

Université de Lille 1 – Sciences et Technologies

**Manuscrit présenté en vue de
l'Habilitation à Diriger des Recherches**

par

Christelle FAVEEUW
Docteur en Sciences

**Etude du mode d'activation des lymphocytes T Natural Killer :
apport du modèle de la schistosomiase expérimentale murine**

Epreuve présentée le 8 décembre 2006 devant le jury composé de :

Pr Monique Capron	Présidente
Dr Agnès Lehuen	Rapporteur
Dr Maria Leite-de-Moraes	Rapporteur
Dr Gerald Spaeth	Rapporteur
Dr Jean Claude Michalski	Examineur
Dr François Trottein	Directeur de Recherche

INSERM U547

**« Schistosomiase, Paludisme et Inflammation »
Institut Pasteur de Lille – Université Lille 2**

Table des matières

Résumé	3
Parcours scientifique	4
<i>Résumé des travaux de thèse</i>	4
<i>Résumé des travaux du 1^{er} stage post-doctoral</i>	5
Introduction générale	7
1- Cycle de vie du parasite <i>schistosoma mansoni</i>	7
2- La schistosomiase expérimentale murine : réponse immune	8
La schistosomiase : glycoconjugués parasitaires et immunomodulation	10
1- Introduction	10
2- Glycoconjugués et réponse Th2	10
2-1 <i>Le déterminant trisaccharidique Lewis X</i>	11
2-2 <i>Les glyco-épitopes core fucose et core xylose</i>	12
a- <i>Article 1 : résumé des travaux</i>	13
b- <i>Article 1 : conclusions</i>	13
3- Glycoconjugués et TLR	14
4- Glycoconjugués et lectines	14
5- Glycoconjugués et CD1d	16
5-1 <i>La molécule CD1d</i>	16
5-2 <i>CD1d et réponse Th2</i>	16
a- <i>Article 2 : résumé des travaux</i>	16
b- <i>Article 2 : conclusions</i>	17
6- Conclusions	17
Lymphocytes T CD1d-restreints et régulation de la réponse immune : modèle de la schistosomiase	18
1- Les lymphocytes NKT invariants (ou iNKT)	18
2- Les lymphocytes NKT non-invariants (ou non-iNKT)	19
3- Activation des lymphocytes CD1d-restreints	20
3-1 <i>Activation TCR-dépendante</i>	20
3-2 <i>Activation TCR-indépendante</i>	22
4- Lymphocytes CD1d-restreints et pathologies : régulation de la réponse immune	23
4-1 <i>immunité anti-tumorale</i>	24
4-2 <i>les infections bactériennes, virales et parasitaires</i>	25

a- <i>Article 3 : résumé des travaux</i>	26
b- <i>Article 3 : conclusions</i>	27
Conclusion et discussion	28
1- iNKT et schistosomiase	28
2- Non-iNKT et schistosomiase	29
Perspectives	31
1- Lymphocytes NKT et schistosomiase	31
2- Activation des lymphocytes NKT : rôle des DC	33
3- Activation des lymphocytes NKT : rôle des MZB	33
3-1 <i>Introduction</i>	33
3-2 <i>Interaction lymphocytes NKT/MZB : approches in vitro</i>	34
3-3 <i>Interaction lymphocytes NKT/MZB : relevance in vivo</i>	35
3-4 <i>Interaction lymphocytes NKT/MZB en conditions pathologiques</i>	36
a- <i>pathologies auto-immunes</i>	37
b- <i>pathologies virales</i>	38
4- Conclusions	39
Bibliographie	40
Curriculum vitae	47
Formation	47
Expérience professionnelle	47
Situation actuelle	47
Enseignement	47
Publications	48
Communications	51
Encadrement	52
Financement	53
Coordinateur de projet	53

Résumé

A mon retour en France, j'ai rejoint le groupe du Dr François Trottein dont la thématique principale était l'étude des conséquences immunologiques des relations hôte/pathogène dans un modèle de maladie parasitaire, **la schistosomiase**. Cette helminthiase est caractérisée par une réorientation de la réponse immune d'un profil Th1 vers un profil Th2 au moment de la ponte des œufs par le parasite. Je me suis investie dans l'étude des mécanismes immunologiques conduisant au développement d'une réponse Th2 en phase aiguë de l'infection, cette réponse étant à l'origine de la pathologie.

Nos travaux ainsi que ce de la littérature ont clairement démontré l'importance des glycoconjugués de *schistosoma mansoni* dans l'induction de la réponse Th2. Nous avons ainsi identifié des glyco-épitopes, le core-fucose et le core-xylose, en partie responsables de la réponse Th2 au cours de l'infection. Par ailleurs, l'extrême richesse du schistosome en glycoconjugués de type glycosphingolipides, représentait un argument de poids pour étudier une éventuelle implication de la molécule CD1d, connue pour interagir avec des structures hydrophobes de type lipidique, dans le développement de la schistosomiase. Nos travaux ont pu montrer pour la première fois, dans le modèle de la schistosomiase, l'implication de cette molécule dans le développement d'une réponse immune adaptative de type Th2.

Ces dernières observations nous ont conduit logiquement à nous intéresser aux lymphocytes T CD1d-restreints, communément appelés lymphocytes T Natural Killer (NKT). Cette population hétérogène de lymphocytes T non-conventionnels est principalement composée de 2 sous populations : les lymphocytes NKT dits invariants ou iNKT et les lymphocytes NKT dits non-invariants ou non-iNKT. L'infection de souris déficientes en iNKT ($J\alpha 18$ KO) ou déficientes en iNKT et non-iNKT (CD1dKO) montre que ces 2 types cellulaires semblent exercer des fonctions différentes sur la réponse immune au cours de la schistosomiase, les iNKT favorisant la différenciation des lymphocytes Th1 et les non-iNKT celle des lymphocytes Th2.

Nos études réalisées jusqu'à présent nous conduisent maintenant à orienter nos projets futurs vers l'étude du mode d'activation des iNKT et non-iNKT au cours de la schistosomiase et, plus généralement, en réponse à des signaux de danger. Un intérêt sera porté à la nature de la cellule présentatrice d'antigènes (APC) dans l'activation des NKT. Bien que nos premiers travaux montre une activation des NKT par les cellules dendritiques en réponse à certains stimuli microbiens, dont le schistosome, des données de la littérature suggère qu'une autre population d'APC pourrait être capable d'activer les cellules NKT : les lymphocytes B de la zone marginale (ou MZB). Notre projet consistera donc à étudier le rôle des MZB dans l'activation des NKT en réponse à des signaux de danger générés notamment au cours de processus infectieux (dont la schistosomiase) ou autres pathologies inflammatoires.

Parcours scientifique

Ayant suivie une formation initiale de Biochimie à l'Université Pierre et Marie Curie à Paris, j'ai débuté mon parcours dans le domaine de l'Immunologie en intégrant le DEA d'Immunologie de l'Institut Pasteur de Paris. Mon stage de DEA a été effectué dans l'Unité INSERM 25, dirigé par le Pr Jean François BACH puis mon parcours s'est poursuivi par une Thèse de Doctorat dans l'Unité CNRS URA 1461 (Unité de recherche formée d'équipes appartenant à l'Unité INSERM 25), dirigée par le Dr Mireille DARDENNE, sous la tutelle du Dr Françoise LEPAULT. Je me suis intéressée aux mécanismes impliqués dans le développement de l'infiltration lymphocytaire du pancréas dans un modèle murin de diabète insulino-dépendant (type I) : la souris NOD.

Résumé travaux de thèse

Le diabète insulino-dépendant est la conséquence de la destruction sélective des cellules β sécrétrices d'insuline des îlots de Langerhans du pancréas. Lorsque mon travail de thèse a débuté, la nature des mécanismes moléculaires contrôlant le développement de l'infiltration des îlots (appelé insulite) restait totalement inconnue. Le but de notre travail était double : 1) Etudier la migration et la recirculation des lymphocytes dans les organes lymphoïdes et le pancréas de la souris NOD et 2) Identifier les récepteurs de domiciliation et les molécules d'adhérence impliqués dans la migration des lymphocytes, diabéto-gènes ou non, vers l'îlot.

Notre étude sur les propriétés migratoires des sous-populations lymphocytaires dans les organes lymphoïdes chez la souris NOD et différentes souches contrôles a montré (1) qu'il n'existait pas d'anomalie spécifique à la souris NOD et (2) que le homing des lymphocytes dans les organes lymphoïdes de souris était contrôlé par des mécanismes spécifiques de souches (Faveeuw et al., 1994b) en plus des mécanismes spécifiques d'organes et de sous populations déjà décrits.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes pouvant être impliqués dans le développement de l'insulite. On a observé l'apparition de veinules endothéliales hautes (HEV) au niveau des infiltrats insulaires ainsi que l'expression successive des adressines muco-sale et périphérique par ces HEV (Faveeuw et al., 1994a). Nous avons également montré que l'infiltrat lymphocytaire était composé d'une forte proportion de cellules mémoires/activées parmi lesquelles se comptent les cellules diabéto-gènes. Ces dernières, présentes dans la rate de souris âgées de plus de 15 semaines et de souris diabétiques, sont faiblement représentées dans les ganglions lymphatiques. En effet, les lymphocytes T de ganglions lymphatiques transfèrent peu le diabète chez des receveurs irradiés (Lepault et al., 1993). Enfin, nous avons montré qu'au cours du développement spontané de la maladie,

les lymphocytes naïfs recirculent en permanence au sein de l'îlot et cette recirculation implique la L-selectine et une intégrine alpha-4. Par contre, au cours du transfert de l'insulite chez des receveurs irradiés la migration des lymphocytes dans l'îlot implique uniquement l'intégrine alpha-4, cette voie de migration favorisant ainsi l'entrée des cellules diabétogènes, ceux-ci n'exprimant pas la L-selectine (Faveeuw et al., 1995).

Nos résultats nous ont conduit à émettre l'hypothèse que les lymphocytes pouvaient recirculer dans les îlots infiltrés en utilisant des mécanismes semblables à ceux décrits jusqu'à présent pour l'entrée des lymphocytes dans les organes lymphoïdes.

Parallèlement à mon projet de recherche, j'ai participé dans le laboratoire au programme de recherche du Dr F. Saravia-Fernandez (post-doctorant), où nous avons étudié la localisation d'un autoantigène potentiel, la GAD (Glutamic Acid Decarboxylase), dans le pancréas de souris NOD en fonction de la gravité de la maladie (Saravia-Fernandez et al., 1996). Nos résultats suggéraient fortement que la GAD représentait un autoantigène de choix responsable du diabète insulino-dépendant.

Les résultats que j'avais obtenus au cours de ma thèse suggéraient une certaine complexité dans les mécanismes utilisés par deux populations cellulaires différentes, en l'occurrence les lymphocytes T naïfs et les lymphocytes diabétogènes (autoréactifs), pour leur entrée dans les tissus périphériques. Afin de mieux appréhender les mécanismes moléculaires impliqués dans l'extravasation des lymphocytes dans les tissus, j'ai décidé de rejoindre, pour mon stage post-doctoral, le groupe du Dr Ann Ager à Londres, au National Institute for Medical Research, dont la thématique principale était l'étude des bases moléculaires de l'interaction lymphocyte-cellule endothéliale.

Résumé travaux du 1^{er} stage post-doctoral

Le but de notre projet était double. D'une part, identifier *in vitro* les molécules d'adhérence impliquées dans l'adhérence et la migration transendothéliale des lymphocytes T naïfs et activés au niveau des HEVs. Pour réaliser ce travail, nous disposions de cultures primaires de cellules endothéliales hautes (HEC), cellules qui forment les HEVs, issues de ganglions lymphatiques de rat. D'autre part, étudier *in vivo* l'implication des metalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMPs) dans la migration transendothéliale des lymphocytes au niveau des HEVs des ganglions lymphatiques périphériques. Pour cela, nous disposions dans le laboratoire d'inhibiteurs synthétiques des MMPs et également de TIMP-1, un inhibiteur naturel.

Si la recirculation des lymphocytes activés/mémoires dans les ganglions restait un sujet très controversé lorsque nous avons débuté ce travail, notre étude montrait très clairement que les lymphocytes T activés pouvaient passer *in vitro* la paroi vasculaire des HEVs, en utilisant soit le couple de récepteurs LFA-1/ICAM-1 ou le couple VLA-4/VCAM-1

(Faveeuw et al., 2000). Nous montrions également dans notre étude que les lymphocytes T naïfs étaient capables de traverser la paroi des HEVs en utilisant l'intégrine VLA-4, connue à l'époque pour être impliquée dans l'interaction lymphocyte-cellule endothéliale en conditions inflammatoires. Notre étude apportait donc de nouvelles données à la compréhension des mécanismes impliqués dans les interactions lymphocyte-endothélium vasculaire.

Parallèlement à cette étude, nous avons également montré pour la première fois, un rôle *in vivo* des MMPs dans la migration transendothéliale des lymphocytes au niveau des HEVs. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur synthétique des MMPs, Ro31-9790, nous a permis de montrer, en microscopie à fluorescence et confocale que chez des souris traitées avec cet inhibiteur (1) les lymphocytes étaient concentrés au niveau des HEVs et très peu se trouvaient dans le tissu lymphoïde et (2) que ces lymphocytes restaient bloqués au niveau des cellules endothéliales des HEVs et non au niveau de la membrane basale (Faveeuw et al., 2001). Ceci suggérait donc fortement un rôle des MMPs dans l'interaction lymphocyte-cellule endothéliale.

Enfin, pendant mon stage post-doctoral, j'ai également pu participer à un autre projet dans le laboratoire qui a consisté à caractériser de nouveaux ligands de la L-sélectine (Derry et al., 1999).

De retour en France, j'ai souhaité m'investir dans une toute autre thématique et j'ai ainsi rejoint, à l'Institut Pasteur de LILLE, l'Unité INSERM 167, dirigée par le Pr André CAPRON, puis l'Unité INSERM 547, dirigée par le Pr Monique CAPRON. J'ai plus particulièrement travaillé dans le groupe de recherche animé par le Dr François TROTTEIN, dont la thématique principale était l'étude des conséquences immunologiques des relations hôte/pathogène dans un modèle de maladie parasitaire, **la schistosomiase**

Introduction générale

L'interaction hôte/pathogène repose sur un dialogue moléculaire permanent où s'exprime à la fois les stratégies de survie du pathogène et les mécanismes de défense de l'hôte. Ce dialogue se traduit par un échange bidirectionnel de facteurs solubles et/ou nécessite un contact direct entre les deux agents biologiques. Parmi les éléments du dialogue, certains délivrés par l'agent pathogène peuvent venir moduler ou altérer les systèmes biologiques de l'hôte infecté, en particulier le système immunitaire.

L'agent pathogène responsable de la schistosomiase ou bilharziose est un helminthe trématode, **le schistosome**. Cette pathologie infectieuse représente la deuxième endémie parasitaire, après le paludisme, et affecte environ 200 millions d'individus dans le monde. Il existe 5 espèces de schistosomes pathogènes pour l'homme et parmi celles-ci, *Schistosoma mansoni*, agent responsable de la bilharziose intestinale chez l'homme.

1 – Cycle de vie du parasite *Schistosoma mansoni*

Le cycle de développement fait intervenir deux hôtes successifs : un hôte intermédiaire, qui est un mollusque d'eau douce, *Biomphalaria glabrata* (reproduction asexuée du parasite) et un hôte définitif vertébré (reproduction sexuée)(**Figure 1**). L'hôte définitif est infecté naturellement au cours de contacts en eau douce par pénétration transcutanée des larves infestantes, les furcocercaires. Au cours de la pénétration, la furcocercaire subit des modifications morphologiques et biochimiques au niveau de la queue, aboutissant à sa métamorphose en schistosomule. Deux à 4 jours après l'infection, les schistosomules quittent la peau et gagnent le réseau sanguin. Entraînés par le flux sanguin, les parasites rejoignent les poumons où ils séjournent quelques jours, bloqués au niveau des capillaires sanguins. Le schistosomule subit une maturation morphologique qui lui permet de quitter les poumons et de gagner le système circulatoire péri-hépatique, où il se différencie en schistosome adulte mâle ou femelle sexuellement mature. La femelle atteint sa maturation sexuelle dès lors qu'elle se loge dans le canal gynécophore du mâle, et le couple migre alors vers le lieu de ponte, le plexus mésentérique, où il se localise définitivement. A ce stade, la femelle commence à pondre des œufs en continu (jusque 300 par jour), dont une partie est piégée dans les tissus (foie et intestins) où ils forment des granulomes, à l'origine de la pathologie. L'autre partie des œufs est excrétée dans les selles. En eau douce, les œufs éclosent et libèrent des miracidium, forme infestante pour l'hôte intermédiaire. Chaque miracidium se transforme en sporocyste primaire puis secondaire, chacun donnant une furcocercaire. Les furcocercaires sont émises par le mollusque à des moments précis de la journée, coïncidant avec les périodes de contact aquatique des populations.

En laboratoire, le cycle de vie de *S. mansoni* est maintenu en infectant successivement l'hôte intermédiaire, *Biomphalaria glabata*, et l'hôte définitif, le hamster.

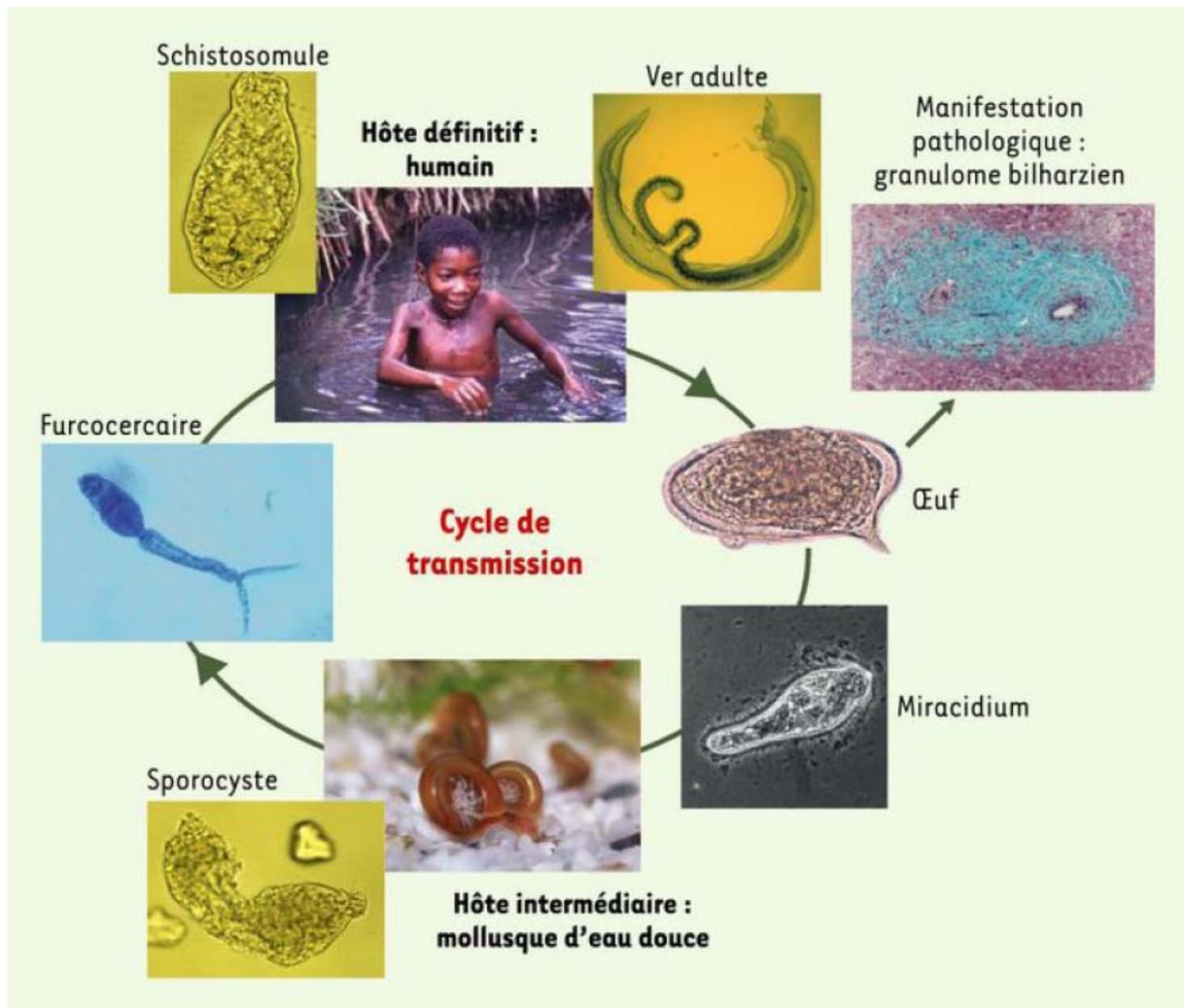


Figure 1 : Cycle de vie de *Schistosoma mansoni*. D'après Pierce et al. 2004

2 – La schistosomiase expérimentale murine : réponse immune

La réponse immunitaire, suite à l'infection par la plupart des parasites helminthes, se traduit par la production des cytokines IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13, par la synthèse d'IgE et l'implication de cellules effectrices telles que les éosinophiles, les mastocytes ou encore les basophiles, caractéristiques des réponses de type Th2 (Maizels et al., 2004). La particularité du schistosome réside dans le fait que les différents stades évolutifs du parasite induisent des réponses immunes distinctes chez l'hôte infecté, particulièrement chez la souris (**Figure 2**). Lors de son séjour dans la peau, les schistosomules initient une faible réponse immune Th0/Th1 alors que les œufs, pondus par les vers adultes femelles, provoquent une forte réponse Th2 responsable de la réaction granulomateuse se développant autour des œufs. En d'autres termes, la faible réponse Th0/Th1 qui se met en place en début d'infection, se réoriente vers une forte réponse Th2 en phase aiguë (au moment de la ponte des œufs), et

peut évoluer vers une réponse régulatrice à mesure que l'infection évolue vers la chronicité. Cette particularité fait donc de la schistosomiase expérimentale murine un excellent modèle d'étude des phénomènes d'immunomodulation.

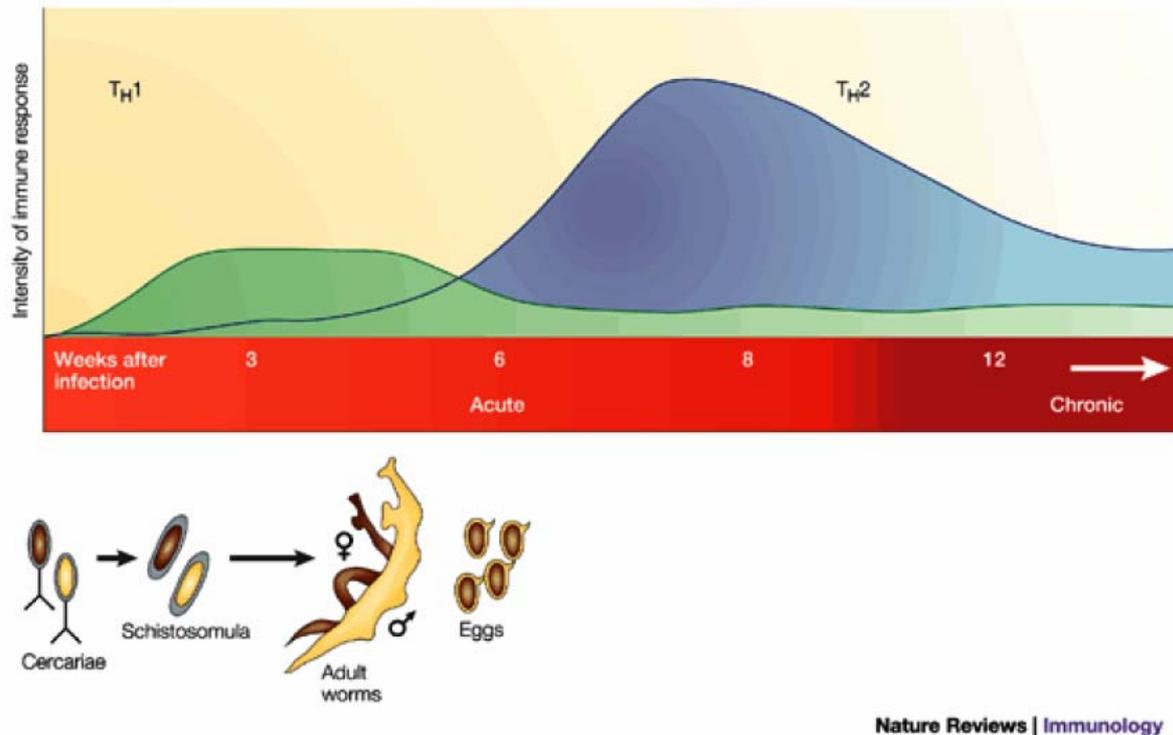


Figure 2 : Développement de la réponse immune au cours de l'infection. D'après Pearce et al, 2002

A mon arrivée dans le groupe, nos objectifs étaient de comprendre les mécanismes (1) mis en œuvre par le schistosome pour échapper à la réponse immune (notamment en début d'infection) et (2) régulant la réorientation de la réponse immune d'un profil de type Th0/Th1 vers un profil de type Th2, au moment de la ponte des œufs dans le foie. Je me suis investie dans la compréhension des mécanismes immunologiques à l'origine de la réponse Th2 en phase aiguë de l'infection et pour des raisons que je vais vous exposer ci-dessous, un intérêt tout particulier a été porté aux glycoconjugués et à leur rôle potentiel dans l'induction de cette réponse.

Parallèlement à ce projet et suite aux travaux de notre groupe montrant que le schistosome est capable, via la prostaglandine D₂ (PGD₂), de contrôler la réponse immune cutanée au cours des phases précoces de l'infection (Angeli et al., 2001), j'ai également entrepris l'étude du mode d'action de la PGD₂ sur les fonctions des cellules dendritiques (DCs) et l'induction/régulation des réponses immunes. Cette partie du projet ne sera pas développée dans ce manuscrit mais elle a néanmoins fait l'objet de plusieurs publications issues du laboratoire ou bien de collaborations extérieures, celles-ci étant citées dans la partie « Curriculum Vitae ».

La schistosomiase : glycoconjugués parasitaires et immunomodulation

1- Introduction

Il y a maintenant 15 ans, Pearce et coll. mettaient en évidence la réorientation de la réponse immune d'un profil Th1 vers un profil Th2 au cours de l'infection de souris par le schistosome (Pearce et al., 1991). Ces auteurs montraient également que des souris immunisées par des cercaires atténuées par irradiation ne développent pas de réponse Th2. Chez ces animaux, les schistosomules ne mûrissent pas en vers adultes et sont donc incapables de pondre des œufs. Par ailleurs, il a été montré que les antigènes de l'œuf (SEA, soluble egg antigen) induisent la production préférentielle d'IL-4 et IL-5, alors que les antigènes du ver adulte (SWAP, soluble worm antigen preparation) induisent la synthèse d'IFN- γ et IL-2, par des splénocytes de souris infectées à 6-8 semaines, moment coïncidant avec la ponte des œufs (Grzych et al., 1991). Enfin, des souris infectées par des cercaires unisexuées, provenant de l'infection de mollusques par une seule larve miracidium, sont incapables de développer une réponse Th2 en phase aiguë de l'infection, par rapport à des souris contrôles normalement infectées. Ces travaux initiaux démontrent donc que l'œuf du parasite est responsable de l'induction de la réponse Th2 au cours de l'infection. Plus récemment, Pearce et coll. ont montré que les œufs du schistosome sont capables d'induire de fortes réponses Th2 lorsqu'ils sont injectés à des souris naïves, et ceci quelle que soit la voie d'injection (Pearce, 2005).

A l'heure actuelle, les molécules parasitaires et les récepteurs de l'hôte impliqués dans ce phénomène d'immunomodulation au cours de l'infection ne sont pas bien connus et relativement peu de travaux ont été consacrés à la caractérisation des événements précoces de l'immunité responsables de cette réponse Th2. Bien qu'un rôle crucial des **glycoconjugués** de l'œuf dans la polarisation de la réponse immune **spécifique** et **non-spécifique** vers un profil Th2 ait été démontré, les mécanismes d'action de ces structures glycaniques restent très peu caractérisés.

2- Glycoconjugués et réponse Th2

Les glycoconjugués représentent de vastes populations de molécules dans lesquelles des chaînes oligosaccharidiques (ou glycanes) sont associées de façon covalente soit à une protéine pour engendrer des glycoprotéines soit un lipide pour engendrer des glycolipides (dont les glycosphingolipides). Le schistosome produit de très grandes quantités de glycoprotéines, notamment N- et O-glycanes hautement fucosylés, ainsi que des glyco(sphingo)lipides complexes. Les structures glycaniques présentes sur ce parasite helminthe ont fait l'objet au cours de ces 10 dernières années, de nombreuses études

(Hokke and Yazdanbakhsh, 2005). Ce sont des approches de spectrométrie de masse qui ont permis l'identification d'une grande variété de motifs glycaniques sur *Schistosoma* (*mansoni* et *japonicum*) mais également sur d'autres helminthes. Des études plus fines sur la localisation de ces structures sucrées chez le schistosome, aux différents stades évolutifs du parasite, ont pu également être réalisées grâce à l'obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques des glycanes précédemment identifiés par spectrométrie de masse. Bien que la liste soit longue, les éléments glycaniques qui ont suscité un intérêt tout particulier ces dernières années, sont présentés dans le **tableau 1**. Certains de ces éléments sont spécifiques au genre *Schistosoma*, tel que le pseudo Le^Y.

Abbreviation	Structure
LDN	GalNAcβ1-4GlcNAcβ1-R
LDN-F	GalNAcβ1-4GlcNAcβ1-R Fucα1-3
Le ^X	Galβ1-4GlcNAcβ1-R Fucα1-3
polyLe ^X	[-3Galβ1-4GlcNAcβ1-] _n -R Fucα1-3
pseudo Le ^Y	Galβ1-4GlcNAcβ1-R Fucα1-3 Fucα1-3
CAA	-6GalNAcβ1-[6GalNAcβ1-] _n -R GlcAβ1-3 GlcAβ1-3
F-LDN	GalNAcβ1-4GlcNAcβ1-R Fucα1-3
F-LDN-F	GalNAcβ1-4GlcNAcβ1-R Fucα1-3 Fucα1-3
HexNAc-DF	GalNAcβ1-[4GlcNAcβ1] _n -R Fucα1-3 Fucα1-3 +/- Fucα1-2 Fucα1-2
core β2-Xyl	Manα1-6 Xylβ1-2Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-Asn
core α3-Fuc	GlcNAcβ1-2Manα1-3 Fucα1-3

Tableau 1 : Eléments glycaniques de *Schistosoma*.

D'après Hokke et al, 2005

Les structures non protéiques ayant longtemps été considérées comme étant peu immunogènes, il est maintenant clairement établi au moins dans le contexte de la schistosomiase, que des motifs glycaniques sont impliqués dans l'induction de la réponse immune Th2.

2-1 Le déterminant trisaccharidique Lewis X

Ce sont les travaux de l'équipe du Dr D. Harn à Boston qui ont tout d'abord montré l'importance d'une structure fucosylée du schistosome, appelée Lacto-N-Fucopentaose III (LNFP III) et contenant le déterminant trisaccharidique Lewis X (**Figure 3**), dans la

polarisation de la réponse immune vers un profil de type Th2 au cours de l'infection (Velupillai and Harn, 1994; Velupillai et al., 1997). Le Lewis X représente un motif d'adhérence également présent chez l'hôte et particulièrement exprimé au stade oeuf chez le schistosome (Trottein et al., 1997). Bien que son rôle immunomodulateur ait été montré (Okano et al., 2001), les mécanismes responsables de son effet adjuvant restent toujours peu élucidés à l'heure actuelle. Il semble néanmoins que certaines populations cellulaires du système immunitaire inné, telles que les lymphocytes B-1 présents dans le péritoine (Velupillai et al., 1997), les macrophages F4/80⁺Gr1⁺ (Terrazas et al., 2001), les DCs (Thomas et al., 2003) et les cellules NK (Atochina and Harn, 2005) soient activées, directement ou indirectement, par ce déterminant trisaccharidique.

Bien que l'ensemble des travaux effectués par l'équipe du Dr D. Harn permet d'associer directement le déterminant trisaccharidique Lewis X au phénomène d'immunomodulation observé au cours de la schistosomiase, leur travail suggère également le rôle particulièrement important du groupement fucose (associé en α 1-3 au GlcNac), dans l'induction de la réponse de type Th2 (voir figure 1, encadré)(Okano et al., 2001). Cette observation a également été faite par l'équipe du Dr M. Yazdanbakhsh en 2002 (Van der Kleij et al., 2002b) ainsi que par notre groupe (voir ci-dessous). En effet, Van der Kleij et coll. ont montré qu'un autre épitope glycanique comprenant 2 groupements fucose (comparativement au même épitope dépourvu de fucose) et présent uniquement sur les glycoconjugués des œufs du schistosome, le LDN-DF (voir tableau 1), induisait une très forte production de cytokines (tel que l'IL-10) par les cellules mononuclées du sang humain, confirmant donc l'importance de la fucosylation des structures glycaniques dans l'induction de la réponse immune. Les travaux de notre groupe ont également permis l'identification d'un autre déterminant saccharidique comprenant entre autre un groupement fucose, impliqué dans le développement de la réponse Th2 au cours de l'infection.

2-2 Les glyco-épitopes core fucose et core xylose

Parallèlement aux structures décrites ci-dessus (le LNFP III/Lewis X et LDN-DF), les premiers travaux de Khoo et coll. suggéraient un rôle éventuel de 2 autres motifs glycaniques, les core fucose et core xylose (voir ci-dessus, **Tableau 1**), dans l'immunomodulation observée au cours de la schistosomiase. En effet, les auteurs montraient une expression de ces 2 glyco-épitopes par le schistosome (Khoo et al., 2001). Par ailleurs, ces 2 motifs exprimés par le schistosome, sont également retrouvés sur de nombreux allergènes du règne animal (insecte) et végétal et semblent être à l'origine de nombreuses allergies alimentaires (fruits, farines) et respiratoires (pollen)(Garcia-Casado et al., 1996; van Ree et al., 2000; Wilson et al., 1998). Bien que leur rôle dans les phases effectrices de l'allergie ne soit pas encore démontré, les patients atopiques présentent un

taux d'IgE anti-core fucose et anti-core xylose élevé. Nos travaux démontrent le rôle de ces deux épitopes dans l'induction de la réponse Th2 au cours de la schistosomiase (**Article 1**).

a- Article 1 : résumé des travaux

Cette étude, faite en collaboration avec l'équipe du Pr P. LEROUGE (Université de Rouen) a nécessité dans un premier temps, la préparation au laboratoire d'anticorps spécifiques des structures core fucose et core xylose. L'utilisation de ces anticorps a permis de détecter, en immunofluorescence et immunohistochimie sur des coupes de parasites, l'expression de ces 2 déterminants glycaniques aux différents stades du cycle évolutif du schistosome, notamment au stade œuf. Ce résultat a été confirmé par la mise en évidence des activités enzymatiques de type core fucosyltransférase et core xylosyltransférase chez le schistosome. Cette dernière approche a pu être réalisée grâce à une nouvelle technique de synthèse d'oligosaccharides (structures acceptrices) mise au point par l'équipe du Dr I. WILSON (Université de Vienne, Autriche). Parallèlement à ces approches *in vitro*, l'utilisation de glycoprotéines témoins possédant ces motifs nous a permis de démontrer l'immunogénicité de ces structures chez la souris, le rat et l'homme (Bardor et al., 2003). De la même manière, l'infection de souris par le schistosome provoque la formation d'anticorps spécifiques d'isotypes IgM et IgG1, mais pas d'IgG2a, suggérant ainsi leur aptitude à induire une réponse de type 2.

b- Article 1 : conclusions

Nous avons identifié de nouvelles structures glycaniques, le core fucose et le core xylose, présentes chez le schistosome et capables d'induire, au moins en partie, une réponse Th2 au cours de la schistosomiase. Ces motifs, présents sur de nombreux allergènes, pourraient également avoir un rôle potentiel dans les phases effectrices de l'allergie.

En conclusion, l'ensemble des études décrites ci-dessus montre donc clairement l'importance de certains glyco-épitopes dans le développement de la réponse Th2 au cours de la schistosomiase. Cependant, le mode d'action de tels composés reste peu élucidé. Il semble néanmoins évident que, pour agir, une interaction entre ces motifs glycaniques et des récepteurs de surface sur les cellules présentatrices d'antigènes (APC), surtout les DCs, soit indispensable. En effet, les DCs sont les seules cellules capables d'initier une réponse immune antigène-spécifique. Parmi les récepteurs de l'immunité innée de l'hôte, capables d'interagir avec les glycoconjugués du schistosome, on retrouve les Toll Like Receptors (ou TLR) et les lectines.

Schistosome N-glycans containing core α 3-fucose and core β 2-xylose epitopes are strong inducers of Th2 responses in mice

Christelle Faveeuw¹, Thierry Mallevaey¹, Katharina Paschinger², Iain B. H. Wilson², Josette Fontaine¹, Rosella Mollicone³, Rafael Oriol³, Friedrich Altmann², Patrice Lerouge⁴, Monique Capron¹ and François Trottein¹

¹ Inserm U547, IFR17, Institut Pasteur de Lille, Lille, France

² Institut für Chemie, Universität für Bodenkultur, Wien, Austria

³ Inserm U504, Université de Paris Sud XI, Villejuif, France

⁴ CNRS-UMR 6037, IFRMP 23, Université de Rouen, Mont Saint Aignan, France

During murine schistosomiasis, egg-derived glycoconjugates play a key role in skewing the immune response towards a Th2 phenotype. Among the candidates responsible for this effect, complex-type N-glycans containing the core α 3-fucose and core β 2-xylose determinants, two glycan epitopes found in some invertebrate- and plant-derived allergens, may be important. Here, we show that core α 3-fucose and core β 2-xylose determinants are expressed in the different developmental stages of *Schistosoma mansoni*, particularly in the excretory-secretory systems of schistosomula and adult worms and in eggs deposited in the liver. Glycosyltransferase assays confirmed the presence of core α 3-fucosyltransferase and core β 2-xylosyltransferase activities in egg extracts. Using a model of immunization with pulsed dendritic cells, we show that egg-derived glycoproteins containing the core α 3-fucose and core β 2-xylose determinants generate a strong Th2-biased cellular response in mice and that the glycan moieties of this extract are important in this effect. During murine infection, these complex-type N-glycans induce a glycan-specific Th2 cellular response and elicit T-dependent anti-core α 3-fucose and anti-core β 2-xylose IgG1 (a Th2-associated isotype), but not IgG2b (a Th1-associated isotype) Ab. Taken together, our results point out the importance of core fucosylated/xylosylated N-glycans in the Th2 immune response during murine schistosomiasis.

Key words: Core α 3-fucose/core β 2-xylose / *Schistosoma mansoni* / Th2 response

Received	7/11/02
Revised	14/2/03
Accepted	6/3/03

1 Introduction

Murine schistosomiasis is characterized by a gradual switch from a predominant Th1 cytokine response (before the egg laying) to a Th2-dominated response, an event that favors the formation of granulomas around viable eggs in the liver [1, 2]. It is now clearly established that egg-derived glycan structures play a key role in this immunological phenomenon [3, 4]. Among them, glycoconjugates containing a fucose α 3-linked to GlcNAc (Gn) residues may be important. For instance, the lacto-N-fucopentaose III, which contains the Lewis X trisaccharide [Gal β 1–4(Fuc α 1–3)Gn], exerts immunomodulatory

function during infection [5–7], probably by activating cells of the innate immune system [8]. Moreover, although the Lewis X epitope is also expressed by host cells, it triggers a strong Ab response in mice and humans infected by *Schistosoma mansoni* [9, 10]. More recently, complex-type N-glycans possessing core α 3-fucose and core β 2-xylose determinants have been detected in *Schistosoma* [11–13]. The localization of these core fucosylated/xylosylated glycans within the parasite has, however, not been examined. Moreover, for the reasons explained below, these core α 3-fucosylated and core β 2-xylosylated N-glycans may be important in the outcome of the immune response during schistosomiasis infection.

The core α 3-fucose and core β 2-xylose determinants are found on many other invertebrate- and plant-derived complex-type N-glycans [Man₃(Xyl)FucGn₂]. In plants, the Man₃Gn₂ N-glycan core common to all eukaryotes is substituted by β 2-linked xylose and/or α 3-linked core

[DOI 10.1002/eji.200323717]

Abbreviations: Gn: GlcNAc **PLA2:** Phospholipase A2
MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry **SEA:** Soluble egg Ag **HRP:** Horseradish peroxidase

3- Glycoconjugués et TLR

Les TLRs présents chez les mammifères, sont les homologues de la protéine Toll décrite chez la drosophile. Les TLR font partie de la famille des PRR (Pattern Recognition Receptors) capables de reconnaître des structures moléculaires bien conservés au sein des agents pathogènes, les PAMP (pathogen-associated molecular patterns). A l'heure actuelle, dix TLR ont été décrits chez la souris et exprimés principalement par les leucocytes (notamment APC) et les cellules épithéliales. Chaque TLR possède une certaine spécificité de ligand. L'interaction ligand-TLR entraînent la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation et la réponse immunitaire adaptative, ex : les cytokines, via une cascade d'événements signalétiques cellulaires.

Certains PAMP du schistosome capables d'activer les TLR ont récemment été mis en évidence. Une étude a montré que le lysophosphatidylsérine (lyso-PS), structure lipidique caractéristique du schistosome, active les DCs via le TLR-2 et les polarise vers un profil Th2 (van der Kleij et al., 2002a). Ces DC sont alors capables de générer des lymphocytes CD4⁺ Th2 mais aussi des cellules T régulatrices productrices d'IL-10. Par ailleurs, l'équipe du Dr D. Harn, travaillant sur le LNFPIII (voir ci-dessus), a montré que ce glycan active les DC via le TLR-4 et les polarise vers une réponse Th2 (Thomas et al., 2003). Toutefois il est possible que cette activation du TLR-4 résulte d'une contamination du LNFPIII par du LPS car dans notre groupe, il a été montré que la déficience en TLR-4 n'entraîne pas de défaut de synthèse d'IL-12 et TNF- α par les DC en réponse aux œufs du schistosome (Aksoy et al., 2005). De plus, nous montrons clairement que les œufs du schistosome n'activent pas le TLR-4 mais activent le TLR-3 via les ARN double-brin isolés de l'œuf du schistosome.

Ainsi, il semble que le schistosome soit capable d'activer certains récepteurs de l'immunité innée, parmi lesquels les TLR. Cette caractéristique n'est pas spécifique à ce pathogène helminthe et d'autres parasites, tels que les nématodes filaires sont également capables d'activer certains TLRs, i.e. TLR4 (Goodridge et al., 2005).

Parallèlement aux TLRs, les récepteurs lectiniques représentent une autre famille de PRR potentiellement intéressante.

4- Glycoconjugués et lectines

Les lectines forment une famille hétérogène de récepteurs qui reconnaissent certaines structures oligosaccharidiques et ont donc la capacité d'interagir avec les glycolipides, les glycoprotéines et les protéoglycanes. Elles jouent un rôle majeur dans de nombreux processus biologiques et représentent notamment l'une des composantes essentielles des cascades biochimiques intervenant dans les interactions entre cellules. Certains de ces récepteurs lectiniques sont internalisés et d'autres ont la capacité de transférer l'information de l'extérieur vers l'intérieur des cellules, suite à la fixation de leur ligand.

Plusieurs lectines ont été décrites comme étant capables d'interagir avec les motifs glycaniques du schistosome, la plus connue étant une lectine de type C appelée DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3 Grabbing Nonintegrin). Les antigènes solubles de l'œuf de *S. mansoni* se fixent à DC-SIGN avec une très forte affinité et cette liaison est largement inhibée par des anticorps spécifiques des motifs Lewis X et LDN-F (voir tableau 1)(Appelmek et al., 2003; van Die et al., 2003). DC-SIGN est également capable d'internaliser des antigènes contenant le Lewis X (Appelmek et al., 2003). Ainsi, étant donné l'implication du déterminant Lewis X dans la polarisation de la réponse immune vers une réponse Th2 au cours de la schistosomiase, nous pouvons supposer que l'interaction Lewis X - DC-SIGN soit nécessaire à ce processus d'immunomodulation observé au cours de l'infection. Les travaux de notre groupe suggèrent que l'interaction de DC-SIGN avec un ligand présent sur l'œuf du schistosome (Lewis X ?) inhibe la voie de signalisation TLR-3 dépendante sur les DCs et pourrait ainsi moduler/contrôler par ce mécanisme d'action, la nature de la réponse immune adaptative (article en préparation). Ce dialogue DC-SIGN/TLR a déjà été identifié dans le cas d'infection à mycobactéries (Geijtenbeek et al., 2003) .

Plus récemment, une autre lectine a suscité un intérêt tout particulier, la galectine-3. Cette lectine de type S fixe le LDN (voir **tableau 1**), cet épitope étant exprimé par les œufs (surtout les coquilles) de *S. mansoni* (van den Berg et al., 2004). La galectine-3 a également été identifiée *in vivo* dans un modèle de granulome, suggérant un rôle éventuel de l'interaction LDN-galectine-3 dans la formation du granulome et peut-être la réponse Th2, celle-ci étant associée à la granulogénèse, au cours de l'infection (van de Vijver et al., 2004). A ce titre, les travaux récents de notre groupe montre l'implication de la galectine-3 dans le développement de la pathologie puisque l'infection de souris déficientes pour la galectine-3 se traduit par une réponse Th1 augmentée associée à une pathologie moins sévère (Breuilh et al, article en préparation).

D'autres lectines ont également été décrites comme pouvant reconnaître certains glycanes du schistosome mais des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer qu'elles puissent avoir un rôle important dans la réponse Th2 (ex : MGL, mannan binding protein, surfactant protein SP-D)(Hokke and Yazdanbakhsh, 2005).

Suite à l'interaction ligand-lectine, l'initiation de la réponse immune Th2 nécessite un contact ultérieur cellule dendritique-lymphocyte T. Une hypothèse est que l'interaction glycane-lectine, telle que Lewis X - DC-SIGN, à la surface de l'APC, conduit (1) à l'internalisation de ce complexe (2) à la dégradation de l'antigène, en l'occurrence une glycoprotéine ou un glycolipide, puis (3) à la présentation antigénique au lymphocyte T. Classiquement, la partie protéique des glycoprotéines est dégradée en peptides et ceux-ci sont présentés aux lymphocytes T, via les molécules du Complexe Majeur

d'Histocompatibilité (CMH), essentiellement le CMH de type II. En revanche, la présentation d'antigènes lipidiques et glycolipidiques est différente et implique chez la souris une molécule apparentée aux molécules du CMH type I, appelée CD1d.

5- Glycoconjugués et CD1d

5-1 La molécule CD1d

La molécule CD1d est une molécule présentatrice d'antigènes peu polymorphe (Brigl and Brenner, 2004). CD1d est exprimée par la majorité des cellules hématopoïétiques des tissus lymphoïdes primaires et secondaires : DCs, monocytes/macrophages, lymphocytes B et T (Brossay et al., 1997). Elle est peu exprimée dans les organes non lymphoïdes à l'exception du foie et de l'épithélium gastro-intestinal (Bleicher et al., 1990). Les cellules qui expriment le plus fortement la molécule CD1d sont les lymphocytes B de la zone marginale de la rate (Roark et al., 1998).

La poche très hydrophobe de la molécule CD1d permettrait l'accès des chaînes acyles des antigènes amphiphiles de manière peu spécifique, laissant les groupements hydrophiles libres d'interagir très spécifiquement avec le TCR des lymphocytes T. Cette faible spécificité de l'interaction antigène/CD1d est nécessaire pour contrebalancer le caractère non polymorphe de la molécule CD1d. En effet, une interaction hautement spécifique limiterait leur aptitude de présentation à un trop petit nombre d'antigènes.

5-2 CD1d et réponse Th2

La mise en évidence de l'extrême richesse du schistosome en structures glyco(shingo)lipidiques représente le premier argument en faveur d'une éventuelle implication de la molécule CD1d dans le développement de la réponse immunitaire innée et adaptative. Ce sont les travaux de notre groupe qui démontre pour la première fois dans le modèle de la schistosomiase, le rôle du CD1d dans réponse Th2 (**article 2**).

a- Article 2 : résumé des travaux

Cette étude a été faite chez des souris Balb/c, le fond génétique de ces souris étant connu pour favoriser les réponses de type Th2 (contrairement à la C57Bl/6). Afin de tester l'hypothèse du rôle de la molécule CD1d dans l'induction des réponses de type Th2 au cours de la schistosomiase murine, nous avons initialement utilisé un modèle de sensibilisation de DCs. Après incubation de DCs avec des antigènes parasitaires et transfert (en i.d) chez des souris receveuses, une analyse de la nature de la réponse immune induite au niveau des ganglions drainant a été réalisée. Nous avons pu montrer que des DCs sensibilisées avec les antigènes du stade oeuf (mais pas du stade cutané) provoque une forte réponse de type Th2. La déglycosylation de cette dernière préparation n'entraîne plus cette polarisation, confirmant ainsi le rôle des glycoconjugués dans ce phénomène. Suite à ce travail et en

collaboration avec l'équipe du Dr L. VAN KAER (Vanderbilt Institute, Nashville), nous avons abordé l'étude du rôle de la molécule CD1d dans ce mécanisme. Ainsi, l'utilisation de DCs issues de souris déficientes en CD1d (CD1 KO) a permis de confirmer notre hypothèse selon laquelle le CD1d joue un rôle clef dans l'induction de la réponse de type Th2 spécifique des antigènes du stade oeuf. Nous avons ensuite étudié le rôle du CD1d dans le développement de la réponse immune spécifique et dans la formation des granulomes au cours de l'infection. Nos résultats démontrent que (1) les souris CD1d KO développent une réponse de type Th2 réduite après oviposition, par rapport aux souris sauvages, et que (2) les souris CD1d KO présentent des modifications importantes au niveau des granulomes (réduction de l'infiltrat éosinophilique et du dépôt de collagène autour des œufs).

b- Article 2 : conclusions

Nous avons ainsi montré que (1) la molécule CD1d était impliquée dans l'induction de la réponse de type Th2 en réponse à l'œuf du schistosome et (2) la molécule CD1d était nécessaire à la mise en place d'une réponse Th2 optimale au cours de la schistosomiase.

6- Conclusions

Les travaux cités ci-dessus soulignent l'importance des glycoconjugués dans l'élaboration de la réponse Th2 au cours de la schistosomiase. Cette réponse Th2 n'est néanmoins pas spécifique de la schistosomiase et des études sur d'autres modèles d'helminthiases accentuent l'importance des déterminants saccharidiques sur le développement de cette réponse. Enfin, à la vue des données bibliographiques sur ces parasitoses à helminthes, il serait tout à fait tentant de penser que de telles structures puissent également participer, au moins en partie à l'initiation de la réponse Th2 au cours des pathologies allergiques.

La mise en évidence par notre groupe de l'implication de la molécule CD1d dans l'élaboration d'une réponse Th2 optimale au cours de la schistosomiase nous a progressivement et logiquement conduit à nous intéresser aux lymphocytes T CD1d-restreints et a ainsi ouvert dans le groupe un nouvel axe de recherche.

Antigen Presentation by CD1d Contributes to the Amplification of Th2 Responses to *Schistosoma mansoni* Glycoconjugates in Mice¹

Christelle Faveeuw,* Véronique Angeli,* Josette Fontaine,* Charles Maliszewski,[†] André Capron,* Luc Van Kaer,[‡] Muriel Moser,[§] Monique Capron,* and François Trottein^{2*}

During murine schistosomiasis, there is a gradual switch from a predominant Th1 cytokine response to a Th2-dominated response after egg laying, an event that favors the formation of granuloma around viable eggs. Egg-derived glycoconjugates, including glycolipids, may play a crucial role in this phenomenon. In this study, we used a model of dendritic cell sensitization to study the role of egg glycoconjugates in the induction of specific immune response to soluble egg Ag (SEA) and to investigate the possibility that CD1d, a molecule implicated in glycolipid presentation, may be involved in such a phenomenon. We show that, when captured, processed, and presented to naive T lymphocytes by dendritic cells, egg, but not larval, Ag skew the immune response toward a Th2 response. Periodate treatment reversed this effect, indicating that the sugar moiety of SEA is important in this phenomenon. Using DC treated *ex vivo* with a neutralizing anti-CD1d Ab or isolated from CD1d knockout mice, we show that CD1d is crucial in the priming of SEA-specific Th2 lymphocytes. We then evaluated the contribution of CD1d on the development of the SEA-specific immune response and on the formation of the egg-induced liver granuloma during murine schistosomiasis. We find that CD1d knockout mice have a reduced Th2 response after egg laying and develop a less marked fibrotic pathology compared with wild-type mice. Altogether, our results suggest that Ag presentation of parasite glycoconjugates to CD1d-restricted T cells may be important in the early events leading to the induction of Th2 responses and to egg-induced pathology during murine schistosomiasis. *The Journal of Immunology*, 2002, 169: 906–912.

Schistosomiasis is a chronic parasitic disease that affects over 200 million people worldwide. The pathology of the disease is associated with egg deposition in the liver and intestines and is characterized by the formation of granulomas developing around viable eggs. In humans, granulomatous disease may eventually lead to fibrosis, occlusion of the presinusoidal vascular beds, and fatal portal hypertension (for review, see Ref. 1). The host's response to soluble secretions from mature eggs is characterized by an intense delayed-type hypersensitivity reaction that is principally mediated by egg Ag-specific MHC class II-restricted CD4⁺ Th cells. Analysis of the immune response in *Schistosoma mansoni*-infected mice shows that the Th0/Th1 cytokine response shifts toward a strong Ag-specific as well as nonspecific Th2 response with the maturation of the granulomas (2, 3). It has been

clearly demonstrated that soluble egg Ag (SEA)³ are the main inducers of this Th2-dominated response (3–5). Although numerous studies have been performed to understand the molecular and cellular events involved in granuloma formation, the early mechanisms leading to the switch toward the Th2 response after egg deposition are still unknown. Similarly, the nature of the egg Ag involved is poorly defined, although previous studies suggested that glycoconjugates expressed by the eggs may be crucial in such events (6). More recently, using a murine model of intranasal sensitization with SEA, Okano et al. (7) showed that carbohydrate determinants are required for induction of SEA-specific Th2 responses, but are not themselves epitopes of induced IgE responses. The molecular mechanisms leading to this adjuvancy remain unclear. Among the putative egg glycanic structures implicated, lacto-*N*-fucopentaose III, which contains Lewis X (Le^x) trisaccharide, may play a key role (8–11). This oligosaccharide determinant is expressed on schistosome glycoproteins and glycolipids (12, 13) and appears to polarize the immune response by activating cells of the innate immune system (14). In the present study, we investigated the possibility that, when presented by APC, egg glycoconjugates may impact the immune response. We also studied, for the reasons explained below, the role of CD1d in the induction of SEA-specific Th2 immune response. To this end, due to their key role in both innate and acquired immune responses (15, 16), we used dendritic cells (DC) as professional APC.

In mice, peptide fragments are presented by MHC I and II molecules, whereas (glyco)lipids are preferentially presented via the CD1d molecule (17, 18). The later type of presentation is probably relevant during *S. mansoni* infection because glycosphingolipid

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 547, Institut Pasteur de Lille, Lille, France; [†]Immunex, Seattle, WA 98101; [‡]Howard Hughes Medical Institute, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN 37232; and [§]Université Libre de Bruxelles, Gosselies, Belgium

Received for publication October 19, 2001. Accepted for publication April 29, 2002.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Pasteur Institute of Lille, and a grant from the Ministère de la Recherche (Program de recherche fondamentale en microbiologie et maladies infectieuses et parasitaires, no. IA028F). C.F. was the recipient of postdoctoral fellowships from the Fondation pour la Recherche Médicale and la Société de Secours des Amis des Sciences, and V.A. was supported by a fellowship from the Ministère de la Recherche. F.T. is a member of the Center National de la Recherche Scientifique.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. François Trottein, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 547, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille cédex, France. E-mail address: Francois.Trottein@pasteur-lille.fr

³ Abbreviations used in this paper: SEA, soluble egg Ag; DC, dendritic cell; KO, knockout; Le^x, Lewis X; LN, lymph node; Sm28GST, *S. mansoni* 28-kDa protein; SSA, soluble schistosomula Ag; wt, wild type.

Lymphocytes CD1d-restreints et régulation de la réponse immune : modèle de la schistosomiase

Les cellules qui reconnaissent la molécule CD1d sont des lymphocytes CD3⁺ que plusieurs caractéristiques originales distinguent des lymphocytes T conventionnels, restreints par le CMH ; la plus radicale étant la reconnaissance de lipides en association avec CD1d. Ces cellules CD1d-restreintes sont communément appelées lymphocytes T Natural Killer (ou NKT) mais comme vous le verrez ci-dessous, représentent une population très hétérogène. Pour la suite de mon exposé, je me concentrerai sur les lymphocytes NKT chez la souris.

1- Les lymphocytes NKT invariants (ou iNKT)

Chez la souris, cette population constitue la grande majorité des cellules NKT. Elle est la mieux caractérisée et étudiée grâce à son usage exclusif d'un TCR α invariant, constitué du segment V α 14-J α 18 (chez l'homme, V α 24-J α 18)(Lantz and Bendelac, 1994). Ce TCR α s'associe à un nombre très restreint de chaînes β , utilisant principalement les segments V β 8, V β 7 et V β 2 (Porcelli et al., 1993).

Les cellules iNKT partagent plusieurs récepteurs avec les cellules NK : NK1.1 (ou CD161 chez l'homme), CD122 et des récepteurs régulateurs de cytotoxicité appartenant notamment à la famille Ly-49. Les iNKT peuvent être soit CD4⁺ soit double négatifs (DN) CD4⁻CD8⁻ et ont un phénotype de cellule mémoire : CD44^{hi}, CD69^{hi}, CD45RB^{hi}, CD122^{hi} et CD62L⁻ (Kronenberg and Gapin, 2002).

Les iNKT sont présents dans de nombreux tissus lymphoïdes et non lymphoïdes mais c'est au niveau du foie qu'elles sont majoritairement représentées (10 à 40%). On les retrouve également dans le thymus, la moelle osseuse, la rate, les ganglions, le sang ou encore les poumons, où elles représentent généralement moins de 1% des lymphocytes (Eberl et al., 1999).

La molécule CD1d est nécessaire à leur ontogénie et à leur activation en périphérie (Mendiratta et al., 1997). L' α -galactosylcéramide (α -GC), un glycolipide isolé d'une éponge marine, est capable de se fixer dans la poche ligand de CD1d et active très fortement et très spécifiquement les iNKT (Kawano et al., 1997). L'existence d'un tétramère CD1d/ α -GC rend ces cellules facilement identifiables.

D'un point de vue fonctionnel, de nombreuses études démontrent leur contribution aux réponses immunitaires anti-infectieuse, -tumorale ainsi qu'au maintien de l'équilibre tolérance-autoimmunité. Ces implications physiopathologiques sont liées à leur capacité de

synthèse de cytokines de type Th1 et/ou Th2 (IFN γ versus IL-4), très rapidement après activation (Godfrey and Kronenberg, 2004; Godfrey et al., 2004).

2- Les lymphocytes NKT non-invariants (ou non-iNKT)

Aux côtés des lymphocytes iNKT, une autre population de cellules NKT non classiques, CD1d restreints, également apparentés aux cellules NK et capables de produire de grande quantité de cytokines a été mise en évidence chez la souris (Behar et al., 1999; Cardell et al., 1995; Park et al., 2001; Skold et al., 2000). Les non-iNKT n'expriment pas la chaîne invariante V α 14-J α 18 du TCR mais utilisent un répertoire de segments V nettement plus diversifié que les iNKT. Ces cellules comprennent néanmoins une sous population exprimant les chaînes V α 3-J α 9 ou V α 8, préférentiellement associé au TCR β V β 8. Cette sous-population CD1d-restreinte inclut aussi les lymphocytes T $\gamma\delta$ (V γ 4).

Ces lymphocytes non-iNKT ont également un phénotype de cellule mémoire mais restent néanmoins peu caractérisés, notamment par manque d'outil biologique spécifique. Contrairement aux iNKT, les non-iNKT ne reconnaissent pas l' α -GC et ne peuvent donc pas être identifiées à l'aide du tétramère CD1d/ α -GC.

Les non-iNKT, bien que faiblement représentées (<1%), sont majoritairement localisées dans la rate, le thymus et les ganglions lymphatiques (Eberl et al., 1999).

Les caractéristiques de ces 2 populations de cellules NKT sont résumées dans le tableau 2 ci-dessous.

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

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

3- Activation des lymphocytes T CD1d-restreints

3-1 Activation TCR-dépendante

L'engagement du TCR des cellules NKT par la molécule CD1d exprimée par les APC, constitue la principale voie d'activation de ces cellules. Mis à part l' α -GC, ligand non physiologique, la molécule CD1d est capable de présenter des ligands glycolipidiques exogènes d'origine microbienne (**Figure 3**). Parmi ces ligands exogènes, les iNKT peuvent être activés par des glycosphingolipides, le phosphatidylinositol mannoside isolé de mycobactéries (Fischer et al., 2004) ainsi que les α -galacturonosylcéramides isolés de *Sphingomonas* (Mattner et al., 2005). Récemment, un ligand non glycosphingolipidique, le diacylglycérol, dérivé de l'agent pathogène *Borrelia burgdorferi*, a été identifié comme un ligand exogène capable également d'activer les cellules iNKT (Kinjo et al., 2006).

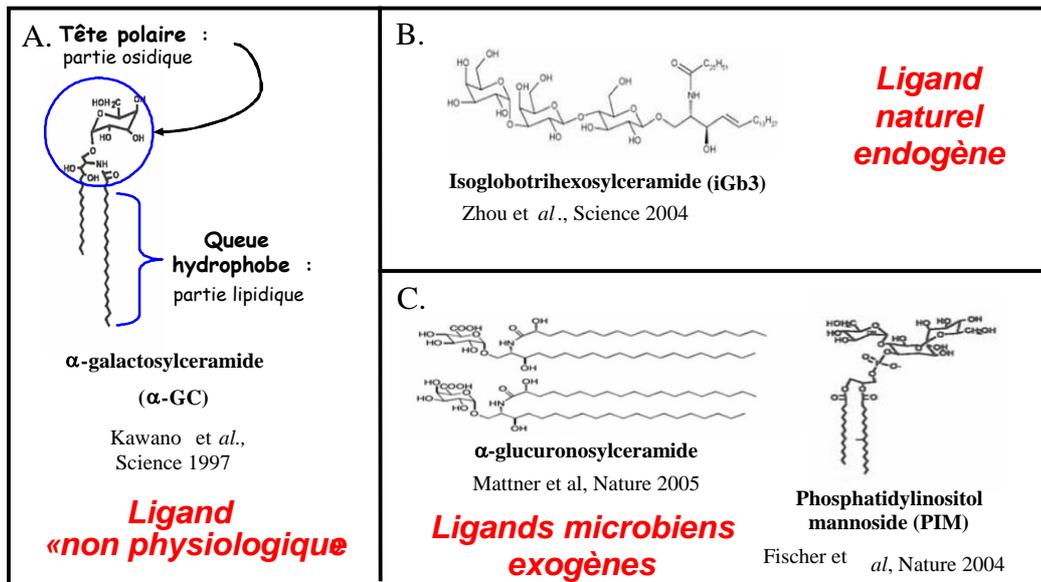


Figure 3 : Nature des ligands CD1d-restreints

Dans le cas de ligands exogènes, ceux-ci vont se fixer sur la DC à la molécule CD1d, après reconnaissance de l'agent pathogène, et être reconnu par le TCR semi-invariant de la cellule iNKT (modèle **Figure 4**).

Parallèlement à ces ligands exogènes, une étude récente montre que les cellules iNKT peuvent également être activées via la présentation CD1d-restreinte d'un ligand glycosphingolipidique endogène appelé iGb3 (isoglobotrihexosylceramide) (**Figure 3**)(Brigl et al., 2003). L'hypothèse dans ce cas est que des structures microbiennes (type PAMPs) vont être reconnues par des récepteurs type TLR (ou lectines) (voir ci-dessus) au niveau de la DC, entraînant la fixation du ligand endogène à la molécule CD1d puis la reconnaissance de ce complexe par le TCR semi-invariant des cellules iNKT (modèle **Figure 4**). Toutefois, il semble que l'activation via l'iGb3 requiert des co-signaux notamment des cytokines comme l'IL-12.

A l'exception de l'iGb3 peu de travaux ont montré l'existence de ligands lipidiques endogènes. Seule une étude a montré qu'un ganglioside, le GD3, exprimé par certaines cellules tumorales, pouvait activer une sous population de iNKT (Wu et al., 2003).

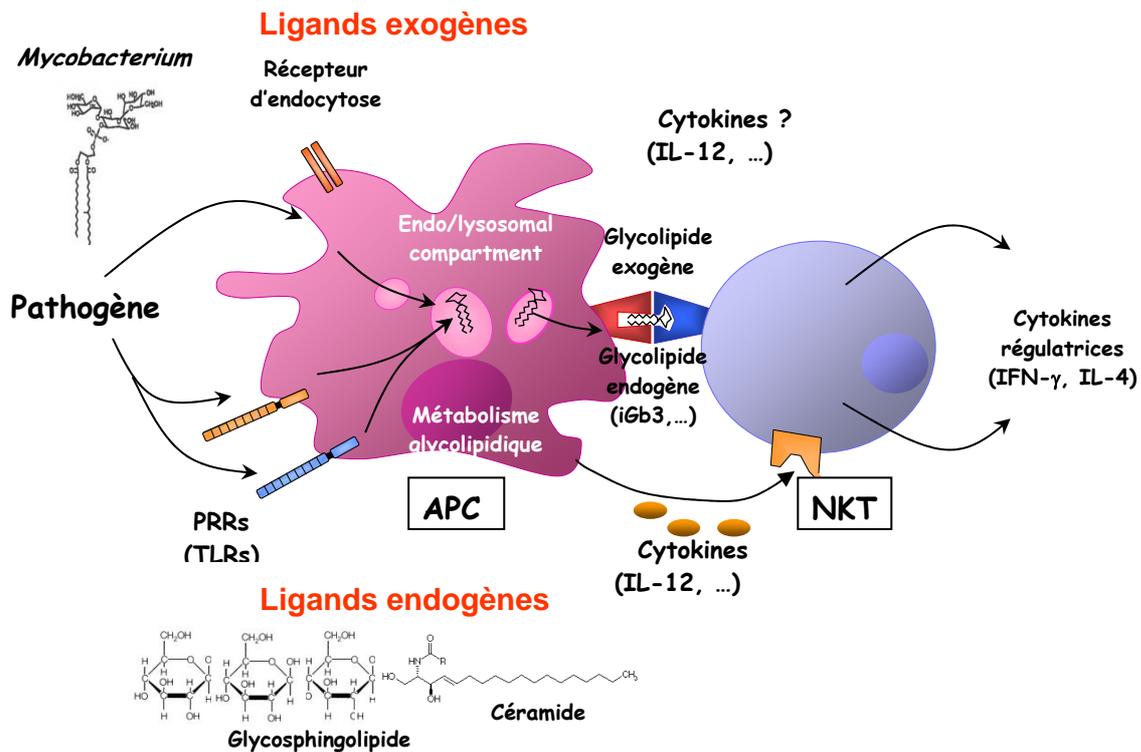


Figure 4 : Activation TCR-dépendante des cellules NKT

Si très peu de ligands endogènes (ou exogènes) capables d'activer les iNKT sont connus à l'heure actuelle, ceux capables d'activer les non-iNKT sont encore plus restreints. En effet, à ce jour, seul le cérébroside sulfatide a été identifié comme ligand pouvant activer cette sous-population de cellules non-iNKT (Jahng et al., 2004).

3-2 Activation TCR-indépendante

Comme nous l'avons décrit ci-dessus, les cellules NKT expriment de nombreux récepteurs des cellules NK, certains d'entre eux étant activateurs comme la molécule NKG2D ou NK1.1. Arase et coll. ont montré qu'un anticorps anti-NK1.1 pouvait activer les cellules NKT et leur faire produire de l'IFN γ (Arase et al., 1996). Certaines cytokines, comme l'IL-12 ou l'IL-12/IL-18, sont également capables d'activer les iNKT (Eberl and MacDonald, 1998; Leite-De-Moraes et al., 1999).

Il est tout à fait possible que ces cellules puissent être activées directement via les TLR. Très peu de choses sont connus sur l'expression des TLR par les cellules NKT. Une étude a montré la présence de mRNA codant pour les TLR-2, 4 et 5 dans les cellules iNKT (Shimizu et al., 2002). Plus récemment, Askenase a montré chez la souris une expression du TLR-4 par les iNKT et leur activation via le TLR-4 (LPS) entraîne la production par ces cellules d'IL-4 (Askenase et al., 2005).

De nombreux travaux ont montré que les cellules NKT (surtout les iNKT) deviennent indétectables *in vivo* suite à leur activation (α -GC, anti-CD3). Certaines de ces cellules

meurent par apoptose (Eberl and MacDonald, 1998; Leite-de-Moraes et al., 2000; Matsuda et al., 2000). Cependant, la disparition apparente de ces cellules peut également être due à la diminution de l'expression de certains marqueurs à la surface de ces cellules après activation. C'est le cas notamment de la molécule NK1.1 mais également du TCR, dans ce dernier cas, dû à l'internalisation du complexe TCR/CD3 (Crowe et al., 2003; Wilson et al., 2003).

4- Lymphocytes CD1d-restreints et pathologies : régulation de la réponse immune

De part leur propriétés fonctionnelles, notamment leur production de cytokines de type Th1 et/ou Th2, les lymphocytes NKT ont été impliqués dans le développement et le contrôle de nombreuses réponses immunes : autoimmunité, immunité antitumorale, et pathologies infectieuses, inflammatoires et allergiques.

Dans la majorité de ces études les auteurs utilisent des approches expérimentales similaires, celles-ci se focalisant sur 3 points principaux :

- 1) Etudier l'activation des cellules iNKT au cours de la pathologie (fréquence et nombre de cellules iNKT, marqueurs d'activation comme CD25, CD69 ou CD44, production de cytokines).
- 2) Etudier l'effet de l'activation pharmacologique des cellules iNKT (ex : α -GC) sur le développement de la pathologie.
- 3) Etudier la pathologie chez des animaux déficients en iNKT, les souris $J\alpha 18$ KO, et ceux déficients en iNKT et non-iNKT, les souris CD1dKO ainsi que l'effet du transfert adoptif de cellules iNKT chez ces animaux.

Au vue de l'ensemble de ces études et essentiellement celles utilisant des souris déficientes ($J\alpha 18$ KO et CD1dKO), il apparaît que les cellules NKT ont naturellement des effets différents suivant la pathologie, tantôt bénéfique (ex : diabète, tumeurs), tantôt délétère (ex : asthme)(Godfrey and Kronenberg, 2004). Cependant, il a également été clairement montré que pour une même pathologie, le rôle des NKT peut être radicalement opposé en fonction du modèle d'étude et de l'approche utilisée. Par exemple dans un modèle d'auto-immunité de type Th1, l'EAE (encéphalomyélite autoimmune expérimentale), l'injection d' α -GC à des souris ayant reçu un protocole d'EAE peut soit prévenir le développement de la pathologie, soit n'avoir aucun effet ou au contraire l'accélérer (Godfrey and Kronenberg, 2004). Ceci semble s'expliquer par différents modèles d'EAE utilisés ainsi que le nombre, la dose, la voie d'injection et le moment d'injection de l' α -GC (Jahng et al., 2001). Dans un autre modèle inflammatoire, cette fois ci de type Th2, l'asthme, les NKT ont naturellement un

rôle délétère sur cette pathologie (Akbari et al., 2003; Lisbonne et al., 2003). Toutefois, l'activation des cellules iNKT par l' α -GC en phase de challenge, inhibe l'hyperréactivité des voies aériennes (Hachem et al., 2005; Morishima et al., 2005). Cet effet bénéfique est lié à la synthèse d'IFN γ par les cellules iNKT. En revanche, l'injection répétée d' α -GC exacerbe les symptômes de l'asthme, ce type d'injection favorisant la production de cytokines de type Th2 (Morishima et al., 2005).

Ces exemples, parmi d'autres, montrent bien la plasticité fonctionnelle des lymphocytes iNKT rendant leur manipulation très complexe puisqu'elle peut conduire à des effets opposés suivant l'approche expérimentale utilisée.

Si le rôle des cellules iNKT dans le contrôle de nombreuses pathologies a largement été décrit et a fait l'objet de très nombreux travaux, l'implication des lymphocytes non-iNKT dans le contrôle de la balance Th1/Th2, notamment au cours de processus inflammatoires, n'a été que très peu abordée. Ceci est essentiellement lié à l'absence de marqueur spécifique nécessaire à leur identification mais aussi à l'absence de souris exclusivement déficientes en lymphocytes non-iNKT. La seule approche expérimentale actuellement utilisée pour étudier les cellules non-iNKT au cours d'inflammation, est l'analyse comparative de la pathologie chez des animaux J α 18KO et CD1d, souris respectivement déficientes en iNKT et iNKT/non-iNKT.

Dans la majorité des pathologies inflammatoires étudiées telles que celles décrites ci-dessus mais encore de nombreuses pathologies infectieuses (bactériennes, virales ou parasitaires), l'étude comparative entre ces 2 souches de souris a souvent révélé une évolution similaire de la maladie, suggérant une absence de rôle des cellules non-iNKT au cours de ces divers processus. Cependant, au cours de ces dernières années, certaines études, dont celles de notre groupe, ont révélé un rôle différent des iNKT et non-iNKT dans le contrôle de l'immunité anti-tumorale et anti-infectieuse.

4-1 immunité anti-tumorale

Les cellules NKT jouent un rôle dans l'immunité anti-tumorale naturelle. En effet les souris J α 18KO et CD1dKO développent des tumeurs plus fréquemment que les souris contrôles (Crowe et al., 2002).

L'IL-12 est connue pour ces propriétés anti-tumorales et les cellules NKT participe à certains effets de cette cytokine (Cui et al., 1997). L'activité anti-tumorale de ces cellules dépend de l'IFN γ et de l'activation de cellules effectrices parmi lesquelles les cellules NK. Il semble néanmoins que différentes sous-populations de cellules NKT n'aient pas les mêmes propriétés anti-tumorale. En effet, bien qu'à l'origine une étude ait montré l'absence de rejet de cellules tumorales chez des souris J α 18KO suite à un traitement par l'IL-12 (Cui et al., 1997), plus récemment Park et coll. ont observé un rejet des mêmes cellules tumorales chez

les souris CD1dKO (Park et al., 2003). En accord avec ces résultats, de très récents travaux portant sur 4 modèles de tumeurs murines montre que les cellules iNKT ont un effet protecteur alors que les non-iNKT ont un rôle suppresseur de l'immunité anti-tumorale (Terabe et al., 2005). Par ailleurs, Smyth et coll. montrent qu'au sein de la population de iNKT, les cellules CD4⁻ ont un potentiel anti-tumoral supérieur aux CD4⁺ (Crowe et al., 2005). Il semble donc que l'implication des cellules NKT, les iNKT CD4⁺ et CD4⁻ et les non-iNKT, dans le rejet des tumeurs soit beaucoup plus complexe qu'initialement montré.

4-2 les infections bactériennes, virales et parasitaires

Si le rôle des cellules NKT dans l'immunité anti-infectieuse ne fait aucun doute, certains résultats font l'objet de controverses. En effet, bien que dans la plupart des cas les cellules NKT jouent un rôle protecteur lors d'infections, un rôle délétère a également été décrit. A l'origine de ces différences, le fond génétique des animaux semble jouer un rôle prépondérant. Par exemple, les cellules NKT préviennent le développement de la malaria cérébrale chez la souris Balb/c alors qu'elles n'ont qu'un effet très partiel chez les souris C57Bl/6 (Hansen et al., 2003).

Le rôle délétère des lymphocytes non-iNKT a été montré dans un modèle murin d'hépatite B (Baron et al., 2002). En effet, seul le transfert de lymphocytes NKT CD1d-restreints mais n'exprimant pas la chaîne V α 14-J α 18 induit une lyse des hépatocytes suggérant fortement un rôle néfaste des non-iNKT. Les mécanismes d'activation de ces cellules dans ce modèle restent néanmoins inconnus. Cette activation peut être TCR-dépendante, via l'interaction du CD1d avec un ligand endogène. En effet, les virus n'expriment pas de glycolipides susceptibles d'activer les NKT. Il est donc possible, comme les iNKT, que ce type d'activation requiert d'abord la reconnaissance de la particule virale par des PRRs, principalement les TLR-7 et 9, à la surface des APC, celle-ci conduisant à l'activation secondaire des lymphocytes non-iNKT via la présentation d'un ligand endogène par le CD1d. Dans ce modèle, il peut également y avoir activation des non-iNKT indépendamment du TCR, par exemple via la production de cytokines.

Ce n'est que très récemment qu'une première étude a montré un rôle différentiel des iNKT et non-iNKT dans le contrôle de la balance Th1/Th2 au cours d'une pathologie infectieuse causée par l'agent de la maladie de Chagas, *Trypanosoma cruzi* (T. cruzi) (Duthie et al., 2005). L'implication des lymphocytes NKT dans cette maladie est connue depuis plus longtemps et il avait initialement été montré que les cellules NKT reconnaissent le glycosylphosphatidylinositol (GPI) de ce parasite protozoaire (ainsi que *Plasmodium falciparum*), présenté par le CD1d, et qu'elles participaient à la réponse humorale dirigée contre cette structure (Schofield et al., 1999). Ces résultats ont été très controversés et il a été montré que le GPI se fixe au CD1d mais n'active par les cellules NKT (Procopio et al.,

2002). Ces cellules s'activent néanmoins au cours de l'infection (Duthie et al., 2002). Cependant l'utilisation des souris Ja18KO et CD1dKO montre qu'en phase aiguë de la maladie, les iNKT inhibent le développement de la réponse pro-inflammatoire alors que les non-iNKT tendent à la favoriser (Duthie, 2005). Les mécanismes d'activation de ces 2 populations restent indéterminés.

Enfin, les travaux de notre groupe ont permis la mise en évidence (1) de l'activation des cellules iNKT par les œufs du schistosome et (2) d'un rôle différent des iNKT et non-iNKT dans le processus d'immunomodulation observé au cours de la schistosomiase. En effet, T. Mallevaey, étudiant en thèse dans notre groupe, a montré que les lymphocytes iNKT s'activent et produisent des cytokines (IFN γ et IL-4) *in vivo* en réponse au oeufs du schistosome (dans un modèle synchrone de dépôt des œufs dans le foie) et favorise le développement d'une réponse Th2 (Mallevaey et al., 2006). Cette activation dépend du mode de présentation CD1d (et ainsi confirme nos résultats initiaux, voir ci-dessus), mais est indépendante des TLR (Toll like receptors) et de l'IL-12. Enfin, les résultats favorisent la présentation d'un ligand endogène, et non d'un ligand parasitaire, aux cellules iNKT.

Parallèlement à cette approche, nous avons étudié l'impact de la déficience en cellules iNKT (souris J α 18KO) sur le développement de la schistosomiase murine. Bien que nos travaux précédents montraient un rôle de la molécule CD1d dans le développement de la réponse Th2 au cours de la schistosomiase, cette étude ayant été réalisée chez des souris Balb/c, nous avons réexaminé la déficience en CD1d sur fond génétique C57Bl/6 (les souris J α 18KO étant également sur fond génétique C57Bl/6) dans le développement de la pathologie (**article 3**).

a- Article 3 : résumé des travaux

Dans une étude cinétique, nous montrons que les cellules NKT CD3⁺ NK1.1⁺ de la rate, qui sont hétérogènes et contiennent entre autres les iNKT et non-iNKT, s'expandent à partir de la 2^e-3^e semaine d'infection, même si leur fréquence diminue, ceci étant probablement lié à l'importante splénomégalie qui se développe au cours de l'infection. Ce résultat suggère que les schistosomules et/ou vers adultes peuvent activer les NKT. Cependant, des DCs sensibilisées *in vitro* par ces 2 stades parasitaires sont incapable d'activer les NKT. De plus, l'utilisation des 2 souches de souris déficientes (J α 18KO et CD1dKO) révèle que les iNKT et les non-iNKT sont dispensables au développement et à la polarisation de la réponse immune dans les phases précoces de l'infection.

En phase aiguë de l'infection, la déficience en non-iNKT et/ou iNKT n'influe pas sur le développement ou la survie du parasite, ni sur la fécondité. Cependant, l'analyse de la réponse immune cellulaire et humorale a révélé de profondes différences chez les animaux déficients : Si les souris CD1dKO développent une réponse Th2 diminuée (confirmant nos

précédents résultats), les souris $J\alpha 18\text{KO}$ ont une réponse Th1 très affectée. Les mécanismes d'activation des cellules non-iNKT dans notre modèle restent indéterminés. Nous montrons néanmoins que, contrairement aux iNKT, les cellules non-iNKT triées (à partir de rate de souris $Ja18\text{KO}$ sur la base du marquage CD5/NK1.1) ne sont pas directement activées *in vitro* par des DCs sensibilisées avec les œufs du schistosome, alors qu'elles produisent de l' $\text{IFN}\gamma$ et de l'IL-4 en réponse à l'anti-CD3.

b- Article 3 : conclusions

Nos résultats montrent déjà qu'à la différence d'autres modèles infectieux, le fond génétique n'affecte pas la fonction des cellules iNKT dans le contexte de la schistosomiase, la déficience en CD1d chez la Balb/c et la C57Bl/6 conduisant à une réponse Th2 diminuée dans les 2 cas. En revanche, il semble que les iNKT et non-iNKT exercent des fonctions distinctes dans le développement de la réponse immune, les iNKT participant à la différenciation des lymphocytes Th1 et les non-iNKT à la différenciation des cellules Th2.

Invariant and non-invariant Natural Killer T cells exert opposite regulatory functions on the immune response during murine schistosomiasis

Thierry Mallevaey,^{1,2,3,t} Josette Fontaine,^{1,2,3} Laetitia Breuilh,^{1,2,3} Christophe Paget,^{1,2,3}

Alexandre Castro-Keller,^{4,5} Catherine Vendeville,^{1,2,3} Monique Capron,^{1,2,3}

Maria Leite-de-Moraes,^{4,5} François Trottein,^{1,2,3,‡,*} and Christelle Faveeuw^{1,2,3,‡}

Institut National de la Recherche Médicale, U547,¹ Institut Pasteur de Lille, Institut Fédératif de Recherche 142,² Université de Lille 2, Lille, F-59019 France,³ Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 8147, Institut Fédératif de Recherche Necker Enfants, Paris, F-75015 France,⁴ Hôpital Necker, Paris, F-75015 France⁵

[‡] Contribute equally to the work

Running title: iNKT cells and non-iNKT cells during schistosomiasis

* Corresponding author. Mailing address: Unité Inserm U547, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex, France. Phone: (333) 2087-7885. Fax: (333) 2087-7888. E-mail: françois.trottein@pasteur-lille.fr.

^t Present address: Integrated Department of Immunology, National Jewish Medical and Research Center, University of Colorado Health Science Center, Denver, CO, USA.

ABSTRACT

CD1d-restricted Natural Killer T (NKT) cells represent a heterogeneous population of innate/memory immune cells expressing both NK and T cell markers, distributed into two major subsets: invariant (i)NKT cells, which express exclusively an invariant TCR α chain (V α 14J α 18 in mice) and non-iNKT cells, which express more diverse TCRs. NKT cells quickly produce Th1- and/or Th2-type cytokines following stimulation with glycolipid Ag in the context of CD1d molecules. Through this unique property, NKT cells play potent immunoregulatory functions during auto-immune diseases, cancer and infection. Although extensively studied during viral, bacterial, protozoan parasite, and fungal infections, no study has addressed the role of NKT cells in metazoan parasite infections. Here, we used two different NKT cell deficient mouse models, namely TCR J α 18^{-/-} (exclusively deficient in iNKT cells) and CD1d^{-/-} (deficient in both iNKT and non-iNKT cells) mice to distinguish the implication of these subsets in murine schistosomiasis. We show that whereas both iNKT and non-iNKT cells do not have a major impact on the immune response during the early phase (1 and 4 wk) of infection, they exert important, although opposite, roles on the immune response during the acute phase of the disease (7 and 12 wk), after schistosome egg production. Indeed, iNKT cells contribute to Th1 whereas non-iNKT cells might be mostly implicated in Th2 cell differentiation in response to parasite Ag. Our findings suggest for the first time that helminths activate both iNKT and non-iNKT cells *in vivo*, enabling them to differentially influence the Th1/Th2 balance of the immune response.

Conclusion et discussion

La schistosomiase expérimentale murine représente un modèle particulièrement pertinent pour étudier l'influence de la réponse immune innée sur le développement des réponses de type Th2, caractéristique des helminthiases mais aussi de nombreuses pathologies allergiques. Nos premiers travaux, parmi d'autres de la littérature, montrent l'importance des glycoprotéines et glycolipides dans l'établissement de cette réponse : d'une part, les glyco-épitopes core fucose et core xylose, présents chez le schistosome sont, au moins en partie, des cibles de la réponse Th2 (article 1) et d'autre part la molécule CD1d, impliquée dans la présentation de structures glycolipidiques est nécessaire à une réponse Th2 optimale en réponse aux œufs du schistosome et au cours de l'infection (article 2).

Ces résultats nous ont progressivement et logiquement conduit à nous intéresser au cours de la schistosomiase aux lymphocytes CD1d-restreints, communément appelés lymphocytes NKT.

La principale propriété des cellules NKT est leur capacité à réguler et à polariser la réponse immune adaptative, notamment en activant de nombreux types cellulaires parmi lesquels les cellules NK, les DC, les lymphocytes B et surtout les lymphocytes T. Les cellules NKT sont capables de produire à la fois des cytokines de type Th1 et Th2, et si les mécanismes gouvernant leur plasticité fonctionnelle ne sont pas pleinement connus, elles sont capables d'orienter la réponse immune adaptative vers un profil Th1 ou Th2.

1- iNKT et schistosomiase

Au cours des phases précoces de l'infection, les iNKT sont indispensables au développement et à l'orientation de la réponse immune (article 3). Par contre, en phase aiguë de l'infection, les cellules iNKT semblent jouer un rôle dans la différenciation des lymphocytes Th1 au cours de l'infection (comparaison souris sauvages et $J\alpha 18\text{KO}$). Ce résultat, montre en accord avec d'autres travaux (Ranson et al., 2005; Ronet et al., 2005), qu'au cours de la schistosomiase, les iNKT participent au développement de la réponse Th1 anti-infectieuse. Cependant, dans un modèle d'immunisation, il semble qu'au contraire les iNKT participent au développement de la réponse Th2 en réponse aux œufs du schistosome (Mallevaey et al., 2006). Ce rôle apparemment duel des cellules iNKT ne peut s'expliquer par des différences phénotypiques et/ou fonctionnelles de ces cellules en fonction du tissu étudié puisqu'il s'agit de la rate dans les 2 études.

3 hypothèses peuvent être envisagées.

1) Dans le modèle d'immunisation, l'injection de DC sensibilisées avec les œufs du schistosome induit l'activation ponctuelle des iNKT ce qui n'est pas le cas dans le modèle infectieux. Dans ce dernier cas, l'activation des iNKT est continue puisque la ponte des œufs par les femelles, constitue une stimulation antigénique permanente. Dans le premier cas, ce type de stimulation favoriserait une réponse Th2 alors qu'une stimulation répétée des iNKT conduirait à une réponse Th2. Cette hypothèse semble être en contradiction avec les données de la littérature où il a été montré qu'une stimulation unique des iNKT avec l' α GC induit une réponse mixte (production $IFN\gamma$ et IL-4) alors qu'une stimulation répétée favorise la production de cytokines de type Th2 (Burdin et al., 1999; Singh et al., 1999). Il reste néanmoins difficile de comparer l'activation des cellules iNKT en réponse à un ligand très puissant avec une activation dans un contexte infectieux, probablement moins puissante.

2) Si cela n'a pas été montré au cours de l'infection, il semble que les DCs sensibilisées *in vitro* avec les œufs du schistosome sont capables d'activer les iNKT. Une deuxième hypothèse pour expliquer les différences observées est que l'activation des DC par les œufs ne se fait pas dans le même contexte. En effet, au cours de l'infection, l'activation des DC se fait *in vivo* dans un contexte inflammatoire qui est absent *in vitro* et qui pourrait polariser les DC elles-mêmes ou modifier leur aptitude à activer les iNKT (synthèse de médiateurs lipidiques, signaux de co-stimulation).

3) Enfin, la nature même des APC impliquées dans ces 2 modèles pourrait également jouer un rôle très important. Dans le modèle d'immunisation, ce sont des DCs myéloïdes sensibilisées qui induisent une réponse Th2 via l'activation des iNKT. Au cours de l'infection, il est fort probable que les choses soient beaucoup plus complexes. En effet, diverses sous-populations de DCs (les mDC, pDC et nouvellement identifiée les IK-DC) pourraient être activées *in vivo* par les œufs du schistosome et interagir avec les cellules iNKT. Par ailleurs, d'autres APC telles que les macrophages, les lymphocytes B ou encore dans le foie les cellules de Küpffer, pourraient activer les iNKT et ainsi participer au développement d'une réponse Th1 au détriment de la réponse Th2. Cette hypothèse semble être en accord avec certaines données de la littérature puisqu'il a été montré que les DCs, les cellules de Küpffer et les lymphocytes B ont des aptitudes différentes à activer les cellules iNKT (Bezbradica et al., 2005; Fujii et al., 2002; Schmiege et al., 2005) .

2- Non-iNKT et schistosomiase

Tout comme les iNKT, au cours des phases précoces de l'infection, les cellules non-iNKT sont dispensables au développement et à l'orientation de la réponse immune (article 3). Par contre, contrairement aux iNKT, en phase aiguë de l'infection, les non-iNKT semblent participer au développement de la réponse Th2 (comparaison souris sauvages et CD1dKO).

Il est toutefois difficile de mettre clairement en évidence le rôle des non-iNKT dans ce modèle car (1) la souris CD1dKO est déficiente en lymphocytes non-iNKT, mais aussi en iNKT, la déficience en ces 2 types cellulaires pouvant jouer un rôle dans ce modèle, et (2) l'activation des non-iNKT n'a pas été formellement mis en évidence, essentiellement par manque de marqueur. Nous avons néanmoins montré que, contrairement aux lymphocytes iNKT, les DCs myéloïdes sensibilisées avec les œufs du schistosome sont incapables d'activer les lymphocytes non-iNKT triés à partir de rate de souris J α 18KO. Ces cellules sont néanmoins capables de produire des cytokines Th1 (IFN γ) et Th2 (IL-4) en réponse à une stimulation du récepteur CD3. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette absence d'activation des non-iNKT par les DCs.

1) Les DCs sensibilisées avec les œufs du schistosome ne sont pas capables à elles seules d'activer les non-iNKT. Au cours de l'infection, l'activation des non-iNKT (comme les iNKT) se fait dans un contexte inflammatoire qui est absent *in vitro*, mais qui est nécessaire à l'activation des non-iNKT. Des co-signaux d'activation comme des cytokines ou encore l'engagement de récepteurs NK (activateurs ou inhibiteurs) pourrait être indispensable à l'activation de ce type cellulaire.

2) Comme précédemment suggéré pour les cellules iNKT, il est tout à fait possible que dans ce cas, les DCs myéloïdes soient incapables d'activer les non-iNKT et leur activation au cours de l'infection nécessite la présence d'autres APC : autres sous-populations de DCs, les lymphocytes B ou encore les macrophages. Très peu de choses sont connues à l'heure actuelle sur le rôle des APC dans l'activation des non-iNKT.

A ce jour, aucune étude ne vient corroborer l'une ou l'autre de ces 2 hypothèses laissant ainsi la question ouverte.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats, ainsi que ceux de la littérature (voir ci-dessus) suggèrent que les cellules iNKT et non-iNKT peuvent exercer des fonctions distinctes au cours de pathologies cancéreuses ou infectieuses. Dans ce contexte, la schistosomiase représente un excellent modèle puisque ces 2 populations exercent des fonctions opposées, et éventuellement complémentaires, dans la polarisation de la réponse au cours de l'infection. Néanmoins, de futures expériences sont nécessaires à l'élucidation du mode d'action des cellules iNKT et surtout non-iNKT dans la schistosomiase mais aussi au vu de la discussion ci-dessus, à une meilleure compréhension en général des mécanismes d'activation de ces 2 populations de cellules NKT et de leur influence ultérieure sur la balance Th1/Th2.

Perspectives

1- lymphocytes NKT et schistosomiase

Nos résultats suggèrent un rôle des iNKT et non-iNKT dans le développement de la réponse Th1 et Th2, respectivement. Des approches complémentaires de transfert cellulaire nous permettraient de confirmer nos précédents travaux.

1) Le transfert de cellules iNKT, triées à partir de rate ou de foie de souris sauvages, chez des animaux $J\alpha 18\text{KO}$ préalablement ou en cours d'infection, afin de restaurer la réponse immunitaire Th1 sera réalisé.

2) La mise en évidence du rôle des non-iNKT sur le développement de la réponse immunitaire Th2 semble plus difficile à étudier. Il n'existe pas de souris exclusivement déficientes en non-iNKT et l'une des approches pourrait consister à injecter des cellules non-iNKT, triées à partir de rate de souris $J\alpha 18\text{KO}$, chez des souris CD1dKO préalablement ou au cours de l'infection. Cependant, la déficience en CD1d chez la souris receveuse devrait empêcher l'activation des non-iNKT et une façon de contourner ce problème est de co-injecter des DCs de souris sauvages ($\text{CD1d}^{+/+}$) naïves. Il est clair que beaucoup d'inconnues subsistent dans cette approche, notamment la capacité des non-iNKT et des DCs à survivre et/ou proliférer pendant au moins 7 semaines, si une seule injection est faite. Dans ce type de transfert, où les lymphocytes non-iNKT seraient présents, un rétablissement de la réponse Th2 impliquerait directement ce type cellulaire. Le même type de transfert peut être envisagé avec les iNKT ou dans ce cas, le maintien d'une réponse Th2 déficiente supprimerait tout rôle de ces cellules dans le développement de cette réponse.

3) Comme nous l'avons décrit ci-dessus, les lymphocytes iNKT activés par les œufs du schistosome participent à l'élaboration de la réponse Th1 en phase aiguë de l'infection. Le rôle immunorégulateur potentiel des iNKT activés au cours de l'infection pourra être étudié dans le développement d'autres pathologies inflammatoires soit à profil Th2 comme l'asthme allergique expérimental ou Th1 comme l'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE). Pour se faire, des cellules iNKT purifiées de souris sauvages infectées seront transférées chez des souris receveuses préalablement à leur sensibilisation en vue de développer une des deux pathologies précédemment citées. Une approche similaire pourra être envisagée pour étudier le rôle immunorégulateur des non-iNKT, ces cellules pouvant être purifiées à partir de rate de souris $J\alpha 18\text{KO}$ infectées.

4) Finalement, les mécanismes moléculaires à l'origine de l'activation des iNKT mais aussi des non-iNKT au cours de la schistosomiase restent non élucidés. Les travaux de notre groupe montrent que l'activation des iNKT nécessite vraisemblablement la synthèse endogène de ligands CD1d-restreints par les DCs (Mallevaey et al., 2006). Dans ce processus, les TLRs exprimés par les DCs ne semblent pas être impliqués et l'identification d'autres PRRs semble très difficile à envisager. Les lectines pourraient représenter des candidats potentiels et une première approche qui pourrait être envisagée serait d'analyser le transcriptome des DC dépourvues de TLR (MyD88^{-/-}/TRIF^{-/-}), par une expérience de microarray, en réponse à l'œuf du schistosome. La mise en évidence d'une 'signature inflammatoire' suggérerait l'implication d'autres PRRs, parmi lesquels on retrouve les lectines de type dectin-1 ou encore les galectines. L'utilisation de souris déficientes pour ces lectines pourra être envisagée et le rôle des PRRs d'intérêt dans l'activation des iNKT pourrait être étudié.

Parallèlement aux iNKT, les mécanismes d'activation des non-iNKT au cours de l'infection sont également inconnus. Nos résultats préliminaires semblent montrer qu'*in vitro*, les DC n'activent pas les non-iNKT en réponse aux œufs du schistosome. Bien que des expériences complémentaires sont actuellement en cours pour confirmer ce résultat, il est tout à fait possible qu'au cours de l'infection, les cellules non-iNKT puissent être activées par d'autres APC (voir ci-dessous).

Si les travaux de notre groupe suggèrent (1) l'existence d'un nouveau mode d'activation original des iNKT par les DCs, indépendant des TLR et de ligands microbiens CD1d restreints et (2) des fonctions distinctes des iNKT et non-iNKT au cours de la schistosomiase, nos résultats soulèvent également de très nombreuses questions encore sans réponse. L'une d'entre elles étant de savoir si les NKT peuvent être activés par des APC autre que les DCs, cette question ne se posant pas uniquement dans le contexte de la schistosomiase.

C'est pourquoi les travaux de recherche futurs de notre groupe vont s'orienter sur les mécanismes d'activation des cellules iNKT et non-iNKT (dans la mesure du possible) en réponse à des signaux de danger, générés notamment lors de processus infectieux. Parmi ces signaux de danger, nous nous intéresserons, dans le cadre de la schistosomiase, à l'œuf du schistosome et plus généralement à ceux générés suite à une interaction ligand-TLR.

Les DC, en tant qu'APC professionnelles, font l'objet d'une abondante littérature et actuellement l'interaction DC-NKT, en réponse à des signaux extérieurs, suscite l'intérêt de plusieurs groupes, y compris le notre (Paget et al, en préparation). Parmi les autres APC susceptibles d'activer les NKT, on retrouve une sous-population de lymphocytes B préactivés appelée lymphocytes B de la zone marginale (ou MZB). En effet, ces cellules ont

la particularité, entre autre, d'exprimer fortement la molécule CD1d comparativement aux DCs (voir ci-dessous).

2- Activation des lymphocytes NKT : rôle des DC

L'absence de synthèse de ligands parasitaires lipidiques capables d'activer les iNKT suggère une synthèse de ligands endogènes CD1d-restreints par les DCs (Mallevaey et al., 2006). Les PRRs, en particulier les TLRs, sont connus pour jouer un rôle crucial dans l'activation des DCs en réponse aux pathogènes (Hemmi and Akira, 2005). C'est pourquoi nous avons émis l'hypothèse que les TLRs puissent activer, via les DCs, les iNKT. Bien que des études parallèles faites au laboratoire montrent une activation des DCs myéloïdes en réponse à l'oeuf du schistosome via le TLR-2 et le TLR-3 (Aksoy et al., 2005), l'activation des iNKT par le parasite ne fait pas intervenir ces TLRs (Mallevaey et al., 2006).

Ces observations nous ont conduit à développer un nouveau projet visant à mieux comprendre les mécanismes d'activation des iNKTs en réponse aux agents pathogènes et plus précisément à définir le rôle des TLRs exprimés par les DCs dans l'activation des iNKTs. Les travaux du groupe montrent l'importance du TLR-7 et TLR-9 dans l'activation des NKT (Paget et al., en préparation). Les travaux futurs vont s'orienter sur une meilleure compréhension des mécanismes d'activation des iNKT et d'autre part sur la relevance *in vivo* de cette observation. Un intérêt tout particulier sera porté au métabolisme des glycosphingolipides au sein des DCs dans ce mécanisme.

Les études précédemment citées ont principalement porté sur l'interaction DC myéloïde-iNKT. Parmi les DCs, on retrouve d'autres sous-populations de DCs, essentiellement les DC plasmacytoïdes (Colonna et al., 2004) et une nouvelle sous-population récemment identifiée, les IK-DC (Taieb et al., 2006). Peu de chose sont actuellement connus sur l'interaction de ces diverses sous-populations avec les cellules iNKT.

Enfin, les mécanismes d'activation des cellules non-iNKT, dans ce même contexte, ne sont absolument pas connus à l'heure actuelle. Même si les moyens d'investigation de ces cellules restent actuellement très limités, nous essaierons dans un premier temps d'identifier *in vitro* au moins un ligand (TLR ou schistosome) capables d'activer cette sous-population cellulaire, via les DC myéloïdes, facilement accessibles. Des résultats positifs nous conduiront à étudier plus précisément les mécanismes d'activation de ces cellules.

3- Activation des lymphocytes NKT : rôle des MZB

3-1 introduction

La zone marginale (MZ) de la rate apparaît comme un lieu stratégique de détection et de contrôle précoce des antigènes et agents pathogènes véhiculés par le sang. Cette propriété est due à la présence dans cette zone particulière de la rate d'un réseau de

cellules appartenant au système immunitaire inné, celui-ci jouant un rôle primordial dans les défenses anti-infectieuses immédiates et orientant la réponse immune adaptative. Parmi ces cellules, une sous-population de lymphocytes B pré-activés, appelée cellules B de la zone marginale (ou cellules MZB) représente une première ligne de reconnaissance, via notamment les TLRs, et de défense contre les molécules bactériennes en produisant très rapidement des anticorps. Par ailleurs, ces cellules, ayant également les propriétés de APC, sont capables d'interagir avec les lymphocytes T CD4⁺ et d'induire directement leur activation (Lopes-Carvalho et al., 2005).

Les lymphocytes MZB représentent 5-10% des lymphocytes B totaux et sont facilement identifiables car ils sont CD21^{high} et CD23^{low}, contrairement à la majorité des lymphocytes B dits folliculaires (FO)(Makowska et al., 1999). Ces cellules ont également la particularité d'exprimer très fortement la molécule CD1d (Roark et al., 1998). Bien que la localisation des cellules NKT dans la MZ n'a pas été étudiée, il est suggéré dans la littérature qu'en tant que cellules de l'immunité innée, les NKT présentes dans la rate pourraient également se trouver dans la MZ. La mise en évidence du rôle de la molécule CD1d, des MZB et des NKT dans le maintien de la tolérance vis-à-vis d'antigènes présents dans un site immunoprivilégié, l'œil, suggère une interaction possible entre ces 2 populations cellulaires (Sonoda and Stein-Streilein, 2002). Bien que les mécanismes moléculaires à l'origine de cet état de tolérance ne soient pas encore clairement établis, l'implication d'autres APC présentes dans l'œil, les macrophages F4/80⁺, a été montrée suggérant également une interaction entre ces macrophages, les cellules MZB et les NKT (Lin et al., 2005).

Ainsi, parmi les APC susceptibles d'activer les cellules NKT en réponse à une stimulation microbienne, les cellules MZB représentent d'excellents candidats. Notre projet de recherche futur va donc s'orienter vers l'étude du rôle des cellules MZB dans l'activation des lymphocytes NKT en réponse à des signaux de danger générés notamment au cours de processus infectieux ou autres pathologies inflammatoires. Dans un premier temps, nous nous concentrerons sur les lymphocytes iNKT.

3-2 interaction MZB/NKT : approches *in vitro*

Les lymphocytes MZB seront triés à partir de cellules de rate (en comparaison avec des lymphocytes B FO). Le tri des cellules MZB sera réalisé sur le FACS Aria, récemment acquis par l'Unité, à l'aide d'anticorps spécifiques de 4 marqueurs distincts, CD19, IgM, CD21 et CD23, couplés à des fluorochromes différents : les MZB sont CD19⁺, IgM⁺, CD21^{high} et CD23^{low} alors que les lymphocytes B FO sont CD19⁺, IgM⁺, CD21^{high} et CD23^{low}.

Dans une première approche, divers ligands TLR seront utilisés pour activer, pendant quelques heures, ces APC. Plusieurs paramètres d'activation seront analysés à savoir la prolifération cellulaire et l'acquisition ou l'augmentation de marqueurs de co-stimulation :

CD80, CD86, CD40 et aussi le CD1d. Il a été montré dans la littérature que le LPS, ligand TLR-4, et le CpG, ligand TLR-9, induisaient la prolifération des MZB et la production d'IgM. Très peu de choses sont connues quant à la production de cytokines par les MZB. Ces cellules semblent capables de produire de faibles quantités d'IL-10 en réponse au CpG (Lenert et al., 2005).

L'étude se poursuivra avec les ligands TLR induisant une activation des MZB. Les cellules MZB seront ensuite co-cultivées, pendant 48h avec les lymphocytes iNKT. Ces dernières seront tout d'abord enrichies à partir de foie. En effet, la proportion de iNKT dans le foie étant plus élevée que celle de la rate, nous nous concentrerons d'abord sur ce tissu. Il sera néanmoins indispensable d'étudier également les cellules iNKT de la rate, sachant que celles-ci peuvent avoir des propriétés fonctionnelles différentes des iNKT du foie. L' α GC sera utilisé comme contrôle positif pour l'activation des iNKT. Il a été montré dans la littérature que les lymphocytes B sont capables de présenter l' α GC aux iNKT et d'induire la production de cytokines par ces dernières (Bezbradica et al., 2005). Après co-culture, les surnageants seront prélevés puis les dosages des cytokines IFN γ , IL-4, IL-10, IL-13, ou encore l'IL-17 seront réalisés par ELISA. A la vue des résultats obtenus dans le groupe sur l'implication des TLR-7 et -9 dans l'activation des iNKT via les DCs, nous porterons un intérêt tout particulier pour ces 2 agonistes.

Pour le(s) ligand(s) TLR d'intérêt, nous envisagerons de regarder la production de cytokines (précédemment détectées) directement par les iNKT, en utilisant la cytométrie intracellulaire ou bien en travaillant avec des iNKT triées. L'implication de la molécule CD1d dans l'activation des iNKT sera vérifiée en utilisant des lymphocytes MZB triés à partir de rate de souris CD1dKO. Enfin, le mode d'activation des cellules iNKT, à savoir si celle-ci est dépendante de cytokines (IL-12, IFN type I,...) ou autres molécules de co-stimulation, sera également étudié.

Dans le cadre de notre projet sur les mécanismes d'activation des cellules NKT au cours de la schistosomiase, les approches décrites ci-dessus pourront également être envisagées en utilisant comme stimulus, l'œuf du schistosome.

A plus long terme, cette approche expérimentale pourrait également être appliquée à l'étude du rôle des MZB dans l'activation des cellules non-iNKT, en réponse à des stimuli microbiens. Il est important de rappeler que les cellules non-iNKT sont enrichies à partir de rate de souris (J α 18KO) contrairement aux cellules iNKT majoritairement représentées dans le foie.

3-3 Interaction NKT/MZB : relevance *in vivo*

L'activation *in vivo* des iNKT par les cellules MZB pré activées *in vitro* pourra être étudiée après injection de ces dernières chez des souris C57Bl/6 sauvages. Une étude

cinétique de l'expression de marqueurs d'activateurs tels que CD69 et CD25 et la production de cytokines intracellulaires par les lymphocytes iNKT sera réalisée. L'identification des iNKT se fera sur la base du marquage avec le tétramère CD1d/ α GC. L'intérêt de travailler chez la souris C57Bl/6 est qu'il est également possible d'identifier la majorité des cellules NKT (iNKT et non-iNKT) en utilisant le couple de marqueurs TCR β /NK1.1. L'association du tétramère au couple TCR β /NK1.1 permettrait de distinguer les non-iNKT (tétramère négative) des iNKT (tétramère positive).

L'implication de la molécule CD1d dans ce phénomène pourra être envisagée en utilisant des cellules MZB issues de souris déficientes pour la molécule CD1d.

L'existence de souris déficientes en MZB, les souris Pyk-2KO (fond génétique 129/sv)(Guinamard et al., 2000), s'avère également très utile pour l'étude *in vivo* de l'implication des MZB dans l'activation des iNKT en réponse à des ligands TLR. Les travaux de notre groupe montre que l'injection de CpG chez des souris sauvages active les iNKT (Paget et al., en préparation). Une étude comparative pourra être menée chez des souris sauvages et déficientes en MZB. Une limitation dans l'étude de l'activation des cellules iNKT chez cette souche de souris est l'absence du marqueur NK1.1 et la seule possibilité pour identifier les cellules iNKT est l'utilisation du tétramère. Pour palier à ce problème, il est possible d'envisager de transférer des cellules MZB chez des souris C57Bl/6 déficientes en lymphocytes B (μ MT) préalablement reconstituées avec des lymphocytes B dépourvus de cellules MZB.

Enfin, bien que l'activation des iNKT en réponse à l'œuf du schistosome ne semble pas être dépendant des TLRs, cette activation implique probablement d'autres PRRs. Il serait donc intéressant, dans le cadre de notre projet sur l'activation des iNKT au cours de la schistosomiase, d'utiliser également ces 2 approches expérimentales pour répondre à la question précédemment citée, à savoir si les iNKT peuvent être activés *in vivo* par des APC autres que les DCs, en réponse au parasite.

3-4 Interaction NKT/MZB en conditions pathologiques

Si la littérature sur le rôle des cellules NKT, surtout iNKT, dans le contrôle de nombreuses pathologies inflammatoires, infectieuses et tumorales est abondante, celle-ci reste plus restreinte en ce qui concerne l'implication des MZB au cours de processus inflammatoires. Leur rôle a néanmoins été suggéré dans le développement de certaines pathologies auto-immunes et virales où un rôle des cellules NKT également été proposé (voir ci-dessous). Par ailleurs, il existe chez l'homme de nombreux lymphomes B dérivés des lymphocytes MZB et très souvent associés à des infections : C'est le cas notamment des lymphomes associés aux infections à certains virus de type herpès ou au virus de l'hépatite

C ou encore aux agents pathogènes de type *Borrelia burgdorferi*, *Helicobacter pylori* ou *Chlamydia psittaci* (Suarez et al., 2006). La mise en place de modèles animaux serait nécessaire pour l'étude des conséquences d'une interaction MZB/NKT induite par un agent infectieux sur le développement de pathologies cancéreuses de type lymphome.

a- Pathologies auto-immunes

Le lupus érythémateux systémique est une maladie auto-immune caractérisée par la présence d'auto-anticorps dirigés contre de nombreux antigènes appartenant à différents compartiments cellulaires, dont le noyau. L'anomalie principale observée au cours du lupus est une hyperactivation lymphocytaire B, y compris les MZB. Chez des souris lupiques (NZB/W, PN...), les lymphocytes MZB ont une expression basale des marqueurs de costimulation (CD80, CD86,...) ainsi qu'une production d'IL-10 en réponse au CpG (ligand TLR-9) plus élevée que des souris sauvages (Wither et al., 2000). L'utilisation de souris déficientes pour les TLR-7 et -9 a montré l'implication de ces deux types de PRRs sur le développement du lupus, bien que leur rôle soit totalement opposé, l'absence du TLR-7 induisant une amélioration de la pathologie contrairement au TLR-9 dont la déficience induit à une aggravation de la maladie (Christensen et al., 2006).

Si une expansion des MZB est largement démontrée dans le lupus, d'autres populations cellulaires, telles que les NKT, s'expandent également au cours de l'infection (Forestier et al., 2005). Ces observations peuvent apparaître surprenantes, puisque la majorité des pathologies auto-immunes sont souvent associées à un déficit en cellules NKT. Une des questions que l'on peut se poser est de savoir si l'hyperactivation des MZB chez ces souris lupiques pourrait être à l'origine, au moins en partie, de l'expansion des cellules NKT.

Dans le cadre de notre projet, une étude de l'activation des NKT par les lymphocytes MZB de souris lupiques pourra être envisagée. Les lymphocytes MZB de souris lupiques, qui présentent d'après la littérature un phénotype de cellules activées par rapport à des souris sauvages, pourront être purifiés et co-cultivés avec des cellules iNKT enrichies ou triées. L'absence du marqueur NK1.1 chez les souris lupiques nécessitera que le tri des cellules iNKT se fasse sur la base d'un marquage à l'aide du tétramère CD1d/ α -GC.

A la vue des résultats obtenus chez des souris lupiques TLR-7 et TLR-9 KO, une pré-activation de quelques heures des MZB de souris lupiques pourra également être réalisée avant la co-culture MZB/NKT. Les paramètres étudiés pour l'activation des NKT sont décrits ci-dessus.

Enfin, quelques approches *in vivo* pourraient éventuellement être envisagées pour établir la relevance. Le transfert de lymphocytes MZB purifiés à partir de souris lupiques semble difficile à envisager pour des raisons d'incompatibilité de fond génétique. Il est

néanmoins possible d'envisager des transferts de cellules purifiées (B totaux ou MZB +/- traités avec des NKT) à partir de souris lupiques chez des souris SCID. Des travaux ont montré que la reconstitution de souris SCID avec des splénocytes de souris F1 NZB/W se traduit par le développement d'une pathologie caractéristique d'un lupus (auto-anticorps anti-ADN double et simple brin, glomérulonéphrite, dépôt de complexes immuns au niveau des reins....)(Ye and Chiang, 1998).

b- Pathologies virales

De part leur position stratégique, les MZB sont régulièrement exposés aux particules virales ou cellules infectées par des virus présentes dans le sang circulant. Comme l'ont montré Gatto et coll., les MZB participent aux phases précoces de la réponse antivirale (Gatto and Bachmann, 2005; Gatto et al., 2004). Les MZB peuvent également représenter des cibles potentielles de virus comme par exemple certains de la famille des 'herpes virus' (Marques et al., 2003). Parmi cette famille de virus, on retrouve le virus d'Epstein-Barr (EBV) ou encore le Cytomegalovirus (CMV). Ces infections virales à caractère chronique sont très souvent associées chez l'homme à des lymphomes B (Suarez et al., 2006).

Des études faites chez la souris ont montré que le CMV de souris (ou MCMV) induit très rapidement une activation polyclonale des lymphocytes B (Karupiah et al., 1998). Il est possible que cette activation se fasse via le TLR-9, sachant que ce récepteur est impliqué dans l'activation des DC et des cellules produisant de l'IFN de type 1 (IPC) en réponse au virus (Krug et al., 2004). Cette interaction MCMV/TLR-9 est absolument nécessaire à l'activation des cellules NK qui jouent un rôle crucial dans l'élimination du virus.

Etant donné l'activation très rapide de nombreuses cellules du système immunitaire inné en réponse au MCMV, DC, cellules NK et probablement MZB, est-il possible que les cellules NKT puissent également participer à cette cascade d'évènements ? Il a été montré dans cette infection virale une activité anti-virale de l' α -GC (van Dommelen et al., 2003).

Il serait donc tout à fait intéressant d'étudier dans ce contexte l'état d'activation des cellules NKT (iNKT et non-iNKT) en réponse à une infection par le MCMV (disponible au laboratoire) chez des souris sauvages et des souris déficientes en lymphocytes B totaux (souris μ MT) sachant qu'une activation polyclonale des lymphocytes B est observée au cours de l'infection. Le rôle des MZB sur l'activation des iNKT en réponse au MCMV pourra être envisagé en reconstituant des souris C57Bl/6 μ MT avec des lymphocytes B déficients en MZB (purifiés par tri cellulaire).

En cas de succès, que ce soit dans un modèle de maladie auto-immune ou virale, le mécanisme d'activation des cellules NKT par les MZB sera abordé.

4- Conclusions

Les cellules NKT jouent un rôle primordial dans le contrôle et la polarisation de la réponse immune lors de nombreuses pathologies cancéreuses, auto-immunes, inflammatoires ou infectieuses. De part leur grande plasticité fonctionnelle, les lymphocytes NKT représentent une cible de choix dans les stratégies d'immunointervention. Toutefois, une meilleure compréhension des propriétés fonctionnelles des cellules iNKT est un pré requis essentiel afin d'envisager de cibler ces cellules en immunothérapie.

Si les DCs, en tant qu'APC professionnelles, sont capables d'activer les lymphocytes iNKT, l'implication d'autres APC, dans l'activation des iNKT est possible mais reste très peu connue, notamment en réponse à des signaux de danger. Les lymphocytes B de la zone marginale représentent également une sous population d'APC intéressante, puisqu'elles expriment fortement la molécule CD1d et comme les DCs et iNKT, en tant que cellules du système immunitaire inné, elles constituent une première ligne de reconnaissance et de défense contre les molécules bactériennes.

Enfin, si les moyens d'investigation des cellules non-iNKT sont actuellement limités, l'étude de la fonction de ces cellules dans la schistosomiase, mais également dans un contexte plus général, n'en représente pas moins un challenge intéressant pour la suite de notre projet de recherche.

Bibliographie

A

Akbari, O., Stock, P., Meyer, E., Kronenberg, M., Sidobre, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Grusby, M. J., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T. (2003). Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 9, 582-588.

Aksoy, E., Zouain, C. S., Vanhoutte, F., Fontaine, J., Pavelka, N., Thieblemont, N., Willems, F., Ricciardi-Castagnoli, P., Goldman, M., Capron, M., *et al.* (2005). Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells. *J Biol Chem* 280, 277-283.

Angeli, V., Faveeuw, C., Roye, O., Fontaine, J., Teissier, E., Capron, A., Wolowczuk, I., Capron, M., and Trottein, F. (2001). Role of the parasite-derived prostaglandin D2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. *J Exp Med* 193, 1135-1147.

Appelmek, B. J., van Die, I., van Vliet, S. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Geijtenbeek, T. B., and van Kooyk, Y. (2003). Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol* 170, 1635-1639.

Arase, H., Arase, N., and Saito, T. (1996). Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking. *J Exp Med* 183, 2391-2396.

Askenase, P. W., Itakura, A., Leite-de-Moraes, M. C., Lisbonne, M., Roongapinun, S., Goldstein, D. R., and Szczepanik, M. (2005). TLR-dependent IL-4 production by invariant Valpha14+Jalpha18+ NKT cells to initiate contact sensitivity in vivo. *J Immunol* 175, 6390-6401.

Atochina, O., and Harn, D. (2005). LNFPIII/LeX-stimulated macrophages activate natural killer cells via CD40-CD40L interaction. *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 1041-1049.

B

Bardor, M., Faveeuw, C., Fitchette, A. C., Gilbert, D., Galas, L., Trottein, F., Faye, L., and Lerouge, P. (2003). Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core alpha(1,3)-fucose and core xylose. *Glycobiology* 13, 427-434.

Baron, J. L., Gardiner, L., Nishimura, S., Shinkai, K., Locksley, R., and Ganem, D. (2002). Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. *Immunity* 16, 583-594.

Behar, S. M., Podrebarac, T. A., Roy, C. J., Wang, C. R., and Brenner, M. B. (1999). Diverse TCRs recognize murine CD1. *J Immunol* 162, 161-167.

Bezbradica, J. S., Stanic, A. K., Matsuki, N., Bour-Jordan, H., Bluestone, J. A., Thomas, J. W., Unutmaz, D., Van Kaer, L., and Joyce, S. (2005). Distinct roles of dendritic cells and B cells in Va14Ja18 natural T cell activation in vivo. *J Immunol* 174, 4696-4705.

Bleicher, P. A., Balk, S. P., Hagen, S. J., Blumberg, R. S., Flotte, T. J., and Terhorst, C. (1990). Expression of murine CD1 on gastrointestinal epithelium. *Science* 250, 679-682.

Brigl, M., and Brenner, M. B. (2004). CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* 22, 817-890.

Brigl, M., Bry, L., Kent, S. C., Gumperz, J. E., and Brenner, M. B. (2003). Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* 4, 1230-1237.

Brossay, L., Jullien, D., Cardell, S., Sydora, B. C., Burdin, N., Modlin, R. L., and Kronenberg, M. (1997). Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells. *J Immunol* 159, 1216-1224.

Burdin, N., Brossay, L., and Kronenberg, M. (1999). Immunization with alpha-galactosylceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis. *Eur J Immunol* 29, 2014-2025.

C

Cardell, S., Tangri, S., Chan, S., Kronenberg, M., Benoist, C., and Mathis, D. (1995). CD1-restricted CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *J Exp Med* 182, 993-1004.

Christensen, S. R., Shupe, J., Nickerson, K., Kashgarian, M., Flavell, R. A., and Shlomchik, M. J. (2006). Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity* 25, 417-428.

Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y. J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 5, 1219-1226.

Crowe, N. Y., Coquet, J. M., Berzins, S. P., Kyparissoudis, K., Keating, R., Pellicci, D. G., Hayakawa, Y., Godfrey, D. I., and Smyth, M. J. (2005). Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *J Exp Med* 202, 1279-1288.

Crowe, N. Y., Smyth, M. J., and Godfrey, D. I. (2002). A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Exp Med* 196, 119-127.

Crowe, N. Y., Uldrich, A. P., Kyparissoudis, K., Hammond, K. J., Hayakawa, Y., Sidobre, S., Keating, R., Kronenberg, M., Smyth, M. J., and Godfrey, D. I. (2003). Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T cells. *J Immunol* 171, 4020-4027.

Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M., and Taniguchi, M. (1997). Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 278, 1623-1626.

D

Derry, C. J., Faveeuw, C., Mordsley, K. R., and Ager, A. (1999). Novel chondroitin sulfate-modified ligands for L-selectin on lymph node high endothelial venules. *Eur J Immunol* 29, 419-430.

Duthie, M. S., Kahn, M., White, M., Kapur, R. P., and Kahn, S. J. (2005). Critical proinflammatory and anti-inflammatory functions of different subsets of CD1d-restricted natural killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 73, 181-192.

Duthie, M. S., Wleklinski-Lee, M., Smith, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Kahn, S. J. (2002). During *Trypanosoma cruzi* infection CD1d-restricted NK T cells limit parasitemia and augment the antibody response to a glycoposphoinositol-modified surface protein. *Infect Immun* 70, 36-48.

E

Eberl, G., Lees, R., Smiley, S. T., Taniguchi, M., Grusby, M. J., and MacDonald, H. R. (1999). Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. *J Immunol* 162, 6410-6419.

Eberl, G., and MacDonald, H. R. (1998). Rapid death and regeneration of NKT cells in anti-CD3epsilon- or IL-12-treated mice: a major role for bone marrow in NKT cell homeostasis. *Immunity* 9, 345-353.

F

Faveeuw, C., Di Mauro, M. E., Price, A. A., and Ager, A. (2000). Roles of alpha(4) integrins/VCAM-1 and LFA-1/ICAM-1 in the binding and transendothelial migration of T lymphocytes and T lymphoblasts across high endothelial venules. *Int Immunol* 12, 241-251.

Faveeuw, C., Gagnerault, M. C., Kraal, G., and Lepault, F. (1995). Homing of lymphocytes into islets of Langerhans in prediabetic non-obese diabetic mice is not restricted to autoreactive T cells. *Int Immunol* 7, 1905-1913.

Faveeuw, C., Gagnerault, M. C., and Lepault, F. (1994a). Expression of homing and adhesion molecules in infiltrated islets of Langerhans and salivary glands of nonobese diabetic mice. *J Immunol* 152, 5969-5978.

Faveeuw, C., Gagnerault, M. C., and Lepault, F. (1994b). Strain-dependent migration of CD4 and CD8 lymphocyte subsets to lymph nodes in NOD (nonobese diabetic) and control mice. *Dev Immunol* 3, 273-282.

Faveeuw, C., Preece, G., and Ager, A. (2001). Transendothelial migration of lymphocytes across high endothelial venules into lymph nodes is affected by metalloproteinases. *Blood* 98, 688-695.

Fischer, K., Scotet, E., Niemeyer, M., Kobernick, H., Zerrahn, J., Maillat, S., Hurwitz, R., Kursar, M., Bonneville, M., Kaufmann, S. H., and Schaible, U. E. (2004). Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10685-10690.

Forestier, C., Molano, A., Im, J. S., Dutronc, Y., Diamond, B., Davidson, A., Illarionov, P. A., Besra, G. S., and Porcelli, S. A. (2005). Expansion and hyperactivity of CD1d-restricted NKT cells during the progression of systemic lupus erythematosus in (New Zealand Black x New Zealand White)F1 mice. *J Immunol* 175, 763-770.

Fujii, S., Shimizu, K., Kronenberg, M., and Steinman, R. M. (2002). Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs. *Nat Immunol* 3, 867-874.

G

Garcia-Casado, G., Sanchez-Monge, R., Chrispeels, M. J., Armentia, A., Salcedo, G., and Gomez, L. (1996). Role of complex asparagine-linked glycans in the allergenicity of plant glycoproteins. *Glycobiology* 6, 471-477.

Gatto, D., and Bachmann, M. F. (2005). Function of marginal zone B cells in antiviral B-cell responses. *Crit Rev Immunol* 25, 331-342.

Gatto, D., Ruedl, C., Odermatt, B., and Bachmann, M. F. (2004). Rapid response of marginal zone B cells to viral particles. *J Immunol* 173, 4308-4316.

Geijtenbeek, T. B., Van Vliet, S. J., Koppel, E. A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Appelmelk, B., and Van Kooyk, Y. (2003). Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med* 197, 7-17.

Godfrey, D. I., and Kronenberg, M. (2004). Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* 114, 1379-1388.

Godfrey, D. I., MacDonald, H. R., Kronenberg, M., Smyth, M. J., and Van Kaer, L. (2004). NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 4, 231-237.

Goodridge, H. S., Marshall, F. A., Else, K. J., Houston, K. M., Egan, C., Al-Riyami, L., Liew, F. Y., Harnett, W., and Harnett, M. M. (2005). Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62. *J Immunol* 174, 284-293.

Grzych, J. M., Pearce, E., Cheever, A., Caulada, Z. A., Caspar, P., Heiny, S., Lewis, F., and Sher, A. (1991). Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J Immunol* 146, 1322-1327.

Guinamard, R., Okigaki, M., Schlessinger, J., and Ravetch, J. V. (2000). Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nat Immunol* 1, 31-36.

H

Hachem, P., Lisbonne, M., Michel, M. L., Diem, S., Roongapinun, S., Lefort, J., Marchal, G., Herbelin, A., Askenase, P. W., Dy, M., and Leite-de-Moraes, M. C. (2005). Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN-gamma. *Eur J Immunol* 35, 2793-2802.

Hansen, D. S., Siomos, M. A., Buckingham, L., Scalzo, A. A., and Schofield, L. (2003). Regulation of murine cerebral malaria pathogenesis by CD1d-restricted NKT cells and the natural killer complex. *Immunity* 18, 391-402.

Hemmi, H., and Akira, S. (2005). TLR signalling and the function of dendritic cells. *Chem Immunol Allergy* 86, 120-135.

Hokke, C. H., and Yazdanbakhsh, M. (2005). Schistosome glycans and innate immunity. *Parasite Immunol* 27, 257-264.

J

Jahng, A., Maricic, I., Aguilera, C., Cardell, S., Halder, R. C., and Kumar, V. (2004). Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. *J Exp Med* 199, 947-957.

Jahng, A. W., Maricic, I., Pedersen, B., Burdin, N., Naidenko, O., Kronenberg, M., Koezuka, Y., and Kumar, V. (2001). Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 194, 1789-1799.

K

Karupiah, G., Sacks, T. E., Klinman, D. M., Fredrickson, T. N., Hartley, J. W., Chen, J. H., and Morse, H. C., 3rd (1998). Murine cytomegalovirus infection-induced polyclonal B cell activation is independent of CD4+ T cells and CD40. *Virology* 240, 12-26.

Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., *et al.* (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278, 1626-1629.

Khoo, K. H., Huang, H. H., and Lee, K. M. (2001). Characteristic structural features of schistosome cercarial N-glycans: expression of Lewis X and core xylosylation. *Glycobiology* 11, 149-163.

Kinjo, Y., Tupin, E., Wu, D., Fujio, M., Garcia-Navarro, R., Benhnia, M. R., Zajonc, D. M., Ben-Menachem, G., Ainge, G. D., Painter, G. F., *et al.* (2006). Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol* 7, 978-986.

Kronenberg, M., and Gapin, L. (2002). The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2, 557-568.

Krug, A., French, A. R., Barchet, W., Fischer, J. A., Dzionek, A., Pingel, J. T., Orihuela, M. M., Akira, S., Yokoyama, W. M., and Colonna, M. (2004). TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 21, 107-119.

L

Lantz, O., and Bendelac, A. (1994). An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4- T cells in mice and humans. *J Exp Med* 180, 1097-1106.

Leite-De-Moraes, M. C., Hameg, A., Arnould, A., Machavoine, F., Koezuka, Y., Schneider, E., Herbelin, A., and Dy, M. (1999). A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement. *J Immunol* 163, 5871-5876.

Leite-de-Moraes, M. C., Herbelin, A., Gouarin, C., Koezuka, Y., Schneider, E., and Dy, M. (2000). Fas/Fas ligand interactions promote activation-induced cell death of NK T lymphocytes. *J Immunol* 165, 4367-4371.

Lenert, P., Brummel, R., Field, E. H., and Ashman, R. F. (2005). TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production. *J Clin Immunol* 25, 29-40.

Lepault, F., Faveeuw, C., Luan, J. J., and Gagnerault, M. C. (1993). Lymph node T-cells do not optimally transfer diabetes in NOD mice. *Diabetes* 42, 1823-1828.

Lin, H. H., Faunce, D. E., Stacey, M., Terajewicz, A., Nakamura, T., Zhang-Hoover, J., Kerley, M., Mucenski, M. L., Gordon, S., and Stein-Streilein, J. (2005). The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J Exp Med* 201, 1615-1625.

Lisbonne, M., Diem, S., de Castro Keller, A., Lefort, J., Araujo, L. M., Hachem, P., Fourneau, J. M., Sidobre, S., Kronenberg, M., Taniguchi, M., *et al.* (2003). Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J Immunol* 171, 1637-1641.

Lopes-Carvalho, T., Foote, J., and Kearney, J. F. (2005). Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation. *Curr Opin Immunol* 17, 244-250.

Maizels, R. M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M. D., and Allen, J. E. (2004). Helminth parasites--masters of regulation. *Immunol Rev* 201, 89-116.

M

Makowska, A., Faizunnessa, N. N., Anderson, P., Midtvedt, T., and Cardell, S. (1999). CD1^{high} B cells: a population of mixed origin. *Eur J Immunol* 29, 3285-3294.

Mallevaey, T., Zanetta, J. P., Faveeuw, C., Fontaine, J., Maes, E., Platt, F., Capron, M., de-Moraes, M. L., and Trottein, F. (2006). Activation of invariant NKT cells by the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 176, 2476-2485.

Marques, S., Efstathiou, S., Smith, K. G., Haurly, M., and Simas, J. P. (2003). Selective gene expression of latent murine gammaherpesvirus 68 in B lymphocytes. *J Virol* 77, 7308-7318.

Matsuda, J. L., Naidenko, O. V., Gapin, L., Nakayama, T., Taniguchi, M., Wang, C. R., Koezuka, Y., and Kronenberg, M. (2000). Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med* 192, 741-754.

Mattner, J., Debord, K. L., Ismail, N., Goff, R. D., Cantu, C., 3rd, Zhou, D., Saint-Mezard, P., Wang, V., Gao, Y., Yin, N., *et al.* (2005). Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 434, 525-529.

Mendiratta, S. K., Martin, W. D., Hong, S., Boesteanu, A., Joyce, S., and Van Kaer, L. (1997). CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity* 6, 469-477.

Morishima, Y., Ishii, Y., Kimura, T., Shibuya, A., Shibuya, K., Hegab, A. E., Iizuka, T., Kiwamoto, T., Matsuno, Y., Sakamoto, T., *et al.* (2005). Suppression of eosinophilic airway inflammation by treatment with alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol* 35, 2803-2814.

O

Okano, M., Satoskar, A. R., Nishizaki, K., and Harn, D. A., Jr. (2001). Lacto-N-fucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response. *J Immunol* *167*, 442-450.

P

Park, S. H., Kyin, T., Bendelac, A., and Carnaud, C. (2003). The contribution of NKT cells, NK cells, and other gamma-chain-dependent non-T non-B cells to IL-12-mediated rejection of tumors. *J Immunol* *170*, 1197-1201.

Park, S. H., Weiss, A., Benlagha, K., Kyin, T., Teyton, L., and Bendelac, A. (2001). The mouse CD1d-restricted repertoire is dominated by a few autoreactive T cell receptor families. *J Exp Med* *193*, 893-904.

Pearce, E. J. (2005). Priming of the immune response by schistosome eggs. *Parasite Immunol* *27*, 265-270.

Pearce, E. J., Caspar, P., Grzych, J. M., Lewis, F. A., and Sher, A. (1991). Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med* *173*, 159-166.

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

Procopio, D. O., Almeida, I. C., Torrecilhas, A. C., Cardoso, J. E., Teyton, L., Travassos, L. R., Bendelac, A., and Gazzinelli, R. T. (2002). 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* *169*, 3926-3933.

R

Ranson, T., Bregenholt, S., Lehuen, A., Gaillot, O., Leite-de-Moraes, M. C., Herbelin, A., Berche, P., and Di Santo, J. P. (2005). Invariant V alpha 14+ NKT cells participate in the early response to enteric *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* *175*, 1137-1144.

Roark, J. H., Park, S. H., Jayawardena, J., Kavita, U., Shannon, M., and Bendelac, A. (1998). CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. *J Immunol* *160*, 3121-3127.

Ronet, C., Darche, S., Leite de Moraes, M., Miyake, S., Yamamura, T., Louis, J. A., Kasper, L. H., and Buzoni-Gatel, D. (2005). NKT cells are critical for the initiation of an inflammatory bowel response against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* *175*, 899-908.

S

Saravia-Fernandez, F., Faveeuw, C., Blasquez-Bulant, C., Tappaz, M., Throsby, M., Pelletier, G., Vaudry, H., Dardenne, M., and Homo-Delarche, F. (1996). Localization of gamma-aminobutyric acid and glutamic acid decarboxylase in the pancreas of the nonobese diabetic mouse. *Endocrinology* *137*, 3497-3506.

Schmieg, J., Yang, G., Franck, R. W., Van Rooijen, N., and Tsuji, M. (2005). Glycolipid presentation to natural killer T cells differs in an organ-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 1127-1132.

Schofield, L., McConville, M. J., Hansen, D., Campbell, A. S., Fraser-Reid, B., Grusby, M. J., and Tachado, S. D. (1999). CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. *Science* *283*, 225-229.

Shimizu, H., Matsuguchi, T., Fukuda, Y., Nakano, I., Hayakawa, T., Takeuchi, O., Akira, S., Umemura, M., Suda, T., and Yoshikai, Y. (2002). Toll-like receptor 2 contributes to liver injury by *Salmonella* infection through Fas ligand expression on NKT cells in mice. *Gastroenterology* *123*, 1265-1277.

Singh, N., Hong, S., Scherer, D. C., Serizawa, I., Burdin, N., Kronenberg, M., Koezuka, Y., and Van Kaer, L. (1999). 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* *163*, 2373-2377.

Skold, M., Faizunnessa, N. N., Wang, C. R., and Cardell, S. (2000). CD1d-specific NK1.1+ T cells with a transgenic variant TCR. *J Immunol* 165, 168-174.

Sonoda, K. H., and Stein-Streilein, J. (2002). CD1d on antigen-transporting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance. *Eur J Immunol* 32, 848-857.

Suarez, F., Lortholary, O., Hermine, O., and Lecuit, M. (2006). Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood* 107, 3034-3044.

T

Taieb, J., Chaput, N., Menard, C., Apetoh, L., Ullrich, E., Bonmort, M., Pequignot, M., Casares, N., Terme, M., Flament, C., *et al.* (2006). A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med* 12, 214-219.

Terabe, M., Swann, J., Ambrosino, E., Sinha, P., Takaku, S., Hayakawa, Y., Godfrey, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., Smyth, M. J., and Berzofsky, J. A. (2005). A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. *J Exp Med* 202, 1627-1633.

Terrazas, L. I., Walsh, K. L., Piskorska, D., McGuire, E., and Harn, D. A., Jr. (2001). The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1(+) cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4(+) cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections. *J Immunol* 167, 5294-5303.

Thomas, P. G., Carter, M. R., Atochina, O., Da'Dara, A. A., Piskorska, D., McGuire, E., and Harn, D. A. (2003). Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J Immunol* 171, 5837-5841.

Trottein, F., Nutten, S., Papin, J. P., Lepotier, C., Poulain-Godefroy, O., Capron, A., and Capron, M. (1997). Role of adhesion molecules of the selectin-carbohydrate families in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to schistosome targets. *J Immunol* 159, 804-811.

V

van de Vijver, K. K., Hokke, C. H., van Remoortere, A., Jacobs, W., Deelder, A. M., and Van Marck, E. A. (2004). Glycans of *Schistosoma mansoni* and keyhole limpet haemocyanin induce hepatic granulomas in vivo. *Int J Parasitol* 34, 951-961.

van den Berg, T. K., Honing, H., Franke, N., van Remoortere, A., Schiphorst, W. E., Liu, F. T., Deelder, A. M., Cummings, R. D., Hokke, C. H., and van Die, I. (2004). LacdiNAc-glycans constitute a parasite pattern for galectin-3-mediated immune recognition. *J Immunol* 173, 1902-1907.

van der Kleij, D., Latz, E., Brouwers, J. F., Kruijze, Y. C., Schmitz, M., Kurt-Jones, E. A., Espevik, T., de Jong, E. C., Kapsenberg, M. L., Golenbock, D. T., *et al.* (2002a). A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem* 277, 48122-48129.

Van der Kleij, D., Van Remoortere, A., Schuitemaker, J. H., Kapsenberg, M. L., Deelder, A. M., Tielens, A. G., Hokke, C. H., and Yazdanbakhsh, M. (2002b). Triggering of innate immune responses by schistosome egg glycolipids and their carbohydrate epitope GalNAc beta 1-4(Fuc alpha 1-2Fuc alpha 1-3)GlcNAc. *J Infect Dis* 185, 531-539.

van Die, I., van Vliet, S. J., Nyame, A. K., Cummings, R. D., Bank, C. M., Appelmelk, B., Geijtenbeek, T. B., and van Kooyk, Y. (2003). The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for *Schistosoma mansoni* egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x. *Glycobiology* 13, 471-478.

van Dommelen, S. L., Tabarias, H. A., Smyth, M. J., and Degli-Esposti, M. A. (2003). Activation of natural killer (NK) T cells during murine cytomegalovirus infection enhances the antiviral response mediated by NK cells. *J Virol* 77, 1877-1884.

van Ree, R., Cabanes-Macheteau, M., Akkerdaas, J., Milazzo, J. P., Loutelier-Bourhis, C., Rayon, C., Villalba, M., Koppelman, S., Aalberse, R., Rodriguez, R., *et al.* (2000). Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J Biol Chem* 275, 11451-11458.

Velupillai, P., and Harn, D. A. (1994). Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 18-22.

Velupillai, P., Secor, W. E., Horauf, A. M., and Harn, D. A. (1997). B-1 cell (CD5+B220+) outgrowth in murine schistosomiasis is genetically restricted and is largely due to activation by polylectosamine sugars. *J Immunol* 158, 338-344.

W

Wilson, I. B., Harthill, J. E., Mullin, N. P., Ashford, D. A., and Altmann, F. (1998). Core alpha1,3-fucose is a key part of the epitope recognized by antibodies reacting against plant N-linked oligosaccharides and is present in a wide variety of plant extracts. *Glycobiology* 8, 651-661.

Wilson, M. T., Johansson, C., Olivares-Villagomez, D., Singh, A. K., Stanic, A. K., Wang, C. R., Joyce, S., Wick, M. J., and Van Kaer, L. (2003). The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10913-10918.

Wither, J. E., Roy, V., and Brennan, L. A. (2000). Activated B cells express increased levels of costimulatory molecules in young autoimmune NZB and (NZB x NZW)F(1) mice. *Clin Immunol* 94, 51-63.

Wu, D. Y., Segal, N. H., Sidobre, S., Kronenberg, M., and Chapman, P. B. (2003). Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *J Exp Med* 198, 173-181.

Y

Ye, Y. L., and Chiang, B. L. (1998). Reconstitution of severe combined immunodeficient mice with spleen cells from autoimmune NZBxNZW F1 mice. *Clin Exp Rheumatol* 16, 33-37.

Curriculum Vitae

Christelle FAVEEUW (épouse VANDENABEELE), Docteur es Sciences

née le 12/11/67 à Dunkerque (59)

mariée, 2 enfants

nationalité française

105 rue de Varsovie

62 240 HARNES

FORMATION

- 1994 : Doctorat Sciences de la Vie – Option Immunologie (Université Paris VI)
Mention très honorable avec les félicitations du jury
- 1990 : Diplôme d'Etudes Approfondies d'Immunologie (Institut Pasteur, Paris)
- 1989 : Maîtrise de Biochimie (Université Paris VII)
- 1988 : Licence de Biochimie (Université Paris VII)
- 1987 : Brevet de Technicien Supérieur Analyses Biologiques (Ecole ESTBA - Paris)

EXPERIENCE PROFESSIONNELLE

- 2003** : Ingénieur de Recherche (CDD) - Unité mixte Institut Pasteur de Lille/Université d'Artois - Lens
Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique
Directeur : Pr Roméo CECHELLI
Thème de recherche : Mise au point *in vitro* d'un modèle murin de barrière hémato-encéphalique
- 1999 – 2002** : Stage post-doctoral – INSERM U547 (Ex-U167) - l'Institut Pasteur de Lille
Directeur : Pr Monique CAPRON
Thèmes de recherche : 1 - Rôle des glycoconjugués dans la polarisation de la réponse immune au cours de la schistosomiase murine.
2 - Etude de la PGD₂ et de ses métabolites sur la réponse immune
- 1995 - 1998** : Stage post-doctoral – National Institute for Medical Research – Londres (UK)
Responsable : Dr Ann AGER
Thème de recherche : Bases moléculaires de l'interaction lymphocyte-cellule endothéliale : Rôle des intégrines et des métalloprotéinases
- 1990 - 1994** : Stage de Doctorat – CNRS URA1461 - Hôpital Necker - Paris
Directeur : Dr Mireille DARDENNE
Thème de recherche : Homing et recirculation des lymphocytes dans un modèle murin de diabète insulino-dépendant (Type I): la souris NOD. Mécanismes impliqués dans le développement de l'infiltration lymphocytaire du pancréas"
- 1989 - 1990** : Stage de DEA - CNRS URA1461 - Hôpital Necker - Paris
Directeur : Dr Mireille DARDENNE
Thème de recherche : Etude de la migration des sous populations lymphocytaires CD4 et CD8 chez la souris NOD (Nonobese diabetic) et les souris contrôles

SITUATION ACTUELLE

Janvier 2004 : Chargée de Recherche 1^{ère} Classe - INSERM
INSERM 547 - Institut Pasteur de LILLE
Directeur : Pr Monique CAPRON

ENSEIGNEMENT

- DEA Sciences de la Vie et de la santé - Agents infectieux et système immunitaire (UV E4/D6)
(Responsables : Pr M. Capron et Dr M. Labalette)(2heures)(2001/2002)
- MASTER Recherche - Mention « Biologie – Santé » (2005/2006 et 2006/2007)
Journée thématique : sensibilisation et tolérance : les cellules dendritiques
(Responsable : Dr J. Pestel)
- MASTER Recherche - Mention « Biologie – Santé » (2006/2007)
Journée thématique : sensibilisation et tolérance : les cellules régulatrices
(Responsable : Dr L. Prin)
- MASTER Biologie et biotechnologie (Responsable : Dr. M. Salzet)(2 heures)(2005/2006)

PUBLICATIONS

- publications originales dans des revues à comité de lecture

- Lepault F., **Faveeuw C.**, Luan J.J., and Gagnerault M.C. (1993)
Lymph node T cells do not optimally transfer diabetes in NOD mice.
Diabetes 42 : 1823-1828.
- Faveeuw C.**, Gagnerault M.C., and Lepault F. (1994)
Strain-dependent migration of CD4 and CD8 lymphocyte subsets to lymph nodes of NOD (Nonobese diabetic) and control mice.
Developmental Immunology 3 : 273-282.
- Faveeuw C.**, Gagnerault M.C., and Lepault F. (1994)
Expression of homing and adhesion molecules in infiltrated islets of Langerhans and salivary glands in NOD (Nonobese diabetic) mice.
Journal of Immunology 152 : 5969-5978.
- Lepault F., Gagnerault M.C., **Faveeuw C.**, and Boitard C. (1994)
Recirculation, phenotype and functions of lymphocytes in mice treated with monoclonal antibody Mel-14.
European Journal of Immunology 24 : 3106-3112.
- Lepault F., Gagnerault M.C., **Faveeuw C.**, Bazin H., and Boitard C. (1995)
Lack of L-selectin expression by cells transferring diabetes in NOD mice: insights into the mechanisms involved in diabetes prevention by Mel-14 antibody treatment.
European Journal of Immunology 25 : 1502-1507.
- Faveeuw C.**, Gagnerault M.C., and Lepault F. (1995)
Isolation of leukocytes infiltrating the islets of Langerhans of diabetes-prone mice for flow cytometric analysis.
Journal of Immunological methods 187 : 163-169.
- Faveeuw C.**, Gagnerault M.C., Kraal G., and Lepault F. (1995)
In prediabetic nonobese diabetic mice, homing of lymphocytes into islets of Langerhans is not restricted to autoreactive T cells.
International Immunology 7 : 1905-1913.
- Saravia-Fernandez F., **Faveeuw C.**, Blasquez-Bulant C., Tappaz M., Throsby M., Pelletier G., Vaudry H., Dardenne M., and Homo-Delarche F. (1996)
Localization of α -aminobutyric acid and glutamic acid decarboxylase in the pancreas of the Nonobese diabetic mouse.
Endocrinology 137 : 3497-3506.
- Derry C.J., **Faveeuw C.**, Mordsley K.R., and Ager A. (1999)
Novel chondroitin sulphate-modified ligands for L-selectin on lymph node high endothelial venules.
European Journal of Immunology 29 : 419-430.
- Faveeuw C.**, Price A., Di Mauro M., and Ager A. (2000)
Roles of alpha (4) integrins/VCAM-1 and LFA-1/ICAM-1 in the binding and transendothelial migration of T lymphocytes and T lymphoblasts across high endothelial venules.
International Immunology 12 : 241-251.
- Faveeuw C.**, Fougeray, S., Fontaine, J., Chinetti, G., Delerive, P., Capron, M., Staels, B., Moser, M and Trottein, F. (2000)
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-12 production in murine dendritic cells.
FEBS letters 486 : 261-266.

- Angeli, V., **Faveeuw, C.**, Roye, O., Fontaine, J., Tessier, E, Capron, A, Wolowczuk, I., Capron, M, and Trottein, F. (2001)
 Role of the parasite-derived prostaglandin D2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection.
Journal of Experimental Medicine 193 : 1135-1147.
- Faveeuw C.**, Preece G., and Ager A. (2001)
 Transendothelial migration of lymphocytes across high endothelial venules into lymph nodes is affected by metalloproteinases.
Blood 98 : 688-695.
- Angeli, V., **Faveeuw, C.**, Delerive, P., Fontaine, J., Barriera, Y., Franchimont, N., Staels, B., Capron, M., and Trottein, F. (2001)
Schistosoma mansoni induces the synthesis of IL-6 in pulmonary microvascular endothelial cells: role of IL-6 in the control of lung eosinophilia during infection.
European Journal of Immunology 31 : 2751-2761.
- Faveeuw, C.**, Angeli, V., Fontaine, J., Maliszewski, C., Capron, A., Van Kaer, L., Moser, M., Capron, M., and Trottein, F. (2002)
 Role of the CD1d-mediated antigen presentation of parasite glycoconjugates in the induction of type 2 responses during murine schistosomiasis
Journal of Immunology 169 : 906-912.
- Bardor, M., **Faveeuw, C.**, Fontaine, J., Gilbert, D., Galas, L., van Ree, R., Trottein, F., Faye, L and Lerouge, P. (2003)
 Core- α (1,3)-fucose- and core- β (1,2)-xylose-containing glyco-epitopes responsible for N-linked glycan immunogenicity are present in crops intended for the production of therapeutic proteins.
Glycobiology 13 : 427-434
- Faveeuw, C.**, Gosset, P., Bureau, F., Angeli, V., Hirai, H., Maruyama, S., Capron, M. and Trottein F. (2003)
 Prostaglandin (PG)_{D2} inhibits the production of interleukin-12 in murine dendritic cells through multiple signalling pathways.
European Journal of Immunology 33 : 889-898
- Faveeuw, C.**, Mallevaey, T., Paschinger, K., Wilson, I., Fontaine, J., Mollicone, R., Oriol, R., Altmann, F., Lerouge, P., Capron, M, and Trottein, F. (2003)
 Schistosome N-glycans containing core- α (1,3)-fucose and core- β (1,2)-xylose epitopes are strong inducers of Th2 responses in mice.
European Journal of Immunology 33 : 1271-1281
- Gosset, P., Bureau, F., Angeli, V., Pichavant, M., **Faveeuw, C.**, Tonnel. A. B and Trottein, F. (2003)
 Prostaglandin (PG)_{D2} affects the maturation of human monocyte-derived dendritic cells: consequence on the polarization of naive T helper cells.
Journal of Immunology 170 : 4943-4952
- Herve, M., Angeli, V., Pinzar, E., Wintjens, R, **Faveeuw, C.**, Narumiya, S., Capron, A., Urade, Y., Capron, M., Riveau, G., and Trottein, F. (2003)
 Pivotal roles of the parasite PGD₂ synthase and of the host D prostanoid receptor 1 in schistosome immune evasion
European Journal of Immunology 33 : 2764 - 2772
- Gosset, P., Pichavant, M., **Faveeuw, C.**, Bureau, F., Tonnel. A. B and Trottein, F. (2005)
 Prostaglandin D(2) affects the differentiation and functions of human dendritic cells: impact on the T cell response.
European Journal of Immunology 7 ; 35 :1491-1500
- Coisne, C., Dehouck, L., **Faveeuw, C.**, Delplace, Y., Miller, F., Morissette, G., Fenart, L., Cecchelli, R., Tremblay, P., and Dehouck B. (2005)
 Development and characterization of a mouse syngenic *in vitro* blood-brain barrier model: A new tool to examine inflammatory events on cerebral endothelium.
Laboratory Investigation 85 : 734-746.

Coisne, C., , **Faveeuw, C.**, Delplace, Y., Dehouck, L., Miller, F., Cecchelli, R., and Dehouck B. (2006)
Development and characterization of a mouse syngenic *in vitro* blood-brain barrier model: A new tool to examine inflammatory events on cerebral endothelium.

Neuroscience Letters 85 : 734-746.

Mallevaey, T., Zanetta, J.P., **Faveeuw, C.**, Fontaine, J., Maes, E., Platt, F., Capron, M., Leite-de-Moraes, M., and Trottein, F. (2006)

Activation of invariant NKT cells by helminth parasite schistosoma mansoni

Journal of Immunology 176 : 2476-2485

- publications de revues dans des revues à comité de lecture

Angeli, V., Hervé, M., **Faveeuw, C.**, Gosset, P., and Trottein, F. (2002)

A novel way of pathogen interference with dendritic cell functions: prostaglandin D₂ as a modulator of immunity.

Modern Aspects of Immunobiology 2 : 256-260.

Trottein, F., **Faveeuw, C.**, Gosset, P., and Angeli, V. (2004)

Role of the D prostanoid receptor 1 in the modulation of immune and inflammatory responses.

Critical Reviews in Immunology 24 : 349-362.

- publications de revues dans des livres ou ouvrages

Trottein, F., Mallevaey, T., **Faveeuw, C.**, Capron, M., and Leite-de-Moraes, M. (2006)

Role of natural killer T lymphocytes in Th2 responses during allergic asthma and helminth parasitic diseases.

Chem Immunol Allergy 90 : 113-127.

- publications effectuées dans le cadre de congrès internationaux

Faveeuw C., Gagnerault M.C., and Lepault F. (1994)

Modifications of the expression of homing and adhesion molecules in infiltrated islets of Langerhans in NOD (Nonobese diabetic) mice.

Advanced Experimental Medicine and Biology 355 : 137-141.

Faveeuw C., Di Mauro M., and Ager A. (1997)

Adhesion molecules used by T lymphoblasts to interact with cultured high endothelial cells.

Biochemical Society Transactions 25 : 261S.

Carnoy, C., Loiez, C., **Faveeuw C.**, Grangette, C., Desreumaux, P., and Simonet, M. (2003)

Impact of the Yersinia pseudotuberculosis-derived mitogen (YMP) on the murine immune system

Advanced Experimental Medicine and Biology 529 : 133-135.

- publications soumises dans des revues à comité de lecture

Mallevaey, T., Fontaine, J., Breuilh, L., Paget, C., Vendeville, C., Keller, A.C., Capron, M.,

Leite-de-Moraes, M., Trottein, F., and **Faveeuw, C.** (2006)

Invariant and non-invariant Natural Killer T cells exert opposite regulatory function the immune response during murine schistosomiasis

Infection and Immunity : en révision

COMMUNICATIONS

- Communications

- Communications orales

Faveeuw C., Gagnerault M.C., and Lepault F. (1991)

Homing of T cell subsets to peripheral lymphoid organs in the NOD mouse.

European Workshop on Biology and Molecular Mechanisms of Lymphocyte Traffic, Hambourg (Allemagne).

Faveeuw C., Gagnerault M.C., and Lepault F. (1993)

Modifications of the expression of homing and adhesion molecules in infiltrated islets of Langerhans in NOD mice.

11th Germinal Center Conference, Spa (Belgique).

Faveeuw C., Di Mauro M. and Ager A. (1996)

Adhesion molecules used by T lymphoblasts to interact with cultured high endothelial cells.

Joint meeting of the British Society for Immunology and the Biochemical Society, Harrogate (GB).

Faveeuw C., Angeli V., Fontaine J., Moser M., Capron M. et Trottein F. (2001)

Rôle immunomodulateur des glycoconjugués de l'oeuf au cours de la schistosomiase murine.

Club Francophone des Cellules Dendritiques, Bruxelles (Belgique).

Mallevaey, T., Leite de Moraes, M., Fontaine, J., Capron, M., Trottein, F., and **Faveeuw, C.** (2003)

Role of invariant V α 14 NKT cells during murine schistosomiasis

Société Française d'Immunologie, Nice (France).

- Communications affichées

Faveeuw C., Di Mauro M. and Ager A. (1996)

Adhesion molecules used by T lymphoblasts to interact with cultured high endothelial cells.

12th International Conference on Lymphoid tissues and Germinal Centers in Immune Reactions, Graz (Autriche).

Faveeuw C. and Ager A. (1997)

Role of L-selectin shedding in vivo.

13th European Immunology Meeting, Amsterdam (Hollande).

Faveeuw C. and Ager A. (1998)

Effect of a metalloproteinase inhibitor on lymphocyte trafficking through peripheral lymph nodes.

Keystone Symposium: Molecular Mechanisms of Leukocyte Trafficking, Lake Tahoe (California, USA).

Faveeuw C., Angeli V., Fontaine J., Wolowczuk I., Maldano R., Moser M., Capron M., and Trottein F. (2000)

Could dendritic cells be used as inducers of protective immunity against murine schistosomiasis?

Woods Hole Immunoparasitology Conference, Woods Hole (Maryland, USA).

Faveeuw C., Gosset P., Fougeray S., Charbonnier A.-S., Staels B., Moser M., Tonnel B.-A., Capron M., Trottein F. (2001)

PPAR γ activators as modulators of dendritic cell polarizing activity

11th International Congress of Immunology, Stockholm (Suède).

Gosset, P., **Faveeuw, C.**, Tonnel, A.B., Capron, M., and Trottein, F. (2003)

Pivotal role of prostaglandin D₂ in the functions of dendritic cells: Impact on the immune responses

Société Française d'Immunologie, Nice (France).

Coisne, C, **Faveeuw, C.**, Dehouck, L., Tremblay, N., Fenart, L., Cecchelli, R., Morissette, C., and Dehouck B. (2003)

Development and characterization of a primary mouse *in vitro* Blood-Brain Barrier model: a new tool to study inflammatory events in the brain.

Conférence de l'Association pour la Recherche sur la Sclérose en Plaque (ARSEP), Paris (France.)

- Invité

SANOFI : Invité par Mr P. CASELLAS, directeur du département d'Immunologie, pour un séminaire Montpellier le 17 février 1997

Titre : Rôle d'un inhibiteur des métalloprotéinases sur la migration des lymphocytes dans les ganglions.

Institut Pasteur de Lille : Invité par le Pr Monique CAPRON (Unité INSERM U167) pour un séminaire Lille le 28 février 1998

Thème : Rôle du clivage de la L-sélectine sur la migration des lymphocytes dans les ganglions.

6th UK adhesion Meeting : Invité par les organisateurs pour une conférence Londres (UK) Avril 1998

Thème : Effect of a metalloproteinase inhibitor on lymphocyte trafficking through peripheral lymph nodes.

ENCADREMENT

1996 – 1997 : Rhian Phillips - Etudiante en Thèse (Londres)

Projet : Role of chemokines in regulating adhesion and transendothelial migration of T lymphocytes across High Endothelial Venules into lymph nodes.

Encadrement de la première année de thèse :

- Mises au point des techniques *in vitro* pour l'étude des chimiokines impliqués dans les interactions lymphocytes-cellules endothéliales
- Interprétations des résultats et discussions scientifiques

1996 – 1998 : Kyriakos Tanousis - Etudiant en Thèse (Londres)

Projet : L-selectin shedding in regulating the migration pathways of lymphocytes

Encadrement des 2 premières années de thèse :

- Mises au point des techniques *in vivo* pour l'étude de la migration des lymphocytes dans les tissus lymphoïdes : implication de la L-sélectine
- Interprétations des résultats et discussions scientifiques

2000 - 2001 : Sébastien Bouché - Etudiant en DEA (Unité INSERM U547)

Projet : Localisation et Immunogénicité des déterminants core fucose et core xylose au cours de la schistosomiase murine.

Encadrement : 40% (apprentissage de diverses techniques immunologiques)

2001 - 2006 : Thierry Mallevaey - Etudiant en DEA/Thèse (Unité INSERM U547)

Projet : Lymphocytes NKT et schistosomiase murine

Encadrement : 40% (apprentissage de diverses techniques immunologiques, manipulations *in vivo* et nombreuses discussions scientifiques)

Juin 2002 – Décembre 2002 : Isabelle Spik - Etudiante en thèse (Unité INSERM 547)

Projet : Etude du rôle de la PGD₂ et de ses récepteurs sur la différenciation et la maturation des cellules dendritiques : conséquences sur la réponse immune.

(apprentissage de la culture cellulaire, de la cytométrie de flux et nombreuses discussions scientifiques)

2002 : Josette Fontaine - Chargé d'étude de l'Institut Pasteur de Lille (Unité INSERM 547)

Projet : Etude du rôle de la 'prostaglandin synthase' (PGDS) sur la différenciation et la maturation des cellules dendritiques : conséquences sur la réponse immune.

(encadrement technique : culture cellulaire et cytométrie de flux ; discussions scientifiques)

Avril 2004 : Stéphanie Moronval – Stagiaire (Médecin)

Encadrement : 100%

Apprentissage de diverses techniques de biologie cellulaire

Août 2005 : Mélanie Müller – Stagiaire (Etudiante en Master de biologie et biotechnologie)

Encadrement : 100%

Apprentissage de diverses techniques de biologie cellulaire

Depuis juin 2005 : Thomas Roumier - Stagiaire post-doctoral (Unité INSERM 547)

Projet : Contrôle des pathologies allergiques par les cellules régulatrices polarisées Th1 ou Th2

Co-responsable scientifique avec le Dr D. Dombrowicz

Depuis août 2006 : Emilie Bialecki – Etudiante Master Recherche (2006-2007)

Projet : Activation des lymphocytes NKT par les lymphocytes B de la zone marginale : rôle des TLR.

Encadrement : 100%

FINANCEMENTSContrats publics (salaire + fonctionnement)

- 1996 **Wellcome Trust**
Thème de recherche : The role of L-selectin shedding in regulating the migration pathway of lymphocytes.
Montant du Financement : 40 374 Livres sterling/année
- 1997/1998 **Medical Research Council**
Thème de recherche : The role of L-selectin shedding in regulating the migration pathway of lymphocytes.
Montant du Financement : 44 768 Livres sterling/année

Contrats associatifs

- 1991/1992 Bourse doctorale de la Ligue Nationale de Lutte contre le Cancer
Thème de recherche : Homing et recirculation des lymphocytes dans les tissus périphériques en conditions pathologiques
Montant du Financement : 72 000F/année
- 1993 Bourse doctorale de l'Association de Recherche contre le Cancer
Thème de recherche : Homing et recirculation des lymphocytes dans les tissus périphériques en conditions pathologiques
Montant du Financement : 72 000F/année
- 1995 Bourse Lavoisier (Ministère des affaires étrangères)
Thème de recherche : mécanismes impliqués dans les interactions lymphocyte-cellule endothéliale : Rôle des intégrines LFA-1 et VLA-4.
Montant du Financement : 84 000F/année
- 1999/2000 Bourse de retour de la Fondation pour la Recherche Médicale
Thème de recherche : Etude des interactions cellulaires précoces induites après vaccination par cellules dendritiques pulsées contre le parasite Schistosoma mansoni.
Montant du Financement : 120 000F/année

COORDINATEUR DE PROJETS**Co-coordonateur** : Projet pour le Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche

Programme : PRFMMIP 2000

Durée : **2001/2002**

Thème : Rôle des glycoconjugués sur les relations hôte-pathogène dans la schistosomiase

Equipes : Equipe coordinatrice – Dr François TROTTEIN et Dr Christelle FAVEEUW (INSERM U547)

Autres équipes :

I – Responsable : Pr Patrice LEROUGE (CNRS ESA 6037) – Rouen

II – Responsable : Pr Hélène GRAS-MASSE (CNRS UMR 8525) – Lille

III – Responsable : Pr Rafael ORIOL (INSERM U504) – Villejuif

Co-coordonateur : Projet de la Fondation pour la Recherche Médicale

Coordinateur : Dr D. Dombrowicz

Programme : Programme pluriannuel 2004 – Défis de la Recherche en Allergologie

Durée : **2005/2007**

Thème: Contrôle des pathologies allergiques par des cellules régulatrices polarisées Th1 ou Th2.