

Université de Montréal

**Rôles de deux corécepteurs impliqués dans le maintien des
cellules T mémoires CD8+ et la maturation des cellules
dendritiques**

Par Nougboli Arias Eustache OUSSA

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en microbiologie, infectiologie et immunologie

Juillet 2016

© Nougboli Arias Eustache OUSSA 2016

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Rôles de deux corécepteurs impliqués dans le maintien des
cellules T mémoires CD8+ et la maturation des cellules
dendritiques**

Présenté par :

Nougboli Arias Eustache OUSSA

A été évalué par le jury composé des personnes suivantes :

Docteur Martin Guimond, président rapporteur

Docteur Jean Sébastien Delisle, directeur de recherche

Docteur Laurent Sabbagh, codirecteur de recherche

Docteur Alain Lamarre, examinateur externe

Docteur Jean-François Cailhier, membre de jury

Docteur Jean François Gauchat représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

La reconnaissance d'un antigène présenté par les cellules présentatrices d'antigène induit la prolifération et la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs et mémoires. Cette reconnaissance se fait par l'interaction du récepteur des cellules T (TCR) des lymphocytes T et le complexe CMH-peptide présent à la surface des DC. Cependant, des signaux additionnels sont requis, une meilleure activation des lymphocytes T implique des corécepteurs présents à la surface de ces deux types cellulaires. Après l'élimination de l'antigène, la plupart des lymphocytes T effecteurs vont mourir. Une petite population de lymphocytes T va persister pour se différencier en lymphocytes T mémoires capables de protéger l'organisme contre une réinfection. Les signaux qui contrôlent le maintien des lymphocytes T mémoires sont encore mal compris. Pour comprendre le rôle de la molécule de costimulation 4-1BB dans le maintien des lymphocytes T CD8 mémoires, nous avons émis l'hypothèse que l'état de phosphorylation de la protéine adaptatrice TRAF1, qui se lie à 4-1BB, module le maintien des lymphocytes T CD8 mémoires. Ainsi, nous avons montré par des expériences de spectrométrie de masse que TRAF1 s'associe préférentiellement à TBK1 lorsqu'elle n'est pas phosphorylée. Nous avons aussi montré que la présence de TRAF1 est requise pour stabiliser TBK1 au récepteur 4-1BB après stimulation des lymphocytes T. Par ailleurs, les lymphocytes T CD8 OT-I TRAF1^{-/-} reconstituées avec un mutant phospho-déficient de TRAF1 (S139A) et ensuite différenciées en lymphocytes T mémoires *in vitro* induisent une activation de la voie de signalisation NF- κ B contrairement à ceux exprimant la forme phospho-mimétique de TRAF1 (S139D). Ces premières études démontrent l'importance de l'état de phosphorylation de TRAF1 en aval de 4-1BB dans les cellules T. Dans la seconde partie, nous avons évalué le rôle d'un autre corécepteur; la neuropiline 1, dans la maturation des DC. A cet effet, nous avons émis l'hypothèse que l'interaction de la neuropiline 1 et ses ligands contribuerait à la fonction des DC. Nous avons démontré que l'absence de la neuropiline 1 n'a pas d'effet sur la maturation au LPS des DC. Cependant, la présence du VEGF (un ligand de Nrp-1) inhibe la maturation des DC dérivées de la moelle osseuse. Notre étude a démontré que VEGF inhibe l'expression des molécules de costimulation, la

sécrétion des cytokines pro inflammatoires et la signalisation TLR4 principalement les voies MAP Kinase et NF- κ B. Contrairement aux résultats avec les cellules WT, VEGF n'est pas capable d'affecter la maturation, la sécrétion des cytokines et la signalisation TLR4 des DC Nrp1-Lyz où la neuropiline 1 est délétée. Ainsi, nos résultats ont démontré que VEGF inhibe la maturation des DC de façon Nrp1-dépendante. Enfin, l'analyse des molécules partenaires de la neuropiline 1 montre que Nrp1, VEGF et TLR4 se retrouvent dans le même complexe. Nos résultats démontrent que VEGF, en présence de la neuropiline 1 est capable d'interagir avec TLR4 pour inhiber la maturation des DC. Toutefois, en absence de la neuropiline1, VEGF n'est pas capable de recruter TLR4 pour réduire l'expression des molécules de costimulation. Ces études sur les corécepteurs pourraient être importantes dans l'élaboration de nouvelles approches vaccinales.

Mots clefs : lymphocytes T, Cellules dendritiques, TRAF1, Nrp1, corécepteur, costimulation

ABSTRACT:

Antigen presentation by dendritic cells induces the proliferation and differentiation of naïve T lymphocytes into effector and memory T lymphocytes. This recognition is due to the interaction of the T cell receptor (TCR) with the cognate peptide-MHC complex presented on the surface of dendritic cells. However, additional signals are required from co-receptors on both cell types to ensure optimal T cell activation. Following the elimination of the antigen, most of the effector T cells will die with a small population of T cells remaining that will continue to differentiate into memory T cells which protect the organism against reinfection. The signals that control the maintenance of memory T cells are poorly understood. To dissect the role of the 4-1BB costimulatory molecules in the maintenance of CD8 memory T cells, we hypothesized that the phosphorylation state of the TRAF1 adaptor protein that binds to 4-1BB, modulates the maintenance of CD8 memory T lymphocytes. Thus, we have demonstrated by mass spectrometry that TRAF1 preferentially associates with TBK1 when it is not phosphorylated. We also have shown that the presence of TRAF1 is required to stabilize the interaction between TBK1 and 4-1BB after T cell activation. Furthermore, OT-I TRAF1^{-/-} CD8 T cells reconstituted with a phospho-deficient TRAF1 mutant (S139A) and differentiated into memory CD8 T cells induced the activation of the NF- κ B signaling pathway, in contrast to cells expressing a phospho-mimetic form of TRAF1 (S139D). Together, these results highlight the importance of the phosphorylation state of TRAF1 downstream of 4-1BB in T cells. In the second part, we evaluated the role of the neuropilin 1 coreceptor in the maturation of dendritic cells. To this end, we hypothesized that the interactions of neuropilin-1 with its ligands contribute to the function of dendritic cells. We have demonstrated that the absence of neuropilin-1 has no effect on the maturation of dendritic cells in the presence of LPS. However, the presence of VEGF (a neuropilin-1 ligand) inhibits the maturation of dendritic cells derived from the bone marrow. Our study further demonstrated that VEGF inhibits the expression of costimulatory molecules, the secretion of proinflammatory cytokines and TLR4 signaling pathways mainly MAP Kinase and NF- κ B. Contrary to the results with wild-type cells, VEGF is not able to affect maturation, cytokine secretion and TLR4 signaling in NRP1-Lyz dendritic cells when neuropilin-1 is deleted. Thus, our results

demonstrated that VEGF inhibits the maturation of dendritic cells in a NRP1-dependent manner. Finally, analysis of neuropilin 1 partners shows that NRP1, VEGF and TLR4 are found in the same complex. Our results show that VEGF, in the presence of neuropilin-1 is able to interact with TLR4 and inhibit the maturation of dendritic cells. However, in the absence of the neuropiline1, VEGF is not able to recruit TLR4 to reduce the expression of costimulatory molecules. These studies on coreceptors could be important in the development of novel vaccine therapies.

Keywords: T cells, dendritic cells, TRAF1, NRP1, coreceptor, costimulation

Table des matières

RÉSUMÉ.....	i
ABSTRACT:.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	ix
Tableau 1: Différents sous types de cellules dendritiques.....	x
Liste des abréviations.....	xi
Liste des Tableaux.....	xiv
Remerciements.....	xv
Introduction.....	1
I- L'immunité.....	1
1. L'immunité innée.....	1
2. L'immunité adaptative.....	1
3. Les récepteurs de l'immunité innée.....	2
3.1 Les récepteurs cytoplasmiques.....	2
3.2 Structure des TLRs.....	3
3.2.1 Expression et ligand des TLRs.....	4
3.2.2 Signalisation en aval des Toll like receptors : Cas du TLR4.....	5
3.2.2.1 La voie MyD88 dépendante.....	5
3.2.2.2. Voie de signalisation MyD88 indépendante.....	6
II- Les cellules dendritiques : Acteurs de l'immunité innée et adaptative.....	7
1. Les cellules dendritiques.....	7
1.1 Reconnaissance de signaux de danger et de maturation.....	9
1.2 Processus de maturation.....	9
1.3 Les PAMPs.....	9
1.4 Expression des molécules de co stimulation.....	10
1.5 Régulation de la maturation.....	11
2. Les cellules dendritiques et l'immunothérapie.....	11
3. Effets de la maturation sur les cellules dendritiques.....	12

3.1 La migration.....	12
3.2 La présentation antigénique	13
3.2.1 La voie de présentation restreinte aux molécules de CMH I.....	13
3.2.2 La présentation restreinte aux molécules de CMH II	13
3.2.3 La présentation croisée	14
4. Activation de la réponse adaptative.....	14
4.1 Interaction entre les DC et les lymphocytes T: synapse immunologique	14
4.2. La signalisation du TCR : Le premier signal d'activation lymphocytaire.....	15
4.3 Le signal de costimulation.....	17
4.3.1 Les molécules de costimulation de la famille des immunoglobulines	18
4.3.1.1 CD28/CTLA	18
4.3.1.2 ICOS/ICOSL.....	19
4.3.1.3 PD1/PD1L.....	19
4.3.2 Les molécules de costimulation de la famille des TNF	20
4.3.2.1 OX40/OX40L	20
4.3.2.2 CD40/CD40L.....	21
4.3.2.3 4-1BB	21
4.3.2.4 Rôle du récepteur 4-1BB.....	22
4.4 Signaux requis pour la différenciation et le maintien des lymphocytes T mémoires	23
4.4.1 Différenciation des lymphocytes.....	23
4.4.2 Régulation transcriptionnelle de la différenciation des lymphocytes	25
4.4.3 Homéostasie de lymphocytes T mémoires	29
4.4.3.1 Rôles des signaux des récepteurs de lymphocytes T.....	29
4.4.3.2 Rôle des cytokines partageant la chaîne γ commune	30
4.4.3.3 Rôle de 4-1BB dans le maintien des lymphocytes T CD8.....	31
4.5 Rôle des protéines associées aux récepteurs de TNF dans la survie des lymphocytes T CD8 mémoires.....	32
4.5.1 Les TRAFs.....	33
4.5.2 Rôle de TRAF1 dans la survie des lymphocytes T CD8 mémoires	34
III- La Neuropiline	35
1. La neuropiline 1.....	36

2. Structure de la neuropiline 1	36
3. Les Ligands de la neuropiline 1	37
3.1 Sémaphorine de classe 3A et 4A	38
3.2 Les VEGFs	39
4. Fonction de la neuropiline 1	40
4.1 Fonction au cours du développement	41
4.2 Fonction au niveau cellulaire	41
4.3 La neuropiline 1 et le système immunitaire	42
4.3.1 La neuropiline 1 sur les cellules dendritiques	42
4.3.2 La neuropiline 1 et les lymphocytes T	43
4.3.3 La neuropiline 1 sur les lymphocytes T régulateurs	44
4.3.4 La neuropiline 1 et le thymus	45
Problématiques :	47
Les résultats de l'article 1	50
Abstract	51
Introduction	52
Materials and methods	54
Results	57
Discussion	61
Acknowledgements	63
References	64
Figures and legends	66
Les résultats du manuscrit 2	71
Figures and legends	96
.....	100
.....	107
.....	108
Discussion et Perspectives	110
I Les récepteurs de TNF et la survie des lymphocytes mémoires	110
II Les TRAFs et la survie des cellules cancéreuses	115
III La maturation des cellules dendritiques et le VEGF	116
IV Les cellules dendritiques et l'immunothérapie	120

V VEGF et la thérapie anti-cancéreuse	122
VI SEMA3A et la thérapie anti-cancéreuse	123
Bibliographie	i
Annexe1	i
Liste des publications	i

Liste des figures

Figure 1: Différents types de TLR Janeway 2010 adapté.	4
Figure 2: Voie de signalisation en aval des TLR ((Takeda and Akira 2005) adapté)	7
Figure 3: Schéma de la signalisation du TCR (van Panhuys et al 2016 adapté)(van Panhuys 2016)	17
Figure 4: Structure des TRAFs montrant le symbole des différents domaines	34
Figure 5: Structure de la neuropiline 1	37
Figure 6: Modèle d'interaction entre SEMA3A et Nrp1	39
Figure 7: Modèle d'interaction entre VEGF et Nrp1 montrant les différents domaines (PELLET-MANY C et al 2008 modifié).....	40
Figure 8 (1 ^{ml}): TBK1 associates with TRAF1 in T cells.	66
. Figure 9 (2 ^{ml}): TBK1 preferentially associates with the TRAF1 S139A mutant.	67
Figure 10 (3 ^{ml}): Requirement of TRAF1 for the recruitment of TBK1 to the 4-1BB complex. OT-I splenocytes (WT and TRAF1 ^{-/-}) were stimulated with 0.1 µg/ml OVA peptide for 48 h.	68
Figure 11 (4 ^{ml}): Impact of TRAF1 Serine 139 mutants on NF-κB activation in response to 4-1BB stimulation.	69
Figure 12 (1 ^{ml}): VEGFA ₁₆₅ inhibits wild-type BMDC maturation by LPS.	96
Figure 13 (2 ^{ml}): Antigen-pulsed NRP-1 –deficient BMDC can prime T-cell responses.	100
Figure 14 (2 ^{ml}): VEGF requires NRP-1 to inhibit BMDC maturation.	101
Figure 15 (2 ^{ml}): BMDC from parental LyzM-Cre mice mirror the observations made in C57BL/6 BMDC.	103
Figure 16 (2 ^{ml}): VEGF attenuates TLR4 signaling in an NRP-1-dependent manner.	104
Figure 17 (2 ^{ml}): NRP-1 interacts with TLR4 in a ligand-dependent manner.....	106
Figure 18 (2 ^{ml}): Supplementary Figure 1.....	107
Figure 19 (2 ^{ml}): Supplementary Figure 2. The reduction in NRP-1 expressing myeloid cells in LyzM-Cre/Nrp1 ^{fl/fl} mice does not alter the myeloid compartment of the bone marrow.	108
Figure 20: Effet de SEM3A sur la maturation des BMDC.....	109
Figure 21: Modèle expérimental et résultat de cytométrie montrant l'augmentation de la survie des lymphocytes OT-I TRAF1 ^{-/-} exprimant le mutant S139A (CD45.1) et TRAF1 ^{-/-} exprimant le WT (Thy1.1) 7 jours après transfert adoptif.....	113
Figure 22: Modèle de l'impact de phosphorylation de TRAF1 dans l'activation de NF-κB en aval du récepteur 4-1BB.	114
Figure 23: Interaction Nrp1-VEGF-TLR3 dans les BMDC.....	120

Liste des Tableaux

Tableau 1: Différents sous types de cellules dendritiques

Liste des abréviations

Bak : Bcl-2 homologous antagonist/ killer

Bax : Bcl-2 associated X protein

Bcl-2 : B cell lymphoma 2

Bcl-xL : B-cell lymphoma extra large

BCR: B cell receptors

Blimp-1 : B lymphocyte-induced maturation protein 1

BMDC: Bone Marrow-derived Dendritic Cell

BTLA-4 : B and T lymphocyte attenuator 4

CLR : C-type lectin (CLR)

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Antigen presenting cell

CTL : Cytotoxic T lymphocyte

CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte antigen 4

DAMP : Damage-associated molecular pattern molecules

DC : Dendritic cell

DD : Death domain

DISC : Death inducing signalling complex

Erk1/2 : Extracellular signal regulated kinase 1/2

FADD : Fas associated death domain

FasL : Fas ligand

FRB : Fibroblastic reticular cell

GM-CSF : Granulocyte macrophage colony stimulating factor

Grb2 : Growth receptor-bound protein 2

ICAM-1 : intercellular adhesion molecular 1

ICOS (L) : Inducible T cell costimulator (ligand)

IFN(R): interferon receptor

Ig : Immunoglobulin
IKB : Inhibitor of NF- κ B
IKK : Inhibitor kappa B cell kinase
IL-X(R) : Interleukine X (récepteur)
iNOS : Inducible nitric oxide synthase
IRAK : interleukin 1 receptor associated kinase
JAK : Janus Kinase
JNK : Jun N terminal kinase
KLF2 : Kruppel-like transcription factor
KLRG1 : Killer cell lectin like receptor G1
LAG-3 : Lymphocyte activation gene 3
LAT : Linker for activation T cell
LB : lymphocyte B
Lck : Leukocyte specific protein tyrosine kinase
LCMV : Lymphocytic choriomeningitis virus
LFA-1 : Lymphocyte function associated antigen 1
LIP : Lymphopenia induced proliferation
LM : Listeria monocytogène
LPS: Lipopolysacharide
MAPK : Mitogen activated protein kinase
MHC :major histocompatibility complex
MPEC : Memory precursor effector cells
NF-AT : Nuclear factor of activated T cell
NF- κ B :Nuclear factor Kappa B cells
NK : Natural killer
NLR: NOD like receptors
Nrp : Neuropiline
PI3K : Phosphatidylinositol 3 kinase

PKC : protein kinase C
PLC γ : phospholipase C γ
PAMP: Pathogen-associated molecular patterns
PRR: Pattern recognition receptors
TCR : T cell receptor
RE : Réticulum endoplasmique
RLR : RIG like receptors
ROS : reactive oxygen species
SEMA: Sémaphorine
S1P1 : Sphingosine-1 phosphate receptor 1
SHP1/2 : SH2 containing protein tyrosine phosphatase 1/2
SI : Synapse immunologique
SLEC : Short lived effector cells
SLP76 : SH2 domain containing leukocyte protein 76KDa
SMAC: supramolecular activation cluster
TLR : Toll like receptors
TANK: TRAF family member-associated NF-kappa-B activator
TBK1: TANK-binding kinase 1
TNF: Tumor necrosis factor
TRAF : TNF receptors associated factors
TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TRADD: Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein
VEGF: Vascular endothelial growth factor

Liste des Tableaux

Tableau 2: Différents sous types de cellules dendritiques

Remerciements

Je remercie mon codirecteur de recherche le Docteur Laurent Sabbagh pour m'avoir premièrement accepté dans son labo. Merci Laurent de m'avoir offert ton savoir et tes connaissances scientifiques. Les deux années passées ensemble m'ont procuré beaucoup d'enthousiasme à la recherche. Je te remercie pour ta passion et ton enthousiasme devant des résultats que parfois je jugeais trop sévèrement. Je te remercie de m'avoir permis de présenter mes résultats dans le cadre de congrès internationaux et de m'avoir soutenu durant toutes mes présentations orales.

Je tiens à remercier très sincèrement le docteur Jean Sébastien Delisle sans lequel je ne saurais finir mes études doctorales. Merci à Jean-Sébastien pour m'avoir accompagné et soutenu sur ce projet. Les rendez-vous hebdomadaires m'ont été d'une grande opportunité d'apprentissage. Sans toi, je me retrouverais sans jamais pouvoir finir ma formation et cela je le dois totalement à ton accueil et ton soutien de bout en bout

Je tiens à remercier aussi mon président du Jury le docteur Martin Guimond ainsi que le docteur Alain Lamarre qui m'ont accompagné dans mes épreuves de mon doctorat, mon examen pré-doctoral et maintenant ma thèse. Je remercie aussi monsieur Lamarre, monsieur Guimond et monsieur Cailhier d'avoir accepté de lire, corriger, écouter et débattre de ma thèse.

Je tiens à remercier toute ma famille dont le soutien constant m'a permis de faire ce parcours. Merci à Louise, Fabien, Brunette, Roxanne et Jessica.

Je remercie aussi tous les collègues Daniella, Youssouf et Geneviève avec qui j'ai vécu ces 2 ans au laboratoire de Laurent. Je tiens aussi à remercier tous les collègues de travail que j'ai eu dans le laboratoire de Jean Sébastien, pour votre soutien. Merci Manon, Cédric, Amina, Valerie, Julie O, Julie T, Caroline, Ali Reza, Emil, Sheena,

Merci au Dr Mike Sapiuha et son équipe, Dr Natalie Labrecque et son équipe

Introduction

I- L'immunité

1. L'immunité innée

L'immunité innée est la première ligne de défense contre les microorganismes. Elle est induite par la reconnaissance des motifs microbiens très conservés, médiée par les récepteurs de reconnaissance des motifs (PRR) qui détectent les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) (Iwasaki and Medzhitov 2015). La reconnaissance des PAMPs par les PRR induit une réponse inflammatoire et la défense innée de l'hôte (Iwasaki and Medzhitov 2015). Les motifs microbiens reconnus par les PRR ont des structures diverses et complexes telles les polysaccharides, les glycolipides, les lipoprotéines, les nucléotides et les acides nucléiques (Iwasaki and Medzhitov 2015). Plusieurs classes de PRR ont été identifiées et caractérisées. Il s'agit des Toll like receptors (TLR), les NOD like receptors (NLR), les RIG like receptors, et les C-type lectin (CLR)(Kawai and Akira 2010). Un des événements majeurs qui résulte de l'activation de l'immunité innée est l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86, CD40, et le CMH II sur les cellules dendritiques(Janeway 2001). L'immunité innée a pour rôle de réguler l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86, et apparaît essentiel pour l'induction de l'immunité adaptative.(Janeway 2001). La reconnaissance d'agent infectieux par les cellules de l'immunité innée vont induire la production de cytokines pro inflammatoires (IL-1,TNF, IL-6, IL-12) mais aussi des molécules effectrices telles iNOS et les peptides anti microbiens (Janeway 2001). La détection des motifs microbiens par les PRR exprimés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) principalement les DC vont activer la réponse immune adaptative.

2. L'immunité adaptative

L'immunité adaptative fait référence à la réponse d'un antigène spécifique des lymphocytes T (immunité cellulaire) et des lymphocytes B (immunité humorale). Elle s'active contre tout pathogène qui s'échappe à l'immunité innée. Les principaux acteurs de

l'immunité adaptative sont les lymphocytes T et les lymphocytes B, qui grâce aux récepteurs de cellules T (TCR) et aux récepteurs de cellules B (BCR) sont responsables de de l'immunité cellulaire et humorale respectivement. Les lymphocytes B vont reconnaître directement les déterminants antigéniques présents sur les pathogènes ou à la surface des cellules alors que les lymphocytes T reconnaissent l'antigène présenté sous forme de peptide associé au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Cette reconnaissance va induire une expansion clonale des lymphocytes T dont les lymphocytes T CD4 vont induire une réponse Th1 ou Th2 dépendamment de la nature des cytokines produites.

3. Les récepteurs de l'immunité innée

Les récepteurs de l'immunité innée connus sous le nom de Pattern Recognition Receptors (PRR) sont exprimés sur les cellules de l'immunité innée que sont les macrophages et les DC. Ces récepteurs sont des senseurs de microorganismes.

3.1 Les récepteurs cytoplasmiques

Les récepteurs NLR

Les NLR constituent la famille des récepteurs ayant la propriété de senseurs de pathogène cytoplasmique. Ils sont composés d'un domaine central de liaison au nucléotide et d'une extrémité C-terminale riche en leucine (Takeuchi and Akira 2010) NOD1 et NOD2 reconnaissent les motifs bactériens comme le peptidoglycane et induisent la transcription des gènes des cytokines pro inflammatoires (Takeuchi and Akira 2010).

Les récepteurs CLR

Les CLR comprennent la famille des récepteurs transmembranaires caractérisés par la présence d'un domaine de liaison au carbohydrate. Ils reconnaissent les groupements carbohydrates présents sur les microorganismes tels que les virus, les bactéries et les champignons. Les CLR sont connus pour stimuler la production de cytokines pro inflammatoires ou inhiber les complexes immuns induits par le TLR (Takeuchi and Akira 2010) Ils sont couplés aux immunorécepteurs dectin1 ou dectin 2 qui leur permettent de jouer le rôle de senseur des β -glycans des champignons (Robinson et al. 2009). Les DC

activées par la dectine1 ou la dectine2 sont capables de stimuler les lymphocytes T et conférer une immunité protectrice contre les virus, les bactéries et les champignons dont *Candida albicans* (Robinson et al. 2009).

Les récepteurs RLR

Le RIG-1-like récepteur (RLR) est composé de RIG-1, du gène 5 de différenciation associé au mélanome (MDA-5) et le LPG2 (Takeuchi and Akira 2009). Ils sont localisés dans le cytoplasme et reconnaissent l'ARN génomique viral ou l'ARN issu de la réplication virale. Son expression est fortement augmentée après une stimulation par les interférons de type I ou en cas d'infection virale (Takeuchi and Akira 2009). L'absence de RIG-1 sur les fibroblastes murins et les DC affecte la production des interférons de type I et les cytokines inflammatoires en réponse au stimulus d'ARN viral (Takeuchi and Akira 2009).

Les récepteurs TLR

La famille des Toll like receptor est l'une des plus caractérisées des PRR capable de détecter les pathogènes à l'extérieur des cellules et à l'intérieur des endosomes et lysosomes (Akira, Uematsu, and Takeuchi 2006) Chaque TLR détecte un PAMP distinct dérivé du virus, d'une bactérie, d'une mycobactérie, d'un champignon et des parasites (Kawai and Akira 2011). Cependant, certains TLR reconnaissent plusieurs PAMPs.

3.2 Structure des TLRs

Les TLR sont caractérisés par une région N-terminale riche en leucine (LRR) importante pour la reconnaissance des PAMPs, une région transmembranaire suivie d'un domaine cytoplasmique TIR (Toll/IL-1R), homologue au récepteur de l'IL-1, requis pour activer les voies de signalisation (Akira, Uematsu, and Takeuchi 2006). Le domaine riche en leucine contient plusieurs motifs d'interaction protéines impliquées dans diverses fonctions physiologiques. Il s'agit la réponse du système immunitaire, l'activation du signal, la régulation du cycle cellulaire et la régulation enzymatique (Dolan et al. 2007). L'analyse du domaine révèle qu'il est impliqué dans des interactions protéine-protéine avec des protéines ayant des fonctions dans l'immunité innée (Ve, Williams, and Kobe 2015).

3.2.1 Expression et ligand des TLRs

Les TLRs constituent des prototypes de récepteur qui reconnaissent les motifs moléculaires associés aux pathogènes et les motifs moléculaires associés au danger des tissus endommagés (DAMPs). A ce jour, 10 et 13 TLRs fonctionnels ont été identifiés respectivement chez l'homme et la souris (Kawai and Akira 2010). Les TLR1 TLR2 TLR4 TLR5 et TLR 6 sont exprimés à la surface des cellules et reconnaissent les composants membranaires microbiens tandis que TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont exprimés à l'intérieur des vésicules et reconnaissent les acides nucléiques (Blasius and Beutler 2010). Les TLRs sont exprimés par un grand nombre de cellules immunitaires en particulier les cellules présentatrices d'antigènes telles que les macrophages et les DC. Cependant, TLR3 a un profil d'expression restreint aux DC. Ces PAMPs sont de composantes diverses, les lipoprotéines qui reconnaissent TLR1, TLR2 et TLR6, l'ARN double brin reconnu par le TLR3, le lipopolysaccharide reconnu par le TLR4, la flagelline reconnue par le TLR5, l'ARN simple brin reconnu par le TLR7 TLR8, et l'ADN reconnu par le TLR9 (Kawai and Akira 2011)

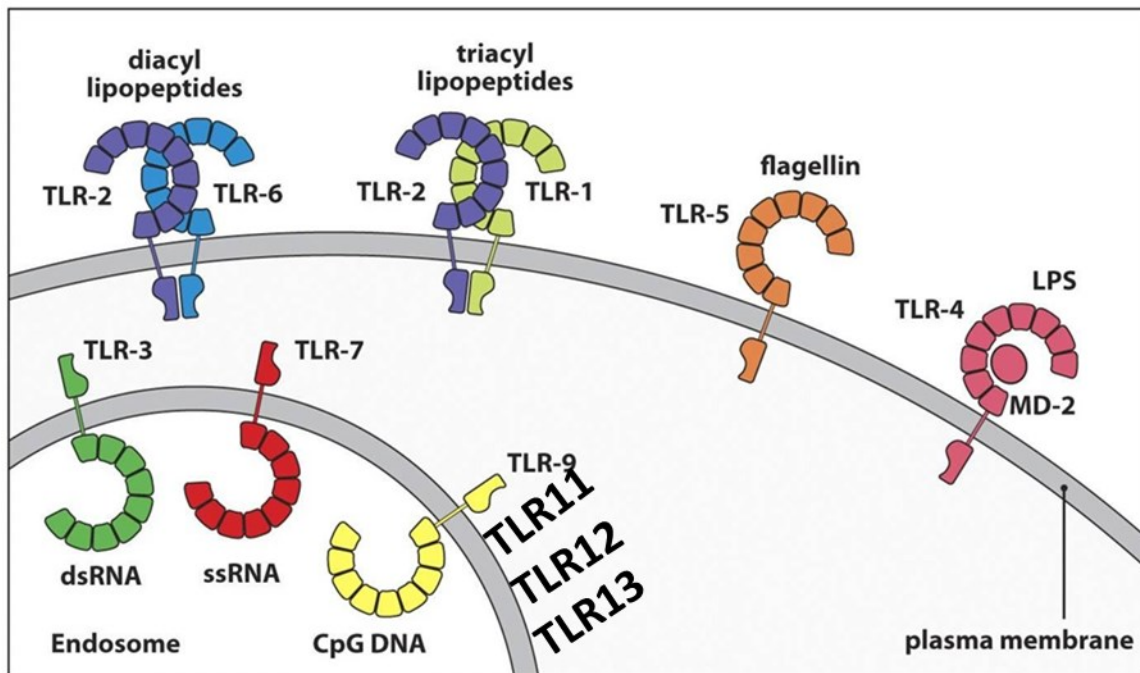


Figure 1: Différents types de TLR Janeway 2010 adapté.

Certains TLR sont localisés à la membrane cellulaire des cellules dendritiques et des macrophages pour détecter les molécules extracellulaires des pathogènes. Les TLR intracellulaires sont ancrés à la paroi de l'endosome où ils reconnaissent les composants microbiens comme l'ADN

3.2.2 Signalisation en aval des Toll like receptors : Cas du TLR4

L'activation de la voie de signalisation en aval des TLR est importante pour les différentes fonctions des DC telles que la surexpression des molécules de co stimulation et sa capacité à stimuler les lymphocytes T. La stimulation du TLR4 par son ligand (LPS) va induire son homodimérisation, il s'en suit un recrutement de protéines adaptatrices (IRAK1 IRAK2 IRAK4 et TRAF6 ou TRAF3) nécessaires à la transduction du signal (O'Neill, Golenbock, and Bowie 2013). Le domaine TIR présent dans les TLRs va induire une activation des voies NFκB et MAP (Mitogen Activated Protein) kinases. Les protéines MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene) et TRIF responsables de deux voies de signalisation, vont induire respectivement la production des cytokines pro inflammatoires et interférons de type I (interféron α et β) dépendante ou indépendante (O'Neill, Golenbock, and Bowie 2013).

3.2.2.1 La voie MyD88 dépendante

La protéine MyD88 a été originellement isolée comme gène capable d'induire la prolifération des cellules M1 myélolœucémiques en macrophages après stimulation à l'IL-6 (Akira and Takeda 2004). La voie MyD88 est utilisée par tous les TLRs sauf le TLR3. L'activation des TLRs va permettre le recrutement des protéines adaptatrices IRAKs et TRAF6, un membre de la famille des TRAFs connus pour activer NFκB. TRAF6 active le complexe TAK1 qui conduit à l'activation de NFκB et MAP Kinases (Kawai and Akira 2011). TAK1 est un membre de la famille mitogen-activated protein kinase (MAPK) qui permet à l'IL-1 et le LPS d'activer la voie NFκB (Akira and Takeda 2004) En effet, la protéine TAK1 phosphoryle le complexe IKK fait de trois sous unités IKKγ et IKKα et IKKβ. IKK à son tour phosphoryle l'inhibiteur de NFκB, IκB, entraînant la libération du facteur de transcription qui transloque dans le noyau pour la transcription des gènes cibles (Akira and Takeda 2004). La voie MyD88 est essentielle pour la réponse contre plusieurs composants microbiens. Cependant, les études sur les cellules déficientes en MyD88 ont

révélé l'existence des voies MyD88 dépendantes et indépendantes toutes deux médiées en réponse à la stimulation LPS (Akira and Takeda 2004).

3.2.2.2. Voie de signalisation MyD88 indépendante

Dans les DC conventionnelles, l'activation des TLR3 TLR4 TLR7 TLR9 peut induire la production des cytokines pro inflammatoires et les cytokines de type I. (Interféron α et β) L'activation de cette voie indépendante de MyD88 implique le recrutement de la protéine TRIF. TLR4 est capable d'activer aussi bien la voie MyD88 que la voie de signalisation TRIF dépendante (Takeuchi and Akira 2010). La protéine TRIF s'associe à TRAF3 et TRAF6 par les motifs de liaison aux TRAFs présents à son extrémité N-terminale. La présence à son extrémité C-terminale d'un motif permettant l'interaction avec les protéines RIP lui permet de se lier à RIP1 et RIP3 (Takeuchi and Akira 2010). La protéine TRADD qui est une molécule adaptatrice importante dans la signalisation TRIF dépendante, s'associe avec la protéine FADD pour former un complexe avec RIP1. Dans ce complexe, TRADD induit l'ubiquitination de RIP1, un événement essentiel à l'activation de la voie NF κ B (Ermolaeva et al. 2008). La protéine TRAF3 est importante à l'activation des kinases TBK1 et IKK qui interagissent avec la protéine TANK, un activateur des protéines TRAFs associées à l'activation des NF κ B (Takeuchi and Akira 2010). Par ailleurs, la protéine TRAF3, en réponse à une stimulation TLR3, s'active et induit une auto ubiquitination de sa lysine K63 avec une activité ubiquitine ligase E3. L'ubiquitination de TRAF3 induit sa dégradation dans le protéasome, un événement important à l'activation des MAP kinases et la production des cytokines pro inflammatoires (Takeuchi and Akira 2010). TBK1 et IKK vont phosphoryler le dimer IRF3 et IRF7 qui va transloquer dans le noyau pour l'expression des gènes d'IFN- α et d'IFN- β (Takeuchi and Akira 2010; Tenoever et al. 2007).

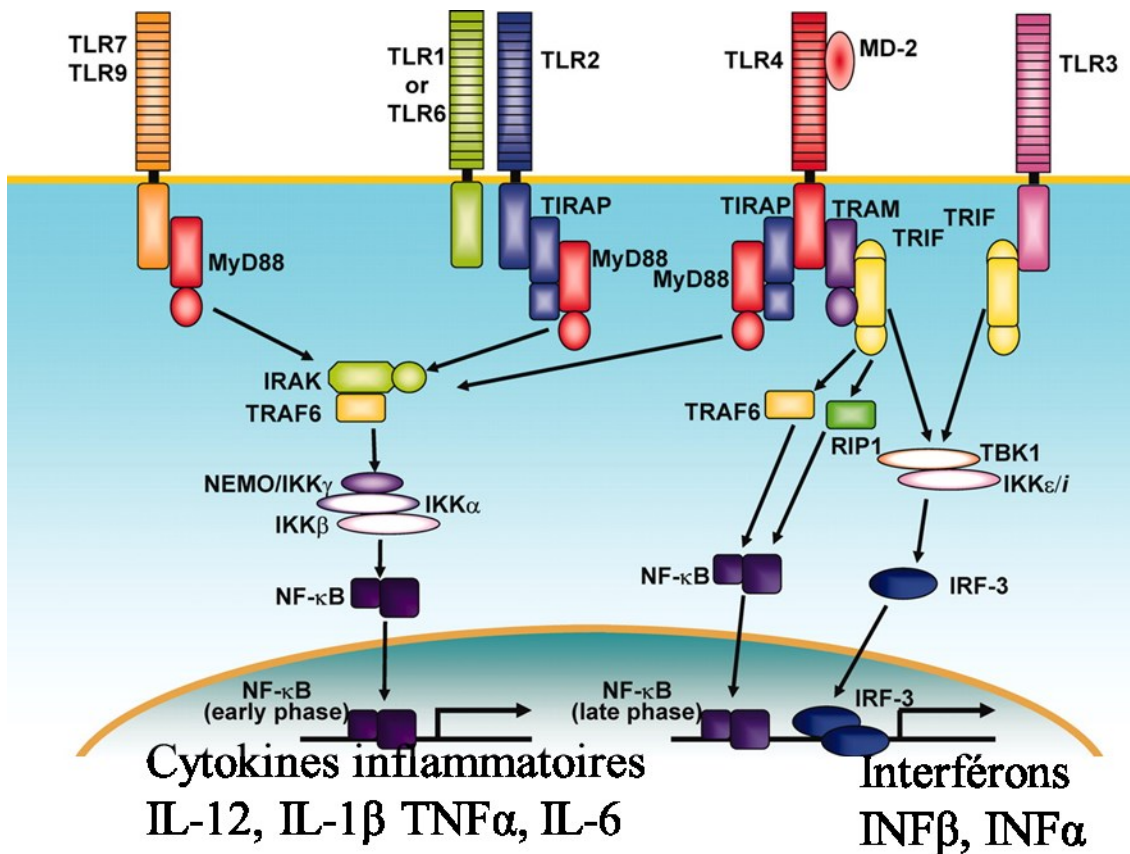


Figure 2: Voie de signalisation en aval des TLR ((Takeda and Akira 2005) adapté)

L'adaptateur MyD88 s'associe au domaine cytoplasmique TIR des TLRs et recrute la protéine IRAK récepteur après stimulation avec les ligands. IRAK à son tour active TRAF6 amenant à l'activation du complexe IKK. Le complexe IKK phosphoryle I κ B résultant la translocation de NF- κ B dans le noyau qui induit la transcription des cytokines inflammatoires. L'adaptateur TRIF contenant le TIR active le complexe IKK/TBK1 menant à l'activation d'IRF3

II- Les cellules dendritiques : Acteurs de l'immunité innée et adaptative

1. Les cellules dendritiques

Les DC constituent une population cellulaire très hétérogène impliquée dans l'immunité et la tolérance. Elles proviennent d'un progéniteur hématopoïétique commun appelé CDP (Common Dendritic cells Progenitor) capable de générer les DC myéloïdes et plasmacytoïdes (Liu and Nussenzweig 2010). Les DC se distinguent des autres cellules adhérentes telles que les monocytes et les macrophages par leur morphologie (Liu and

Nussenzweig 2010). Elles jouent un rôle important dans la capture, la présentation de peptides antigéniques afin d'induire une réponse spécifique à l'antigène (Liu and Nussenzweig 2010). Les DC se distinguent par l'expression de leurs marqueurs de surface (Shortman and Liu 2002), qui ont permis de mieux les caractériser. Contrairement aux lymphocytes T et B, il est impossible d'identifier un sous type par un simple marqueur de surface. Les DC constituent une population cellulaire très hétérogène dont les principaux sous types sont les DC plasmacytoïdes et myéloïdes conventionnelles. Cette hétérogénéité se traduit aussi par les propriétés fonctionnelles de chaque sous type. Les DC plasmacytoïdes spécialisées dans la production d'interféron- α (IFN- α) après stimulation par des acides nucléiques (Liu 2005; Shortman and Liu 2002). Les DC plasmacytoïdes se caractérisent par une faible expression des molécules du CMH de classe II avec une forte expression de TLR7 et TLR9 (Haniffa, Collin, and Ginhoux 2013). Elles jouent un rôle majeur dans l'induction de la réponse antivirale et antibactérienne (Chistiakov et al. 2014). Les DC conventionnelles ou myéloïdes se caractérisent par l'expression de CD11c+ CD11b+ TLR2+ TLR3+ TLR4+ (Chistiakov et al. 2015). La fonction classique des DC myéloïdes est la capture, l'apprêtement et la présentation des peptides microbiens aux lymphocytes T CD4 naïfs qui s'activent après reconnaissance de l'antigène associée à la molécule de CMH II. L'activation des lymphocytes T CD4 induit une réaction inflammatoire (Th1, Th17), anti-inflammatoire (Th2) ou immuno régulateur caractérisé par la génération des lymphocytes Tregs (Chistiakov et al. 2015). Par ailleurs, les DC conventionnels présentent les peptides microbiens exogènes associés au CMH I aux lymphocytes T CD8 et induisent leur activation (Joffre et al. 2012).

Plusieurs sous types de DC ont été décrits, le tableau suivant résume les différents sous types et leur fonction (Liu and Nussenzweig 2010)

Organe	Rate	Phénotype	Rôle
	CD8+ DC	CD8+CD205+SIRPa- CD11b-	Présentation antigénique
Ganglions lymphatiques	CD8- DC	CD8-DCIR2+SIRPa+ CD11b+	Présentation antigénique
	DC migratoire	CD11c ^{int} CD40 ^{hi} MHC ^{hi} CCR7+	Présentation antigénique
	DC résident CD8+	CD11c ^{hi} MHCII+CD8+CD205+	Présentation croisée
Poumon, foie, derme, rein	DC résident CD8-	CD11c ^{hi} MHCII+CD8-CD11b+	inconnu
	DC CD103+	CD11c ^{hi} MHCII+CD103+CD11b-	Présentation croisée pour la réponse antivirale
	DC CD11b+	CD11c ^{hi} MHCII+CD103-CD11b+	inconnu
Intestin	DC PP CD103+	CD11c ^{hi} MHCII+CD103+CD11b-CX3CRI-	inconnu
	DC LP CD103+	CD11c ^{hi} MHCII+CD103+CD11b+CX3CRI-M-CSFR ^{lo}	Inconnu
	DC LP CD103-	CD11c ^{hi} MHCII+CD103+CD11b+CX3CRI+M-CSFR ^{hi}	Transport d'antigène au ganglion

Tableau 3: Différents sous types de cellules dendritiques

1.1 Reconnaissance de signaux de danger et de maturation

Toutes les DC et les autres cellules présentatrices d'antigènes telles que les macrophages expriment des motifs de reconnaissance (PRR) qui leur permettent de détecter tout signal de danger et alerter le système immunitaire. Comme mentionné plus haut, les PRR en particulier les TLR vont induire la maturation des DC par leur capacité de reconnaissance des motifs microbiens associés aux pathogènes.

1.2 Processus de maturation

Plusieurs molécules comme l'IL-1R, les récepteurs de TNF ont été montrés comme étant capable d'activer les DC en favorisant leur transition de l'état immature à mature. Il s'agit d'un processus continu induit après rencontre de l'antigène et ou des cytokines en périphérie du système immunitaire (Banchereau et al. 2000).

1.3 Les PAMPs

Plusieurs facteurs activent et régulent le processus de la maturation des DC dont les PAMP tels que le LPS, l'ADN bactérien, l'ARN double brin.(Hacker et al. 1999; Hartmann, Weiner, and Krieg 1999). Le LPS est un composant majeur de la membrane des bactéries Gram négatives est connu pour détecter le TLR4 associé à la molécule MD2 (Kumar, Kawai, and Akira 2011). Le peptidoglycane des bactéries Gram positives et le lipoarabinomann des mycobactéries sont détectés par le TLR2. La reconnaissance des

PAMPs par les TLR1 TLR2 TLR4 TLR5 et TLR6 vont induire la production des cytokines inflammatoires tandis que TLR7 et TLR9 vont induire la production de l'interféron de type I (Kumar, Kawai, and Akira 2011). Les acides nucléiques (ARN simple brin, ARN double brin et ADN double brin) dérivés des virus tels que Herpes Simplex Virus (HSV), CMV et les motifs CPG non méthylés sont détectés par TLR9 vont induire la production d'interféron de types I par les DC plamacytoïdes (Kumar, Kawai, and Akira 2011). Les composées β Glycan des champignons comme *Candida albicans* sont détectés par TLR2 alors que les composés insaturés de la membrane des protozoaires sont détectés par TLR2 et TLR4 (Takeuchi and Akira 2010)

1.4 Expression des molécules de co stimulation

L'expression des molécules de costimulation permet de distinguer les DC immatures caractérisées par une faible expression des molécules de costimulation telles que CD40 CD80 et CD86 et une forte capacité phagocytaire (Wallet, Sen, and Tisch 2005). Les DC matures se caractérisent par l'expression plus élevée de ces molécules de costimulation qui leur confèrent le rôle de cellule présentatrice professionnelle capable d'activer les lymphocytes T naïfs. La stimulation des TLR sur les DC induit l'expression de CD80 et CD86 qui constituent les premiers signaux de costimulation (Hubo et al. 2013). Ces deux molécules sont souvent utilisées pour décrire une cellule dendritique mature.

Plusieurs études ont montré que l'expression d'ICOSL à la surface les DC activées induit la tolérance en favorisant la différenciation des lymphocytes T naïfs en T regs par la production d'IL-10 (Ito et al. 2007). Cependant, il est important de préciser que selon le contexte de l'environnement inflammatoire l'interaction ICOS/ICOSL induit une polarisation Th1/Th2 des lymphocytes (Kopf et al. 2000)

CD40 est une molécule de costimulation de la famille des récepteurs de TNF fortement exprimée sur les DC matures. Des études ont montré que l'interaction CD40, exprimé sur les DC et CD40L exprimé sur les lymphocytes T régule l'immunité cellulaire et humorale, et joue un rôle majeur dans l'activation et la maturation des lymphocytes T (MacDonald et al. 2002). La Liaison de CD40L sur les DC augmente l'expression des molécules d'adhésion et favorise la production d'IL-12 (Lapteva et al. 2007).

Contrairement aux DC immatures où les molécules de CMH de classe II sont internalisées avec une demi-vie courte, la maturation ou un stimulus inflammatoire induit de façon stable une augmentation de l'expression des molécules de CMH II à la surface des DC pour la reconnaissance des lymphocytes T CD4 (Inaba et al. 1997; Winzler et al. 1997; Cella et al. 1997).

1.5 Régulation de la maturation

La balance entre les signaux pro inflammatoires et anti inflammatoires dans le microenvironnement tels que le TNF, l'IL-1, l'IL10, le TGF β et le VEGF régule la maturation des DC (Banchereau et al. 2000). Des études dont celle de Walet et al ont montré le rôle de l'IL-10 dans l'inhibition de la maturation des DC (Walet, Sen, and Tisch 2005). Par ailleurs, les travaux de Yang et McBride ont montré que la stimulation au LPS des DC après traitement à l'IL-10 inhibe la sécrétion des cytokines pro inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL12p70, le TNF- α . Cette inhibition concerne l'expression des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86 et l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T allogéniques (McBride et al. 2002; Yang and Lattime 2003). Plusieurs autres études ont montré que l'effet tolérogène de l'IL-10 ne se limite pas à ces effets De plus, les travaux de Manavalan ont montré que le traitement à l'IL-10 induit l'expression de molécules inhibitrices telles qu'ILT3 et ILT4 à la surface des DC (Manavalan et al. 2003). TGF β a été montré de jouer un rôle dans la modulation de la maturation des DC. En effet, des trois isoformes de TGF β , il a été montré que TGF β 1 inhibe la maturation des DC *in vitro* (Yamaguchi et al. 1997). Comme ce fut le cas pour l'IL-10, TGF β 1 inhibe aussi l'expression de CD83 et CD86 chez l'humain (Strobl and Knapp 1999) et de CD80 et CD86 chez la souris (Zhang et al. 1999). Les travaux de Mou rapportent que le traitement de TGF β 1 sur les BMDC réduit l'expression de TLR4, la sensibilité à la maturation au LPS et la production de l'IL-6 et l'IL-12 (Mou et al. 2004; Tada et al. 2004). Oyama et al, ont rapporté que VEGF inhibe la maturation des DC en inhibant la voie de signalisation NF κ B (Oyama et al. 1998). Une partie de cette thèse a tenté de mieux comprendre le rôle de VEGF dans la maturation des DC.

2. Les cellules dendritiques et l'immunothérapie

Plusieurs modèles de cancer murin ont montré que les DC peuvent capturer les antigènes tumoraux et les présenter aux lymphocytes T dans le ganglion qui ensuite infiltrent la tumeur. Il s'en suit la génération de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de la tumeur capable de contribuer au rejet de la tumeur (Diamond et al. 2011; Fuertes et al. 2011). Ces études démontrent que les DC sont essentielles à la génération de l'immunité anti tumorale *in vivo* et montrent le potentiel thérapeutique des DC en cancer. Les mécanismes mis en place par les cellules tumorales se traduisent par l'interférence avec la maturation des DC. En effet, les cellules tumorales peuvent inhiber la maturation des DC par la production de l'IL-10 (Fiorentino et al. 1991; Steinbrink et al. 1997) conduisant à l'anergie des lymphocytes T. Des facteurs produits par les cellules altèrent également la maturation des DC (Steinbrink et al. 1997). Des modèles thérapeutiques de vaccination via les DC sont en cours pour générer les Lymphocytes T CD8 spécifiques des antigènes tumoraux capables d'induire une réponse robuste conduisant à la régression de la tumeur chez les patients (Yee et al. 2002; Dudley et al. 2002). Plusieurs essais cliniques de vaccins *ex vivo* à base des DC donnent des résultats encourageants en particulier pour le cancer de la prostate (Palucka and Banchereau 2012)

3. Effets de la maturation sur les cellules dendritiques

3.1 La migration

La maturation des DC est accompagnée d'un changement de leur morphologie qui se traduit par la perte des structures adhésives, la réorganisation du cytosquelette et l'acquisition d'une forte mobilité cellulaire (Cella et al. 1999). Les facteurs de maturation induisent la migration des DC de la périphérie vers les organes lymphoïdes où elles rencontrent les lymphocytes T (Banchereau et al. 2000). Cette migration des DC matures implique l'action de plusieurs chimiokines et de leur récepteur spécifique. Au cours de cette maturation, les DC induisent l'expression de CCR7 qui permet de migrer des tissus infectés pour les organes lymphoïdes secondaires (Yoshida et al. 1997). Une fois dans les organes lymphoïdes secondaires, les DC vont sécréter MIP-3 β qui favorise le contact DC-lymphocytes T naïfs qui participe à la mise en place de la réponse immune (Banchereau et al. 2000).

3.2 La présentation antigénique

Les DC expriment à leur surface les molécules de CMH I et CMH II qui ont des fonctions similaires. Ces molécules de CMH I CMH II présentent les peptides antigéniques à la surface des DC aux lymphocytes T CD8 et CD4 respectivement. La présentation des peptides intracellulaires se fait par la molécules de CMH I tandis que celle exogène se fait par les molécules de CMH II (Vyas, Van der Veen, and Ploegh 2008). Une forme de présentation appelée la présentation croisée existe, et permet la présentation des antigènes exogènes par le CMH I et endogènes par le CMH II.(Kurts, Robinson, and Knolle 2010)

3.2.1 La voie de présentation restreinte aux molécules de CMH I

Les molécules de CMH de classe I sont exprimées sur toutes les cellules nucléées et présentent les fragments peptidiques cytoplasmiques et nucléaires à la surface cellulaire. Plusieurs études ont montré que ces antigènes sont dégradés au niveau des protéasomes cytoplasmique et nucléaire (Neefjes et al. 2011). Les peptides ainsi générés dans le protéasome vont transloquer dans le réticulum endoplasmique par les transporteurs TAP1 et TAP2 (Transporter associated with antigen presentation) pour accéder à la molécule de CMH I. Dans le réticulum endoplasmique, le CMH I est un hétérodimère composé d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère, la β 2 microglobuline. Le peptide est le troisième composant du CMH I, qui s'insère dans le sillon capable d'être lié à des peptides antigéniques 8 à 9 acides aminés. La liaison du peptide est requise pour la stabilité de la molécule mais en son absence, cette stabilité est assurée par les protéines chaperonnes du RE telles que la calréticuline et la protéine ERp57 (Neefjes et al. 2011). L'interaction des protéines TAP avec la tapasine va permettre le chargement du peptide sur la molécule de CMH I. Une fois liée au CMH I, les protéines chaperonnes relâchent le complexe peptide-CMH I, qui quitte le RE pour la présentation à la surface cellulaire des lymphocytes T CD8 (Vyas, Van der Veen, and Ploegh 2008). Inversement, aux peptides et les molécules de CMH I qui n'ont pas formé le complexe retournent dans le cytosol pour être dégradés (Hughes, Hammond, and Cresswell 1997; Koopmann et al. 2000).

3.2.2 La présentation restreinte aux molécules de CMH II

Contrairement à la molécule de CMH de classe I, le CMH II est exprimé uniquement sur les cellules présentatrices d'antigène telles que les DC, les macrophages et les lymphocytes B. Les études rapportées par plusieurs groupes ont démontré que le complexe transmembrane α et la chaîne β se forme dans le RE et s'associe à la chaîne invariante (Ii). Le complexe Ii-CMH est transporté dans le compartiment endosomal où la chaîne invariante Ii est clivée, laissant un peptide résiduel appelé CLIP qui s'insère dans le sillon de liaison peptidique de la molécule de CMH II (Neeffjes et al. 2011). La molécule HLA-DM (H2-DM chez la souris) va faciliter l'échange du fragment CLIP en un peptide spécifique issu de la dégradation protéique (Neeffjes et al. 2011). La molécule de CMH Ii est transportée jusqu'à la membrane pour présenter le peptide antigénique aux lymphocytes T CD4 (Neeffjes et al. 2011)

3.2.3 La présentation croisée

La présentation des antigènes exogènes par les molécules de CMH de classe I appelée présentation croisée, est essentielle à l'initiation de la réponse CD8 (Joffre et al. 2012). Plusieurs cellules présentatrices d'antigènes peuvent induire la présentation croisée *in vitro*, et la plupart des études indiquent que les DC sont essentiels pour ce type de présentation *in vivo* (Jung et al. 2002). Cependant, il n'est pas encore clair quels sont les sous types de DC capables de la présentation croisée et les conditions inflammatoires spécifiques qui sont requises (Joffre et al. 2012).

4. Activation de la réponse adaptative

4.1 Interaction entre les DC et les lymphocytes T: synapse immunologique

La réponse immune adaptative est initiée par les interactions spécifiques entre les antigènes chargés, les DC matures et les lymphocytes T naïfs. Cette activation des lymphocytes est contrôlée par la formation d'une structure à l'interface des DC et des lymphocytes T appelée synapse immunologique (Hivroz et al. 2012). Cette surface de contact est organisée de façon temporelle et spatiale et implique plusieurs protéines membranaires et molécules cytosoliques à l'interface entre les lymphocytes T et les DC. Cette interaction entraîne une réorganisation de l'actine et du cytosquelette (Hivroz et al. 2012). Les premières images de la synapse immunologique furent analysées avec les lymphocytes B contenant les

molécules importantes impliquées dans l'activation des lymphocytes (Monks et al. 1998; Grakoui et al. 1999). Ces premières études ont montré que les récepteurs de cellules T s'accumulent progressivement dans la partie centrale de la synapse appelée le complexe supramoléculaire central d'activation cSMAC. Les intégrines séparent les récepteurs du TCR pour former le complexe supramoléculaire périphérique d'activation pSMAC (Grakoui et al. 1999; Monks et al. 1998). Les protéines PKC θ et LAT se retrouvent dans le cSMAC alors que d'autres protéines comme la taline se retrouvent dans le pSMAC (Monks et al. 1998; Hivroz et al. 2012). Les études ont montré que les DC sont capables d'induire cette zone de contact avec les lymphocytes en absence d'antigène (Revy et al. 2001; Brossard et al. 2005). En effet, l'accumulation du complexe PKC θ -CD3, la séparation de LFA-1 du CD3 ont été observées en absence d'une stimulation antigénique spécifique (Brossard et al. 2005; Revy et al. 2001). Par ailleurs, les DC matures établissent une longue interaction avec les lymphocytes T naïfs même en absence d'antigène tandis que les DC immatures établissent de court contact avec les lymphocytes T naïfs. Ce court contact empêche la formation de la synapse immunologique et une activation des lymphocytes T par les DC immatures.

4.2. La signalisation du TCR : Le premier signal d'activation lymphocytaire

L'activation des lymphocytes T résultant de l'engagement du TCR avec le complexe CMH-peptide suscite encore des débats (Acuto, Di Bartolo, and Michel 2008). Cet engagement du TCR induit la signalisation des protéines de la famille SRC kinase (SFK) comprenant les protéines LCK et FYN dont l'activation constitue le premier événement du signal du TCR (Brownlie and Zamoyska 2013). Toutefois, le TCR n'a pas une activité enzymatique intrinsèque, son activité enzymatique dépend de ces deux kinases. Les travaux de Veillette et al., ont démontré depuis plusieurs années que la protéine LCK est capable de se lier au domaine cytoplasmique des corécepteurs CD4 et CD8 (Veillette et al. 1988). En effet, après l'interaction du TCR avec le complexe CMH-peptide, ces corécepteurs sont importants pour délivrer le signal de LCK aux substrats proximaux tels que le TCR-CD3 et la chaîne ζ ITAM (Artyomov et al. 2010). L'activation de la protéine LCK induit la phosphorylation des molécules ITAM et la protéine Zap70. Cette phosphorylation induit un changement conformationnel de Zap70, qui active son activité kinase. Cette activation

conduit à la phosphorylation de ces cibles dont la protéine LAT, un adaptateur essentiel dans l'activation des lymphocytes T (Deindl et al. 2007). La phosphorylation de LAT va permettre le recrutement de plusieurs adaptateurs qui vont activer différentes voies. Cette activation va induire la prolifération, la différenciation et la réorganisation de l'actine, phénomène essentiel à l'activation des lymphocytes T (Brownlie and Zamoyska 2013) Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer l'activation du TCR dont deux sont les plus courants et populaires. Il y a d'une part, le modèle de changement conformationnel et d'autre part, le modèle de séparation cinétique (Brownlie and Zamoyska 2013) Dans le premier modèle, Xu et al., ont démontré dans les cellules non stimulées, une étroite interaction entre le CD3 et le domaine cytoplasmique du TCR se caractérisant par une signature de résidus tyrosine et leucine dans la bicouche lipidique membranaire. Ainsi, au cours de l'activation, on observe un relâchement de ces domaines membranaires de la bicouche lipidique (Xu et al. 2008). Dans le second modèle, Davis et al. suggèrent que la signalisation du TCR est le résultat d'une séparation de la membrane lipidique dont l'une est riche en LCK et l'autre caractérisée par l'absence de la phosphatase transmembranaire CD45 (Davis and van der Merwe 2006).

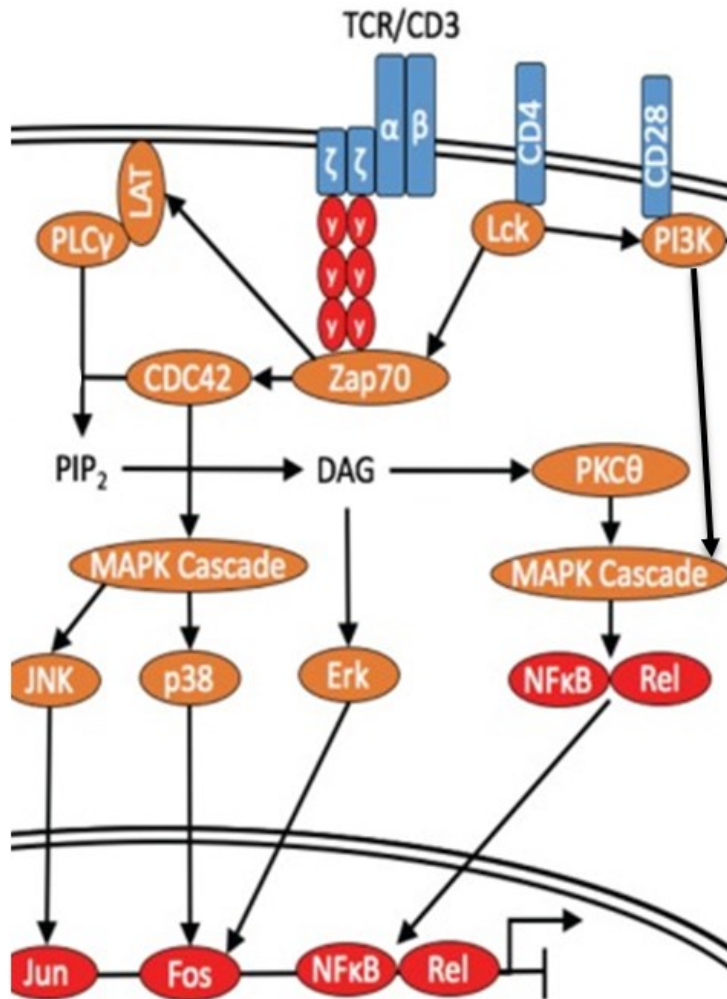


Figure 3: Schéma de la signalisation du TCR (van Panhuys et al 2016 adapté)(van Panhuys 2016)

Diagramme montrant les molécules de signalisation impliquées dans l'activation des lymphocytes T au cours de la stimulation du TCR

4.3 Le signal de costimulation

La reconnaissance du complexe CMH-peptide par le TCR induit la signalisation conduisant à l'activation des lymphocytes T. Cependant, ce sont les corécepteurs de costimulation et co-inhibition présents à la surface des lymphocytes T qui déterminent la fonction et l'état du lymphocyte T (Chen and Flies 2013).

4.3.1 Les molécules de costimulation de la famille des immunoglobulines

4.3.1.1 CD28/CTLA

La découverte de CD28 comme molécule de costimulation du TCR a confirmé l'existence du modèle à deux signaux d'activation optimale des lymphocytes T, celui délivré par le TCR et celui de costimulation (Norton et al. 1992; Jenkins et al. 1991). CD28 et B7 constituent la famille des immunoglobulines les plus caractérisées (Greenwald, Freeman, and Sharpe 2005). En effet, plusieurs récepteurs cellulaires augmentent la signalisation via le TCR. L'interaction de CD28 et de son ligand a montré le rôle majeur de cette molécule comme récepteur de costimulation. Plusieurs études ont montré que CD28, favorise la prolifération des lymphocytes T, la sécrétion des cytokines, la survie cellulaire, et le métabolisme cellulaire (Acuto and Michel 2003). La liaison de CD28 exprimée de façon constitutive sur les lymphocytes T CD4 et CD8 naïfs, à ces ligands CD80 ou CD86 induit l'activation de la voie PI3K. PI3K à son tour, active la voie Akt. Akt phosphoryle plusieurs protéines ayant un effet sur plusieurs processus cellulaires (Smith-Garvin, Koretzky, and Jordan 2009). L'activation de Akt permet la translocation de NF- κ B dans le noyau pour la transcription des gènes de survie dont Bcl-x1 et la sécrétion de l'IL-2 (Smith-Garvin, Koretzky, and Jordan 2009). Par ailleurs, les souris déficientes en CD28 ou traitées avec un anticorps bloquant empêche toute interaction avec son ligand Il en résulte une réduction de la réponse immune dans divers contextes pathologiques telles que les infections, les allogreffes et la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) (Shahinian et al. 1993). De plus, les travaux de Green ont montré que l'absence du signal de costimulation médiée par CD28 réduit la prolifération des lymphocytes T *in vitro* et *in vivo* (Green et al. 1994). Cependant, l'identification d'un récepteur co-inhibiteur CTLA-4 qui se lie aussi à CD80 et CD86 suggère que son induction sur les lymphocytes T après activation supprime la réponse des lymphocytes T (Rudd, Taylor, and Schneider 2009). Ainsi, en cas d'expression de CTLA-4, l'inhibiteur de CD28, l'expression de CD28 est réprimée par endocytose (Smith-Garvin, Koretzky, and Jordan 2009). Les travaux d'Egen et al. ont démontré que la localisation intracellulaire de CTLA-4 lui confère des propriétés de trafic qui favorisent l'inhibition de la réponse T (Egen and Allison 2002). En effet, il rapporte que l'accumulation de CTLA-

4 au niveau de la synapse immunologie est proportionnelle à la force du signal suggérant que les lymphocytes qui reçoivent un fort stimulus sont plus susceptibles à l'inhibition médiée par CTLA-4 (Egen and Allison 2002) Les molécules inhibitrices dont CTLA-4 modulent la réponse immune en limitant l'activation prolongée des lymphocytes T mais aussi en empêchant ou en limitant une réponse aberrante et auto réactive des lymphocytes (Chen and Flies 2013).

4.3.1.2 ICOS/ICOSL

Contrairement à CD28 qui s'exprime sur les lymphocytes T naïfs et activés, l'expression d'ICOS sur les lymphocytes T activés, n'induit pas la production d'IL-2. Elle induit la sécrétion de l'IL-10, essentielle à la différenciation des lymphocytes B (Hutloff et al. 1999). Harada et al. expliquent l'incapacité de sécrétion d'IL-2 par l'absence de motifs spécifiques dans sa région cytoplasmique capable de recruter la protéine Grb2 (Harada et al. 2003). L'absence d'ICOS sur les lymphocytes T inhibe la réponse immune avec des effets aussi sévères que ceux observés dans les modèles de CD28 KO. Ces observations suggèrent que les deux molécules fonctionnent suivant la même voie de signalisation (Coyle et al. 2000). En effet, comme CD28, la stimulation d'ICOS active la voie PI3K/Akt qui contribue aux mêmes effets observés après stimulation CD80/CD28 (Arimura et al. 2002).

4.3.1.3 PD1/PD1L

PD1 (Programmed-Death 1) est exprimé sur les lymphocytes T activés mais aussi sur les lymphocytes B suggérant son implication dans la régulation de la réponse immune. PD1 est capable de se lier à ses deux ligands PDL1 et PDL2 exprimés sur les cellules présentatrices d'antigènes mais également sur les cellules parenchymateuses (Dong et al. 1999). La liaison à son ligand inhibe la prolifération des lymphocytes T, la sécrétion de l'IL-2 et l'arrêt du cycle cellulaire (Carter et al. 2002). En utilisant des anticorps contre PD1, Bennett et Okazaki ont montré que PD1 est un régulateur négatif dans l'activation des lymphocytes T (Bennett et al. 2003; Okazaki et al. 2001). Ces observations ont été confirmées par Nishimura et Salama qui rapportent que les souris déficientes en PD1 montrent une splénomégalie et sont plus susceptibles aux maladies auto immunes

(Nishimura et al. 1998; Salama et al. 2003). La liaison de PD-1 à son ligand inhibe la voie Akt et le métabolisme du glucose médiée par l'activation CD3/CD28. En effet, PD1 inhibe la voie PI3k/Akt médiée par l'activation de CD3/CD28 (Parry et al. 2005).

4.3.2 Les molécules de costimulation de la famille des TNF

4.3.2.1 OX40/OX40L

A l'origine, OX40 a été identifié comme molécule exprimée sur les lymphocytes T activées du rat (Gramaglia et al. 1998). Elle a été ensuite caractérisée depuis chez la souris et l'homme où son expression est limitée au sous-groupe activé (Gramaglia et al. 1998; Sugamura, Ishii, and Weinberg 2004). OX40 est exprimée préférentiellement sur les lymphocytes T CD4 activés que les CD8 suggérant son important rôle sur les CD4 (Gramaglia et al. 1998; Taraban et al. 2002). Cependant, OX40 peut être induit sur les lymphocytes T CD8 après une stimulation antigénique forte (Kotani et al. 2001; Baum et al. 1994). Son ligand OX40L est exprimé sur les cellules présentatrices d'antigène notamment les lymphocytes B activées et la signalisation via OX40L induit la prolifération et la différenciation des lymphocytes B (Watts 2005). Les premières études utilisant OX40L ou un anticorps agoniste, ont montré que la signalisation OX40 est capable d'induire la prolifération des lymphocytes T CD4 (Gramaglia et al. 1998) même en absence de CD28 (Akiba et al. 1999). Plusieurs études ont montré le rôle important d'OX40 dans la réponse Th2 (Baum et al. 1994; Ohshima et al. 1998; Kim et al. 2003). Cependant, OX40 peut aussi contribuer à la mise en place d'une réponse Th1 (Humphreys et al. 2003). L'activation du TCR et le signal d'OX40 peuvent induire la sécrétion de l'IL-2, mais pas à l'échelle de celle produite par CD28 (Gramaglia, Jember, et al. 2000). La signalisation OX40 induit l'expression des molécules anti apoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bcl-2 et Bcl-xl lui conférant son rôle de survie cellulaire (Rogers et al. 2001; Song et al. 2004). Dans une étude récente, Yamaki et al ont montré que l'interaction OX40/OX40L est requise pour la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4 effecteurs (Yamaki et al. 2014). Cette prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4 particulièrement dans les ganglions dépend d'OX40 et d'IL-7 (Yamaki et al. 2014).

4.3.2.2 CD40/CD40L

CD40 a été initialement caractérisée sur les lymphocytes B. Ce récepteur est aussi exprimé sur les DC, les plaquettes, les monocytes, les macrophages aussi bien par les cellules non hématopoïétiques telles les myofibroblastes, les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales (Banchereau et al. 1995; van Kooten and Banchereau 1997). Le ligand de CD40 appelé CD154 ou CD40L est une protéine transmembranaire de poids moléculaire variable entre 32 et 39 kDa (van Kooten and Banchereau 2000). L'existence d'une forme soluble de la molécule a été rapportée, et possède les mêmes propriétés fonctionnelles que la forme transmembranaire (Graf et al. 1995; Mazzei et al. 1995). Dans certaines conditions, il est aussi exprimé sur les monocytes, les basophiles et les éosinophiles (Carbone et al. 1997). L'interaction CD40L/CD40 a des effets majeurs sur les DC, les lymphocytes B, les cellules endothéliales et plusieurs cellules du compartiment hématopoïétique et non hématopoïétique (Elgueta et al. 2009). La liaison de CD40L à la surface des DC favorise la sécrétion des cytokines, l'induction d'autres molécules de costimulation et la présentation antigénique (Quezada et al. 2004). En effet, la signalisation CD40 confère aux DC leur caractère mature, capable d'induire l'activation et la différenciation des lymphocytes T (Elgueta et al. 2009). De plus, la signalisation CD40 dans les lymphocytes B favorise la formation des centres germinatifs et la conversion isotypique des immunoglobulines. Elle permet l'hypermutation somatique et la formation des plasmocytes et des lymphocytes B mémoires (Danese, Sans, and Fiocchi 2004). Les travaux de Bishop et al., ont rapporté que la voie CD40 est essentielle à la survie de plusieurs types cellulaires tels que les lymphocytes B et les cellules endothéliales (Bishop et al. 2007). Une dérégulation de cette voie de signalisation est observée dans plusieurs types de maladies auto-immunes (Elgueta et al. 2009).

4.3.2.3 4-1BB

4-1BB a été identifié comme molécule exprimée sur les lymphocytes T activés (Kwon and Weissman 1989). Le récepteur 4-1BB et son ligand ont été bien caractérisés chez la souris et l'humain (Watts 2005). Des expériences *in vitro* ont montré que son expression est induite 48 h après activation des lymphocytes T et décroît au bout de 4 à 5 jours (Gramaglia,

Cooper, et al. 2000; Cannons et al. 2001). L'analyse de l'expression de 4-1BB *in vivo* a montré que son expression peut être précoce et transitoire que celle observée *in vitro* (Takahashi, Mittler, and Vella 1999). Son expression coïncide avec l'expression de CD69, le marqueur d'activation des lymphocytes T entre 12 et 13 jours après immunisation (Dawicki and Watts 2004). Futagawa montra que 4-1BB est exprimé sur les lymphocytes T CD4 et CD8 y compris les lymphocytes Th1 et Th2 (Futagawa et al. 2002). Cependant, les lymphocytes T CD8 l'expriment plus rapidement et de façon plus élevée que les lymphocytes T CD4 (Taraban et al. 2002; Wen, Bukczynski, and Watts 2002). Vinay et Watts ont permis de comprendre son rôle de récepteur de costimulation des lymphocytes T (Vinay and Kwon 1998; Watts and DeBenedette 1999). 4-1BB est exprimé de façon ubiquitaire sur les monocytes humains (Kienzle and von Kempis 2000), les cellules NK traitées aux cytokines (Wilcox, Tamada, et al. 2002), les éosinophiles activés (Heinisch et al. 2001) et les microglies (Reali et al. 2003). Son ligand, 4-1BBL est exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes activées telles que les macrophages, les lymphocytes B et les DC (Futagawa et al. 2002; Goodwin et al. 1993; Diehl et al. 2002). L'engagement du récepteur sur les DC induit la sécrétion d'IL-6 et d'IL-12 (Wilcox, Chapoval, et al. 2002; Futagawa et al. 2002), tandis que la stimulation avec un anticorps agoniste induit la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK (Wilcox, Tamada, et al. 2002).

4.3.2.4 Rôle du récepteur 4-1BB

L'analyse initiale de 4-1BB sur les lymphocytes T murins indique que 4-1BB favorise la prolifération des lymphocytes T (Futagawa et al. 2002). Des expériences *in vitro* ont montré que 4-1BBL active la prolifération des lymphocytes T CD4 et CD8 (Cannons et al. 2001; Gramaglia, Cooper, et al. 2000; Cooper, Bansal-Pakala, and Croft 2002). En effet, la stimulation 4-1BB prévient l'apoptose induite par l'activation des lymphocytes T (Hurtado, Kim, and Kwon 1997). L'injection *in vivo* d'un anticorps agoniste anti-4-1BB pendant le traitement de super antigènes chez la souris augmente la survie des lymphocytes T avec un meilleur effet sur les lymphocytes T CD8 (Takahashi, Mittler, and Vella 1999). Les travaux de Lee ont montré que l'effet sur la survie des lymphocytes T dépend de l'activation de la voie NF- κ B qui induit Bcl-x1 et Bfl, deux molécules de survie (Lee et al. 2002). Toutes ces données suggèrent que 4-1BB a un impact sur la division et la survie des

lymphocytes T CD4 et CD8 (Cannons et al. 2001; Cooper, Bansal-Pakala, and Croft 2002; Bukczynski, Wen, and Watts 2003). Le rôle du récepteur 4-1BB dans le maintien des lymphocytes T CD8 est plus amplement discuté dans la section 4.4.3.3 de cette thèse.

4.4 Signaux requis pour la différenciation et le maintien des lymphocytes T mémoires

4.4.1 Différenciation des lymphocytes

La réponse cellulaire T au cours d'une infection virale aiguë est caractérisée par 3 phases distinctes : l'expansion clonale, la contraction de la population T et la formation des cellules mémoires. Au cours de l'infection virale ou bactérienne, les CPA activent les cellules naïves qui prolifèrent, pour se différencier en cellules effectrices cytotoxiques qui vont entrer dans le sang et migrer vers les sites infectieux (Masson et al. 2008). Cette activation favorise la différenciation des cellules CD8 en lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) qui éliminent les cellules infectées. Cette élimination se fait par la production des molécules effectrices telles que le granzyme B, la perforine et la sécrétion des cytokines telles que l'IL-12 et l'interféron- γ (IFN- γ). Les lymphocytes T CD4 se différencient en lymphocytes T helper (Th1) qui secrètent aussi l'IFN- γ et l'IL-2 pour réguler la réponse antivirale nécessaire à l'élimination de l'agent infectieux. Ce pool de lymphocytes T CD8 et CD4 formé au cours de la réponse primaire a un phénotype effecteur particulier (cytotoxicité et production d'IFN- γ). Toutefois, cette population n'est pas uniforme et peut être subdivisée en différentes sous-populations. Cette hétérogénéité à l'intérieur des lymphocytes mémoires est basée sur le profil d'expression des récepteurs, des gènes et protéines de surface, des fonctions effectrices additionnelles, du profil migratoire, de leur capacité proliférative et leur survie à long terme (Marshall et al. 2011; Pepper et al. 2011; Roman et al. 2002). Quatre sous populations de lymphocytes se distinguent : les cellules centrales mémoires, (TCM), les lymphocytes effecteurs mémoires (TEM), les lymphocytes mémoires résident dans les tissus (TRM) et les lymphocytes mémoires souches. Cependant les facteurs extérieurs tels que l'inflammation, le signal du récepteur de la cellule T et les cytokines constituent des médiateurs importants dans la différenciation des lymphocytes T. En plus de l'hétérogénéité à l'intérieur des lymphocytes mémoires, s'ajoute

l'hétérogénéité du destin cellulaire dans les progénitures des lymphocytes activés. Pour les lymphocytes T CD4, cette diversité inclut différents effecteurs tels que les sous populations de lymphocytes T auxiliaires Th1, Th2, Th17 et Th9 associé aux lymphocytes folliculaires auxiliaires et les lymphocytes T régulateurs induits Treg (Chang, Wherry, and Goldrath 2014). Ces sous populations de lymphocytes servent pour des fonctions spécifiques et adaptées pour attaquer différents types de pathogènes (Zhu, Yamane, and Paul 2010) ou atténuer une activation excessive du système immunitaire.

Les lymphocytes T CD8 effecteurs montrent une hétérogénéité quant à leur capacité individuelle de production des cytokines telles que l'interféron- γ (IFN- γ) le TNF α , l'interleukine-2 (IL-2), les chimiokines β . La co-production de chimiokines et cytokines est en corrélation avec l'amélioration et la protection contre l'infection (Seder, Darrah, and Roederer 2008) et l'augmentation de l'immunité anti-tumorale (Yuan et al. 2008). De plus, cette hétérogénéité des lymphocytes T CD8 se traduit par leur capacité à synthétiser de nouvelles molécules telles que la perforine, le granzyme et une co expression de ces deux molécules (Makedonas et al. 2010). Le profil fonctionnel des lymphocytes T CD8 effecteurs et mémoires est complexe car celui-ci dépend du type de pathogène. Dans les modèles d'infection de *Listeria monocytogenes* et de *Vesicular stomatitis virus*, les études ont montré une différence dans le nombre et la fréquence des sous populations de lymphocytes T CD8 spécifiques d'un antigène exprimant la lectine like receptor G1 (KLRG1) et le récepteur à l'IL-7 (IL-7R α ou CD127). Dans cette étude, les auteurs attribuent cette différence à l'environnement inflammatoire généré par chaque infection (Obar et al. 2011). La diversité des molécules de surface exprimées servent d'indicateurs du destin et de l'état des lymphocytes dans la différenciation (Newell et al. 2012). En se basant sur ces molécules de surface, il est possible d'identifier les signaux qui vont programmer les lymphocytes T CD8 effecteurs à la survie pour se différencier en lymphocytes mémoires et ceux en phase terminale, programmés à l'apoptose. Les lymphocytes avec une forte expression du récepteur à l'IL-7 et une faible expression du KLRG1 (IL-7R α^{hi} KLRG1 $^{\text{Lo}}$) ont une grande capacité de survie après une infection aigüe contrairement aux lymphocytes IL-7R α^{lo} KLRG1 $^{\text{hi}}$. Le récepteur à l'IL-7 est un marqueur intermédiaire de différenciation des lymphocytes mémoires KLRG1 représente un marqueur de différenciation terminale des lymphocytes destinés à la mort (Kaech et al.

2003). Ces différents marqueurs de surface bien qu'utiles ne permettent pas de déterminer complètement le degré d'hétérogénéité des lymphocytes. Il apparaît nécessaire de regarder des phénotypes additionnels et fonctionnels dans les sous populations d'IL-7R α^{hi} et KLRG1 $^{\text{hi}}$ (Joshi et al. 2007). Plusieurs études suggèrent que les sous populations IL-7R α^{hi} ont une plasticité qui est absente dans les sous populations KLRG1 $^{\text{hi}}$. Ces précurseurs mémoires IL-7R α^{hi} ont la capacité à se différencier en lymphocytes T CD8 résident ou en lymphocytes épuisés (Angelosanto et al. 2012).

4.4.2 Régulation transcriptionnelle de la différenciation des lymphocytes

L'hétérogénéité phénotypique observée au pic de la réponse immune suggère l'expression d'autres molécules qui peuvent servir d'indicateurs du destin des cellules activées. Des études se sont consacrées à élucider les mécanismes moléculaires permettant le développement des lymphocytes T effecteurs et mémoires. Plusieurs facteurs de transcription régulant le développement des lymphocytes T ont été identifiés. La plupart de ces molécules fonctionnent en paire en formant les axes de contre régulation en produisant simultanément des effecteurs qui régulent le potentiel effecteur et mémoire des lymphocytes T (Kaech and Cui 2012).

T bet et Eomesodermin

T bet et eomesodermin (Eomes) sont deux facteurs de transcription qui jouent un rôle crucial dans la formation et la fonction des lymphocytes T CD8. Au début de la phase d'activation, T-bet et Eomes coopèrent pour activer les lymphocytes T cytotoxiques en induisant l'expression de l'IFN- γ , le granzyme B, la perforine et le CXCR3 (Joshi et al. 2007; Pipkin et al. 2010; Intlekofer et al. 2007). De plus, en absence de ces facteurs de transcription, les lymphocytes T CD8 perdent leurs propriétés cytotoxiques. Il s'accompagne d'une différenciation en lymphocytes T CD8 sécréteur de l'IL-17 causant un syndrome inflammatoire léthal au cours d'une infection LCMV (Intlekofer et al. 2008). L'expression de T-bet est induite par l'activation du TCR, amplifiée par l'IL-12 et la voie de signalisation mTOR (Takemoto et al. 2006; Joshi et al. 2007). T-bet et Eomes coopèrent pour leur expression réciproque. Ainsi, T-bet est fortement exprimé dans les cellules effectrices, mais décroît progressivement avec la formation des cellules mémoires (Joshi

et al. 2011). Dans les lymphocytes T CD8 mémoires, T bet et Eomes jouent un rôle synergique dans l'hémostase en induisant l'expression de l'IL-2R β (encore appelé CD122) qui permet la prolifération homéostatique médiée par l'IL-15 (Intlekofer et al. 2007; Banerjee et al. 2010). L'absence de T bet dans les lymphocytes T CD8 s'accompagne de leur incapacité à se différencier en lymphocytes effecteurs IL-7R^{lo} et KLRG1^{hi} tandis que sa surexpression est suffisante pour induire la formation de ces cellules (Joshi et al. 2007). De même, le facteur Eomes joue un rôle dans l'homéostasie des lymphocytes T CD8 mémoires. Son expression est augmentée au cours de la transition effecteur mémoire, probablement en réponse à la voie de signalisation Wnt et le facteur TCF1 (Joshi et al. 2011; Pipkin et al. 2010; Zhou et al. 2010). Les lymphocytes T effecteurs CD8 déficients pour le facteur Eomes génèrent efficacement les précurseurs mémoires IL-7R^{hi} et KLRG1^{lo}. Toutefois, ils sont incapables de former les lymphocytes mémoires avec une expression normale de CD122, CD62L, CXCR3, CXCR4 impliquée dans la signalisation médiée par l'IL-15. Ces données suggèrent que le phénotype, la fonction et la survie à long terme des lymphocytes T CD8 (mémoire et effecteur) dépendent du ratio T-bet/Eomes. Actuellement, aucune donnée ne permet de savoir comment ce ratio est régulé. Cependant, l'activité de FOXO1 et l'exposition aux cytokines pro inflammatoires telles que l'IL-2, l'IL-12 et les interférons de type I et d'autres facteurs (IL-4, IL-10, IL-21) sont impliqués (Wiesel et al. 2012; Rao et al. 2010; Rao et al. 2012).

Blimp1 et BCL6

B lymphocyte induced maturation protein 1 (Blimp1) encore appelé PRDM1 et BCL-6 sont une paire de facteurs de transcription antagonistes qui fonctionnent différemment dans le destin des lymphocytes B et T (Crotty, Johnston, and Schoenberger 2010). Blimp1 est un répresseur transcriptionnel fortement exprimé par les lymphocytes effecteurs T CD8 et induit par l'IL-2, l'IL-12 et l'IL-21 (Kalia et al. 2010; Pipkin et al. 2010). Après l'élimination du pathogène, son expression décroît avec la formation des lymphocytes mémoires et réduit à sa plus faible expression dans les lymphocytes mémoires centrales (Tcm) (Rutishauser et al. 2009). Dans les lymphocytes effecteurs, Blimp1 participe à la formation des lymphocytes effecteurs KLRG1^{hi} CD127^{lo}. Il augmente les fonctions cytotoxiques telles la production d'IFN- γ , de granzyme B et la migration au site de

l'inflammation (Rutishauser et al. 2009; Kallies et al. 2009). L'absence de Blimp1 induit la formation importante de précurseurs mémoires CD8 IL-7R^{hi} CD62L^{hi} après une infection LCMV (Rutishauser et al. 2009). BCL6 est l'antagoniste le mieux caractérisé de Blimp1, son expression est inversement corrélée avec celui de Blimp1 dans les lymphocytes effecteurs (Cui et al. 2011). Des études récentes ont montré que BCL6 est plus exprimé dans les précurseurs mémoires KLRG1^{lo} CD127^{hi} que dans les lymphocytes effecteurs KLRG1^{hi} CD127^{lo} au cours d'une infection virale LCMV (Cui et al. 2011). BCL6 est important dans la maturation et l'auto-renouvellement des lymphocytes mémoires (Ichii et al. 2002). Les lymphocytes T CD8 qui sur-expriment BCL-6 génèrent un plus grand nombre de lymphocytes mémoires notamment les lymphocytes T centrales mémoires (Ichii et al. 2004). BCL-6 fonctionne en s'associant à des corépresseurs tels que NCOR1 et NCOR2. De récentes données sur les lymphocytes T CD4 ont montré que BCL-6 et T-bet interagissent pour la répression de beaucoup de gènes cibles (Oestreich, Huang, and Weinmann 2011; Oestreich, Mohn, and Weinmann 2012). Ces données suggèrent que la concentration relative de BCL6, Blimp1 et d'autres co-facteurs régulent la décision effectrice versus mémoire (Oestreich, Huang, and Weinmann 2011).

ID2 et ID3

ID2 et ID3 sont deux autres paires de facteurs de transcription qui ont un rôle important dans le développement des lymphocytes T CD8 effecteurs et mémoires. Ils fonctionnent en inhibant la liaison de l'ADN aux facteurs de transcription de type E. Ces deux protéines sont exprimées dans les lymphocytes effecteurs, mais leur activité varie dans le temps. ID2 permet la transition des lymphocytes naïfs aux lymphocytes effecteurs et leur survie alors qu'ID3 est requis pour la transition des lymphocytes effecteurs en lymphocytes mémoires (Cannarile et al. 2006; Yang et al. 2011). De plus, ID2 est important pour la formation de lymphocytes effecteurs KLRG1^{hi} CD127^{lo} alors qu'ID3 permet la génération des lymphocytes mémoires KLRG1^{lo} CD127^{hi} (Yang et al. 2011). Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de ID3 permet de distinguer les lymphocytes T CD8 ayant acquis la signature génétique des précurseurs mémoires (Yang et al. 2011). ID3 est la cible de la répression transcriptionnelle médiée par Blimp1 (Ji et al. 2011). Le ratio ID2/ID3 est plus élevé dans les lymphocytes effecteurs T CD8 KLRG1^{hi} CD127^{lo} que les précurseurs

mémoires KLRG1^{lo} CD127^{hi} (Ji et al. 2011; Yang et al. 2011). Ces deux protéines fonctionnent pour moduler la différenciation et la survie des cellules CD8.

Les voies de signalisation JAK-STAT

Il y a sept membres de la famille des STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6) chez les mammifères connus principalement pour leurs fonctions de facteurs de transcription (O'Shea and Plenge 2012) (Gough et al. 2009). Elles sont connues pour la différenciation, la survie et l'homéostasie des lymphocytes T CD8 mémoires. Plusieurs mécanismes sont proposés pour la modulation de l'activité des STAT dans différents types cellulaires. Ainsi, le niveau de STAT1 décroît dans les lymphocytes effecteurs T CD8 en prolifération au cours de l'infection virale (Gil et al. 2006). Les interférons de type I sont connus pour activer les voies STAT1 et STAT4 dans les lymphocytes effecteurs T CD8 suggérant que ces cytokines modulent ces deux voies au cours du temps (Gil et al. 2006). Dans un modèle d'infection de *Listeria monocytogenes*, une augmentation de l'activité de STAT4 résulte de la signalisation médiée par l'IL-12 et les interférons de type I pour augmenter l'expression de T-bet dans les lymphocytes effecteurs KLRG1^{hi} CD127^{lo} (Joshi et al. 2007). De récentes études ont montré le rôle important de STAT3 et son gène cible Socs3 dans le développement des lymphocytes mémoires T CD8. En absence de STAT3, les lymphocytes T CD8 après une infection LCMV ne sont pas capables de se différencier en lymphocytes mémoires. Le facteur de transcription STAT3 est requis pour induire l'expression Socs3, BCL6, Eomes, CD127 et CD62L durant la transition de lymphocyte effecteur en mémoire des cellules CD8 (Cui et al. 2011).

Collectivement, ces données renforcent le modèle récent que la programmation transcriptionnelle qui contrôle la différenciation des lymphocytes effecteurs T CD8 en lymphocytes mémoires est basée sur la gradation et une compétition de ces facteurs de transcription. Au cours d'une infection, l'expression ou l'activité des facteurs T bet, Blimp1, ID2 et STAT4 augmente et atteint un seuil, ainsi les lymphocytes T CD8 acquièrent un phénotype de différenciation terminale associé à la réduction de leur capacité proliférative et de survie (Kaech and Cui 2012). Ces facteurs vont interagir avec les régulateurs de transcription opposés tels qu'Eomes, BCL-6, ID3, TCF1 et STAT3 pour

empêcher la différenciation terminale en maintenant les propriétés des lymphocytes mémoires. Ces propriétés constituent leur survie à long terme, leur potentiel prolifératif, leur plasticité et leur capacité d'auto-renouvellement

4.4.3 Homéostasie de lymphocytes T mémoires

Le renouvellement constant des lymphocytes T CD8 requiert trois types de signal, le signal du TCR, le signal de costimulation et les signaux délivrés par les cytokines

4.4.3.1 Rôles des signaux des récepteurs de lymphocytes T

Les lymphocytes T reçoivent au cours de leur développement dans le thymus les mêmes signaux de survie. La survie des lymphocytes T naïfs requiert leur contact continu avec le complexe peptide- molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), CMH classe II pour les lymphocytes T CD4 et classe I pour les lymphocytes T CD8 (Takeda et al. 1996; Labrecque et al. 2001; Polic et al. 2001; Martin et al. 2006; Takada and Jameson 2009). Ce signal du TCR induit par le contact peptide-CMH, spécifique d'un peptide du soi, crée une compétition entre les lymphocytes T naïfs spécifiques d'un peptide du soi et ceux qui sont spécifiques de l'autre peptide (Hataye et al. 2006). Ce signal impliquant les antigènes du soi et les molécules du CMH n'induit pas la prolifération des lymphocytes T naïfs. Il va en synergie avec l'IL-7, fournir un faible signal qui maintient la survie des lymphocytes (Takada and Jameson 2009; Boyman et al. 2009). Le contact avec ces facteurs de survie a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions où les CPA et les cellules stromales sont une source de molécules de CMH et de l'IL-7 (Boyman et al. 2009; Brocker 1997; Link et al. 2007; Jung et al. 2010). Ainsi, avec ce modèle, le nombre des lymphocytes T naïfs est réduit dans ces organes en cas de diminution des molécules de localisation telles que CD62L, CCR7 et S1P1 (Carlson et al. 2006; Kerdiles et al. 2009; Ouyang et al. 2009).

Contrairement aux lymphocytes T naïfs, le contact TCR peptide-molécules du CMH n'est pas requis pour l'homéostasie des lymphocytes mémoires (Swain, Hu, and Huston 1999; Murali-Krishna et al. 1999; Leignadier et al. 2008; Surh et al. 2006). Cependant, dans certaines conditions, les lymphocytes T restent dépendant du complexe peptide/ molécule

CMH comme dans les modèles d'infection chronique et les réponses contre les antigènes du soi (Boyman et al. 2009; Shin et al. 2007). Les observations de modèle d'infection virale aiguë et chronique montrent un mécanisme distinct de maintien des lymphocytes mémoires T CD8 dépendamment du contexte physiopathologique. Ainsi, le maintien des lymphocytes T CD8 générés après une infection virale aiguë dépend de cytokines particulières pour leur survie et leur prolifération homéostatique. Toutefois, ceux générés au cours d'une infection virale chronique requiert le contact antigène/molécule de CMH pour leur homéostasie (Boyman et al. 2009; Surh et al. 2006; Shin et al. 2007).

Pour les lymphocytes T CD4, une controverse persiste au sujet de la nécessité du contact du peptide du soi/ molécule de CMH pour leur homéostasie. Dans une étude, il a été démontré que les souris exprimant seulement le CMH de classe II sur les cellules épithéliales du cortex thymique non dans les tissus périphériques contiennent un nombre comparable de lymphocytes T régulateurs. Cette étude suggère que l'homéostasie des lymphocytes T régulateurs ne requiert pas le contact peptide du soi/molécule CMH (Bensinger et al. 2001). Inversement, une étude plus récente démontre que l'absence de la signalisation TCR réduit la prolifération homéostatique des lymphocytes T régulateurs *in vivo* (Kim et al. 2009).

4.4.3.2 Rôle des cytokines partageant la chaîne γ commune

Le récepteur CD132 est la sous unité commune aux récepteurs des cytokines IL-2, IL-4, IL7, IL-9, IL-15 et IL21 qui joue un rôle important dans la génération la survie et l'homéostasie. La spécificité individuelle de chaque cytokine est déterminée par sa chaîne privée α (Rochman, Spolski, and Leonard 2009). De plus, l'IL-2 et l'IL-15 partagent la chaîne β du récepteur aux deux cytokines (CD122) impliquée dans la liaison aux cytokines et à la signalisation. La liaison à la cytokine et la signalisation induite par la chaîne β activent différentes voies de signalisation. Il s'agit de STAT 5A et 5B, Jak1 et Jak3, et en cas de signal de survie, la tendance des signaux de survie régulés par Bcl-2 prédominent sur ceux apoptotiques régulés par Bim (Rochman, Spolski, and Leonard 2009; Hildeman et al. 2007). L'IL-2 est produite principalement par les lymphocytes T CD4 activés ainsi que les autres types cellulaires comme les cellules NK, NKT et DC (Letourneau et al.

2009). L'IL-7 est produite en grande quantité par les cellules stromales dans les organes lymphoïdes primaire et secondaires (Tokoyoda et al. 2009; Fry and Mackall 2005; Jiang et al. 2005; Link et al. 2007). Les CPA secrètent l'IL-15, le transportent à leur surface en association avec le récepteur IL-15R α où il est présenté en trans aux lymphocytes T et cellules NK sensible à l'IL-15. L'IL-7 et l'IL-15 jouent un rôle important dans la survie homéostatique et la prolifération des lymphocytes T conventionnels alors que l'IL-2 est essentiel pour l'homéostasie des lymphocytes T régulateurs. L'IL-7 avec un fort signal du TCR contribue à la survie des lymphocytes T naïfs CD4 et TCD8 et aussi à la prolifération homéostatique des lymphocytes mémoires (Lenz et al. 2004; Schluns et al. 2000; Tan et al. 2001). L'homéostasie des lymphocytes T est gouvernée par les cytokines partageant la γ chaîne commune. Ainsi la survie et l'expansion homéostatique des lymphocytes T naïfs CD4 et CD8 est sous la gouverne de l'IL-7 et le complexe CMH-peptide du soi. La prolifération homéostatique de ces lymphocytes mémoires requiert les signaux de l'IL-7 et/ou l'IL-15. L'homéostasie des lymphocytes T CD4 mémoires est assurée par les signaux de l'IL-7 tandis que l'IL-15 assure l'homéostasie des lymphocytes T CD8 mémoires.

4.4.3.3 Rôle de 4-1BB dans le maintien des lymphocytes T CD8

La famille des récepteurs de TNF sont des médiateurs importants de survie du système immunitaire et jouent un rôle dans différentes étapes de la réponse immune (Locksley, Killeen, and Lenardo 2001; Croft 2003; Watts 2005). Les évidences du rôle des ligands de TNF dans le maintien des lymphocytes T CD8 proviennent des travaux de Bertram et Tan. En effet, les souris déficientes en 4-1BBL secrètent 2 à 3 fois moins d'IFN- γ et une réponse immune réduite après réinfection virale que les souris WT (Bertram, Lau, and Watts 2002; Tan et al. 2000). Par ailleurs, le transfert adoptif des lymphocytes T CD8 transgéniques ayant un phénotype central mémoire dans une souris WT ou 4-1BBL déficiente a montré 2 à 3 fois de défaut de prolifération des cellules mémoires transférées dans la rate et la moelle osseuse des souris 4-1BBL^{-/-} comparé aux souris WT (Pulle, Vidric, and Watts 2006). Toutefois, ce défaut de prolifération n'affecte pas le taux de division homéostatique des cellules mémoires qui est similaire dans les deux cas. Le rôle de 4-1BB dans le maintien des lymphocytes T CD8 mémoires est observé aussi bien dans les modèles où les lymphocytes mémoires sont majoritairement des effecteurs (Bertram, Lau, and Watts

2002) ou central mémoires (Pulle, Vidric, and Watts 2006). De plus, l'analyse des souris 4-1BBL déficientes âgées de 3 mois montre une diminution du nombre de lymphocytes T CD8 ayant un phénotype mémoire CD44^{hi} CD8 dans la rate et la moelle osseuse (Pulle, Vidric, and Watts 2006). Les lymphocytes T naïfs et activés n'expriment pas 4-1BBL (Futagawa et al. 2002). Ainsi, l'activation directe des lymphocytes T par la stimulation 4-1BB résulterait de l'interaction entre 4-1BB exprimé sur les lymphocytes T activés et 4-1BBL exprimé sur les CPA activées. Comment 4-1BBL contribue-t-il au maintien des lymphocytes T CD8 mémoire en absence d'antigène? La réponse à cette question vient des travaux de Pulle portant sur la culture des cellules de la rate ou de la moelle osseuse en présence d'IL-15 recombinante humaine. Cette cytokine induit 4-1BB et non OX40 sur la population de lymphocytes mémoire CD44^{hi} CD8 et non sur la population naïve CD44^{lo} CD8 (Pulle, Vidric, and Watts 2006). Les auteurs de cette étude ont montré que l'IL-7 est capable d'induire OX40 sur les lymphocytes T CD4 mémoires (Gaspal et al. 2005) mais pas 4-1BB sur les lymphocytes T CD8. Le modèle proposé est que l'IL-15 induit l'expression de 4-1BB qui se lie à son ligand pour favoriser la survie des lymphocytes T CD8 en absence de tout antigène (Pulle, Vidric, and Watts 2006). En effet, plusieurs études supportent ce modèle (Zhu et al. 2007; Mitchell, Ravkov, and Williams 2010; Sandau et al. 2010), les souris transgéniques qui sur-expriment 4-1BBL augmentent le nombre de lymphocytes T mémoire effecteurs. De façon similaire, le traitement des souris avec un anticorps anti-4-1BB induit la prolifération des lymphocytes T mémoires. Cependant les souris 4-1BBL déficientes montrent une réponse anti-virale CD8 défectueuse (Bertram, Lau, and Watts 2002; Tan et al. 1999). Les cellules qui expriment 4-1BBL pour le maintien des lymphocytes T CD8 ne sont pas connues, mais 4-1BB est exprimé *in vitro* sur les DC, les macrophages et les lymphocytes B (Futagawa et al. 2002). 4-1BBL est difficile à détecter *in vivo* parce que son expression est faible, transitoire ou réprimé par clivage des métalloprotéinases.

4.5 Rôle des protéines associées aux récepteurs de TNF dans la survie des lymphocytes T CD8 mémoires

Les récepteurs de survie de la famille des TNF jouent leur rôle de survie cellulaire en recrutant les protéines adaptatrices appelée TRAF (TNFR Associated Factor) (Sabbagh, Snell, and Watts 2007).

4.5.1 Les TRAFs

Les TRAFs sont des protéines identifiées à l'origine comme des adaptateurs de signalisation qui se lient au domaine cytoplasmique des récepteurs de TNF (Inoue et al. 2000; Wajant, Henkler, and Scheurich 2001; Ha, Han, and Choi 2009). A ce jour, six protéines de cette famille ont été décrites (TRAF1 à 6) chez les mammifères. Cependant, une nouvelle protéine appelée TRAF7 (Xu, Li, and Shu 2004) a été décrite mais demeure controversée due à l'absence du domaine TRAF qui les caractérise. Les TRAFs se caractérisent à leur extrémité C terminale par le TRAF domaine (TRAF-C) très conservé et une région TRAF-N super enroulée. L'extrémité N-terminale se caractérise par un domaine en doigt de zinc et un RING domaine nécessaire pour l'activation respective des protéines de stress et la voie NF- κ B alors que le RING domaine a une activité E3 ubiquitine ligase (Wajant, Henkler, and Scheurich 2001; Ha, Han, and Choi 2009; Arron, Walsh, and Choi 2002). (Figure 4)

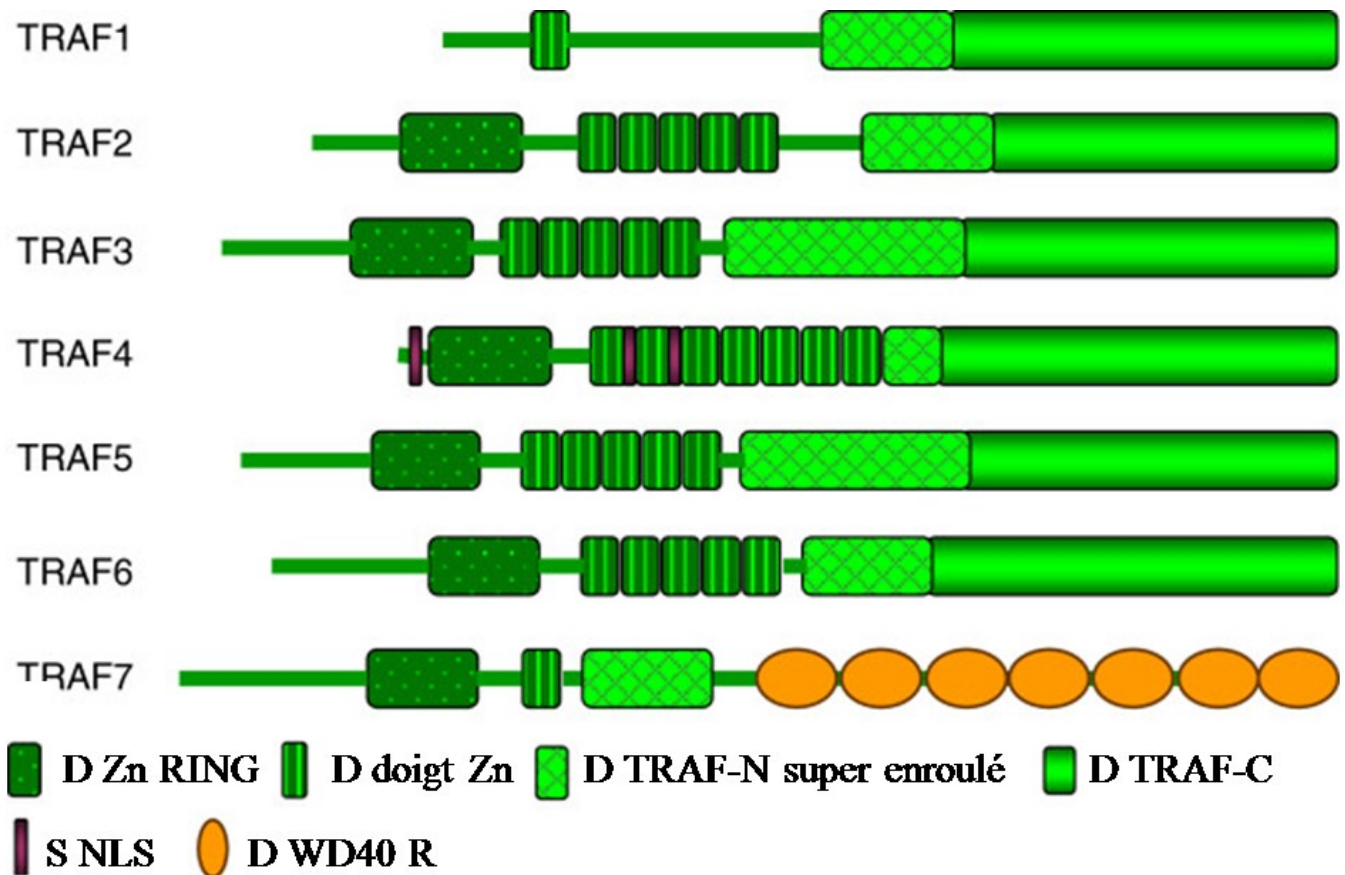


Figure 4: Structure des TRAFs montrant le symbole des différents domaines

(Xie et al 2013 adapté)

4.5.2 Rôle de TRAF1 dans la survie des lymphocytes T CD8 mémoires

Plusieurs récepteurs de TNF dont 4-1BB peut se lier à TRAF1. TRAF1 est unique parmi les TRAFs à ne pas avoir le RING domaine requis pour l'activation de NF- κ B, et son rôle précis dans la signalisation en aval des récepteurs de TNF est encore mal compris (Zapata et al. 2000; Zapata and Reed 2002)(Chung et al. 2002). TRAF1 a un profil d'expression réduite aux lymphocytes, DC et certaines cellules épithéliales (Zapata et al. 2000; Zapata and Reed 2002). Des travaux de Sabbagh ont montré que TRAF1 joue un rôle majeur dans la survie des lymphocytes T CD8 mémoires en absence d'antigène (Sabbagh et al. 2006). En effet, lorsqu'on met en compétition les lymphocytes T CD8 mémoires venant des souris transgéniques OT-I WT et TRAF1 KO dans une souris hôte en absence d'antigène, les

lymphocytes T CD8 WT montrent un taux de survie 7 à 8 fois meilleur que les cellules TRAF1 KO 3 semaines après transfert. La présence de TRAF1 dans les cellules WT réduit le niveau de la molécule apoptotique Bim après stimulation antigénique (Sabbagh et al. 2006). Toutefois, la culture des lymphocytes WT et TRAF1 KO en présence de l'IL-15 expriment un niveau similaire de Bim. Il est connu que Bim est induit en absence de cytokines (Dijkers et al. 2000) et cette étude a proposé un modèle de maintien des lymphocytes T CD8 mémoires. En effet, les récepteurs de TNF induits sur les lymphocytes T CD8 mémoires par l'exposition transitoire aux cytokines, recrute TRAF1. Ainsi, le recrutement de TRAF1 réduit l'expression de Bim et augmente la survie des lymphocytes T CD8 mémoires. L'absence de TRAF1 dans les lymphocytes a un défaut majeur sur la survie des lymphocytes T CD8, plus prononcé que l'absence de 4-1BBL dans l'hôte (Watts 2005; Pulle, Vidric, and Watts 2006; Sabbagh et al. 2006) suggérant que plusieurs membres de TRAF contribuent au maintien des lymphocytes T CD8 mémoires. Cette même équipe montra quelques années plus tard que TRAF1 joue ce rôle de survie en aval du récepteur 4-1BB durant l'expansion des lymphocytes T CD8 en réponse à une infection virale *in vivo* (Sabbagh et al. 2008). Cette étude a démontré que les cellules déficientes en TRAF1 sont incapables d'induire la molécule de survie de la famille des bcl-2 mais augmente l'expression de la molécule pro apoptotique Bim (Sabbagh et al. 2008)

III- La Neuropiline

La signalisation des molécules de costimulation est essentielle pour la communication cellulaire des lymphocytes et avec d'autres cellules. Durant le contact cellule-cellule, la reconnaissance a lieu grâce aux co-récepteurs présents à la surface des cellules qui induisent la signalisation conduisant à la transcription de plusieurs gènes (Chen 2004).

Nous nous sommes aussi intéressés au co récepteur neuropiline 1. La neuropiline 1, par son interaction avec les immunomodulateurs tels que VEGF et SEMA3A, est impliquée dans divers processus biologiques.

La neuropiline existe sous forme de deux protéines homologues identifiées dans les vertébrés; la neuropiline 1 (Nrp1) et la neuropiline 2 (Nrp2). La neuropiline 2 se présente sous forme de deux iso-formes issues de l'épissage alternatif du gène original, Nrp2A et Nrp2B. Ces deux protéines ont une homologie de séquence respective de 44 et 15 % avec la neuropiline1 (Chaudhary et al. 2014)

1. La neuropiline 1

La neuropiline 1 (Nrp1) est une glycoprotéine transmembranaire de poids moléculaire compris entre 120 et 140 kDa et impliquée dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques. Elle est aussi connue sous le nom de BDCA-4 ou CD304 et décrit dans le développement neuronal, le système cardiovasculaire, la guidance axonale, et l'angiogenèse (Mori et al. 2002; Chaudhary et al. 2014). Plusieurs études réalisées chez la souris révèlent que la neuropiline 1 est exprimée sur les cellules endothéliales, les DC, les lymphocytes T régulateurs plusieurs populations de lymphocytes T présents dans les ganglions, le sang périphérique et les cellules tumorales (Romeo, Lemarchandel, and Tordjman 2002; Uniewicz and Fernig 2008). Chez l'homme, la neuropiline 1 est exprimée sur les DC conventionnelles et plasmcytoïdes (pDC) (Tordjman et al. 2002; Romeo, Lemarchandel, and Tordjman 2002; Dzionek et al. 2000) et sur une sous population des lymphocytes T régulateurs (Battaglia et al. 2008). Cette protéine a suscité un grand intérêt ces dernières années pour son rôle dans le développement et la prolifération de différentes tumeurs (Prud'homme and Glinka 2012). En effet de récentes études ont rapporté que la forte expression de la neuropiline 1 dans le système vasculaire tumoral est associée à un mauvais tableau clinique (Prud'homme and Glinka 2012).

2. Structure de la neuropiline 1

Localisée sur le chromosome 10 chez l'homme (Rossignol, Gagnon, and Klagsbrun 2000) et le chromosome 8 chez la souris, la neuropiline 1 contient un petit domaine intracellulaire avec des motifs PDZ, un domaine transmembranaire et une grande région extracellulaire (Kumanogoh and Kikutani 2013). Ce domaine extracellulaire est subdivisé en trois régions : l'extrémité N-terminale contenant deux domaines CUB (complement binding

homology domain) a1/a2, deux domaines d'homologie aux facteurs de coagulations V/VII (b1/b2) et le domaine meprine encore appelé MAM. La dimérisation des domaines meprine et transmembranaire est essentielle pour son activité de co récepteur (Roth et al. 2008; Pellet-Many et al. 2008; Ruiz de Almodovar et al. 2009). Le domaine intracellulaire lie plusieurs protéines telles que la myosine, les protéines d'adhésion (FA) et les protéines contenant des motifs PDZ. Ces protéines PDZ sont importantes dans la formation des complexes pour maintenir l'intégrité de la structure transmembranaire de la neuropiline 1 (Lanahan et al. 2013). Cette région cytoplasmique est également importante pour son activité pro-angiogénique (Seerapu et al. 2013). Cependant des iso formes solubles de la neuropiline 1 (sNRP1) ont été décrites et ne contiennent pas de domaine transmembranaire et cytoplasmique. Toutefois, ces protéines solubles contiennent le domaine extracellulaire qui leur permet toute liaison aux ligands de la neuropiline1 (Schuch et al. 2002).

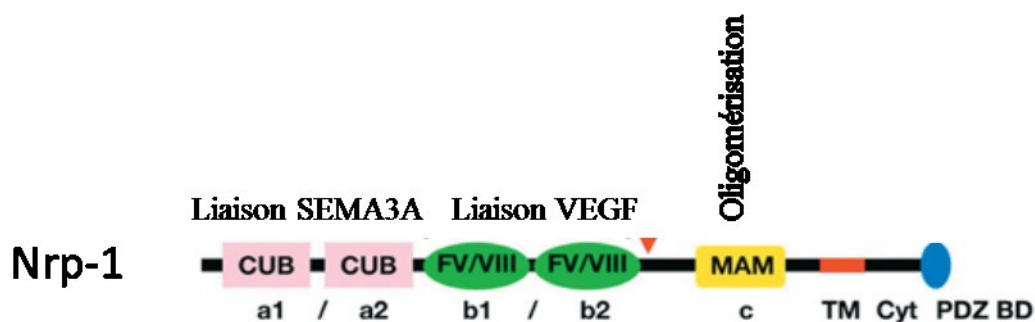


Figure 5: Structure de la neuropiline 1

Les symboles des différents domaines et les ligands qui interagissent avec ces domaines (Ruiz de Almodovar, C., et al. 2009 modifié)

3. Les Ligands de la neuropiline 1

La neuropiline 1 sert de co récepteur pour plusieurs ligands extracellulaires : les sémaphorines de classe III et IV (SEMA3A /SEMA4A)(Janssen et al. 2012), plusieurs facteurs de croissance dont le VEGF₁₆₅ (Djordjevic and Driscoll 2013; Soker et al. 2002). Elle sert aussi de co récepteur pour la forme active de TGFβ (Transforming growth Factor beta) et la forme inactive latente (LAP-TGFβ) (Glinka and Prud'homme 2008).

3.1 Sémaphorine de classe 3A et 4A

La famille des sémaphorines comprend un grand nombre de protéines phylogénétiquement conservées dont la structure se caractérise par la présence du domaine Sema dans la région extracellulaire (Kumanogoh and Kikutani 2013). Les sémaphorines ont été initialement identifiées comme des acteurs essentiels dans la guidance axonale, mais elles sont aussi impliquées dans l'apoptose, la migration cellulaire, la régression et la progression tumorale, l'angiogenèse et la dérégulation de la réponse immunitaire (Yazdani and Terman 2006). La courte queue cytoplasmique de la neuropiline 1 ne permet pas à la protéine la transduction du signal. Elle s'associe au plexin A pour former un co récepteur de haute affinité pour la sémaphorine 3A (Glinka et al. 2011). La neuropiline 1 se lie au plexin A par son domaine CUD pour former un complexe qui augmente l'activité de signalisation de SEMA3A (Janssen et al. 2012). Une étude a montré que l'interaction de SEMA3A avec le complexe Nrp1- Plexin A inhibe l'activation et la prolifération des lymphocytes T en perturbant la formation de la synapse immunologique avec les DC (Lepelletier et al. 2006). Une autre étude très récente a rapporté que l'interaction de SEMA4A avec la neuropiline 1 est essentielle pour le maintien et la stabilité des lymphocytes T régulateurs (Delgoffe et al. 2013). Comme pour SEMA3A, SEMA4A se lie au domaine CUB de la neuropiline 1 mais avec une affinité moins forte que SEMA3A. La liaison de SEMA4A à la neuropiline 1 est essentielle pour le rôle immunosuppresseur des lymphocytes T régulateurs qui se caractérise par la production d'IL-10 et l'IL-35. Le complexe SEM4A-Nrp1 favorise la stabilité des lymphocytes T régulateurs par son action inhibitrice sur la signalisation Akt – mTOR. En effet, le complexe SEMA4A Nrp1 recrute la phosphatase PTEN à la synapse immunologique, et inhibe la phosphorylation d'Akt, empêchant la sortie du noyau du facteur de transcription FOXO. Il s'en suit une augmentation de la stabilité et de la fonctionnalité des lymphocytes T régulateurs (Delgoffe et al. 2013).

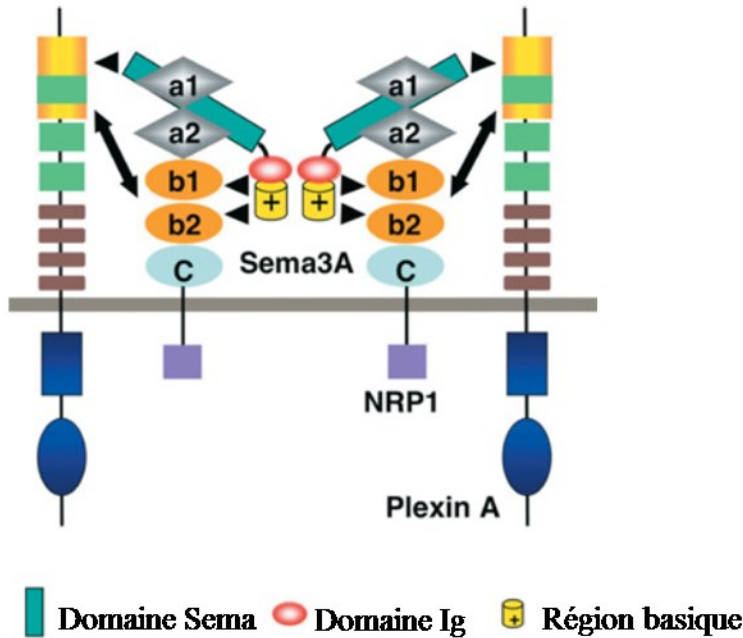


Figure 6: Modèle d'interaction entre SEMA3A et Nrp1

Les symboles montrent les domaines et les ligands qui se lient (PELLET-MANY C et al 2008 modifié)

3.2 Les VEGFs

Vascular endothelial growth factor (VEGF) a été initialement décrit comme un facteur mitogène des cellules endothéliales, avec sa capacité d'induire l'angiogenèse (Goel and Mercurio 2013). VEGF appartient à une grande famille des facteurs de croissance comprenant VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD et le facteur de croissance placentaire (PLGF) (Goel and Mercurio 2013). Ces protéines diffèrent selon leur profil d'expression, la spécificité de leur récepteur et leur fonction biologique (Koch and Claesson-Welsh 2012). VEGFA est la plus étudiée de cette famille avec plusieurs isoformes VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆ dont VEGF₁₆₅ est le plus connu. Ces différents isoformes issues d'un épissage alternatif diffèrent dans leur fonction et la spécificité de leur récepteurs (Koch and Claesson-Welsh 2012). Plusieurs études se sont consacrées au rôle du VEGF dans l'angiogenèse, la perméabilité vasculaire et ont démontré

les mécanismes qui sous-tendent le processus complexe de l'angiogenèse (Chung and Ferrara 2011). Cependant, le rôle de VEGF ne se limite à la perméabilité vasculaire et à l'angiogenèse (Senger 2010). Il a été démontré que VEGF affecte la fonction des cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement tumoral, ce qui a un impact sur la réponse de l'hôte (Hansen et al. 2012). L'injection de VEGF dans les souris adulte inhibe le développement des DC (Gabrilovich, Chen, et al. 1996), favorise la production des lymphocytes B et la génération des cellules myéloïdes immatures (Hattori et al. 2001). La neuropiline 1 est un co récepteur de haute affinité pour les isoformes de VEGFA en particulier VEGF₁₆₅ (Djordjevic and Driscoll 2013; Soker et al. 2002). Elle se lie à VEGFR2 par son domaine b1/b2 augmentant ainsi l'affinité de VEGF₁₆₅ au domaine extracellulaire de VEGFR2. VEGFR2 est une glycoprotéine transmembranaire possédant des domaines immunoglobulines extracellulaires et deux domaines intracellulaires ayant une activité kinase (Fuh, Garcia, and de Vos 2000). Le domaine de liaison PDZ de la neuropiline 1 est impliqué dans la formation du complexe Nrp1-VEGFR2 et la délétion de ce domaine intracellulaire réduit la formation de ce complexe (Prahst et al. 2008)

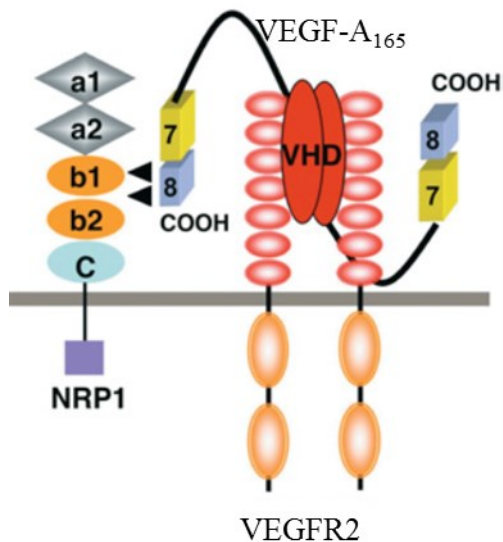


Figure 7: Modèle d'interaction entre VEGF et Nrp1 montrant les différents domaines (PELLET-MANY C et al 2008 modifié)

4. Fonction de la neuropiline 1

4.1 Fonction au cours du développement

L'analyse des modèles de souris génétiquement modifiée a permis de comprendre le rôle de la neuropiline 1 dans plusieurs systèmes au cours du développement. La délétion de la Nrp1 (Nrp1^{-/-}) chez la souris entraîne un phénotype embryonnaire létal avec divers défauts vasculaires tels que la diminution de la vascularisation neuronale, un réseau sanguin perturbé et les anomalies du système cardiovasculaire (Kawasaki et al. 1999). De même, une autre étude rapporte que la délétion de la Nrp1 chez la souris entraîne de graves anomalies du système nerveux central périphérique avec des défauts de connexions des fibres nerveuses (Kitsukawa et al. 1997). La surexpression de la Nrp1 dans les modèles de souris entraîne divers anomalies morphologiques telles que l'excès des capillaires et vaisseaux sanguins, la dilatation des vaisseaux et un défaut de formation des fibres nerveuses (Kitsukawa et al. 1995). Les travaux de Gu et al ont montré que l'absence totale de la Nrp1 dans les cellules endothéliales Nrp1^{endo-/-} entraîne une létalité embryonnaire due à des défauts cardiovasculaires. Par contre, les souris Nrp1^{sema-/-} incapable de se lier à SEMA3A mais qui peut lier VEGF, meurent après la naissance. Ces décès précoces dus à des défauts du système nerveux suggèrent que la signalisation Nrp1 SEMA3A n'est pas essentielle pour le développement vasculaire mais est requise pour le système nerveux central et périphérique (Gu et al. 2003).

4.2 Fonction au niveau cellulaire

Au cours du développement, l'expression de la Nrp1 sur les cellules endothéliales est importante pour la croissance des vaisseaux sanguins (Fantin et al. 2014). Par ailleurs, la co expression de la Nrp1 et du VEGFR2 à la surface des cellules endothéliales améliore la liaison de VEGF₁₆₅ au VEGFR2 pour favoriser leur chimiotactisme (Soker et al. 2002). En utilisant le système Cre LoxP pour déléter la Nrp1 dans les cellules endothéliales et non du cerveau postérieur, Fantin et al, ont démontré que la présence de la neuropiline 1 sur les cellules endothéliales est nécessaire pour l'angiogenèse normale malgré son expression abondante dans les cellules non endothéliales (Fantin et al. 2013). Des études sur la culture des tissus ont révélé que la Nrp1, indépendamment du VEGFR2 favorise la migration des cellules endothéliales et le remodelage de la matrice extracellulaire. En effet, la fusion du

domaine extracellulaire du récepteur EGF et du domaine transmembranaire de la Nrp1 induit la migration des cellules endothéliales (Plein, Fantin, and Ruhrberg 2014). La Nrp1 en réponse au VRGF₁₆₅, induit la migration des cellules endothéliales veineuses primaires par l'activation des protéines de la famille p130Cas (Evans et al. 2011). La Nrp1 est également impliquée dans le mécanisme d'évasion tumorale de la réponse immune médiée par les Tregs (Chaudhary et al. 2014). En effet, dans un modèle de mélanome murin, Hansen et al ont démontré que le VEGF dérivé des tumeurs attire les Tregs qui s'infiltrent dans la tumeur où il supprime la réponse anti tumorale en inhibant l'activation des lymphocytes T CD8 à l'intérieur de la tumeur (Hansen et al. 2012). A l'opposé de VEGF, Kigel et al., ont démontré la propriété anti tumorale de SEMA3A capable de bloquer la migration des cellules tumorales (Kigel et al. 2008)

4.3 La neuropiline 1 et le système immunitaire

4.3.1 La neuropiline 1 sur les cellules dendritiques

Les travaux de Tordjman ont décrit pour la première fois en 2002, l'expression de la Nrp1 sur les DC humaines différenciées *in vitro* à partir des monocytes (Tordjman et al. 2002). Cette étude a démontré que la neuropiline 1 exprimée sur les DC, est importante à l'initiation de la réponse immune primaire. En utilisant des anticorps bloquants de la Nrp1 pré incubés avec des DC ou les lymphocytes, l'étude montre l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T induite par les DC. Ces résultats suggèrent que l'interaction homotypique (Nrp1-Nrp1) est essentielle à l'initiation de la réponse immune (Tordjman et al. 2002). Une autre étude a rapporté que la Nrp1 exprimée sur les DC humaines peut être transférée sur les lymphocytes T par transcytose au cours de la première étape de la réponse immune (Bourbie-Vaudaine et al. 2006). Ce transfert de la neuropiline 1 a lieu indépendamment de l'activation des lymphocytes T mais dépend du niveau d'expression du récepteur sur les DC (Bourbie-Vaudaine et al. 2006). Dans le modèle murin, l'analyse de l'expression de la Nrp1 sur des DC immatures dérivées de la moelle osseuse est de 5% qui augmente à 45 % après une stimulation LPS (Corbel et al. 2007). Les DC sont connues pour leur rôle crucial dans la tolérance du soi par la présentation des antigènes du soi en induisant une absence de réponse ou une expansion de lymphocytes T régulateurs. Les

travaux de Sarris en 2008 montrent que l'interaction des DC immatures (iDC) incubées avec des lymphocytes T régulateurs est plus longue que si elles sont incubées avec les lymphocytes T conventionnels. Par des expériences de microscopie, il montra que la durée de l'interaction est supérieure à 400 secondes pour les lymphocytes T régulateurs soit deux fois plus longue que pour les lymphocytes T conventionnels (Mizui and Kikutani 2008; Sarris et al. 2008). Les auteurs concluent dans ces deux études que la neuropiline 1 contribue à la prolongation de cette interaction entre DC immatures et les lymphocytes T régulateurs (Sarris et al. 2008; Mizui and Kikutani 2008). En effet, lorsque les lymphocytes T conventionnels CD4⁺CD25⁻ sont transduits avec un vecteur rétroviral exprimant la Nrp1 et mis en coculture avec les DC immatures, on observe une durée d'interaction comparable à celle observée avec les lymphocytes T régulateurs (Sarris et al. 2008). Aussi, la Nrp1 semble jouer un rôle dans la migration des DC. En effet, Takamatsu et al ont montré que le complexe Nrp1/ PlexinA/ SEMA3A est indispensable à la migration des DC. Les auteurs démontrent une altération de l'activation des lymphocytes T *in vivo* après stimulation des DC Plexin A1^{-/-} due à un défaut de migration des DC (Takamatsu et al. 2010). Dans cette étude, le transfert des DC PlexinA^{-/-}-chargées avec le peptide OVA injectées dans le coussinet plantaire de la patte de souris induisait une faible réponse dans les ganglions poplitaire comparée au DC WT. Cette réponse faible résulte d'un défaut de migration des DC PlexinA^{-/-} dans les ganglions (Takamatsu et al. 2010). De plus, il a été rapporté que certains virus dont le HTLV1 se sert de la Nrp1 présente sur les DC, comme récepteur pour infecter les lymphocytes T CD4 mais le mécanisme demeure encore mal compris (Ghez et al. 2010).

4.3.2 La neuropiline 1 et les lymphocytes T

Les travaux de Tordjman ont mis en évidence l'expression de la neuropiline 1 sur les lymphocytes T CD4 (Tordjman et al. 2002). Dans la même année, Dzionek rapporte que la Nrp1 est exprimée sur une population de lymphocytes T mémoires dans les amygdales (Dzionek et al. 2002). Le mécanisme par lequel la neuropiline 1 est exprimée sur les lymphocytes est encore mal compris. Des études ont rapporté que l'inflammation du microenvironnement au cours de l'activation pourrait induire la nrp1 sur les lymphocytes T CD4 (Weiss et al. 2012; Yadav et al. 2012). Un des mécanismes proposé pour expliquer

l'induction de la Nrp1 sur les lymphocytes T CD4 est le phénomène de transcytose au cours duquel Nrp1 est transférée des DC sur les lymphocytes T CD4 (Bourbie-Vaudaine et al. 2006). Par ailleurs Milpied et al ont rapporté que la neuropiline 1 peut être induite sur les lymphocytes T CD4 *in vitro* après stimulation CD3/CD28 (Milpied et al. 2009). Ces auteurs ont caractérisé cette population de CD4 exprimant Nrp1 (TCR β^+ CD1d tet $^+$) de lymphocyte iNKT qui se retrouve dans la rate, le foie, le thymus et les ganglions lymphatiques (Milpied et al. 2009). Une autre étude rapporte que l'absence de la Nrp1 sur les lymphocytes T CD4 augmente la gravité de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale chez la souris (Solomon et al. 2011). En effet, l'analyse des lymphocytes T CD4 de souris Nrp1^{flox/flox} CD4^{cre} sur laquelle la Nrp1 a été délétée, montre que ces souris développent la forme sévère de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Solomon et al. 2011). Ces lymphocytes T CD4 se caractérisent par un phénotype Th17 avec l'induction du facteur de transcription ROR γ t (Solomon et al. 2011). Dans un autre modèle expérimental d'arthrite auto-immune, Catalano rapporte que l'interaction de Sema3A de la Nrp1 exprimée sur les lymphocytes T CD4, induit la sécrétion de l'IL-10 pour inhiber la prolifération des autres lymphocytes (Catalano 2010). En effet, l'auteur suggère dans son modèle que l'expression de la Nrp1 sur les lymphocytes T CD4 au cours de l'activation leur confère une propriété immuno-modulatrice (Catalano 2010)

4.3.3 La neuropiline 1 sur les lymphocytes T régulateurs

La neuropiline 1 a été identifiée comme un marqueur spécifique (Bruder et al. 2004; Corbel et al. 2007) qui est exprimée sur les lymphocytes T régulateurs murins et non sur les lymphocytes T conventionnels. Son expression corrélait avec l'expression du facteur de transcription FoxP3 au cours du développement, de l'étape des thymocytes naïfs aux lymphocytes T reg matures. Deux études récentes ont montré que la neuropiline 1 est un marqueur exclusif des Tregs du thymus et proposent que les Tregs du thymus ont un phénotype CD4⁺CD25^{hi}Nrp1^{hi}. En utilisant un modèle de souris TCR transgénique incapable de produire des Tregs, Yadav et al, ont générés des Tregs périphériques à partir des lymphocytes T conventionnels après une stimulation polyclonale CD3/CD28 plus

TGF β *in vitro* ou une stimulation antigène spécifique avec des DC. De même, des expériences de transfert adoptif de lymphocytes naïfs génèrent des Tregs en périphérie qui expriment faiblement la Nrp1 (Nrp1^{lo}) (Yadav et al. 2012). Ces observations ont été confirmées la même année par le groupe de Weiss qui montra que les Tregs générés après une administration orale d'antigène ont un phénotype Nrp1^{lo} (Weiss et al. 2012). Cette étude montra que dans un microenvironnement inflammatoire tel que l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, les Treg générés expriment la Nrp1 (Weiss et al. 2012) contrairement aux observations d'activation homéostatique *in vitro* et *in vivo* où il n'y a pas d'expression de Nrp1 sur les Treg en périphérie (Weiss et al. 2012; Yadav et al. 2012). Ces deux études suggèrent que le microenvironnement est responsable de l'induction de l'expression de la Nrp1 sur les Tregs en périphérie. La neuropiline 1 serait donc considérée comme un marqueur pour différencier les lymphocytes T régulateurs naturels du thymus des Tregs induits en périphérie. Par ailleurs, la Nrp1 peut servir de récepteur à la forme latente du TGF β (LAPTGF β) (Glinka and Prud'homme 2008), ce qui libère la forme active pour contribuer la propriété immunosuppressive des lymphocytes T régulateurs. Peu de données sont disponibles chez l'humain, cependant, des études sur l'expression de la Nrp1 sur les Tregs humains montrent un profil différent entre l'humain et la souris. Une différence d'expression de la Nrp1 est observée sur les Tregs humains par rapport aux Tregs murins où les études rapportent que la majorité des Tregs murins expriment Nrp1. Cette étude rapporte que les Tregs humains n'expriment pas la Nrp1 mais une petite population de CD4 Nrp1⁺ FoxP3(-) est détectée dans les organes lymphoïdes secondaires (Milpied et al. 2009).

4.3.4 La neuropiline 1 et le thymus

L'étude de la neuropiline 1 au cours du développement des lymphocytes T dans le thymus humain montre que la Nrp1 est exprimée sur les thymocytes (Lepelletier et al. 2007). Elle est également exprimée par les cellules épithéliales thymiques (TEC) et son expression est augmentée après stimulation du TCR des thymocytes de même que l'expression de SEMA3A. L'induction de SEMA3A va inhiber l'adhésion des thymocytes Nrp1⁺ au TEC favorisant ainsi leur migration par un mécanisme de répulsion. Cette interaction Nrp1-SEMA3A va favoriser le développement des thymocytes humains (Lepelletier et al. 2007).

Chez la souris, Corbel et al., ont rapporté que la Nrp1 est exprimée au douzième jour de gestation alors que chez l'adulte, elle est exprimée principalement par les thymocytes CD4-CD8-, CD4+CD8+ mais à peine détectable sur les thymocytes simples positifs CD4+ et CD8+ (Corbel et al. 2007). Toutefois, l'absence de la Nrp1 n'a pas d'effet sur le développement thymique et la maturation des lymphocytes T (Corbel et al. 2007).

Les récepteurs de co stimulation et de co inhibition jouent un rôle majeur dans la biologie des lymphocytes et des DC. Ils déterminent la fonctionnalité du signal du TCR. Plus particulièrement, ces récepteurs de par leur diversité d'expression, de structure et de fonction induisent des phénomènes biologiques tels que la survie, la différenciation, ou la maturation qui dans la plupart du temps sont dépendants du contexte physiologique.

Problématiques :

Au cours de mon doctorat, je me suis intéressé aux rôles de deux co-récepteurs impliqués dans le maintien des cellules T mémoires et la maturation des DC qui m'ont permis de répondre à deux questions par la rédaction de deux articles.

Question 1 : Quel est le rôle de 4-1BB dans la survie des lymphocytes T CD8?

Comme je l'ai mentionné dans mon introduction, la survie, la différenciation et la fonction des lymphocytes T CD8 requièrent trois types de signaux, le signal du TCR, le signal de costimulation et le signal délivré par les cytokines. En effet, un des récepteurs de TNF qui joue un rôle dans la survie des lymphocytes T CD8 est le récepteur de costimulation 4-1BB. Un des modèles proposés pour expliquer le rôle de 4-1BB dans la survie des lymphocytes T CD8 en absence d'antigène est le suivant; l'IL-15 induirait le récepteur 4-1BB sur les lymphocytes T qui se lie à son ligand pour favoriser la survie de cellules CD8 mémoires (Pulle, Vidric, and Watts 2006). Une autre étude montra que 4-1BB joue son rôle de survie dans des lymphocytes T CD8 en recrutant la protéine adaptatrice associée au TNF, TRAF1 (Sabbagh et al. 2006) qui conduit à une régulation négative de l'expression de la molécule pro-apoptotique Bim médiée par la kinase Erk (Sabbagh et al. 2008). Par ailleurs, la surexpression de TRAF1 dans de nombreuses tumeurs d'origine de cellules B suggère que TRAF1 jouerait un rôle dans la survie cellulaire. Il est également connu que la protéine TRAF1 est phosphorylée (Kato et al. 2008), cependant, l'importance de cet événement post-traductionnel dans les cellules T n'est pas connue.

La phosphorylation et l'ubiquitination représentent deux modifications post-traductionnelles importantes qui jouent un rôle majeur dans l'initiation de la signalisation du TCR au cours des réponses immunitaires. Plus important encore, elles sont essentielles à l'activation et la régulation de la voie NF- κ B. Il est bien établi que la phosphorylation régule différents facteurs conduisant à l'activation de la cascade NF- κ B et la régulation des réponses immunitaires (Hayden, West, and Ghosh 2006). En outre, l'ubiquitination est nécessaire pour l'activation de NF- κ B ainsi que la cascade de la MAP Kinase. La

coopération entre ces deux événements post-traductionnels a été documentée en aval des TNFRs impliquant différents TRAFs (Li, Wang, and Dorf 2009). Une étude récente de Kato Jr *et al*, a montré que PKN1 serait capable de phosphoryler TRAF1 murin sur la sérine 139. La conséquence de cette modification serait que les activités IKK et JNK en aval de TNFR2 sont inhibées (Kato et al. 2008). Il reste à déterminer si, en vertu des niveaux d'expression physiologique de ces molécules, cette modification post-traductionnelle serait nécessaire pour le maintien des cellules T mémoires CD8 en aval du récepteur 4-1BB.

Des expériences nous ont permis de démontrer l'importance des différents sites de phosphorylation de TRAF1 en aval du 4-1BB dans les lymphocytes T CD8 mémoires. Les résultats de cette étude ont été publiés dans un article scientifique dans le journal *Biochemical and Biophysical Research Communication* (2013)

Question 2 : Quel est le rôle d'un autre corécepteur, la neuropiline 1 dans la maturation des DC dérivées de la moelle osseuse ?

En effet, le rôle de la neuropiline 1 a été étudié de façon intensive dans la biologie des lymphocytes T régulateurs. Cependant, le groupe d'Hermine a rapporté que la neuropiline 1 était essentielle à l'initiation de la réponse immune (Tordjman et al. 2002). Elle montra que l'expression de la neuropiline 1 sur les DC et les lymphocytes T régulateurs résulte en une longue interaction entre ces deux cellules (Tordjman et al. 2002), suggérant que cette interaction est médiée par la liaison homotypique des molécules de neuropiline 1 exprimées par les 2 types cellulaires. Comme peu de choses sont connues du rôle de ce corécepteur dans la biologie des cellules, nous avons étudié premièrement le rôle de la neuropiline 1 dans la biologie des lymphocytes T conventionnels. Nos premiers résultats ont montré que les lymphocytes T CD8 et TCD4 naïfs ou activés n'expriment pas la neuropiline 1. Cependant, nos résultats ont montré que plusieurs sous types cellulaires de la lignée myéloïde expriment cette molécule. Puisque plusieurs ligands de la neuropiline 1 sont aussi des immunomodulateurs (SEM3A, VEGF), nous avons entrepris d'examiner le rôle de la Nrp1 dans la biologie des DC. Pour y arriver nous avons utilisé un modèle de souris Nrp1 Lyz Cre Lox dans lequel la recombinaison Cre est sur le promoteur du gène de lysozyme 2, ce qui permet la délétion de la neuropiline 1 dans la lignée myéloïde. La différenciation des cellules de la moelle osseuse de souris WT et Nrp1-Lyz en présence du GM-CSF et l'IL-4

a permis la génération des DC. Nous avons premièrement évalué le rôle de la neuropiline 1 dans la réponse immune primaire. Pour ce faire, les DC générés à partir des cellules souris C57BL/6 et Nrp-1 lyz Cre ont été évalués pour l'expression des marqueurs de costimulation CD40, CD86, I-Ab après une stimulation avec le LPS. Pour analyser de la réponse primaire, les DC chargés le peptide OVA ont servi pour vacciner les souris et la réponse endogène spécifique a été évaluée au bout de 7 jours. L'analyse des résultats montre qu'il n'y a pas de différence dans l'initiation de la réponse primaire chez les deux groupes de souris après vaccination. De même, l'analyse de la persistance des lymphocytes T CD8 mémoires après 45 jours ne révèle aucune différence. Par la suite, nous avons entrepris d'évaluer le rôle de la neuropiline 1 et de son ligand VEGF dans la biologie des DC. Ainsi, les DC ainsi générées ont été évaluées pour l'expression de la neuropiline 1 et stimulées avec le LPS en présence ou non du VEGF pour évaluer leur potentiel de maturation. L'évaluation de la maturation des DC en présence du VEGF ont montré que VEGF inhibe la maturation des DC de façon neuropiline 1 dépendante. Par ailleurs, nous avons démontré que VEGF inhibe la maturation des DC par l'inhibition de la voie de signalisation TLR4. Les résultats de cette étude sont compris dans un manuscrit qui a été soumis à la revue *Journal of Immunology*

Les résultats de l'article 1

TRAF1 phosphorylation on Serine 139 modulates NF- κ B activity downstream of 4-1BB in T cells

N.A. Eustache Oussa,^{*,†} Youssouf Soumounou,^{*} Laurent Sabbagh,^{*,†,1}

^{*}Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, 5415 l'Assomption boulevard, Montreal, QC, Canada H1T 2M4

[†]Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, QC, Canada H3C 3J7

¹ Corresponding author: Laurent Sabbagh, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, 5415 l'Assomption boulevard, Montreal, QC, Canada H1T 2M4. Tel.: 514-252-3400 x7726; Fax: 514-252-3569;

Abbreviations: TNFR, Tumour necrosis factor receptor; TCR, T cell receptor; MHC, Major Histocompatibility Complex; TRAF, TNFR-associated factor; TBK1, TANK-binding kinase 1; WT, wildtype; OVA, ovalbumin

Abstract

The Tumour Necrosis Factor (TNF) Receptor-associated factor-1 (TRAF1) adaptor protein is a key component in initiating intracellular signalling pathways downstream of TNF receptors (TNFR). More importantly, TRAF1 has a pattern of expression restricted primarily to lymphoid cells and plays an important role in lymphocyte survival. TRAF1 has been shown to be phosphorylated on Serine 139, consequently inhibiting NF- κ B activation downstream of TNFR2 when expressed in HeLa cells. We have previously demonstrated that TRAF1 cooperates with the TNFR family member 4-1BB to mediate signalling in T cells. However, the impact of TRAF1 phosphorylation on events downstream of 4-1BB in T cells remained to be defined. Using a proteomics approach we demonstrate that TANK-binding kinase 1 (TBK1) preferentially associates with the TRAF1 Serine 139 to Alanine (S139A) mutant. TBK1 is a kinase that functions upstream of NIK and IKK in the activation of the NF- κ B pathway. When TRAF1-deficient CD8 T cells were reconstituted with the TRAF1 S139A mutant, we observed more sustained levels of I κ B α degradation in response to 4-1BB stimulation in contrast to cells expressing either TRAF1 wild-type or TRAF1 S139D phospho-mimetic mutant. Together, these findings define the importance of the phosphorylation state of the TRAF1 Serine 139 residue in coordinating signalling events downstream of 4-1BB in primary T cells.

KEYWORDS: TRAF; TBK1; co-stimulation; signalling; NF- κ B; 4-1BB

Introduction

Tumour Necrosis Factor Receptor (TNFR) family members play a role in cell survival and cell death. Among these receptors, CD27, CD30, OX40, 4-1BB, HVEM and GITR are co-stimulatory molecules that mediate their effects on T cells (Watts 2005; Vinay and Kwon 2009). The signals provided by co-stimulatory molecules promote more sustained interactions of T cell receptors (TCR) with their cognate Major Histocompatibility Complex (MHC):peptide complexes, increase cell division, survival, and induce effector functions. TNFR signalling is dependent on the recruitment of TNFR-associated factor (TRAF) adaptor molecules to their cytoplasmic tails which triggers the activation of Erk, JNK, p38 and NF- κ B pathways leading to cell survival and secretion of cytokines (Dempsey et al. 2003; Croft 2009; Sabbagh et al. 2008; Sabbagh et al. 2006).

TRAF proteins have in common a conserved TRAF domain in the C-terminus responsible for association with TNFR cytoplasmic tails as well as for homotypic and heterotypic oligomerization. The N-terminal region of most TRAF proteins contain Zn fingers and a RING finger responsible for signalling through the stress activated protein kinase and NF- κ B signalling pathways, respectively, with the exception of TRAF1 (Rothe et al. 1994; Cao et al. 1996). Additionally, TRAF1 has the most restricted expression pattern among the TRAF family members, found almost exclusively in lymphocytes, dendritic cells and certain epithelia (Zapata and Reed 2002; Ha, Han, and Choi 2009; Zapata et al. 2000). TRAF1 cooperates with TRAF2 to activate the NF- κ B and JNK pathways downstream of the CD40 receptor in B cells (Xie et al. 2006) and dendritic cells (Arron et al. 2002). Additionally, TRAF1 expression was also shown to inhibit TNFR2-induced TRAF2 degradation, and enhance NF- κ B activation in response to TNFR2 (Wicovsky et al. 2009).

We have shown that TRAF1 is required downstream of 4-1BB to downmodulate the levels of the pro-apoptotic molecule Bim and enhance survival of CD8 T cells (Sabbagh et al. 2006; Sabbagh et al. 2008).

Interestingly, TRAF1 has been shown to be phosphorylated on Serine 139 by PKN1 (Serine 149 on human TRAF1) when overexpressed in HeLa cells, consequently attenuating IKK/NF- κ B and JNK activation downstream of TNFR2 (Kato et al. 2008). However, the impact of TRAF1 phosphorylation on the recruitment of intracellular mediators and the induction of signalling pathways in response to 4-1BB co-stimulation in T cells remains to be defined. Using a systems biology approach and a TRAF1 Serine 139 to Alanine (S139A) mutant, we identified TANK-binding kinase 1 (TBK1), an I κ B kinase (IKK)-activating kinase (Pomerantz and Baltimore 1999), to preferentially associate with the TRAF1 signalling complex in the absence of phosphorylation on Ser139. In addition, the absence of TRAF1 from T cells leads to a reduction in TBK1 recruitment to the 4-1BB signalling complex upon receptor triggering. More importantly, TRAF1-deficient T cells reconstituted with the TRAF1 S139A mutant showed the highest levels of sustained I κ B α degradation in contrast to cells reconstituted with the wild-type (WT) form of TRAF1 or a TRAF1 phospho-mimetic mutant (S139D). These findings highlight the importance of TRAF1 phosphorylation on Serine 139 in coordinating intracellular signalling events in response to 4-1BB stimulation in primary T cells.

Materials and methods

Mice. OT-I mice (Hogquist et al. 1994) were obtained from the Jackson Laboratories. OT-I TRAF1^{-/-} mice have been described (Sabbagh et al. 2006). OT-I transgene expression was assayed using anti-V α 2 and anti-V β 5.1 (eBiosciences, San Diego, CA, USA). Mice were maintained under SPF conditions in sterile microisolator caging. Mice studies were performed in accordance with the regulations of the Canadian Council on animal care.

Lymphocyte isolation and stimulation. Total splenocytes from OT-I WT and TRAF1^{-/-} mice were incubated with 0.1 μ g/ml of SIINFEKL peptide for 18 h, excess peptide was washed away and cells were rested for 24 h. At day 3 post activation, live CD8 T cells were isolated using Lympholyte-M density separation medium (Cedarlane, Burlington, ON, Canada). Purified CD8 OT-I cells were then stimulated with 10 μ g/ml agonistic anti-4-1BB antibody (clone 3H3) or control rat IgG antibody (Sigma, Oakville, ON, Canada). Naïve CD8 T cells from OT-I mice spleens were isolated by negative depletion using magnetic bead separation (Easy Sep, StemCell, Vancouver, BC, Canada), purity was >90%. OT-I cells (10⁶ cells/ml) were stimulated with 1 μ g/ml plate bound anti-CD3 ϵ (clone 145-2C11) for 24 h.

Retroviral transduction. Retroviral particles were produced in 293T cells (ATCC, Manassas, VA USA) co-transfected with 10 μ g of pMSCV-IRES-GFP vector (pMIG) expressing TRAF1 (WT, S139D and S139A) and 10 μ g pCL-Eco retrovirus packaging vector (Imgenex, San Diego, CA, USA) using Poly(ethyleneimine) solution (Sigma). Viral supernatant were collected 48 h post-transfection, and diluted with T cell media at a 1:1 ratio. OT-I cells were infected at 37°C at 2200 RPM in a tabletop centrifuge for 90 min at day 0 and 1 of activation. 48 h after infection GFP⁺ cells were FACS sorted and expanded

in 20 ng/ml recombinant human IL-15 (R&D Systems, Minneapolis, MN USA) for 8 to 14 days. For Jurkat E6.1 infection, 293T cells were co-transfected with 10 µg of a vector expressing the Vesicular Stomatitis Virus glycoprotein.

Flow cytometry. Cells were surface-stained with anti-CD8α-PerCP (BD Pharmingen, Mississauga, ON, Canada), biotinylated anti-4-1BB and streptavidin-APC (eBioscience). Samples were acquired and analyzed using a FACSCalibur (BD Biosciences, Mountain View, CA) and FlowJo software (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA), respectively. OT-I TRAF1^{-/-} cells transduced with retroviral constructs were sorted on a FACS Aria sorter (BD Biosciences).

Immunoprecipitation and Western blot analysis. After stimulation with anti-4-1BB or rat IgG control, cells were washed in cold PBS, lysed in Tris buffered saline containing 0.4mM EDTA, 1% NP40, and the complete protease inhibitors cocktail (Roche, Mississauga, ON, Canada), immunoprecipitated using protein G-sepharose beads (GE Healthcare Life Sciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) coupled to 1 µg anti-4-1BB or anti-TRAF1 antibodies and subjected to SDS-PAGE, and then transferred to PVDF membranes (Pall Life Sciences, Mississauga, ON, Canada). Membranes were probed with antibodies specific for TRAF1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), IκBα, TBK1 (Cell Signaling Technology, Whitby, ON, Canada), 4-1BB (Alexis Biochemical, Burlington, ON, Canada) or β-actin (Sigma) and incubated with the HRP-conjugated anti-rabbit or anti-rat Ig antibody (Sigma). Signals were revealed with the Amersham ECL detection system (GE Healthcare Life Sciences) and digital images were acquired using the FujiFilm LAS-4000. Densitometry was performed using the Multi Gauge software (Fujifilm, Tokyo, Japan).

Mass Spectrometry. Affinity-purified protein complexes were washed in 50 mM Tris pH 7.4 containing protease inhibitors. Proteins were eluted off protein G sepharose beads with 100 μ L of 50 mM H₃PO₄, pH 1.8 on ice for 10 min, acidity verified (pH 2) and stored at -80°C until tryptic digestion. Samples were processed using a solid-phase digest protocol, as previously described (Bisson et al. 2011). A QSTAR Elite QqTOF mass spectrometer equipped with a nanospray III ion source (AB Sciex, Concord, ON, Canada), and coupled to an Eksigent 1D+ Nano LC (Dublin, CA, USA) was used. Tandem mass spectra were extracted, charge state deconvoluted and deisotoped in Analyst version 2.0. All MS/MS samples were analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK). Mascot was set up to search the subset of all murine proteins extracted from the ENSEMBL database. Searches were performed with carbamidomethyl (C) set as a fixed modification and deamidated (NQ), pyro-Glu (N-term Q), pyro-Glu (N-term E), phospho Tyr, and phospho Ser/Thr set as variable modifications. Trypsin was selected for enzyme digestion with up to 2 missed cleavages. QqTOF type fragmentation was selected with peptide mass tolerance set to 80 ppm, and fragment mass tolerance set to 0.15 Da. Scaffold (Proteome Software Inc., Portland, OR, USA) was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications. Protein identifications were generally accepted if they could be established at greater than 95.0% probability and contained at least 1 identified peptide. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm.

Results

TBK1 associates with the TRAF1 complex in T cells. TRAF1 was shown to be phosphorylated on Serine 139 by PKN1 in the absence of activation, when overexpressed in HeLa cells (Kato et al. 2008). We sought to determine the impact of this posttranslational event on signalling in T cells. Murine WT TRAF1 and a Ser 139 to Ala (S139A) mutant, which cannot be phosphorylated at Ser 139, were introduced into the Jurkat E6.1 human leukemic cell line by retroviral transduction with a vector that co-expresses the GFP. Transduction of the retroviral constructs expressing either the WT or S139A mutant into Jurkat cells was confirmed by flow cytometry based on GFP expression (Fig. 1A) and Western blotting analysis (data not shown). Murine TRAF1 was then immunoprecipitated and the complex was subjected to gel-free liquid chromatography coupled tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using solid phase tryptic digestion. TANK and TBK1, two molecules involved in NF- κ B activation downstream of TNFRs family members (Chin et al. 1999; Pomerantz and Baltimore 1999; Cheng and Baltimore 1996), were identified to preferentially co-immunoprecipitate with the TRAF1 S139A mutant since we only observed TBK1 peptides from immunoprecipitates isolated from Jurkat cells expressing the TRAF1 S139A mutant (Fig. 1B). Of note, the amino acid sequences of human and murine TBK1 are 94% identical (Pomerantz and Baltimore 1999). Primary CD8 T cells were then isolated from resting TCR transgenic (OT-I) mice, and TRAF1 was immunoprecipitated. Western blotting analysis confirmed the presence of TBK1 and TRAF1 within the same complex (Fig. 1C). As a control, immunoprecipitation was also performed on OT-I TRAF1^{-/-} CD8 T cells.

Differential recruitment of TBK1 to TRAF1 phospho mutants. Due to the absence of a TRAF1 phospho-specific (Ser139) antibody, it is difficult to assess the phosphorylation state of TRAF1 in cells. Therefore, we also generated a Ser 139 to Asp mutant (S139D) as it was previously described that conversion of a Serine to Aspartate imitates phosphorylation (Leger et al. 1997). Jurkat cells were stably transduced with retroviral vectors expressing the TRAF1 WT, S139D and S139A mutants and the levels of expression of the recombinant proteins was verified by Western blot analysis (Fig. 2A). In addition, we assessed the levels of protein expression of TBK1, which was similar in Jurkat cells expressing the different forms of TRAF1. Subsequently, we immunoprecipitated murine TRAF1 and determined the levels of endogenous TBK1 association with the TRAF1 signalling complex in resting cells. Densitometry analysis revealed that TBK1 preferentially associates with the TRAF1 signalling complex when it is not phosphorylated on Ser 139 (S139A mutant) (Fig. 2B). In contrast, the TRAF1 phospho-mimetic mutant (S139D) showed the lowest levels of TBK1 association. Interestingly, murine WT TRAF1 immunoprecipitated from Jurkat cells showed a ratio of TBK1 to TRAF1 that was intermediate to both mutants, which would suggest that a pool of TRAF1 might be phosphorylated within a cell (Fig. 2B). These findings demonstrate that the level of TBK1 recruitment to the TRAF1 signalling complex is dependent on the phosphorylation state of TRAF1.

Reduced TBK1 recruitment to the 4-1BB receptor in the absence of TRAF1. 4-1BB is a TRAF1 binding receptor and its expression on the cell surface is induced upon activation through the TCR and co-stimulation (Dawicki and Watts 2004). Furthermore, we have previously demonstrated that 4-1BB and TRAF1 cooperate to induce downstream

signalling in T cells (Sabbagh et al. 2008). To investigate the impact of the association of TRAF1 and TBK1 downstream of 4-1BB signalling, we used a TCR transgenic model (OT-I) where the CD8 T cells have specificity to an ovalbumin (OVA) epitope (SIINFEKL) presented by the H-2K^b MHC class I molecule. OT-I WT or TRAF1^{-/-} splenocytes were activated with the OVA peptide and at 48 h the majority of CD8 T cells from OT-I WT or TRAF1^{-/-} cultures were found to express 4-1BB on the cell surface (Fig. 3A). Activated OT-I T cells were then stimulated with an agonistic anti-4-1BB antibody or a rat IgG control antibody for 20 min and the TRAF1 signalling complex was immunoprecipitated. As determined by Western blot analysis, the levels of TBK1 within the TRAF1 complex in OT-I WT cells are similar in the absence (rat IgG) or presence of 4-1BB stimulation (Fig. 3B). As a specificity control, immunoprecipitations were also performed on lysates from OT-I TRAF1^{-/-} cells.

Subsequently, we immunoprecipitated the 4-1BB signalling complex from OVA peptide activated OT-I cells in the absence (rat IgG) or presence of 4-1BB stimulation from OT-I WT and TRAF1^{-/-} cells and determined the levels of TBK1 within the 4-1BB complex. Western blot analysis revealed that stimulation through 4-1BB does not alter the levels of TBK1 associated with the 4-1BB signalling complex in OT-I WT cells (Fig. 3C). In addition, the levels of TBK1 associated with the 4-1BB complex were also similar in OT-I TRAF1^{-/-} cells prior to 4-1BB stimulation (rat IgG control). However, when OT-I TRAF1^{-/-} cells were stimulated with the 4-1BB agonistic antibody we observed 4-fold less TBK1 within the 4-1BB complex when compared to WT cells. These results demonstrate that TRAF1 plays a critical role in maintaining the proper ratio of signalling molecules recruited to 4-1BB in T cells upon receptor triggering.

Enhanced NF- κ B activation with the TRAF1 S139A mutant downstream of 4-1BB signalling. TRAF1 phosphorylation on Ser139 by PKN1, has been shown to silence the activity of NF- κ B signalling downstream of TNFR2 when overexpressed in HeLa cells (Kato et al. 2008). Additionally, TBK1 is an upstream initiator of the NF- κ B pathway downstream of TNFR signalling (Pomerantz and Baltimore 1999). We sought to determine the impact of TRAF1 phosphorylation on NF- κ B activation downstream of the 4-1BB receptor in CD8 T cells (OT-I). Initially, retroviral constructs expressing TRAF1 WT, S139D or S139A mutant were introduced into activated OT-I TRAF1^{-/-} cells. Protein expression levels of TRAF1 WT, S139D and S139A in reconstituted OT-I TRAF1^{-/-} cells were confirmed by Western blotting (Fig.4A). OT-I cells were then stimulated with anti-CD3 ϵ to induce 4-1BB cell surface expression, which was confirmed by flow cytometry (Fig. 4B). OT-I TRAF1^{-/-} cells were also transduced with the empty vector expressing only the GFP tag as a control. Cells were then stimulated with the 4-1BB agonistic antibody or rat IgG control and the degradation of the NF- κ B inhibitor, I κ B α , was determined by Western blot analysis (Fig. 4C). Crosslinking of 4-1BB on OT-I cells expressing the TRAF1 S139A mutant demonstrated the most sustained NF- κ B activation, based on the degradation of I κ B α , whereas OT-I TRAF1^{-/-} cells transduced with the empty vector showed the least sustained response. Interestingly, cells expressing the TRAF1 S139D mutant showed a small reduction in I κ B α levels following 4-1BB stimulation (Fig. 4C). Collectively, these findings demonstrate that the presence and phosphorylation state of TRAF1 has an impact on the association of TBK1 with the 4-1BB signalling complex and NF- κ B activation in T cells.

Discussion

Phosphorylation of TRAFs downstream of TNFRs has been previously described (Matsuzawa et al. 2008; Vallabhapurapu et al. 2008; Li, Wang, and Dorf 2009). Murine TRAF1 was shown to be phosphorylated on Serine 139 by the kinase PKN1, a member of the PKC superfamily, which silenced IKK/NF- κ B activity downstream of TNFR2 (Kato et al. 2008). In this study, we report that substitution of the TRAF1 Serine 139 with an Alanine, which eliminates phosphorylation on this residue, leads to enhanced recruitment of TBK1 to the TRAF1 signalling complex. In addition, the presence of TRAF1 was required in T cells to ensure efficient recruitment of TBK1 to the 4-1BB complex upon receptor engagement. TBK1 is required to form a ternary complex with TRAF2 and TANK to mediate its activity, and represents an alternative way for TRAF-mediated activation of NF- κ B downstream of TNFRs (Pomerantz and Baltimore 1999). However, our findings demonstrate that the presence of TRAF1 seems to be essential downstream of 4-1BB. Indeed, when OT-I TRAF1^{-/-} cells were stimulated with an agnostic 4-1BB antibody, we observed an important reduction in TBK1 levels within the 4-1BB receptor complex (Fig. 3C). Interestingly, we have previously shown that the absence of TRAF1 in OT-I cells leads to a reduction in the levels of TRAF2 following 4-1BB stimulation (Sabbagh et al. 2008). Similar observations have been reported by others regarding TRAF1-dependent stabilization of TRAF2 levels downstream of other TNFRs (Xie et al. 2006; Arron et al. 2002; Wicovsky et al. 2009). Thus, TRAF1 may regulate the levels of TBK1 within the 4-1BB receptor complex indirectly through the stabilisation of TRAF2 protein levels. However, the phosphorylation state of TRAF1 on Serine 139 is critical to maintain the proper ratio of signalling molecules downstream of 4-1BB in T cells.

TRAF1 was originally thought to be a negative regulator of TNF signalling, since TRAF1-deficient T cells were found to hyperproliferate in response to anti-CD3 stimulation (Tsitsikov et al. 2001). In addition, given that TRAF1 lacks a RING finger domain present in other TRAF family members to mediate NF- κ B activation, it resembled a dominant negative form of TRAF2. In contrast, our previous findings and other studies have demonstrated a positive regulatory role for TRAF1 in cells of the immune system (Sabbagh et al. 2008; Sabbagh et al. 2006; Arron et al. 2002; Speiser et al. 1997; Xie et al. 2006). The current study demonstrates that phosphorylation of TRAF1 modulates NF- κ B activity by coordinating the recruitment of signalling molecules to the 4-1BB receptor in primary T cells. More recently, TRAF1 was shown to restrict the alternative NF- κ B pathway but was required for the induction of the classical pathway in response to 4-1BB in T cells (McPherson et al. 2012). Phosphorylation of TRAF1 on Serine 139 could dictate which NF- κ B pathway is induced downstream of 4-1BB signalling. When OT-I TRAF1^{-/-} cells expressed the S139A TRAF1 mutant, we consistently observed fluctuations in I κ B α levels in the absence of 4-1BB stimulation (rat IgG control), in contrast to TRAF1-deficient cells or cells expressing WT TRAF1 (Fig. 4C). This demonstrates that the phosphorylation state of TRAF1 on Serine 139 may impact basal NF- κ B activity in T cells in the absence of TNFR triggering, similarly to what was described when TRAF1 S139A was overexpressed in resting HeLa cells (Kato et al. 2008). Furthermore, we consistently recovered significantly less OT-I cells expressing the TRAF1 S139D mutant in culture compared to TRAF1 WT or S139A expressing cells (data not shown), demonstrating the negative regulatory effects of TRAF1 phosphorylation on the maintenance of cells *in vitro*. However, it is clear that the absence of TRAF1 phosphorylation on Serine 139 is required

for sustained NF- κ B activation in response to 4-1BB signalling in T cells when compared with cells expressing the TRAF1 S139D phospho-mimetic mutant or cells lacking TRAF1.

Collectively, the present observations provide a novel insight into the impact of TRAF1 phosphorylation in fine tuning intracellular events by coordinating the recruitment of signalling mediators involved in NF- κ B activation following 4-1BB co-stimulation in T cells. We have previously demonstrated that TRAF1 was required for the maintenance of CD8 memory T cells *in vivo* and downstream of 4-1BB signalling (Sabbagh et al. 2008; Sabbagh et al. 2006). The importance of TRAF1 phosphorylation on the maintenance of immunological memory will be investigated in future studies.

Acknowledgements

This work was supported by the Maisonneuve-Rosemont Hospital (HMR) Foundation and a grant from the Leukemia and Lymphoma Society (LLS) of Canada (to L.S.). L.S. was a Special fellow of the LLS U.S.A., and N.A.E.O. is the recipient of a doctoral scholarship from the Cole Foundation and the Jeffrey Michael Cherbaka scholarship from the HMR Foundation.

References

- [1] T.H. Watts, TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses, *Annu Rev Immunol* 23 (2005) 23-68.
- [2] D.S. Vinay, B.S. Kwon, TNF superfamily: costimulation and clinical applications, *Cell Biol Int* 33 (2009) 453-465.
- [3] P.W. Dempsey, S.E. Doyle, J.Q. He, G. Cheng, The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily, *Cytokine Growth Factor Rev* 14 (2003) 193-209.
- [4] M. Croft, The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases, *Nat Rev Immunol* 9 (2009) 271-285.
- [5] L. Sabbagh, G. Pulle, Y. Liu, E.N. Tsitsikov, T.H. Watts, ERK-dependent Bim modulation downstream of the 4-1BB-TRAF1 signaling axis is a critical mediator of CD8 T cell survival in vivo, *J Immunol* 180 (2008) 8093-8101.
- [6] L. Sabbagh, C.C. Srokowski, G. Pulle, L.M. Snell, B.J. Sedgmen, Y. Liu, E.N. Tsitsikov, T.H. Watts, A critical role for TNF receptor-associated factor 1 and Bim down-regulation in CD8 memory T cell survival, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 18703-18708.
- [7] M. Rothe, S.C. Wong, W.J. Henzel, D.V. Goeddel, A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor, *Cell* 78 (1994) 681-692.
- [8] Z. Cao, J. Xiong, M. Takeuchi, T. Kurama, D.V. Goeddel, TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1, *Nature* 383 (1996) 443-446.
- [9] J.M. Zapata, J.C. Reed, TRAF1: lord without a RING, *Sci STKE* 2002 (2002) PE27.
- [10] H. Ha, D. Han, Y. Choi, TRAF-mediated TNFR-family signaling, *Curr Protoc Immunol* Chapter 11 (2009) Unit11 19D.
- [11] J.M. Zapata, M. Krajewska, S. Krajewski, S. Kitada, K. Welsh, et al., TNFR-associated factor family protein expression in normal tissues and lymphoid malignancies, *J Immunol* 165 (2000) 5084-5096.
- [12] P. Xie, B.S. Hostager, M.E. Munroe, C.R. Moore, G.A. Bishop, Cooperation between TNF receptor-associated factors 1 and 2 in CD40 signaling, *J Immunol* 176 (2006) 5388-5400.
- [13] J.R. Arron, Y. Pewzner-Jung, M.C. Walsh, T. Kobayashi, Y. Choi, Regulation of the subcellular localization of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)2 by TRAF1 reveals mechanisms of TRAF2 signaling, *J Exp Med* 196 (2002) 923-934.
- [14] A. Wicovsky, F. Henkler, S. Salzmann, P. Scheurich, C. Kneitz, H. Wajant, Tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 enhances proinflammatory TNF receptor-2 signaling and modifies TNFR1-TNFR2 cooperation, *Oncogene* 28 (2009) 1769-1781.
- [15] T. Kato, Jr., Y. Gotoh, A. Hoffmann, Y. Ono, Negative regulation of constitutive NF-kappaB and JNK signaling by PKN1-mediated phosphorylation of TRAF1, *Genes Cells* 13 (2008) 509-520.
- [16] J.L. Pomerantz, D. Baltimore, NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase, *Embo J* 18 (1999) 6694-6704.
- [17] K.A. Hogquist, S.C. Jameson, W.R. Heath, J.L. Howard, M.J. Bevan, F.R. Carbone, T cell receptor antagonist peptides induce positive selection, *Cell* 76 (1994) 17-27.

- [18] N. Bisson, D.A. James, G. Ivosev, S.A. Tate, R. Bonner, L. Taylor, T. Pawson, Selected reaction monitoring mass spectrometry reveals the dynamics of signaling through the GRB2 adaptor, *Nat Biotechnol* 29 (2011) 653-658.
- [19] A.I. Chin, J. Shu, C. Shan Shi, Z. Yao, J.H. Kehrl, G. Cheng, TANK potentiates tumor necrosis factor receptor-associated factor-mediated c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation through the germinal center kinase pathway, *Mol Cell Biol* 19 (1999) 6665-6672.
- [20] G. Cheng, D. Baltimore, TANK, a co-inducer with TRAF2 of TNF- and CD 40L-mediated NF-kappaB activation, *Genes Dev* 10 (1996) 963-973.
- [21] J. Leger, M. Kempf, G. Lee, R. Brandt, Conversion of serine to aspartate imitates phosphorylation-induced changes in the structure and function of microtubule-associated protein tau, *J Biol Chem* 272 (1997) 8441-8446.
- [22] W. Dawicki, T.H. Watts, Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo, *Eur J Immunol* 34 (2004) 743-751.
- [23] A. Matsuzawa, P.H. Tseng, S. Vallabhapurapu, J.L. Luo, et al., Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex, *Science* 321 (2008) 663-668.
- [24] S. Vallabhapurapu, A. Matsuzawa, W. Zhang, P.H. Tseng, et al., Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling, *Nat Immunol* 9 (2008) 1364-1370.
- [25] S. Li, L. Wang, M.E. Dorf, PKC phosphorylation of TRAF2 mediates IKKalpha/beta recruitment and K63-linked polyubiquitination, *Mol Cell* 33 (2009) 30-42.
- [26] E.N. Tsitsikov, D. Laouini, I.F. Dunn, T.Y. Sannikova, L. Davidson, F.W. Alt, R.S. Geha, TRAF1 is a negative regulator of TNF signaling. enhanced TNF signaling in TRAF1-deficient mice, *Immunity* 15 (2001) 647-657.
- [27] D.E. Speiser, S.Y. Lee, B. Wong, J. Arron, A. Santana, Y.Y. Kong, P.S. Ohashi, Y. Choi, A regulatory role for TRAF1 in antigen-induced apoptosis of T cells, *J Exp Med* 185 (1997) 1777-1783.
- [28] A.J. McPherson, L.M. Snell, T.W. Mak, T.H. Watts, Opposing roles for TRAF1 in the alternative versus classical NF-kappaB pathway in T cells, *J Biol Chem* 287 (2012) 23010-23019.

Figures and legends

Figure 1

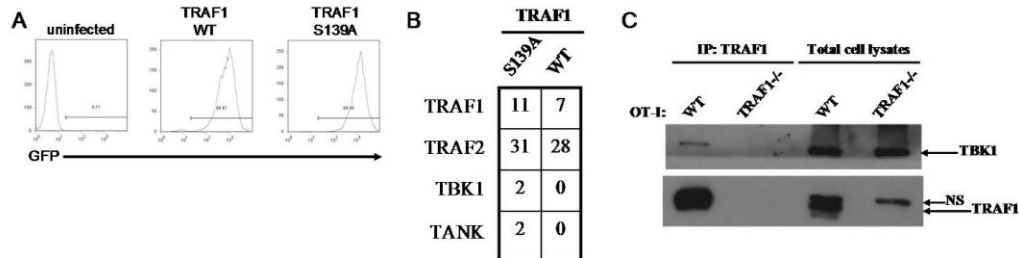
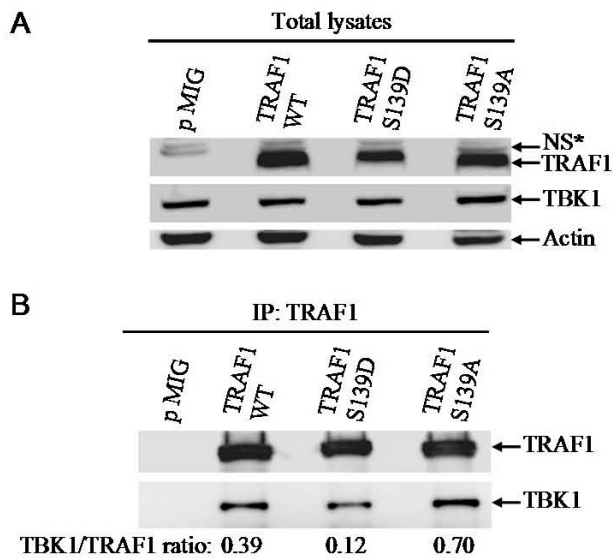


Figure 8 (*1^{ml}*): TBK1 associates with TRAF1 in T cells.

(A) Murine TRAF1 WT and S139A mutant were introduced into Jurkat E6.1 cells with a retroviral construct co-expressing GFP. FACS plots show >95% of cells are GFP⁺. (B) Murine TRAF1 was immunoprecipitated and LC-MS/MS was then performed. The number of unique peptides for TRAF1, TRAF2, TBK1 and TANK identified by LC-MS/MS is shown. (C) Naïve CD8 T cells from OT-I mice (WT and TRAF1^{-/-}) were isolated, TRAF1 was then immunoprecipitated and the association of TRAF1 and TBK1 was analyzed by Western blot analysis. The expression of TBK1 and TRAF1 in total cell lysates from WT and TRAF1^{-/-} cells is shown. NS, non-specific band.

Figure 2



. Figure 9 (2^{ml}): TBK1 preferentially associates with the TRAF1 S139A mutant.

(A) Jurkat cells were transduced with the empty retroviral vector (pMIG), or the vector co-expressing TRAF1 WT, TRAF1 S139A or TRAF1 S139D. The levels of expression of the different forms of TRAF1, TBK1 and actin were determined in total lysates by Western blot analysis. *NS, non-specific band. (B) TRAF1 was immunoprecipitated from Jurkat cells expressing TRAF1 WT, S139D or S139A and the levels of TBK1 associated with the TRAF1 complex was determined by Western blot. TBK1/TRAF1 ratios were determined by densitometry analysis. Representative results of three independent experiment

Figure 3

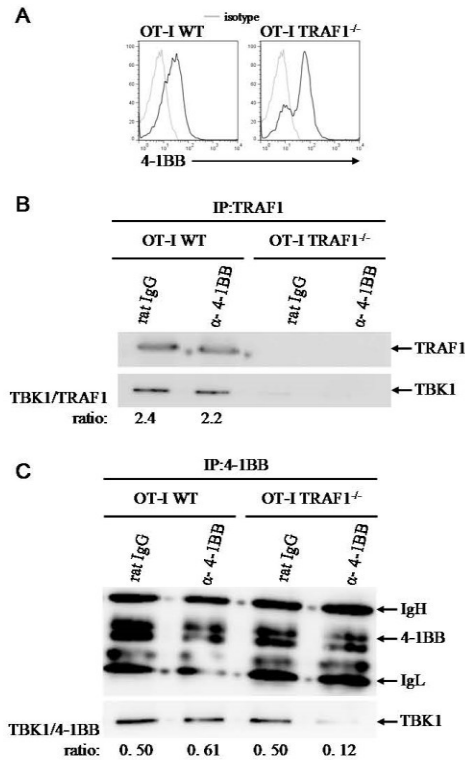


Figure 10 (3^{ml}): Requirement of TRAF1 for the recruitment of TBK1 to the 4-1BB complex. OT-I splenocytes (WT and TRAF1^{-/-}) were stimulated with 0.1 μg/ml OVA peptide for 48 h.

(A) Live CD8 T cells were isolated from the cultures at day 3 and 4-1BB surface expression was confirmed by flow cytometry. (B) Following the stimulation of cells for 20 min. with anti-4-1BB or control rat IgG, cells were lysed and the TRAF1 complex was immunoprecipitated. TRAF1 and TBK1 levels were determined by Western blot analysis. TBK1/TRAF1 ratios were determined by densitometry analysis. (C) Similarly to (B) cells were lysed after 4-1BB or rat IgG control stimulation and the 4-1BB complex was immunoprecipitated. 4-1BB and TBK1 levels were determined by Western blot analysis. TBK1/4-1BB ratios were determined by densitometry analysis. Representative results of four independent experiments.

Figure 4

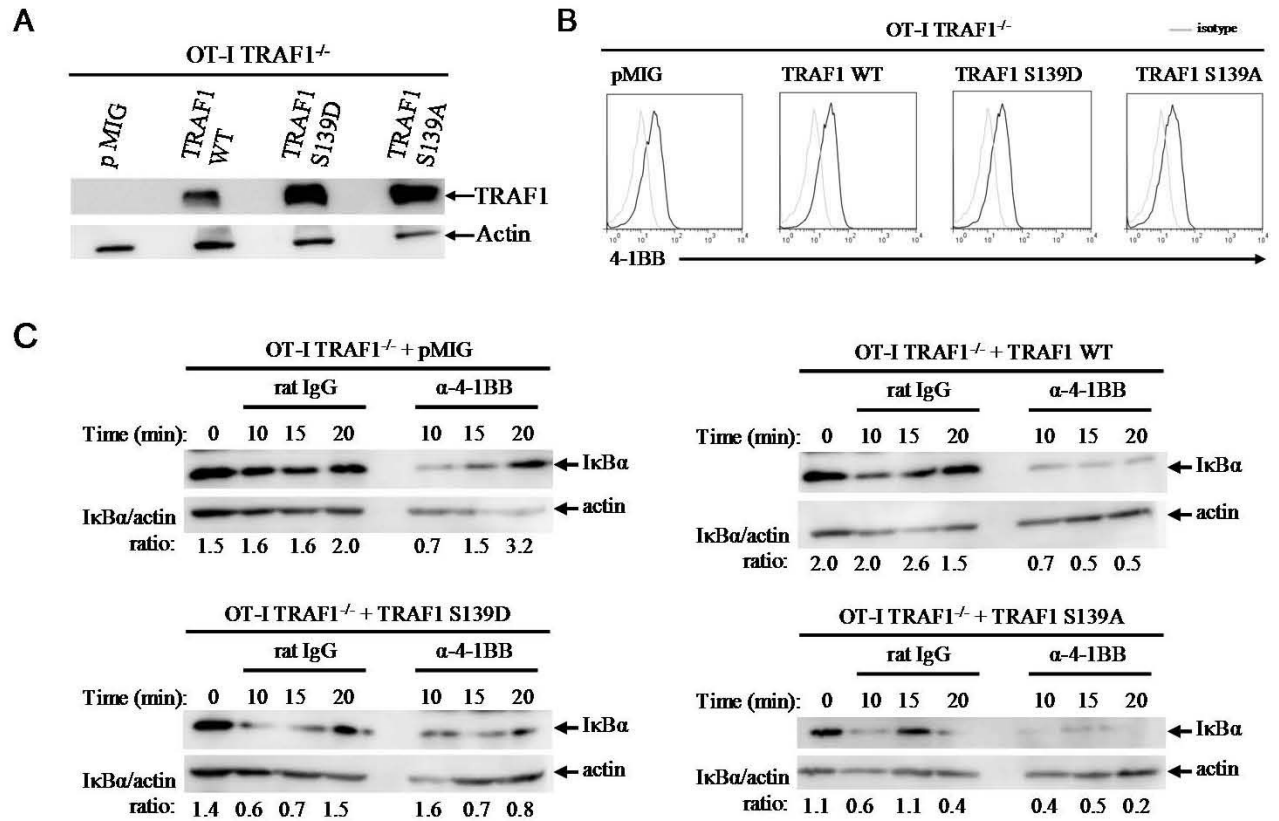


Figure 11(4^{ml}): Impact of TRAF1 Serine 139 mutants on NF-κB activation in response to 4-1BB stimulation.

OT-I TRAF1^{-/-} splenocytes were stimulated with 0.1 μg/ml OVA peptide and transduced with either the empty retroviral vector (pMIG) expressing the GFP alone or in parallel with the TRAF1 WT, TRAF1 S139D or TRAF1 S139A mutants. Live OT-I CD8 T cells expressing the TRAF1 variants were sorted based on GFP expression and expanded in IL-15 *in vitro*. (A) The levels of expression of the different forms of TRAF1 and actin were determined in total lysates by Western blot analysis. (B) Cells were restimulated with 1 μg/ml of anti-CD3ε for 24 h to induce 4-1BB surface expression which was verified by flow cytometry. (C) Cells were then stimulated for the indicated time point with anti-4-1BB or control rat IgG and the levels of IκBα and actin were determined by Western blot

analysis. I κ B α /actin ratios were determined by densitometry analysis. Representative results of three independent experiments

Les résultats du manuscrit 2

VEGF requires the receptor NRP-1 to inhibit LPS-dependent dendritic cell maturation

Running title: NRP-1 inhibits dendritic cell maturation

Nougoli A. E. Oussa *†, Amina Dahmani *, Marie Gomis *, Manon Richaud *, Emil Andreev *, Ali-Reza Navab-Daneshmand *, Julie Taillefer *, Cédric Carli *, Salix Boulet *, Laurent

Sabbagh *†, Nathalie Labrecque *†‡, Przemyslaw Sapielha *§, Jean-Sébastien Delisle *†‡¶

* Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont (CRHMR)

† Department of Microbiology, infectiology and immunology, Université de Montréal

‡ Department of Medicine, Université de Montréal

§ Department of Ophthalmology, Université de Montréal

¶ Hematology-oncology Divison, Hôpital Maisonneuve-Rosemont

Correspondence should be addressed to Jean-Sébastien Delisle

MD, PhD CRHMR

5415 Boul. De L'Assomption

Montréal, Qc

H1T 2M4

Canada

Telephone : 514-252-3400 ext. 6381

FAX : 514-252-3430

This project was funded through a Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) Discovery Grant to JSD.

Abstract

In order to stimulate a productive T-cell response, dendritic cells (DC) must undergo maturation characterized by heightened cell surface expression of major histocompatibility complex (MHC) and co-stimulatory molecules as well as cytokine production. Conversely, the inhibition of DC maturation is a central mechanism of immune tolerance. The control of the DC maturation process relies on the integration of several cellular stimulatory or inhibitory signals. The soluble factors and their receptors controlling this central aspect of DC biology are incompletely characterized. We show that murine bone marrow-derived DC (BMDC) maturation induced by LPS, as opposed to Polyinosinic:polycytidylic acid (PolyI:C) or CpG, is robustly inhibited by Vascular endothelial growth factor (VEGF), a previously identified immunosuppressive cytokine. Using BMDC from wild type and conditional knock-out mice, we show that Neuropilin-1 (NRP-1), a known receptor of VEGF, is necessary to suppress LPS-dependent DC maturation. The absence of NRP-1 had no ostensible effects on the biology of BMDC in the absence of VEGF. However, NRP-1-deficient DC remained completely insensitive to the VEGF- dependent inhibition of BMDC maturation in culture. In the presence of VEGF, Nrp-1 directly interacted with the LPS receptor TLR4 and suppressed downstream signaling through ERK kinases and NF- κ B, resulting in a sharp inhibition of MHC class II and co-stimulatory molecules (CD40, CD86) expression as well as pro-inflammatory cytokine production. Consequently, we identify NRP-1 as a target to optimize DC maturation within environments that are rich in VEGF, such as tumors.

Introduction

Dendritic cells (DC) are potent antigen presenting cells that are central to anti-microbial and anti- tumor immunity (1). As such, several immunomodulatory strategies aim to optimize antigen presentation in vivo or in vitro for applications in vaccine therapy or ex vivo T-cell stimulation.

In order to stimulate a productive immune response, DC integrate signals from their environment to maximize antigen-bound major histocompatibility complex (MHC) molecules as well as co- stimulatory molecules expression at their cell surface through a process leading to their functional maturation (2). In addition, mature DC secrete several pro-inflammatory cytokines that provide additional signals directing T-cell activation and differentiation. These signals are essential to prime an adaptive immune response. Various microbial components (pathogen- associated molecular patterns – PAMPs), or endogenously derived molecules indicating tissue damage or inflammation (alarmins), interact with receptors at the surface of immature DC and trigger the maturation process (3, 4). In contrast, several infectious agents and tumors directly or indirectly produce factors that inhibit DC maturation and therefore contribute to immune dysfunction (5). Given the importance of DC maturation in the generation of productive immune responses and the therapeutic opportunity that lies in the control of this process, it is imperative to understand how pro- and anti-maturation signals integrate at the cellular level.

The DC rely on several receptors to interpret the cues in their environment. Among these receptors, Toll-like receptors (TLR) play a prominent role in the recognition of PAMPs and alarmins (6). Of particular relevance to this study, TLR4 recognizes the bacterial wall

component lipopolysaccharide (LPS) as well as several alarmins leading to inflammation or immune responses following tissue ischemia, neurodegeneration and tumor formation (7, 8). Of similar relevance to several experimental and clinical settings is Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), which in addition to its pro-angiogenic effects, has multiple immunoregulatory roles on both T cells and DC (9). Notably, this mediator inhibits DC generation and maturation (10, 11). VEGF has several isoforms and mediates its effects through various receptors. The VEGF-A₁₆₅ isoform is one of the most abundant forms, notably in tumors, and mediates most of its effects through VEGF receptors 2 (VEGFR2) and VEGFR1 which are receptor tyrosine kinases (12, 13). In addition, VEGF binds other cell surface molecules that can serve as co-receptors and modulate cellular responses to VEGF. Neuropilin-1 (NRP-1) and 2 are such co-receptors. Whether neuropilins are physiologically important in the VEGFA₁₆₅-mediated inhibition of DC maturation remains to be determined.

NRP-1 is a transmembrane glycoprotein and a receptor involved in several developmental, physiological and pathological processes such as axon guidance and angiogenesis (14-16). A central aspect of NRP-1 biology is that in most instances, it acts as a co-receptor for a wide variety of soluble and cell surface ligands. In the immune system, NRP-1 is expressed on regulatory T cells (Treg) and myeloid cells, including DC where it is involved in the formation of the immune synapse with T cells (17-19). In myeloid cells, NRP-1 has additional roles including cell migration and angiogenesis (20). NRP-1 comprises a short intracellular domain containing PDZ motifs allowing for interaction with other membrane or cytoplasmic proteins. The extracellular domain of NRP-1 contains three regions responsible for ligand binding and dimerization. Among

the known ligands of NRP-1, the class III semaphorin, SEMA3A, has been shown to negatively regulate T-cell activation and modulated myeloid cell migration (20, 21). Moreover, the class IV semaphorin, SEMA4A interacts with Nrp-1 on Treg resulting in inhibition of Akt/mTOR signaling and maintenance of the Treg phenotype and function (22). VEGF binds to a different domain than semaphorins on the extracellular portion of NRP-1 but it remains unclear whether the VEGF-NRP-1 interaction plays a role in determining cellular fates in the immune system.

Using murine bone marrow-derived dendritic cells (BMDC), we show that VEGF potently inhibits LPS-driven maturation but not maturation induced by polyinosinic:polycytidylic acid (PolyI:C) and CpG which are respectively TLR3 and TLR9 ligands. In order to assess whether NRP-1 was necessary to this process, we used conditional knockout mice where the deletion of the Nrp-1 gene occurs specifically in myeloid cells. Relative to NRP-1 expressing wild type BMDC, the NRP-1 deficient BMDC had no intrinsic defect in cell growth, capacity to mature in the presence of LPS and stimulate a CD8 T-cell response. However, the maturation of BMDC with LPS in the presence of VEGFA₁₆₅ was robustly inhibited in NRP-1-expressing cells but not in NRP-1-deficient BMDC, thereby demonstrating that NRP-1 is necessary for VEGFA₁₆₅ to inhibit DC maturation. We further demonstrate that NRP-1 associates with TLR4, but not VEGF-Receptor 2 (VEGFR2), in a VEGFA₁₆₅-dependent manner and abrogates TLR signaling. Globally, our results reveal a novel role for NRP-1 in DC physiology and identify NRP-1 as a target to manipulate DC maturation.

Materials and Methods

Generation and culture of bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs)

BMDCs were generated as described by a modified protocol of Inaba et al (23). Briefly, bone marrow cells from murine tibias and femurs were passed through a nylon mesh to remove debris, and 1×10^6 cells were placed in 6-well plates (Sarstedt) containing 4 ml DC-media (RPMI supplemented with 10% Fetal calf serum (FCS), L-glutamine, penicillin/streptomycin and 1000

U/ml GM-CSF (Life Technologies) and 75 U/ml IL-4 as previously described (24, 25). Half of the media was changed on days 2 and 3. On day 6, 2×10^6 non-adherent cells were transferred into a new six-well plate with 4ml DC-media/well. On day 6, cells were stimulated for 24h as indicated with LPS 250ng/ml, PolyI:C 2.5ug/ml or cytosine-phosphate-guanine (CpG) (100ng/ml) (all from Sigma) in presence or absence of recombinant human VEGFA₁₆₅ 100ng/ml (Peprotech). After a total of 7 days of culture, mature BMDCs were harvested.

Mice

C57BL/6 WT mice were purchased from Charles River Laboratories. LyzM-Cre/Nrp1^{fl/fl} and parental LyzM-Cre mice on a C57BL/6 background were housed at the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center and bred locally as previously described (20). Mice were maintained under specific pathogen-free conditions in sterile micro-isolator caging. For in vivo vaccination experiments, BMDCs were generated as described above, matured with LPS, and loaded overnight with the OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (SIINFEKL, 2 µg/ml;

Midwest Biotech). A total of 1×10^6 DCs were injected i.v. for vaccination (25). The primary endogenous CD8⁺ T cell response and persisting memory was analyzed in the spleen with K^b-OVA tetramer staining (Immunex) at indicated time points. All procedures were conducted with the approval of the institutional authorities according to Canadian Council on Animal Care (CCAC) regulations.

Flow cytometry

Expression of surface molecules was assessed by flow cytometry using the following antibodies: Nrp1 (R&D Systems), CD11c (BD Biosciences), CD11b (BD Biosciences), CD40 (eBioscience), CD86 (BD Biosciences), IAb (BD Biosciences). For flow cytometry, 1×10^5 BMDC were incubated with the antibodies for 30 min at 4°C. The cells were washed twice with Phosphate- buffered saline (PBS)/2% FBS (v/v) and resuspended. Samples were acquired and analyzed using a FACSCanto (BD Biosciences) as well as the Flowlogic (TreeStar Inc) and FlowJo (FlowJo, LLC) softwares.

Detection of cytokines

IL-1 β , IL-10, IL-12, TNF- α , and IL-6 production by BMDC was determined using mouse cytokine magnetic 10-plex panel (Novex, Life Technologies). All samples (supernatant of BMDC culture) were diluted 1:2 and were analysed after coupling with fluorescent magnetic microspheres beads conjugated with capture antibodies directed to the cytokines. Data acquisition and analysis was performed with a multiplex reader, Magpix analyzer (Bio-Rad technologies) as recommended by the manufacturer.

Immunoprecipitation and western blots

After 30 minutes of stimulation with LPS or LPS and VEGFA₁₆₅, cells were washed in

cold PBS, lysed in Tris buffered saline containing 0.4 mM EDTA, 1% NP40, and the complete protease inhibitors cocktail (Roche), immunoprecipitated using protein A/G-agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) coupled to 1 μ g anti-Nrp1 antibodies and subjected to SDS-PAGE, and then transferred to PVDF membranes (Pall Life Sciences). Membranes were probed with antibodies specific for Nrp1 (R&D Systems), TLR4 (Abcam) Vegf (Santa Cruz Biotechnology), pI κ B α , I κ B α , pErk1/2, Erk1/2, T (Cell Signaling Technology), or β -actin (Sigma) and incubated with the HRP-conjugated anti-rabbit (Bio-rad) or anti-goat Ig antibody (Sigma). Signals were revealed with the Amersham ECL detection system (Bio-rad) and digital images were acquired using the FujiFilm LAS-4000. Densitometry was performed using the Multi Gauge software (Fujifilm).

Statistics

The student t-test was used for all comparisons involving two experimental groups. Equal variance was confirmed using the F- test. A p value of 0.05 was considered significant. The software Graph Pad was used for all statistical analyses.

Results

VEGF inhibits LPS-dependent bone marrow derived dendritic cells (BMDC)

maturation. We initially tested whether VEGFA₁₆₅ could suppress BMDC maturation in the context of stimulation with various TLR ligands. Given that VEGF was previously shown to suppress LPS- driven maturation (10, 26), but not pro-inflammatory cytokine stimulation (27), we aimed at defining whether VEGF could suppress BMDC maturation induced by other TLR ligands. To this end, we assessed the expression of the maturation markers CD40, CD86 and the major histocompatibility complex (MHC) class II molecule I-A^b in BMDC from C57BL/6 mice after exposure to TLR ligands in the presence or absence of VEGFA₁₆₅ (see Supplementary Figure 1 for gating strategy). As shown in Figure 1, the proportion of BMDC expressing maturation markers is sharply reduced when VEGFA₁₆₅ is added along with the TLR4 agonist LPS. However, we noted no inhibitory effects of VEGFA₁₆₅ on the expression of maturation markers in the context of CpG or Poly IC exposure, which are respectively TLR9 and TLR3 ligands (6). Our data reinforce the notion that VEGF may be particularly effective at inhibiting the LPS-dependent maturation process of BMDC. Given these results, we used LPS-driven BMDC maturation to assess whether NRP-1 plays a role in the inhibition of BMDC maturation mediated by VEGFA₁₆₅.

The deletion of NRP-1 does not affect the BMDC phenotype and function in the absence of VEGFA₁₆₅

NRP-1-deficient mice die during embryogenesis due to defects in neuronal migration and vascular development (28, 29). To specifically address the role of NRP-1 in

myeloid cells, conditional deletion of *Nrp-1* was achieved using the Cre-Lox system. C57BL/6 *Nrp-1^{fl/fl}* mice were crossed with C57BL/6 LyzM-Cre mice, where the Cre recombinase is expressed under the control of the Lysozyme 2 promoter (20). The LyzM-Cre/*Nrp-1^{fl/fl}* mice have no ostensible developmental, behavioral or physiological defects and display a similar myeloid compartment at steady state when compared to the C57BL/6 reference WT strain (Supplementary Figure 2 A-B). Using this conditional system, the NRP-1 expressing myeloid cells are reduced by around 70% relative to C57BL/6 controls as assessed on freshly isolated cells from the bone marrow ((20) and Supplementary Figure 2 C-D).

We next compared BMDC generation using C57BL/6 or LyzM-Cre/*Nrp-1^{fl/fl}* bone marrow cells. After 6 days of culture in the presence of IL-4 and GM-CSF, bone marrow cells from C57BL/6 and LyzM-Cre/*Nrp-1^{fl/fl}* generated a similar number of BMDC (Figure 2 A-B). We next validated that NRP-1 was deleted in BMDC generated in vitro. As shown in Figure 2 C-D, the deletion of NRP-1 was nearly complete in both immature and LPS-matured BMDC from LyzM-Cre/*Nrp-1^{fl/fl}* mice. In contrast, most immature and mature BMDC from control mice expressed NRP-1. This dichotomous difference in NRP-1 expression between control and LyzM-Cre/*Nrp-1^{fl/fl}* allowed us to further study the role of NRP-1 in the biology of BMDC.

Given the importance of dendritic maturation for the efficient priming of T cells, we next sought to determine whether NRP-1-deficient BMDC were impaired in the upregulation of key co-stimulatory and MHC class II molecules following exposure to LPS. In both control and LyzM-Cre/*Nrp-1^{fl/fl}* cells, LPS similarly increased the percentage of CD86, CD40 and I-A^b expressing cells (Figure 2 E-F). Thus, in standard culture conditions,

NRP-1 does not impact BMDC generation and the acquisition of a mature phenotype. We extended our observations by evaluating whether NRP-1 expression by BMDC affected their capacity to prime a T-cell response *in vivo*. Control or NRP-1-deficient BMDC pulsed with the ovalbumin-derived peptide

SIINFEKL were injected intravenously into C57BL/6 mice. No significant differences were noted in the number of antigen-specific CD8 T cells generated between the two experimental groups (Figure 3A). Similarly, 45 days post BMDC vaccination, persisting SIINFEKL-specific memory CD8 T cells were equivalent in the two conditions (Figure 3B). Collectively, these data show that following standard BMDC generation and LPS-maturation, the presence or absence of NRP-1 does not impact BMDC generation, maturation and priming of a CD8 T-cell immune response.

VEGFA₁₆₅ requires NRP-1 to inhibit BMDC maturation

We showed that VEGFA₁₆₅ inhibits BMDC maturation marker expression after LPS exposure and that the presence or absence of NRP-1 has no apparent effects on BMDC generation and function in the context of LPS-driven maturation. Given that NRP-1 can be a receptor for VEGFA₁₆₅, we next evaluated whether the addition of VEGFA₁₂₅ during LPS-induced BMDC maturation was influenced by the expression of NRP-1. When added along with LPS during the maturation phase, VEGFA₁₆₅ potently reduced CD40, CD86 and IA^b expression in control C57BL/6 BMDC as expected (Figure 4A-B). Strikingly, VEGFA₁₆₅ had no effect on the expression of maturation markers in NRP-1-deficient cells (Figure 4A-B). This result implies that NRP-1 is an essential receptor for the inhibitory effect of VEGFA₁₆₅ on BMDC maturation. In order to further establish

that NRP-1 is necessary for VEGFA₁₆₅ to blunt BMDC maturation, we assessed whether the phenotypic characteristics would be correlated with functional impairment. In addition to preventing upregulation of MHC class II and co-stimulatory molecules in control cells, VEGFA₁₆₅ abrogated the secretion of IL-1 β , IL-6, IL-12 and TNF- α in LPS-matured C57BL/6 BMDC. In contrast, the production of inflammatory cytokines by NRP-1-deficient BMDC was unaffected by the presence of VEGFA₁₆₅ as assessed by multiplex cytokine quantification in the culture medium (Figure 4C). Hence, both phenotypic and functional features were differentially modulated in control versus NRP-1-deficient cells in the presence of VEGFA₁₆₅. In order to rule out a strain effect resulting from the insertion of the Cre recombinase in the lysozyme 2 locus in LyzM-Cre/Nrp-1^{fl/fl} BMDC, we matured BMDC from parental LyzM-Cre mice in the presence of VEGFA₁₆₅ (Figure 5). LyzM-Cre BMDC maturation inhibition by VEGFA₁₆₅ was of similar magnitude to what we observed in C57BL/6 BMDC. These observations further support the notion that NRP-1 is an obligate co-receptor for VEGFA₁₆₅ to mediate its inhibitory effects on LPS-mediated BMDC maturation.

NRP-1 inhibits LPS-driven TLR signaling and directly interacts with TLR4 in the presence of VEGF

Upon binding LPS, TLR4 triggers a signaling cascade common to all TLR that hinges on MyD88-IRAK4-mediated downstream activation of the effector kinases ERK1-2 as well as the NF- κ B pathway (30). We assessed the phosphorylation of ERK1-2 as well as the phosphorylation of the cellular inhibitor of NF- κ B, I κ B α at early time points after LPS exposure and at the end of the 24 hour maturation period. In the absence of VEGFA₁₆₅,

the kinetics and extent of ERK-1-2 and I κ B α phosphorylation were identical in control and NRP-1 deficient BMDC (Figure 6A-C). Robust phosphorylation of ERK1-2 was observed at 30 minutes after LPS stimulation and was maintained at 60 minutes and 24 hours post stimulation, irrespective of NRP-1 expression. Likewise, the activation of the NF- κ B pathway, as measured by the phosphorylation of I κ B α , was noted at 30 and 60 minutes and at 24 hours in both WT and NRP-1 deficient cells. Hence, in line with the phenotypic and cytokine secretion data, NRP-1 deficiency does not impact TLR4 signaling in BMDC maturation in the absence of its ligand.

However, in the presence of both LPS and VEGFA₁₆₅, ERK1-2 phosphorylation was similar at 30 minutes in both WT and NRP-1-deficient BMDC, but was not sustained at 60 minutes nor 24 hours in control cells in contrast to NRP-1-deficient BMDC where ERK activation was maintained at later time points (Figure 6D-F). A similar observation was made for I κ B α phosphorylation, but in this case, a tendency (not reaching statistical significance) could be observed as early as 30 minutes of LPS stimulation. Consistent with the phenotypic and functional data, exposure to VEGFA₁₆₅ failed to alter ERK and NF- κ B activation in NRP-1 deficient cells during stimulation with LPS. Collectively, these results strongly suggest that VEGFA₁₆₅ inhibits TLR4 signaling through NRP-1.

We next evaluated whether NRP-1 directly interacts with the LPS receptor TLR4 and whether this interaction was VEGF-dependent. Initially, we demonstrated that BMDC from control or LyzM-Cre/Nrp-1^{fl/fl} mice expressed similar levels of TLR4 (Figure 7A). Using NRP-1 co-immunoprecipitation, we assessed whether NRP-1 interacted with TLR4. In the absence of VEGFA₁₆₅, no evidence of such interaction could be found (Figure 7B). However, in the presence of VEGFA₁₆₅, TLR4 and VEGF

immunoprecipitated with NRP-1 early in the maturation process (30 minutes), indicating that NRP-1 bound to VEGF directly interacts with TLR4 (Figure 7C, D). Importantly, VEGFR2 which has been shown to interact with NRP-1 in endothelial cells (31, 32), and can mediate several effects of VEGFA₁₆₅, was not present within the NRP-1-TLR4 complex despite similar expression in C57BL/6 and LyzM-Cre/Nrp-1^{fl/fl} BMDC (Figure 7C, D). Collectively, these findings indicate that VEGFA₁₆₅ binds NRP-1 and associates with TLR4 in the context of LPS stimulation. This correlates with the inhibition of TLR4 signaling and inhibition of LPS-driven BMDC maturation.

Discussion

Our study shows that NRP-1 is essential for VEGFA₁₆₅ to inhibit the LPS-driven maturation of BMDC. The inhibitory effects of VEGFA₁₆₅ on DC maturation in terms of phenotypic and functional changes has been described a long time ago (26). As such, VEGF-mediated DC suppression has been heralded as an immunosuppressive mechanism in several settings, including in neoplastic microenvironments. Our findings reveal an additional and important new player in the orchestration of DC maturation and highlight the importance of understanding how multiple signals and receptors integrate to regulate DC biology. The absence of NRP-1 had no ostensible impact on BMDC physiology but determined whether VEGF could suppress the maturation process, emphasizing the importance of context-dependence in DC maturation outcomes.

Our data indicate that once bound to its ligand, NRP-1 is able to inhibit TLR4 signaling. This inhibition became evident at 60 minutes and persisted until the end of the maturation period after

24 hours of LPS stimulation. At 30 minutes of the maturation process in the presence of VEGFA₁₆₅, phosphorylation of ERK1-2 and I κ B α could be observed in both control and LyzM- Cre/Nrp-1^{fl/fl} BMDC. This suggests that TLR4 signaling is initiated following LPS exposure but that it is rapidly suppressed by ligand-exposed NRP-1. The NF- κ B and ERK pathways can be triggered by several stimuli, including VEGF in the case of ERK(12). However, the correlation between the suppression of ERK and NF- κ B signaling, the inhibition of maturation marker expression and inflammatory cytokine production evokes a role for ligand-bound NRP-1 in TLR4 signaling suppression. This

may be the result of a direct interaction between NRP-1 and TLR4 as indicated by the co-immunoprecipitation experiments. Both TLR4 and NRP-1 are predominantly cell surface molecules as opposed to TLR3 or TLR9 that are intracellular receptors and not inhibited by VEGFA₁₆₅ in our experimental conditions. As such, TLR3 did not co-immunoprecipitate with NRP-1 in PolyI:C treated BMDC exposed to VEGFA₁₆₅ (data not shown). Hence, our work suggests a direct interaction between NRP-1 and TLR4 resulting in a mitigation of downstream signaling events. Whether NRP-1 requires other partners to mediate its effects remains to be determined. Given the numerous examples of interactions between NRP-1 and VEGFR2 in other cell types (31-33), notably endothelial cells, we evaluated whether an association with VEGFR2 could be demonstrated in VEGFA₁₆₅ exposed cells. Despite expression of VEGFR2 by BMDC, no evidence of a direct association with NRP-1 was observed, indicating that NRP-1 has other partners or may mediate its effects by being the sole VEGFA₁₆₅ receptor interacting with TLR4. Further studies to characterize the extent and nature of the interaction between TLR4 and NRP-1, as well as to identify additional NRP-1 partners after exposure to VEGFA₁₆₅, are warranted. Our data reveals an essential role for NRP-1 in the inhibition of BMDC maturation by LPS. However, this does not rule out an independent, and complementary, role for VEGF receptors in BMDC maturation as implied by other experimental approaches (26, 34, 35). A better understanding of different receptor contribution in the control of DC maturation may ultimately guide therapeutic interventions and stimulate the design of novel pharmaceuticals or biologics to target NRP-1 in addition to VEGFR inhibitors.

We used LPS, a gram-negative bacterial wall compound, to stimulate TLR4 and mature

BMDC. However, the implications of our findings may extend beyond bacterial infections. Several endogenously produced alarmins such as High mobility group box 1 (HMGB1) signal through TLR4 (7, 36) and may thus be inhibited by ligand-bound NRP-1. Thus the potential relevance of our findings may span areas of vaccine design, infectious diseases, autoimmunity, inflammation and tumor immunology. We focussed on TLR4, owing to the relevance of this TLR in inducing cellular responses in response to LPS and our data as well as previous evidence showing that this interaction could be inhibited by VEGFA₁₆₅, an NRP-1/NRP-2 ligand(37). Whether TLR2 which also binds LPS (7) can interact with NRP-1 remains to be tested and whether NRP-2 shares BMDC suppressive properties with NRP-1 is currently unknown. In addition, other NRP-1 ligands such as Placental growth factor (PIGF), which shares homology with VEGF, can inhibit BMDC maturation (10). Whether NRP-1 would similarly inhibit BMDC maturation in the presence of other of its ligands is unknown. The effects of NRP-1 in DC biology might thus extend beyond the immunoregulatory effects of VEGF, through interactions with several classes of ligands.

In conclusion, the identification of NRP-1 as an inhibitor of DC maturation has several implications for the design of more effective DC vaccine and the development of strategies to program DC differentiation within inflammatory environments that are rich in VEGF. This may be particularly relevant to tumor immunology where VEGF is suspected to contribute to DC dysfunction (38), immune escape and neoplastic progression. Hence, targeting NRP-1 may optimize DC maturation in several pathological settings

Acknowledgments

The authors are grateful to Sylvie Lesage for helpful discussions and review of the manuscript as well as Martine Dupuis for flow cytometry and the animal care facility personnel. NO is a Cole Foundation training award recipient. JSD is a Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) Junior 1 award recipient and a Cole Foundation early career Transition Awardee

References

1. Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller, and A. Mortha. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 31: 563-604.
2. Joffre, O., M. A. Nolte, R. Sporri, and C. Reis e Sousa. 2009. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* 227: 234-247.
3. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801.
4. Chan, J. K., J. Roth, J. J. Oppenheim, K. J. Tracey, T. Vogl, M. Feldmann, N. Horwood, and J. Nanchahal. 2012. Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest* 122: 2711-2719.
5. Wallet, M. A., P. Sen, and R. Tisch. 2005. Immunoregulation of dendritic cells. *Clin Med Res* 3: 166-175.
6. Kawai, T., and S. Akira. 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34: 637-650.
7. Erridge, C. 2010. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J Leukoc Biol* 87: 989-999.
8. Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are

hypo-responsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162: 3749-3752.

9. Byrne, A. M., D. J. Bouchier-Hayes, and J. H. Harmey. 2005. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 9: 777-794.

10. Oyama, T., S. Ran, T. Ishida, S. Nadaf, L. Kerr, D. P. Carbone, and D. I. Gabrilovich.

1998. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 160: 1224-1232.

11. Gabrilovich, D., T. Ishida, T. Oyama, S. Ran, V. Kravtsov, S. Nadaf, and D. P. Carbone.

1998. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 92: 4150-4166.

12. Koch, S., and L. Claesson-Welsh. 2012. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a006502.

13. Zachary, I. 2003. VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans* 31: 1171-1177.

14. Chaudhary, B., Y. S. Khaled, B. J. Ammori, and E. Elkord. 2014. Neuropilin 1: function and therapeutic potential in cancer. *Cancer Immunol Immunother* 63: 81-99.

15. Kumanogoh, A., and H. Kikutani. 2013. Immunological functions of the neuropilins and plexins as receptors for semaphorins. *Nat Rev Immunol* 13: 802-814.

16. Prud'homme, G. J., and Y. Glinka. 2012. Neuropilins are multifunctional

coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* 3: 921-939.

17. Solomon, B. D., C. Mueller, W. J. Chae, L. M. Alabanza, and M. S. Bynoe. 2011. Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2040-2045.

18. Sarris, M., K. G. Andersen, F. Randow, L. Mayr, and A. G. Betz. 2008. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 28: 402-413.

19. Tordjman, R., Y. Lepelletier, V. Lemarchandel, M. Cambot, P. Gaulard, O. Hermine, and P. H. Romeo. 2002. A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol* 3: 477-482.

20. Dejda, A., G. Mawambo, A. Cerani, K. Miloudi, Z. Shao, J. F. Daudelin, S. Boulet, M.

Oubaha, F. Beaudoin, N. Akla, S. Henriques, C. Menard, A. Stahl, J. S. Delisle, F. A. Rezende, N. Labrecque, and P. Sapienza. 2014. Neuropilin-1 mediates myeloid cell chemoattraction and influences retinal neuroimmune crosstalk. *J Clin Invest* 124: 4807-4822.

21. Takamatsu, H., T. Okuno, and A. Kumanogoh. 2010. Regulation of immune cell responses by semaphorins and their receptors. *Cell Mol Immunol* 7: 83-88.

22. Delgoffe, G. M., S. R. Woo, M. E. Turnis, D. M. Gravano, C. Guy, A. E. Overacre, M. L.

Bettini, P. Vogel, D. Finkelstein, J. Bonnevier, C. J. Workman, and D. A. Vignali. 2013. Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-

4a axis. *Nature* 501: 252-256.

23. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R.

M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176: 1693-1702.

24. Boulet, S., J. F. Daudelin, and N. Labrecque. 2014. IL-2 induction of Blimp-1 is a key in vivo signal for CD8⁺ short-lived effector T cell differentiation. *J Immunol* 193: 1847-1854.

25. Lacombe, M. H., M. P. Hardy, J. Rooney, and N. Labrecque. 2005. IL-7 receptor expression levels do not identify CD8⁺ memory T lymphocyte precursors following peptide immunization. *J Immunol* 175: 4400-4407.

26. Gabrilovich, D. I., H. L. Chen, K. R. Girgis, H. T. Cunningham, G. M. Meny, S. Nadaf, D. Kavanaugh, and D. P. Carbone. 1996. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 2: 1096-1103.

27. Takahashi, A., K. Kono, F. Ichihara, H. Sugai, H. Fujii, and Y. Matsumoto. 2004. Vascular endothelial growth factor inhibits maturation of dendritic cells induced by lipopolysaccharide, but not by proinflammatory cytokines. *Cancer Immunol Immunother* 53: 543-550.

28. Takashima, S., M. Kitakaze, M. Asakura, H. Asanuma, S. Sanada, F. Tashiro, H. Niwa, J.

Miyazaki Ji, S. Hirota, Y. Kitamura, T. Kitsukawa, H. Fujisawa, M. Klagsbrun, and M. Hori. 2002. Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely

impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3657-3662.

29. Kawasaki, T., T. Kitsukawa, Y. Bekku, Y. Matsuda, M. Sanbo, T. Yagi, and H. Fujisawa.

1999. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 126: 4895-4902.

30. Miller, S. I., R. K. Ernst, and M. W. Bader. 2005. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* 3: 36-46.

31. Herzog, B., C. Pellet-Many, G. Britton, B. Hartzoulakis, and I. C. Zachary. 2011. VEGF binding to NRP1 is essential for VEGF stimulation of endothelial cell migration, complex formation between NRP1 and VEGFR2, and signaling via FAK Tyr407 phosphorylation. *Mol Biol Cell* 22: 2766-2776.

32. Whitaker, G. B., B. J. Limberg, and J. S. Rosenbaum. 2001. Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of VEGF(165) and VEGF(121). *J Biol Chem* 276: 25520-25531.

33. Hamerlik, P., J. D. Lathia, R. Rasmussen, Q. Wu, J. Bartkova, M. Lee, P. Moudry, J.

Bartek, Jr., W. Fischer, J. Lukas, J. N. Rich, and J. Bartek. 2012. Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth. *J Exp Med* 209: 507-520.

34. Dikov, M. M., J. E. Ohm, N. Ray, E. E. Tchekneva, J. Burlison, D. Moghanaki, S. Nadaf, and D. P. Carbone. 2005. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J Immunol* 174: 215-222.

35. Yang, D. H., J. S. Park, C. J. Jin, H. K. Kang, J. H. Nam, J. H. Rhee, Y. K. Kim, S. Y.

Chung, S. J. Choi, H. J. Kim, I. J. Chung, and J. J. Lee. 2009. The dysfunction and abnormal signaling pathway of dendritic cells loaded by tumor antigen can be overcome by neutralizing VEGF in multiple myeloma. *Leuk Res* 33: 665-670.

36. Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M. C.

Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F. J. Barrat, P. Saftig, F. Levi, R. Lidereau, C. Nogues, J. P. Mira, A. Chompret, V. Joulin, F. Clavel-Chapelon, J. Bourhis, F. Andre, S. Delaloge, T. Tursz, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2007. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13: 1050-1059.

37. Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch, and Z. Poltorak. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13: 9-22.

38. Pinzon-Charry, A., T. Maxwell, and J. A. Lopez. 2005. Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. *Immunol Cell Biol* 83: 451-461.

Figures and legends

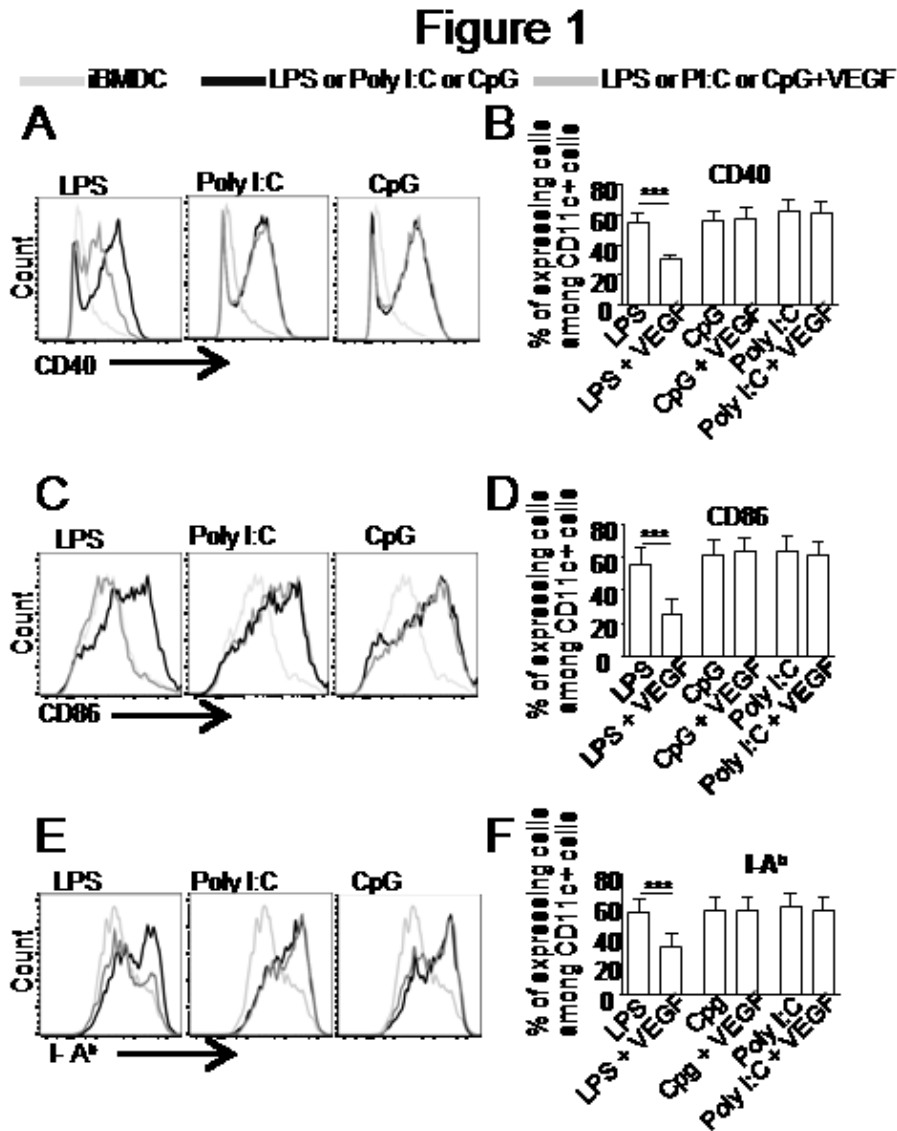


Figure 12 (*I^{mlI}*): VEGFA₁₆₅ inhibits wild-type BMDC maturation by LPS.

A. One representative histogram and B. average of 5 independent experiments showing the expression of the co-stimulatory molecule CD40 in the context of different maturation stimuli. The light gray line is the expression on immature BMDC (iBMDC), the black line represents the expression following the maturation stimulus for 24hrs and the gray

line indicates the expression in the context of the TLR agonist and VEGFA₁₆₅ exposure. C, D represent the same analysis for CD86 expression and E, F for IA^b expression. All error bars represent SEM. ***p<0.001

Figure 2

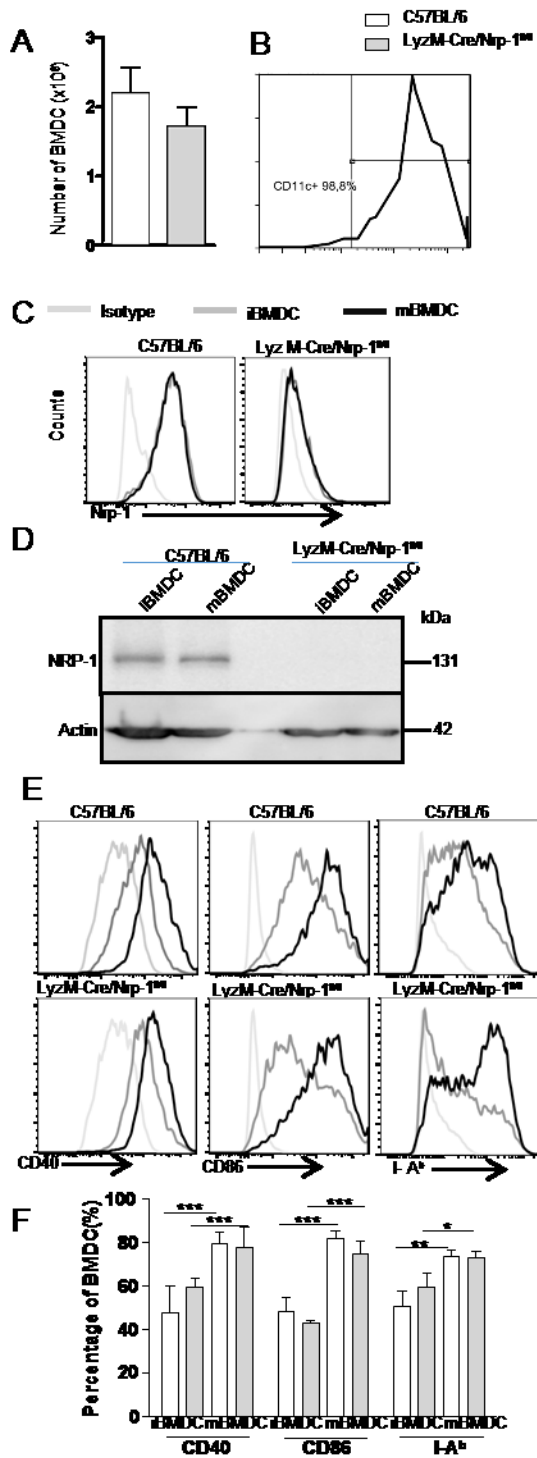


Figure 2^{ml}: *Nrp-1*-deficient BMDC expand and mature normally in standard conditions.

A. Absolute count of BMDC compiled from 3 independent experiments after culture of bone marrow cells from both C57BL/6 and LzM-Cre/Nrp-1^{fl/fl} mice. B. One representative histogram showing CD11c expression following culture. C. One representative of 4 independent experiments showing cell surface expression of NRP-1 on iBMDC and LPS matured (mBMDC) generated from C57BL/6 and LzM-Cre/Nrp-1^{fl/fl} mice. Isotype staining on mBMDC shown. D. Western blots showing deletion of NRP-1 in BMDC derived from LzM-Cre/Nrp-1^{fl/fl} mice (one representative from 3 independent experiments). E. Representative cell surface staining of CD40, CD86 and I-Ab in iBMDC and mBMDC from C57BL/6 and LzM-Cre/Nrp-1^{fl/fl} and F, compiled data showing mean percentage of maturation marker-expressing BMDC and SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

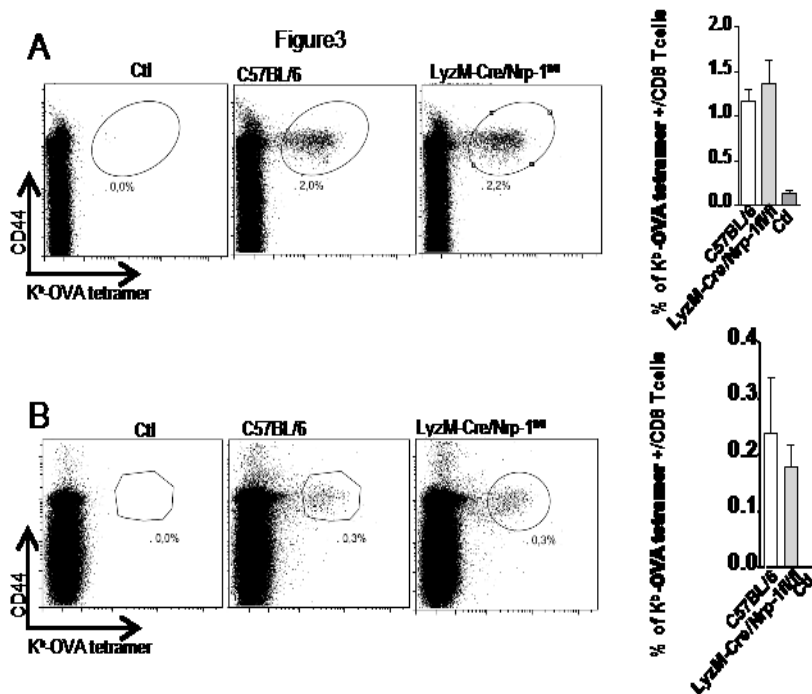


Figure 13 (2^{mIII}) *∴* Antigen-pulsed NRP-1 –deficient BMDC can prime T-cell responses.

A. Representative dot plots gated on CD8⁺ splenocytes 7 days after i.v. injection of SIINFELK-loaded BMDC from either C57BL/6 or LyzM-Cre/Nrp-1^{fl/fl} in C57BL/6 mice and compilation from 6 mice per group. The control (ctrl) condition are unimmunized mice.

B. Representative dot blots and compilation from 6 mice per group sacrificed at day 45 post-immunization showing equivalent proportions of persisting antigen-specific memory CD8 T cells irrespective of the type of BMDC used for immunization.

Figure 4

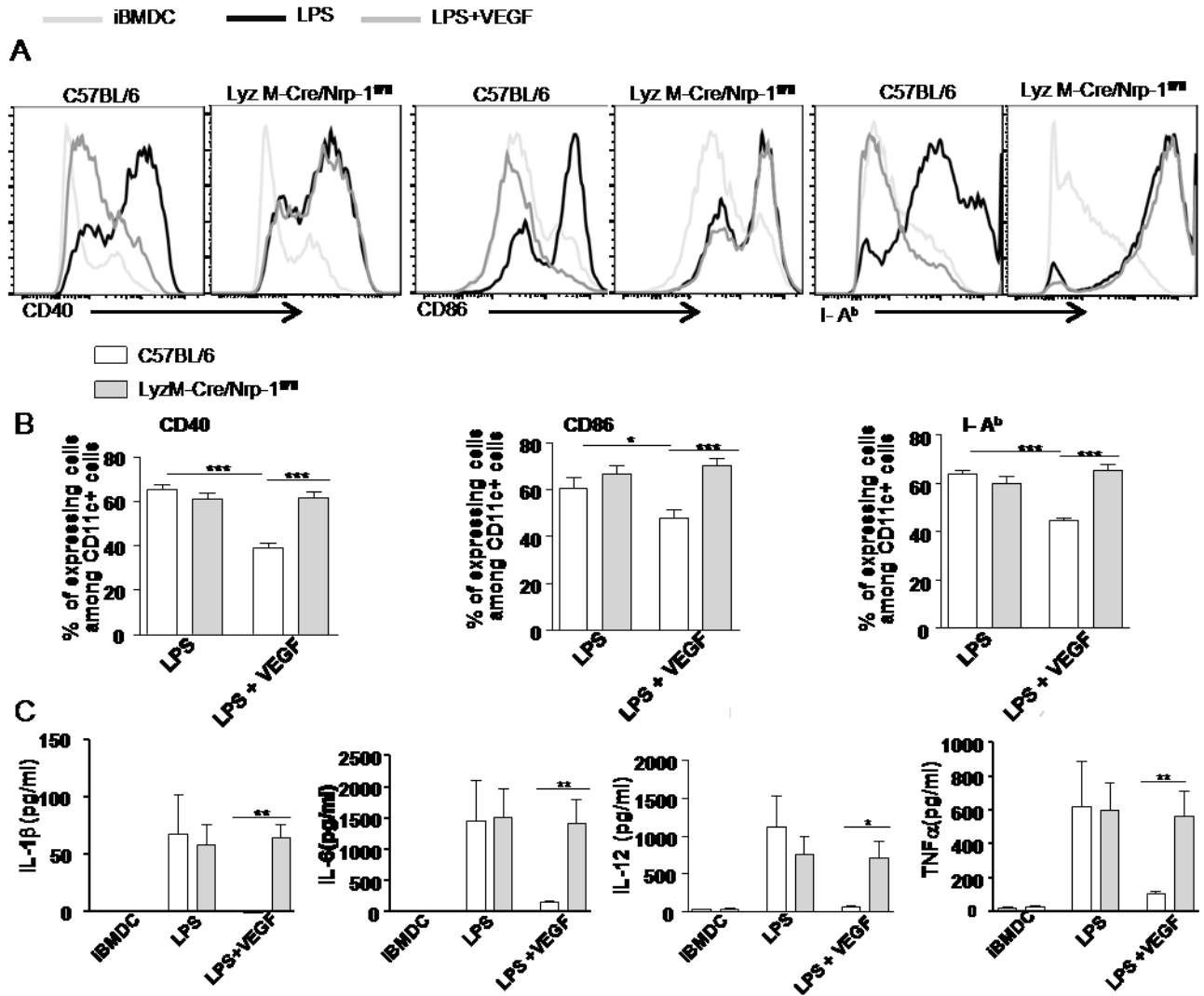


Figure 14 (2^{mIV}): VEGF requires NRP-1 to inhibit BMDC maturation.

A. Representative histograms of CD40, CD86 and I-A^b expression in function of culture condition (iBMDC, mBMDC with LPS alone or LPS and VEGFA₁₆₅). B compiled results from 8-9 independent experiments showing the expression of CD86, CD40 and I-A^b on dendritic cells (gated on CD11c) after 6 days of culture and a 24-hour maturation step with LPS or LPS and VEGFA₁₆₅. C. Cytokine concentration measurements in the culture

supernatant at the end of the maturation period (from 6 independent experiments). All results are expressed as means with SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 5

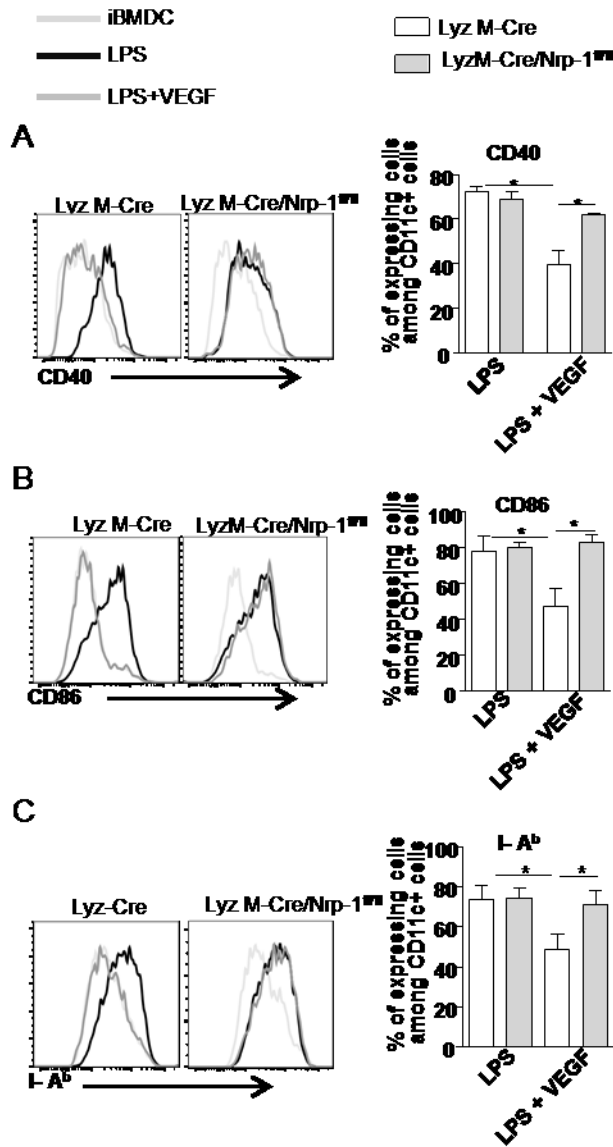


Figure 15 (2^{mV}): BMDC from parental Lyz M-Cre mice mirror the observations made in C57BL/6 BMDC.

One representative and compilation of 3 independent experiments (means and SEM) comparing costimulatory molecule CD40 (A), CD86 (B) and the MHC class II molecule I-A^b (C) expression on BMDC generated from parental Lyz M-Cre and Lyz M-Cre/Nrp-1^{fl/fl} mice. *p<0.05

Figure 6

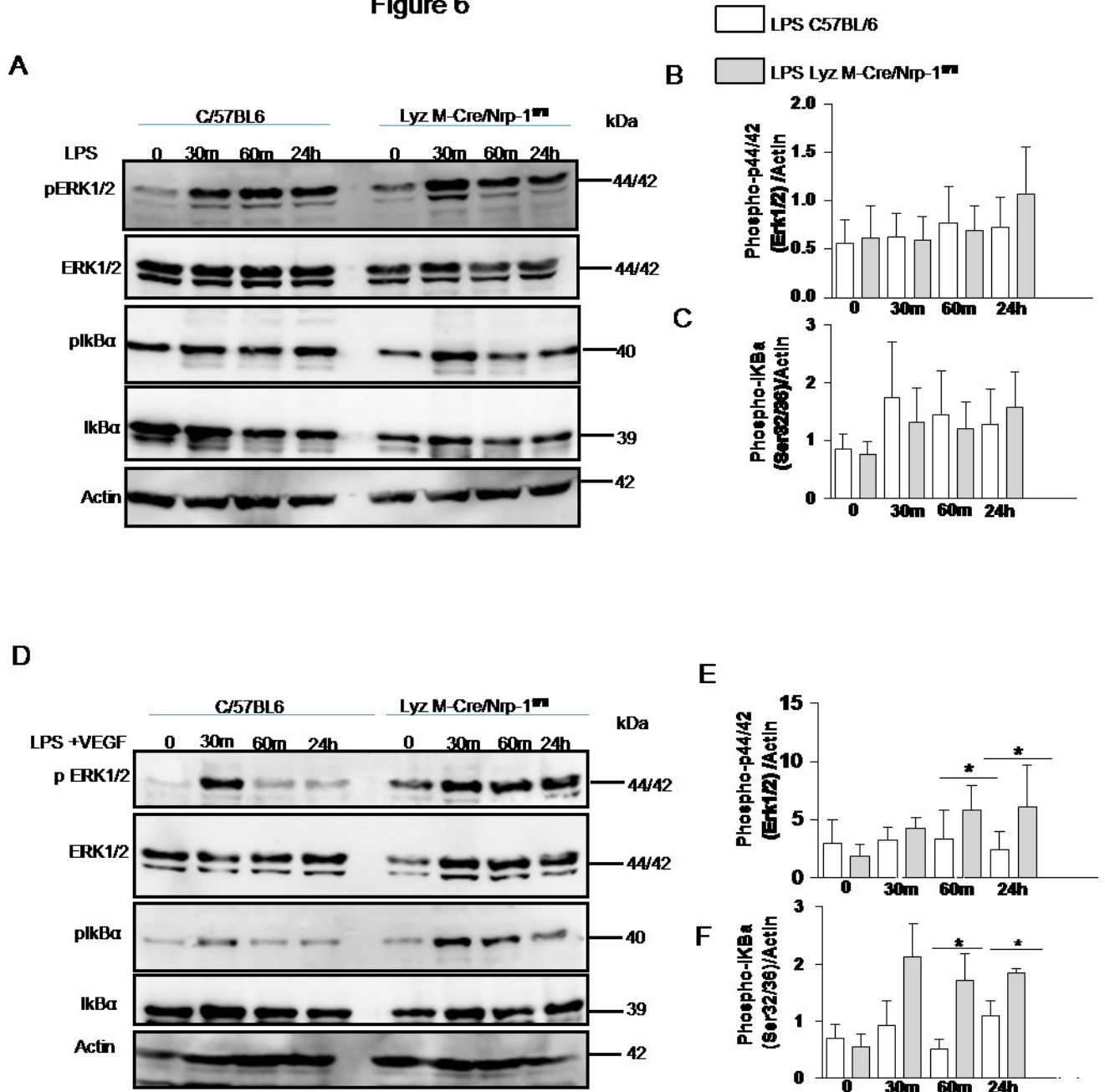


Figure 16 (2^{mVI}): VEGF attenuates TLR4 signaling in an NRP-1-dependent manner.

A. Western blots using 1×10^6 BMDC of either C57BL/6 or LyzM-Cre/Nrp-1^{fl/fl} origin in the absence of LPS (time 0) and 30 minutes (30m), 60 minutes (60m) as well as 24hrs (24h) into the LPS maturation step. Depiction of phospho-ERK 1/2 (pERK 1/2), total ERK (ERK 1/2), Phospho-Ik β (pIkBa), total IkBa and loading control action. B. Compilation of 3

independent experiments showing the average ratio of active pERK 1/2 and C. plkBα to actin at all the time-points in both C57BL/6 and LyzM-Cre/Nrp-1^{fl/fl} BMDC. D-F. Same experiments in BMDC exposed to both VEGF and LPS. Error bars represent SEM. *p<0.05

Figure 7

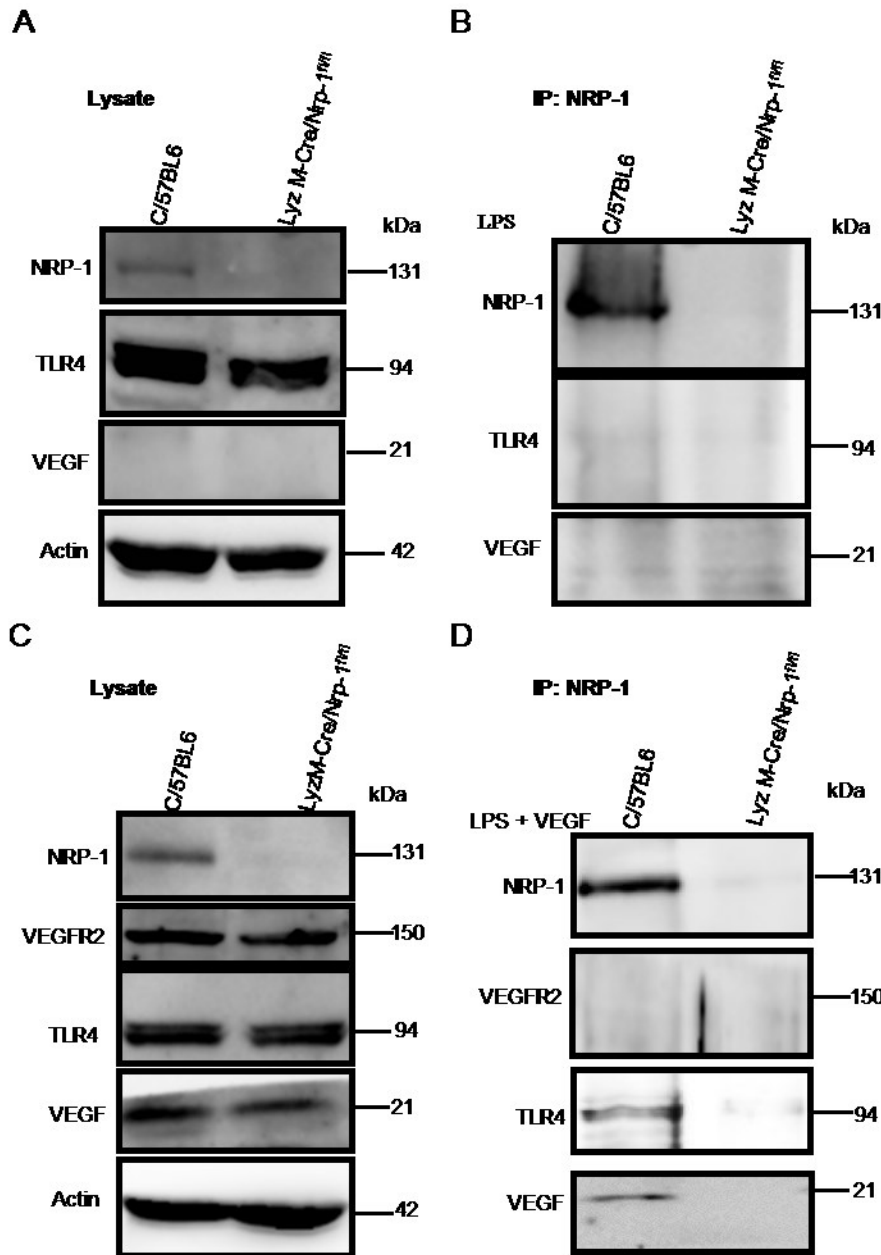


Figure 17 (2^{mVII}): NRP-1 interacts with TLR4 in a ligand-dependent manner.

A. Western blots using the indicated antibodies on whole cell lysates of C57BL/6 and LyzM-Cre/Nrp-1^{fl/fl} BMDC following exposure to LPS (30 minutes). B. Immunoprecipitation from the same samples using anti-NRP-1 antibodies for precipitation and indicated antibodies for revelation. C, D. Identical procedures with samples obtained from BMDC matured in the presence of both LPS and VEGF. All results in A-D were repeated in 3 independent experiments

Supplementary Figure 1

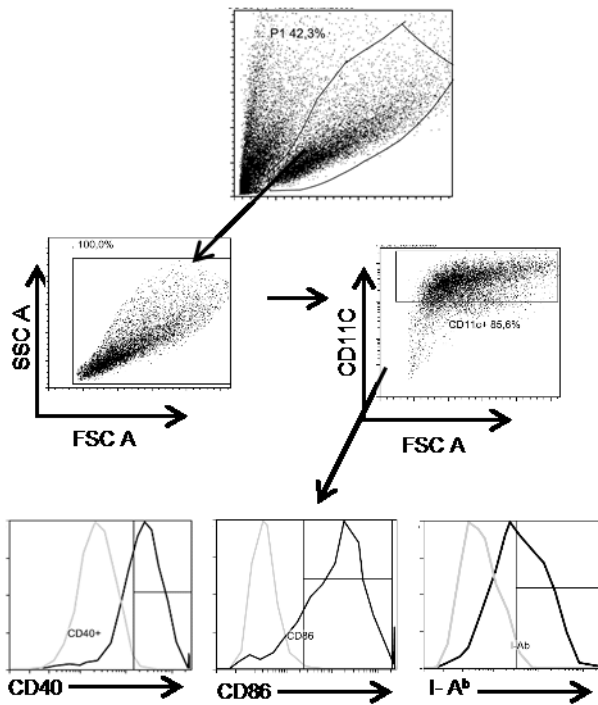


Figure 18 (2^{ms1}):Supplementary Figure 1.

Representative gating of CD11c⁺ dendritic cells after culture. Percentages of CD40, CD86 and I-A^b-expressing cells (black line) were determined based on isotype control staining (light gray line).

Supplementary Figure 2

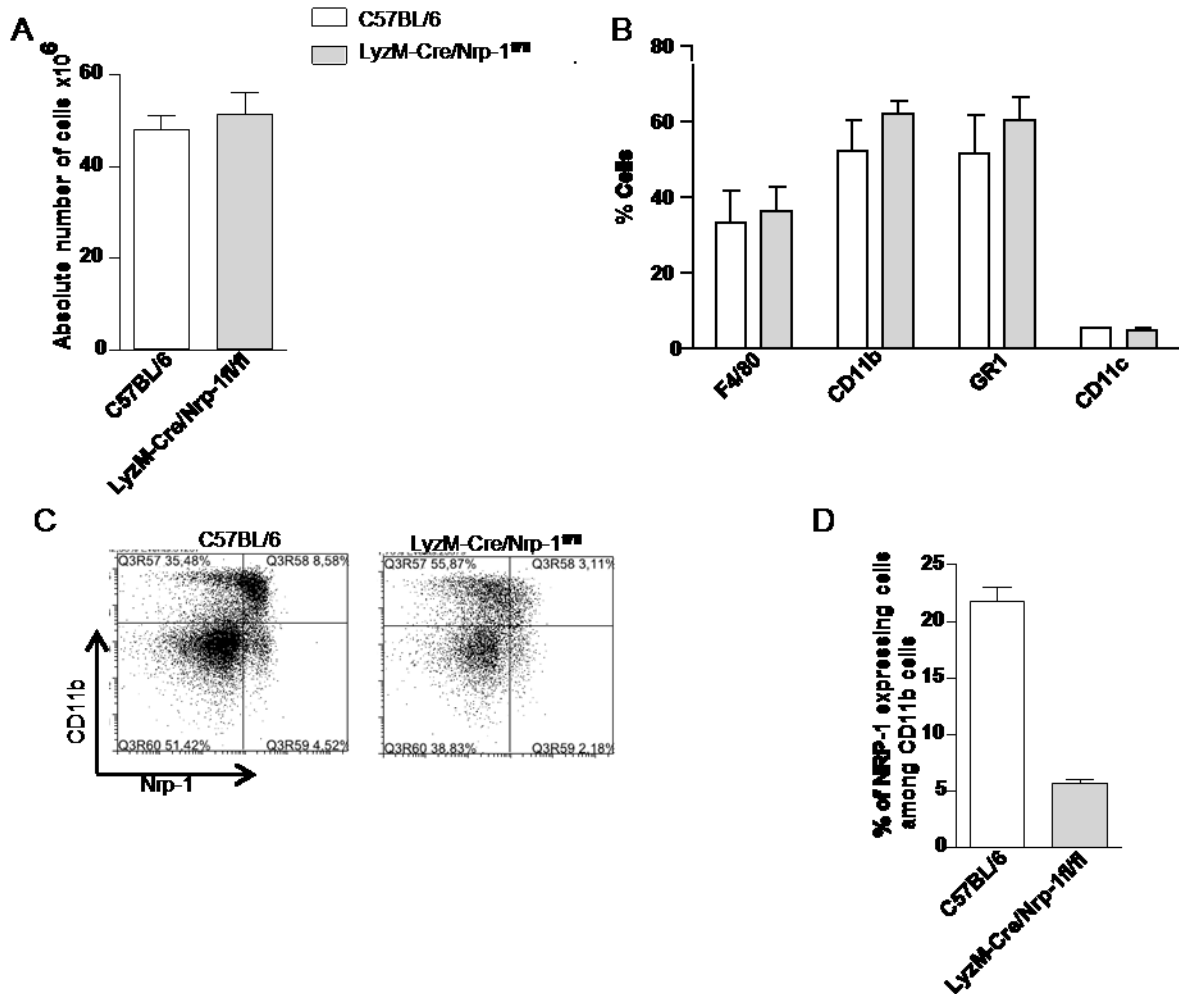


Figure 19 (2^{mS2}): Supplementary Figure 2. The reduction in NRP-1 expressing myeloid cells in LyzM-Cre/Nrp-1^{fl/fl} mice does not alter the myeloid compartment of the bone marrow.

A. Mean bone marrow cellularity (3 mice, 2 femurs per mice) in C57BL/6 and LyzM-Cre/Nrp-1^{fl/fl} mice. B. Percentage of cells expressing monocytic (F4/80, CD11b) or granulocytic (Cd11b, GR1) markers in the bone marrow of the two mice strain as well as the percentage of CD11c^{hi} cells (dendritic cells) in the extracted bone marrow. C. One representative and average of three mice per group showing a reduction in the percentage of NRP-1 expressing CD11b⁺ cells in LyzM-Cre/Nrp-1^{fl/fl} mice. Error bars represent SEM.

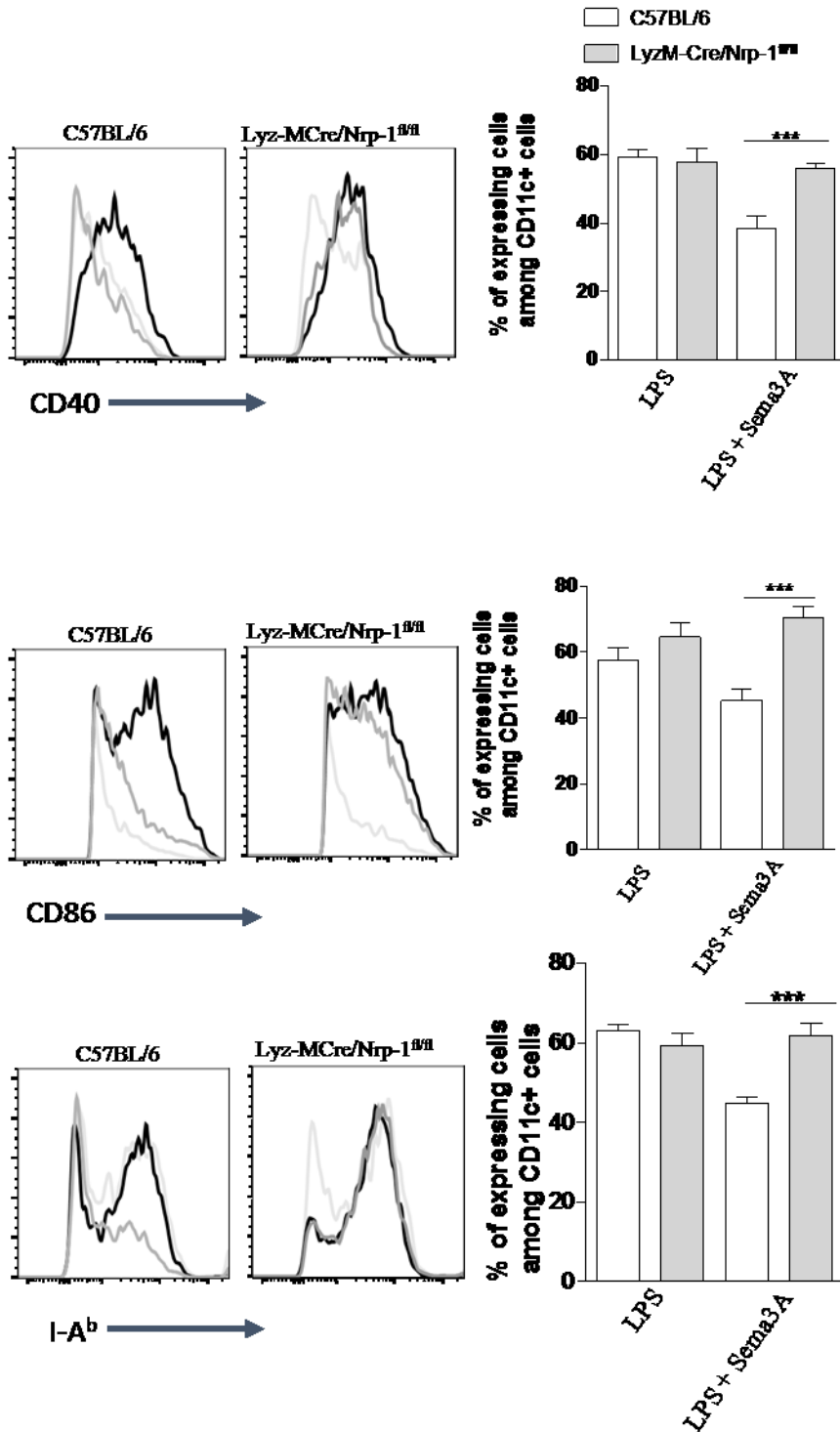


Figure 20: Effet de SEM3A sur la maturation des BMDC

One representative and compilation of 3 independent experiments (means and SEM) comparing costimulatory molecule CD40 (A), CD86 (B) and the MHC class II molecule I-A^b (C) expression on BMDC generated from parental C57BL/6 and LyzM-Cre/Nrp-1^{fl/fl} mice. *p<0.05

Discussion et Perspectives

Au cours de mes études doctorales, je me suis intéressé au rôle des récepteurs de TNF dans la survie des lymphocytes T CD8 d'une part et d'autre part à l'interaction du corécepteur Nrp1 dans la maturation des DC. Dans la première partie de cette discussion, j'émettrai quelques hypothèses sur le rôle de la phosphorylation de TRAF1 en aval de 4-1BB dans les cellules T CD8+ suivies des perspectives pour expliquer les résultats de l'article 1. Dans la seconde partie, les hypothèses seront émises pour expliquer les résultats obtenus sur le rôle de NRP-1 sur la maturation des DC.

I Les récepteurs de TNF et la survie des lymphocytes mémoires

Les récepteurs de TNF jouent un rôle essentiel dans la survie et la mort cellulaire. Parmi ces récepteurs, 4-1BB est une molécule de costimulation qui a un effet sur la survie des lymphocytes T CD8 (Watts 2005; Vinay and Kwon 2009). 4-1BB joue son rôle de survie dans les lymphocytes T CD8 en recrutant des protéines adaptatrices, dont les TRAFs. Il a été montré que TRAF1 est phosphorylée sur sa sérine 139 par la kinase PKN1 lorsqu'elle est surexprimée dans les cellules HeLa en absence de tout antigène. Il s'en suit l'inhibition de la voie NF- κ B en aval du TNFR2 (Kato et al. 2008). Dans le premier article de cette thèse, nous avons rapporté par des expériences de spectrométrie de masse que TRAF1 s'associe de façon préférentielle à TBK1 lorsqu'elle n'est pas phosphorylée. L'immunoprécipitation de TRAF1 après surexpression de TRAF1 WT, TRAF1S139A ou TRAF1S139D dans la lignée leucémique Jurkat, confirme cette association préférentielle de TBK1 à TRAF1S139A. L'analyse de l'expression de TBK1 montre un ratio TBK1/TRAF1 5 fois de plus que la condition TRAF1S139D mimant la phosphorylation constitutive. TBK1 avait déjà été montrée de former un complexe avec TRAF2-TANK et la formation de ce complexe est requise pour l'activité de TBK1 à stimuler la voie NF- κ B.

Notre étude rapporte que TRAF1 est nécessaire au recrutement efficace de TBK1 au complexe 4-1BB. De plus, l'état de phosphorylation de TRAF1 va moduler le niveau d'expression de TBK1 et l'activation de la voie NF- κ B. Ainsi, l'immunoprécipitation du récepteur 4-1BB après stimulation des lymphocytes T CD8 OT-I TRAF1WT ou TRAF1-/- avec un anticorps agoniste 4-1BB ou un contrôle isotypique montre une réduction du recrutement de TBK1 en absence de TRAF1. Ces résultats suggèrent que TRAF1 est requise pour la stabilité de TBK1 au récepteur 4-1BB. TRAF1 est unique parmi les TRAFs puisqu'il ne possède pas le domaine de doigt de zinc requis pour l'activation de la voie NF- κ B et beaucoup d'études ont rapporté des rôles contradictoires sur TRAF1 (Xie et al. 2006). En effet, Xie a aussi montré que TRAF1 coopère avec TRAF2 pour l'activation des lymphocytes B via le CD40, un autre récepteur de la famille de TNF. En absence de TRAF1 on observe une accumulation de TRAF2 au niveau des radeaux lipidiques suivie de sa dégradation médiée par CD40 (Xie et al. 2006). Cette coopération entre TRAF2 et I serait requise pour l'activation de la voie NF- κ B (Xie et al. 2006). Comme il est décrit dans le premier article, TRAF1 serait également requise pour le recrutement de TBK1 dont l'activité kinase est essentielle pour activer la voie NF- κ B nécessaire à l'activation des lymphocytes B. Le rôle biologique de TRAF1 dans la survie des lymphocytes T serait d'interagir ou de recruter des protéines partenaires pour augmenter l'activation des lymphocytes B. Ainsi nos résultats sont en corrélation avec les observations de Xie qui rapportent que les lymphocytes B TRAF1-/- affichent une diminution de la prolifération en réponse à une stimulation CD40 ou TNF (Xie et al. 2006). La modulation de l'état de phosphorylation de TRAF1 est essentielle à la survie des lymphocytes T CD8. Dans le modèle d'infection virale chronique, Wang a démontré qu'une perte de l'expression de TRAF1 survient dans les lymphocytes T CD8 au cours d'une infection virale de l'immunodéficiência humaine (VIH) chez l'homme ou Lymphocytic ChorioMeningitis Virus (LCMV) chez la souris (Wang et al. 2012). Dans le premier article, il est clairement démontré que la phosphorylation de TRAF1 module la voie NF- κ B en recrutant les facteurs de signalisation au récepteur 4-1BB dans les lymphocytes T. Les lymphocytes OT-I CD8 TRAF1-/- exprimant le mutant S139A montrent une activation de NF- κ B déterminée par une dégradation de I κ B α après stimulation avec un anticorps anti 4-1BB. La fluctuation de la dégradation de I κ B α observée dans les lymphocytes OT-I TRAF1-/- (figure 4C)

exprimant TRAF1WT s'explique par la population hétérogène de lymphocytes T où TRAF1 est phosphorylé ou non. Pour mieux comprendre le rôle de la phosphorylation de TRAF1 dans la survie des lymphocytes, l'impact du phospho mutant TRAF1 S139A a été évalué *in vivo*. A cet effet, les plasmides lentiviraux exprimant la GFP et un FLAG-TRAF1 (WT) ou FLAG-TRAF1 dont la sérine 139 a été substituée pour une alanine (S139A) éliminant le site de phosphorylation ont été générés. Ces constructions ont été introduites par transduction lentivirale, dans des lymphocytes T CD8 antigène-spécifique (OT-I) TRAF1^{-/-} activés. Les cellules GFP + ont ensuite été triées pour isoler les cellules exprimant les différentes formes de TRAF1 (> 90%) et mis en culture en présence d'IL-15 pour 5 à 8 jours pour faire proliférer les cellules. Les lymphocytes OT-I exprimant TRAF1 WT (Thy1.1) ou S139A (CD45.1), ont ensuite été mélangés dans un ratio de 1:1 (2500 cellules / chacun) et transféré dans des souris congéniques distinctes (Thy1.2 CD45.2). Les souris ayant reçu ces lymphocytes (5000 au total) ont ensuite été infectées avec un virus recombinant de la grippe exprimant l'épitope OVA dans la tige neuraminidase (Flu-OVA), reconnu par les cellules OT-I. Par la suite, les souris ont été traitées avec un anticorps agoniste anti-4-1BB pour déterminer le potentiel de signalisation du mutant S139A dans les lymphocytes T CD8 en aval du 4-1BB. Au pic de la réponse immunitaire les splénocytes ont été isolés, et en moyenne, nous avons récupéré 3 fois plus de cellules OT-I TRAF1^{-/-} exprimant le mutant de TRAF1 S139A comparativement aux lymphocytes T exprimant la forme wt de TRAF1 (figure 22). Ces résultats concordent avec les résultats de la figure 4 de l'article1 où les lymphocytes T OT-I TRAF1^{-/-} exprimant le mutant S139A induisent l'activation de la voie NF- κ B. Ils renforcent aussi l'étude de Kato et al qui ont rapporté que la phosphorylation de TRAF1 a pour conséquence l'inhibition de cette voie (Kato et al. 2008). Nous avons démontré que le mutant TRAF1 S139A s'associe préférentiellement à TBK1 entraînant une activation de NF- κ B en aval de 4-1BB. De plus, les études réalisées avec le mutant S139A de TRAF1 ont été faites dans des lymphocytes T CD8 mémoire réactivés suite à une stimulation avec Flu-OVA et anti-4-1BB *in vivo*. Cependant, nous ne savons pas si l'avantage de survie observé avec les OT-I TRAF1^{-/-} exprimant le mutant S139A de TRAF1 par rapport aux lymphocytes exprimant TRAF1 WT est due à TBK1. Pour le savoir, il faudrait évaluer l'impact de la délétion de TBK1 dans les lymphocytes T CD8 exprimant les différentes formes de TRAF1.

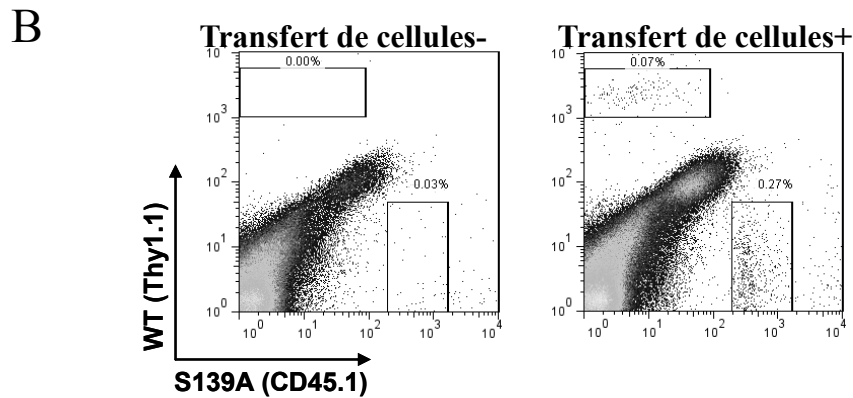
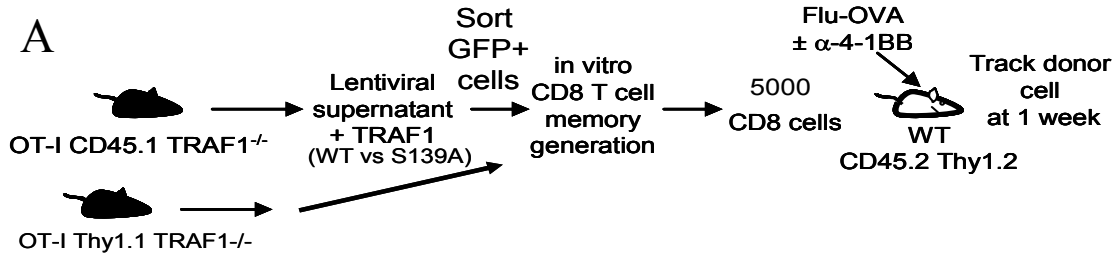


Figure 21: Modèle expérimental et résultat de cytométrie montrant l'augmentation de la survie des lymphocytes OT-I TRAF1^{-/-} exprimant le mutant S139A (CD45.1) et TRAF1^{-/-} exprimant le WT (Thy1.1) 7 jours après transfert adoptif.

Ces travaux permettent de proposer un modèle de l'impact de la phosphorylation de TRAF1 pour la mise en place d'évènement intracellulaire par la coordination du recrutement des molécules de signalisation dont TBK1 impliquées dans l'activation de NF- κ B suivant une costimulation 4-1BB (figure 9).

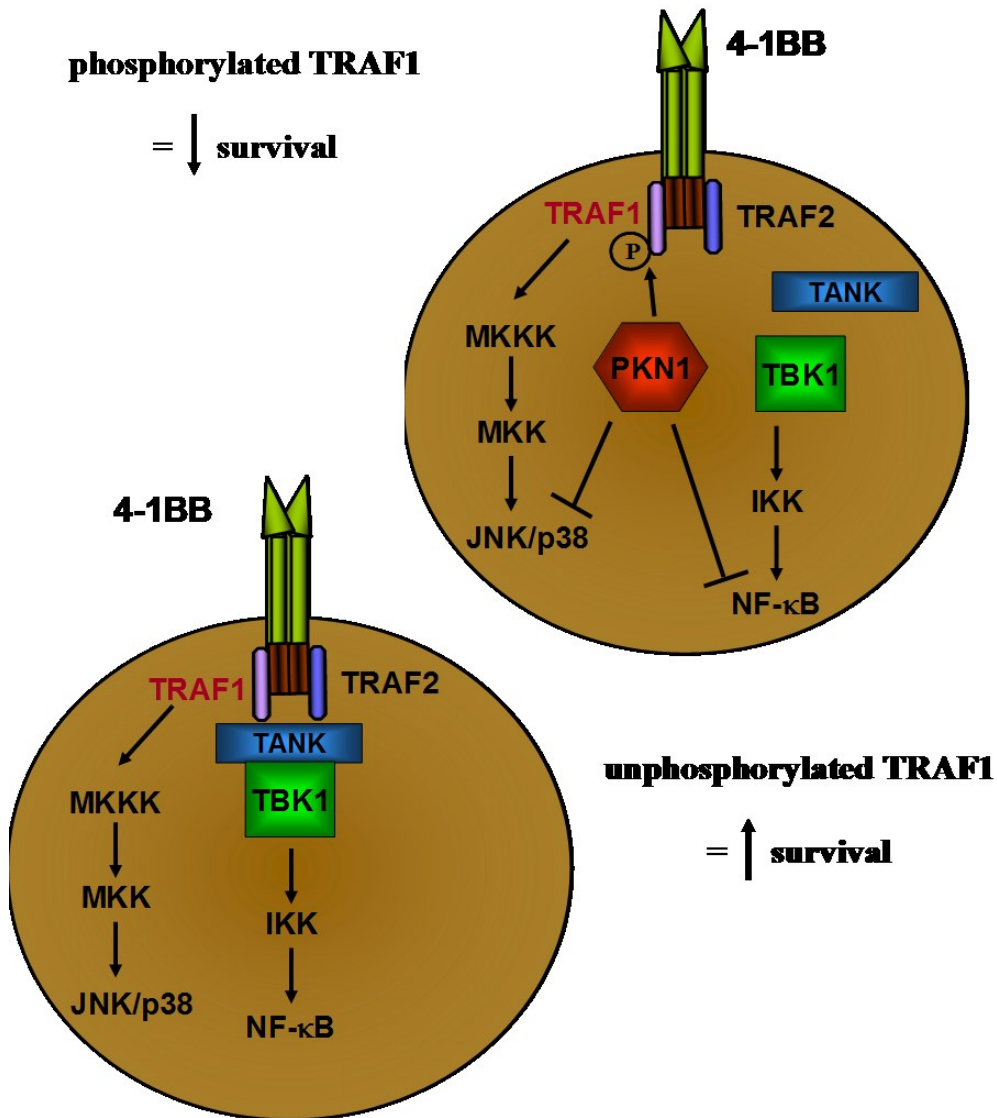


Figure 22: Modèle de l'impact de phosphorylation de TRAF1 dans l'activation de NF-κB en aval du récepteur 4-1BB.

TRAF1 a été montré d'être phosphorylé sur sa sérine 139 par PKN1 entraînant l'inhibition de NF-κB et JNK menant à la diminution de la survie. L'abolition du site de phosphorylation permet une association préférentielle de TANK et de TBK1 à TRAF1 entraînant une activation de NF-κB menant à la survie des cellules CD8 mémoires en aval de 4-1BB

En effet, Les souris déficientes en TBK1 ont un phénotype embryonnaire létal (Bonnard et al. 2000), ce qui empêche d'étudier le rôle de TBK1 dans les lymphocytes T matures. Par conséquent, pour évaluer l'importance de TBK1 dans la signalisation en aval de 4-1BB, l'expression de TBK1 pourrait être inhibée avec des vecteurs rétroviraux contenant de

l'ARN d'interférence (shRNA). Après l'inhibition de TBK1 avec le shRNA dans les cellules OT-I, nous pourrions générer des lymphocytes T CD8 mémoires *in vitro* qui seraient cotransduits avec des phospho mutants TRAF1 S139A ou WT. Ces lymphocytes seraient ensuite greffés par transfert adoptif dans une souris naïve pour ensuite déterminer l'importance de TBK1 dans la survie des lymphocytes après une stimulation *in vivo* avec l'anticorps anti-4-1BB. Nos données indiquent que TBK1 est essentielle à l'activation de NF- κ B dans les lymphocytes OT-TRAF1^{-/-} S139A. De plus, l'analyse des souris TBK1^{-/-} révèle que la délétion de TBK1 induit un phénotype embryonnaire léthal (Bonnard et al. 2000). De ces observations, TBK1 apparaît comme une molécule essentielle à la survie des lymphocytes T CD8 mémoires. L'activation de cette cascade de signalisation en aval de 4-1BB pourrait augmenter la génération des lymphocytes mémoires. En favorisant l'activation de cette cascade, on générerait plus de lymphocytes mémoires capables d'une réponse plus forte et rapide lors d'une réinfection d'un pathogène ou dans un contexte tumoral. Ainsi, dans un modèle tumoral, les lymphocytes T mémoires spécifiques d'un antigène tumoral pourraient avoir une activité anti-tumorale efficace pour le patient.

II Les TRAFs et la survie des cellules cancéreuses

L'expression de TRAF1 est particulièrement élevée dans les cellules malignes lymphoïdes telles les lymphomes hodgkin et non hodgkiniens et la leucémie lymphocytaire chronique de type B. Cependant, l'importance de cette expression élevée n'est pas connue (Durkop et al. 2003; Zapata et al. 2004). Dans ces cellules B, TRAF1 augmente la survie comme dans le cas des lymphocytes T CD8 mémoires et renforce la résistance des cellules B à l'apoptose (Zapata et al. 2004). Une des molécules qui s'associe avec TRAF1S139A en aval du récepteur 4-1BB est TBK1. TBK1 peut s'associer au protooncogène KRAS. Le gène KRAS est muté dans plusieurs cancers humains, notamment les cancers plus agressifs qui répondent peu aux traitements de chimiothérapies (Barbie et al. 2009). Dans les cellules cancéreuses, TBK1 active la voie NF- κ B en induisant les molécules anti apoptotiques de la famille Bcl-x1 qui sont essentielles à leur survie (Barbie et al. 2009). En utilisant des stratégies d'ARN interférence, Barbie et al ont démontré que l'inhibition de TBK1 en

présence du gène KRAS induit l'apoptose des cellules cancéreuses (Barbie et al. 2009). Ces études montrent clairement que les molécules partenaires identifiées en aval de 4-1BB dans la survie des lymphocytes T CD8 dans le premier article, pourraient également être essentielles pour la survie de nombreuses cellules cancéreuses lymphoïdes. Nos résultats offrent des potentiels thérapeutiques qui cibleraient le TBK1. Ainsi, en utilisant des approches pharmacologiques et génétiques, il serait possible de réduire l'expression de TBK1 dans les cancers hématologiques et autres. Ces stratégies pourraient se traduire par l'inhibition de TBK1 par des inhibiteurs chimiques ou l'utilisation de l'ARN interférence sur des cellules cancéreuses. La spécificité de ces inhibiteurs permettrait de mieux caractériser le rôle de TBK1 dans les cellules tumorales. De plus, la caractérisation du rôle biologique de TBK1 dans le cancer permettrait d'établir les orientations dans le traitement des maladies ciblées par TBK1. Le potentiel thérapeutique de ces différentes méthodes pourrait être évalué par la prolifération des cellules et leurs effets sur les voies de signalisations impliquées. La première approche serait d'évaluer premièrement l'expression de TBK1 au niveau ou d'ARN messager dans les cancers hématologiques.

III La maturation des cellules dendritiques et le VEGF

Dans le deuxième manuscrit de cette thèse, nous avons démontré que l'absence de la neuropiline 1 dans la lignée myéloïde n'avait aucun effet sur les différents types cellulaires après comparaison de la souris *Lyz-Cre-Nrp1^{fl/fl}* avec la souris *C57/BL6*. Nos résultats ont montré une expression similaire de la *Nrp1* sur les BMDC contrairement à Corbel qui avait démontré que l'expression de la *Nrp1* passait de 5% dans les DC immatures à 45% après stimulation au LPS (Corbel et al. 2007). Par ailleurs, la comparaison des molécules de costimulation à savoir CD86, CD40 et le CMH II sur les DC maturées en présence du LPS montrent des résultats similaires entre les DC *C57/BL6* et *Lyz-Cre-Nrp1^{fl/fl}* suggérant que l'absence de la neuropiline 1 n'affecterait pas la maturation des DC. Plusieurs études ont montré que la neuropiline1 était essentielle à l'initiation de la réponse immunitaire (Tordjman et al. 2002; Wulfig and Rupp 2002). Nous avons vérifié si la neuropiline1 à elle seule influençait la réponse primaire spécifique CD8. Ainsi les DC *C57/BL6* et *Lyz-*

Cre-Nrp1^{fl/fl} chargés avec le peptide OVA injectés dans une souris C57/BL6 ont montré le même pourcentage de lymphocytes T CD8 tétramère positif. Ces résultats s'observent tant au pic de la réponse immune que lors de la phase mémoire. Les DC chargés avec l'antigène cible peuvent migrer et stimuler une réponse primaire CD8 semblable en présence ou en absence de la Nrp1. Bien que plusieurs études rapportent que la neuropiline 1 soit requise pour l'initiation de la réponse immune, et participe à la formation de la synapse immunologique, il n'est pas encore clair comment et quel est le rôle de la neuropiline1 dans la réponse immune. La plupart des études s'appuient sur des observations de microscopie pour proposer différents modèles. Le modèle se base sur l'interaction des DC matures et les lymphocytes T quiescents tous exprimant la neuropiline 1. Ainsi, grâce une interaction homotypique (neuropiline 1-neuropiline1), les deux types cellulaires initieraient la réponse immune. Il serait important de mieux comprendre le rôle de la neuropiline1 avec des études plus extensives dans des contextes physiologiques pour élucider l'implication de la neuropiline 1 dans la réponse immune.

La neuropiline 1 est un corécepteur pour plusieurs ligands, nous avons émis l'hypothèse que son rôle devait être évalué en présence de ses ligands. L'analyse de son rôle en présence de ces deux des ligands en particulier le VEGF et le SEMA3A nous éclaire davantage sur son rôle. Les essais de maturation au LPS en présence du VEGF ou du SEMA3A montrent une inhibition de l'expression des molécules de costimulation (CD86, CD40 et CMH II) sur DC C57/BL6. Cependant, l'expression de ces molécules reste inchangée en absence de Nrp1 sur les DC Lyz-Cre-Nrp1^{fl/fl}. Plusieurs études ont rapporté depuis des années que VEGF inhibe la maturation des DC (Takahashi et al. 2004; Fan et al. 2003; Oyama et al. 1998; Gabrilovich, Chen, et al. 1996), le présent manuscrit lève un voile sur un mécanisme par lequel VEGF joue son rôle inhibiteur de la maturation des DC. Notre étude a démontré que VEGF et SEMA3A inhibent la maturation des DC via leur interaction avec son corécepteur qu'est la neuropiline1. Autour des années 2000, les études se sont succédées pour rapporter le rôle du VEGF dans la maturation des DC aussi bien chez la souris que l'humain. Nos données viennent renforcer les précédentes études en révélant un des facteurs clés du mécanisme d'action du VEGF et du SEMA3A. Nos données montrent au niveau fonctionnel que VEGF inhibe la maturation en inhibant la sécrétion des cytokines pro inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6, IIL-12 et le TNF α . Conséquemment,

lorsqu'on regarde l'effet du VEGF sur la voie TLR4 activée par LPS, nos résultats ont démontré un même niveau d'activation des voies NF- κ B et Erk1/2. Cette activation se traduit par le même niveau de phosphorylation de pI κ B α et pErk1/2 respectivement dans les DC C57/BL6 et Lyz-Cre-Nrp1^{fl/fl} après stimulation LPS. Cependant, avec du VEGF, les voies NF- κ B et Erk1/2 sont inhibées en présence de Nrp1 confirmant que VEGF inhibe la maturation des DC par la voie TLR4 de façon neuropiline 1-dépendante. Nos résultats montrent que VEGF inhibe la voie NF- κ B alors que dans les DC Nrp1-lyz, cette voie de signalisation reste activée. Déjà à l'orée des années 2000, Oyama avait démontré que VEGF affectait la maturation des DC en inhibant la voie NF- κ B (Oyama et al. 1998). Dans cette étude, il démontra que VEGF était capable de réduire la liaison spécifique de NF- κ B à l'ADN 30 minutes après une stimulation TNF α . Ces expériences ont montré que VEGF se lie au VEGFR2 pour bloquer la voie NF κ B (Oyama et al. 1998). Ces résultats renforcent le deuxième manuscrit de cette thèse et sont confirmés par le groupe d'Alfaro. Il rapporte que VEGF inhibe l'expression des molécules de costimulation, un effet qui est renversé par l'utilisation des inhibiteurs tels que le bevacizumab et le sunitinib (Alfaro et al. 2009). Plus intéressant, nos résultats démontrent que le mécanisme d'action de VEGF se traduit par l'inhibition de la voie TLR4. Ainsi, VEGF et TLR4 se retrouvent dans le même complexe que la neuropiline 1 après stimulation LPS en présence du VEGF dans les DC WT. Toutefois, nos données démontrent l'absence de VEGFR2 dans le complexe de la neuropiline 1 contrairement à l'étude d'Oyama qui rapporte que l'inhibition de la maturation se fait par VEGFR2 (Oyama et al. 1998). Ces résultats montrent le rôle du VEGF et de son corécepteur dans la régulation de la maturation des DC. Le mode d'action de VEGF reste à déterminer, il se peut que VEGF ait une action directe sur le récepteur TLR4 via une interaction physique. Dans ce cas, VEGF inhiberait toute interaction de TLR4 avec son ligand potentiel ou réduirait l'interaction entre TLR4 et son ligand VEGF pourrait agir de façon indirecte par la sécrétion de médiateurs qui modulent l'expression des molécules de costimulation. La diminution drastique des cytokines telles que l'IL-12, l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF α montre la propriété immunosuppressive du VEGF rendant les DC probablement tolérogènes. Sur la base de nos résultats, nous pouvons spéculer que VEGF se lie à Nrp1 et induirait l'expression de IDO. Ainsi, les cellules générées dans ces conditions expriment de faibles quantités de molécules de costimulation et une faible

expression des cytokines pro inflammatoires. Dans ce contexte, l'activation de lymphocytes T naïfs par ces DC pourrait induire l'anergie ou l'apoptose des lymphocytes T. Cet état d'anergie est favorisé par l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T et leur capacité à produire l'IL-2 et l'interféron- γ (Steinbrink et al. 1997). Plusieurs facteurs dont le TGF- β (Geissmann et al. 1999) et le VEGF (Oyama et al. 1998) ont été démontrés capable d'altérer la maturation des DC les conduisant à un phénotype immature. Nos résultats démontrent que l'effet tolérogène conférée au VEGF dans le microenvironnement tumoral pourrait être induit par l'intermédiaire de la neuropiline1 de façon TLR4 dépendante.

VEGF module la capacité fonctionnelle des DC en altérant la présentation antigénique, l'expression de molécules de surface, la sécrétion de cytokines. Conséquemment il altérerait le potentiel d'activation et de prolifération des lymphocytes. Contrairement à la stimulation LPS en présence du VEGF, la stimulation des DC avec le poly :IC ou le CPG en présence du VEGF n'affecte pas la maturation de ces cellules. Ces résultats suggèrent que l'action de VEGF semble cibler la voie TLR4 comme nous l'avons démontré. L'analyse des molécules partenaires de la neuropiline 1 après une stimulation poly :IC en présence de VEGF révèle que Nrpl et TLR3 ne forment pas un complexe (figure 23). Ces résultats suggèrent une interaction des récepteurs de surface dans le mécanisme d'action de VEGF. Nos résultats sont en accord avec les récentes données de Zhang qui rapporte que la signalisation TLR4/Myd88/ NF- κ B augmente l'expression de VEGF qui en retour exerce un feedback négatif sur l'inflammation induite par TLR4 dans les macrophages (Zhang et al. 2014).

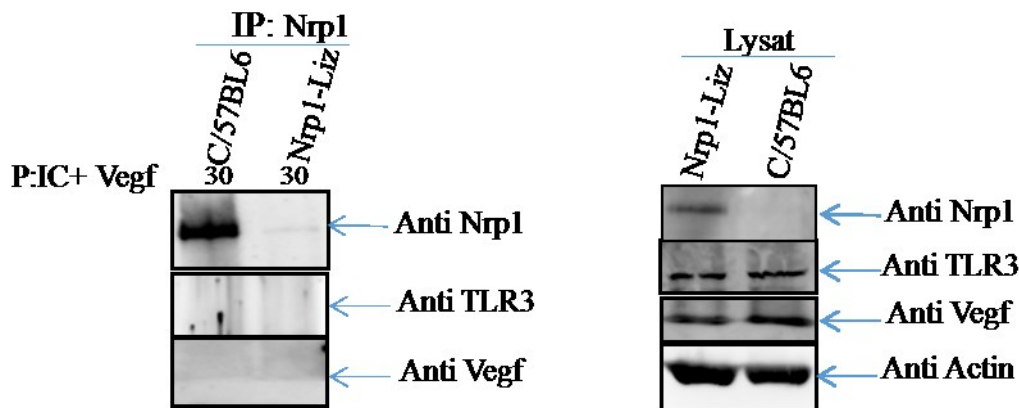


Figure 23: Interaction Nrp1-VEGF-TLR3 dans les BMDC

L'analyse western blot sur les lysats totaux des BMDC C57BL/6 et Iyz Cre M Nrp-1^{fl/fl} avec les anticorps indiqués (droite). L'immunoprécipitation de Nrp-1 des mêmes échantillons suivie de l'analyse western blot avec les anticorps indiqués. (gauche)

IV Les cellules dendritiques et l'immunothérapie

Des études relativement récentes suggèrent que VEGF pourrait jouer un rôle dans la réponse immune de l'hôte face aux tumeurs (Laxmanan et al. 2005). Les DC sont connues pour leur rôle de cellules présentatrices d'antigène avec leur capacité d'induire et de maintenir la réponse immune primaire (Banchereau et al. 2000). Ces DC lorsqu'elles rencontrent l'antigène, deviennent matures après avoir reçu les signaux de danger. Elles migrent ensuite dans les organes lymphoïdes pour activer les lymphocytes spécifiques de l'antigène (Fong and Engleman 2000). Par ailleurs, plusieurs études ont clairement établi le rôle crucial des DC dans l'immunité anti-tumorale. Le succès de l'immunothérapie anti-tumorale repose sur leurs efficaces capacités fonctionnelles (Gabrilovich, Ciernik, and Carbone 1996). L'infiltration des DC dans un modèle du cancer du poumon est associé à un bon pronostic (Zeid and Muller 1993). Ces DC infiltrant la tumeur expriment des molécules inhibitrices comme PD-1 et TIM-3 (Janco et al. 2015) et le défi serait d'identifier et de cibler les facteurs qui induisent ces molécules. Nous avons rapporté dans le deuxième manuscrit de cette thèse que VEGF inhibe la maturation des DC *in vitro* et l'utilisation d'anticorps anti VEGF augmente la fonction et le nombre des cellules *in vivo* (Gabrilovich et al. 1999). Ces observations sont en accord avec les travaux d'Inoshima qui a analysé l'expression de VEGF et l'infiltration intra tumorale des DC dans 132 spécimens de cancer du poumon (Inoshima et al. 2002). Il résulte de cette analyse, que l'expression de VEGF est inversement en corrélation avec l'infiltration des DC (Inoshima et al. 2002). Une forte infiltration intra tumorale des DC est associée à une faible expression du VEGF. Par ailleurs, Michielen utilise une autre approche pour démontrer que VEGF inhibe la maturation des DC. En effet, l'incubation de milieu de culture de spécimen de tumeur colorectal (capable de sécréter du VEGF) avec les DC inhibe la maturation des DC en réponse au LPS. Il en résulte la réduction de la sécrétion d'IL-12 avec une augmentation de la sécrétion d'IL-10 (Michielsen et al. 2011). Nos résultats comme de précédentes études

ont démontré que les DC expriment la neuropiline 1. Ainsi, en présence du LPS, la liaison de VEGF à son corécepteur dans l'environnement tumoral induirait l'inhibition des voies Erk et NF- κ B qui sont essentielles à la maturation des DC. Nos résultats offrent des perspectives intéressantes pour l'amélioration de la réponse anti-tumorale. Ainsi l'inhibition de la neuropiline1 par des anticorps bloquants ou par de petites molécules inhibitrices capables de contrer le mécanisme inhibiteur induit par VEGF pourrait être envisagée afin d'augmenter l'immunité anti tumorale. Une approche pour bloquer la neuropiline 1 dans l'environnement tumorale est l'utilisation des aptamères. Les aptamères sont des oligonucléotides (molécules d'ADN, simple ou double brin, et ARN) qui peuvent se lier avec une grande affinité et une grande spécificité à un grand nombre de molécules cibles. Pour que les aptamères soient des agents thérapeutiques efficaces, ils doivent se lier fortement à la neuropiline 1 et inhiber une fonction spécifique de cette protéine. La liaison de l'aptamère à la neuropiline1 empêcherait toute interaction avec VEGF et par conséquent empêche la propriété inhibitrice de VEGF. La neuropiline 1 est connue pour sa capacité à interagir avec plusieurs facteurs de croissance et une des stratégies pour piéger VEGF a démontré des effets anti tumoraux (Hong et al. 2007; Barr et al. 2005). D'autres stratégies consisteraient à inhiber l'expression de la neuropiline1 par de l'ARN interférence de type sh RNA et si RNA. Plusieurs études ont décrit des peptides et petites molécules inhibitrices qui ont été développées pour inhiber la fonction de la neuropiline 1 (Hong et al. 2007; Geretti et al. 2010; Barr et al. 2005; Lee et al. 2013). La plupart de ces études se sont consacrées à identifier des peptides qui pourraient empêcher la liaison du VEGF à la neuropiline 1 et donc inhiber la signalisation et la fonction de VEGF. Il est à remarquer que la séquence consensus pour que VEGF se lie est faite de R/KXXR/K présent à l'extrémité terminale de VEGF et cette séquence serait essentielle pour toute liaison de VEGF au domaine b1 de la Nrp1. Ces peptides connus sous le nom de CendR (C-end Rule) empêche la formation du complexe Nrp1/VEGFR2 et inhibe la signalisation de VEGF en favorisant une internalisation du récepteur. Ces peptides sont capables d'induire l'apoptose et d'inhiber la migration des cellules endothéliales *in vitro*. Par ailleurs, dans plusieurs modèles de cancer tels que le sein, les poumons, les leucémies et lymphome, ces peptides inhibent la croissance tumorale, les métastases et l'angiogenèse associée aux tumeurs (Barr et al. 2005). Les anticorps bloquant contre la Nrp1 (anti Nrp1A et anti Nrp1B) ont été

développés, les anticorps anti Nrp1A et anti Nrp1B ciblent respectivement les domaines de liaison de SEMA3A et de VEGF (Liang et al. 2007). De façon intéressante, ces anticorps ont montré des résultats encourageants en réduisant la croissance tumorale et l'angiogenèse (Pan et al. 2007).

V VEGF et la thérapie anti-cancéreuse

La sécrétion de VEGF dans l'environnement tumoral pourrait expliquer l'inhibition de la réponse anti tumorale comme les effets observés *in vitro*. Toutefois, plusieurs auteurs ont rapporté que l'évasion tumorale du système immunitaire résulte d'un défaut fonctionnel des DC (Gabrilovich et al. 1999; Gabrilovich, Ciernik, and Carbone 1996; Gabrilovich, Nadaf, et al. 1996; Gabrilovich, Chen, et al. 1996; Gabrilovich et al. 1997). En effet, VEGF est une cytokine essentielle à la néo vascularisation. Le développement de la néo vascularisation tumorale et l'angiogenèse tumorale sont intimement liés à la sécrétion de grandes quantités de VEGF nécessaire pour la prolifération des cellules endothéliales (Ferrara and Davis-Smyth 1997). Nos résultats corrént bien avec les observations de Lissoni qui rapporte un nombre réduit DC immature et mature chez les patients souffrant de diverses formes de cancers métastatiques avec une concentration élevée de VEGF₁₆₅ dans le sérum (Lissoni et al. 2001). Ces auteurs arrivent à une conclusion qui supporte nos résultats, à savoir que la sécrétion de VEGF dans l'environnement tumoral de l'hôte est lié à un mauvais pronostic (Ellis and Fidler 1996). Ils justifient cet état, non pas en raison de l'angiogenèse induite par VEGF, mais plutôt à cause de l'immunosuppression induite par VEGF. Le mécanisme qui sous-tend le rôle du VEGF dans la maturation des DC est bien démontré dans le deuxième manuscrit de cette thèse. Il explique beaucoup de mécanismes mis en place par les cellules tumorales pour échapper à la réponse anti-tumorale. D'ailleurs, plusieurs mécanismes d'évasion tumorale médiée par VEGF ont été décrits, mais peu de choses étaient connues quant au mode d'action du VEGF. Cette thèse apporte la clarification sur un des mécanismes de l'inhibition de VEGF médié par son interaction avec la neuropiline 1. Zhan a analysé les données issues de plusieurs études sur le rôle de VEGF dans la progression du cancer de la prostate. Il démontre que la surexpression de

VEGF a un impact défavorable à la survie des patients souffrant du cancer de la prostate (Zhan, Ji, and Yu 2013). Ces observations offrent des implications thérapeutiques intéressantes au cancer. Des anticorps anti-VEGF et des inhibiteurs de VEGF constituent des sources thérapeutiques à explorer. De même, les anticorps anti Nrp1 pourraient être administrés, ce qui pourrait empêcher toute liaison du VEGF dont le mode d'action est d'induire l'inhibition de la maturation des DC dans l'environnement tumoral. Le défi des prochaines années dans le combat contre le cancer est de mieux comprendre le mécanisme d'action des facteurs impliqués dans l'angiogenèse. Parmi ces facteurs, figure le VEGF dont un des mécanismes d'action est rapporté dans cette thèse. Dans ce registre, Lee et al ont évalué l'effet de la bevacizumab, un anticorps monoclonal humanisé spécifique de VEGFA, et du sunitinib, un inhibiteur des tyrosines kinases incluant VEGFR utilisés dans le traitement du cancer rénal (Lee et al. 2016). Les résultats montrant une réduction de la masse tumorale sont sporadiques et peu fréquents. Toutefois, des études au niveau moléculaire pour élucider le rôle de ces facteurs dans l'environnement tumoral doivent être intensifiées. Les modèles de l'immunothérapie utilisant les DC comme le modèle de mélanome, une source importante de sécrétion de VEGF pourraient permettre de mieux comprendre le rôle de VEGF dans cet environnement. Les expériences faites au laboratoire ont montré que VEGF n'est pas capable d'inhiber la maturation induite par le poly : IC ou le CPG. VEGF est l'un des facteurs sécrétés abondamment par différents types de cancer. Dans un contexte tumoral très agressif, ces facteurs sécrétés en très forte concentration pourraient agir pour inhiber la réponse anti tumorale. La concentration de VEGF et d'autres facteurs retrouvés dans l'environnement tumorale est très importante pour l'induction des effets observés *in vivo*.

VI SEMA3A et la thérapie anti-cancéreuse

Nos résultats ont par ailleurs démontré que SEMA3A, un autre ligand de la neuropiline 1, inhibe la maturation des DC avec les mêmes effets sur les molécules de costimulation comme observé avec le VEGF. SEMA3A est une protéine capable de diffuser et d'affecter la croissance tumorale en agissant directement sur la physiologie de ces cellules ou sur le

microenvironnement tumoral (Nasarre, Gemmill, and Drabkin 2014). SEMA3A fait partie de la famille des sémaphorines capables de favoriser la prolifération tumorale et des métastases dépendamment du contexte et du stade de prolifération des tumeurs. Ainsi, l'analyse des métastases venant de plusieurs patients souffrant du cancer du pancréas révèle une forte expression de l'ARN messager de SEMA3A, Nrp1 et de plexin A1. Leur niveau d'expression corrèle avec un mauvais pronostic de la maladie (Muller et al. 2007). Dans cette étude, SEMA3A active plusieurs voies de signalisation allant de la voie Rac1, Erk1/2 et la voie GSK. Les observations du rôle de SEMA3A dans la maturation des DC rapportées dans cette thèse confortent les résultats de Catalano (Catalano et al. 2006). En effet, il démontre que la sécrétion de SEMA3A par les cellules tumorales inhibe la réponse immune en bloquant la prolifération des lymphocytes T et la sécrétion des cytokines. Dans ce modèle, SEMA3A inhibe la différenciation des lymphocytes T induite par l'activation CD3/CD28 en inhibant la voie MAP kinase. Par ailleurs, dans les cellules cancéreuses du colon, SEMA3A induit une invasion cellulaire qui implique la signalisation des MAP Kinases et du Rac1 (Nguyen et al. 2006). Les résultats obtenus nous permettent de proposer des stratégies thérapeutiques ciblant SEMA3A dans l'environnement tumoral. Les approches thérapeutiques visent d'une part à inhiber l'effet de survie tumorale de SEMA3A et d'autre part de bloquer cet effet par d'autres facteurs de croissance capables de se lier à la neuropiline 1. A cet effet, des études précliniques ont été récemment rapportées au cours duquel, un peptide dérivé de plexine D1 utilisé pour piéger le ligand (ligand trap) pour inhiber l'effet tumorigène de SEMA3E (Luchino et al. 2013). De même, dans le cancer du côlon et du gliome, l'effet immuno suppressive de SEMA3A pourrait être inhibé par son inhibiteur sélectif, SM-216289 qui interfère sa liaison à la neuropiline.1 (Kaneko et al. 2006)

Conclusion :

Cette thèse est consacrée au rôle de deux corécepteurs impliqués dans le maintien des lymphocytes T et dans la maturation des DC. Nous avons contribué à l'évolution de la compréhension des signaux qui participent au maintien des lymphocytes T mémoires d'une part et d'autre part à la régulation de la maturation des DC. Par notre modèle de souris transgénique OT-I TRAF1^{-/-}, nous avons pu démontrer que l'état de phosphorylation de TRAF1 en aval du récepteur 4-1BB module la survie des lymphocytes T CD8. 4-1BB joue ce rôle en recrutant des protéines partenaires qui vont moduler la signalisation NF- κ B. L'intérêt d'étudier les signaux qui maintiennent les lymphocytes T mémoires se traduit par leur capacité de protection à long terme contre les infections subséquentes. Le potentiel thérapeutique des lymphocytes mémoires constituent une avenue prometteuse pour la recherche médicale. Nos travaux ont contribué à une meilleure compréhension des signaux requis pour le maintien des lymphocytes mémoires. Une meilleure compréhension du mécanisme de maintien de ces lymphocytes permettra l'élaboration de vaccins beaucoup plus efficaces car l'efficacité de la vaccination repose sur l'induction d'une réponse immunitaire mémoire protectrice. Par ailleurs dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons élucidé le mécanisme d'action de VEGF dans la maturation des DC. En effet, nous avons démontré que VEGF inhibe la maturation des DC via son interaction avec son corécepteur, la neuropiline 1. Les études apportent une meilleure contribution en ce qui concerne la compréhension du mécanisme d'action du VEGF dans les environnements tumoraux. Cette interaction avec la neuropiline 1 inhibe la maturation des DC induite par le LPS en inhibant la signalisation dépendante de TLR4. Nos résultats ouvrent des perspectives thérapeutiques ciblant la neuropiline 1 dans l'utilisation des DC en immunothérapie du cancer

En utilisant des approches d'ARN interférence, le rôle du TBK1 dans le maintien des cellules CD8 mémoires pourrait être évalué. Ainsi, des expériences ciblant le TBK1 permettront de mesurer sa contribution dans le maintien des lymphocytes TCD8 exprimant le TRAF1 S139A en aval de 4-1BB.

Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier dans un modèle tumoral comme le mélanome où l'on observe une forte sécrétion de VEGF le rôle BMDC dans l'environnement tumoral. Ainsi, l'injection des cellules B16F10 en sous cutanée à des souris C57BL/6 pourrait être suivie de l'injection dans le microenvironnement tumoral des BMDC WT ou NRP-1 KO. Ces expériences pourraient permettre d'évaluer d'une part l'état de la maturation dans les deux environnements et d'autre part, la réponse anti tumorale.

Bibliographie

- Acuto, O., V. Di Bartolo, and F. Michel. 2008. Tailoring T-cell receptor signals by proximal negative feedback mechanisms. *Nat Rev Immunol* 8 (9):699-712.
- Acuto, O., and F. Michel. 2003. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 3 (12):939-51.
- Akiba, H., H. Oshima, K. Takeda, M. Atsuta, H. Nakano, A. Nakajima, C. Nohara, H. Yagita, and K. Okumura. 1999. CD28-independent costimulation of T cells by OX40 ligand and CD70 on activated B cells. *J Immunol* 162 (12):7058-66.
- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124 (4):783-801.
- Akira, Shizuo, and Kiyoshi Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4 (7):499-511.
- Alfaro, C., N. Suarez, A. Gonzalez, S. Solano, L. Erro, J. Dubrot, A. Palazon, S. Hervas-Stubbs, A. Gurrpide, J. M. Lopez-Picazo, E. Grande-Pulido, I. Melero, and J. L. Perez-Gracia. 2009. Influence of bevacizumab, sunitinib and sorafenib as single agents or in combination on the inhibitory effects of VEGF on human dendritic cell differentiation from monocytes. *Br J Cancer* 100 (7):1111-9.
- Angelosanto, J. M., S. D. Blackburn, A. Crawford, and E. J. Wherry. 2012. Progressive loss of memory T cell potential and commitment to exhaustion during chronic viral infection. *J Virol* 86 (15):8161-70.
- Arimura, Y., H. Kato, U. Dianzani, T. Okamoto, S. Kamekura, D. Buonfiglio, T. Miyoshi-Akiyama, T. Uchiyama, and J. Yagi. 2002. A co-stimulatory molecule on activated T cells, H4/ICOS, delivers specific signals in T(h) cells and regulates their responses. *Int Immunol* 14 (6):555-66.
- Arron, J. R., Y. Pewzner-Jung, M. C. Walsh, T. Kobayashi, and Y. Choi. 2002. Regulation of the subcellular localization of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)2 by TRAF1 reveals mechanisms of TRAF2 signaling. *J Exp Med* 196 (7):923-34.
- Arron, J. R., M. C. Walsh, and Y. Choi. 2002. TRAF-mediated TNFR-family signaling. *Curr Protoc Immunol* Chapter 11:Unit 11 9D.
- Artyomov, M. N., M. Lis, S. Devadas, M. M. Davis, and A. K. Chakraborty. 2010. CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (39):16916-21.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811.
- Banchereau, J., B. Dubois, J. Fayette, N. Burdin, F. Briere, P. Miossec, M. C. Rissoan, C. van Kooten, and C. Caux. 1995. Functional CD40 antigen on B cells, dendritic cells and fibroblasts. *Adv Exp Med Biol* 378:79-83.
- Banerjee, A., S. M. Gordon, A. M. Intlekofer, M. A. Paley, E. C. Mooney, T. Lindsten, E. J. Wherry, and S. L. Reiner. 2010. Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8+ T cells to compete for the memory cell niche. *J Immunol* 185 (9):4988-92.
- Barbie, D. A., P. Tamayo, J. S. Boehm, S. Y. Kim, S. E. Moody, I. F. Dunn, A. C. Schinzel, P. Sandy, E. Meylan, C. Scholl, S. Frohling, E. M. Chan, M. L. Sos, K. Michel, C. Mermel, S. J. Silver, B. A. Weir, J. H. Reiling, Q. Sheng, P. B. Gupta, R. C. Wadlow, H. Le, S. Hoersch, B. S. Wittner, S. Ramaswamy, D. M. Livingston, D. M. Sabatini, M. Meyerson, R. K. Thomas, E. S. Lander, J. P. Mesirov, D. E. Root, D. G. Gilliland, T. Jacks, and W. C. Hahn. 2009.

- Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* 462 (7269):108-12.
- Barr, M. P., A. M. Byrne, A. M. Duffy, C. M. Condrón, M. Devocelle, P. Harriott, D. J. Bouchier-Hayes, and J. H. Harmey. 2005. A peptide corresponding to the neuropilin-1-binding site on VEGF(165) induces apoptosis of neuropilin-1-expressing breast tumour cells. *Br J Cancer* 92 (2):328-33.
- Battaglia, A., A. Buzzonetti, G. Monego, L. Peri, G. Ferrandina, F. Fanfani, G. Scambia, and A. Fattorossi. 2008. Neuropilin-1 expression identifies a subset of regulatory T cells in human lymph nodes that is modulated by preoperative chemoradiation therapy in cervical cancer. *Immunology* 123 (1):129-38.
- Baum, P. R., R. B. Gayle, 3rd, F. Ramsdell, S. Srinivasan, R. A. Sorensen, M. L. Watson, M. F. Seldin, E. Baker, G. R. Sutherland, K. N. Clifford, and et al. 1994. Molecular characterization of murine and human OX40/OX40 ligand systems: identification of a human OX40 ligand as the HTLV-1-regulated protein gp34. *EMBO J* 13 (17):3992-4001.
- Bennett, F., D. Luxenberg, V. Ling, I. M. Wang, K. Marquette, D. Lowe, N. Khan, G. Veldman, K. A. Jacobs, V. E. Valge-Archer, M. Collins, and B. M. Carreno. 2003. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol* 170 (2):711-8.
- Bensinger, S. J., A. Bandeira, M. S. Jordan, A. J. Caton, and T. M. Laufer. 2001. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J Exp Med* 194 (4):427-38.
- Bertram, E. M., P. Lau, and T. H. Watts. 2002. Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection. *J Immunol* 168 (8):3777-85.
- Bishop, G. A., C. R. Moore, P. Xie, L. L. Stunz, and Z. J. Kraus. 2007. TRAF proteins in CD40 signaling. *Adv Exp Med Biol* 597:131-51.
- Bisson, N., D. A. James, G. Ivosev, S. A. Tate, R. Bonner, L. Taylor, and T. Pawson. 2011. Selected reaction monitoring mass spectrometry reveals the dynamics of signaling through the GRB2 adaptor. *Nat Biotechnol* 29 (7):653-8.
- Blasius, A. L., and B. Beutler. 2010. Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 32 (3):305-15.
- Bonnard, M., C. Mirtsos, S. Suzuki, K. Graham, J. Huang, M. Ng, A. Itie, A. Wakeham, A. Shahinian, W. J. Henzel, A. J. Elia, W. Shillinglaw, T. W. Mak, Z. Cao, and W. C. Yeh. 2000. Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF-kappaB-dependent gene transcription. *EMBO J* 19 (18):4976-85.
- Bourbie-Vaudaine, S., N. Blanchard, C. Hivroz, and P. H. Romeo. 2006. Dendritic cells can turn CD4+ T lymphocytes into vascular endothelial growth factor-carrying cells by intercellular neuropilin-1 transfer. *J Immunol* 177 (3):1460-9.
- Boyman, O., S. Letourneau, C. Krieg, and J. Sprent. 2009. Homeostatic proliferation and survival of naive and memory T cells. *Eur J Immunol* 39 (8):2088-94.
- Brocker, T. 1997. Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med* 186 (8):1223-32.
- Brossard, C., V. Feuillet, A. Schmitt, C. Randriamampita, M. Romao, G. Raposo, and A. Trautmann. 2005. Multifocal structure of the T cell - dendritic cell synapse. *Eur J Immunol* 35 (6):1741-53.
- Brownlie, R. J., and R. Zamoyka. 2013. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol* 13 (4):257-69.

- Bruder, D., M. Probst-Kepper, A. M. Westendorf, R. Geffers, S. Beissert, K. Loser, H. von Boehmer, J. Buer, and W. Hansen. 2004. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 34 (3):623-30.
- Bukczynski, J., T. Wen, and T. H. Watts. 2003. Costimulation of human CD28- T cells by 4-1BB ligand. *Eur J Immunol* 33 (2):446-54.
- Cannarile, M. A., N. A. Lind, R. Rivera, A. D. Sheridan, K. A. Camfield, B. B. Wu, K. P. Cheung, Z. Ding, and A. W. Goldrath. 2006. Transcriptional regulator Id2 mediates CD8+ T cell immunity. *Nat Immunol* 7 (12):1317-25.
- Cannons, J. L., P. Lau, B. Ghumman, M. A. DeBenedette, H. Yagita, K. Okumura, and T. H. Watts. 2001. 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J Immunol* 167 (3):1313-24.
- Cao, Z., J. Xiong, M. Takeuchi, T. Kurama, and D. V. Goeddel. 1996. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383:443-6.
- Carbone, E., G. Ruggiero, G. Terrazzano, C. Palomba, C. Manzo, S. Fontana, H. Spits, K. Karre, and S. Zappacosta. 1997. A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. *J Exp Med* 185 (12):2053-60.
- Carlson, C. M., B. T. Endrizzi, J. Wu, X. Ding, M. A. Weinreich, E. R. Walsh, M. A. Wani, J. B. Lingrel, K. A. Hogquist, and S. C. Jameson. 2006. Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature* 442 (7100):299-302.
- Carter, L., L. A. Fouser, J. Jussif, L. Fitz, B. Deng, C. R. Wood, M. Collins, T. Honjo, G. J. Freeman, and B. M. Carreno. 2002. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol* 32 (3):634-43.
- Catalano, A. 2010. The neuroimmune semaphorin-3A reduces inflammation and progression of experimental autoimmune arthritis. *J Immunol* 185 (10):6373-83.
- Catalano, A., P. Caprari, S. Moretti, M. Faronato, L. Tamagnone, and A. Procopio. 2006. Semaphorin-3A is expressed by tumor cells and alters T-cell signal transduction and function. *Blood* 107 (8):3321-9.
- Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters, and A. Lanzavecchia. 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388 (6644):782-7.
- Cella, M., M. Salio, Y. Sakakibara, H. Langen, I. Julkunen, and A. Lanzavecchia. 1999. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med* 189 (5):821-9.
- Chang, J. T., E. J. Wherry, and A. W. Goldrath. 2014. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat Immunol* 15 (12):1104-15.
- Chaudhary, B., Y. S. Khaled, B. J. Ammori, and E. Elkord. 2014. Neuropilin 1: function and therapeutic potential in cancer. *Cancer Immunol Immunother* 63 (2):81-99.
- Chen, L. 2004. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* 4 (5):336-47.
- Chen, L., and D. B. Flies. 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13 (4):227-42.
- Cheng, G., and D. Baltimore. 1996. TANK, a co-inducer with TRAF2 of TNF- and CD 40L-mediated NF-kappaB activation. *Genes Dev* 10 (8):963-73.
- Chin, A. I., J. Shu, C. Shan Shi, Z. Yao, J. H. Kehrl, and G. Cheng. 1999. TANK potentiates tumor necrosis factor receptor-associated factor-mediated c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation through the germinal center kinase pathway. *Mol Cell Biol* 19 (10):6665-72.

- Chistiakov, D. A., A. N. Orekhov, I. A. Sobenin, and Y. V. Bobryshev. 2014. Plasmacytoid dendritic cells: development, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Front Physiol* 5:279.
- Chistiakov, D. A., I. A. Sobenin, A. N. Orekhov, and Y. V. Bobryshev. 2015. Myeloid dendritic cells: Development, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Immunobiology* 220 (6):833-44.
- Chung, A. S., and N. Ferrara. 2011. Developmental and pathological angiogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:563-84.
- Chung, J. Y., Y. C. Park, H. Ye, and H. Wu. 2002. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* 115 (Pt 4):679-88.
- Cooper, D., P. Bansal-Pakala, and M. Croft. 2002. 4-1BB (CD137) controls the clonal expansion and survival of CD8 T cells in vivo but does not contribute to the development of cytotoxicity. *Eur J Immunol* 32 (2):521-9.
- Corbel, C., V. Lemarchandel, V. Thomas-Vaslin, A. S. Pelus, C. Agboton, and P. H. Romeo. 2007. Neuropilin 1 and CD25 co-regulation during early murine thymic differentiation. *Dev Comp Immunol* 31 (11):1082-94.
- Coyle, A. J., S. Lehar, C. Lloyd, J. Tian, T. Delaney, S. Manning, T. Nguyen, T. Burwell, H. Schneider, J. A. Gonzalo, M. Gosselin, L. R. Owen, C. E. Rudd, and J. C. Gutierrez-Ramos. 2000. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 13 (1):95-105.
- Croft, M. 2003. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 3 (8):609-20.
- Repeated Author. 2009. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol* 9 (4):271-85.
- Crotty, S., R. J. Johnston, and S. P. Schoenberger. 2010. Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat Immunol* 11 (2):114-20.
- Cui, W., Y. Liu, J. S. Weinstein, J. Craft, and S. M. Kaech. 2011. An interleukin-21-interleukin-10-STAT3 pathway is critical for functional maturation of memory CD8+ T cells. *Immunity* 35 (5):792-805.
- Danese, S., M. Sans, and C. Focchi. 2004. The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease. *Gut* 53 (7):1035-43.
- Davis, S. J., and P. A. van der Merwe. 2006. The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond. *Nat Immunol* 7 (8):803-9.
- Dawicki, W., and T. H. Watts. 2004. Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo. *Eur J Immunol* 34 (3):743-51.
- Deindl, S., T. A. Kadlecsek, T. Brdicka, X. Cao, A. Weiss, and J. Kuriyan. 2007. Structural basis for the inhibition of tyrosine kinase activity of ZAP-70. *Cell* 129 (4):735-46.
- Delgoffe, G. M., S. R. Woo, M. E. Turnis, D. M. Gravano, C. Guy, A. E. Overacre, M. L. Bettini, P. Vogel, D. Finkelstein, J. Bonnevier, C. J. Workman, and D. A. Vignali. 2013. Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis. *Nature* 501 (7466):252-6.
- Dempsey, P. W., S. E. Doyle, J. Q. He, and G. Cheng. 2003. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 14 (3-4):193-209.
- Diamond, M. S., M. Kinder, H. Matsushita, M. Mashayekhi, G. P. Dunn, J. M. Archambault, H. Lee, C. D. Arthur, J. M. White, U. Kalinke, K. M. Murphy, and R. D. Schreiber. 2011. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med* 208 (10):1989-2003.

- Diehl, L., G. J. van Mierlo, A. T. den Boer, E. van der Voort, M. Fransen, L. van Bostelen, P. Krimpenfort, C. J. Melief, R. Mittler, R. E. Toes, and R. Offringa. 2002. In vivo triggering through 4-1BB enables Th-independent priming of CTL in the presence of an intact CD28 costimulatory pathway. *J Immunol* 168 (8):3755-62.
- Dijkers, P. F., R. H. Medema, J. W. Lammers, L. Koenderman, and P. J. Coffey. 2000. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol* 10 (19):1201-4.
- Djordjevic, S., and P. C. Driscoll. 2013. Targeting VEGF signalling via the neuropilin co-receptor. *Drug Discov Today* 18 (9-10):447-55.
- Dolan, J., K. Walshe, S. Alsbury, K. Hokamp, S. O'Keeffe, T. Okafuji, S. F. Miller, G. Tear, and K. J. Mitchell. 2007. The extracellular leucine-rich repeat superfamily; a comparative survey and analysis of evolutionary relationships and expression patterns. *BMC Genomics* 8:320.
- Dong, H., G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen. 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5 (12):1365-9.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, P. F. Robbins, J. C. Yang, P. Hwu, D. J. Schwartzentruber, S. L. Topalian, R. Sherry, N. P. Restifo, A. M. Hubicki, M. R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C. A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, D. E. White, and S. A. Rosenberg. 2002. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298 (5594):850-4.
- Durkop, H., B. Hirsch, C. Hahn, H. D. Foss, and H. Stein. 2003. Differential expression and function of A20 and TRAF1 in Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma and their induction by CD30 stimulation. *J Pathol* 200 (2):229-39.
- Dzionic, A., A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D. W. Buck, and J. Schmitz. 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165 (11):6037-46.
- Dzionic, A., Y. Inagaki, K. Okawa, J. Nagafune, J. Rock, Y. Sohma, G. Winkels, M. Zysk, Y. Yamaguchi, and J. Schmitz. 2002. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol* 63 (12):1133-48.
- Egen, J. G., and J. P. Allison. 2002. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 16 (1):23-35.
- Elgueta, R., M. J. Benson, V. C. de Vries, A. Wasiuk, Y. Guo, and R. J. Noelle. 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 229 (1):152-72.
- Ellis, L. M., and I. J. Fidler. 1996. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 32A (14):2451-60.
- Ermolaeva, M. A., M. C. Michallet, N. Papadopoulou, O. Utermohlen, K. Kranidioti, G. Kollias, J. Tschopp, and M. Pasparakis. 2008. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nat Immunol* 9 (9):1037-46.
- Evans, I. M., M. Yamaji, G. Britton, C. Pellet-Many, C. Lockie, I. C. Zachary, and P. Frankel. 2011. Neuropilin-1 signaling through p130Cas tyrosine phosphorylation is essential for growth factor-dependent migration of glioma and endothelial cells. *Mol Cell Biol* 31 (6):1174-85.
- Fan, X. H., B. H. Han, Q. G. Dong, H. F. Sha, G. L. Bao, and M. L. Liao. 2003. [Vascular endothelial growth factor inhibits dendritic cells from patients with non-small cell lung carcinoma]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 26 (9):539-43.
- Fantin, A., B. Herzog, M. Mahmoud, M. Yamaji, A. Plein, L. Denti, C. Ruhrberg, and I. Zachary. 2014. Neuropilin 1 (NRP1) hypomorphism combined with defective VEGF-A binding reveals novel roles for NRP1 in developmental and pathological angiogenesis. *Development* 141 (3):556-62.

- Fantin, A., J. M. Vieira, A. Plein, L. Denti, M. Fruttiger, J. W. Pollard, and C. Ruhrberg. 2013. NRP1 acts cell autonomously in endothelium to promote tip cell function during sprouting angiogenesis. *Blood* 121 (12):2352-62.
- Ferrara, N., and T. Davis-Smyth. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18 (1):4-25.
- Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, P. Vieira, T. R. Mosmann, M. Howard, K. W. Moore, and A. O'Garra. 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146 (10):3444-51.
- Fong, L., and E. G. Engleman. 2000. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 18:245-73.
- Fry, T. J., and C. L. Mackall. 2005. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J Immunol* 174 (11):6571-6.
- Fuertes, M. B., A. K. Kacha, J. Kline, S. R. Woo, D. M. Kranz, K. M. Murphy, and T. F. Gajewski. 2011. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8 α + dendritic cells. *J Exp Med* 208 (10):2005-16.
- Fuh, G., K. C. Garcia, and A. M. de Vos. 2000. The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J Biol Chem* 275 (35):26690-5.
- Futagawa, T., H. Akiba, T. Kodama, K. Takeda, Y. Hosoda, H. Yagita, and K. Okumura. 2002. Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. *Int Immunol* 14 (3):275-86.
- Gabrilovich, D. I., H. L. Chen, K. R. Girgis, H. T. Cunningham, G. M. Meny, S. Nadaf, D. Kavanaugh, and D. P. Carbone. 1996. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 2 (10):1096-103.
- Gabrilovich, D. I., I. F. Ciernik, and D. P. Carbone. 1996. Dendritic cells in antitumor immune responses. I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts. *Cell Immunol* 170 (1):101-10.
- Gabrilovich, D. I., J. Corak, I. F. Ciernik, D. Kavanaugh, and D. P. Carbone. 1997. Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 3 (3):483-90.
- Gabrilovich, D. I., T. Ishida, S. Nadaf, J. E. Ohm, and D. P. Carbone. 1999. Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. *Clin Cancer Res* 5 (10):2963-70.
- Gabrilovich, D. I., S. Nadaf, J. Corak, J. A. Berzofsky, and D. P. Carbone. 1996. Dendritic cells in antitumor immune responses. II. Dendritic cells grown from bone marrow precursors, but not mature DC from tumor-bearing mice, are effective antigen carriers in the therapy of established tumors. *Cell Immunol* 170 (1):111-9.
- Gaspal, F. M., M. Y. Kim, F. M. McConnell, C. Raykundalia, V. Bekiaris, and P. J. Lane. 2005. Mice deficient in OX40 and CD30 signals lack memory antibody responses because of deficient CD4 T cell memory. *J Immunol* 174 (7):3891-6.
- Geissmann, F., P. Revy, A. Regnault, Y. Lepelletier, M. Dy, N. Brousse, S. Amigorena, O. Hermine, and A. Durandy. 1999. TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol* 162 (8):4567-75.
- Geretti, E., L. A. van Meeteren, A. Shimizu, A. C. Dudley, L. Claesson-Welsh, and M. Klagsbrun. 2010. A mutated soluble neuropilin-2 B domain antagonizes vascular endothelial growth factor bioactivity and inhibits tumor progression. *Mol Cancer Res* 8 (8):1063-73.
- Ghez, D., Y. Lepelletier, K. S. Jones, C. Pique, and O. Hermine. 2010. Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex. *Retrovirology* 7:99.

- Gil, M. P., R. Salomon, J. Louten, and C. A. Biron. 2006. Modulation of STAT1 protein levels: a mechanism shaping CD8 T-cell responses in vivo. *Blood* 107 (3):987-93.
- Glinka, Y., and G. J. Prud'homme. 2008. Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J Leukoc Biol* 84 (1):302-10.
- Glinka, Y., S. Stoilova, N. Mohammed, and G. J. Prud'homme. 2011. Neuropilin-1 exerts co-receptor function for TGF-beta-1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF-beta. *Carcinogenesis* 32 (4):613-21.
- Goel, H. L., and A. M. Mercurio. 2013. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer* 13 (12):871-82.
- Goodwin, R. G., W. S. Din, T. Davis-Smith, D. M. Anderson, S. D. Gimpel, T. A. Sato, C. R. Maliszewski, C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and et al. 1993. Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Eur J Immunol* 23 (10):2631-41.
- Gough, D. J., A. Corlett, K. Schlessinger, J. Wegrzyn, A. C. Larner, and D. E. Levy. 2009. Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. *Science* 324 (5935):1713-6.
- Graf, D., S. Muller, U. Korthauer, C. van Kooten, C. Weise, and R. A. Kroccek. 1995. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol* 25 (6):1749-54.
- Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, and M. L. Dustin. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285 (5425):221-7.
- Gramaglia, I., D. Cooper, K. T. Miner, B. S. Kwon, and M. Croft. 2000. Co-stimulation of antigen-specific CD4 T cells by 4-1BB ligand. *Eur J Immunol* 30 (2):392-402.
- Gramaglia, I., A. Jember, S. D. Pippig, A. D. Weinberg, N. Killeen, and M. Croft. 2000. The OX40 costimulatory receptor determines the development of CD4 memory by regulating primary clonal expansion. *J Immunol* 165 (6):3043-50.
- Gramaglia, I., A. D. Weinberg, M. Lemon, and M. Croft. 1998. Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J Immunol* 161 (12):6510-7.
- Green, J. M., P. J. Noel, A. I. Sperling, T. L. Walunas, G. S. Gray, J. A. Bluestone, and C. B. Thompson. 1994. Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity* 1 (6):501-8.
- Greenwald, R. J., G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23:515-48.
- Gu, C., E. R. Rodriguez, D. V. Reimert, T. Shu, B. Fritsch, L. J. Richards, A. L. Kolodkin, and D. D. Ginty. 2003. Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Dev Cell* 5 (1):45-57.
- Ha, H., D. Han, and Y. Choi. 2009. TRAF-mediated TNFR-family signaling. *Curr Protoc Immunol* Chapter 11:Unit11 9D.
- Hacker, H., H. Mischak, G. Hacker, S. Eser, N. Prenzel, A. Ullrich, and H. Wagner. 1999. Cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinases by CpG-DNA controls interleukin-12 release from antigen-presenting cells. *EMBO J* 18 (24):6973-82.
- Haniffa, M., M. Collin, and F. Ginhoux. 2013. Ontogeny and functional specialization of dendritic cells in human and mouse. *Adv Immunol* 120:1-49.
- Hansen, W., M. Hutzler, S. Abel, C. Alter, C. Stockmann, S. Kliche, J. Albert, T. Sparwasser, S. Sakaguchi, A. M. Westendorf, D. Schadendorf, J. Buer, and I. Helfrich. 2012. Neuropilin 1

- deficiency on CD4+Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *J Exp Med* 209 (11):2001-16.
- Harada, Y., D. Ohgai, R. Watanabe, K. Okano, O. Koiwai, K. Tanabe, H. Toma, A. Altman, and R. Abe. 2003. A single amino acid alteration in cytoplasmic domain determines IL-2 promoter activation by ligation of CD28 but not inducible costimulator (ICOS). *J Exp Med* 197 (2):257-62.
- Hartmann, G., G. J. Weiner, and A. M. Krieg. 1999. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (16):9305-10.
- Hataye, J., J. J. Moon, A. Khoruts, C. Reilly, and M. K. Jenkins. 2006. Naive and memory CD4+ T cell survival controlled by clonal abundance. *Science* 312 (5770):114-6.
- Hattori, K., S. Dias, B. Heissig, N. R. Hackett, D. Lyden, M. Tateno, D. J. Hicklin, Z. Zhu, L. Witte, R. G. Crystal, M. A. Moore, and S. Rafii. 2001. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 193 (9):1005-14.
- Hayden, M. S., A. P. West, and S. Ghosh. 2006. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25 (51):6758-80.
- Heinisch, I. V., C. Bizer, W. Volgger, and H. U. Simon. 2001. Functional CD137 receptors are expressed by eosinophils from patients with IgE-mediated allergic responses but not by eosinophils from patients with non-IgE-mediated eosinophilic disorders. *J Allergy Clin Immunol* 108 (1):21-8.
- Hildeman, D., T. Jorgensen, J. Kappler, and P. Marrack. 2007. Apoptosis and the homeostatic control of immune responses. *Curr Opin Immunol* 19 (5):516-21.
- Hivroz, C., K. Chemin, M. Tourret, and A. Bohineust. 2012. Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells. *Crit Rev Immunol* 32 (2):139-55.
- Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, and F. R. Carbone. 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76:17-27.
- Hong, T. M., Y. L. Chen, Y. Y. Wu, A. Yuan, Y. C. Chao, Y. C. Chung, M. H. Wu, S. C. Yang, S. H. Pan, J. Y. Shih, W. K. Chan, and P. C. Yang. 2007. Targeting neuropilin 1 as an antitumor strategy in lung cancer. *Clin Cancer Res* 13 (16):4759-68.
- Hubo, M., B. Trinschek, F. Kryczanowsky, A. Tuettenberg, K. Steinbrink, and H. Jonuleit. 2013. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol* 4:82.
- Hughes, E. A., C. Hammond, and P. Cresswell. 1997. Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (5):1896-901.
- Humphreys, I. R., L. Edwards, G. Walzl, A. J. Rae, G. Dougan, S. Hill, and T. Hussell. 2003. OX40 ligation on activated T cells enhances the control of *Cryptococcus neoformans* and reduces pulmonary eosinophilia. *J Immunol* 170 (12):6125-32.
- Hurtado, J. C., Y. J. Kim, and B. S. Kwon. 1997. Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. *J Immunol* 158 (6):2600-9.
- Hutloff, A., A. M. Dittrich, K. C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos, and R. A. Kroccek. 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397 (6716):263-6.
- Ichii, H., A. Sakamoto, M. Hatano, S. Okada, H. Toyama, S. Taki, M. Arima, Y. Kuroda, and T. Tokuhisa. 2002. Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* 3 (6):558-63.

- Ichii, H., A. Sakamoto, Y. Kuroda, and T. Tokuhiya. 2004. Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8⁺ T cells. *J Immunol* 173 (2):883-91.
- Inaba, K., M. Pack, M. Inaba, H. Sakuta, F. Isdell, and R. M. Steinman. 1997. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med* 186 (5):665-72.
- Inoshima, N., Y. Nakanishi, T. Minami, M. Izumi, K. Takayama, I. Yoshino, and N. Hara. 2002. The influence of dendritic cell infiltration and vascular endothelial growth factor expression on the prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 8 (11):3480-6.
- Inoue, Ji, T. Ishida, N. Tsukamoto, N. Kobayashi, A. Naito, S. Azuma, and T. Yamamoto. 2000. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res* 254 (1):14-24.
- Intlekofer, A. M., A. Banerjee, N. Takemoto, S. M. Gordon, C. S. Dejong, H. Shin, C. A. Hunter, E. J. Wherry, T. Lindsten, and S. L. Reiner. 2008. Anomalous type 17 response to viral infection by CD8⁺ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science* 321 (5887):408-11.
- Intlekofer, A. M., N. Takemoto, C. Kao, A. Banerjee, F. Schambach, J. K. Northrop, H. Shen, E. J. Wherry, and S. L. Reiner. 2007. Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 204 (9):2015-21.
- Ito, T., M. Yang, Y. H. Wang, R. Lande, J. Gregorio, O. A. Perng, X. F. Qin, Y. J. Liu, and M. Gilliet. 2007. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* 204 (1):105-15.
- Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* 16 (4):343-53.
- Janco, J. M. T., P. Lamichhane, L. Karyampudi, and K. L. Knutson. 2015. TUMOR-INFILTRATING DENDRITIC CELLS IN CANCER PATHOGENESIS(1). *J Immunol* 194 (7):2985-91.
- Janeway, C. A., Jr. 2001. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (13):7461-8.
- Janssen, B. J., T. Malinauskas, G. A. Weir, M. Z. Cader, C. Siebold, and E. Y. Jones. 2012. Neuropilins lock secreted semaphorins onto plexins in a ternary signaling complex. *Nat Struct Mol Biol* 19 (12):1293-9.
- Jenkins, M. K., P. S. Taylor, S. D. Norton, and K. B. Urdahl. 1991. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* 147 (8):2461-6.
- Ji, Y., Z. Pos, M. Rao, C. A. Klebanoff, Z. Yu, M. Sukumar, R. N. Reger, D. C. Palmer, Z. A. Borman, P. Muranski, E. Wang, D. S. Schrupp, F. M. Marincola, N. P. Restifo, and L. Gattinoni. 2011. Repression of the DNA-binding inhibitor Id3 by Blimp-1 limits the formation of memory CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* 12 (12):1230-7.
- Jiang, Q., W. Q. Li, F. B. Aiello, R. Mazzucchelli, B. Asefa, A. R. Khaled, and S. K. Durum. 2005. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev* 16 (4-5):513-33.
- Joffre, O. P., E. Segura, A. Savina, and S. Amigorena. 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 12 (8):557-69.
- Joshi, N. S., W. Cui, A. Chandele, H. K. Lee, D. R. Urso, J. Hagman, L. Gapin, and S. M. Kaech. 2007. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8⁽⁺⁾ T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* 27 (2):281-95.
- Joshi, N. S., W. Cui, C. X. Dominguez, J. H. Chen, T. W. Hand, and S. M. Kaech. 2011. Increased numbers of preexisting memory CD8 T cells and decreased T-bet expression can restrain terminal differentiation of secondary effector and memory CD8 T cells. *J Immunol* 187 (8):4068-76.

- Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E. G. Pamer, D. R. Littman, and R. A. Lang. 2002. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17 (2):211-20.
- Jung, Y. W., R. L. Rutishauser, N. S. Joshi, A. M. Haberman, and S. M. Kaech. 2010. Differential localization of effector and memory CD8 T cell subsets in lymphoid organs during acute viral infection. *J Immunol* 185 (9):5315-25.
- Kaech, S. M., and W. Cui. 2012. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 12 (11):749-61.
- Kaech, S. M., J. T. Tan, E. J. Wherry, B. T. Konieczny, C. D. Surh, and R. Ahmed. 2003. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 4 (12):1191-8.
- Kalia, V., S. Sarkar, S. Subramaniam, W. N. Haining, K. A. Smith, and R. Ahmed. 2010. Prolonged interleukin-2Ralpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* 32 (1):91-103.
- Kallies, A., A. Xin, G. T. Belz, and S. L. Nutt. 2009. Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses. *Immunity* 31 (2):283-95.
- Kaneko, S., A. Iwanami, M. Nakamura, A. Kishino, K. Kikuchi, S. Shibata, H. J. Okano, T. Ikegami, A. Moriya, O. Konishi, C. Nakayama, K. Kumagai, T. Kimura, Y. Sato, Y. Goshima, M. Taniguchi, M. Ito, Z. He, Y. Toyama, and H. Okano. 2006. A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med* 12 (12):1380-9.
- Kato, T., Jr., Y. Gotoh, A. Hoffmann, and Y. Ono. 2008. Negative regulation of constitutive NF-kappaB and JNK signaling by PKN1-mediated phosphorylation of TRAF1. *Genes Cells* 13 (5):509-20.
- Kawai, T., and S. Akira. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11 (5):373-84.
- Repeated Author. 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34 (5):637-50.
- Kawasaki, T., T. Kitsukawa, Y. Bekku, Y. Matsuda, M. Sanbo, T. Yagi, and H. Fujisawa. 1999. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 126 (21):4895-902.
- Kerdiles, Y. M., D. R. Beisner, R. Tinoco, A. S. Dejean, D. H. Castrillon, R. A. DePinho, and S. M. Hedrick. 2009. Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat Immunol* 10 (2):176-84.
- Kienzle, G., and J. von Kempis. 2000. CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *Int Immunol* 12 (1):73-82.
- Kigel, B., A. Varshavsky, O. Kessler, and G. Neufeld. 2008. Successful inhibition of tumor development by specific class-3 semaphorins is associated with expression of appropriate semaphorin receptors by tumor cells. *PLoS One* 3 (9):e3287.
- Kim, J. K., M. Klinger, J. Benjamin, Y. Xiao, D. J. Erle, D. R. Littman, and N. Killeen. 2009. Impact of the TCR signal on regulatory T cell homeostasis, function, and trafficking. *PLoS One* 4 (8):e6580.
- Kim, M. Y., F. M. Gaspal, H. E. Wiggett, F. M. McConnell, A. Gulbranson-Judge, C. Raykundalia, L. S. Walker, M. D. Goodall, and P. J. Lane. 2003. CD4(+)CD3(-) accessory cells costimulate

- primed CD4 T cells through OX40 and CD30 at sites where T cells collaborate with B cells. *Immunity* 18 (5):643-54.
- Kitsukawa, T., M. Shimizu, M. Sanbo, T. Hirata, M. Taniguchi, Y. Bekku, T. Yagi, and H. Fujisawa. 1997. Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19 (5):995-1005.
- Kitsukawa, T., A. Shimono, A. Kawakami, H. Kondoh, and H. Fujisawa. 1995. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* 121 (12):4309-18.
- Koch, S., and L. Claesson-Welsh. 2012. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2 (7):a006502.
- Koopmann, J. O., J. Albring, E. Huter, N. Bulbuc, P. Spee, J. Neefjes, G. J. Hammerling, and F. Momburg. 2000. Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity* 13 (1):117-27.
- Kopf, M., A. J. Coyle, N. Schmitz, M. Barner, A. Oxenius, A. Gallimore, J. C. Gutierrez-Ramos, and M. F. Bachmann. 2000. Inducible costimulator protein (ICOS) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection. *J Exp Med* 192 (1):53-61.
- Kotani, A., T. Ishikawa, Y. Matsumura, T. Ichinohe, H. Ohno, T. Hori, and T. Uchiyama. 2001. Correlation of peripheral blood OX40+(CD134+) T cells with chronic graft-versus-host disease in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 98 (10):3162-4.
- Kumanogoh, A., and H. Kikutani. 2013. Immunological functions of the neuropilins and plexins as receptors for semaphorins. *Nat Rev Immunol* 13 (11):802-14.
- Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30 (1):16-34.
- Kurts, C., B. W. Robinson, and P. A. Knolle. 2010. Cross-priming in health and disease. *Nat Rev Immunol* 10 (6):403-14.
- Kwon, B. S., and S. M. Weissman. 1989. cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (6):1963-7.
- Labrecque, N., L. S. Whitfield, R. Obst, C. Waltzinger, C. Benoist, and D. Mathis. 2001. How much TCR does a T cell need? *Immunity* 15 (1):71-82.
- Lanahan, A., X. Zhang, A. Fantin, Z. Zhuang, F. Rivera-Molina, K. Speichinger, C. Prahst, J. Zhang, Y. Wang, G. Davis, D. Toomre, C. Ruhrberg, and M. Simons. 2013. The neuropilin 1 cytoplasmic domain is required for VEGF-A-dependent arteriogenesis. *Dev Cell* 25 (2):156-68.
- Lapteva, N., M. R. Seethammagari, B. A. Hanks, J. Jiang, J. M. Levitt, K. M. Slawin, and D. M. Spencer. 2007. Enhanced activation of human dendritic cells by inducible CD40 and Toll-like receptor-4 ligation. *Cancer Res* 67 (21):10528-37.
- Laxmanan, S., S. W. Robertson, E. Wang, J. S. Lau, D. M. Briscoe, and D. Mukhopadhyay. 2005. Vascular endothelial growth factor impairs the functional ability of dendritic cells through Id pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 334 (1):193-8.
- Lee, E., J. E. Koskimaki, N. B. Pandey, and A. S. Popel. 2013. Inhibition of lymphangiogenesis and angiogenesis in breast tumor xenografts and lymph nodes by a peptide derived from transmembrane protein 45A. *Neoplasia* 15 (2):112-24.
- Lee, H. W., S. J. Park, B. K. Choi, H. H. Kim, K. O. Nam, and B. S. Kwon. 2002. 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol* 169 (9):4882-8.

- Lee, M., J. Y. Choi, J. S. Lim, M. S. Park, M. J. Kim, and H. Kim. 2016. Lack of anti-tumor activity by anti-VEGF treatments in hepatic hemangiomas. *Angiogenesis*.
- Leger, J., M. Kempf, G. Lee, and R. Brandt. 1997. Conversion of serine to aspartate imitates phosphorylation-induced changes in the structure and function of microtubule-associated protein tau. *J Biol Chem* 272 (13):8441-6.
- Leignadier, J., M. P. Hardy, M. Cloutier, J. Rooney, and N. Labrecque. 2008. Memory T-lymphocyte survival does not require T-cell receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (51):20440-5.
- Lenz, D. C., S. K. Kurz, E. Lemmens, S. P. Schoenberger, J. Sprent, M. B. Oldstone, and D. Homann. 2004. IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4+T cell memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (25):9357-62.
- Lepelletier, Y., I. C. Moura, R. Hadj-Slimane, A. Renand, S. Fiorentino, C. Baude, A. Shirvan, A. Barzilai, and O. Hermine. 2006. Immunosuppressive role of semaphorin-3A on T cell proliferation is mediated by inhibition of actin cytoskeleton reorganization. *Eur J Immunol* 36 (7):1782-93.
- Lepelletier, Y., S. Smaniotto, R. Hadj-Slimane, D. M. Villa-Verde, A. C. Nogueira, M. Dardenne, O. Hermine, and W. Savino. 2007. Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (13):5545-50.
- Letourneau, S., C. Krieg, G. Pantaleo, and O. Boyman. 2009. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol* 123 (4):758-62.
- Li, S., L. Wang, and M. E. Dorf. 2009. PKC phosphorylation of TRAF2 mediates IKKalpha/beta recruitment and K63-linked polyubiquitination. *Mol Cell* 33 (1):30-42.
- Liang, W. C., M. S. Dennis, S. Stawicki, Y. Chanthery, Q. Pan, Y. Chen, C. Eigenbrot, J. Yin, A. W. Koch, X. Wu, N. Ferrara, A. Bagri, M. Tessier-Lavigne, R. J. Watts, and Y. Wu. 2007. Function blocking antibodies to neuropilin-1 generated from a designed human synthetic antibody phage library. *J Mol Biol* 366 (3):815-29.
- Link, A., T. K. Vogt, S. Favre, M. R. Britschgi, H. Acha-Orbea, B. Hinz, J. G. Cyster, and S. A. Luther. 2007. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol* 8 (11):1255-65.
- Lissoni, P., F. Malugani, A. Bonfanti, R. Bucovec, S. Secondino, F. Brivio, A. Ferrari-Bravo, R. Ferrante, L. Vigore, F. Rovelli, M. Mandala, S. Viviani, L. Fumagalli, and G. S. Gardani. 2001. Abnormally enhanced blood concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastatic cancer patients and their relation to circulating dendritic cells, IL-12 and endothelin-1. *J Biol Regul Homeost Agents* 15 (2):140-4.
- Liu, K., and M. C. Nussenzweig. 2010. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev* 234 (1):45-54.
- Liu, Y. J. 2005. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23:275-306.
- Locksley, R. M., N. Killeen, and M. J. Lenardo. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104 (4):487-501.
- Luchino, J., M. Hocine, M. C. Amoureux, B. Gibert, A. Bernet, A. Royet, I. Treilleux, P. Lecine, J. P. Borg, P. Mehlen, S. Chauvet, and F. Mann. 2013. Semaphorin 3E suppresses tumor cell death triggered by the plexin D1 dependence receptor in metastatic breast cancers. *Cancer Cell* 24 (5):673-85.
- MacDonald, A. S., E. A. Patton, A. C. La Flamme, M. I. Araujo, C. R. Huxtable, B. Bauman, and E. J. Pearce. 2002. Impaired Th2 development and increased mortality during *Schistosoma mansoni* infection in the absence of CD40/CD154 interaction. *J Immunol* 168 (9):4643-9.

- Makedonas, G., N. Hutnick, D. Haney, A. C. Amick, J. Gardner, G. Cosma, A. R. Hersperger, D. Dolfi, E. J. Wherry, G. Ferrari, and M. R. Betts. 2010. Perforin and IL-2 upregulation define qualitative differences among highly functional virus-specific human CD8 T cells. *PLoS Pathog* 6 (3):e1000798.
- Manavalan, J. S., P. C. Rossi, G. Vlad, F. Piazza, A. Yarilina, R. Cortesini, D. Mancini, and N. Suciufoca. 2003. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl Immunol* 11 (3-4):245-58.
- Marshall, H. D., A. Chandele, Y. W. Jung, H. Meng, A. C. Poholek, I. A. Parish, R. Rutishauser, W. Cui, S. H. Kleinstein, J. Craft, and S. M. Kaech. 2011. Differential expression of Ly6C and T-bet distinguish effector and memory Th1 CD4(+) cell properties during viral infection. *Immunity* 35 (4):633-46.
- Martin, B., C. Becourt, B. Bienvenu, and B. Lucas. 2006. Self-recognition is crucial for maintaining the peripheral CD4+ T-cell pool in a nonlymphopenic environment. *Blood* 108 (1):270-7.
- Masson, F., A. M. Mount, N. S. Wilson, and G. T. Belz. 2008. Dendritic cells: driving the differentiation programme of T cells in viral infections. *Immunol Cell Biol* 86 (4):333-42.
- Matsuzawa, A., P. H. Tseng, S. Vallabhapurapu, J. L. Luo, W. Zhang, H. Wang, D. A. Vignali, E. Gallagher, and M. Karin. 2008. Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex. *Science* 321 (5889):663-8.
- Mazzei, G. J., M. D. Edgerton, C. Losberger, S. Lecoanet-Henchoz, P. Graber, A. Durandy, J. F. Gauchat, A. Bernard, B. Allet, and J. Y. Bonnefoy. 1995. Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active. *J Biol Chem* 270 (13):7025-8.
- McBride, J. M., T. Jung, J. E. de Vries, and G. Aversa. 2002. IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. *Cell Immunol* 215 (2):162-72.
- McPherson, A. J., L. M. Snell, T. W. Mak, and T. H. Watts. 2012. Opposing roles for TRAF1 in the alternative versus classical NF-kappaB pathway in T cells. *J Biol Chem* 287 (27):23010-9.
- Michielsen, A. J., A. E. Hogan, J. Marry, M. Tosetto, F. Cox, J. M. Hyland, K. D. Sheahan, D. P. O'Donoghue, H. E. Mulcahy, E. J. Ryan, and J. N. O'Sullivan. 2011. Tumour tissue microenvironment can inhibit dendritic cell maturation in colorectal cancer. *PLoS One* 6 (11):e27944.
- Milpied, P., A. Renand, J. Bruneau, D. A. Mendes-da-Cruz, S. Jacquelin, V. Asnafi, M. T. Rubio, E. MacIntyre, Y. Lepelletier, and O. Hermine. 2009. Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3+ Treg. *Eur J Immunol* 39 (6):1466-71.
- Mitchell, D. M., E. V. Ravkov, and M. A. Williams. 2010. Distinct roles for IL-2 and IL-15 in the differentiation and survival of CD8+ effector and memory T cells. *J Immunol* 184 (12):6719-30.
- Mizui, M., and H. Kikutani. 2008. Neuropilin-1: the glue between regulatory T cells and dendritic cells? *Immunity* 28 (3):302-3.
- Monks, C. R., B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, and A. Kupfer. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395 (6697):82-6.
- Mori, I., F. Goshima, Y. Imai, S. Kohsaka, T. Sugiyama, T. Yoshida, T. Yokochi, Y. Nishiyama, and Y. Kimura. 2002. Olfactory receptor neurons prevent dissemination of neurovirulent influenza A virus into the brain by undergoing virus-induced apoptosis. *J Gen Virol* 83 (Pt 9):2109-16.
- Mou, H. B., M. F. Lin, H. Cen, J. Yu, and X. J. Meng. 2004. TGF-beta1 treated murine dendritic cells are maturation resistant and down-regulate Toll-like receptor 4 expression. *J Zhejiang Univ Sci* 5 (10):1239-44.

- Muller, M. W., N. A. Giese, J. M. Swiercz, G. O. Ceyhan, I. Esposito, U. Hinz, P. Buchler, T. Giese, M. W. Buchler, S. Offermanns, and H. Friess. 2007. Association of axon guidance factor semaphorin 3A with poor outcome in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 121 (11):2421-33.
- Murali-Krishna, K., L. L. Lau, S. Sambhara, F. Lemonnier, J. Altman, and R. Ahmed. 1999. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* 286 (5443):1377-81.
- Nasarre, Patrick, Robert M. Gemmill, and Harry A. Drabkin. 2014. The emerging role of class-3 semaphorins and their neuropilin receptors in oncology. *OncoTargets and therapy* 7:1663-1687.
- Neefjes, J., M. L. Jongsma, P. Paul, and O. Bakke. 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11 (12):823-36.
- Newell, E. W., N. Sigal, S. C. Bendall, G. P. Nolan, and M. M. Davis. 2012. Cytometry by time-of-flight shows combinatorial cytokine expression and virus-specific cell niches within a continuum of CD8+ T cell phenotypes. *Immunity* 36 (1):142-52.
- Nguyen, Q. D., S. Rodrigues, C. M. Rodrigue, C. Rivat, C. Grijelmo, E. Bruyneel, S. Emami, S. Attoub, and C. Gespach. 2006. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-165 and semaphorin 3A-mediated cellular invasion and tumor growth by the VEGF signaling inhibitor ZD4190 in human colon cancer cells and xenografts. *Mol Cancer Ther* 5 (8):2070-7.
- Nishimura, H., N. Minato, T. Nakano, and T. Honjo. 1998. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol* 10 (10):1563-72.
- Norton, S. D., L. Zuckerman, K. B. Urdahl, R. Shefner, J. Miller, and M. K. Jenkins. 1992. The CD28 ligand, B7, enhances IL-2 production by providing a costimulatory signal to T cells. *J Immunol* 149 (5):1556-61.
- O'Neill, Luke A. J., Douglas Golenbock, and Andrew G. Bowie. 2013. The history of Toll-like receptors [mdash] redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13 (6):453-460.
- O'Shea, J. J., and R. Plenge. 2012. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity* 36 (4):542-50.
- Obar, J. J., E. R. Jellison, B. S. Sheridan, D. A. Blair, Q. M. Pham, J. M. Zickovich, and L. Lefrancois. 2011. Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8+ T cell differentiation. *J Immunol* 187 (10):4967-78.
- Oestreich, K. J., A. C. Huang, and A. S. Weinmann. 2011. The lineage-defining factors T-bet and Bcl-6 collaborate to regulate Th1 gene expression patterns. *J Exp Med* 208 (5):1001-13.
- Oestreich, K. J., S. E. Mohn, and A. S. Weinmann. 2012. Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile. *Nat Immunol* 13 (4):405-11.
- Ohshima, Y., L. P. Yang, T. Uchiyama, Y. Tanaka, P. Baum, M. Sergerie, P. Hermann, and G. Delespesse. 1998. OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4(+) T cells into high IL-4-producing effectors. *Blood* 92 (9):3338-45.
- Okazaki, T., A. Maeda, H. Nishimura, T. Kurosaki, and T. Honjo. 2001. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (24):13866-71.
- Ouyang, W., O. Beckett, R. A. Flavell, and M. O. Li. 2009. An essential role of the Forkhead-box transcription factor Foxo1 in control of T cell homeostasis and tolerance. *Immunity* 30 (3):358-71.

- Oyama, T., S. Ran, T. Ishida, S. Nadaf, L. Kerr, D. P. Carbone, and D. I. Gabrilovich. 1998. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 160 (3):1224-32.
- Palucka, K., and J. Banchereau. 2012. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* 12 (4):265-77.
- Pan, Q., Y. Chantry, W. C. Liang, S. Stawicki, J. Mak, N. Rathore, R. K. Tong, J. Kowalski, S. F. Yee, G. Pacheco, S. Ross, Z. Cheng, J. Le Couter, G. Plowman, F. Peale, A. W. Koch, Y. Wu, A. Bagri, M. Tessier-Lavigne, and R. J. Watts. 2007. Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell* 11 (1):53-67.
- Parry, R. V., J. M. Chemnitz, K. A. Frauwirth, A. R. Lanfranco, I. Braunstein, S. V. Kobayashi, P. S. Linsley, C. B. Thompson, and J. L. Riley. 2005. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 25 (21):9543-53.
- Pellet-Many, C., P. Frankel, H. Jia, and I. Zachary. 2008. Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochem J* 411 (2):211-26.
- Pepper, M., A. J. Pagan, B. Z. Igyarto, J. J. Taylor, and M. K. Jenkins. 2011. Opposing signals from the Bcl6 transcription factor and the interleukin-2 receptor generate T helper 1 central and effector memory cells. *Immunity* 35 (4):583-95.
- Pipkin, M. E., J. A. Sacks, F. Cruz-Guilloty, M. G. Lichtenheld, M. J. Bevan, and A. Rao. 2010. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* 32 (1):79-90.
- Plein, A., A. Fantin, and C. Ruhrberg. 2014. Neuropilin regulation of angiogenesis, arteriogenesis, and vascular permeability. *Microcirculation* 21 (4):315-23.
- Polic, B., D. Kunkel, A. Scheffold, and K. Rajewsky. 2001. How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (15):8744-9.
- Pomerantz, J. L., and D. Baltimore. 1999. NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *EMBO J* 18 (23):6694-704.
- Prahst, C., M. Heroult, A. A. Lanahan, N. Uziel, O. Kessler, N. Shraga-Heled, M. Simons, G. Neufeld, and H. G. Augustin. 2008. Neuropilin-1-VEGFR-2 complexing requires the PDZ-binding domain of neuropilin-1. *J Biol Chem* 283 (37):25110-4.
- Prud'homme, G. J., and Y. Glinka. 2012. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* 3 (9):921-39.
- Pulle, G., M. Vidric, and T. H. Watts. 2006. IL-15-dependent induction of 4-1BB promotes antigen-independent CD8 memory T cell survival. *J Immunol* 176 (5):2739-48.
- Quezada, S. A., L. Z. Jarvinen, E. F. Lind, and R. J. Noelle. 2004. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 22:307-28.
- Rao, R. R., Q. Li, M. R. Gubbels Bupp, and P. A. Shrikant. 2012. Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8(+) T cell differentiation. *Immunity* 36 (3):374-87.
- Rao, R. R., Q. Li, K. Odunsi, and P. A. Shrikant. 2010. The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity* 32 (1):67-78.
- Reali, C., M. Curto, V. Sogos, F. Scintu, S. Pauly, H. Schwarz, and F. Gremo. 2003. Expression of CD137 and its ligand in human neurons, astrocytes, and microglia: modulation by FGF-2. *J Neurosci Res* 74 (1):67-73.
- Revy, P., M. Sospedra, B. Barbour, and A. Trautmann. 2001. Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 2 (10):925-31.

- Robinson, M. J., F. Osorio, M. Rosas, R. P. Freitas, E. Schweighoffer, O. Gross, J. S. Verbeek, J. Ruland, V. Tybulewicz, G. D. Brown, L. F. Moita, P. R. Taylor, and C. Reis e Sousa. 2009. Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J Exp Med* 206 (9):2037-51.
- Rochman, Y., R. Spolski, and W. J. Leonard. 2009. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol* 9 (7):480-90.
- Rogers, P. R., J. Song, I. Gramaglia, N. Killeen, and M. Croft. 2001. OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 15 (3):445-55.
- Roman, E., E. Miller, A. Harmsen, J. Wiley, U. H. Von Andrian, G. Huston, and S. L. Swain. 2002. CD4 effector T cell subsets in the response to influenza: heterogeneity, migration, and function. *J Exp Med* 196 (7):957-68.
- Romeo, P. H., V. Lemarchandel, and R. Tordjman. 2002. Neuropilin-1 in the immune system. *Adv Exp Med Biol* 515:49-54.
- Rossignol, M., M. L. Gagnon, and M. Klagsbrun. 2000. Genomic organization of human neuropilin-1 and neuropilin-2 genes: identification and distribution of splice variants and soluble isoforms. *Genomics* 70 (2):211-22.
- Roth, L., C. Nasarre, S. Dirrig-Grosch, D. Aunis, G. Cremel, P. Hubert, and D. Bagnard. 2008. Transmembrane domain interactions control biological functions of neuropilin-1. *Mol Biol Cell* 19 (2):646-54.
- Rothe, M., S. C. Wong, W. J. Henzel, and D. V. Goeddel. 1994. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78:681-92.
- Rudd, C. E., A. Taylor, and H. Schneider. 2009. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev* 229 (1):12-26.
- Ruiz de Almodovar, C., D. Lambrechts, M. Mazzone, and P. Carmeliet. 2009. Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol Rev* 89 (2):607-48.
- Rutishauser, R. L., G. A. Martins, S. Kalachikov, A. Chandele, I. A. Parish, E. Meffre, J. Jacob, K. Calame, and S. M. Kaech. 2009. Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity* 31 (2):296-308.
- Sabbagh, L., G. Pulle, Y. Liu, E. N. Tsitsikov, and T. H. Watts. 2008. ERK-dependent Bim modulation downstream of the 4-1BB-TRAF1 signaling axis is a critical mediator of CD8 T cell survival in vivo. *J Immunol* 180 (12):8093-101.
- Sabbagh, L., L. M. Snell, and T. H. Watts. 2007. TNF family ligands define niches for T cell memory. *Trends Immunol* 28 (8):333-9.
- Sabbagh, L., C. C. Srokowski, G. Pulle, L. M. Snell, B. J. Sedgmen, Y. Liu, E. N. Tsitsikov, and T. H. Watts. 2006. A critical role for TNF receptor-associated factor 1 and Bim down-regulation in CD8 memory T cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (49):18703-8.
- Salama, A. D., T. Chitnis, J. Imitola, M. J. Ansari, H. Akiba, F. Tushima, M. Azuma, H. Yagita, M. H. Sayegh, and S. J. Khoury. 2003. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 198 (1):71-8.
- Sandau, M. M., J. E. Kohlmeier, D. L. Woodland, and S. C. Jameson. 2010. IL-15 regulates both quantitative and qualitative features of the memory CD8 T cell pool. *J Immunol* 184 (1):35-44.
- Sarris, M., K. G. Andersen, F. Randow, L. Mayr, and A. G. Betz. 2008. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 28 (3):402-13.

- Schluns, K. S., W. C. Kieper, S. C. Jameson, and L. Lefrancois. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1 (5):426-32.
- Schuch, G., M. Machluf, G. Bartsch, Jr., M. Nomi, H. Richard, A. Atala, and S. Soker. 2002. In vivo administration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its antagonist, soluble neuropilin-1, predicts a role of VEGF in the progression of acute myeloid leukemia in vivo. *Blood* 100 (13):4622-8.
- Seder, R. A., P. A. Darrah, and M. Roederer. 2008. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 8 (4):247-58.
- Seerapu, H. R., S. Borthakur, N. Kong, S. Agrawal, J. Drazba, A. VasANJI, A. Fantin, C. Ruhrberg, M. Buck, and A. Horowitz. 2013. The cytoplasmic domain of neuropilin-1 regulates focal adhesion turnover. *FEBS Lett* 587 (21):3392-9.
- Senger, D. R. 2010. Vascular endothelial growth factor: much more than an angiogenesis factor. *Mol Biol Cell* 21 (3):377-9.
- Shahinian, A., K. Pfeffer, K. P. Lee, T. M. Kundig, K. Kishihara, A. Wakeham, K. Kawai, P. S. Ohashi, C. B. Thompson, and T. W. Mak. 1993. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261 (5121):609-12.
- Shin, H., S. D. Blackburn, J. N. Blattman, and E. J. Wherry. 2007. Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *J Exp Med* 204 (4):941-9.
- Shortman, K., and Y. J. Liu. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2 (3):151-61.
- Smith-Garvin, J. E., G. A. Koretzky, and M. S. Jordan. 2009. T cell activation. *Annu Rev Immunol* 27:591-619.
- Soker, S., H. Q. Miao, M. Nomi, S. Takashima, and M. Klagsbrun. 2002. VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J Cell Biochem* 85 (2):357-68.
- Solomon, B. D., C. Mueller, W. J. Chae, L. M. Alabanza, and M. S. Bynoe. 2011. Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (5):2040-5.
- Song, J., S. Salek-Ardakani, P. R. Rogers, M. Cheng, L. Van Parijs, and M. Croft. 2004. The costimulation-regulated duration of PKB activation controls T cell longevity. *Nat Immunol* 5 (2):150-8.
- Speiser, D. E., S. Y. Lee, B. Wong, J. Arron, A. Santana, Y. Y. Kong, P. S. Ohashi, and Y. Choi. 1997. A regulatory role for TRAF1 in antigen-induced apoptosis of T cells. *J Exp Med* 185 (10):1777-83.
- Steinbrink, K., M. Wolfl, H. Jonuleit, J. Knop, and A. H. Enk. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159 (10):4772-80.
- Strobl, H., and W. Knapp. 1999. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect* 1 (15):1283-90.
- Sugamura, K., N. Ishii, and A. D. Weinberg. 2004. Therapeutic targeting of the effector T-cell costimulatory molecule OX40. *Nat Rev Immunol* 4 (6):420-31.
- Surh, C. D., O. Boyman, J. F. Purton, and J. Sprent. 2006. Homeostasis of memory T cells. *Immunol Rev* 211:154-63.
- Swain, S. L., H. Hu, and G. Huston. 1999. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science* 286 (5443):1381-3.
- Tada, Y., A. Asahina, H. Fujita, H. Mitsui, H. Torii, T. Watanabe, and K. Tamaki. 2004. Differential effects of LPS and TGF-beta on the production of IL-6 and IL-12 by Langerhans cells, splenic dendritic cells, and macrophages. *Cytokine* 25 (4):155-61.

- Takada, K., and S. C. Jameson. 2009. Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat Rev Immunol* 9 (12):823-32.
- Repeated Author. 2009. Self-class I MHC molecules support survival of naive CD8 T cells, but depress their functional sensitivity through regulation of CD8 expression levels. *J Exp Med* 206 (10):2253-69.
- Takahashi, A., K. Kono, F. Ichihara, H. Sugai, H. Fujii, and Y. Matsumoto. 2004. Vascular endothelial growth factor inhibits maturation of dendritic cells induced by lipopolysaccharide, but not by proinflammatory cytokines. *Cancer Immunol Immunother* 53 (6):543-50.
- Takahashi, C., R. S. Mittler, and A. T. Vella. 1999. Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal. *J Immunol* 162 (9):5037-40.
- Takamatsu, H., N. Takegahara, Y. Nakagawa, M. Tomura, M. Taniguchi, R. H. Friedel, H. Rayburn, M. Tessier-Lavigne, Y. Yoshida, T. Okuno, M. Mizui, S. Kang, S. Nojima, T. Tsujimura, Y. Nakatsuji, I. Katayama, T. Toyofuku, H. Kikutani, and A. Kumanogoh. 2010. Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II. *Nat Immunol* 11 (7):594-600.
- Takeda, K., and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17 (1):1-14.
- Takeda, S., H. R. Rodewald, H. Arakawa, H. Bluethmann, and T. Shimizu. 1996. MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* 5 (3):217-28.
- Takemoto, N., A. M. Intlekofer, J. T. Northrup, E. J. Wherry, and S. L. Reiner. 2006. Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8+ T cell differentiation. *J Immunol* 177 (11):7515-9.
- Takeuchi, O., and S. Akira. 2009. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev* 227 (1):75-86.
- Takeuchi, Osamu, and Shizuo Akira. 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140 (6):805-820.
- Tan, J. T., E. Dudl, E. LeRoy, R. Murray, J. Sprent, K. I. Weinberg, and C. D. Surh. 2001. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (15):8732-7.
- Tan, J. T., J. K. Whitmire, R. Ahmed, T. C. Pearson, and C. P. Larsen. 1999. 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *J Immunol* 163 (9):4859-68.
- Tan, J. T., J. K. Whitmire, K. Murali-Krishna, R. Ahmed, J. D. Altman, R. S. Mittler, A. Sette, T. C. Pearson, and C. P. Larsen. 2000. 4-1BB costimulation is required for protective anti-viral immunity after peptide vaccination. *J Immunol* 164 (5):2320-5.
- Taraban, V. Y., T. F. Rowley, L. O'Brien, H. T. Chan, L. E. Haswell, M. H. Green, A. L. Tutt, M. J. Glennie, and A. Al-Shamkhani. 2002. Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of anti-tumor immune responses. *Eur J Immunol* 32 (12):3617-27.
- Tenoever, B. R., S. L. Ng, M. A. Chua, S. M. McWhirter, A. Garcia-Sastre, and T. Maniatis. 2007. Multiple functions of the IKK-related kinase IKKepsilon in interferon-mediated antiviral immunity. *Science* 315 (5816):1274-8.
- Tokoyoda, K., S. Zehentmeier, A. N. Hegazy, I. Albrecht, J. R. Grun, M. Lohning, and A. Radbruch. 2009. Professional memory CD4+ T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. *Immunity* 30 (5):721-30.
- Tordjman, R., Y. Lepelletier, V. Lemarchandel, M. Cambot, P. Gaulard, O. Hermine, and P. H. Romeo. 2002. A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol* 3 (5):477-82.

- Tsitsikov, E. N., D. Laouini, I. F. Dunn, T. Y. Sannikova, L. Davidson, F. W. Alt, and R. S. Geha. 2001. TRAF1 is a negative regulator of TNF signaling. enhanced TNF signaling in TRAF1-deficient mice. *Immunity* 15 (4):647-57.
- Uniewicz, K. A., and D. G. Fernig. 2008. Neuropilins: a versatile partner of extracellular molecules that regulate development and disease. *Front Biosci* 13:4339-60.
- Vallabhapurapu, S., A. Matsuzawa, W. Zhang, P. H. Tseng, J. J. Keats, H. Wang, D. A. Vignali, P. L. Bergsagel, and M. Karin. 2008. Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol* 9 (12):1364-70.
- van Kooten, C., and J. Banchereau. 1997. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol* 9 (3):330-7.
- Repeated Author. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67 (1):2-17.
- van Panhuys, N. 2016. TCR Signal Strength Alters T-DC Activation and Interaction Times and Directs the Outcome of Differentiation. *Front Immunol* 7.
- Ve, T., S. J. Williams, and B. Kobe. 2015. Structure and function of Toll/interleukin-1 receptor/resistance protein (TIR) domains. *Apoptosis* 20 (2):250-61.
- Veillette, A., M. A. Bookman, E. M. Horak, and J. B. Bolen. 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 55 (2):301-8.
- Vinay, D. S., and B. S. Kwon. 1998. Role of 4-1BB in immune responses. *Semin Immunol* 10 (6):481-9.
- Repeated Author. 2009. TNF superfamily: costimulation and clinical applications. *Cell Biol Int* 33 (4):453-65.
- Vyas, J. M., A. G. Van der Veen, and H. L. Ploegh. 2008. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 8 (8):607-18.
- Wajant, H., F. Henkler, and P. Scheurich. 2001. The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell Signal* 13 (6):389-400.
- Wallet, M. A., P. Sen, and R. Tisch. 2005. Immunoregulation of dendritic cells. *Clin Med Res* 3 (3):166-75.
- Wang, C., A. J. McPherson, R. B. Jones, K. S. Kawamura, G. H. Lin, P. A. Lang, T. Ambagala, M. Pellegrini, T. Calzascia, N. Aidarus, A. R. Elford, F. Y. Yue, E. Kremmer, C. M. Kovacs, E. Benko, C. Tremblay, J. P. Routy, N. F. Bernard, M. A. Ostrowski, P. S. Ohashi, and T. H. Watts. 2012. Loss of the signaling adaptor TRAF1 causes CD8+ T cell dysregulation during human and murine chronic infection. *J Exp Med* 209 (1):77-91.
- Watts, T. H. 2005. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* 23:23-68.
- Watts, T. H., and M. A. DeBenedette. 1999. T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr Opin Immunol* 11 (3):286-93.
- Weiss, J. M., A. M. Bilate, M. Gobert, Y. Ding, M. A. Curotto de Lafaille, C. N. Parkhurst, H. Xiong, J. Dolpady, A. B. Frey, M. G. Ruocco, Y. Yang, S. Floess, J. Huehn, S. Oh, M. O. Li, R. E. Niec, A. Y. Rudensky, M. L. Dustin, D. R. Littman, and J. J. Lafaille. 2012. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J Exp Med* 209 (10):1723-42, S1.
- Wen, T., J. Bukczynski, and T. H. Watts. 2002. 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function. *J Immunol* 168 (10):4897-906.

- Wicovsky, A., F. Henkler, S. Salzmann, P. Scheurich, C. Kneitz, and H. Wajant. 2009. Tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 enhances proinflammatory TNF receptor-2 signaling and modifies TNFR1-TNFR2 cooperation. *Oncogene* 28 (15):1769-81.
- Wiesel, M., J. Crouse, G. Bedenikovic, A. Sutherland, N. Joller, and A. Oxenius. 2012. Type-I IFN drives the differentiation of short-lived effector CD8+ T cells in vivo. *Eur J Immunol* 42 (2):320-9.
- Wilcox, R. A., A. I. Chapoval, K. S. Gorski, M. Otsuji, T. Shin, D. B. Flies, K. Tamada, R. S. Mittler, H. Tsuchiya, D. M. Pardoll, and L. Chen. 2002. Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. *J Immunol* 168 (9):4262-7.
- Wilcox, R. A., K. Tamada, S. E. Strome, and L. Chen. 2002. Signaling through NK cell-associated CD137 promotes both helper function for CD8+ cytolytic T cells and responsiveness to IL-2 but not cytolytic activity. *J Immunol* 169 (8):4230-6.
- Winzler, C., P. Rovere, M. Rescigno, F. Granucci, G. Penna, L. Adorini, V. S. Zimmermann, J. Davoust, and P. Ricciardi-Castagnoli. 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med* 185 (2):317-28.
- Wulfing, C., and F. Rupp. 2002. Neuropilin-1: another neuronal molecule in the "immunological synapse". *Nat Immunol* 3 (5):418-9.
- Xie, P., B. S. Hostager, M. E. Munroe, C. R. Moore, and G. A. Bishop. 2006. Cooperation between TNF receptor-associated factors 1 and 2 in CD40 signaling. *J Immunol* 176 (9):5388-400.
- Xu, C., E. Gagnon, M. E. Call, J. R. Schnell, C. D. Schwieters, C. V. Carman, J. J. Chou, and K. W. Wucherpennig. 2008. Regulation of T cell receptor activation by dynamic membrane binding of the CD3epsilon cytoplasmic tyrosine-based motif. *Cell* 135 (4):702-13.
- Xu, L. G., L. Y. Li, and H. B. Shu. 2004. TRAF7 potentiates MEKK3-induced AP1 and CHOP activation and induces apoptosis. *J Biol Chem* 279 (17):17278-82.
- Yadav, M., C. Louvet, D. Davini, J. M. Gardner, M. Martinez-Llordella, S. Bailey-Bucktrout, B. A. Anthony, F. M. Sverdrup, R. Head, D. J. Kuster, P. Ruminiski, D. Weiss, D. Von Schack, and J. A. Bluestone. 2012. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med* 209 (10):1713-22, S1-19.
- Yamaguchi, Y., H. Tsumura, M. Miwa, and K. Inaba. 1997. Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells* 15 (2):144-53.
- Yamaki, S., S. Ine, T. Kawabe, Y. Okuyama, N. Suzuki, P. Soroosh, S. F. Mousavi, H. Nagashima, S. L. Sun, T. So, T. Sasaki, H. Harigae, K. Sugamura, H. Kudo, M. Wada, M. Nio, and N. Ishii. 2014. OX40 and IL-7 play synergistic roles in the homeostatic proliferation of effector memory CD4(+) T cells. *Eur J Immunol* 44 (10):3015-25.
- Yang, A. S., and E. C. Lattime. 2003. Tumor-induced interleukin 10 suppresses the ability of splenic dendritic cells to stimulate CD4 and CD8 T-cell responses. *Cancer Res* 63 (9):2150-7.
- Yang, C. Y., J. A. Best, J. Knell, E. Yang, A. D. Sheridan, A. K. Jesionek, H. S. Li, R. R. Rivera, K. C. Lind, L. M. D'Cruz, S. S. Watowich, C. Murre, and A. W. Goldrath. 2011. The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8+ T cell subsets. *Nat Immunol* 12 (12):1221-9.
- Yazdani, U., and J. R. Terman. 2006. The semaphorins. *Genome Biol* 7 (3):211.
- Yee, C., J. A. Thompson, D. Byrd, S. R. Riddell, P. Roche, E. Celis, and P. D. Greenberg. 2002. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (25):16168-73.

- Yoshida, R., T. Imai, K. Hieshima, J. Kusuda, M. Baba, M. Kitauro, M. Nishimura, M. Kakizaki, H. Nomiya, and O. Yoshie. 1997. Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7. *J Biol Chem* 272 (21):13803-9.
- Yuan, J., S. Gnjatic, H. Li, S. Powel, H. F. Gallardo, E. Ritter, G. Y. Ku, A. A. Jungbluth, N. H. Segal, T. S. Rasalan, G. Manukian, Y. Xu, R. A. Roman, S. L. Terzulli, M. Heywood, E. Pogoriler, G. Ritter, L. J. Old, J. P. Allison, and J. D. Wolchok. 2008. CTLA-4 blockade enhances polyfunctional NY-ESO-1 specific T cell responses in metastatic melanoma patients with clinical benefit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (51):20410-5.
- Zapata, J. M., M. Krajewska, S. Krajewski, S. Kitada, K. Welsh, A. Monks, N. McCloskey, J. Gordon, T. J. Kipps, R. D. Gascoyne, A. Shabaik, and J. C. Reed. 2000. TNFR-associated factor family protein expression in normal tissues and lymphoid malignancies. *J Immunol* 165 (9):5084-96.
- Zapata, J. M., M. Krajewska, H. C. Morse, 3rd, Y. Choi, and J. C. Reed. 2004. TNF receptor-associated factor (TRAF) domain and Bcl-2 cooperate to induce small B cell lymphoma/chronic lymphocytic leukemia in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (47):16600-5.
- Zapata, J. M., and J. C. Reed. 2002. TRAF1: lord without a RING. *Sci STKE* 2002 (133):pe27.
- Zeid, N. A., and H. K. Muller. 1993. S100 positive dendritic cells in human lung tumors associated with cell differentiation and enhanced survival. *Pathology* 25 (4):338-43.
- Zhan, P., Y. N. Ji, and L. K. Yu. 2013. VEGF is associated with the poor survival of patients with prostate cancer: a meta-analysis. *Transl Androl Urol* 2 (2):99-105.
- Zhang, Y., Y. Lu, L. Ma, X. Cao, J. Xiao, J. Chen, S. Jiao, Y. Gao, C. Liu, Z. Duan, D. Li, Y. He, B. Wei, and H. Wang. 2014. Activation of vascular endothelial growth factor receptor-3 in macrophages restrains TLR4-NF-kappaB signaling and protects against endotoxin shock. *Immunity* 40 (4):501-14.
- Zhang, Y., Y. Y. Zhang, M. Ogata, P. Chen, A. Harada, S. Hashimoto, and K. Matsushima. 1999. Transforming growth factor-beta1 polarizes murine hematopoietic progenitor cells to generate Langerhans cell-like dendritic cells through a monocyte/macrophage differentiation pathway. *Blood* 93 (4):1208-20.
- Zhou, X., S. Yu, D. M. Zhao, J. T. Harty, V. P. Badovinac, and H. H. Xue. 2010. Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity* 33 (2):229-40.
- Zhu, J., H. Yamane, and W. E. Paul. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 28:445-89.
- Zhu, Y., G. Zhu, L. Luo, A. S. Flies, and L. Chen. 2007. CD137 stimulation delivers an antigen-independent growth signal for T lymphocytes with memory phenotype. *Blood* 109 (11):4882-9.

Annexe1

Liste des publications

Oussa N A E, Dahmani A, Gomis M, Richaud M, Andreev E, Navab-Daneshmand A, Taillefer J, Carli C, Boulet S, Sabbagh L, Labrecque N, Sapiéha P, Delisle J-S. VEGF requires the co-receptor Nrp-1 to inhibit LPS-dependent dendritic cell maturation. En preparation

Oussa N.A.E, Soumounou Y, Sabbagh L. TRAF1 phosphorylation on Serine 139 modulates NF- κ B activity downstream of 4-1BB in T cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 2013 Mar 1; 432 (1):129-134.

Sabbagh L, Andreeva D, **Oussa N A E**, et al. Leukocyte-specific protein 1 links TNF receptor-associated factor 1 to survival signaling downstream of 4-1BB in T cells. Journal Leukocyte Biol. 2013 Feb 27.