGG ACC TCG CTT TTT AGG AAG-3'			
IL-12p40 (M65272)	s 5'-CTT CAG CTG CAA GTT CTT GG-3"	355 pb	54°C	35
	as 5'-GAC ACA ACG GAA TAG ACC CA-3'			
GAPDH	s 5'-GGT GAA GGT CGG TGT CAA CG-3'	505 pb	55°C	27
	as 5'- CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC-3'			

**Tableau 6: Séquences des amorces et conditions de la PCR**

s : brin sens, as : brin antisens

Nous avons effectué nos PCR dans un volume réactionnel de 25  $\mu$ L contenant : 10  $\mu$ L provenant de la solution d'ADNc, 10% de Tampon Taq (PCR Buffer 10x, 15 mM  $MgCl_2$ , PERKIN ELMER), 0,2 mM de dNTP (dNTP Mix 10 mM, GIBCO BRL), 15  $\mu$ M de chaque amorce, 2,5 U de Taq polymérase (Ampli Taq DNA Polymerase 5 U/ $\mu$ L, PERKIN ELMER), eau stérile (Water PCR Reagent SIGMA). Les amplifications ont été effectuées dans un thermocycleur PERKIN ELMER (Gene Amp PCR System 2400).

Après une phase initiale de dénaturation de 5 minutes à 94°C, on réalise n cycles (Tableau 6) comportant une étape de dénaturation de 45 secondes à 94°C, une étape d'hybridation de 40 secondes à une température spécifique du couple d'amorces et une étape d'élongation de 40 secondes à 72°C. Au terme de ces cycles, se produit une étape d'élongation finale de 10 minutes à 72°C puis les tubes sont portés à 4°C. Le nombre de cycles et la quantité initiale d'ADNc ont été ajustés afin de se situer dans la phase ascendante de l'amplification génique quand la réaction n'a pas encore atteint son pallier de saturation.

Les produits d'amplification sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%, contenant 0,5 ng/mL de bromure d'éthidium, à tension constante. La sauvegarde informatique des bandes d'acides nucléiques visualisées sur gel d'agarose et l'analyse de leur intensité ont été réalisées avec le logiciel 1D Analysis System Software (KODAK DIGITAL SCIENCE).

L'amplification des fragments d'ADNc du gène ubiquiste GAPDH nous a permis de contrôler que nous avons effectué chaque PCR à partir de quantités équivalentes d'ADNc.

#### **4. DOSAGE ELISA DE L'IL-12p70 SECRETEE**

La concentration en IL-12p70 des surnageants de culture de kératinocytes est dosée grâce au kit ELISA Quantikine HS (R&D SYSTEMS) en suivant les recommandations du fabricant. Le dosage est basé sur la méthode dite en "sandwich" selon laquelle les surnageants sont incubés dans des puits où a été fixé un anticorps monoclonal spécifique de l'hétérodimère IL-12p70 révélé secondairement par une amplification immuno-enzymatique. La concentration des échantillons est obtenue par référence à une courbe étalon établie grâce à une solution d'IL-12p70 humaine recombinante. Le kit utilisé permet de détecter l'IL-12p70 à des concentrations comprises entre 0,625 et 40 pg/mL. Les résultats sont exprimés par la moyenne de 3 expériences indépendantes  $\pm$  l'écart type et le degré de signification est évalué grâce au test de Student.

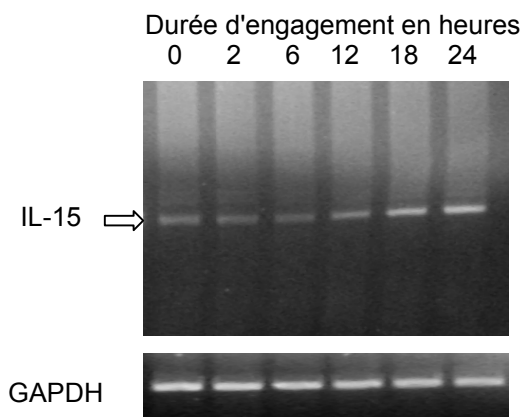
## **5. RECHERCHE DE L'IL-15 PAR CYTOMETRIE DE FLUX**

Les immunomarquages pour la cytométrie de flux ont été réalisés sur des cellules HaCaT après trypsination. Pendant toute la durée du marquage les cellules sont maintenues à 4°C. Les cellules sont d'abord lavées plusieurs fois dans une solution de PBS contenant 1% d'albumine bovine (PBS-BSA). Puis on incube pendant 1 h l'anticorps primaire anti-IL-15 humaine (IgG1 de souris, R&D SYSTEM) ou le témoin isotypique (IgG1 de souris, IMMUNOTECH), dilué dans la solution PBS-BSA, à raison de 50 µl pour  $2.10^5$  cellules. Les cellules sont lavées avec du PBS-BSA puis on dépose l'anticorps secondaire, une immunoglobuline de chèvre spécifique des IgG de souris conjuguée à la fluorescéine (GAMIg-FITC, ZYMED) incubé pendant 45 minutes à l'abri de la lumière. Après un nouveau rinçage, les cellules sont fixées par une solution de PBS-BSA contenant 1% de formaldéhyde et conservées à 4°C. La lecture s'effectue sur un cytomètre de flux BECTON-DICKINSON. L'analyse des données est réalisée grâce au logiciel Cell Quest (BECTON-DICKINSON).

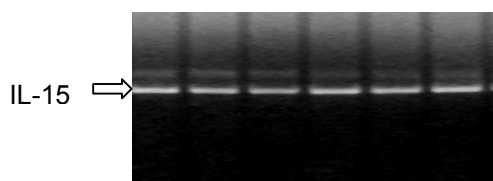
## RESULTATS

**L'engagement de CD1d à la surface du kératinocyte induit la transcription des gènes de l'IL-15 et des 2 chaînes p35 et p40 de l'IL-12.**

Nous avons décidé d'étudier deux interleukines, IL-12 et l'IL-15 connues pour tenir une place centrale dans l'environnement cytokinique cutané et susceptibles d'interférer avec le système CD1d. Nous avons analysé par RT-PCR semi quantitative, la transcription du gène de l'IL-15 qui joue un rôle crucial dans la différenciation et la survie des cellules NK et NKT inv. La cinétique d'activation du kératinocyte via CD1d montre une augmentation progressive de la transcription de ce gène jusqu'à 24 heures d'activation (Figure 11a). Les cellules HaCaT montrent un niveau basal de transcription du gène de l'IL-15 significativement supérieur à celui des kératinocyte humains normaux, mais la stimulation CD1d-dépendante reste sans effet sur la transcription du gène de cette cytokine dans ces cellules (Figure 11b).

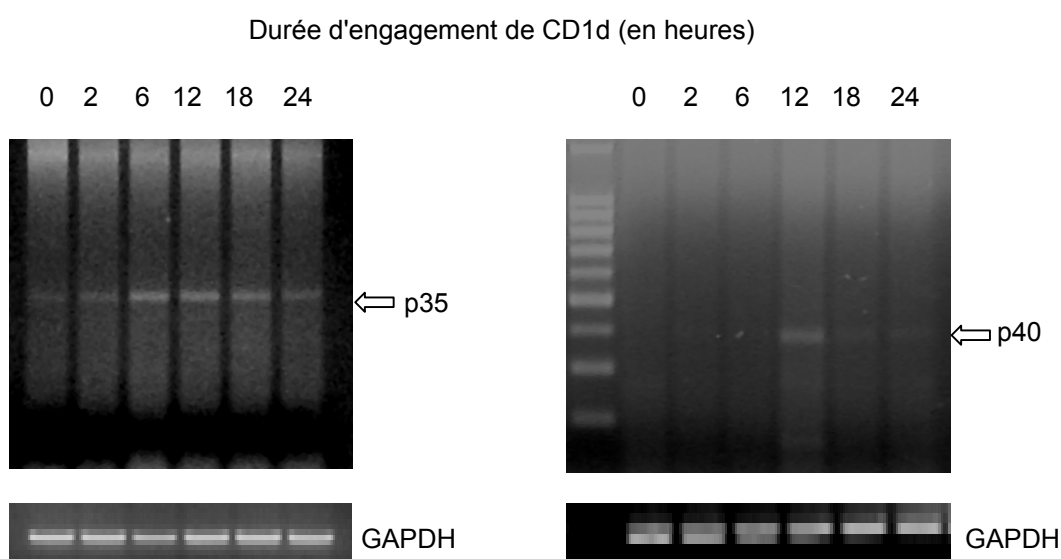


**Figure 11a : L'engagement de CD1d induit une augmentation de transcription du gène de l'IL-15 par le kératinocyte.** Quantification des ARNm d'IL-15 après les durées d'engagement indiquées de CD1d avec un anticorps spécifique. Ces résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.



**Figure 11b : L'engagement de CD1d à la surface des cellules HaCaT est sans effet sur la transcription du gène de l'IL-15 par ces cellules.**

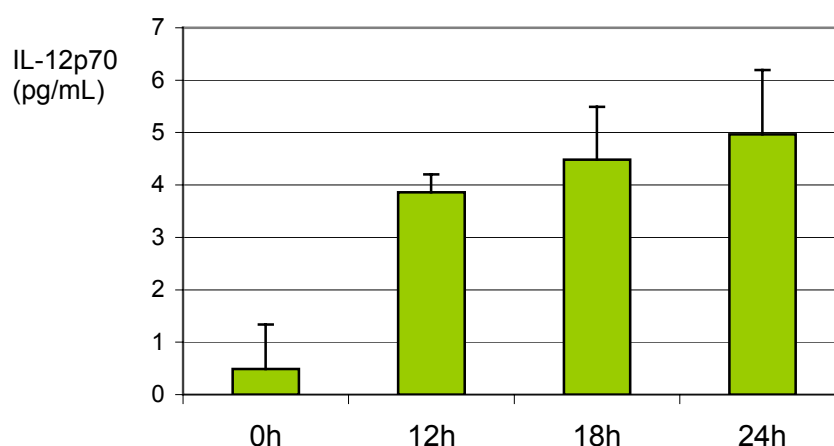
L'IL-12 nous est également apparue pertinente à plusieurs titres de part sa capacité d'activation des cellules NK et NKT et son rôle essentiel dans l'orientation de l'immunité locale vers un profil de type 1. Cette cytokine est une glycoprotéine composée de 2 sous unités p35 et p40 codées par 2 gènes distincts, reliées par un pont disulfure et inactives indépendamment. L'étude de la cinétique d'activation du kératinocyte révèle une induction de la transcription de ces 2 gènes. Nous mettons en évidence une augmentation de la quantité des ARNm de la chaîne p35 au cours des 12 premières heures d'activation puis une diminution (Figure 12a). De même, l'oligomérisation de CD1d induit un pic de transcription du gène de la chaîne p40, 12 heures après le début de l'activation des kératinocytes (Figure 12b). Il est intéressant de remarquer que les deux anticorps primaires anti-CD1d utilisés (NOR3.2 et 51.1) donnent des résultats similaires.



**Figure 12 : L'engagement de CD1d à la surface des kératinocytes induit la transcription des gènes de l'IL-12p35 (a) et de l'IL-12p40 (b).** Les ARNm ont été quantifiés par RT-PCR après des durées d'engagement indiquées de CD1d avec un anticorps spécifique. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

### L'activation des kératinocytes via CD1d induit la sécrétion d'IL-12p70.

Afin de savoir si les transcriptions géniques observées sont suivies dans les faits d'une expression protéique, seule capable de justifier physiologiquement un phénomène cellulaire, nous avons cherché à montrer une augmentation des quantités d'interleukines au niveau protéique. Pour déterminer le niveau de sécrétion d'IL-12 par les kératinocytes stimulés, nous avons analysé les surnageants de culture par un test ELISA spécifique de l'hétérodimère p70. Une induction de la sécrétion par les kératinocytes d'IL-12 sous sa forme bioactive est mise en évidence, avec une moyenne de  $5 \pm 1,2$  pg/mL après 24 heures d'activation (Figure 13). Les concentrations obtenues dans les surnageants de cellules HaCaT activées sont en moyenne supérieures de 1 pg/mL à celles obtenues à partir des kératinocytes (données non représentées).

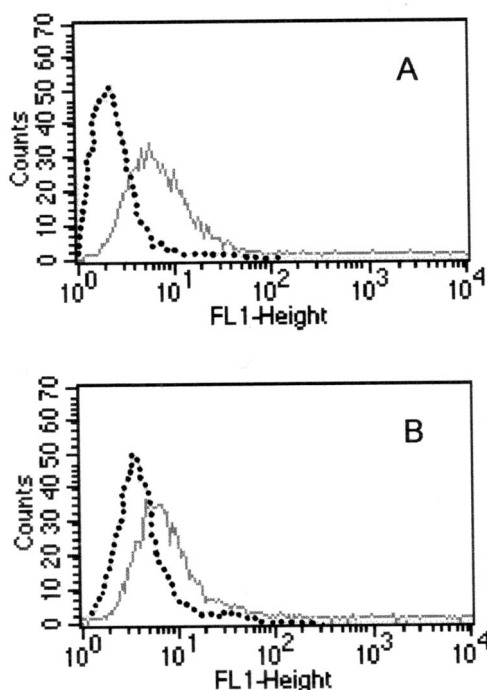


**Figure 13 : Induction de la sécrétion d'IL-12p70 par les kératinocytes activés.** Les surnageants de culture sont récoltés à 0, 12, 18 et 24h d'engagement de CD1d par un anticorps spécifique. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences indépendantes ( $p < 0,001$ ).



**Bien que nos travaux confirment l'expression d'IL-15 à la surface des cellules HaCaT, nous cherchons encore à mettre en évidence une augmentation de la synthèse protéique d'IL-15 par les kératinocytes et les HaCaT activés.**

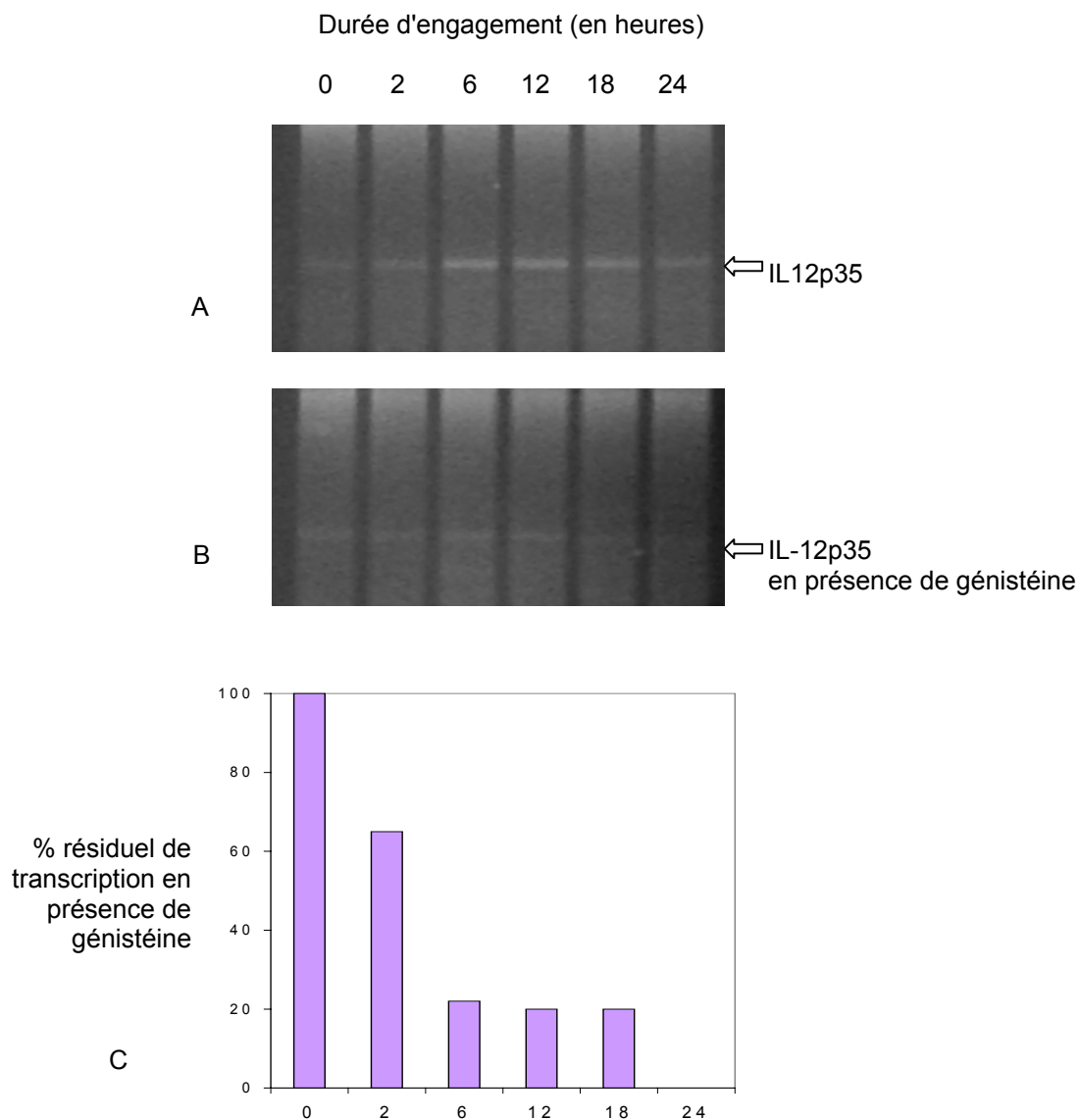
Il a été montré que les kératinocytes normaux et les kératinocytes immortalisés HaCaT expriment l'IL-15 sous une forme non sécrétée restant liée à la membrane de ces cellules [216] ; par conséquent, des cellules HaCaT stimulées via CD1d pendant 24 heures ont été marquées avec un anticorps anti-IL-15 puis analysées en cytométrie de flux. Nos résultats confirment que les cellules HaCaT synthétisent constitutivement de l'IL-15 et que celle-ci reste liée à la membrane (Figure 14). En revanche, la comparaison des intensités moyennes de fluorescence des cellules stimulées pendant 24 h et des cellules contrôles non stimulées ne montre pas de différence de quantité d'IL-15 exprimée à la surface des cellules HaCaT.



**Figure 14 : Les cellules HaCaT expriment constitutivement l'IL-15 reliée à la membrane.** Les cellules stimulées par engagement de CD1d pendant 24h (B) ne montrent pas de différence d'expression de l'IL-15 membranaire par rapport aux cellules non stimulées (A). Les courbes continues correspondent au marquage avec l'Ac anti-IL-15 et les courbes en pointillés au témoin isotypique.

### **La transduction du signal de synthèse de l'IL-12p35 induit par CD1d implique la phosphorylation d'une tyrosine.**

Les phénomènes d'activation cellulaire et de transduction des signaux à l'intérieur des cellules nécessitent fréquemment des réactions de phosphorylation-déphosphorylation, les tyrosine-kinases étant les enzymes dont le rôle est de phosphoryler spécifiquement les tyrosines. Etant donné que la queue intracytoplasmique de la molécule CD1d comporte une unique tyrosine, nous avons souhaité savoir si l'inhibition de ces enzymes peut bloquer la cascade intracellulaire de transduction du signal d'engagement de CD1d et donc se traduire par l'inhibition de la transcription de certains gènes. A cette fin, la stimulation des kératinocytes a été réalisée en présence de 10  $\mu$ M de génistéine, un inhibiteur non spécifique des tyrosine-kinases. Les résultats montrent une inhibition croissante dans le temps de l'induction CD1d-dépendante de transcription du gène de l'IL-12p35 par la génistéine (Figure 15). Nous avons décidé d'analyser l'inhibition de la transcription du gène de l'IL-12p35 car l'induction de sa transcription par le kératinocyte est supérieure à celle du gène de l'IL-12p40 ce qui rend une éventuelle variation du niveau de transcription plus aisée à mettre en évidence [217].



**Figure 15 : La cinétique d'engagement de CD1d à la surface des kératinocytes en présence de génistéine montre une inhibition de la transcription du gène de l'IL-12p35.**

A : Quantification des ARNm d'IL-12p35 par RT-PCR au terme de durées d'engagement indiquées de CD1d.

B et C : Engagement de CD1d à la surface des kératinocytes en présence 10  $\mu$ M de génistéine. Quantification des ARNm par RT-PCR (b) et niveau résiduel de transcription du gène de l'IL-12p35 suite à l'inhibition par la génistéine (analyse de l'intensité des bandes) (c).

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous démontrons l'aptitude de la molécule transmembranaire CD1d à transmettre un signal au kératinocyte. Nous mettons en évidence que l'engagement de CD1d à la surface de cette cellule par des anticorps spécifiques se traduit par l'augmentation de la transcription de gènes de cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire cutanée, l'IL-15 et l'IL-12.

On considère actuellement que le système CD1d se situe à l'interface entre réponse immunitaire innée et acquise. L'interaction entre kératinocytes CD1d<sup>+</sup> et lymphocyte T CD1d-restreints et ses conséquences sont en faveur d'une intervention de ce système dans l'immunité innée. En effet, l'engagement de CD1d sur le kératinocyte induit la sécrétion d'IL-12 bioactive en 12 heures. Cette cytokine est capable d'activer en retour les cellules NK et les lymphocytes CD1d-restreints qui se trouvent en première ligne dans les défenses immunitaires. De plus, les lymphocytes NKT inv activées par l'IL-12 ont la capacité d'activer rapidement plusieurs types de cellules immunitaires et produisent de grandes quantités d'IFN- $\gamma$ . Or, l'IFN- $\gamma$  stimule à son tour de manière non spécifique différentes voies de défense aux sein de la peau et contribue à l'immunité dirigée contre les cellules de mélanomes et de carcinomes et à l'immunité antivirale. L'IL-15 produite par les kératinocytes activés via CD1d s'inscrit aussi dans le cadre de l'immunité innée par son pouvoir chimiotactique sur les cellules NK et en induisant, en synergie avec l'IL-12, la production d'IFN- $\gamma$  par ces cellules [218].

Outre cette implication dans les premières lignes de défense, notre étude élargit la connaissances des possibilités d'intervention du système CD1d dans la réponse immunitaire adaptative. En effet, l'engagement de CD1d à la surface du kératinocyte pourrait intervenir par le biais de la sécrétion d'IL-12 dans l'orientation de la différenciation des lymphocytes T vers le type 1 nécessaire entre autres à la cytotoxicité dirigée contre les cellules infectées par des agents pathogènes intracellulaires. De plus, des cellules NKT inv ont été mises en évidence dans les granulomes de patients atteints de lèpre tuberculoïde [219]. Or, ces lésions relèvent d'un mécanisme d'hypersensibilité retardée et l'IL-12 est connue pour participer à l'induction de ce type de réaction. Il est donc possible que ces lymphocytes T CD1d-restreints jouent un rôle dans la formation des granulomes comme c'est le cas chez la souris [178] et que ce phénomène soit médié par la synthèse CD1d-dépendante d'IL-12. L'IL-15 participe également à l'immunité spécifique anti-infectieuse en favorisant la réponse lymphocytaire T cutanée dirigée contre les bactéries intracellulaires [220]. Le système CD1d semble donc joué un rôle à la fois effecteur et régulateur dans l'immunité adaptative.

L'implication des lymphocytes T CD1d-restreints et donc du système CD1d dans la physiopathogénie de diverses dermatoses est illustrée par plusieurs études. La molécule CD1d est surexprimée à la surface des kératinocytes des plaques de psoriasis [54] et des infiltrats de lymphocytes T exprimant les marqueurs NK CD161 et CD94 ont été mis en évidence au sein de l'épiderme des plaques de psoriasis. Ces données suggéraient déjà une participation du système CD1d dans la pathogénie du psoriasis mais il existe un argument plus direct : chez des souris SCID, l'injection au sein d'un greffon de peau asymptomatique d'un patient psoriasique de lymphocytes T CD1d-restreints autologues induit la production CD1d-dépendante de grandes quantités d'IFN- $\gamma$  et le développement d'une plaque de psoriasis [214]. Par ailleurs, nous montrons que l'engagement de CD1d induit *in vitro* l'augmentation de la transcription du gène de l'IL-15. Or, cette cytokine est connue pour son rôle déterminant dans la survie et l'homéostasie des cellules NK et NKT inv. La persistance des lymphocytes T CD1d-restreints observée dans le greffon de peau psoriasique pourrait donc être favorisée par l'aptitude de ces lymphocytes à induire la synthèse d'IL-15 par les kératinocytes suite à l'engagement de CD1d. C'est dans cet environnement cytokinique que certaines sous populations lymphocytaires CD1d-restreintes peuvent se maintenir et exercer leur pathogénicité au sein de l'épiderme. En outre, la sécrétion d'IL-12 par le kératinocyte activé est susceptible d'induire une réponse de type 1 notamment au travers de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK et NKT inv. L'interaction CD1d:TCR se situe donc au centre de cette boucle d'amplification et les lymphocytes CD1d-restreints sont ainsi susceptibles d'altérer l'homéostasie cutanée, à la fois directement via leur propre activation et indirectement en modulant la physiologie kératinocytaire de manière CD1d-dépendante. En effet, l'IFN- $\gamma$  qui résulte de l'activation réciproque de ces deux types cellulaires est impliqué dans la pathogénie de nombreuses dermatoses inflammatoires chroniques.

L'IL-15, en restant reliée à la membrane des kératinocytes exerce ces effets au sein de l'épiderme de manière paracrine. Ce mode d'action combiné à l'effet anti-apoptotique de cette cytokine sur les kératinocytes et à sa surexpression au sein des plaques de psoriasis suggère que l'IL-15 pourrait contribuer au phénomène d'hyperprolifération kératinocytaire observée dans cette maladie [216].

Bien que notre étude révèle une augmentation CD1d-dépendante du niveau de transcription du gène de l'IL-15 par les kératinocytes humains normaux, cette observation n'est pas reproduite avec les cellules HaCaT ; l'absence de réactivité des HaCaT à l'engagement de CD1d est possiblement due à un niveau basal de transcription du gène de l'IL-15 plus élevé dans ces cellules tumorales et peut-être déjà maximal, ceci empêchant la cellule de répondre à

la stimulation extracellulaire. Cette hypothèse expliquerait nos difficultés à montrer une variation de la quantité de protéine IL-15 exprimée à la surface des cellules HaCaT activées en comparaison des cellules non stimulées. Ce point reste à éclaircir en réalisant les expériences sur des kératinocytes humains normaux qui présentent une plus grande sensibilité à l'induction de la transcription du gène de l'IL-15. D'autre part, nous n'avons pour l'heure quantifié la présence d'IL-15 à la membrane des kératinocytes qu'au terme de 24 heures d'activation et il n'est pas exclu que l'expression de cette cytokine soit plus tardive. Nous envisageons par conséquent d'analyser l'expression de l'IL-15 à différents temps d'activation. Néanmoins, l'hypothèse d'une absence de traduction des ARNm d'IL-15 en protéine ne peut être écartée ; en effet, cette cytokine qui ne peut pas mettre en évidence par ELISA ni par test de lymphoprolifération à partir des surnageants de culture en raison de son expression membranaire possède de multiples mécanismes de régulation post-transcriptionnels.

Une étude a montré que l'engagement de CD1d à la surface des cellules de l'épithélium intestinal induit la transcription du gène de l'IL-10. Ce phénomène implique la phosphorylation par des kinases de l'unique acide aminé tyrosine compris dans la séquence intracytoplasmique de CD1d [221]. Les tyrosine-kinases sont également impliquées dans la transduction du signal d'engagement de CD1d dans le kératinocyte ; en effet, nos résultats révèlent une inhibition croissante dans le temps de la transcription du gène de l'IL-12p35 en présence d'un inhibiteur de ces enzymes. En revanche, la non-spécificité de l'inhibiteur utilisé ne nous permet pas de conclure à la phosphorylation spécifique de la tyrosine de la séquence intracytoplasmique de CD1d. Nous envisageons actuellement un protocole d'immunoprécipitation et de purification des protéines CD1d issues des kératinocytes activés suivi d'un transfert sur membrane de nitrocellulose afin de révéler d'éventuelles molécules CD1d phosphorylées grâce à un anticorps anti-phosphotyrosine.

Notre étude suggère que le système CD1d est capable d'orienter le système immunitaire vers une réponse de type 1 qui paraît adaptée au sein d'un épithélium confronté à de multiples agressions tel que l'épiderme. Etant donné la place importante que l'IL-18 occupe dans l'immunité innée, nous prévoyons d'étudier les conséquences de l'engagement de CD1d sur la synthèse de cette cytokine pro-inflammatoire par les kératinocytes. Toutefois, la principale perspective de ce travail repose sur l'étude de l'activation du kératinocyte lors de co-cultures de kératinocytes humains normaux et de clones T CD1d-restreints dans le but de savoir si l'interaction de ces deux types cellulaires est modulée par d'autres médiateurs (membranaires ou solubles) de signaux de co-stimulation.







# Conclusion

La glycoprotéine transmembranaire CD1d est une molécule présentatrice d'antigènes semblable aux molécules du CMH de classe I. Elle se singularise par son aptitude à présenter des antigènes lipidiques, autologues ou étrangers à des lymphocytes T CD1d-restreints et par les processus intracellulaires conduisant à cette présentation. Les lymphocytes T CD1d-restreints sont hétérogènes du point de vue leur phénotype et de leurs effets (effecteurs et régulateurs) sur la réponse immunitaire. Du fait de leur capacité à sécréter rapidement de grandes quantités de nombreuses cytokines, ces lymphocytes participent tant à l'immunité innée qu'adaptative et établissent un pont entre ces deux versants des défenses immunitaires.

Bien que CD1d soit exprimée par de plusieurs types cellulaires au sein de la peau humaine, sa fonction demeure peu connue. Nous montrons *in vitro* que l'oligomérisation de CD1d à la surface du kératinocyte induit une augmentation de la transcription des gènes codant l'IL-15 et les deux chaînes p35 et p40 de l'IL-12. Au niveau protéique, l'analyse des surnageants de culture met en évidence une sécrétion croissante de l'hétérodimère bioactif IL-12p70. Ces cytokines sont impliquées dans la régulation de l'immunité cutanée et le développement de certaines dermatoses inflammatoires.

Les connaissances concernant le système CD1d sont aujourd'hui suffisamment étayées chez la souris et l'homme pour justifier et encourager des études d'immunologie tant fondamentale que clinique chez d'autres Mammifères exprimant la molécule CD1d.

**Le Professeur responsable  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon**



Th. Marchal

**Vu : Le Directeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon**



**Le Président de la thèse**



**Vu et permis d'imprimer**

Lyon, le 27 JAN 2006

**Pour le Président de l'Université,  
Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales,  
Professeur D. VITAL-DURAND**





# Références

1. Revillard JP, *Immunologie*, 4<sup>e</sup> éd. De Boeck Université ed. 2001, Bruxelles. 595 pp.
2. Calabi F et Milstein C. A novel family of human major histocompatibility complex-related genes not mapping to chromosome 6. *Nature*. 1986, 323: 540-3.
3. Martin LH, Calabi F et Milstein C. Isolation of CD1 genes: a family of major histocompatibility complex-related differentiation antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986, 83: 9154-8.
4. Martin LH, Calabi F, Lefebvre FA, Bilsland CA et Milstein C. Structure and expression of the human thymocyte antigens CD1a, CD1b, and CD1c. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987, 84: 9189-93.
5. Yu CY et Milstein C. A physical map linking the five CD1 human thymocyte differentiation antigen genes. *Embo J*. 1989, 8: 3727-32.
6. Balk SP, Bleicher PA et Terhorst C. Isolation and characterization of a cDNA and gene coding for a fourth CD1 molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989, 86: 252-6.
7. Brigl M et Brenner MB. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol*. 2004, 22: 817-90.
8. Calabi F, Jarvis JM, Martin L et Milstein C. Two classes of CD1 genes. *Eur J Immunol*. 1989, 19: 285-92.
9. Angenieux C, Salamero J, Fricker D, Cazenave JP, Goud B, Hanau D et de La Salle H. Characterization of CD1e, a third type of CD1 molecule expressed in dendritic cells. *J Biol Chem*. 2000, 275: 37757-64.
10. Angenieux C, Salamero J, Fricker D, Wurtz JM, Maitre B, Cazenave JP, Hanau D et de la Salle H. Common characteristics of the human and rhesus macaque CD1e molecules: conservation of biochemical and biological properties during primate evolution. *Immunogenetics*. 2003, 54: 842-9.
11. Han M, Hannick LI, DiBrino M et Robinson MA. Polymorphism of human CD1 genes. *Tissue Antigens*. 1999, 54: 122-7.
12. Jones DC, Gelder CM, Ahmad T, Campbell IA, Barnardo MC, Welsh KI, Marshall SE et Bunce M. CD1 genotyping of patients with Mycobacterium malmoense pulmonary disease. *Tissue Antigens*. 2001, 58: 19-23.
13. Balk SP, Bleicher PA et Terhorst C. Isolation and expression of cDNA encoding the murine homologues of CD1. *J Immunol*. 1991, 146: 768-74.

14. Katabami S, Matsuura A, Chen HZ, Imai K et Kikuchi K. Structural organization of rat CD1 typifies evolutionarily conserved CD1D class genes. *Immunogenetics*. 1998, 48: 22-31.
15. Miller MM, Wang C, Parisini E, Coletta RD, Goto RM, Lee SY, Barral DC, Townes M, Roura-Mir C, Ford HL, Brenner MB et Dascher CC. Characterization of two avian MHC-like genes reveals an ancient origin of the CD1 family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, 102: 8674-9.
16. Bradbury A, Belt KT, Neri TM, Milstein C et Calabi F. Mouse CD1 is distinct from and co-exists with TL in the same thymus. *Embo J*. 1988, 7: 3081-6.
17. Dascher CC, Hiromatsu K, Naylor JW, Brauer PP, Brown KA, Storey JR, Behar SM, Kawasaki ES, Porcelli SA, Brenner MB et LeClair KP. Conservation of a CD1 multigene family in the guinea pig. *J Immunol*. 1999, 163: 5478-88.
18. Calabi F et Milstein C. The molecular biology of CD1. *Semin Immunol*. 2000, 12: 503-9.
19. Calabi F, Belt KT, Yu CY, Bradbury A, Mandy WJ et Milstein C. The rabbit CD1 and the evolutionary conservation of the CD1 gene family. *Immunogenetics*. 1989, 30: 370-7.
20. Hayes SM et Knight KL. Group 1 CD1 genes in rabbit. *J Immunol*. 2001, 166: 403-10.
21. Dascher CC et Brenner MB. Evolutionary constraints on CD1 structure: insights from comparative genomic analysis. *Trends Immunol*. 2003, 24: 412-8.
22. Chun T, Wang K, Zuckermann FA et Gaskins HR. Molecular cloning and characterization of a novel CD1 gene from the pig. *J Immunol*. 1999, 162: 6562-71.
23. Hopkins J, Dutia BM et Rhind SM. Sheep CD1 genes and proteins. *Vet Immunol Immunopathol*. 2000, 73: 3-14.
24. Rhind SM, Hopkins J et Grant ES. Differential expression of ovine CD1. *Immunology*. 2000, 101: 452-7.
25. Steinbach F, Stark R, Ibrahim S, Gawad EA, Ludwig H, Walter J, Commandeur U et Mauel S. Molecular cloning and characterization of markers and cytokines for equid myeloid cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005, 108: 227-36.
26. Parsons K, Howard CJ et Sopp P. Immunohistology of workshop monoclonal antibodies to the bovine homologue of CD1. *Vet Immunol Immunopathol*. 1991, 27: 201-6.
27. Woo JC et Moore PF. A feline homologue of CD1 is defined using a feline-specific monoclonal antibody. *Tissue Antigens*. 1997, 49: 244-51.

28. Saint-Andre Marchal I, Dezutter-Dambuyant C, Willett BJ, Woo JC, Moore PF, Magnol JP, Schmitt D et Marchal T. Immunophenotypic characterization of feline Langerhans cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997, 58: 1-16.
29. Moore PF, Schrenzel MD, Affolter VK, Olivry T et Naydan D. Canine cutaneous histiocytoma is an epidermotropic Langerhans cell histiocytosis that expresses CD1 and specific beta 2-integrin molecules. *Am J Pathol.* 1996, 148: 1699-708.
30. Kashiwase K, Kikuchi A, Ando Y, Nicol A, Porcelli SA, Tokunaga K, Omine M, Satake M, Juji T, Nieda M et Koezuka Y. The CD1d natural killer T-cell antigen presentation pathway is highly conserved between humans and rhesus macaques. *Immunogenetics.* 2003, 54: 776-81.
31. Salomonsen J, Sorensen MR, Marston DA, Rogers SL, Collen T, van Hateren A, Smith AL, Beal RK, Skjodt K et Kaufman J. Two CD1 genes map to the chicken MHC, indicating that CD1 genes are ancient and likely to have been present in the primordial MHC. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, 102: 8668-73.
32. Porcelli S et Modlin R. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Ann Rev Immunol.* 1999, 17: 297-329.
33. Porcelli SA. Bird genes give new insights into the origins of lipid antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, 102: 8399-400.
34. Chen QY et Jackson N. Human CD1D gene has TATA boxless dual promoters: an SP1-binding element determines the function of the proximal promoter. *J Immunol.* 2004, 172: 5512-21.
35. Geng Y, Laslo P, Barton K et Wang CR. Transcriptional regulation of CD1D1 by Ets family transcription factors. *J Immunol.* 2005, 175: 1022-9.
36. Woolfson A et Milstein C. Alternative splicing generates secretory isoforms of human CD1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994, 91: 6683-7.
37. Kojo S, Adachi Y, Tsutsumi A et Sumida T. Alternative splicing forms of the human CD1D gene in mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000, 276: 107-11.
38. Roark JH, Park SH, Jayawardena J, Kavita U, Shannon M et Bendelac A. CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. *J Immunol.* 1998, 160: 3121-7.
39. Balk SP, Burke S, Polischuk JE, Frantz ME, Yang L, Porcelli S, Colgan SP et Blumberg RS. Beta 2-microglobulin-independent MHC class Ib molecule expressed by human intestinal epithelium. *Science.* 1994, 265: 259-62.

40. Kim HS, Garcia J, Exley M, Johnson KW, Balk SP et Blumberg RS. Biochemical characterization of CD1d expression in the absence of beta2-microglobulin. *J Biol Chem.* 1999, 274: 9289-95.
41. Zeng Z, Castano AR, Segelke BW, Stura EA, Peterson PA et Wilson IA. Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science.* 1997, 277: 339-45.
42. Zajonc DM, Cantu C, 3rd, Mattner J, Zhou D, Savage PB, Bendelac A, Wilson IA et Teyton L. Structure and function of a potent agonist for the semi-invariant natural killer T cell receptor. *Nat Immunol.* 2005, 6: 810-8.
43. Koch M, Stronge VS, Shepherd D, Gadola SD, Mathew B, Ritter G, Fersht AR, Besra GS, Schmidt RR, Jones EY et Cerundolo V. The crystal structure of human CD1d with and without alpha-galactosylceramide. *Nat Immunol.* 2005, 6: 819-26.
44. Giabbai B, Sidobre S, Crispin MD, Sanchez-Ruiz Y, Bachi A, Kronenberg M, Wilson IA et Degano M. Crystal structure of mouse CD1d bound to the self ligand phosphatidylcholine: a molecular basis for NKT cell activation. *J Immunol.* 2005, 175: 977-84.
45. Exley M, Garcia J, Wilson SB, Spada F, Gerdes D, Tahir SM, Patton KT, Blumberg RS, Porcelli S, Chott A et Balk SP. CD1d structure and regulation on human thymocytes, peripheral blood T cells, B cells and monocytes. *Immunology.* 2000, 100: 37-47.
46. Salamone MC, Rabinovich GA, Mendiguren AK, Salamone GV et Fainboim L. Activation-induced expression of CD1d antigen on mature T cells. *J Leukoc Biol.* 2001, 69: 207-14.
47. Brossay L, Jullien D, Cardell S, Sydora BC, Burdin N, Modlin RL et Kronenberg M. Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells. *J Immunol.* 1997, 159: 1216-24.
48. Mandal M, Chen XR, Alegre ML, Chiu NM, Chen YH, Castano AR et Wang CR. Tissue distribution, regulation and intracellular localization of murine CD1 molecules. *Mol Immunol.* 1998, 35: 525-36.
49. Chen YH, Wang B, Chun T, Zhao L, Cardell S, Behar SM, Brenner MB et Wang CR. Expression of CD1d2 on thymocytes is not sufficient for the development of NK T cells in CD1d1-deficient mice. *J Immunol.* 1999, 162: 4560-6.
50. Blumberg RS, Terhorst C, Bleicher P, McDermott FV, Allan CH, Landau SB, Trier JS et Balk SP. Expression of a nonpolymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells. *J Immunol.* 1991, 147: 2518-24.
51. Amano M, Baumgarth N, Dick MD, Brossay L, Kronenberg M, Herzenberg LA et Strober S. CD1 expression defines subsets of follicular and marginal zone B cells in the

- spleen: beta 2-microglobulin-dependent and independent forms. *J Immunol.* 1998, 161: 1710-7.
52. Spada FM, Borriello F, Sugita M, Watts GF, Koezuka Y et Porcelli SA. Low expression level but potent antigen presenting function of CD1d on monocyte lineage cells. *Eur J Immunol.* 2000, 30: 3468-77.
  53. Skold M, Xiong X, Illarionov PA, Besra GS et Behar SM. Interplay of cytokines and microbial signals in regulation of CD1d expression and NKT cell activation. *J Immunol.* 2005, 175: 3584-93.
  54. Bonish B, Jullien D, Dutronc Y, Huang BB, Modlin R, Spada FM, Porcelli SA et Nickoloff BJ. Overexpression of CD1d by keratinocytes in psoriasis and CD1d-dependent IFN-gamma production by NK-T cells. *J Immunol.* 2000, 165: 4076-85.
  55. Gerlini G, Hefti HP, Kleinhans M, Nickoloff BJ, Burg G et Nestle FO. Cd1d is expressed on dermal dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells. *J Invest Dermatol.* 2001, 117: 576-82.
  56. Ronger-Savle S, Valladeau J, Claudy A, Schmitt D, Peguet-Navarro J, Dezutter-Dambuyant C, Thomas L et Jullien D. TGFbeta inhibits CD1d expression on dendritic cells. *J Invest Dermatol.* 2005, 124: 116-8.
  57. Canchis PW, Bhan AK, Landau SB, Yang L, Balk SP et Blumberg RS. Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d. *Immunology.* 1993, 80: 561-5.
  58. Colgan SP, Pitman RS, Nagaishi T, Mizoguchi A, Mizoguchi E, Mayer LF, Shao L, Sartor RB, Subjeck JR et Blumberg RS. Intestinal heat shock protein 110 regulates expression of CD1d on intestinal epithelial cells. *J Clin Invest.* 2003, 112: 745-54.
  59. Bleicher PA, Balk SP, Hagen SJ, Blumberg RS, Flotte TJ et Terhorst C. Expression of murine CD1 on gastrointestinal epithelium. *Science.* 1990, 250: 679-82.
  60. Burke S, Landau S, Green R, Tseng CC, Nattakom T, Canchis W, Yang L, Kaiserlian D, Gispach C, Balk S et al. Rat cluster of differentiation 1 molecule: expression on the surface of intestinal epithelial cells and hepatocytes. *Gastroenterology.* 1994, 106: 1143-9.
  61. Lantz O et Bendelac A. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med.* 1994, 180: 1097-106.
  62. Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB et Balk SP. 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.* 1993, 178: 1-16.

63. Matsuura A, Kinebuchi M, Chen HZ, Katabami S, Shimizu T, Hashimoto Y, Kikuchi K et Sato N. NKT cells in the rat: organ-specific distribution of NK T cells expressing distinct V alpha 14 chains. *J Immunol.* 2000, 164: 3140-8.
64. Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T et Brenner MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med.* 2002, 195: 625-36.
65. Lee PT, Benlagha K, Teyton L et Bendelac A. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med.* 2002, 195: 637-41.
66. van Der Vliet HJ, Nishi N, de Gruijl TD, von Blomberg BM, van den Eertwegh AJ, Pinedo HM, Giaccone G et Scheper RJ. Human natural killer T cells acquire a memory-activated phenotype before birth. *Blood.* 2000, 95: 2440-2.
67. D'Andrea A, Goux D, De Lalla C, Koezuka Y, Montagna D, Moretta A, Dellabona P, Casorati G et Abrignani S. Neonatal invariant Valpha24+ NKT lymphocytes are activated memory cells. *Eur J Immunol.* 2000, 30: 1544-50.
68. Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, Nakayama T, Taniguchi M, Wang CR, Koezuka Y et Kronenberg M. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med.* 2000, 192: 741-54.
69. Motsinger A, Azimzadeh A, Stanic AK, Johnson RP, Van Kaer L, Joyce S et Unutmaz D. Identification and simian immunodeficiency virus infection of CD1d-restricted macaque natural killer T cells. *J Virol.* 2003, 77: 8153-8.
70. Cardell S, Tangri S, Chan S, Kronenberg M, Benoist C et Mathis D. CD1-restricted CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *J Exp Med.* 1995, 182: 993-1004.
71. Chiu YH, Jayawardena J, Weiss A, Lee D, Park SH, Dautry-Varsat A et Bendelac A. Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments. *J Exp Med.* 1999, 189: 103-10.
72. Park SH, Weiss A, Benlagha K, Kyn T, Teyton L et Bendelac A. The mouse CD1d-restricted repertoire is dominated by a few autoreactive T cell receptor families. *J Exp Med.* 2001, 193: 893-904.
73. Huber S, Sartini D et Exley M. Role of CD1d in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Immunol.* 2003, 170: 3147-53.
74. Exley MA, Tahir SM, Cheng O, Shaulov A, Joyce R, Avigan D, Sackstein R et Balk SP. A major fraction of human bone marrow lymphocytes are Th2-like CD1d-reactive T cells that can suppress mixed lymphocyte responses. *J Immunol.* 2001, 167: 5531-4.



75. Kobayashi E, Motoki K, Uchida T, Fukushima H et Koezuka Y. KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. *Oncol Res.* 1995, 7: 529-34.
76. Giaccone G, Punt CJ, Ando Y, Ruijter R, Nishi N, Peters M, von Blomberg BM, Scheper RJ, van der Vliet HJ, van den Eertwegh AJ, Roelvink M, Beijnen J, Zwierzina H et Pinedo HM. A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2002, 8: 3702-9.
77. Nieda M, Okai M, Tazbirkova A, Lin H, Yamaura A, Ide K, Abraham R, Juji T, Macfarlane DJ et Nicol AJ. Therapeutic activation of Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood.* 2004, 103: 383-9.
78. Park SH, Benlagha K, Lee D, Balish E et Bendelac A. Unaltered phenotype, tissue distribution and function of Valpha14(+) NKT cells in germ-free mice. *Eur J Immunol.* 2000, 30: 620-5.
79. Joyce S, Woods AS, Yewdell JW, Bennink JR, De Silva AD, Boesteanu A, Balk SP, Cotter RJ et Brutkiewicz RR. Natural ligand of mouse CD1d1: cellular glycosylphosphatidylinositol. *Science.* 1998, 279: 1541-4.
80. Park JJ, Kang SJ, De Silva AD, Stanic AK, Casorati G, Hachey DL, Cresswell P et Joyce S. Lipid-protein interactions: biosynthetic assembly of CD1 with lipids in the endoplasmic reticulum is evolutionarily conserved. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101: 1022-6.
81. Kang SJ et Cresswell P. Saposins facilitate CD1d-restricted presentation of an exogenous lipid antigen to T cells. *Nat Immunol.* 2004, 5: 175-81.
82. Gumperz JE, Roy C, Makowska A, Lum D, Sugita M, Podrebarac T, Koezuka Y, Porcelli SA, Cardell S, Brenner MB et Behar SM. Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids. *Immunity.* 2000, 12: 211-21.
83. Rauch J, Gumperz J, Robinson C, Skold M, Roy C, Young DC, Lafleur M, Moody DB, Brenner MB, Costello CE et Behar SM. Structural features of the acyl chain determine self-phospholipid antigen recognition by a CD1d-restricted invariant NKT (iNKT) cell. *J Biol Chem.* 2003, 278: 47508-15.
84. Zhou D, Mattner J, Cantu C, 3rd, Schrantz N, Yin N, Gao Y, Sagiv Y, Hudspeth K, Wu YP, Yamashita T, Teneberg S, Wang D, Proia RL, Lavery SB, Savage PB, Teyton L et Bendelac A. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science.* 2004, 306: 1786-9.
85. Jahng A, Maricic I, Aguilera C, Cardell S, Halder RC et Kumar V. Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. *J Exp Med.* 2004, 199: 947-57.

86. Wu DY, Segal NH, Sidobre S, Kronenberg M et Chapman PB. Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *J Exp Med*. 2003, 198: 173-81.
87. Schofield L, McConville MJ, Hansen D, Campbell AS, Fraser-Reid B, Grusby MJ et Tachado SD. CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. *Science*. 1999, 283: 225-9.
88. Molano A, Park SH, Chiu YH, Nossair S, Bendelac A et Tsuji M. Cutting edge: the IgG response to the circumsporozoite protein is MHC class II-dependent and CD1d-independent: exploring the role of GPIs in NK T cell activation and antimalarial responses. *J Immunol*. 2000, 164: 5005-9.
89. Procopio DO, Almeida IC, Torrecilhas AC, Cardoso JE, Teyton L, Travassos LR, Bendelac A et Gazzinelli RT. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins from *Trypanosoma cruzi* bind to CD1d but do not elicit dominant innate or adaptive immune responses via the CD1d/NKT cell pathway. *J Immunol*. 2002, 169: 3926-33.
90. Kinjo Y, Wu D, Kim G, Xing GW, Poles MA, Ho DD, Tsuji M, Kawahara K, Wong CH et Kronenberg M. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature*. 2005, 434: 520-5.
91. Mattner J, Debord KL, Ismail N, Goff RD, Cantu C, 3rd, Zhou D, Saint-Mezard P, Wang V, Gao Y, Yin N, Hoebe K, Schneewind O, Walker D, Beutler B, Teyton L, Savage PB et Bendelac A. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature*. 2005, 434: 525-9.
92. Fischer K, Scotet E, Niemeyer M, Koebernick H, Zerrahn J, Maillet S, Hurwitz R, Kursar M, Bonneville M, Kaufmann SH et Schaible UE. Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, 101: 10685-90.
93. Amprey JL, Im JS, Turco SJ, Murray HW, Illarionov PA, Besra GS, Porcelli SA et Spath GF. A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. *J Exp Med*. 2004, 200: 895-904.
94. Van Rhijn I, Young DC, Im JS, Lavery SB, Illarionov PA, Besra GS, Porcelli SA, Gumperz J, Cheng TY et Moody DB. CD1d-restricted T cell activation by nonlipidic small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, 101: 13578-83.
95. Castano AR, Tangri S, Miller JE, Holcombe HR, Jackson MR, Huse WD, Kronenberg M et Peterson PA. Peptide binding and presentation by mouse CD1. *Science*. 1995, 269: 223-6.
96. Lee DJ, Abeyratne A, Carson DA et Corr M. Induction of an antigen-specific, CD1-restricted cytotoxic T lymphocyte response In vivo. *J Exp Med*. 1998, 187: 433-8.

97. Naidenko OV, Maher JK, Ernst WA, Sakai T, Modlin RL et Kronenberg M. Binding and antigen presentation of ceramide-containing glycolipids by soluble mouse and human CD1d molecules. *J Exp Med.* 1999, 190: 1069-80.
98. Cantu C, 3rd, Benlagha K, Savage PB, Bendelac A et Teyton L. The paradox of immune molecular recognition of alpha-galactosylceramide: low affinity, low specificity for CD1d, high affinity for alpha beta TCRs. *J Immunol.* 2003, 170: 4673-82.
99. Benlagha K, Weiss A, Beavis A, Teyton L et Bendelac A. In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *J Exp Med.* 2000, 191: 1895-903.
100. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, Koseki H et Taniguchi M. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science.* 1997, 278: 1626-9.
101. Oki S, Chiba A, Yamamura T et Miyake S. The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL-4 production by modified glycolipid-stimulated NKT cells. *J Clin Invest.* 2004, 113: 1631-40.
102. Yu KO, Im JS, Molano A, Dutronc Y, Illarionov PA, Forestier C, Fujiwara N, Arias I, Miyake S, Yamamura T, Chang YT, Besra GS et Porcelli SA. Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of alpha-galactosylceramides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, 102: 3383-8.
103. Brossay L, Naidenko O, Burdin N, Matsuda J, Sakai T et Kronenberg M. Structural requirements for galactosylceramide recognition by CD1-restricted NK T cells. *J Immunol.* 1998, 161: 5124-8.
104. Miyamoto K, Miyake S et Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature.* 2001, 413: 531-4.
105. Sidobre S, Hammond KJ, Benazet-Sidobre L, Maltsev SD, Richardson SK, Ndonge RM, Howell AR, Sakai T, Besra GS, Porcelli SA et Kronenberg M. The T cell antigen receptor expressed by Valpha14i NKT cells has a unique mode of glycosphingolipid antigen recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101: 12254-9.
106. Wu D, Xing GW, Poles MA, Horowitz A, Kinjo Y, Sullivan B, Bodmer-Narkevitch V, Plettenburg O, Kronenberg M, Tsuji M, Ho DD et Wong CH. Bacterial glycolipids and analogs as antigens for CD1d-restricted NKT cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, 102: 1351-6.
107. Burdin N, Brossay L, Degano M, Iijima H, Gui M, Wilson IA et Kronenberg M. Structural requirements for antigen presentation by mouse CD1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, 97: 10156-61.

108. Gui M, Li J, Wen LJ, Hardy RR et Hayakawa K. TCR beta chain influences but does not solely control autoreactivity of V alpha 14J281T cells. *J Immunol.* 2001, 167: 6239-46.
109. Sidobre S, Naidenko OV, Sim BC, Gascoigne NR, Garcia KC et Kronenberg M. The V alpha 14 NKT cell TCR exhibits high-affinity binding to a glycolipid/CD1d complex. *J Immunol.* 2002, 169: 1340-8.
110. Sim BC, Holmberg K, Sidobre S, Naidenko O, Niederberger N, Marine SD, Kronenberg M et Gascoigne NR. Surprisingly minor influence of TRAV11 (Valpha14) polymorphism on NK T-receptor mCD1/alpha-galactosylceramide binding kinetics. *Immunogenetics.* 2003, 54: 874-83.
111. Schumann J, Voyle RB, Wei BY et MacDonald HR. Cutting edge: influence of the TCR V beta domain on the avidity of CD1d:alpha-galactosylceramide binding by invariant V alpha 14 NKT cells. *J Immunol.* 2003, 170: 5815-9.
112. Brossay L, Chioda M, Burdin N, Koezuka Y, Casorati G, Dellabona P et Kronenberg M. CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J Exp Med.* 1998, 188: 1521-8.
113. Kang SJ et Cresswell P. Calnexin, calreticulin, and ERp57 cooperate in disulfide bond formation in human CD1d heavy chain. *J Biol Chem.* 2002, 277: 44838-44.
114. Brozovic S, Nagaishi T, Yoshida M, Betz S, Salas A, Chen D, Kaser A, Glickman J, Kuo T, Little A, Morrison J, Corazza N, Kim JY, Colgan SP, Young SG, Exley M et Blumberg RS. CD1d function is regulated by microsomal triglyceride transfer protein. *Nat Med.* 2004, 10: 535-9.
115. Jayawardena-Wolf J, Benlagha K, Chiu YH, Mehr R et Bendelac A. CD1d endosomal trafficking is independently regulated by an intrinsic CD1d-encoded tyrosine motif and by the invariant chain. *Immunity.* 2001, 15: 897-908.
116. Kang SJ et Cresswell P. Regulation of intracellular trafficking of human CD1d by association with MHC class II molecules. *Embo J.* 2002, 21: 1650-60.
117. Rodionov DG, Nordeng TW, Pedersen K, Balk SP et Bakke O. A critical tyrosine residue in the cytoplasmic tail is important for CD1d internalization but not for its basolateral sorting in MDCK cells. *J Immunol.* 1999, 162: 1488-95.
118. Lawton AP, Prigozy TI, Brossay L, Pei B, Khurana A, Martin D, Zhu T, Spate K, Ozga M, Honing S, Bakke O et Kronenberg M. The mouse CD1d cytoplasmic tail mediates CD1d trafficking and antigen presentation by adaptor protein 3-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol.* 2005, 174: 3179-86.
119. Elewaut D, Lawton AP, Nagarajan NA, Maverakis E, Khurana A, Honing S, Benedict CA, Sercarz E, Bakke O, Kronenberg M et Prigozy TI. The adaptor protein AP-3 is required for CD1d-mediated antigen presentation of glycosphingolipids and development of Valpha14i NKT cells. *J Exp Med.* 2003, 198: 1133-46.

120. Cernadas M, Sugita M, van der Wel N, Cao X, Gumperz JE, Maltsev S, Besra GS, Behar SM, Peters PJ et Brenner MB. Lysosomal localization of murine CD1d mediated by AP-3 is necessary for NK T cell development. *J Immunol.* 2003, 171: 4149-55.
121. Sugita M, Cao X, Watts GF, Rogers RA, Bonifacino JS et Brenner MB. Failure of trafficking and antigen presentation by CD1 in AP-3-deficient cells. *Immunity.* 2002, 16: 697-706.
122. Chiu YH, Park SH, Benlagha K, Forestier C, Jayawardena-Wolf J, Savage PB, Teyton L et Bendelac A. Multiple defects in antigen presentation and T cell development by mice expressing cytoplasmic tail-truncated CD1d. *Nat Immunol.* 2002, 3: 55-60.
123. Prigozy TI, Naidenko O, Qasba P, Elewaut D, Brossay L, Khurana A, Natori T, Koezuka Y, Kulkarni A et Kronenberg M. Glycolipid antigen processing for presentation by CD1d molecules. *Science.* 2001, 291: 664-7.
124. Honey K, Benlagha K, Beers C, Forbush K, Teyton L, Kleijmeer MJ, Rudensky AY et Bendelac A. Thymocyte expression of cathepsin L is essential for NKT cell development. *Nat Immunol.* 2002, 3: 1069-74.
125. Zhou D, Cantu C, 3rd, Sagiv Y, Schrantz N, Kulkarni AB, Qi X, Mahuran DJ, Morales CR, Grabowski GA, Benlagha K, Savage P, Bendelac A et Teyton L. Editing of CD1d-bound lipid antigens by endosomal lipid transfer proteins. *Science.* 2004, 303: 523-7.
126. van den Elzen P, Garg S, Leon L, Brigl M, Leadbetter EA, Gumperz JE, Dascher CC, Cheng TY, Sacks FM, Illarionov PA, Besra GS, Kent SC, Moody DB et Brenner MB. Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature.* 2005, 437: 906-10.
127. Sriram V, Du W, Gervay-Hague J et Brutkiewicz RR. Cell wall glycosphingolipids of *Sphingomonas paucimobilis* are CD1d-specific ligands for NKT cells. *Eur J Immunol.* 2005, 35: 1692-701.
128. Tailleux L, Schwartz O, Herrmann J, Pivert E, Jackson M, Amara A, Legres L, Dreher D, Nicod L, Gluckman J, Lagrange P, Gicquel B et Neyrolles O. DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J Exp Med.* 2003, 197: 121-7.
129. Gapin L, Matsuda JL, Surh CD et Kronenberg M. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol.* 2001, 2: 971-8.
130. Benlagha K, Kyin T, Beavis A, Teyton L et Bendelac A. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science.* 2002, 296: 553-5.
131. Pellicci DG, Hammond KJ, Uldrich AP, Baxter AG, Smyth MJ et Godfrey DI. A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. *J Exp Med.* 2002, 195: 835-44.

132. Coles MC et Raulet DH. NK1.1+ T cells in the liver arise in the thymus and are selected by interactions with class I molecules on CD4+CD8+ cells. *J Immunol.* 2000, 164: 2412-8.
133. Dao T, Guo D, Ploss A, Stolzer A, Saylor C, Boursalian TE, Im JS et Sant'Angelo DB. Development of CD1d-restricted NKT cells in the mouse thymus. *Eur J Immunol.* 2004, 34: 3542-52.
134. Chen YH, Chiu NM, Mandal M, Wang N et Wang CR. Impaired NK1+ T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice. *Immunity.* 1997, 6: 459-67.
135. Pellicci DG, Uldrich AP, Kyparissoudis K, Crowe NY, Brooks AG, Hammond KJ, Sidobre S, Kronenberg M, Smyth MJ et Godfrey DI. Intrathymic NKT cell development is blocked by the presence of alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol.* 2003, 33: 1816-23.
136. Chun T, Page MJ, Gapin L, Matsuda JL, Xu H, Nguyen H, Kang HS, Stanic AK, Joyce S, Koltun WA, Chorney MJ, Kronenberg M et Wang CR. CD1d-expressing dendritic cells but not thymic epithelial cells can mediate negative selection of NKT cells. *J Exp Med.* 2003, 197: 907-18.
137. Jordan MA, Fletcher J et Baxter AG. Genetic control of NKT cell numbers. *Immunol Cell Biol.* 2004, 82: 276-84.
138. Stanic AK, Bezbradica JS, Park JJ, Van Kaer L, Boothby MR et Joyce S. Cutting edge: the ontogeny and function of Va14Ja18 natural T lymphocytes require signal processing by protein kinase C theta and NF-kappa B. *J Immunol.* 2004, 172: 4667-71.
139. Townsend MJ, Weinmann AS, Matsuda JL, Salomon R, Farnham PJ, Biron CA, Gapin L et Glimcher LH. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity.* 2004, 20: 477-94.
140. Kim CH, Johnston B et Butcher EC. 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.* 2002, 100: 11-6.
141. Thomas SY, Hou R, Boyson JE, Means TK, Hess C, Olson DP, Strominger JL, Brenner MB, Gumperz JE, Wilson SB et Luster AD. CD1d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of Th1-type inflammatory homing cells. *J Immunol.* 2003, 171: 2571-80.
142. Matsuda JL, Gapin L, Sidobre S, Kieper WC, Tan JT, Ceredig R, Surh CD et Kronenberg M. Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. *Nat Immunol.* 2002, 3: 966-74.
143. Ranson T, Vosshenrich CA, Corcuff E, Richard O, Laloux V, Lehuen A et Di Santo JP. IL-15 availability conditions homeostasis of peripheral natural killer T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, 100: 2663-8.

144. Matsuda JL, Gapin L, Fazilleau N, Warren K, Naidenko OV et Kronenberg M. Natural killer T cells reactive to a single glycolipid exhibit a highly diverse T cell receptor beta repertoire and small clone size. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98: 12636-41.
145. Matsuda JL, Gapin L, Baron JL, Sidobre S, Stetson DB, Mohrs M, Locksley RM et Kronenberg M. Mouse V alpha 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, 100: 8395-400.
146. Uldrich AP, Crowe NY, Kyparissoudis K, Pellicci DG, Zhan Y, Lew AM, Bouillet P, Strasser A, Smyth MJ et Godfrey DI. NKT cell stimulation with glycolipid antigen in vivo: costimulation-dependent expansion, Bim-dependent contraction, and hyporesponsiveness to further antigenic challenge. *J Immunol*. 2005, 175: 3092-101.
147. Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Van Kaer L, Saiki I et Okumura K. Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways. *J Immunol*. 2001, 166: 6012-8.
148. Ikarashi Y, Mikami R, Bendelac A, Terme M, Chaput N, Terada M, Tursz T, Angevin E, Lemonnier FA, Wakasugi H et Zitvogel L. Dendritic cell maturation overrules H-2D-mediated natural killer T (NKT) cell inhibition: critical role for B7 in CD1d-dependent NKT cell interferon gamma production. *J Exp Med*. 2001, 194: 1179-86.
149. Kaneda H, Takeda K, Ota T, Kaduka Y, Akiba H, Ikarashi Y, Wakasugi H, Kronenberg M, Kinoshita K, Yagita H et Okumura K. ICOS costimulates invariant NKT cell activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005, 327: 201-7.
150. Kitamura H, Iwakabe K, Yahata T, Nishimura S, Ohta A, Ohmi Y, Sato M, Takeda K, Okumura K, Van Kaer L, Kawano T, Taniguchi M et Nishimura T. The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J Exp Med*. 1999, 189: 1121-8.
151. Tomura M, Yu WG, Ahn HJ, Yamashita M, Yang YF, Ono S, Hamaoka T, Kawano T, Taniguchi M, Koezuka Y et Fujiwara H. A novel function of Valpha14+CD4+NKT cells: stimulation of IL-12 production by antigen-presenting cells in the innate immune system. *J Immunol*. 1999, 163: 93-101.
152. Lang GA, Maltsev SD, Besra GS et Lang ML. Presentation of alpha-galactosylceramide by murine CD1d to natural killer T cells is facilitated by plasma membrane glycolipid rafts. *Immunology*. 2004, 112: 386-96.
153. Stetson DB, Morhs M, Reinhardt R, Baron JL, Wang Z, Gapin L, Kronenberg M et Locksley R. Constitutive cytokine mRNAs mark Natural Killer (NK) and NKT cells poised for effector function. *J Exp Med*. 2003, 198: 1069-1076.
154. Goff RD, Gao Y, Mattner J, Zhou D, Yin N, Cantu C, 3rd, Teyton L, Bendelac A et Savage PB. Effects of lipid chain lengths in alpha-galactosylceramides on cytokine release by natural killer T cells. *J Am Chem Soc*. 2004, 126: 13602-3.

155. Schmieg J, Yang G, Franck RW et Tsuji M. Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand alpha-Galactosylceramide. *J Exp Med.* 2003, 198: 1631-41.
156. Schmieg J, Yang G, Franck RW, Van Rooijen N et Tsuji M. Glycolipid presentation to natural killer T cells differs in an organ-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, 102: 1127-32.
157. Fujii S, Shimizu K, Kronenberg M et Steinman RM. Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs. *Nat Immunol.* 2002, 3: 867-74.
158. Bezbradica JS, Stanic AK, Matsuki N, Bour-Jordan H, Bluestone JA, Thomas JW, Unutmaz D, Van Kaer L et Joyce S. Distinct roles of dendritic cells and B cells in Valpha14 natural T cell activation in vivo. *J Immunol.* 2005, 174: 4696-705.
159. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Sato H, Kondo E, Harada M, Koseki H, Nakayama T, Tanaka Y et Taniguchi M. Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, 95: 5690-3.
160. Nieda M, Nicol A, Koezuka Y, Kikuchi A, Lapteva N, Tanaka Y, Tokunaga K, Suzuki K, Kayagaki N, Yagita H, Hirai H et Juji T. TRAIL expression by activated human CD4(+)V alpha 24NKT cells induces in vitro and in vivo apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Blood.* 2001, 97: 2067-74.
161. Metelitsa LS, Naidenko OV, Kant A, Wu HW, Loza MJ, Perussia B, Kronenberg M et Seeger RC. Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *J Immunol.* 2001, 167: 3114-22.
162. Gansert JL, Kiessler V, Engele M, Wittke F, Rollinghoff M, Krensky AM, Porcelli SA, Modlin RL et Stenger S. Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity. *J Immunol.* 2003, 170: 3154-61.
163. Vincent MS, Leslie DS, Gumperz JE, Xiong X, Grant EP et Brenner MB. CD1-dependent dendritic cell instruction. *Nat Immunol.* 2002, 3: 1163-8.
164. Fujii S, Shimizu K, Smith C, Bonifaz L et Steinman RM. 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.* 2003, 198: 267-79.
165. Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y et Bendelac A. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol.* 1999, 163: 4647-50.



166. Nieuwenhuis EE, Matsumoto T, Exley M, Schleipman RA, Glickman J, Bailey DT, Corazza N, Colgan SP, Onderdonk AB et Blumberg RS. CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. *Nat Med*. 2002, 8: 588-93.
167. Van Kaer L. alpha-Galactosylceramide therapy for autoimmune diseases: prospects and obstacles. *Nat Rev Immunol*. 2005, 5: 31-42.
168. Stober D, Jomantaite I, Schirmbeck R et Reimann J. NKT cells provide help for dendritic cell-dependent priming of MHC class I-restricted CD8<sup>+</sup> T cells in vivo. *J Immunol*. 2003, 170: 2540-8.
169. Hermans IF, Silk JD, Gileadi U, Salio M, Mathew B, Ritter G, Schmidt R, Harris AL, Old L et Cerundolo V. NKT cells enhance CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells. *J Immunol*. 2003, 171: 5140-7.
170. Burdin N, Brossay L et Kronenberg M. Immunization with alpha-galactosylceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis. *Eur J Immunol*. 1999, 29: 2014-25.
171. Singh N, Hong S, Scherer DC, Serizawa I, Burdin N, Kronenberg M, Koezuka Y et Van Kaer L. Cutting edge: activation of NK T cells by CD1d and alpha-galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype. *J Immunol*. 1999, 163: 2373-7.
172. Galli G, Nuti S, Tavarini S, Galli-Stampino L, De Lalla C, Casorati G, Dellabona P et Abrignani S. CD1d-restricted help to B cells by human invariant natural killer T lymphocytes. *J Exp Med*. 2003, 197: 1051-7.
173. Diao H, Kon S, Iwabuchi K, Kimura C, Morimoto J, Ito D, Segawa T, Maeda M, Hamuro J, Nakayama T, Taniguchi M, Yagita H, Van Kaer L, Onoe K, Denhardt D, Rittling S et Uede T. Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Immunity*. 2004, 21: 539-50.
174. Parekh VV, Singh AK, Wilson MT, Olivares-Villagomez D, Bezbradica JS, Inazawa H, Ehara H, Sakai T, Serizawa I, Wu L, Wang CR, Joyce S et Van Kaer L. Quantitative and qualitative differences in the in vivo response of NKT cells to distinct alpha- and beta-anomeric glycolipids. *J Immunol*. 2004, 173: 3693-706.
175. Brigl M, Bry L, Kent SC, Gumperz JE et Brenner MB. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol*. 2003, 4: 1230-7.
176. Behar SM, Dascher CC, Grusby MJ, Wang CR et Brenner MB. Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*. 1999, 189: 1973-80.
177. Dieli F, Taniguchi M, Kronenberg M, Sidobre S, Ivanyi J, Fattorini L, Iona E, Orefici G, De Leo G, Russo D, Caccamo N, Sireci G, Di Sano C et Salerno A. An anti-

- inflammatory role for V alpha 14 NK T cells in Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin-infected mice. *J Immunol.* 2003, 171: 1961-8.
178. Apostolou I, Takahama Y, Belmant C, Kawano T, Huerre M, Marchal G, Cui J, Taniguchi M, Nakauchi H, Fournie JJ, Kourilsky P et Gachelin G. Murine natural killer T(NKT) cells [correction of natural killer cells] contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999, 96: 5141-6.
  179. Mempel M, Ronet C, Suarez F, Gilleron M, Puzo G, Van Kaer L, Lehuen A, Kourilsky P et Gachelin G. Natural killer T cells restricted by the monomorphic MHC class 1b CD1d1 molecules behave like inflammatory cells. *J Immunol.* 2002, 168: 365-71.
  180. Kumar H, Belperron A, Barthold SW et Bockenstedt LK. Cutting edge: CD1d deficiency impairs murine host defense against the spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol.* 2000, 165: 4797-801.
  181. Belperron AA, Dailey CM et Bockenstedt LK. Infection-induced marginal zone B cell production of *Borrelia hermsii*-specific antibody is impaired in the absence of CD1d. *J Immunol.* 2005, 174: 5681-6.
  182. Grubor-Bauk B, Simmons A, Mayrhofer G et Speck PG. Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. *J Immunol.* 2003, 170: 1430-4.
  183. Ashkar AA et Rosenthal KL. Interleukin-15 and natural killer and NKT cells play a critical role in innate protection against genital herpes simplex virus type 2 infection. *J Virol.* 2003, 77: 10168-71.
  184. Johnson TR, Hong S, Van Kaer L, Koezuka Y et Graham BS. NK T cells contribute to expansion of CD8(+) T cells and amplification of antiviral immune responses to respiratory syncytial virus. *J Virol.* 2002, 76: 4294-303.
  185. Motsinger A, Haas DW, Stanic AK, Van Kaer L, Joyce S et Unutmaz D. CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. *J Exp Med.* 2002, 195: 869-79.
  186. Levy O, Orange JS, Hibberd P, Steinberg S, LaRussa P, Weinberg A, Wilson SB, Shaulov A, Fleisher G, Geha RS, Bonilla FA et Exley M. Disseminated varicella infection due to the vaccine strain of varicella-zoster virus, in a patient with a novel deficiency in natural killer T cells. *J Infect Dis.* 2003, 188: 948-53.
  187. Cho S, Knox KS, Kohli LM, He JJ, Exley MA, Wilson SB et Brutkiewicz RR. Impaired cell surface expression of human CD1d by the formation of an HIV-1 Nef/CD1d complex. *Virology.* 2005, 337: 242-52.
  188. Hage CA, Kohli LL, Cho S, Brutkiewicz RR, Twigg HL, 3rd et Knox KS. Human immunodeficiency virus gp120 downregulates CD1d cell surface expression. *Immunol Lett.* 2005, 98: 131-5.

189. Sanchez DJ, Gumperz JE et Ganem D. Regulation of CD1d expression and function by a herpesvirus infection. *J Clin Invest.* 2005, 115: 1369-78.
190. Renukaradhya GJ, Webb TJ, Khan MA, Lin YL, Du W, Gervay-Hague J et Brutkiewicz RR. Virus-induced inhibition of CD1d1-mediated antigen presentation: reciprocal regulation by p38 and ERK. *J Immunol.* 2005, 175: 4301-8.
191. Askenase PW, Itakura A, Leite-de-Moraes MC, Lisbonne M, Roongapinun S, Goldstein DR et Szczepanik M. TLR-dependent IL-4 production by invariant Valpha14+Jalpha18+ NKT cells to initiate contact sensitivity in vivo. *J Immunol.* 2005, 175: 6390-401.
192. Hansen DS, Siomos MA, Buckingham L, Scalzo AA et Schofield L. Regulation of murine cerebral malaria pathogenesis by CD1d-restricted NKT cells and the natural killer complex. *Immunity.* 2003, 18: 391-402.
193. Faveeuw C, Angeli V, Fontaine J, Maliszewski C, Capron A, Van Kaer L, Moser M, Capron M et Trottein F. Antigen presentation by CD1d contributes to the amplification of Th2 responses to *Schistosoma mansoni* glycoconjugates in mice. *J Immunol.* 2002, 169: 906-12.
194. Ishikawa H, Hisaeda H, Taniguchi M, Nakayama T, Sakai T, Maekawa Y, Nakano Y, Zhang M, Zhang T, Nishitani M, Takashima M et Himeno K. CD4(+) v(alpha)14 NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with *Leishmania major*. *Int Immunol.* 2000, 12: 1267-74.
195. Swann J, Crowe NY, Hayakawa Y, Godfrey DI et Smyth MJ. Regulation of antitumour immunity by CD1d-restricted NKT cells. *Immunol Cell Biol.* 2004, 82: 323-31.
196. Smyth MJ, Crowe NY, Pellicci DG, Kyriakoudis K, Kelly JM, Takeda K, Yagita H et Godfrey DI. Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Blood.* 2002, 99: 1259-66.
197. Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Smyth MJ, Van Kaer L, Okumura K et Saiki I. IFN-gamma-mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, alpha-galactosylceramide. *Blood.* 2002, 100: 1728-33.
198. Smyth MJ, Cretney E, Takeda K, Wiltout RH, Sedger LM, Kayagaki N, Yagita H et Okumura K. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med.* 2001, 193: 661-70.
199. Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Toura I, Kaneko Y, Koseki H, Kanno M et Taniguchi M. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science.* 1997, 278: 1623-6.

200. Kodama T, Takeda K, Shimozato O, Hayakawa Y, Atsuta M, Kobayashi K, Ito M, Yagita H et Okumura K. Perforin-dependent NK cell cytotoxicity is sufficient for anti-metastatic effect of IL-12. *Eur J Immunol.* 1999, 29: 1390-6.
201. Takeda K, Hayakawa Y, Atsuta M, Hong S, Van Kaer L, Kobayashi K, Ito M, Yagita H et Okumura K. Relative contribution of NK and NKT cells to the anti-metastatic activities of IL-12. *Int Immunol.* 2000, 12: 909-14.
202. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, Kawano T, Pelikan SB, Crowe NY et Godfrey DI. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med.* 2000, 191: 661-8.
203. Crowe NY, Smyth MJ et Godfrey DI. A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Exp Med.* 2002, 196: 119-27.
204. Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H, Watson C, Donaldson DD, Carbone DP, Paul WE et Berzofsky JA. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol.* 2000, 1: 515-20.
205. Terabe M, Matsui S, Park JM, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Chen W, Wahl SM, Ledbetter S, Pratt B, Letterio JJ, Paul WE et Berzofsky JA. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med.* 2003, 198: 1741-52.
206. Moodycliffe AM, Nghiem D, Clydesdale G et Ullrich SE. Immune suppression and skin cancer development: regulation by NKT cells. *Nat Immunol.* 2000, 1: 521-5.
207. Matsumura Y, Moodycliffe AM, Nghiem DX, Ullrich SE et Ananthaswamy HN. Resistance of CD1d<sup>-/-</sup> mice to ultraviolet-induced skin cancer is associated with increased apoptosis. *Am J Pathol.* 2004, 165: 879-87.
208. Yoshimoto T, Min B, Sugimoto T, Hayashi N, Ishikawa Y, Sasaki Y, Hata H, Takeda K, Okumura K, Van Kaer L, Paul WE et Nakanishi K. Nonredundant roles for CD1d-restricted natural killer T cells and conventional CD4<sup>+</sup> T cells in the induction of immunoglobulin E antibodies in response to interleukin 18 treatment of mice. *J Exp Med.* 2003, 197: 997-1005.
209. Akbari O, Stock P, Meyer E, Kronenberg M, Sidobre S, Nakayama T, Taniguchi M, Grusby MJ, DeKruyff RH et Umetsu DT. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med.* 2003, 9: 582-8.
210. Lisbonne M, Diem S, de Castro Keller A, Lefort J, Araujo LM, Hachem P, Fourneau JM, Sidobre S, Kronenberg M, Taniguchi M, Van Endert P, Dy M, Askenase P, Russo M, Vargaftig BB, Herbelin A et Leite-de-Moraes MC. Cutting edge: invariant V alpha

- 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J Immunol.* 2003, 171: 1637-41.
211. Campos RA, Szczepanik M, Itakura A, Akahira-Azuma M, Sidobre S, Kronenberg M et Askenase PW. Cutaneous immunization rapidly activates liver invariant Valpha14 NKT cells stimulating B-1 B cells to initiate T cell recruitment for elicitation of contact sensitivity. *J Exp Med.* 2003, 198: 1785-96.
  212. Dutronc Y, *Expression de la molécule CD1d dans les carcinomes basocellulaires.* Thèse de médecine, Faculté de médecine de Dijon, 2000, 100 pp.
  213. Adley MA, Assaf HA et Hussein M. Expression of CD1d in human scalp skin and hair follicles: hair cycle related alterations. *J Clin Pathol.* 2005, 58: 1278-82.
  214. Nickoloff BJ, Bonish B, Huang BB et Porcelli SA. Characterization of a T cell line bearing natural killer receptors and capable of creating psoriasis in a SCID mouse model system. *J Dermatol Sci.* 2000, 24: 212-25.
  215. Boyce S et Ham R. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol.* 1983, 81: 33s-40s.
  216. Ruckert R, Asadullah K, Seifert M, Budagian V, Arnold R, Trombotto C, Paus R et Bulfone-Paus S. Inhibition of keratinocyte apoptosis by IL-15: a new parameter in the pathogenesis of psoriasis? *J Immunol.* 2000, 165.
  217. Yawalkar N, Limat A, Brand C et Braathen L. Constitutive expression of both subunits of interleukin-12 in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1996, 106: 80-3.
  218. Carson W, Ross M, Baiocchi R, Marien M, Boiani N, Grabstein K et Caligiuri M. Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. *J Clin Invest.* 1995, 96: 2578-82.
  219. Mempel M, Flageul B, Suarez F, Ronet C, Dubertret L, Kourilsky P, Gachelin G et Musette P. Comparison of the T cell patterns in leprous and cutaneous sarcoid granulomas. Presence of Valpha24-invariant natural killer T cells in T-cell-reactive leprosy together with a highly biased T cell receptor Valpha repertoire. *Am J Pathol.* 2000, 157: 509-23.
  220. Jullien D, Sieling P, Uyemura K, Mar N, Rea T et Modlin R. IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection. *J Immunol.* 1997, 158: 800-6.
  221. Colgan SP, Hershberg RM, Furuta GT et Blumberg RS. Ligation of intestinal epithelial CD1d induces bioactive IL-10: critical role of the cytoplasmic tail in autocrine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999, 96: 13938-43.

**GERMAIN Jean-Philippe**

**Thèse Vétérinaire : Lyon, 2006**

**TITRE :**

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA MOLECULE PRESENTATRICE D'ANTIGENES CD1d.  
ETUDE *IN VITRO* DE LA PRODUCTION D'INTERLEUKINES PAR LES KERATINOCYTES DE  
L'HOMME APRES OLIGOMERISATION DE CETTE PROTEINE TRANSMEMBRANAIRE.

**RÉSUMÉ :**

Les glycoprotéines transmembranaires CD1 sont une famille de molécules présentatrices d'antigènes lipidiques. Dans une première partie, ce mémoire rapporte les connaissances génétiques, biochimiques et immunologiques relatives à l'isoforme CD1d, exprimée chez plusieurs Mammifères. L'activation spécifique des lymphocytes T CD1d-restreints par un antigène lipidique ou glycolipidique présenté par CD1d se traduit par la production de grandes quantités de cytokines de types 1 et 2. De ce fait, le système CD1d est impliqué dans de nombreuses réactions immunitaires, tant adaptatives qu'innées.

La deuxième partie étudie expérimentalement la fonction de la molécule CD1d au sein de l'épiderme humain. Nous montrons *in vitro* que l'oligomérisation de CD1d exprimée à la surface des kératinocytes, par des anticorps spécifiques, induit la transcription voire la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-12 et IL-15.

**MOTS CLES :** CD1d, kératinocyte, IL-12, IL-15.

**JURY :**

Président : Monsieur le Professeur D. JULLIEN

1<sup>er</sup> Assesseur : Monsieur le Docteur T. MARCHAL

2<sup>e</sup> Assesseur : Madame le Docteur D. GREZEL

**DATE DE SOUTENANCE :**

9 février 2006

**ADRESSE DE L'AUTEUR :**

4 rue Paul Vaillant Couturier  
13140 MIRAMAS