



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*

Discipline ou spécialité :
Immunologie

Présentée et soutenue par

Fanny Lafouresse

Le jeudi 20 septembre 2012

Titre :

*Implication de la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich
dans la migration et la rencontre des lymphocytes T CD4+
avec les cellules présentatrices de l'antigène*

JURY

Pr. Denis Hudrisier

Dr. Emmanuel Donnadiéu

Dr. Jacques Bertoglio

Dr. Loïc Dupré

Ecole doctorale : *Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)*

Unité de recherche : *Dynamique moléculaire des interactions lymphocytaires*

Directeur(s) de Thèse : *Dr. Loïc Dupré*

Rapporteurs : *Dr. Emmanuel Donnadiéu*

Dr. Jacques Bertoglio

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	Erreur ! Signet non défini.
SOMMAIRE	1
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	3
LISTE DES FIGURES	6
RÉSUMÉ.....	7
ABSTRACT	8
AVANT-PROPOS	9
INTRODUCTION.....	11
I. Les lymphocytes T : chefs d’orchestre de l’immunité adaptative, une vie bien rythmée	12
1. Développement et sélection thymique des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes primaires	14
a) Expression du pré-TCR à la membrane des thymocytes.....	15
b) La sélection positive	16
c) La sélection négative	17
d) Tolérance périphérique par les lymphocytes T régulateurs	17
e) Lymphocytes T CD8 ⁺ et lymphocytes T CD4 ⁺	18
f) Sortie du thymus et recirculation	18
2. Extravasation des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires.....	19
a) « Roulement » des lymphocytes T induit par une adhésion aux HEV de faible intensité.....	21
b) Activation des récepteurs aux chimiokines	22
c) Adhésion des lymphocytes T aux HEV induite par l’engagement de LFA-1	25
d) Passage des HEV	27
e) Contrôle de l’entrée lymphocytaire	30
3. Rencontre avec les cellules présentatrices de l’antigène dans les organes lymphoïdes secondaires.....	31
a) Organisation des organes lymphoïdes secondaires	32
b) Caractérisation de la mobilité des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires.....	33
c) Caractérisation de la rencontre avec les cellules dendritiques dans les organes lymphoïdes secondaires	39
d) Rencontre avec les cellules dendritiques en condition de non-infection	40
e) Rencontre avec les cellules dendritiques en condition d’infection	46
4. Activation des lymphocytes T CD4 ⁺	50
a) Architecture des synapses immunologiques	51
b) Signalisation lymphocytaire	58
c) Terminaison de l’interaction cellulaire	59
5. Phase effectrice des lymphocytes T CD4 ⁺	59
a) Devenir des lymphocytes T CD4 ⁺ dicté par les cellules présentatrices d’antigène ..	59
b) Les lymphocytes T CD4 ⁺ effecteurs dans les organes lymphoïdes secondaires.....	60

- c) Les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs hors des organes lymphoïdes secondaires 61

II. La protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich : un régulateur clef du cytosquelette d'actine des lymphocytes T 62

- 1. Le cytosquelette d'actine 63
 - a) Polymérisation et dépolymérisation des filaments d'actine 63
 - b) Molécules et modèles pour l'étude du cytosquelette d'actine..... 64
 - c) Implication du cytosquelette d'actine dans les fonctions des lymphocytes T..... 65
 - d) Organisation du cytosquelette d'actine lors de la migration amiboïde 65
 - e) Organisation du cytosquelette d'actine lors de la rencontre avec les cellules présentatrices de l'antigène..... 69
 - f) Organisation du cytosquelette d'actine lors de la formation de la synapse immunologique 70
 - g) Les protéines régulatrices du cytosquelette d'actine..... 71
- 2. La protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) 71
 - a) Structure et partenaires protéiques de WASP 71
 - b) Expression et localisation de WASP dans les cellules hématopoïétiques..... 74
- 3. Le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS)..... 75
 - a) Historique de la découverte de WAS 76
 - b) Pathologies 76
 - c) Manifestations cliniques..... 79
 - d) Défauts cellulaires 82
 - e) Thérapie..... 85

OBJECTIFS DU TRAVAIL 91

RÉSULTATS 92

DISCUSSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES..... 132

I. Rôle de WASP dans la dynamique des lymphocytes T : point de vue fondamental 133

- 1. Au niveau cellulaire 133
- 2. Au niveau moléculaire 142

II. Rôle de WASP dans la dynamique des lymphocytes T : point de vue physiopathologie 147

ANNEXES 151

BIBLIOGRAPHIE 183

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADP	Adenosin DiPhosphate
AIRE	AutoImmune Regulator
APECED	Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy
Arp2/3	Actin-related protein 2/3
ATP	Adenosine TriPhosphate
Ca ²⁺	Calcium
CALDAG	Calcium and diacylglycerol-regulated
CD-	Cluster de Différenciation-
CGD	Chronic granulomatous disease
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CRIB	Cdc42-Rac Interactive Binding
CTS	Central Terminaison Sequence
DAG	1,2 Diacylglycerol
DARC	Duffy Antigen Receptor for Chemokines
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
EBV	Epstein Barr Virus
ERM	Ezrine, Radixine, Moésine
ESAM	Endothelial Cell Selective Adhesion Molecule
EVH1	Ena-VASP-Homology-1 domain
FDC	Follicular Dendritic Cells
FRC	Fibroblastic Reticular Cells
GDP	Guanosine 5' DiPhosphate
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GTP	Guanosine 5' Triphosphate
HDMVEC	Human Dermal Microvascular-Endothelial Cells
HEC	High Endothelial Cells
HEV	High Endothelial Venules
HLA	Human Leukocyte Antigen
HLMVEC	Human Lung Microvascular- Endothelial Cells
HUVEC	Human Umbilical Vein-Endothelial Cells
ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule-1

IL-	InterLeukine-
JAM-	Junctional Adhesion Molecule-
LAD	Leucocyte Adhesion Deficiency
LBRC	Lateral Border Recycling Compartement
LFA-1	Lymphocytes Function-associated Antigen-1
LTR	Long Terminal Repeat
MAdCAM-1	Mucosal Addressin Cellular Adhesion Molecule-1
Min	Minute
MLCK	Myosin Light-Chain Kinase
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MPSV	MyeloProliferative Sarcoma Virus
MTOC	MicroTubule Organizing Center
N-WASP	Neural-Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
PBS	Primer Binding Site
PBSF	Pre-B-cell growth Stimulating Factor
PECAM-1	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PIP5K	PhosphatidyInositol-4-Phosphate 5 Kinase
PLC	Phospholipase C
plt	Paucity in Lymph-node T cells
PNAD	Peripheral Node ADdressin
PPT	PolyPurine Tract
PRD	Prolin Rich Domain
PTX	Pertussis ToXine
RAG	Recombinaison Activating Genes
SCID	Severe Conbined Immunodeficiency Diseases
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SMAC	Supra Molecular Activation Cluster
S1P ₁	Sphingosine 1 Phosphate 1
TCR	T Cell Receptor
Th	T Helper cells
TIRF	Total Internal Reflexion Fluorescence
TSLP	Thymic Stromal LymphoPoietine
VAP1	Vascular Apoptosis-Inducing Protein 1
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule

VE-Cadhérine	Vascular Endothelial cell-specific Cadherin
WAS	Wiskott-Aldrich Syndrome
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
WH	WASP homology domain
WIP	WASP Interacting Protein
WPRE	Woodchuck Post transcriptional Regulatory Element
XLN	X-Linked congénital Neutropenia
XLT	X-Linked Thrombocytopenia

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Génération et migration des lymphocytes T dans l'organisme.	13
Figure 2 : Extravasation des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires.....	21
Figure 3 : Changement conformationel de LFA-1.	26
Figure 4 : Structure des organes lymphoïdes secondaires.....	32
Figure 5 : Vitesse de migration et interactions cellulaires des lymphocytes T.	48
Figure 6 : Architecture moléculaire de la synapse immunologique concentrique.	52
Figure 7 : Dynamique des microregroupements de TCR au cours de la formation de la synapse immunologique.	54
Figure 8 : La kinapse : redistribution des microregroupements de TCR.	58
Figure 9 : Structure et régulation des filaments d'actine.	64
Figure 10 : En absence d'adhésion, l'environnement peut offrir les forces nécessaires à la mobilité.....	66
Figure 11 : Structure des protéines de la famille de WASP et de WAVE.	72
Figure 12 : Changements conformationnels de WASP.....	74
Figure 13 : Pedigree des 3 frères décrits par Wiskott en 1937.....	76
Figure 14 : Score clinique pour les patients XLN, iXLT, XLT et WAS.	78
Figure 15 : Rôle de WASP dans les cellules du système immunitaire.	82
Figure 16 : Observation en temps réel de la dynamique de l'actine d'un lymphocyte T.	137
Figure 17 : Expression de CD25, CD40L et CD69 à la surface des lymphocytes T incubés seuls ou en présence de cellules dendritiques immatures.	139
Figure 18 : Principe de fonctionnement du biosenseur WASP.....	143
Figure 19 : Assemblage et dissolution des podosomes par WASP.....	146
Figure 20 : Modèle des rencontres en série.....	149

Implication de la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich dans la migration et la rencontre des lymphocytes T CD4⁺ avec les cellules présentatrices de l'antigène

RESUME

Les lymphocytes T CD4⁺ sont des acteurs clés dans l'orchestration d'une réponse immunitaire dirigée spécifiquement contre un pathogène. L'efficacité de la réponse immunitaire dépend de la génération de lymphocytes T CD4⁺, de l'acquisition de leurs fonctions effectrices et de l'exercice de ces dernières. Ces différentes étapes se déroulent successivement dans différents sites spécialisés de l'organisme. Ceci impose aux lymphocytes T CD4⁺ une grande mobilité ainsi que l'établissement de contacts privilégiés avec les cellules présentatrices de l'antigène, responsables de leur différenciation et de leur activation. La mobilité ainsi que les interactions cellulaires des lymphocytes T CD4⁺ requièrent une réorganisation continue de leur cytosquelette d'actine. Un des régulateurs majeurs du cytosquelette d'actine des lymphocytes T est la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) dont la déficience provoque le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), une immunodéficience primaire sévère. Le dysfonctionnement des lymphocytes T est généralement considéré comme la cause majeure du dérèglement du système immunitaire observé chez les patients WAS.

Mes travaux de thèse ont consisté à étudier l'implication de WASP dans la mobilité des lymphocytes T CD4⁺ humains, au cours des phases de migration et de rencontre avec les cellules présentatrices de l'antigène dans les contextes d'interaction non spécifique (antigènes du soi) et spécifique de l'antigène (antigènes exogènes).

Nous avons tout d'abord montré que WASP n'est pas requis pour la migration dirigée par les chimiokines des lymphocytes T CD4⁺ *in vitro*. Ensuite, nous nous sommes intéressés au rôle de WASP dans l'interaction des lymphocytes T CD4⁺ avec des cellules présentatrices de l'antigène présentant des antigènes du soi. Dans cette situation, il a été précédemment décrit que les cellules présentatrices de l'antigène induisaient la mobilité des lymphocytes T et participaient au maintien de l'homéostasie lymphocytaire. De façon surprenante, nous avons observé que l'absence de WASP conduisait à une mobilité anormalement élevée des lymphocytes T CD4⁺ au contact des cellules présentatrices de l'antigène. Nous avons ensuite montré que cet excès de mobilité était lié à une adhésion LFA-1/ICAM-1 anormalement régulée. En conséquence de cet excès de mobilité, nous avons également observé un maintien favorisé de la survie homéostatique lymphocytaire. Enfin, nous avons poursuivi cette étude dans un contexte d'interaction avec des cellules présentatrices de l'antigène présentant des antigènes exogènes. Dans cette situation, il est connu que l'engagement du TCR avec les antigènes exogènes induit un arrêt de mobilité des lymphocytes T. Nous avons observé qu'en absence de WASP, les lymphocytes T CD4⁺ présentaient des défauts d'arrêt de migration sur les cellules présentatrices de l'antigène. Nous avons aussi montré un défaut d'organisation moléculaire de la synapse immunologique, formée entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice de l'antigène. En conséquence de cette mauvaise organisation, des défauts de prolifération et de production de cytokines des lymphocytes T ont été révélés.

Finalement, nos résultats indiquent que WASP agirait comme un frein sur la mobilité des lymphocytes T CD4⁺ au contact des cellules présentatrices de l'antigène pour permettre une interaction cellulaire optimale dans le contexte de la rencontre avec le soi et le non-soi. Nous proposons que ces défauts soient en partie responsables des symptômes auto-immuns et de l'immunodéficience observés chez les patients WAS.

Mots Clés : Syndrome de Wiskott-Aldrich, mobilité lymphocytaire, interaction cellulaire, cellules présentatrices de l'antigène, cytosquelette d'actine.

Discipline : Immunologie

Role of the Wiskott-Aldrich syndrome protein in CD4⁺ T cell migration and encounter with antigen presenting cells

ABSTRACT

CD4⁺ T cells orchestrate immune response directed specifically against pathogens. Immune response efficiency depends on the maturation of CD4⁺ T lymphocytes and on their ability to exert effectors functions. These steps occur successively in different sites of the organism in which T cells will interact with multiple antigen presenting cells. Tissue homing and antigen presenting cell scanning require a very high and regulated migratory capacity. This is in part controlled by actin cytoskeleton reorganization. A key regulator of actin cytoskeleton in T lymphocyte is the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) which deficiency in humans causes the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS), a severe primary immunodeficiency. T cell dysfunction is contributing to the immune system dysregulation observed in WAS patients.

My thesis research consisted in studying the role of WASP in human CD4⁺ T lymphocyte motility, in real time, during their migration phases and during antigen presenting cell encounter in the context of both non specific (self antigens) and specific interactions (exogenous antigens).

First, we demonstrated that WASP is not required for CD4⁺ T lymphocyte chemotaxis *in vitro*. Then, we investigated the role of WASP in CD4⁺ T lymphocyte interaction with antigen presenting cells presenting self-antigens. In this context, it was previously described that antigen-presenting cells drive T cell motility and maintain T cell homeostasis. Surprisingly, we observed that the absence of WASP lead to an abnormally high CD4⁺ T cell motility at the contact with antigen presenting cells. Then, we showed that this increased motility is linked to an abnormal regulation of LFA-1/ICAM-1 adhesion. Consequently of this exacerbated motility, we also observed that T cell homeostatic survival is favored. Finally, we pursued our study in the context of exogenous antigen encounter. In this condition, it is known that TCR engagement with exogenous antigens drive T cell migration arrest. We observed that in the absence of WASP, CD4⁺ T lymphocytes are unable to stop efficiently at the contact with antigen presenting cells. We also demonstrated that signaling molecules at the immunological synapse established between T lymphocytes and antigen presenting cells are dispersed in the absence of WASP. Consequently to this defective organization, we showed that CD4⁺ T cell proliferation and cytokine production are impaired.

All together, our results indicate that WASP acts as a brake on CD4⁺ T cell motility at the contact with antigen presenting cells permitting optimal cellular interaction in the context of self and non-self encounter. We hypothesized that these defects could be in part responsible for the autoimmune development and immunodeficiency observed in WAS patients.

Keywords : Wiskott-Aldrich Syndrome, lymphocyte motility, cell interactions, antigen presenting cells, actin cytoskeleton

Discipline : Immunology

AVANT-PROPOS

L'immunologie s'intéresse aux mécanismes de défense de notre organisme contre les pathogènes. Elle correspond à un domaine d'étude très étendu, tout d'abord de part la grande diversité des agents pathogènes, mais également de part l'existence de différentes cellules du système immunitaire aux mécanismes de reconnaissance et de lutte contre les pathogènes tout aussi variés. Une co-évolution constante des pathogènes et des cellules du système immunitaire à l'échelle de l'Evolution complexifie aussi ce schéma.

L'immunologie peut être subdivisée en deux grandes lignes de défense : la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative. La réponse immunitaire innée est rapide, indépendante d'une reconnaissance spécifique des pathogènes et sans mémoire de l'historique des pathogènes déjà rencontrés. Même si la réponse immunitaire innée peut parfois être suffisante pour éliminer efficacement les pathogènes infectant notre organisme, une seconde ligne de défense est souvent nécessaire et est déclenchée par la première. La seconde ligne de défense, qui correspond à la réponse immunitaire adaptative, nécessite plus de temps pour se mettre en place, est spécifique du pathogène et garde en mémoire les pathogènes rencontrés. La réponse immunitaire adaptative est conduite par les lymphocytes T et les lymphocytes B, cellules possédant des récepteurs leur permettant de reconnaître spécifiquement les pathogènes (le non-soi) et de les distinguer des constituants de notre organisme (le soi). Les lymphocytes activent des programmes différents face au non-soi et au soi. En effet, après reconnaissance du non-soi, les lymphocytes acquièrent leurs fonctions effectrices et ceci afin de défendre notre organisme. En revanche, ils ne doivent pas acquérir leurs fonctions effectrices face au soi, au risque de s'attaquer à notre propre organisme. Toutefois, en absence de pathogène, les lymphocytes doivent rester prêts à réagir contre le non-soi ; leur statut de vigilance est maintenu par leurs interactions avec le soi. Ainsi, la distinction entre non-soi et soi apparaît comme cruciale pour l'efficacité de la réponse immunitaire adaptative. Cette distinction est permise par l'interaction des lymphocytes avec des cellules présentatrices de l'antigène au moment de leur génération dans les organes lymphoïdes primaires et intervient lors de la rencontre avec les antigènes du non-soi ou du soi dans les organes lymphoïdes secondaires puis tertiaires.

Il est bien connu que le cytosquelette d'actine joue un rôle majeur dans les fonctions de mobilité et d'interaction cellulaire des lymphocytes. Un modèle naturel de défaut d'organisation du cytosquelette d'actine est le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS). Il s'agit

d'une maladie génétique liée à la déficience en protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP). La réponse immunitaire adaptative des patients atteints de WAS est défectueuse. En effet ces patients présentent à la fois une immunodéficience et une susceptibilité au développement de cancers (déficience de la réponse immunitaire contre le non-soi) et également une prévalence au développement de maladies auto-immunes (exacerbation de la réponse immunitaire contre le soi).

Nous posons l'hypothèse qu'un des régulateurs clefs du cytosquelette d'actine, WASP, soit impliqué dans les mécanismes de migration des lymphocytes T et d'interaction avec les cellules présentatrices d'antigènes.

Ainsi mes travaux de thèse ont consisté à mieux comprendre le rôle de WASP dans les lymphocytes T humains au cours de leur migration et de leurs interactions avec les cellules présentatrices de l'antigène à la fois dans le contexte de présentation du non-soi et du soi.

En introduction de mes travaux de thèse, l'emphase sera portée sur la mobilité ainsi que sur l'interaction des lymphocytes T avec les cellules présentatrices de l'antigène en condition d'infection et de non infection, puis le rôle particulier du cytosquelette d'actine dans ces fonctions spécifiques sera présenté, avant de se focaliser sur un de ses régulateurs clefs : WASP, dont l'importance sera soulignée par la description du tableau clinique sévère des patients atteints de WAS.

Mon implication dans l'enseignement de l'immunologie à l'Université et également dans l'encadrement d'étudiants au laboratoire, m'a encouragé à entamer chacune des sections de mon introduction par un résumé vulgarisé des principales informations qui y sont présentées. Pour des raisons de clarté, ces résumés de vulgarisation scientifique apparaissent dans des encarts au fil de l'introduction.

INTRODUCTION

I. Les lymphocytes T : chefs d'orchestre de l'immunité adaptative, une vie bien rythmée

Cycle de vie des lymphocytes T

Les lymphocytes T défendent notre organisme contre les pathogènes. Leur efficacité résulte de leur capacité à reconnaître de manière spécifique un pathogène donné et à déclencher une attaque adaptée. Chaque lymphocyte T est doté d'un récepteur capable de reconnaître de manière spécifique une portion d'un pathogène donné. Ces récepteurs sont différents à la surface de chacun de nos lymphocytes T, permettant ainsi à notre organisme de reconnaître une grande diversité de pathogènes. Les lymphocytes T, aux récepteurs variés, sont conçus au niveau du thymus. Une fois produits, ils vont sortir du thymus et emprunter la circulation sanguine pour rejoindre les ganglions lymphatiques. C'est dans les ganglions lymphatiques qu'ils vont rencontrer les différents pathogènes qui infectent notre organisme. En effet, les pathogènes sont transportés par notre système immunitaire au niveau des ganglions pour être présentés aux lymphocytes T. Dans le cas où un lymphocyte T reconnaît de manière spécifique un pathogène, il s'active et se multiplie. Les lymphocytes T spécifiques du pathogène sont alors prêts à engager la lutte contre le pathogène reconnu.

Il existe plusieurs sous-types de lymphocytes T, dotés d'armes différentes pour lutter contre les pathogènes. Les lymphocytes T CD8 (aussi appelé lymphocytes T tueurs) sont capables de tuer les cellules de notre organisme infectées par le pathogène reconnu. Les lymphocytes T CD4 (aussi appelé lymphocytes T auxiliaires) apportent un soutien aux autres cellules du système immunitaire en participant à leur activation. Dans les ganglions, ils vont participer à l'activation des lymphocytes B, producteurs d'anticorps et à l'activation des lymphocytes T CD8. Ils apporteront également une aide aux cellules du système immunitaire sur le site de l'infection, qu'ils rejoindront en passant par la circulation sanguine.

En résumé, pour combattre un pathogène efficacement les lymphocytes T se déplacent, en empruntant les vaisseaux sanguins, de leur site de production (le thymus) vers le site de présentation des pathogènes (les ganglions), pour enfin gagner le site de l'infection. Ils sont donc sans cesse en mouvement dans l'organisme et vont interagir avec une grande variété de cellules. Parce que les lymphocytes T doivent se trouver au bon endroit, au bon moment et rencontrer les bons partenaires pour défendre efficacement notre organisme, leur mobilité et les interactions cellulaires qu'ils vont établir doivent être bien orchestrées.

Avec une vitesse moyenne de migration de 10 μm / minutes (min), les lymphocytes T sont dotés d'une mobilité exceptionnelle. Leur vitesse de migration est jusqu'à 100 fois plus importante que celle des cellules mésenchymateuses ou épithéliales, 10 fois plus importante que celle des fibroblastes, et presque 2 fois plus importante que celle des lymphocytes B (Friedl et al., 1998b; Gudima et al., 1988; Miller et al., 2002; Pittet and Mempel, 2008).

Mais pourquoi les lymphocytes T sont-ils d'aussi bons migrants ? Nous verrons dans ce chapitre que tout au long de leur vie, ils vont devoir migrer vers différents sites spécialisés de l'organisme pour pouvoir finalement remplir leurs fonctions effectrices. Les différentes « étapes de vie » des lymphocytes T sont présentées sous forme de schéma en **Figure 1**.

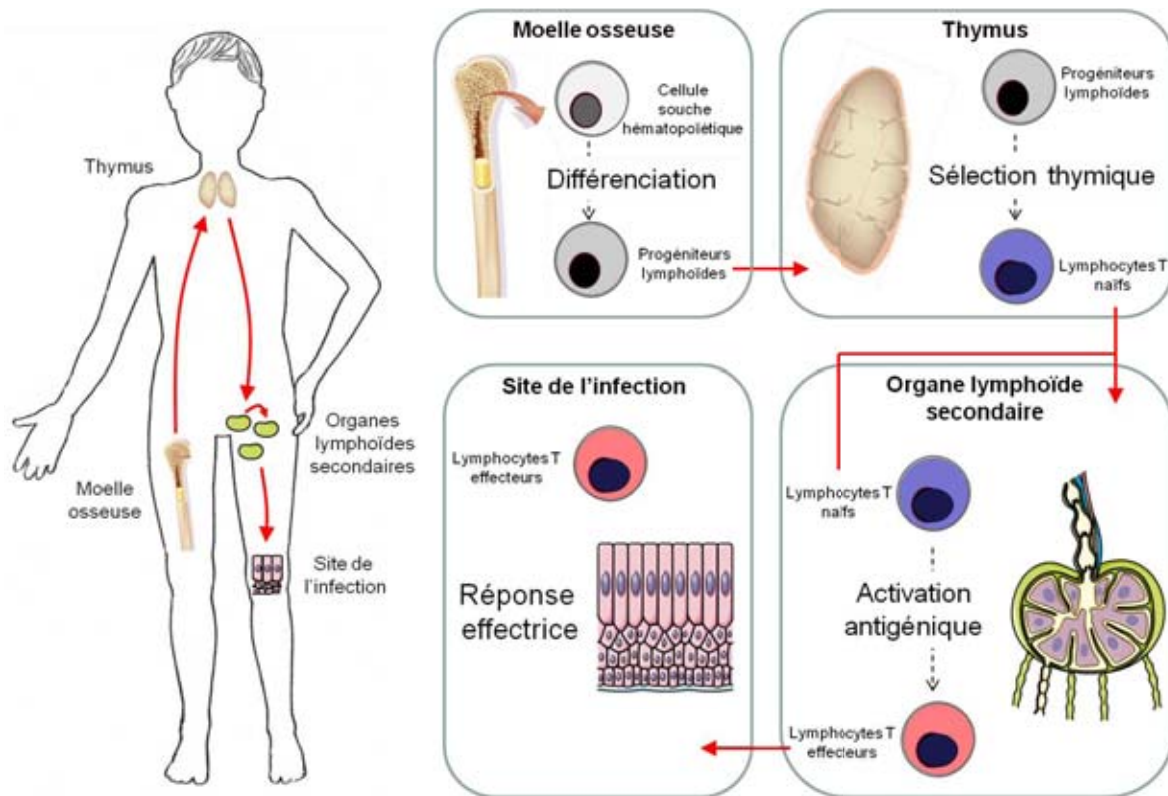


Figure 1 : Génération et migration des lymphocytes T dans l'organisme.

Au niveau de la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques se différencient en progéniteurs lymphoïdes. Ces derniers rejoignent le thymus où ils poursuivent leur différenciation et subissent les sélections positives et négatives. Les cellules ainsi sélectionnées constituent la population de lymphocytes T naifs. Ces derniers quittent le thymus pour se rendre sur leurs sites de rencontre avec les antigènes : les organes lymphoïdes secondaires. Au niveau des organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes T naifs qui reconnaissent de manière spécifique un antigène présenté par les cellules présentatrices de l'antigène s'activent, prolifèrent et acquièrent leurs fonctions effectrices. En revanche, les lymphocytes T naifs qui ne rencontrent pas l'antigène pour lequel ils sont spécifiques, circulent entre les différents organes lymphoïdes secondaires. Les lymphocytes T effecteurs sortent des organes lymphoïdes secondaires pour rejoindre le site de l'infection où ils exerceront leurs fonctions effectrices.

Les lymphocytes T ont pour origine la cellule souche hématopoïétique qui au niveau de la **moelle osseuse** va se différencier en progéniteur myéloïde commun et en progéniteur lymphoïde commun. Les progéniteurs lymphoïdes communs vont pénétrer dans le **thymus** et y poursuivre leur différenciation. Les cellules en différenciation dans le thymus, aussi appelées thymocytes, subiront une sélection positive et une sélection négative qui permettront de s'assurer que les lymphocytes T qui sortiront du thymus : 1/ seront capables de reconnaître les cellules présentatrices de l'antigène et 2/ ne réagiront pas contre le soi. À la sortie du thymus, les lymphocytes T qui sont alors naifs (ils n'ont jamais rencontré l'antigène pour lequel ils sont spécifiques), vont gagner, en empruntant la circulation sanguine, les **organes lymphoïdes secondaires**. Ce site favorise la rencontre entre les lymphocytes T et les antigènes pathogènes présentés à la surface des cellules présentatrices de l'antigène, en condition d'infection. En absence d'interaction antigénique spécifique, les lymphocytes T

Introduction : *Les lymphocytes T : chefs d'orchestre de l'immunité adaptative, une vie bien rythmée*

naïfs vont circuler entre les différents organes lymphoïdes secondaires. La spécificité antigénique de l'interaction entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice de l'antigène, aboutira à l'activation du lymphocyte T. Celui-ci sera alors capable de proliférer de manière clonale et d'exercer ses fonctions effectrices. On parlera alors de lymphocytes T effecteurs. Ils pourront alors rejoindre le **site de l'infection** pour exercer leurs fonctions, se rendre dans les **centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires** pour aider à l'activation des lymphocytes B ou encore être mis en mémoire dans les **organes lymphoïdes secondaires**.

Les différentes étapes de vie des lymphocytes T seront détaillées ci-après avec une attention plus particulière sur la description du dynamisme des lymphocytes T CD4⁺ humains et de leurs interactions cellulaires qui ont été la thématique privilégiée des recherches que j'ai conduites au cours de ma thèse.

1. Développement et sélection thymique des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes primaires

Naissance des lymphocytes T

Les lymphocytes T sont produits au niveau du thymus à partir d'un progéniteur lymphocytaire provenant de la moelle osseuse et issu de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques. Les lymphocytes T produits sont tous dotés de récepteurs qui leur permettront de reconnaître les pathogènes de manière spécifique. Au niveau de l'ensemble de la population produite, une grande variabilité de récepteurs est ainsi disponible. Néanmoins, seuls les lymphocytes T capables : 1/ d'interagir avec des cellules qui présentent les pathogènes et 2/ de ne pas s'activer contre le soi ; seront autorisés à quitter le thymus. Cette sélection au niveau du thymus permet de ne trouver en périphérie que des lymphocytes T qui seront capables de s'activer contre les pathogènes qui leur seront présentés mais pas contre le soi.

Les lymphocytes T sont des cellules de l'immunité adaptative. Contrairement aux cellules de l'immunité innée, elles vont reconnaître les agents pathogènes de manière spécifique grâce à leur récepteur pour l'antigène : le TCR (T Cell Receptor). Les lymphocytes T sont divisés en 2 catégories en fonction des chaînes qui constituent leur TCR : les lymphocytes T_{αβ} qui sont majoritairement représentés et les lymphocytes T_{γδ} qui représentent 1 à 10 % des lymphocytes T totaux chez l'homme. Nous nous intéresserons uniquement aux lymphocytes T_{αβ} que nous appellerons pour des raisons de simplicité, lymphocytes T.

Au niveau du thymus, des lymphocytes T de spécificité antigénique très variée vont être générés à partir des progéniteurs lymphoïdes communs. La diversité dans le répertoire des lymphocytes T est engendrée par un réarrangement aléatoire des gènes codant pour chacune des 2 chaînes du TCR. Cependant, 2 systèmes de sélection (la sélection positive et la

sélection négative) vont s'assurer que les lymphocytes T produits sont utiles à l'organisme, c'est-à-dire qu'ils reconnaissent le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) du soi et non dangereux c'est-à-dire qu'ils ne réagissent pas contre des peptides du soi. Finalement, sur les millions de différents thymocytes générés dans le thymus, environ seulement 2 % d'entre eux seront sélectionnés et sortiront du thymus pour générer le stock de lymphocytes T matures naïfs en périphérie (Goldrath and Bevan, 1999; Scollay et al., 1980).

Les progéniteurs lymphoïdes communs accèdent au thymus en s'extravasant à partir des vaisseaux sanguins situés à proximité de la jonction corti-médullaire thymique (Lind et al., 2001; Scimone et al., 2006). L'expression des récepteurs aux chimiokines CCR7 et CCR9 par les progéniteurs lymphoïdes communs a notamment été identifiée comme nécessaire pour leur accès au thymus (Scimone et al., 2006). L'entrée des progéniteurs lymphoïdes communs au niveau du thymus a lieu par vague avec une périodicité de 3 à 5 semaines (Foss et al., 2001). A l'intérieur du thymus, la différenciation des progéniteurs lymphoïdes communs en lymphocytes T se déroule en 3 étapes, détaillées ci-dessous et distinguables sur la base de l'expression des corécepteurs CD4 et CD8.

a) Expression du pré-TCR à la membrane des thymocytes

La première étape de cette différenciation est subie par les cellules double-négatives : CD4⁻ CD8⁻. Ces cellules représentent 1 à 5 % des thymocytes et correspondent aux thymocytes les plus immatures. Elles vont migrer depuis la jonction cortico-médullaire vers la région sous-capsulaire du cortex thymique (Lind et al., 2001). Plusieurs récepteurs aux chimiokines (CXCR4, CCR7, CCR9) ont été identifiés comme impliqués dans cette migration, néanmoins aucun d'entre eux n'est apparu indispensable (Benz et al., 2004; Misslitz et al., 2004; Plotkin et al., 2003). La migration des thymocytes double-négatifs vers la zone sous capsulaire du cortex va durer entre 13 et 15 jours (Porritt et al., 2003), au cours desquels ils vont commencer à réarranger la chaîne β de leur TCR (Raulet et al., 1985). Les thymocytes double-négatifs expriment la machinerie moléculaire nécessaire au réarrangement des gènes codant le TCR, telle que les enzymes de recombinaison RAG1 et RAG2 (Recombinaison Activating Genes 1 et 2) (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992). Sur la base de l'expression des marqueurs CD25 et CD44, 4 stades distincts de différenciation des thymocytes double-négatifs ont été décrits : double-négatifs 1 à 4 (DN1 à DN4) (Godfrey et al., 1993). Jusqu'au stade DN3, le développement des thymocytes est induit par Notch1 et supporté par l'IL-7 sécrétée par les cellules stromales corticales (Peschon et al., 1994; Radtke et al., 1999). De plus, les thymocytes eux-mêmes participent au développement des cellules

stromales corticales, puisqu'en leur absence le cortex thymique est histologiquement anormal (Hollander et al., 1995). Au stade DN2-DN3, les thymocytes vont tout d'abord, réarranger les gènes V, D et J codant pour la chaîne β du TCR (Saint-Ruf et al., 1994; von Boehmer, 2005). Si le processus de recombinaison génique est productif, la chaîne β sera exprimée à la membrane du thymocyte et stabilisée par la co-expression d'une chaîne α de substitution, la chaîne pré-T α . Ensemble, la chaîne β et la chaîne pré-T α formeront le pré-TCR. L'initiation de la transduction du signal par le pré-TCR permet l'exclusion allélique du locus β non réarrangé et le passage au stade DN4. Ce dernier est associé à la perte d'expression du marqueur CD25, puis à une prolifération cellulaire intense aboutissant au stade double-positif CD4⁺ CD8⁺. Ce dernier est représenté par 80 à 90 % des thymocytes présents dans le thymus (Sebzda et al., 1999). Il est marqué par l'expression en surface du TCR $_{\alpha\beta}$ après recombinaison fonctionnelle des gènes V et J de la chaîne α (Alam et al., 1996).

b) La sélection positive

Les thymocytes double-positifs vont ensuite subir la sélection positive au niveau du cortex thymique (Benoist and Mathis, 1989). Celle-ci va permettre de ne garder que les thymocytes T qui ont un TCR capable de reconnaître des peptides présentés sur les molécules de CMH du soi par les cellules épithéliales thymiques corticales. 90 % des thymocytes double-positifs n'auront pas une affinité suffisante pour les complexes CMH-peptide et seront éliminés puisqu'incapables de recevoir les signaux de survie transmis lors d'une interaction de bonne affinité. Une analyse par microscopie biphotonique a permis d'observer en temps réel les interactions entre les thymocytes double-positifs et les cellules stromales thymiques donnant lieu à la sélection positive (Bouso et al., 2002). Il est apparu que 10 à 50 % des thymocytes double-positifs étaient très mobiles, particulièrement dans les zones où le réseau de cellules stromales est dense. Ces observations ont été confirmées par une étude très récente qui montre que les thymocytes se déplacent le long de fibres constituées par le stroma thymique auxquelles les cellules dendritiques thymiques adhèrent (Sanos et al., 2011). Ainsi le microenvironnement thymique favorise les interactions cellulaires. Les thymocytes double-positifs établissent avec les cellules épithéliales corticales 2 types d'interactions dépendantes du CMH du soi : des contacts stables et de longue durée et des contacts transitoires en série (54 % vs 46 % des contacts). Les auteurs ont parfois pu observer les 2 types de contacts associés à une même cellule épithéliale corticale. A l'heure actuelle, il n'a pas été identifié s'il y avait une différence fonctionnelle et/ou chronologique entre ces 2 types d'interactions.

c) La sélection négative

Une fois la sélection positive réalisée, les thymocytes vont rejoindre la médulla thymique pour y poursuivre leur développement et être soumis à la sélection négative (Campbell et al., 1999; Kim et al., 1998; Witt et al., 2005). Bien que l'implication de CCR7 dans la migration des thymocytes depuis le cortex vers la médulla thymique semblait être clairement établie, une étude récente remet en question son indispensabilité (Ehrlich et al., 2009; Kwan and Killeen, 2004). La sélection négative permet d'éliminer les thymocytes auto-réactifs, qui ont une trop forte affinité pour les complexes CMH-peptides du soi. Dans le cas où les thymocytes auto-réactifs se retrouveraient en périphérie, ils seraient dangereux pour l'organisme d'où la nécessité de les éliminer. Au niveau de la médulla, les cellules épithéliales thymiques ainsi que les cellules dendritiques présentent, sur leurs molécules du CMH, des antigènes du soi exprimés aussi au niveau des organes périphériques. L'expression ectopique de ces antigènes par les cellules épithéliales thymiques est sous le contrôle de la protéine AIRE (AutoImmune REgulator) (Anderson et al., 2002). AIRE présente des similitudes importantes avec des facteurs de transcription et régule l'expression de 200 à 1200 gènes chez la souris. Chez l'Homme, la déficience en AIRE entraîne un syndrome auto-immun, l'APECED (Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy) (Anderson et al., 2002). L'issue de l'interaction entre un thymocyte auto-réactif et une cellule épithéliale thymique sera l'inactivation fonctionnelle du thymocyte aussi appelée anergie (van Meerwijk et al., 1997). En revanche, l'issue de l'interaction entre un thymocyte auto-réactif et une cellule dendritique sera l'élimination du thymocyte par apoptose (Page et al., 1996).

d) Tolérance périphérique par les lymphocytes T régulateurs

Cependant, tous les thymocytes auto-réactifs ne seront pas éliminés au niveau du thymus et certains rejoindront la périphérie. La raison principale à l'échappement des thymocytes à la tolérance centrale qui a été évoquée est que certains antigènes du soi exprimés en périphérie ne seraient pas ou peu exprimés au niveau thymique via AIRE (Klein and Kyewski, 2000). Heureusement, des mécanismes de tolérance en périphérie existent pour pallier à cette élimination imparfaite (Redmond and Sherman, 2005; Walker and Abbas, 2002). Il existe des mécanismes de tolérance passive tels que l'ignorance, l'induction d'apoptose ou d'anergie et des mécanismes actifs réalisés par les lymphocytes T régulateurs CD4⁺ Foxp3⁺. Les lymphocytes T régulateurs se développent également dans le thymus. Une étape majeure de leur développement aurait lieu dans la médulla thymique (Fontenot et al.,

2005; Sakaguchi, 2004). Les corpuscules de Hassal joueraient un rôle important dans le développement de ces cellules à travers la sécrétion de TSLP (Thymic Stromal Lymphopoïétine) et son effet sur l'activation des cellules dendritiques thymiques (Watanabe et al., 2005).

e) Lymphocytes T CD8⁺ et lymphocytes T CD4⁺

Le thymus va générer environ 10 % de thymocytes simple-positifs CD4⁺ et 5 % de thymocytes simple-positifs CD8⁺ par rapport au nombre total de thymocytes. Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ subissent le même processus de développement et de sélection thymique. Bien que le moment du choix du lignage CD4 ou CD8 soit controversé, les différentes études s'accordent sur le fait qu'il ait lieu avant la sélection négative (Germain, 2002; Singer et al., 2008; Singer and Bosselut, 2004). Les modèles suivants ont été proposés concernant le choix du lignage CD4 ou CD8 :

1/ Le modèle stochastique : selon ce modèle, le choix du lignage se ferait de manière aléatoire, indépendamment de l'engagement du TCR. Cette étape n'aurait lieu qu'une fois le choix effectué et permettrait de garder seulement les thymocytes ayant des complexes TCR/corécepteurs permettant d'induire une signalisation.

2/ Les modèles instructifs : Ces modèles sont basés sur la force ou la durée de l'interaction avec les cellules présentatrices de l'antigène. Une interaction longue ou forte conduirait à la perte d'expression du corécepteur CD8 et par conséquent à la génération de thymocytes simple-positifs CD4⁺. A l'inverse, une interaction courte ou faible conduirait à la perte d'expression du corécepteur CD4 et par conséquent à la génération de thymocytes simple-positifs CD8⁺.

3/ Le modèle cinétique : selon ce modèle, la sélection positive des thymocytes double-positifs induit une diminution de l'expression du corécepteur CD8. Dans le cas où la signalisation à travers le TCR serait persistante, les thymocytes CD4⁺ CD8^{intermédiaire} se différencieraient en thymocytes simple-positifs CD4⁺. Dans le cas contraire, des thymocytes simple-positifs CD8⁺ seraient générés.

f) Sortie du thymus et recirculation

La sortie des thymocytes matures du thymus est régulée majoritairement par le récepteur S1P₁ (Sphingosine 1 Phosphate receptor 1) (Matloubian et al., 2004). Le ligand de S1P₁, S1P (Sphingosine 1 Phosphate) est sécrété par des péricytes situés au niveau de la jonction corti-médullaire et est très enrichi dans la circulation sanguine (Pappu et al., 2007;

Zachariah and Cyster, 2010). Il a également été démontré dans des thymus artificiels qu'une forte concentration en CXCL12 avait un effet répulsif sur les thymocytes matures induisant ainsi leur sortie thymique (Poznansky et al., 2002). Les thymocytes matures rejoindraient la circulation sanguine en passant par l'espace périvasculaire connecté aux circulations sanguines et lymphatiques (Kato, 1997). Cependant, les voies de sorties du thymus ne sont pas très documentées et le système de circulation emprunté par les thymocytes matures n'est pas établi. Une recirculation des lymphocytes T matures vers le thymus a été observée, cependant les mécanismes et l'implication de cette recirculation ne sont pas clairement identifiés (Michie and Rouse, 1989). Les lymphocytes T matures retrouvés dans le thymus sont majoritairement des lymphocytes T activés bien qu'une faible proportion de lymphocytes T naïfs ait également été observée (Agus et al., 1991). Ces cellules empruntent les veinules post-capillaires au niveau de la jonction cortico-médullaire pour entrer dans le thymus puis se localisent principalement au niveau de la médulla (Mori et al., 2007). De nombreuses fonctions à la recirculation des lymphocytes T dans le thymus ont été proposées. Parmi elles, la présence de lymphocytes T matures dans le thymus permettrait d'éliminer les pathogènes qui infecteraient le thymus, participerait aux sélections positives et négatives et/ou constituerait un lieu de stockage des cellules mémoires (Hale and Fink, 2009).

2. Extravasation des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires

Enfance des lymphocytes T

A la sortie du thymus, les lymphocytes T qui n'ont encore jamais rencontré le pathogène pour lequel ils sont spécifiques vont rejoindre la circulation sanguine pour se rendre dans les ganglions lymphatiques. La phase d'entrée dans les ganglions est un mécanisme finement régulé qui nécessite une interaction forte des lymphocytes T avec les cellules spécialisées qui tapissent les vaisseaux sanguins. Cette interaction agit comme un frein sur les lymphocytes T entraînés par le flux sanguin, permettant leur passage entre les cellules des vaisseaux sanguins mais aussi au travers de ces dernières.

Contrairement aux cellules dendritiques qui empruntent les vaisseaux lymphatiques afférents pour entrer dans les organes lymphoïdes secondaires, la majorité des lymphocytes T y accèdent en traversant les HEV (High Endothelial Venules). Morphologiquement, les HEV se distinguent des veinules par la présence de cellules endothéliales cuboïdales volumineuses, d'une lame basale fine et d'une gaine périvasculaire (Kraal and Mebius, 1997). Les HEV sont majoritairement localisées au niveau de la zone T des organes lymphoïdes secondaires.

Il est largement admis que l'extravasation des lymphocytes T naïfs depuis la circulation sanguine vers les organes lymphoïdes secondaires (aussi appelé diapédèse) est contrôlée par une succession de 3 étapes distinctes [**Figure 2** ; pour revue : (Butcher and Picker, 1996)]. Elle est initiée par **l'adhésion des lymphocytes T aux HEV**, majoritairement à travers l'interaction des L-sélectines (CD62-L) avec son ligand, le PNAD (Peripheral Node Addressin) exprimé par l'endothélium. Cette adhésion de faible intensité a pour conséquence de freiner le mouvement des lymphocytes T portés par le flux sanguin. Les lymphocytes T roulent alors sur les cellules endothéliales ce qui favorise leur **interaction avec les chimiokines**. L'activation des récepteurs aux chimiokines sur les lymphocytes T induit le **changement de conformation de la molécule d'adhésion LFA-1** (Lymphocytes Function-associated Antigen-1 ; CD11a-CD18 ou $\alpha_L\beta_2$) et son interaction à ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1 ; CD54), exprimée par les cellules endothéliales. La forte adhésion résultante de cette interaction est alors la clef pour le passage des lymphocytes T à travers les HEV. Ces 3 étapes sont détaillées plus précisément ci-après. Ce serait l'expression par les HEV de molécules d'adhésion et de chimiokines spécifiques qui expliquerait, qu'à l'exception des cellules dendritiques plasmacytoïdes, seuls les lymphocytes T soient capables d'emprunter cette voie d'entrée pour accéder aux organes lymphoïdes secondaires (Cella et al., 1999).

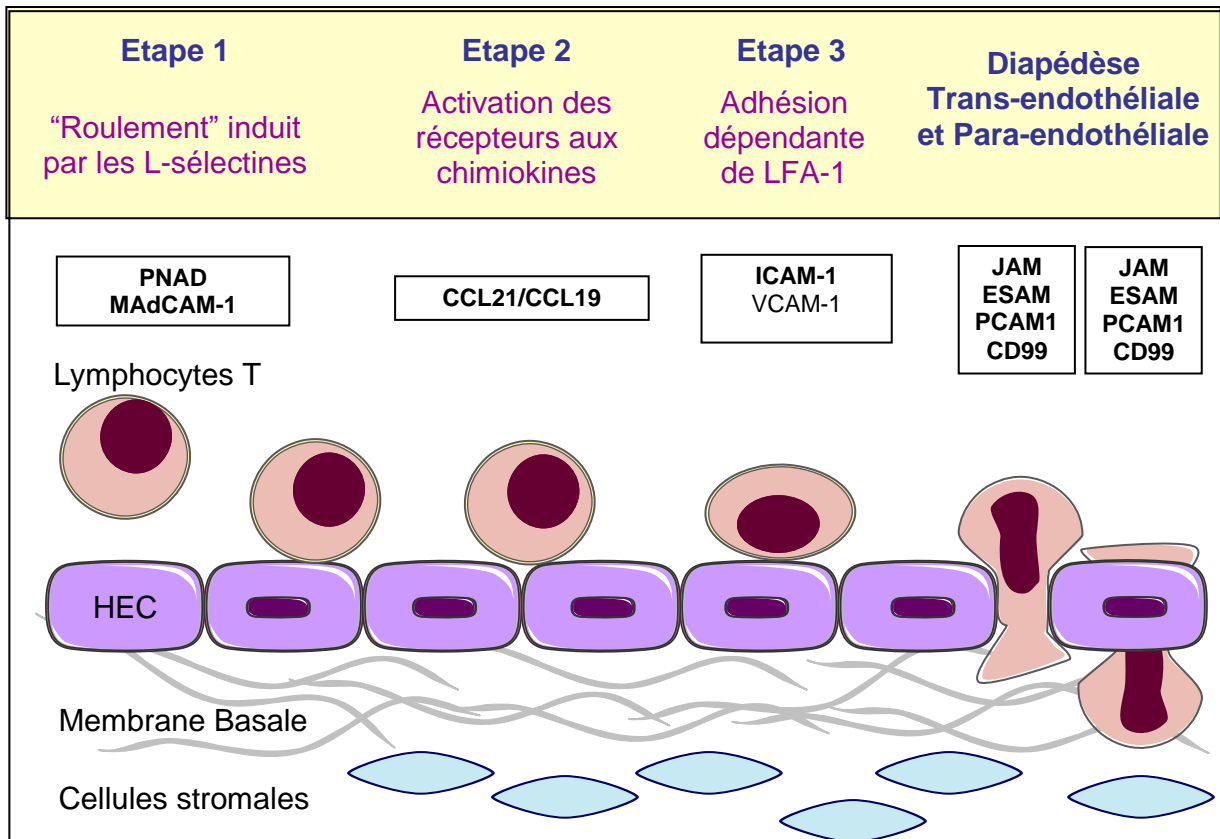


Figure 2 : Extravasation des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires

La migration des lymphocytes T dans les HEV est freinée par l'engagement des L-Sélectines avec PNAD et MAdCAM exprimés à la surface des HEC (Etape 1). Les lymphocytes « roulent » alors sur la surface des HEC, ce qui va permettre l'engagement de leurs récepteurs aux chimiokines avec les chimiokines (CCL19/21) présentées par les HEC (Etape 2). L'activation des récepteurs aux chimiokines induit le changement de conformation des molécules d'adhésion (LFA-1) et leur forte interaction avec leurs ligands (ICAM-1). Cette interaction va conduire à un arrêt de migration des lymphocytes T (Etape 3). Ces derniers traversent alors les HEC au niveau des jonctions serrées (passage para-endothélial) ou à travers les cellules (passage trans-endothélial). Les lymphocytes T traverseront ensuite la membrane basale et la couche de cellules stromales périvasculaires.

a) « Roulement » des lymphocytes T induit par une adhésion aux HEV de faible intensité

La première étape (**Figure 2, Etape 1**) conduisant à l'extravasation des lymphocytes T naïfs vers les organes lymphoïdes secondaires consiste en la diminution de la vitesse des lymphocytes T présents dans la circulation sanguine. L'implication de la L-sélectine est classiquement et largement établie, bien qu'il ait également été démontré que d'autres molécules d'adhésion participent à cette étape.

La déficience en L-sélectine compromet l'entrée des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes périphériques, réduit leur entrée dans les organes lymphoïdes mésentériques mais n'a aucun effet sur leur entrée dans les plaques de Peyer (Arbones et al., 1994; Kunkel et al.,

1998). Il a été démontré que l'entrée dans les plaques de Peyer est dépendante de MAdCAM1 (Mucosal Addressin Cellular Adhesion Molecule-1), un ligand des intégrines $\alpha_4\beta_7$, conduisant également au roulement des lymphocytes T sur les HEV (Bargatze et al., 1995; Wagner et al., 1996). Ces observations s'expliquent par une expression différentielle des molécules d'adhésion PNAD et MAdCAM1 par les HEV de ces différents organes lymphoïdes secondaires. En effet, les HEV des plaques de Peyer sont PNAD⁻ et MAdCAM1⁺, les HEV des organes lymphoïdes mésentériques expriment à la fois PNAD et MAdCAM1, alors que les HEV des organes lymphoïdes périphériques sont PNAD⁺ et MAdCAM⁻ (Berlin et al., 1993). En plus de PNAD et de MAdCAM1, les molécules d'adhésions P-sélectine et VAP1 (Vascular Apoptosis-inducing Protein 1) contribueraient également, mais de manière mineure, à l'induction du roulement des lymphocytes T sur les HEV (Kunkel et al., 1998; Salmi and Jalkanen, 2001). La contribution de CD43 et CD44 est quant à elle sujette à controverse (Jalkanen et al., 1986; McEvoy et al., 1997; Stockton et al., 1998; Stoop et al., 2002).

b) Activation des récepteurs aux chimiokines

Le ralentissement des lymphocytes T dans la circulation sanguine favorise l'interaction des chimiokines avec leurs récepteurs exprimés à la surface des lymphocytes T (**Figure 2, Etape 2**). Cette étape est également nécessaire à l'extravasation des lymphocytes T. Cela a été démontré par l'utilisation de la toxine pertussique (PTX). Cette protéine produite par *Bordetella pertussis* inhibe la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G (dont les récepteurs aux chimiokines) par ribosylation de l'ADP (Adénosine DiPhosphate) porté par la sous-unité G_{oi} (Kaslow and Burns, 1992). En effet, l'utilisation de PTX inhibe fortement l'entrée des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes (Spangrude et al., 1984). Par la suite, l'utilisation de souris déficientes en chimiokines ou en récepteurs aux chimiokines a conforté ces résultats. Les souris plt/plt (paucity in lymph-node T cells) sont déficientes pour les chimiokines CCL19 et CCL21Ser (isoforme de CCL21 exprimé au niveau des HEV). CCL19 (aussi appelée ELC ; Epstein-Barr virus-induced gene 1 Ligand Chemokine, ou MIP3 β) et CCL21 (aussi appelée SLT, TCA4, exodus2 ou 6Ckine) sont des ligands du récepteur CCR7 exprimé à la surface des lymphocytes T naïfs. Il a été démontré que les organes lymphoïdes des souris plt/plt mais aussi des souris déficientes pour CCR7, contiennent très peu de lymphocytes T naïfs (Forster et al., 1999; Gunn et al., 1999). Les lymphocytes T déficients pour le récepteur à la chimiokine CXCL12 (SDF-1 α ; Stromal cell-Derived Factor-1 α , PBSF ; Pre-B-cell growth Stimulating Factor), CXCR4, ne présentent aucun défaut de transmigration vers les organes lymphoïdes secondaires dans les souris sauvages (Okada et al., 2002).

Cependant, une réduction de leur transmigration a été observée dans les souris plt/plt avec un défaut plus sévère chez les souris de fond génétique BALB/c par rapport au fond C57BL/6. Il existerait donc une spécificité génique des voies de signalisation des chimiokines. L'ensemble de ces résultats indiquent que la contribution de CXCR4/CXCL12 dans l'extravasation des lymphocytes T vers les organes lymphoïdes secondaires est mineure alors que CCR7 et ses ligands (CCL21 et CCL19) y jouent un rôle majeur.

Chez l'Homme, les chimiokines CCL21, CCL19 et CXCL12 sont exprimées à la surface des HEC (High Endothelial Cells), cependant les ARNm de ces chimiokines ne sont pas détectés dans ces cellules (Carlsen et al., 2005; Gunn et al., 1998; Okada et al., 2002). Les chimiokines produites par les cellules stromales des organes lymphoïdes secondaires seraient donc transportées à la surface des HEC (Baekkevold et al., 2001; Luther et al., 2000). Une autre source de chimiokines dans les organes lymphoïdes secondaires provient des cellules hématopoïétiques, principalement des cellules dendritiques et des macrophages (Luther et al., 2000). Les premières évidences du transport des chimiokines depuis les organes lymphoïdes secondaires vers les HEV découlent d'expériences réalisées chez les souris plt/plt : l'injection intra-cutanée de CCL19 ou de CCL21 restaure le défaut d'extravasation des lymphocytes T naïfs (Baekkevold et al., 2001; Stein et al., 2000). Par la suite, il a été démontré que le transport des chimiokines depuis le sinus subcapsulaire jusqu'aux HEV est assuré par les FRC (Fibroblastic Reticular Cells) (Gretz et al., 2000). Les FRC entourent les HEV et forment une sorte de canal, aussi appelé conduit, entre le sinus subcapsulaire et les zones T des organes lymphoïdes secondaires (**Figure 4**). Ce même mécanisme de transport des chimiokines a également été mis en évidence dans la rate (Nolte et al., 2003).

L'activité des chimiokines dans la lumière des HEV peut être inhibée par le récepteur scavenger DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines) (Kashiwazaki et al., 2003). Comme les récepteurs aux chimiokines, DARC appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G avec pour différence de ne pas exprimer le motif DRY (Neote et al., 1994). Ce dernier étant nécessaire au couplage des protéines G, le récepteur DARC ne transduit aucun signal suite à la fixation de chimiokines. Il a donc pour fonction de séquestrer ces chimiokines. Néanmoins, il ne semble pas jouer un rôle majeur dans la transmigration lymphocytaire, puisqu'aucun défaut dans la composition cellulaire des organes lymphoïdes secondaires des souris déficientes en DARC n'a été observé (Kashiwazaki et al., 2003). La protéine MAC25 (anciennement appelée Insulin-like Growth Factor-Binding Protein related Protein1 (Baxter et al., 1998)) est également capable de séquestrer les chimiokines (Nagakubo

et al., 2003). Il s'agit d'une protéine sécrétée et exprimée au niveau de la lame basale des HEV (Nagakubo et al., 2003; Usui et al., 2002). Son expression dans la lumière des HEV est controversée (Girard et al., 1999; Usui et al., 2002). Au niveau de la lame basale, il a également été proposé que MAC25 soit impliquée dans la présentation des chimiokines sans que cela ait été démontré *in vivo* (Nagakubo et al., 2003).

Généralement, il est admis que les chimiokines se lient aux glycosamines et aux peptidoglycane pour être présentées aux lymphocytes T ; cependant la démonstration d'un tel mécanisme est actuellement inexistante (Bernfield et al., 1999). Des protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine et le collagène IV s'avèrent capables de lier les chimiokines CXCL12 et CCL21 respectivement (Nagakubo et al., 2003; Pelletier et al., 2000).

Il est classiquement proposé que les chimiokines soient également requises pour orienter la migration unidirectionnelle (de l'extérieur vers l'intérieur des organes lymphoïdes secondaires) des lymphocytes T. Bien que les expériences de migration lymphocytaire conduites *in vitro* s'accordent sur la nécessité de créer un gradient de chimiokines pour induire la transmigration, il n'a actuellement jamais été montré *in vivo* que les lymphocytes T migrent en direction de la source de chimiokines. En effet, bien que la signalisation à travers les récepteurs aux chimiokines soit nécessaire à la transmigration lymphocytaire, la formation de gradient n'est pas requise (Cinamon et al., 2001). D'autre part, l'existence de gradient n'a pas été prouvée *in vivo*. Enfin, des expériences complexes conduites *in vitro* ont montré que l'expression simultanée de plusieurs chimiokines peut moduler la réponse migratoire lymphocytaire (Nandagopal et al., 2011). Ces observations soutiennent que la migration lymphocytaire *in vivo* est un mécanisme finement régulé et souligne par conséquent les difficultés de son étude.

La liaison des chimiokine CCL21 et CCL19 à leur récepteur CCR7, permet un changement de conformation des intégrines (inside-out signalling) (Bargatze and Butcher, 1993). Ce changement de conformation nécessaire à la réalisation de l'étape suivante (**Figure 2, Etape 3**) est détaillé dans le sous-chapitre suivant (**Figure 3**). Le changement de conformation des intégrines nécessaire à la forte adhésion des lymphocytes T aux HEV peut également être induit et/ou soutenu par le flux sanguin (Alon and Dustin, 2007; Cinamon et al., 2001; Shamri et al., 2005).

c) Adhésion des lymphocytes T aux HEV induite par l'engagement de LFA-1

Chez l'Homme, le rôle crucial de la molécule d'adhésion LFA-1 est révélé par deux immunodéficiences rares, LAD-I et LAD-III (Leucocyte Adhesion Deficiency) liées respectivement à des mutations géniques de LFA-1 et des autres intégrines $\beta 2$ ou de leurs molécules activatrices : Rap1 et kindlin-3 (Hogg and Bates, 2000). Le rôle de ces 2 molécules sur l'activation des intégrines $\beta 2$ sera détaillé ci-après. Alors que les patients LAD-I n'expriment pas les intégrines $\beta 2$ à la membrane cellulaire, les patients LAD-III expriment des intégrines $\beta 2$ mais leur changement de conformation à travers la signalisation « inside-out » est défectueuse. Les désordres immuns des patients LAD sont majoritairement incriminés aux neutrophiles qui sont les premières cellules du système immunitaire à se rendre sur le site d'une infection et pour lesquels l'expression des intégrines est restreinte aux intégrines $\beta 2$. Les lymphocytes T des patients LAD présentent aussi des défauts de migration, partiellement compensés par l'utilisation des intégrines $\alpha_4\beta_7$. Chez les souris déficientes pour LFA-1, la migration des lymphocytes T vers les organes lymphoïdes secondaires périphériques est défectueuse alors que l'entrée dans les organes mésentériques est seulement partiellement affectée (Andrew et al., 1998; Berlin-Rufenach et al., 1999). Il a été démontré que l'interaction des intégrines $\alpha_4\beta_7$ avec VCAM1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) peut compenser l'absence de LFA-1 pour l'entrée lymphocytaire dans les organes lymphoïdes périphériques (Berlin-Rufenach et al., 1999). Cette interaction est également impliquée dans l'entrée dans les organes lymphoïdes mésentériques. Quelles que soient les intégrines en jeu, celles-ci doivent avoir préalablement été activées pour permettre l'arrêt des lymphocytes sur les HEV. Comme indiqué précédemment, le changement de conformation des intégrines est induit via une signalisation « inside-out » résultant de l'activation des récepteurs aux chimiokines et est augmenté par la force du flux sanguin (Alon and Dustin, 2007; Shamri et al., 2005). LFA-1 est composée d'une chaîne α et d'une chaîne β exprimées à la membrane cellulaire sous 3 conformations différentes : la conformation courbée (bent) de LFA-1 correspond à une forme inactive de la protéine, la conformation étendue-fermée (extended-closed) a une affinité intermédiaire pour la liaison avec son ligand ICAM-1 et la conformation étendue-ouverte (extended-open) a une forte affinité pour ICAM-1 (Nishida et al., 2006) (**Figure 3**). Contrairement à la forme courbée, la forme étendue d'affinité intermédiaire se caractérise par l'accessibilité de l'anticorps monoclonal KIM127 à un épitope exprimé au niveau du second domaine EGF-like (Beglova et al., 2002; Dransfield et al., 1992). Les conformations d'affinité intermédiaire et forte se distinguent structurellement par la valeur de

l'angle formé entre les domaines hybrid et β -like (Nishida et al., 2006). L'épitope pour l'anticorps monoclonal 24 est exprimé au niveau du domaine I-like de la conformation de forte affinité uniquement (Kamata et al., 2002).

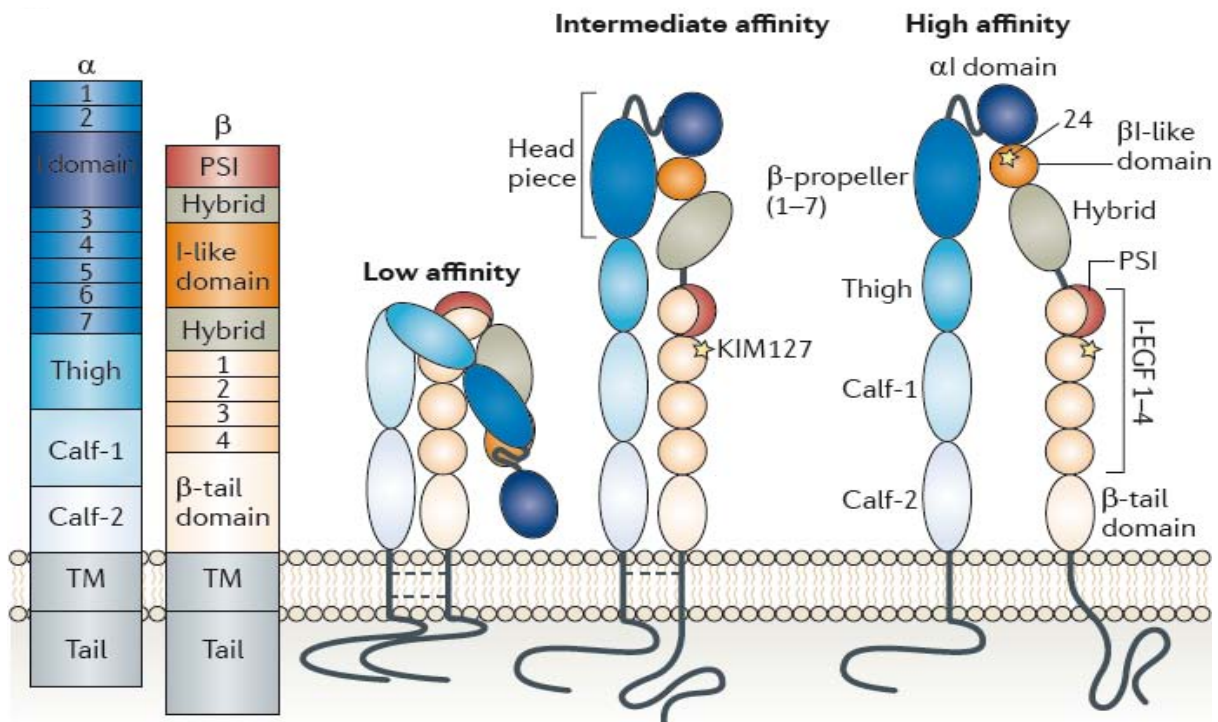


Figure 3 : Changement conformationnel de LFA-1.

La molécule d'adhésion LFA-1 est composée par une chaîne α et par une chaîne β . Elle se présente sous 3 conformations distinctes : une forme courbée de faible affinité pour son ligand ICAM-1 (low affinity) et de 2 formes étendues, d'affinité intermédiaire (intermediate affinity) et forte (high affinity). La localisation des épitoques reconnus par les anticorps KIM127 et 24 est indiquée par des étoiles. D'après (Hogg et al., 2011).

► La signalisation « inside-out » :

Un rôle majeur dans la signalisation « inside-out » des lymphocytes T, induite par les chimiokines, a été attribué à RAP1 et à sa GEF (Guanine Exchange Factor), CALDAG-GEF1 (Calcium and DiAcylGlycerol-regulated Guanine nucleotide Exchange Factor 1) (Ghandour et al., 2007; Pasvolsky et al., 2007). En effet, l'expression d'une forme constitutivement activée de RAP1 augmente l'affinité de LFA-1 pour ICAM-1 et favorise la transmigration des lymphocytes T en condition de flux (Shimonaka et al., 2003). De plus, la déficience en CALDAG-GEF1 montre une diminution de l'arrêt des lymphocytes T sur les HEV (Pasvolsky et al., 2007). Suite à l'activation des récepteurs aux chimiokines, la PLC (PhosphoLipase C) induit, via la libération de calcium (Ca^{2+}) et de DAG (1,2 DiAcylGlycerol), le recrutement à la membrane et l'activation de CALDAG-GEF-1. Cette dernière activera alors RAP1 par changement de sa forme liée au GDP (Guanosine 5'-DiPhosphate) en GTP (Guanosine 5'TriPhosphate) (Ghandour et al., 2007).

La PIP5K1 γ 87 (Phosphatidylinositol-4-Phosphate 5 Kinase type 1 γ 87) joue également un rôle important dans la signalisation « inside-out », puisqu'il a été montré que l'expression de LFA-1 sous sa forme de forte affinité est dépendante de l'activité de cette kinase (Bolomini-Vittori et al., 2009). La PIP5K1 γ 87 serait activée par la production d'acides phosphatidiques résultant de l'activation des récepteurs aux chimiokines (Bolomini-Vittori et al., 2009). Cependant, les molécules impliquées dans le changement de conformation de LFA-1 sous la PIP5K1 γ 87 n'ont pas été clairement décrites dans les lymphocytes T. Les résultats obtenus à partir d'autres types cellulaires suggèrent que la PIP5K1 γ 87 produirait du PI(4,5)P2 qui servirait de molécule d'ancrage à la membrane pour d'autres molécules signalétiques ou pour des molécules du cytosquelette d'actine exprimant des domaines PH (Hogg et al., 2011; Wang et al., 2004). La taline fait partie des molécules recrutées à la membrane par le PI(4,5)P2. Celle-ci active les intégrines β 2 par liaison à leur extrémité cytoplasmique (Garcia-Alvarez et al., 2003). La kindlin-3 participe à la liaison de la taline aux intégrines β 2 (Moser et al., 2009). Ainsi, le changement de conformation de LFA-1 (de la conformation courbée à la conformation étendue d'affinité intermédiaire) sur les lymphocytes T permet leur arrêt de migration et leur interaction avec les HEV (Salas et al., 2006).

► La signalisation « outside-in » :

La conformation étendue d'affinité intermédiaire de LFA-1 est capable de se lier à son ligand, ICAM-1. Cette interaction induit une cascade de signalisation appelée signalisation « outside-in ». Elle implique une coopération entre la taline et un effecteur de RAP1, RAPL présent à la membrane puisque recruté précédemment par la signalisation inside-out. De plus, les tyrosines kinases de la famille de SRC et de SYK (Lck, Zap70) sont phosphorylées suite à cette interaction (Evans et al., 2011). Une fois activée, Zap70 va à son tour phosphoryler VAV-1, libérant ainsi la taline constitutivement complexée à VAV-1. Cette cascade de signalisation permet la conversion de LFA-1 en sa conformation étendue de forte affinité et par conséquent une adhésion forte des lymphocytes T aux HEV.

d) Passage des HEV

Une fois que les lymphocytes T adhèrent fortement aux HEV, ils leur restent encore à traverser 3 barrières pour enfin accéder aux organes lymphoïdes secondaires : la couche de cellules endothéliales (HEC), la membrane basale et la couche de cellules stromales périvasculaires (**Figure 2** ; (Kraal and Mebius, 1997)). En 1964, des travaux ont montré par microscopie électronique que les lymphocytes T traversent la couche de HEC en passant par

les jonctions intercellulaires (passage para-cellulaire) ou en pénétrant à l'intérieur des cellules (passage trans-cellulaire) (Marchesi and Gowans, 1964). Bien que très surprenante, l'utilisation de la voie trans-cellulaire par les leucocytes a été observée dans un grand nombre d'études *in vivo* (pour revue (Sage and Carman, 2009)). En revanche, la diapédèse trans-cellulaire n'a été observée *in vitro* que récemment (Carman et al., 2007). Par conséquent, les mécanismes de la migration trans-cellulaire sont moins connus que ceux de la diapédèse para-cellulaire.

► Passage par les jonctions serrées des HEC (para-cellulaire) :

L'importance du passage à travers les jonctions serrées des HEC a été révélée en interférant avec les molécules exprimées au niveau des jonctions serrées. L'utilisation d'anticorps bloquants ou de souris déficientes pour les molécules JAM-A (Junctional Adhesion Molecule A), JAM-C, ESAM (Endothelial Cell Selective Adhesion Molecule), PECAM-1 (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1), et CD99 ont révélé l'implication de ces molécules dans le passage des leucocytes entre les cellules endothéliales (pour revue (Muller, 2011)). A l'opposé, les VE-Cadhérine (Vascular Endothelial cell-specific Cadherin) auraient un effet négatif sur ce passage. Cependant, l'implication spécifique de ces différentes molécules d'adhésion dans le passage des lymphocytes T au niveau des jonctions serrées des HEC des organes lymphoïdes secondaires, n'a pas été étudiée. Il a été proposé que l'engagement des molécules d'adhésion lymphocytaire avec leur ligand à la surface des HEC entraine en compétition avec les interactions adhésives nécessaires à la formation des jonctions serrées entre les HEC (Ley et al., 2007). Ainsi, le passage des lymphocytes T à travers les jonctions serrées serait favorisé par le relâchement de ces dernières. Un second facteur pouvant agir sur le relâchement des jonctions serrées est le Ca^{2+} produit par les HEC suite à l'agrégation (clustering) des molécules ICAM-1 ou VCAM-1 (Muller, 2003). En effet, le Ca^{2+} induit l'activation des MLCK (Myosin Light-Chain Kinase) et par conséquent la contraction des cellules endothéliales. Bien que ce mécanisme ait été identifié pour le passage transendothélial des neutrophiles, aucune étude n'a à ce jour révélé sa participation pour les lymphocytes (Hixenbaugh et al., 1997). Enfin, de petites vésicules nommées LBRC (Lateral Border Recycling Compartement) ont été identifiées à proximité de la membrane des HEC, au niveau des jonctions serrées (Jin et al., 2008). Les LBRC contiennent des molécules d'adhésion impliquées dans le passage transendothélial telles que JAM-A, CD99 et nepmucine (Jin et al., 2008; Mamdouh et al., 2009). Le blocage de la polarisation des LBRC

(induit par les kinésines le long des microtubules) au site de la transmigration empêche le passage lymphocytaire (Mamdouh et al., 2009).

► Passage intracellulaire des HEC (trans-cellulaire)

Les études conduites *in vitro* ont révélé que le pourcentage de lymphocytes qui utilisent la migration trans-cellulaire est compris entre 5 et 60 %. Ce pourcentage varie en fonction du type de cellules endothéliales (HDMVEC, HLMVEC or HUVEC (Human Dermal Microvascular-, Human Lung Microvascular- or Human Umbilical Vein-, -Endothelial Cells) utilisées dans les expériences *in vitro* (Carman et al., 2007). Les études menées *in vivo* et étudiant spécifiquement le passage des HEC par les lymphocytes ont révélé que la voie trans-cellulaire est préférentiellement empruntée par les lymphocytes (Marchesi and Gowans, 1964). Plus récemment, la diapédèse trans-cellulaire des lymphocytes a aussi été observée par microscopie électronique au niveau des HEV d'amygdales humaines (Indrasingh et al., 2002). Deux modes de diapédèse trans-cellulaire ont été observés. Le premier mode, nommé « emperiopolesis » (du grec em = à l'intérieur, peri = autour, polemai = se balader), est caractérisé par l'entrée en totalité du lymphocyte à l'intérieur des HEC (Cho and De Bruyn, 1979; Humble et al., 1956). Le second mode de diapédèse implique la formation d'un pore dans les HEC à proximité des jonctions serrées que les lymphocytes empruntent alors (Azzali et al., 2008). La diapédèse est précédée par une étape de migration latérale des cellules du système immunitaire le long des HEC, ce qui leur permet de détecter les sites les plus permissifs au passage trans-endothélial (Schenkel et al., 2004). Récemment, il a été montré qu'au cours de leur migration latérale, les lymphocytes émettent et rétractent de petites protrusions riches en actine comparables aux podosomes des cellules invasives (Carman et al., 2007). La formation de ces protrusions est un pré-requis à la diapédèse trans-cellulaire. De plus, il a été observé que les protrusions induisent des invaginations de la membrane des HEC qui pourraient être à l'origine du déplacement des organelles endothéliales et de la fusion des membranes plasmiques apicales et basales. De manière surprenante, de nombreuses molécules impliquées dans le passage intercellulaire, jouent également un rôle dans le passage intracellulaire. Au cours du passage des lymphocytes T à travers les cellules endothéliales, ICAM-1 est recruté au site de la diapédèse ainsi que tout le long du canal bordé par la membrane endothéliale et formé pour le passage intracellulaire (Carman and Springer, 2004; Mamdouh et al., 2009; Millan et al., 2006). Carman et Springer ont aussi montré que la molécule ICAM-1 est enrichie au niveau de protrusions membranaires émanant des HEC (nommées « transmigratory cups ») et qui contactent les lymphocytes T (Carman and

Springer, 2004). Le désassemblage du cytosquelette d'actine conduit à la disparition de ces protrusions, mais n'a pas d'effet sur l'adhésion lymphocytaire. Cependant, *in vitro*, bien que le recrutement de ICAM-1 au site de la diapédèse ait été observé par différents groupes, la formation des protrusions membranaires semble dépendre des conditions expérimentales et notamment de la présence de chimiokines (Barreiro et al., 2002; Carman and Springer, 2004; Mamdouh et al., 2009). D'autre part l'existence physiologique de telles structures est aujourd'hui controversée (Millan et al., 2006).

Comme pour ICAM-1, un enrichissement des molécules PECAM, JAM-A et CD99 a été observé au site de la diapédèse (Carman and Springer, 2004; Mamdouh et al., 2009; Millan et al., 2006). L'implication de PECAM et CD99 dans la diapédèse trans-cellulaire a aussi été montrée par l'utilisation d'anticorps bloquant (Mamdouh et al., 2009).

Ainsi, actuellement aucune spécificité dans l'implication des molécules d'adhésion pour les diapédèses para- et intra-cellulaires n'a pu être démontrée.

► Passage de la membrane basale et des cellules stromales périvasculaires

La membrane basale est composée d'un réseau de laminine et d'un réseau de collagène IV. Ces réseaux sont interconnectés grâce au nidogen 2 et au perlecan. Il a été démontré que certaines régions de la membrane basale de la barrière hémato-encéphalique sont appauvries en laminine et en collagène, ce qui faciliterait le passage des lymphocytes (Sixt et al., 2001). Cependant, l'existence de ces zones de moindre densité, n'a pas été prouvée au niveau de la lame basale des HEV des organes lymphoïdes secondaires. De plus, chez la souris, au niveau des vaisseaux crémastériques, il a été montré que les zones de moindre densité colocalisent avec des régions dans lesquelles les cellules stromales périvasculaires (péricytes ou FRC) sont peu fréquentes facilitant ainsi le passage des neutrophiles (Wang et al., 2006). La présence de zones comparables reste à prouver au niveau des HEV des organes lymphoïdes secondaires.

e) Contrôle de l'entrée lymphocytaire

Récemment, il a été montré que les HEV ne sont pas seulement une barrière physique, mais qu'elles sont dotées d'un système de régulation de l'entrée dans les organes lymphoïdes secondaires (Mionnet et al., 2011). En bloquant la sortie des lymphocytes T des organes lymphoïdes secondaires, les auteurs de ce travail ont montré la formation de poches sous les HEV des organes lymphoïdes secondaires. Ces poches sont un lieu de stockage pour les lymphocytes T candidats à l'entrée dans les organes lymphoïdes secondaires. En effet, les lymphocytes T « attendent » quelques minutes dans ces zones que de la place se libère au

Introduction : *Les lymphocytes T : chefs d'orchestre de l'immunité adaptative, une vie bien rythmée*

niveau du parenchyme des organes lymphoïdes secondaires via la sortie d'autres lymphocytes. Par ce système, les HEV régulent l'homéostasie des organes lymphoïdes secondaires. Une autre étude récente a montré le rôle des cellules dendritiques dans le contrôle de l'entrée des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires (Moussion and Girard, 2011). En effet, la déplétion en cellules dendritiques diminue l'extravasation des lymphocytes T naïfs. Les auteurs de cette étude ont montré que la sécrétion de lymphotoxine par les cellules dendritiques est impliquée dans la maturation des HEV nécessaire à l'extravasation lymphocytaire.

3. Rencontre avec les cellules présentatrices de l'antigène dans les organes lymphoïdes secondaires

Adolescence des lymphocytes T

Une fois que les lymphocytes T ont atteints les ganglions, leur objectif va être de trouver le pathogène pour lequel ils sont spécifiques. Dans les ganglions, les pathogènes sont présentés par des cellules du système immunitaire, et notamment par les cellules dendritiques. Les lymphocytes T vont donc explorer le ganglion lymphatique à la recherche des cellules dendritiques puis scanner leur surface. En absence de pathogènes, les lymphocytes T sont très mobiles dans les ganglions. En revanche, lorsqu'ils vont rencontrer une cellule dendritique leur présentant le pathogène pour lequel ils sont spécifiques, ils vont stopper leur migration afin d'établir un contact privilégié avec la cellule dendritique.

Une fois à l'intérieur des organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes T vont explorer l'environnement à la recherche de cellules présentatrices de l'antigène présentant sur le CMH du soi, des antigènes du soi (en condition de non infection) ou des antigènes pathogènes (en condition d'infection). Cette tâche implique que les lymphocytes T explorent scrupuleusement la surface des cellules présentatrices de l'antigène tout en évitant d'adhérer trop fortement à ces dernières ce qui aurait pour conséquence une diminution de leur mobilité. Par conséquent, la mobilité et l'interaction des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires sont des mécanismes qui se doivent d'être finement balancés. Nos connaissances dans ce domaine ont été très nettement enrichies à partir de 2002 grâce au développement de la microscopie biphotonique. Cette technologie d'imagerie à fluorescence, à fort pouvoir de pénétration dans les tissus (~ 400 μm versus ~ 100 μm pour la microscopie confocale), a en effet permis de visualiser les interactions entre lymphocytes T et cellules présentatrices de l'antigène en 3-dimensions dans l'environnement intact et complexe qu'est l'organe lymphoïde secondaire.

a) Organisation des organes lymphoïdes secondaires

De manière simplifiée, les organes lymphoïdes secondaires sont divisés en deux régions : le cortex et la médulla (**Figure 4**). Le cortex est subdivisé en zones T aussi appelés paracortex et en zones B qui correspondent aux follicules primaires en cas de non infection et qui se développent en centres germinatifs en cas d'infection. C'est au niveau des zones T que l'on retrouve les HEV qui permettent l'entrée des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires. Comme indiqué précédemment, la couche de cellules endothéliales des HEV est entourée par une lame basale et par les FRC. Ces derniers assurent la connexion entre le sinus subcapsulaire et les zones T en formant une sorte de conduit. Les zones T correspondent également au lieu d'interaction et d'activation des lymphocytes T par les cellules présentatrices de l'antigène professionnelles, les cellules dendritiques. Les zones B sont le site de la réponse immunitaire humorale. L'organisation corticale en zones T et B repose sur un réseau de fibres dense constitué par les FRC dans les zones T et par les cellules dendritiques folliculaires (FDC) dans les zones B (Bajenoff et al., 2006; Cyster et al., 2000; Gretz et al., 1997). Alors que les FRC expriment des chimiokines (CCL21 majoritairement) reconnues par les lymphocytes T naïfs et les lymphocytes B, les FDC expriment des chimiokines (CXCL13 majoritairement) spécifiques des lymphocytes B (Asperti-Boursin et al., 2007; Kim et al., 2001). Les fonctions de la médulla ne sont pas clairement établies. Elle contient les sinus des vaisseaux lymphatiques drainants, ainsi que des macrophages et les lymphocytes T mémoires.

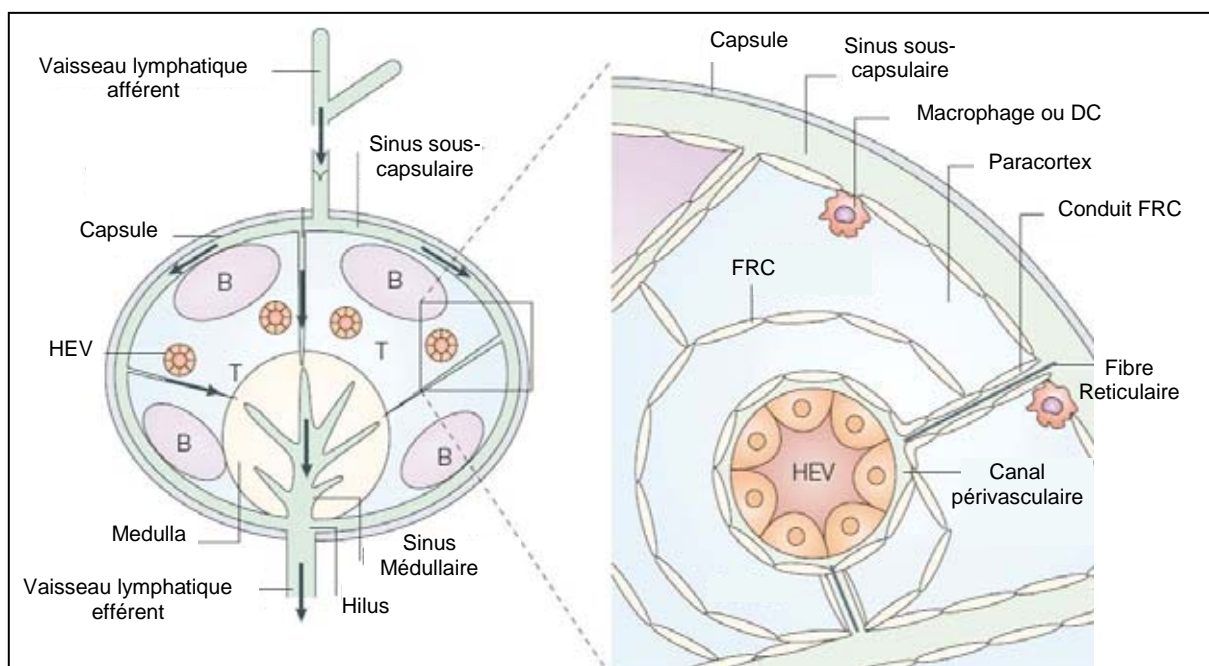


Figure 4 : Structure des organes lymphoïdes secondaires.

Schéma représentant les composants majeurs des organes lymphoïdes secondaires. Adaptée de (von Andrian and Mempel, 2003)

b) Caractérisation de la mobilité des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires

La première étude de microscopie biphotonique intra-vitale a permis d'observer la mobilité des lymphocytes T naïfs au niveau des ganglions lymphatiques inguinaux de souris anesthésiées (Miller et al., 2003). Ces travaux ont montré que la mobilité des lymphocytes T naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires est, contrairement à ce que l'on pensait, aléatoire et non dirigée par les chimiokines. En effet, les lymphocytes T naïfs se déplacent dans les organes lymphoïdes secondaires de manière indépendante les uns des autres. Ils migrent à une vitesse moyenne de 11 $\mu\text{m}/\text{min}$, alternant toutes les 2 min environ, entre des phases d'immobilité ou de faible mobilité, et des phases de forte mobilité atteignant jusqu'à 25 $\mu\text{m}/\text{min}$. Dans cette étude, les auteurs ont pu observer l'entrée de quelques lymphocytes T naïfs depuis la circulation sanguine et suivre leur mobilité dans les organes lymphoïdes secondaires. Ils ont observé que les lymphocytes T adoptent les caractéristiques de la mobilité aléatoire décrite précédemment dès leur entrée. Ces travaux challengent donc l'existence de gradient de chimiokines agissant sur de longues distances, au niveau des zones T des organes lymphoïdes secondaires, sans pour autant exclure l'éventuelle présence de gradients locaux. De nombreuses autres questions sur la mobilité des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires émanent de ces observations : Les intégrines sont-elles impliquées dans la mobilité des lymphocytes T dans l'environnement tri-dimensionnel de l'organe lymphoïde secondaire ? L'alternance entre phase d'immobilité et phase de mobilité dépend-elle d'un programme intrinsèque aux lymphocytes T et/ou du microenvironnement ?

Les caractéristiques de migration des lymphocytes T naïfs obtenus par Miller et *al.* par microscopie intra-vitale sont en accord avec leurs études précédentes réalisées à partir d'explants de nœuds lymphatiques murins (Miller et al., 2002). Ainsi, les travaux de microscopie intra-vitale valident l'utilisation des explants tissulaires en termes de relevance physiologique. Les explants tissulaires sont déconnectés des circulations sanguine et lymphatique ; une attention particulière sur les conditions d'oxygénation sera donc requise pour l'utilisation de ce dispositif expérimental. En effet, des travaux précédents ont observé par microscopie confocale les lymphocytes T des organes lymphoïdes murins maintenus en culture sans oxygénation particulière. Dans ces conditions, les lymphocytes T naïfs étaient immobiles en absence d'antigènes et seuls les lymphocytes T activés étaient capables de mobilité (Stoll et al., 2002). Ainsi, les travaux obtenus à partir d'explants d'organes lymphoïdes secondaires murins ou humains et maintenus sous oxygénation, permettront

d'étudier les questions posées précédemment sur les caractéristiques de la migration des lymphocytes T. Un nouveau système d'étude de la mobilité des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires a été développé en 2007 par Asperti-Boursin *et al.* (Asperti-Boursin *et al.*, 2007). Les organes lymphoïdes secondaires murins sont inclus en agarose puis coupés en tranches de 320 μm d'épaisseur. Les cellules d'intérêts déposées sur les tranches d'organes migrent à l'intérieur de celles-ci. Dans ces conditions, les lymphocytes T migrent de manière aléatoire à une vitesse moyenne 7,5 $\mu\text{m}/\text{min}$, ce qui corrèle avec les résultats obtenus dans les organes lymphoïdes secondaires intacts (Asperti-Boursin *et al.*, 2007).

► Migration amiboïde des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires le long des FRC :

La qualification de migration amiboïde provient du mode de migration d'un protozoaire *Amoeba proteus* (en Grec $\alpha\mu\omicron\iota\beta\text{Z}$: change ; et Protée = Dieu grec dont la particularité était d'apparaître sous des formes très diverses). En effet, les lymphocytes T qui adoptent ce mode de migration transitent d'une morphologie cellulaire ronde à une morphologie allongée avec une périodicité comprise entre 1,6 et 2,4 min (Miller *et al.*, 2003). Il apparaît clairement que les cellules s'arrondissent quand elles arrêtent de migrer et qu'elles s'allongent pour pouvoir se déplacer (Negulescu *et al.*, 1996). La régulation de la périodicité de ce mode de migration, aussi qualifié de « stop and go » sera discutée ci-après.

La flexibilité morphologique des lymphocytes T leur permet de se déplacer dans des environnements denses, sans avoir recours à leur dégradation. Au niveau des zones T dans les organes lymphoïdes secondaires, les FRC constituent un réseau de fibres dense servant de support à la migration des lymphocytes T (Bajenoff *et al.*, 2006). La densité de ce réseau peut être évaluée par la distance relativement faible (entre 5 et 37 μm) mesurée entre les intersections des fibres des FRC. Les lymphocytes T suivent les fibres et adaptent leur morphologie pour passer au travers des mailles préformées de la matrice extracellulaire. Il a été démontré que pour traverser des mailles fines, les cellules dendritiques ont recours à une contraction myosine II dépendante nécessaire au passage de leur noyau rigide (Lammermann *et al.*, 2008). Un mécanisme similaire est envisagé pour la migration des lymphocytes T. Les lymphocytes T migrent continuellement le long des fibres de FRC, tournent au niveau des embranchements et rencontrent les cellules dendritiques qui adhèrent également à ce réseau. Quelques rares lymphocytes T vont migrer d'une fibre à une autre. Ce « saut » de fibres a lieu seulement si les 2 fibres ne forment pas d'intersection ensemble et implique un contact permanent du lymphocyte T avec au moins l'une ou l'autre des fibres. Les moteurs de la

migration amiboïde impliquent des forces de traction et de contraction permises par le changement morphologique des lymphocytes T. Ceci suppose une réorganisation continue du cytosquelette d'actine qui sera décrite dans le chapitre suivant.

De manière complémentaire, Wolf *et al.* ont montré *in vitro* que la mobilité des lymphocytes T dans des matrices de collagène est indépendante de la dégradation de la matrice extracellulaire par les métalloprotéases ou par d'autres protéases (Wolf *et al.*, 2003). Bien que les lymphocytes T soient capables de former des protrusions invasives de type podosomes au contact des cellules endothéliales, permettant leur diapédèse (Carman *et al.*, 2007), ce type de structure n'a jamais été observé dans l'environnement des organes lymphoïdes secondaires. En générant *in vitro*, des matrices extracellulaires de différentes densités, nous avons également confirmé que les lymphocytes T n'ont pas la capacité de dégrader la matrice extracellulaire pour leur migration et qu'ils ne forment pas de protrusions de type podosome au contact de ces matrices (**Cf. Annexe 2**). Finalement, nous avons montré que contrairement à d'autres leucocytes (les macrophages notamment) qui adaptent leur mode de migration à l'environnement qu'ils rencontrent (Van Goethem *et al.*, 2010), les lymphocytes T utilisent exclusivement le mode de migration amiboïde. Néanmoins, ces cellules sont dotées d'une flexibilité morphologique extraordinaire puisque capables de migrer dans des matrices très denses.

► Existe-t-il des gradients de chimiokines dans les organes lymphoïdes secondaires ?

Au niveau des organes lymphoïdes secondaires, les chimiokines sont majoritairement produites par les FRC, mais également en proportion plus restreinte par les cellules dendritiques et les macrophages (Luther *et al.*, 2000). La chimiokine CCL21 est observée au niveau de la médulla et des zones T où elle co-localise avec les FRC (Asperti-Boursin *et al.*, 2007; Luther *et al.*, 2000). Par marquage histologique, CCL19 n'est pas détecté dans les organes lymphoïdes secondaires. Ce résultat peut refléter une faible concentration en CCL19 (estimée à 100 fois moins importante que CCL21) et /ou le fait que seul CCL21 se fixe sur les protéoglycanes. Cette différence provient du fait que seul CCL21 exprime à son extrémité C-terminale, une séquence de 40 acides aminés permettant son ancrage (de Paz *et al.*, 2007). Ainsi, des gradients solubles de CCL21 et de CCL19 pourraient théoriquement exister *in vivo*, mais expérimentalement leur mise en évidence est délicate car ils sont probablement perdus au cours de la préparation des échantillons. CXCL12 est exprimé majoritairement au niveau de la médulla et de la zone sous-capsulaire mais aussi à de plus faibles concentrations dans les zones T (Asperti-Boursin *et al.*, 2007).

La mobilité aléatoire des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires observée par microscopie intra-vitale, remet en question l'existence des gradients de chimiokines dans les organes lymphoïdes secondaires (Miller et al., 2003). Néanmoins, il a clairement été démontré, par l'utilisation de la toxine pertussique, que les chimiokines sont nécessaires à la mobilité des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires (Asperti-Boursin et al., 2007; Huang et al., 2007; Okada and Cyster, 2007). Plus précisément, un rôle majeur a été attribué à l'interaction entre CCR7/CCL21 dans ce mécanisme, alors que l'implication de l'interaction entre CXCR4/CXCL12 a été exclue (Asperti-Boursin et al., 2007; Okada and Cyster, 2007; Worbs et al., 2007). Des expériences conduites *in vitro*, ont montré que l'action de CCL21 ne nécessite pas sa présentation sous forme de gradient (Okada and Cyster, 2007). Ainsi, la migration des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires devrait être qualifiée de chimiokinèse et non de chimiotactisme.

Qu'en est-il *in vivo* ? A ce jour, aucune étude n'a encore prouvé de manière claire que les lymphocytes T ne soient pas capables de chimiotactisme dans les organes lymphoïdes secondaires. En revanche, des travaux ont montré que la migration des cellules dendritiques dans des sections d'organes lymphoïdes secondaires est dirigée par un gradient soluble de chimiokines (Schumann et al., 2010). En effet, sur ces sections, les cellules dendritiques migrent depuis l'extérieur de l'organe vers l'intérieur, dans les zones T. Une section a été divisée transversalement en 2 parties de taille inégale. La partie droite (la plus petite) a été retournée et disposée à côté de la partie gauche (la plus grande). Dans ces conditions, les auteurs ont observé une inversion du sens de la migration des cellules dendritiques dans la partie droite (migration de l'intérieur vers l'extérieur de l'organe ; en direction de la partie gauche). Cette observation démontre donc que la migration des cellules dendritiques est dirigée par un gradient soluble de chimiokines et non par les chimiokines immobilisées. Ces travaux ont aussi montré que les cellules dendritiques sont capables de cliver la chimiokine CCL21 lorsque celle-ci est immobilisée sur les protéoglycanes générant ainsi une forme soluble de CCL21. De plus, les auteurs de ces travaux montrent, de manière originale *in vitro*, que des gradients solubles de chimiokines perturbent la migration dirigée des cellules dendritiques le long de fibres artificielles présentant des chimiokines immobilisées (Schumann et al., 2010). Ainsi, le mode de présentation des chimiokines (immobilisées ou solubles) apporterait un niveau supplémentaire de régulation de la mobilité cellulaire.

Les lymphocytes T répondent également de manière différentes aux chimiokines immobilisées ou solubles. En effet, une étude réalisée *in vitro*, a démontré que la chimiokine CCL21 induit la mobilité des lymphocytes T lorsqu'elle est immobilisée sur une matrice de

collagène et de fibronectine alors qu'elle n'a pas d'effet sur la mobilité cellulaire lorsqu'elle est soluble (Woolf et al., 2007). Cependant, l'effet d'une chimiokine soluble sur la mobilité des lymphocytes T n'a jamais été étudié en présence de chimiokines immobilisées.

► La mobilité des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes est-elle dépendante des intégrines ?

A l'intérieur des organes lymphoïdes secondaires, les FRC expriment de manière ubiquitaire ICAM-1 et VCAM-1 (Katakai et al., 2004; Woolf et al., 2007). Cependant l'absence de mouvement fluide à l'intérieur des organes lymphoïdes secondaires, minimise la fonction des molécules d'adhésion pour la migration des lymphocytes T. En effet, dans des expériences *in vitro*, il a été montré que pour induire l'adhésion des lymphocytes T sur ICAM-1, CCL21 n'est pas suffisante et qu'un flux est nécessaire (Woolf et al., 2007). Dans ces expériences, le blocage de LFA-1, n'a pas eu d'effet sur la mobilité des lymphocytes T induite par les chimiokines CCL21, CCL19 ou CXCL12. La faible implication de LFA-1 sur la migration des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires a été confirmée *in vivo* par microscopie biphotonique dans des explants d'organes lymphoïdes secondaires. En effet, la mobilité des lymphocytes T déficients pour CD18 (chaîne β de LFA-1) dans des organes lymphoïdes de souris sauvages ainsi que la mobilité des lymphocytes T sauvages dans les organes lymphoïdes de souris ICAM-1 déficientes, n'est que très faiblement diminuée (-15%). De plus, le blocage des intégrines α_4 (VCAM-1) n'a pas d'effet additif sur la déficience en CD18, suggérant l'absence d'un mécanisme de compensation par cette autre molécule d'adhésion.

Lammermann et al. ont également montré que les molécules d'adhésion ne sont pas indispensables pour la mobilité cellulaire dans les organes lymphoïdes secondaires, en utilisant des cellules dendritiques déficientes pour l'ensemble des intégrines hétérodimeriques qu'elles expriment normalement à leur surface (α_4 , α_5 , α_M , α_L , α_V , α_X , β_1 , β_2 , β_3 et β_7) (Lammermann et al., 2008). Ils concluent finalement que dans leur modèle cellulaire les intégrines sont nécessaires à l'extravasation cellulaire et à la migration cellulaire en 2-dimensions, mais qu'elles ne sont pas impliquées dans la migration cellulaire en 3-dimensions. Ceci permet aussi de réconcilier les résultats obtenus *in vivo* (montrant l'absence d'implication des intégrines pour la mobilité des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires) avec : i) les résultats prouvant l'implication des intégrines pour l'entrée des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires (voir chapitre précédent ; (Andrew et

al., 1998)) et ii) les résultats démontrant une implication des intégrines dans des systèmes de migration *in vitro* en 2D (Campbell et al., 1998; Cinamon et al., 2001).

► La mobilité des lymphocytes T dépend-elle d'un programme intrinsèque ?

Les lymphocytes T se déplacent dans les organes lymphoïdes secondaires en alternant entre des phases d'immobilité et de mobilité (Miller et al., 2003). Il a tout d'abord été proposé que ce mode de migration (aussi appelé « stop and go ») soit dépendant d'un programme intrinsèque aux lymphocytes T, rythmé en quelque sorte par une horloge interne. Bien que l'idée même d'une programmation interne du « stop and go » n'ait pas été expérimentalement exclue à ce jour, il a plus récemment été établi que des facteurs environnementaux régulent la mobilité des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires (Beltman et al., 2007). Cette conclusion a pu être apportée par modélisation de la migration des lymphocytes T et confirmée par une analyse sur des périodes de temps plus longues (40 min au lieu de 12 min lors des premières études), sur des zones d'observations un peu plus large (xyz : 200x220x40-60 au lieu de 175x225x51 μm) et avec une fréquence d'acquisition d'images équivalente (11s au lieu de 10s) aux études précédentes. Au cours de leur migration, les lymphocytes T rencontrent de nombreux obstacles physiques, tels que les cellules dendritiques, les FRC, d'autres lymphocytes T ainsi que les composants de la matrice extracellulaire. Ensemble, ils sont à l'origine de la forte densité des zones T des organes lymphoïdes secondaires responsables des phases d'arrêts de migration des lymphocytes. L'interaction des lymphocytes T avec les cellules dendritiques même en absence d'antigène pathogène induit un arrêt de migration de courte durée (Mempel et al., 2004).

Dans les expériences visant à observer la migration lymphocytaire au niveau des organes lymphoïdes secondaires, moins d'1 % des lymphocytes T présents sont marqués à l'aide d'une sonde fluorescente. Ainsi, de nombreux obstacles à la migration des lymphocytes T marqués ne sont pas visibles ; ce qui rend l'interprétation des arrêts de migration délicate. Une des prédictions du modèle mathématique de Beltman et *al.* est que les lymphocytes T organiseraient eux-mêmes leur migration, localement et à petite échelle, sous forme de vagues. Celles-ci faciliteraient la migration lymphocytaire, permettant d'éviter les collisions cellulaires, en établissant une orientation commune. Ces vagues de migrations ont été observées expérimentalement seulement lorsque la quantité de cellules marquées par fluorescence était augmentée (Beltman et al., 2007).

Ainsi, la périodicité de la migration des lymphocytes T ne serait pas liée à un programme intrinsèque mais serait dictée par le microenvironnement.

► Que permettent les phases d'arrêts de migration des lymphocytes T ?

Les arrêts de migration réalisés par les lymphocytes T corrént avec un changement de polarisation du cytosquelette d'actine permettant aux lymphocytes T de modifier ensuite la direction de leur migration (Miller et al., 2003). L'implication du cytosquelette d'actine et de ses molécules régulatrices dans la migration lymphocytaire sera détaillée dans le chapitre suivant. Au cours de la migration des lymphocytes T, des pics de calcium intracellulaire ont été mesurés, n'excédant pas 2 min (Asperti-Boursin et al., 2007; Wei et al., 2007). Ils corrént avec une diminution de la vitesse de migration ou avec un arrêt de migration lymphocytaire (Negulescu et al., 1996). Ces pics de calcium peuvent être induits par contact avec les cellules dendritiques, même en absence d'antigène spécifique. Les conséquences de l'induction de flux calciques par les cellules dendritiques seront discutées dans le sous-chapitre suivant.

c) **Caractérisation de la rencontre avec les cellules dendritiques dans les organes lymphoïdes secondaires**

Les organes lymphoïdes secondaires sont peuplés par des cellules dendritiques et des cellules de Langherhans résidentes mais aussi par des cellules dendritiques qui vont immigrées dans les organes lymphoïdes secondaires. Les cellules dendritiques résidentes vont capturer, processor et présenter les antigènes solubles périphériques convoyés par les conduits réticulaires au niveau des organes lymphoïdes secondaires (Sixt et al., 2005). Les cellules dendritiques résidentes sont en étroites relations avec les FRC (Bajenoff et al., 2006; Lindquist et al., 2004). Les cellules dendritiques immigrantes transportent les antigènes depuis les tissus non-lymphoïdes jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires. Elles accèdent aux organes lymphoïdes secondaires via les vaisseaux lymphatiques afférents, puis se localisent au niveau des zones T. Là, elles présentent aux lymphocytes T, les antigènes qu'elles auront apprêtés, sur leurs molécules du CMH. En condition de non infection, les cellules dendritiques présenteront des antigènes du soi alors qu'en condition d'infection elles présenteront des antigènes étrangers. Nous verrons que la dynamique et les conséquences de l'interaction avec les lymphocytes T seront différentes en fonction de la nature de l'antigène présenté.

► La rencontre entre les lymphocytes T et les cellules présentatrices de l'antigène relève t-elle du hasard ?

Dans les organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes T sont à la recherche d'antigènes présentés par les cellules dendritiques. En fonction des études, il a été estimé qu'une cellule dendritique peut contacter entre 2000 et 5000 lymphocytes T différents/ heure (Beltman et al., 2007; Miller et al., 2004a). Ce taux rend les chances de rencontre, des cellules dendritiques avec les rares (entre 100 et 1000 dans l'organe lymphoïde secondaire) lymphocytes T spécifiques de l'antigène, excellentes (Beltman et al., 2007). Au regard de ce bon résultat on se demande alors si la rencontre entre un lymphocyte T et une cellule dendritique est opportune ou si elle est contrôlée ? Nous avons vu que cette rencontre est favorisée par l'organisation des organes lymphoïdes secondaires en zones spécialisées. De plus, le fort pouvoir de mobilité basal des lymphocytes T augmente la probabilité pour un lymphocyte T de rencontrer les cellules dendritiques. En revanche, bien que les cellules dendritiques soient très mobiles lors de leur entrée dans les organes lymphoïdes secondaires, elles établissent ensuite une étroite relation avec les FRC et sont alors quasiment immobiles (Miller et al., 2004a). Cette observation laisse à penser que les cellules dendritiques sont passives dans la rencontre avec les lymphocytes T. Cependant, il a été observé que les cellules dendritiques bien qu'immobiles, étendent et rétractent continuellement leurs dendrites (Lindquist et al., 2004; Mempel et al., 2004; Miller et al., 2004a). De cette manière, elles augmentent la surface membranaire susceptible d'être scannée par les lymphocytes T. Enfin, il a également été démontré que les cellules dendritiques sont capables d'attirer les lymphocytes T vers elles par le biais de la sécrétion de chimiokines (Castellino et al., 2006; Friedman et al., 2006). Les chimiokines sécrétées par les cellules dendritiques se lieraient à leur surface et formeraient ainsi un gradient local.

Bien que les intégrines et notamment LFA-1 ne soit pas nécessaire à la migration des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires, il a été montré, *in vivo*, que LFA-1 joue un rôle important dans la formation des contacts avec les cellules dendritiques. En effet, la présence de LFA-1 permet de diminuer le seuil de sensibilité aux antigènes (Bachmann et al., 1997; Schmits et al., 1996).

d) Rencontre avec les cellules dendritiques en condition de non-infection

En condition de non infection, dans les organes lymphoïdes secondaires, les cellules dendritiques vont présenter aux lymphocytes T des antigènes du soi sur leurs molécules de CMH (Scheinecker et al., 2002). La majorité des cellules dendritiques présentes dans les

organes lymphoïdes secondaires sont immatures et ne possèdent donc pas les molécules (telles que les molécules de costimulation CD80/86) requises pour l'activation lymphocytaire (Wilson et al., 2003). Cependant, elles sont impliquées dans la tolérance périphérique et pourront éliminer les lymphocytes T auto-réactifs qui auraient échappé à la tolérance thymique (pour revue (Steinman et al., 2003)). Les cellules dendritiques immatures ont également un rôle dans le maintien de la population de lymphocytes T régulateurs (Yamazaki et al., 2003). Néanmoins, nous avons vu précédemment qu'en condition de non infection, les lymphocytes T étaient très mobiles dans les organes lymphoïdes secondaires. Ces observations présagent que les interactions établies entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques présentant des antigènes du soi soient de courtes durées ou mobiles. Ces interactions ont-elles d'autres fonctions que le maintien de la tolérance périphérique ? Ont-elles des conséquences sur la rencontre avec l'antigène en condition d'infection et sur l'activation spécifique des lymphocytes T ?

► Interactions des lymphocytes T avec les cellules dendritiques en absence de pathogènes

Par microscopie électronique, il a été montré qu'en absence d'antigènes, les lymphocytes T interagissent avec les cellules dendritiques mais pas avec les lymphocytes B (Delon et al., 1998). La longueur de la zone de contact formée entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques est réduite en absence d'antigènes en comparaison avec une interaction réalisée en présence d'antigènes spécifiques. Par microscopie biphotonique, il a été observé que les lymphocytes T interagissent de manière transitoire avec les cellules dendritiques présentant des peptides du soi sur leurs molécules de CMH (Miller et al., 2004a). De plus, ces interactions sont très dynamiques. La durée moyenne des interactions est de 3,8 min, ce qui permet aux lymphocytes T de rencontrer successivement plusieurs cellules dendritiques. De manière surprenante, il a été montré dans des expériences *in vitro*, conduites dans des matrices de collagène en 3-dimensions, que les lymphocytes T forment une synapse immunologique dynamique (aire de contact privilégiée et organisée en zones enrichies en différentes molécules membranaires et de signalisation) avec les cellules dendritiques qu'ils rencontrent (Storim et al., 2010). Les lymphocytes T maintiennent leur migration amiboïde tout en se polarisant vers la cellule dendritique. L'organisation moléculaire de la synapse immunologique dynamique formée (aussi appelée kinapse) a aussi été étudiée *in vitro* en 2-dimensions (Revy et al., 2001) et sera détaillée dans le sous-chapitre suivant. Nous nous intéresserons maintenant aux conséquences de cette interaction sur le lymphocyte T.

► Conséquences de l'interaction sur la mobilité des lymphocytes T ?

Nous avons vu que la grande mobilité des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires est principalement conduite par les chimiokines et les FRC. Il a également été démontré, dans des expériences *in vivo* et *in vitro*, que les cellules dendritiques sont, elles aussi, responsables de cette mobilité (Fischer et al., 2007; Gunzer et al., 2000; Real et al., 2004). *In vivo*, il a été montré par microscopie biphotonique, que la mobilité des lymphocytes T CD4⁺ naïfs dans des explants d'organes lymphoïdes secondaires de souris déficientes en CMH-II, est largement diminuée par rapport à la mobilité observée dans les explants de souris sauvages (Fischer et al., 2007). De plus, en absence de CMH-II, les lymphocytes T CD4⁺ ne parviennent pas à rencontrer les rares cellules dendritiques présentant les antigènes pour lesquels elles sont spécifiques. *In vitro*, alors que les lymphocytes T naïfs sont immobiles dans des matrices 3-dimensions de collagène, la présence de cellules dendritiques dans ces mêmes matrices induit la mobilité des lymphocytes T (Gunzer et al., 2000). Ces résultats ont été confirmés dans des expériences conduites *in vitro* en 2-dimensions (Real et al., 2004). Dans ces travaux, les auteurs ont également montré que l'induction de la mobilité des lymphocytes T CD4⁺ par les cellules dendritiques immatures était dépendante d'un contact et qu'elle impliquait la molécule d'adhésion ICAM-1 mais pas DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin). De plus, les auteurs ont montré que les chimiokines et plus particulièrement CCL17 et CCL22 jouaient également un rôle dans l'induction de cette mobilité. Enfin, ces travaux ont aussi prouvé que le phénomène d'induction de la mobilité par les cellules dendritiques immatures était 2 à 3 fois plus important pour les CD4⁺ mémoires par rapport aux CD4⁺ naïfs. *In vitro*, il a aussi été montré que les cellules dendritiques matures sont capables d'induire la mobilité des lymphocytes T naïfs (Kaiser et al., 2005). Enfin, l'induction de la mobilité des lymphocytes T n'est pas restreinte aux cellules dendritiques, puisqu'il a été souligné que les monocytes et les lymphocytes B étaient dotés de la même propriété mais avec une efficacité nettement moindre (Real et al., 2004).

En résumé, il a donc clairement été établi que les cellules dendritiques induisent la mobilité des lymphocytes T de manière chimiokine et adhésion dépendante, cependant les mécanismes moléculaires impliqués restent encore à être explorés. Outre l'amélioration de l'exploration des organes lymphoïdes secondaires (Fischer et al., 2007), l'induction de la mobilité des lymphocytes T par les cellules dendritiques a-t-elle des conséquences fonctionnelles ?

► Conséquences de l'interaction sur l'état d'activation des lymphocytes T :

Afin d'étudier les conséquences fonctionnelles des interactions entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T réalisées en absence d'antigène, des souris transgéniques exprimant le récepteur à la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur CD11c ont été utilisées (Hochweller et al., 2010). Le traitement de ces souris par la toxine diphtérique permet une déplétion quasiment totale (90 à 97 %) des cellules dendritiques. Les lymphocytes T CD4⁺ de la rate de ces souris ont été purifiés après traitement par la toxine diphtérique et leur capacité proliférative a été testée *ex vivo* suite à une stimulation antigénique. Il est apparu que les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ purifiés à partir des souris déficientes en cellules dendritiques, présentent des défauts sévères de prolifération en comparaison aux lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ purifiés chez les souris sauvages. Ce défaut de prolifération est à mettre en lien avec un défaut de formation de la synapse immunologique et de phosphorylation de Zap-70, molécule clef de la voie de signalisation du TCR. La cascade de signalisation du TCR ainsi que la structure moléculaire de la synapse immunologique seront décrites en détail dans le sous-chapitre suivant. De plus, dans cette même étude, les auteurs ont montré qu'une déplétion partielle en cellules dendritiques résulte en des défauts intermédiaires en termes de prolifération lymphocytaire. Enfin, les auteurs montrent également que le défaut de prolifération est réversible, puisque corrigé lorsque le nombre de cellules dendritiques revient à la normale dans la rate des souris après arrêt du traitement à la toxine diphtérique. Ainsi, les auteurs de ces travaux montrent de manière élégante, qu'en condition de non infection, les cellules dendritiques ont pour fonction de préparer les lymphocytes T à répondre à une stimulation antigénique en les pré-activant.

Les auteurs d'une étude précédente avaient bâti une conclusion similaire quant au rôle des interactions entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques en absence d'antigènes pathogènes, en utilisant une approche expérimentale opposée à celle décrite précédemment (Stefanova et al., 2002). Dans cette étude, Stefanova *et al.* ont purifié des lymphocytes T CD4⁺ naïfs à partir d'organes lymphoïdes secondaires de souris non infectées puis les ont privés de contacts avec les complexes CMH-peptides du soi par une culture *ex vivo* de 30 min. Ils ont ensuite mesuré la prolifération de ces cellules suite à une stimulation antigénique. Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs maintenus 30 min en culture présentent un défaut de prolifération par rapport aux lymphocytes T qui ont été stimulés juste après leur purification. De même, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs maintenus 30 min en culture perdent la phosphorylation de Zap-70 par rapport aux lymphocytes T CD4⁺ naïfs analysés juste après purification. De plus, les lymphocytes T purifiés à partir du sang (ne sont pas en contact avec

les cellules dendritiques) de souris sauvages répondent moins fortement à une stimulation antigénique (prolifération et phosphorylation de Zap-70) que les lymphocytes T purifiés à partir des organes lymphoïdes secondaires (sont en contact avec les cellules dendritiques) de ces mêmes souris.

Des études conduites *in vitro*, ont aussi confirmé qu'en absence d'antigènes pathogènes, l'interaction entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T permet de maintenir les lymphocytes T dans un état de pré-activation, diminuant ainsi leur seuil d'activation pour une stimulation successive par un antigène pathogène (Kaiser et al., 2005; Real et al., 2004).

De plus, il a été montré qu'outre la faible induction de prolifération et d'activation des voies de signalisation sous le TCR, les lymphocytes T au contact de cellules dendritiques présentant des antigènes du soi, produisent des flux calciques de faible amplitude, augmentent l'expression des marqueurs d'activation tels que CD69 et CD25 et produisent de faibles quantités de cytokines (IL-2) (Delon et al., 1998; Kondo et al., 2001; Real et al., 2004; Revy et al., 2001).

Ainsi, les travaux conduits *in vivo* et *in vitro* ont montré que l'interaction des lymphocytes T avec les cellules dendritiques présentant des antigènes du soi diminue le seuil d'activation des lymphocytes pour leur prochaine rencontre avec l'antigène. Cet état de faible niveau d'activation des lymphocytes T a été qualifié d'activation homéostatique.

► Conséquences de l'interaction sur la survie des lymphocytes T ?

Bien que de nombreuses études réalisées *in vitro* et *in vivo* s'accordent sur l'implication des interactions entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T en absence d'antigènes, dans l'activation homéostatique des lymphocytes T, leur implication sur la survie des lymphocytes T est controversée.

In vivo, la déplétion en cellules dendritiques n'a pas d'effet sur la survie des lymphocytes T (Hochweller et al., 2010). En revanche, la présence de cellules dendritiques dans des cultures *in vitro* de lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ améliore la survie de ces dernières (Kondo et al., 2001; Revy et al., 2001).

► Rôle des molécules du CMH sur l'interaction homéostatique des lymphocytes T avec les cellules dendritiques

L'implication des molécules du CMH sur la mobilité, l'activation et la survie des lymphocytes T en condition de non infection a pu être investiguée chez des souris déficientes pour les molécules de CMH-I et/ou CMH-II ou par l'utilisation d'anticorps anti-CMH

bloquants. Cependant, nous verrons que les différentes études réalisées ne s'accordent pas sur la nécessité de l'interaction CMH-TCR en condition d'homéostasie et cette question reste donc ouverte. Dans les souris déficiente pour le CMH-II, les lymphocytes T CD4⁺ sont privés du contact CMH-II dépendant avec les cellules présentatrices de l'antigène. Dans ces conditions il a été observé par microscopie biphotonique que les lymphocytes T CD4⁺ perdent leur dynamisme dans les organes lymphoïdes secondaires et deviennent quasiment immobiles (Fischer et al., 2007). Ainsi, les interactions entre lymphocytes T et cellules présentatrices de l'antigène sont réduites et l'activation subséquente des lymphocytes T en réponse à un antigène est défectueuse. Cependant, dans cette étude, il ne semblerait pas que le défaut de mobilité des lymphocytes soit à l'origine du défaut de pré-activation car, chronologiquement, *in vivo*, le défaut de pré-activation des lymphocytes T précède l'arrêt de mobilité. Hochweller *et al.* montrent aussi que l'état de pré-activation et la sensibilité à l'antigène des lymphocytes T sont diminués chez les souris pour lesquelles les cellules dendritiques sont déficientes en CMH (Hochweller et al., 2010). Néanmoins, il apparaît difficile de conclure clairement sur la nécessité directe de l'engagement des molécules du CMH sur l'activation homéostatique et sur la survie des lymphocytes T à partir d'expériences réalisées *in vivo*. La majorité des expériences *in vitro*, montrent un rôle des molécules du CMH sur l'activation homéostatique des lymphocytes T (Delon et al., 1998; Storim et al., 2010). De plus, une étude a montré que les cellules dendritiques matures (qui expriment fortement le CMH-II) mais pas les cellules dendritiques immatures (qui expriment très faiblement le CMH-II) induisent la mobilité et l'activation homéostatique de lymphocytes T CD4⁺ naïfs (Kaiser et al., 2005). Ces observations sont en faveur d'un rôle des molécules du CMH sur l'activation homéostatique. Néanmoins, une étude précédente, conduite par le même groupe avait démontré que les cellules dendritiques immatures pouvaient induire la mobilité ainsi que l'activation homéostatique des lymphocytes T CD4⁺ mémoires avec une fréquence 2 à 3 fois plus élevée que pour les lymphocytes T CD4⁺ naïfs (Real et al., 2004).

En revanche, Revy *et al.* montrent que les cellules dendritiques CMH-I^{KO} ou CMH-II^{KO} n'affectent ni l'activation homéostatique (réponse calcique, prolifération, polarisation du CD3 à la synapse immunologique) ni la survie des lymphocytes T CD8⁺ ou CD4⁺ par rapport aux cellules dendritiques sauvages (Revy et al., 2001). Les travaux de Storim et al. ont aussi montré que les molécules de CMH ne seraient pas impliquées dans l'augmentation de la survie des lymphocytes T médiée par les cellules dendritiques (Storim et al., 2010).

► Rôle de LFA-1 sur l'interaction homéostatique des lymphocytes T avec les cellules dendritiques :

De part sa fonction dans l'adhésion cellulaire, le rôle de la molécule LFA-1 dans l'interaction homéostatique entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques a également été étudié. Des études réalisées *in vitro*, s'accordent sur l'implication de l'interaction LFA-1/ICAM-1 sur l'induction de mobilité et d'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques (Real et al., 2004; Suzuki et al., 2007). Plus particulièrement, Suzuki *et al.* montrent que l'enrichissement de la molécule LFA-1 à la zone de contact cellulaire a lieu même en absence d'antigènes pathogènes et que cet enrichissement permet de diminuer le seuil d'activation des lymphocytes.

En résumé, l'interaction entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques matures ou immatures présentant des antigènes du soi dans les organes lymphoïdes secondaires induirait 1) une mobilité lymphocytaire qui favoriserait l'exploration des organes lymphoïdes secondaires pour les rares antigènes spécifiques ; 2) une pré-activation des lymphocytes T qui favoriserait la stimulation antigénique consécutive et 3) la survie des lymphocytes T. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'interaction et dans l'activation cellulaire sont encore à confirmer concernant le CMH ou à découvrir. Il est aussi important de souligner ici que les interactions entre les cellules dendritiques immatures présentant des antigènes du soi et les lymphocytes effecteurs ou mémoires ont également lieu dans la région non inflammée des tissus périphériques. D'autre part, l'observation d'une pré-activation des lymphocytes T périphériques au contact des cellules dendritiques présentant des peptides du soi apporte bien des interrogations sur l'interaction entre les thymocytes et les cellules épithéliales thymiques lors de la sélection positive. En effet, on peut penser qu'au cours de la sélection positive, l'interaction TCR-CMH-peptide du soi conduise à une pré-stimulation du thymocyte permettant sa sélection (Stefanova et al., 2003).

e) Rencontre avec les cellules dendritiques en condition d'infection

En condition d'infection, le nombre de lymphocytes présents dans les organes lymphoïdes secondaires augmente ce qui accroît la probabilité que les antigènes présentés soient reconnus par les rares lymphocytes T qui en sont spécifiques (Cahill et al., 1976). Il a été estimé qu'entre 10^{-5} et 10^{-6} lymphocytes T présents dans les organes lymphoïdes

secondaires étaient capables de reconnaître les antigènes d'un pathogène donné présentés à la surface des cellules présentatrices de l'antigène (Blattman et al., 2002).

► Les 3 phases de la rencontre :

Contrairement aux interactions entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques qui ont lieu en absence d'infection, la rencontre des lymphocytes T avec les cellules dendritiques présentant des antigènes pathogènes, est orchestrée par une succession de 3 étapes distinctes (Mempel et al., 2004; Miller et al., 2004b). Ces 3 étapes ont été observées par microscopie biphotonique intra-vitale, au niveau des organes lymphoïdes secondaires, à différents temps après le transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de l'ovalbumine et marqués par une sonde fluorescente (Miller et al., 2004b) (**Figure 5**).

Moins de 2h après le transfert adoptif, la mobilité des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires de souris immunisées avec l'ovalbumine diminue par rapport aux conditions de non infection. En effet, la vitesse de migration moyenne des lymphocytes T est de 5,4µm/min. Les lymphocytes interagissent préférentiellement avec les dendrites des cellules dendritiques, établissant des contacts transitoires mais qui sont tout de même 3,5 fois plus longs que ceux observés en absence d'antigènes (11,4 min vs 3,2 min dans cette étude). Les lymphocytes T réalisent une série de contact avec la même cellule dendritique ou avec plusieurs cellules dendritiques voisines, et n'explorent finalement qu'une zone restreinte des organes lymphoïdes secondaires.

Entre 2h et 14h après le transfert adoptif, les lymphocytes T se regroupent (forment un « cluster » dense) autour des cellules dendritiques. Leur vitesse de migration diminue considérablement (2,6 µm/min). La durée des contacts entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques est alors très nettement augmentée. Elle est supérieure à la durée d'acquisition c'est-à-dire supérieure à 60 min. Cependant ces « clusters » sont très dynamiques : la position relative des cellules change continuellement.

Entre 16h et 24h après le transfert adoptif, les « clusters » formés entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques se dissocient. La vitesse de migration des lymphocytes augmente (4,1 µm/min), le temps de contact moyen avec les cellules dendritiques est de 20 min et leur volume cellulaire est important et caractéristique de cellules blastiques. La majorité des contacts sont transitoires. En effet, les lymphocytes T scannent tour à tour la surface de plusieurs cellules dendritiques environnantes.

Plus de 24h après le transfert adoptif, de nombreuses divisions lymphocytaires sont observées, rendant compte d'une interaction lymphocyte T/ cellule dendritique productive en termes d'activation lymphocytaire.

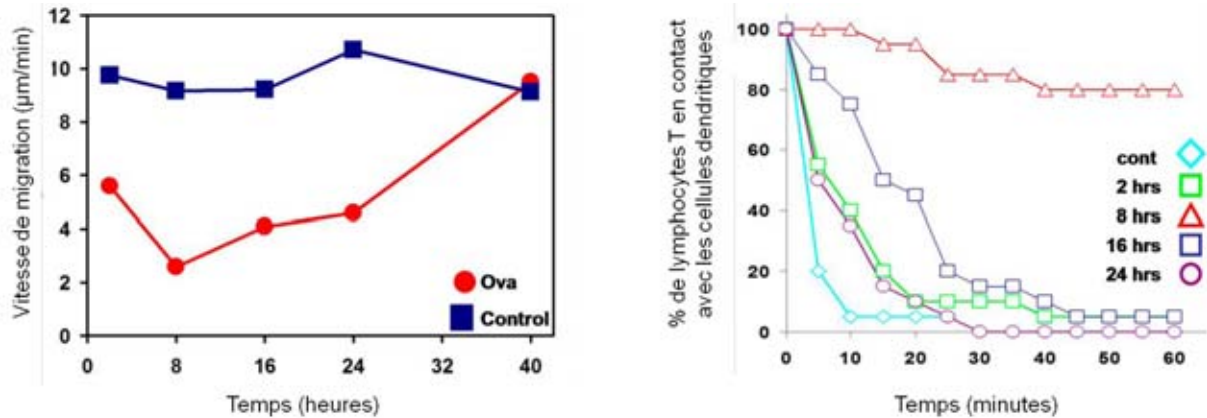


Figure 5 : Vitesse de migration et interactions cellulaires des lymphocytes T.

Vitesse de migration des lymphocytes T et pourcentage de lymphocytes T en interaction avec les cellules dendritiques dans les organes lymphoïdes secondaires à différents temps après le transfert adoptif des lymphocytes T spécifiques de l'ovalbumine dans une souris immunisée ou pas avec l'ovalbumine. D'après (Miller et al., 2004b).

Ces 3 étapes distinctes ont également été observées par microscopie biphotonique intra-vitale par Mempel et *al.* au cours de l'interaction des lymphocytes T CD8⁺ et des lymphocytes T CD4⁺ avec les cellules dendritiques présentant des antigènes dans les organes lymphoïdes secondaires murins (Mempel et al., 2004). Cependant, dans certaines études, la première phase d'interaction transitoire entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques n'a pas été observée, les cellules établissant dès leur entrée dans les organes lymphoïdes des contacts longs (Shakhar et al., 2005; Wei et al., 2007). Ces désaccords entre les études peuvent s'expliquer par une qualité de reconnaissance de l'antigène différente (concentration en antigène, affinité du TCR pour l'antigène). En effet, les contacts transitoires réalisés lors de la première phase pourraient permettre aux lymphocytes T d'accumuler les signaux nécessaires pour atteindre un seuil d'activation permettant d'établir des contacts longs. Cette hypothèse corrèle avec le fait qu'en première phase, l'expression des marqueurs d'activation précoce tel que CD69 augmente à la surface des lymphocytes (Celli et al., 2005; Hugues et al., 2004; Mempel et al., 2004). Le seuil d'activation pourrait être atteint très rapidement en cas de forte stimulation antigénique et l'intégration de signaux multiples ne serait alors pas requise dans ce cas.

► Le signal stop :

Le signal qui va induire l'arrêt de migration du lymphocyte T suite à sa rencontre avec un antigène pathogène n'a pas été clairement identifié. De plus, nous verrons dans le chapitre suivant que, contrairement à ce qui a longtemps été pensé, les contacts formés entre les lymphocytes T et les cellules présentatrices de l'antigène peuvent être mobiles sans pour autant nuire à l'issue de la rencontre en termes d'activation lymphocytaire. Le stop ne correspond pas à une période de repos, au contraire c'est une phase très active qui implique une augmentation du métabolisme cellulaire (Beeson et al., 1996; Frauwirth and Thompson, 2004). Puisque la cellule dépense de l'énergie pour le réaliser, il y a fort à penser que l'arrêt de migration soit capital. Néanmoins, le mécanisme et l'importance physiologique du signal stop sont loin d'être totalement compris.

L'arrêt de migration implique la reconnaissance spécifique par le TCR de l'antigène présenté par les molécules du CMH. Il a été démontré que la molécule d'adhésion LFA-1 augmente la sensibilité de cette reconnaissance (Bachmann et al., 1997). L'engagement du TCR avec son ligand réoriente la polarisation du lymphocyte T. En effet, le MTOC (MicroTubule Organizing Center) localisé au niveau de l'uropode dans les cellules en migration, va se polariser à la zone de contact avec la cellule présentatrice de l'antigène (Dustin et al., 1997). L'engagement du TCR augmente également les propriétés adhésives des lymphocytes T par activation de LFA-1 à travers la signalisation « inside-out » (Dustin et al., 1997; Raab et al., 2010; Smith et al., 2005). Ces 2 changements, qui surviennent suite à l'interaction du TCR avec son ligand, semblent favoriser l'arrêt de migration des lymphocytes T. Cependant, ces signaux ne seraient pas responsables du stop induit par l'antigène. Il a aussi été montré que la molécule ICAM-1 est nécessaire au stop des lymphocytes T CD8⁺, de manière antigène spécifique *in vivo* (Scholer et al., 2008).

En revanche, Negulescu *et al.* ont montré que la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T résulte en une augmentation du signal calcique qui est nécessaire et suffisante pour induire l'arrêt de migration des lymphocytes T (Negulescu et al., 1996). L'implication du signal calcique a par la suite été confirmée pour l'arrêt de migration des lymphocytes T naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires (Skokos et al., 2007). Néanmoins, une autre étude a démontré que le stop des cellules effectrices était indépendant du signal calcique (Dustin et al., 1997). Les mécanismes par lesquels le calcium contribuerait à l'arrêt de migration ne sont pas connus à ce jour.

► Les modèles de rencontres : unique ou en série (« single or serial encounter ») :

L'issue d'une interaction spécifique de l'antigène entre un lymphocyte T naïf et une cellule présentatrice de l'antigène sera l'activation du lymphocyte T. Deux modèles de rencontres conduisant à l'activation du lymphocyte ont été proposés.

Selon le modèle d'une rencontre unique ou « single encounter » entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice de l'antigène, le maintien d'une interaction stable sur une longue durée (entre 6 et 20 h) est nécessaire à l'activation lymphocytaire (Iezzi et al., 1998). Le maintien de l'interaction cellulaire implique l'interaction moléculaire ICAM-1/LFA-1 au site de contact. Cette dernière favorise la reconnaissance spécifique du TCR pour les complexes CMH-peptide et une signalisation soutenue en aval du TCR. Le second modèle propose qu'au lieu de recevoir un signal d'activation complet à travers une interaction unique avec une cellule présentatrice de l'antigène, les lymphocytes T somment des signaux d'activations provenant de rencontres successives, de courtes durées, avec les cellules présentatrices de l'antigène. Ce modèle est appelé modèle de rencontres en série ou « serial encounter ». Les 2 modèles imposent un seuil pour l'activation lymphocytaire dépendant de la durée de l'interaction dans un cas ou de la fréquence des interactions dans l'autre. Les interactions moléculaires et la signalisation lymphocytaire résultante seront détaillées dans le sous-chapitre suivant (voir synapse vs kinapse)

4. Activation des lymphocytes T CD4⁺

Vers l'Age adulte des lymphocytes T

L'interaction privilégiée entre un lymphocyte T et une cellule dendritique présentant un pathogène spécifique va conduire à l'activation du lymphocyte T. Celui va proliférer et acquérir les armes nécessaires à ses fonctions de défense contre le pathogène reconnu. Alors que les lymphocytes T CD8 (aussi appelés lymphocytes T tueurs) vont avoir pour fonction d'éliminer les cellules infectées de notre organisme, les lymphocytes T CD4 vont aider les lymphocytes B et les lymphocytes T CD8 dans leur lutte contre le pathogène reconnu.

Le devenir de la rencontre entre un lymphocyte T et une cellule dendritique dans les organes lymphoïdes secondaires dépend de l'intégration des signaux par les récepteurs engagés à l'interface cellulaire. L'aire de contact privilégiée formée entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice de l'antigène est appelée synapse immunologique. Ce terme a été utilisé, pour la première fois en 1984 par Norcross et al., pour décrire les interactions spécifiques engagées entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice de l'antigène, par analogie à la synapse communicative formée entre 2 neurones ou entre un neurone et une

autre cellule (Norcross, 1984). Bien que la structure moléculaire de la synapse immunologique soit strictement établie, on sait aujourd'hui que celle-ci ne correspond pas une structure figée. Au contraire, elle est dynamique. Ce dynamisme va permettre par exemple à un lymphocyte d'interagir simultanément avec plusieurs cellules présentatrices de l'antigène pour finalement se focaliser sur celle qui lui présentera le meilleur stimuli antigénique (Depoil et al., 2005). D'autre part, un même lymphocyte T peut également former plusieurs synapses immunologiques de manière successive afin d'accumuler les signaux qui permettront son activation (Celli et al., 2005; Faroudi et al., 2003). Finalement, on ne parle plus aujourd'hui de la synapse immunologique au singulier, mais des synapses immunologiques, du fait de leur diversité dimensionnelle et fonctionnelle (Trautmann and Valitutti, 2003).

a) Architecture des synapses immunologiques

La formation de la synapse immunologique a lieu dans les 30 min qui suivent l'engagement spécifique du récepteur aux lymphocytes T (TCR) avec les antigènes présentés par les molécules de CMH à la surface des cellules présentatrices de l'antigène. Les parties extracellulaires du TCR et des molécules de CMH mesurent chacune 7,5 μm de long, par conséquent, l'interaction entre ces molécules impose que les membranes des 2 cellules ne soient pas éloignées de plus de 13 μm (Garboczi et al., 1996; Garcia et al., 1996; Springer, 1990).

► La synapse immunologique concentrique :

En 1990, Springer et *al.* proposent que la synapse immunologique soit organisée en différents domaines ségrégués en fonction de la taille des complexes moléculaires formés entre le lymphocyte T et la cellule présentatrice de l'antigène (Springer, 1990). En 1998, Monks *et al.* prouvent la réalité de cette hypothèse par l'observation structurale en 3-dimensions de l'aire de contact entre un lymphocyte T et un lymphocyte B en présence d'antigènes, après déconvolution d'une série d'images prises en z (Monks et al., 1998). L'aire synaptique est formée de zones distinctes concentriques appelées SMAC (Supra Molecular Activation Cluster) (**Figure 6**). Le cSMAC (central SMAC) désigne le cœur de la synapse immunologique où sont concentrés les TCR en interaction avec les molécules de CMH-peptide. Tout autour du cSMAC, le pSMAC (peripheral SMAC) est enrichi en LFA-1, une molécule d'adhésion de taille plus importante qui interagit avec ICAM-1. Puis, d'autres travaux ont confirmé et étendu nos connaissances sur la structure de la synapse immunologique concentrique. Aujourd'hui, il est établi qu'au niveau du cSMAC, se

concentrent non seulement les molécules du TCR-CMH-peptide mais également le corécepteur CD4 (ou CD8 ; en interaction avec les molécules du CMH), la molécule de costimulation CD28 (en interaction avec CD80/86) et la molécule CD2 (en interaction avec CD48/CD58). Ces molécules transmembranaires sont notamment associées, du côté du lymphocyte T, avec les kinases PKC θ , Lck et Fyn au cSMAC. Au niveau du pSMAC, la molécule d'adhésion LFA-1 est associée en intracellulaire à une molécule de liaison avec le cytosquelette d'actine, la taline (Grakoui et al., 1999). Enfin, une troisième zone, plus externe et concentrique aux 2 premières, appelée dSMAC (distal SMAC), a également été observée. Dans cette zone, de grosses protéines (exclues du cSMAC et du pSMAC) sont présentes telles que les phosphatases CD45 et CD148, et la molécule de liaison avec le cytosquelette d'actine CD43, via son interaction avec les molécules ERM en intracellulaire (Ezrine, Radixine, Moésine) (Allenspach et al., 2001; Delon et al., 2001; Leupin et al., 2000). Cette organisation de la synapse immunologique en SMAC favorise l'engagement simultané de nombreuses molécules transmembranaires et le recrutement de molécules de signalisation à l'origine de l'activation de différentes cascades de signalisation contrôlant ainsi l'activation et la mise en place des fonctions effectrices des lymphocytes T (van der Merwe, 2000).

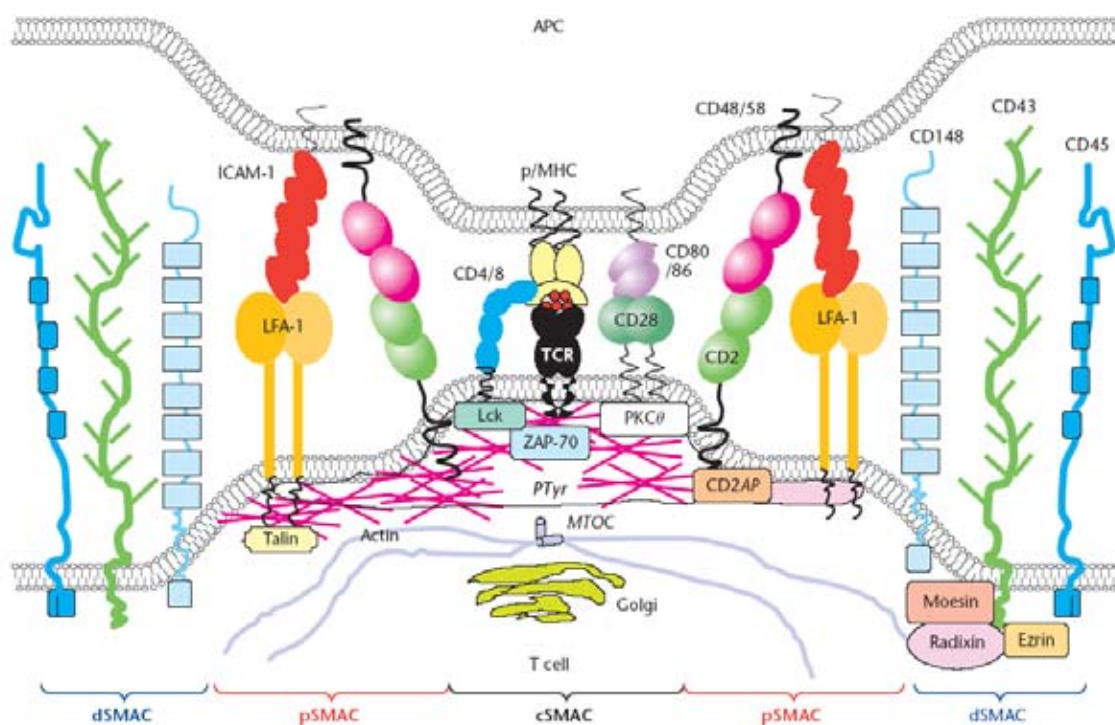


Figure 6 : Architecture moléculaire de la synapse immunologique concentrique.

La synapse immunologique concentrique formée entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice de l'antigène est organisée en trois zones. La zone centrale ou cSMAC contient les molécules du TCR, CD4/8, CD28, les molécules de signalisation Lck, PKC θ ... La zone périphérique ou pSMAC contient LFA-1 et la taline. La zone distale ou dSMAC contient CD45, CD43, CD148. Les appareils sécrétoires (golgi et MTOC) sont polarisés vers la cellule présentatrice de l'antigène. D'après Valitutti.S and Espagnolle.N, Immunological Synapse, Encyclopedia of life science, 2006

La signalisation débute avant même que la synapse immunologique soit complètement formée (Lee et al., 2002; Monks et al., 1998). En effet, la formation du cSMAC implique tout d'abord un engagement du TCR avec les complexes CMH-peptide au niveau du pSMAC (Yokosuka and Saito, 2009). Cet engagement est fonctionnel puisqu'il induit une augmentation de la concentration calcique intracellulaire ainsi que la phosphorylation des molécules de signalisation Zap-70 et Lck. La microscopie TIRF (Total Internal Reflexion Fluorescence) a permis d'observer le TCR sous forme de microregroupements (« microclusteurs ») de plusieurs molécules du TCR (Campi et al., 2005; Yokosuka et al., 2005). La formation de microregroupements de TCR engendre par conséquent la concentration des molécules intracellulaires qui lui sont associées. Dans les 5 min qui suivent l'engagement du TCR en périphérie, les microregroupements de TCR engagés se déplacent vers le cSMAC ce qui permet ainsi leur accumulation au centre synaptique (**Figure 7**). Il est important de noter que les microregroupements de TCR se forment continuellement en périphérie puis se déplacent vers le centre de la synapse. Le déplacement des TCR vers le centre de la synapse serait dépendant de l'actine et de la myosine IIA (Ilani et al., 2009; Kaizuka et al., 2007). Très récemment, il a été montré que le transport des microregroupements dépend de la dynéine, une protéine motrice associée aux microtubules (Hashimoto-Tane et al., 2011). Enfin, au niveau du cSMAC, les TCR sont internalisés et recyclés par le biais d'endosomes exprimant le récepteur à la transferrine (Das et al., 2004).

La polarisation du cytosquelette d'actine est également impliquée dans la formation de la synapse immunologique (Billadeau et al., 2007). L'organisation de l'actine à la synapse immunologique ainsi que son implication sur l'activation et sur les fonctions effectrices des lymphocytes T seront détaillées dans le chapitre suivant.

Une autre caractéristique marquante de la structure de la synapse immunologique réside dans la polarisation de la machinerie sécrétoire (appareil de golgi et MTOC) du lymphocyte T vers la cellule présentatrice de l'antigène (Kupfer et al., 1987). Enfin, à l'opposé de la synapse immunologique, l'anti-synapse ou pôle distal est enrichi en CD43, CD44 et en PKC ζ , une molécule ayant un rôle clef dans la polarité cellulaire (Cullinan et al., 2002; Ludford-Menting et al., 2005).

La synapse immunologique concentrique (décrite ici) est la première à avoir été décrite en termes d'organisation morphologique et signalétique. Elle correspond à une synapse immunologique mature et est aujourd'hui la synapse immunologique de référence. Cependant, nous verrons par la suite que d'autres synapses immunologiques ont été décrites, celles-ci adoptant finalement rarement une structure concentrique.

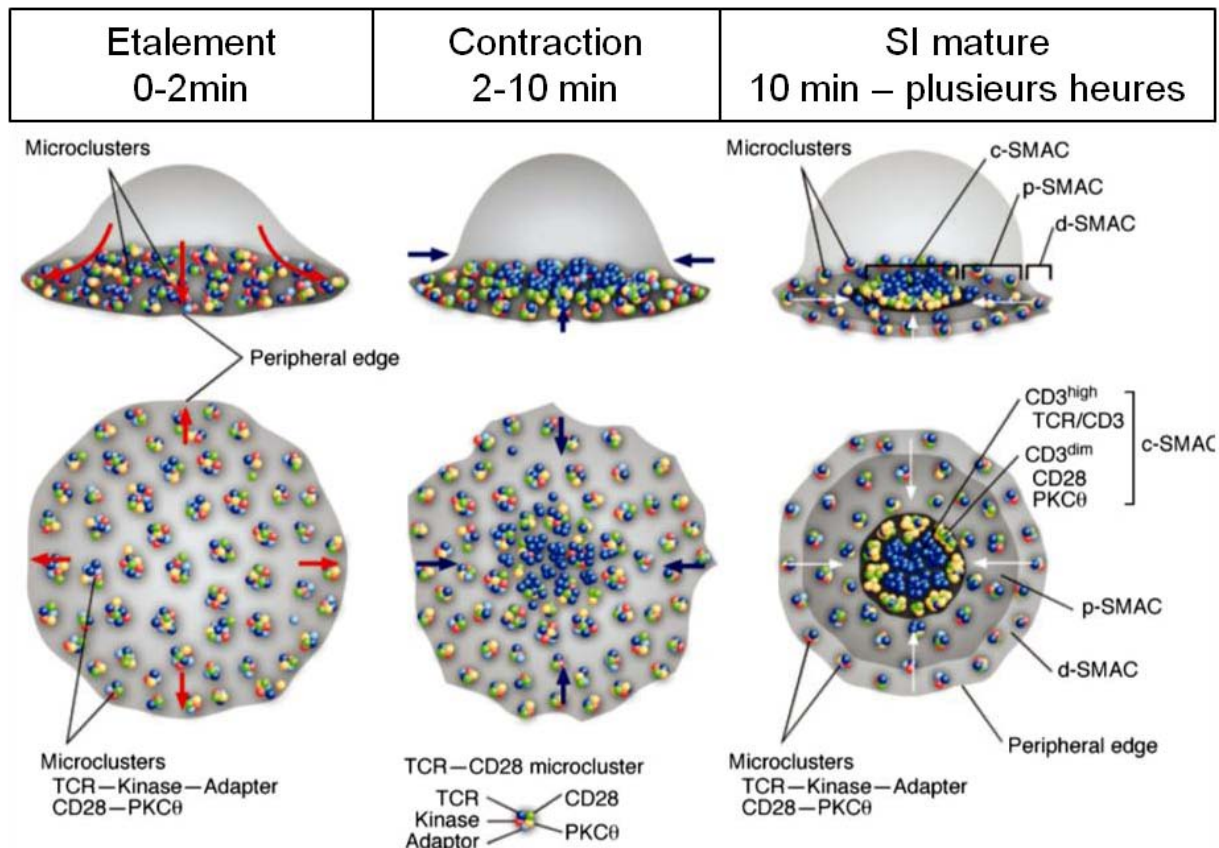


Figure 7 : Dynamique des microregroupements de TCR au cours de la formation de la synapse immunologique.

Lors du contact des lymphocytes T avec une cellule présentatrice de l'antigène mimée ici par le contact avec une bicouche lipidique contenant des peptides chargés sur des molécules du CMH, d'ICAM-I et de CD80, les lymphocytes T vont tout d'abord s'étaler sur la bicouche lipidique (Étalement), puis se contracter (Contraction) pour enfin former une synapse immunologique mature (SI mature). Les microregroupements (microclusters) de TCR auxquels s'associent les molécules de signalisation : Zap-70, SLP-76, PKC θ et de costimulation CD28 sont représentées. Les microregroupements sont formés dès l'initiation du contact, puis ils s'accumulent et fusionnent entre eux au niveau de la région centrale via un mouvement centripète. Après 10 min d'interaction, le c-SMAC est formé. En périphérie, de nouveaux microregroupements se forment continuellement et sont recrutés au c-SMAC. D'après (Yokosuka and Saito, 2009).

► La synapse immunologique multi-centrique :

Lors de l'interaction spécifique entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice de l'antigène, il peut y avoir une interruption dans le processus de la formation d'une synapse immunologique concentrique qui va conduire à la génération d'une synapse immunologique dite multi-centrique. Cette synapse se caractérise par la formation de plusieurs agrégats composés de molécules du cSMAC et du pSMAC (Brossard et al., 2005). Une colocalisation entre les molécules CD3 et LFA-1 ainsi qu'entre la PKC θ et de la taline sous forme de patches a été observée par microscopie à fluorescence lors du contact entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice de l'antigène. Les agrégats formés sont très dynamiques : ils peuvent fusionner ou se fractionner au cours de l'interaction cellulaire. Finalement, cette étude montre qu'il apparaît inapproprié de considérer, comme dans le passé, la synapse immunologique

concentrique comme mature et la synapse immunologique multi-centrique comme immature. En effet, en termes d'activation lymphocytaire et de fonctions effectrices, la synapse immunologique multi-centrique s'avère productive (Brossard et al., 2005). De plus, il semblerait que la génération d'une synapse immunologique multi-centrique soit plus fréquente que la génération d'une synapse concentrique ; cette dernière nécessitant de très fortes concentrations en antigène (Brossard et al., 2005). Il a aussi été démontré que la formation d'une synapse immunologique multi-centrique est dictée par la présence sur les cellules dendritiques de multiples petites protrusions d'actine au niveau desquelles les molécules de CMH ainsi que les molécules de costimulation se concentrent (Fisher et al., 2008). L'activation des lymphocytes T est favorisée par l'agrégation des molécules impliquées dans la présentation de l'antigène à la surface des cellules présentatrices de l'antigène (Giannoni et al., 2005).

► La synapse immunologique non ségrégée :

Dans le cas de la formation d'une synapse immunologique non ségrégée, le TCR et les molécules de signalisation se polarisent à l'aire de contact cellulaire, mais le processus est stoppé avant même que les molécules s'agrègent entre elles. Ce type de synapse a été décrit dans la littérature dans 4 situations d'interactions différentes. Elle a tout d'abord été observée dans le cas d'une interaction, non spécifique de l'antigène, entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice de l'antigène (Revy et al., 2001). La synapse immunologique non ségrégée a aussi été observée durant la phase initiale de contact avec une cellule présentatrice de l'antigène présentant de fortes concentrations en antigène et précédant l'agrégation moléculaire (Lee et al., 2002). Il a également été démontré que les lymphocytes T CD8⁺ naïfs mais pas les CD8⁺ effecteurs pouvaient former des synapses immunologiques non ségrégées conduisant néanmoins à leur activation (O'Keefe et al., 2004). Enfin, il a été montré que l'agrégation moléculaire, n'est pas non plus requise pour certaines fonctions effectrices des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs, telle que la sécrétion cytokinique, dans le cas d'une interaction avec des cellules dendritiques (Blanchard et al., 2004).

► La synapse immunologique sécrétrice :

La synapse immunologique sécrétrice correspond à une variante de la synapse immunologique concentrique. Elle est formée entre les lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ effecteurs et les cellules présentatrices de l'antigène. Elle partage l'organisation moléculaire en SMAC de la synapse immunologique concentrique et a la particularité de sécréter des

cytokines de manière polarisée au niveau de l'aire synaptique. Le cSMAC de la synapse immunologique sécrétrice est partagé en 2 zones juxtaposées : la zone classique d'enrichissement du TCR et une zone sécrétoire qui colocalise avec la machinerie sécrétoire du lymphocyte T. Ainsi, les granules des lymphocytes T contenant des molécules solubles telles que des cytokines ou des granzymes, mais également des protéines associées aux membranes comme FasL ou CTLA-4, pourront être sécrétées de manière polarisée à la synapse. La synapse immunologique sécrétrice formée entre un lymphocyte T CD8⁺ effecteur (CTL) et sa cible a reçu beaucoup plus d'investigations que celle formée entre un lymphocyte T CD4⁺ et une cellule présentatrice de l'antigène. Chez les CTL, les granules libérés sont connues sous le nom de granules lytiques et de lysosomes sécrétoires et ont pour fonction de tuer la cellule cible avec laquelle elles interagissent (Bossi and Griffiths, 2005; Stinchcombe and Griffiths, 2003). Pour les lymphocytes CD4⁺, il a été montré qu'en réponse à l'engagement du TCR, des cytokines telles que l'IL-2, l'IFN- γ ou le TNF mais également des chimiokines s'accumulent à la synapse immunologique dans un compartiment situé à proximité de l'appareil de Golgi et du MTOC (Kupfer et al., 1991; Morales-Tirado et al., 2004). Il apparaît également qu'il existe des voies de sécrétions distinctes pour les cytokines et pour les chimiokines, impliquant différents régulateurs du cytosquelette d'actine, ce qui permettrait une régulation plus fine de la sécrétion par les lymphocytes T CD4⁺ (Huse et al., 2006; Morales-Tirado et al., 2004). En effet, alors que l'IL-2 et l'IFN- γ sont sécrétés de manière polarisée à la synapse immunologique, le TNF et les chimiokines sont sécrétés de manière diffuse. De plus, les lymphocytes T CD4⁺ sont capables de sécréter des vésicules exprimant la molécule inhibitrice CTLA-4 suite à leur activation antigénique (Iida et al., 2000). Celle-ci entre ainsi en compétition avec la molécule de costimulation CD28 pour l'interaction avec CD80/86 exprimé à la surface de la cellule présentatrice de l'antigène et permet l'arrêt de l'activation lymphocytaire (Krummel and Allison, 1995; Poo et al., 1988). Comme pour l'expression de CTLA-4, l'expression de FasL est augmentée à la surface des lymphocytes T CD4⁺ par sécrétion de vésicules à la synapse immunologique suite à l'activation lymphocytaire (Bossi and Griffiths, 2005). Une faible proportion de lymphocytes T CD4⁺ peut acquérir des fonctions cytotoxiques et a été qualifiée de CD4⁺ CTL (Appay et al., 2002). Ces cellules se développent sous des conditions particulières et leur relevance *in vivo* reste à démontrer.

► La synapse immunologique dynamique ou kinapse :

Jusque dans les années 2000, on pensait que l'interaction entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice de l'antigène devait être stable afin de permettre l'intégration des signaux conduisant à l'activation lymphocytaire. Ce dogme est tombé lorsqu'il a été montré que les lymphocytes T peuvent former des synapses immunologiques à la fois dynamiques et productives (Friedl and Brocker, 2002). En 2008, M.Dustin a proposé le nom de kinapse pour décrire l'interaction dynamique entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice de l'antigène (Dustin, 2008). Le choix du nom kinapse repose sur la définition du suffixe -apse (rejoindre un endroit) et du préfixe kin- (mouvement), ce dernier s'opposant au suffixe syn- (similaire ; c'est-à-dire rejoindre un même endroit) retrouvé dans le mot synapse.

La formation de kinapses supporte la dynamique de la rencontre entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice de l'antigène, au niveau des organes lymphoïdes secondaires, ainsi que le modèle de la rencontre en série décrit dans le sous-chapitre précédent (Mempel et al., 2004). Du fait de la mobilité du lymphocyte T à la surface de la cellule présentatrice de l'antigène, celui-ci conserve une morphologie allongée acquise pour sa migration. En parallèle, le lymphocyte T va se polariser vers la cellule dendritique (Storim et al., 2010). La zone de contact comprend 3 zones distinctes qui sont comparables à l'organisation en SMAC de la synapse immunologique concentrique (**Figure 8**) :

- **le front de migration** : Cette zone riche en actine va permettre la mobilité du lymphocyte T. Elle est comparée au dSMAC de par sa concentration élevée en actine mais aussi parce qu'elle est le lieu de la formation des microregroupements de TCR et de LFA-1.
- **la zone centrale** : Cette zone soutient l'engagement du TCR avec les complexes CMH-peptide ainsi que leur translocation vers l'uropode et est comparée au pSMAC.
- **l'uropode** : C'est dans cette zone que les microregroupements de TCR et de LFA-1 vont s'accumuler et être internalisés. Il s'agit de la zone de terminaison de la signalisation, qui est par conséquent comparable au cSMAC.

Ainsi, les microregroupements de TCR et de LFA-1 ainsi que des molécules qui leur sont associées vont se former au niveau du front de migration du lymphocyte T puis être transportés via le flux rétrograde d'actine jusqu'à l'uropode de la cellule, lieu où les interactions seront finalement inactivées (Storim et al., 2010). Contrairement aux synapses qui ont une organisation moléculaire symétrique, les kinapses sont asymétriques. La PKC θ va permettre la conversion des synapses en kinapses, alors que la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) est impliquée dans la conversion des kinapses en synapses (Sims et al., 2007).

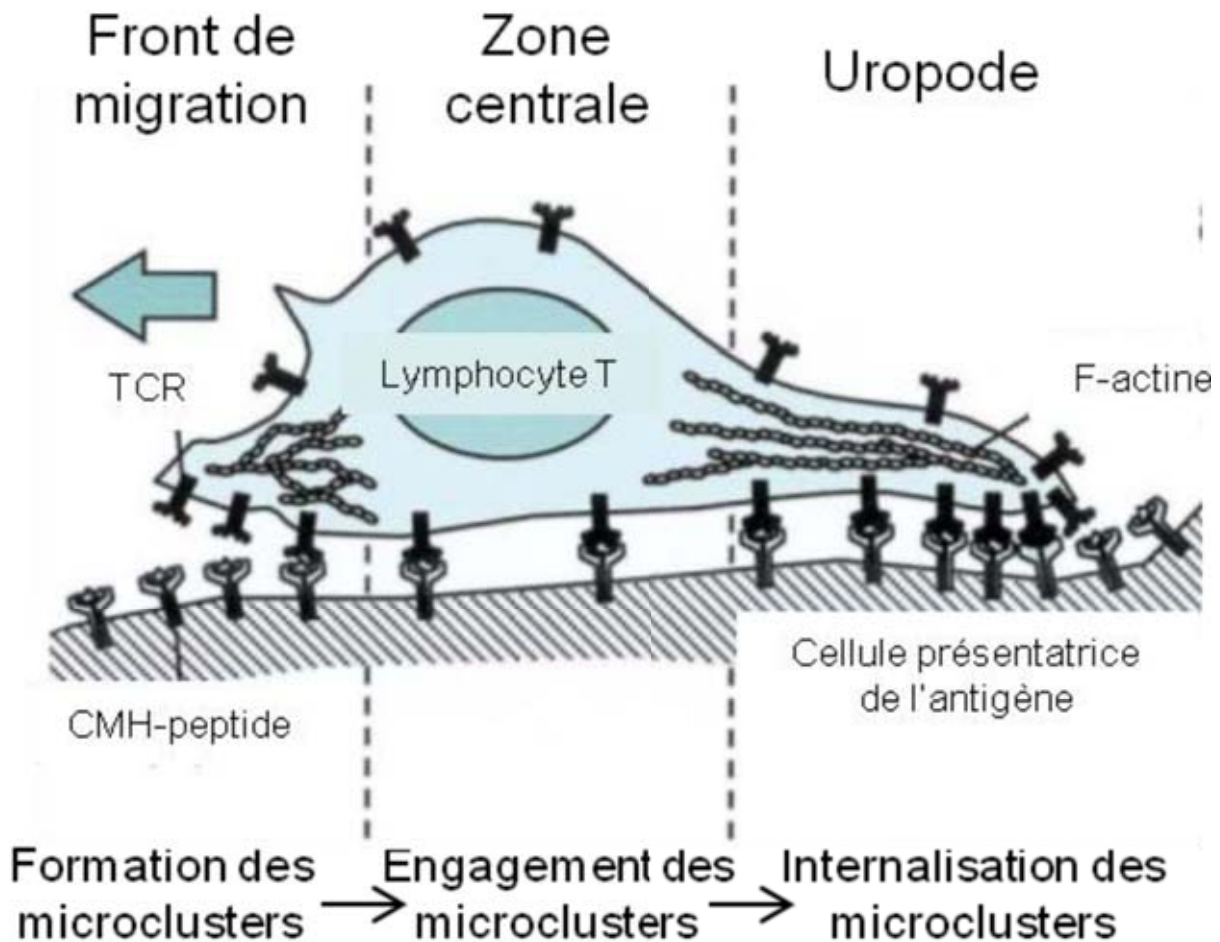


Figure 8 : La kinapse : redistribution des microregroupements de TCR.

Schéma représentant une kinapse immunologique formée entre un lymphocyte T en migration et une cellule présentatrice de l'antigène. Les microregroupements de TCR se forment au niveau du front de migration du lymphocyte T, s'engagent avec les complexes CMH-peptide au niveau de la zone centrale et sont internalisés au niveau de l'uropode. Adaptée de (Friedl and Brocker, 2002)

b) Signalisation lymphocytaire

Jusqu'il y a 10 ans, on pensait que la formation de la synapse immunologique organisée en SMAC permettait l'initiation de la signalisation lymphocytaire. On sait désormais que cette dernière a lieu avant la formation des SMAC, dès que les molécules de TCR s'engagent avec les complexes CMH-peptide en périphérie (Lee et al., 2002). L'engagement de 11 à 17 molécules de TCR est nécessaire pour induire une signalisation (Varma et al., 2006).

Suite à l'engagement du TCR, plusieurs voies de signalisation vont être déclenchées :

- la voie calcique
- la voie de la protéine kinase C θ (PKC θ)
- la voie des MAPKinases
- la voie Vav-1/Jun

Introduction : *Les lymphocytes T : chefs d'orchestres de l'immunité adaptative, une vie bien rythmée*

Toutes ces voies auront pour finalité d'activer plusieurs facteurs de transcription qui moduleront l'expression de gènes impliqués dans l'activation et dans les fonctions effectrices des lymphocytes T telles que la prolifération, la production de cytokines, la différenciation cellulaire.

c) Terminaison de l'interaction cellulaire

Cette phase correspond à la dissolution de la synapse immunologique et au retour du lymphocyte T à un phénotype exclusivement migratoire. Cette étape n'est à ce jour que très peu documentée. En effet, il n'a pas été déterminé si la terminaison de la synapse immunologique était une conséquence ou un pré-requis pour le détachement du lymphocyte T (Friedl et al., 2005). Plusieurs mécanismes semblent être impliqués dans le détachement du lymphocyte T : l'internalisation et la dégradation des TCR ainsi que des molécules d'adhésion LFA-1, l'augmentation de l'expression à la synapse immunologique des molécules inhibitrices de l'activation de lymphocytes T, telles que CTLA-4 (Iida et al., 2000; Lee et al., 2003; Mazerolles et al., 1996). D'autres facteurs qui vont influencer la stabilité de la synapse immunologique sont les chimiokines. En effet, il a été montré que certaines chimiokines (CCL21, CCL19, CXCL10) sont capables de distraire les lymphocytes T de la cellule présentatrice de l'antigène, en favorisant un retour du lymphocyte T à la migration (Bromley et al., 2000).

5. Phase effectrice des lymphocytes T CD4⁺

La vie active des lymphocytes T

Une fois activés, les lymphocytes T CD4⁺ deviennent effecteurs. Au moment de leur activation, les cellules présentatrices de l'antigène leur ont dicté leur destinée. Certains lymphocytes T CD4⁺ vont exercer leurs fonctions dans les ganglions où ils vont apporter leur aide aux lymphocytes T CD8 tueurs ou aux lymphocytes B producteurs d'anticorps. D'autres sortiront des ganglions et seront recrutés sur les sites de l'infection pour y exercer leurs fonctions effectrices.

a) Devenir des lymphocytes T CD4⁺ dicté par les cellules présentatrices de l'antigène

La rencontre entre les lymphocytes T CD4⁺ et les cellules présentatrices de l'antigène va dicter aux lymphocytes T CD4⁺ leur devenir. Dans le cas où les lymphocytes T n'auraient pas trouvé d'antigène pour lequel ils sont spécifiques, dans les heures ou les jours qui suivent leur entrée dans un organe lymphoïde secondaire, ils retournent dans la circulation sanguine

via la circulation efférente (Gowans and Knight, 1964). Une fois qu'ils ont rejoint la circulation sanguine, les lymphocytes T naïfs vont y rester en moyenne moins d'une demi-heure avant de rejoindre un nouvel organe lymphoïde secondaire, toujours à la recherche d'un antigène spécifique (Pabst, 1988).

Dans le cas où les lymphocytes T ont reconnu dans les organes lymphoïdes secondaires l'antigène pour lequel ils sont spécifiques, la rencontre avec les cellules présentatrices de l'antigène a conduit à leur activation. Ces lymphocytes T sont alors effecteurs. Le devenir des lymphocytes T effecteurs est aussi orienté par cette rencontre. En effet, il a été montré qu'au moment de l'interaction cellulaire, les cellules dendritiques vont induire et contrôler la nature de l'expression de molécules d'adhésion et de récepteurs aux chimiokines à la surface des lymphocytes T effecteurs ainsi que la nature des chimiokines qu'ils vont sécréter (Agace, 2006; Sigmundsdottir and Butcher, 2008). Sur la base de l'expression différentielle de ces molécules, différents lignages de différenciation des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs ont été définis. Chaque lignage a des propriétés de localisation différentes dans l'organisme et par conséquent des propriétés effectrices distinctes.

b) Les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs dans les organes lymphoïdes secondaires

Des études de microscopie biphotonique ont montré qu'au moment du contact productif entre cellules dendritiques et lymphocytes T CD4⁺, les chimiokines CCL3 et CCL4 sont produites par les deux partenaires (Castellino et al., 2006). Ces chimiokines induisent le recrutement de lymphocytes T CD8⁺ naïfs qui expriment CCR5, le récepteur de ces chimiokines. Ainsi, des trios cellulaires se forment et conduisent à l'activation antigène spécifique des lymphocytes T CD8⁺ avec l'aide des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs, aussi nommé Th1 (T helper cells 1).

Un second exemple de l'activité effectrice des lymphocytes T CD4⁺ dans les organes lymphoïdes secondaires a été décrit plus récemment. L'expression de CXCR5, récepteur à la chimiokine CXCL13 par une sous population de lymphocytes T CD4⁺ effecteurs conduit à leur recrutement au niveau des zones B des organes lymphoïdes secondaires (Breitfeld et al., 2000). En effet, la chimiokine CXCL13 est exprimée par les FDC qui constituent le réseau de fibres des zones B. Les lymphocytes T effecteurs CXCR5⁺, nommés Tfh (follicular T helper cells), apportent une aide aux lymphocytes B supportant leur activation, leur expansion, leur différenciation et la formation des centres germinatifs.

c) Les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs hors des organes lymphoïdes secondaires

Certains sous-types de lymphocytes T effecteurs vont quant à eux quitter les organes lymphoïdes secondaires. Ces lymphocytes T vont perdre l'expression de CCR7 et de CD62L au profit de récepteurs spécifiques des organes non-lymphoïdes (Agace, 2006). Des études génétiques et pharmacologiques ont montré que le récepteur 1 à la Sphingosine 1-Phosphate (S1P₁ ; Sphingosine 1-Phosphate receptor 1) est impliqué dans la sortie des lymphocytes T des organes lymphoïdes secondaires (Mandala et al., 2002; Matloubian et al., 2004). De manière anecdotique, il a été observé chez le cochon que les lymphocytes T pouvaient également quitter les organes lymphoïdes secondaires en empruntant la voie d'entrée de l'organe, c'est-à-dire en traversant les HEV (Pabst, 1988). Chez le rat, il a également été observé qu'un faible pourcentage (8 %) de lymphocytes T traversent les HEV en direction de la lumière de l'endothélium plutôt que vers le parenchyme des organes lymphoïdes secondaires (Anderson and Anderson, 1976). L'existence et la fonction d'une migration « inversée » reste à élucider chez l'Homme.

Pour exemple, les lymphocytes T CD4⁺ qui vont exprimer CCR9 auront un tropisme pour l'intestin, alors que ceux qui exprimeront CCR4 et CCR10 se localiseront dans la peau (Reiss et al., 2001). L'entrée des lymphocytes T effecteurs depuis la circulation sanguine vers les organes lymphoïdes tertiaires implique les 3 étapes précédemment décrites (**Figure 2**) pour l'entrée des lymphocytes T naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires (Ley et al., 2007). La différence majeure réside dans la nature des molécules d'adhésion et des chimiokines impliquées. Très récemment, il a aussi été montré que certains sous-types de lymphocytes T effecteurs sont capables de traverser les HEV en absence de chimiokines présentées à la surface des HEC ou d'une source de chimiokines extra-endothéliale (Shulman et al., 2012). En revanche, il a été démontré que leur transmigration est guidée par des chimiokines stockées dans des vésicules à l'intérieur des cellules endothéliales. Ces vésicules sont ancrées aux fibres d'actine et relarguées au niveau des zones de contact étroit formées entre les lymphocytes T et les cellules endothéliales. Les lymphocytes T effecteurs émettent des extensions membranaires riches en actine, de type filopodes, préférentiellement à proximité des vésicules enrichies en chimiokines.

II. La protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich : un régulateur clef du cytosquelette d'actine des lymphocytes T

La protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich modèle le squelette des lymphocytes T

Nous avons vu dans le chapitre précédent que pour bien défendre notre organisme, les lymphocytes T CD4⁺ sont en perpétuel mouvement dans le but de rejoindre différents sites de l'organisme et d'y établir des interactions avec d'autres cellules. Alors que les lymphocytes T s'allongent pour se déplacer, ils s'arrondissent pour interagir avec leurs partenaires. La forme des cellules est définie par leur squelette : le cytosquelette d'actine. Ce dernier est très malléable et est modelé principalement par la protéine du syndrome de Wiskott-Adrich (WASP). L'absence de la protéine dans nos cellules (à cause de mutations génétiques) conduit au Syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS). Il s'agit d'une maladie héréditaire sévère caractérisée par l'incapacité des cellules du système immunitaire à défendre l'organisme contre tous les types de pathogènes.

Dans le premier chapitre nous avons souligné que les lymphocytes T doivent être de très bons migrants pour protéger notre organisme. Nous avons également décrit que ces cellules ont la capacité d'infiltrer une grande diversité de tissus et de former des contacts variés et dynamiques avec d'autres cellules de l'immunité ou avec les cellules stromales. Dans ce second chapitre, nous verrons que la formation de protrusions membranaires riches en actine permet aux lymphocytes T d'atteindre des vitesses de migration exceptionnelles par rapport aux autres cellules, d'infiltrer des tissus de densités différentes et d'établir des contacts cellulaires dynamiques. Nous comprendrons également l'importance du dynamisme du cytosquelette d'actine et de sa réorganisation continue dans la physiologie des lymphocytes T. Un régulateur majeur du cytosquelette d'actine des lymphocytes T est la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) dont la fonction cruciale sera soulignée par la description du tableau clinique sévère des patients atteints du Syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) chez lesquels WASP est déficiente.

1. Le cytosquelette d'actine

Un squelette malléable

Le cytosquelette d'actine est très malléable car il est construit par l'assemblage de plusieurs monomères d'actine formant un réseau de longs filaments d'actine. Les filaments d'actine sont sans cesse défaits d'un côté de la cellule pour être recyclés d'un autre côté. Ceci permet à la cellule de s'allonger pour se déplacer ou de s'arrondir pour interagir stablement avec un partenaire cellulaire. Finalement, sans une restructuration constante du réseau d'actine, les lymphocytes T seraient incapables de se déplacer et de rencontrer les partenaires cellulaires nécessaires à la défense de notre organisme.

a) Polymérisation et dépolymérisation des filaments d'actine

Le cytosquelette d'actine est extrêmement flexible, il est continuellement réorganisé dans la cellule. Cette réorganisation est nécessaire pour la réalisation de l'ensemble des étapes de vie du lymphocyte T décrites dans le chapitre précédent (pour revue (Samstag et al., 2003)). Des filaments d'actine (ou actine-F) sont générés à partir de monomères d'actine (ou actine-G) à un site de la cellule (on parle alors de polymérisation de l'actine), pendant que ces filaments sont défaits à un autre site (on parle ici de dépolymérisation de l'actine) (**Figure 9 A-B**). Un stock de monomères d'actine est maintenu dans la cellule par liaison avec des molécules de séquestration telles que la thymosin- β 4, la profiline ou encore la cofiline (**Figure 9C**). La génération de nouveaux filaments d'actine à partir de filaments existants est initiée par le complexe Arp2/3, lui-même activé par la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) (**Figure 9E**). Le complexe Arp2/3 branche de nouveaux filaments d'actine avec un angle de 70° sur des filaments pré-existants. D'autre part, les filaments d'actine existants peuvent être allongés, en principe à chaque extrémité, mais il a été observé que l'élongation était plus rapide à l'extrémité (+) ou « barbue » (barbed ends) qu'à l'extrémité (-) ou « pointue » (pointed ends) du filament d'actine (**Figure 9B**). Cette différence de cinétique permet à un filament d'actine de s'allonger à l'extrémité (+) et de se raccourcir à l'extrémité (-). Cette élongation peut être réalisée par les formines (**Figure 9D**). De nouvelles extrémités de filaments peuvent aussi être créées par clivage des filaments existants (**Figure 9F**). Le clivage implique la cofiline et la gelsoline. Les filaments d'actine sont protégés de la dépolymérisation par des protéines de coiffes (capping). La cofiline n'est pas seulement impliquée dans la polymérisation de l'actine mais également dans sa dépolymérisation. Ce serait sa localisation et les partenaires avec qui elle interagirait qui déterminerait si elle favorise la polymérisation ou la dépolymérisation de l'actine.

Finalement, la myosine s'associe aux filaments d'actine générés et glisse le long de ces filaments depuis l'extrémité (-) vers l'extrémité (+) (**Figure 9G**).

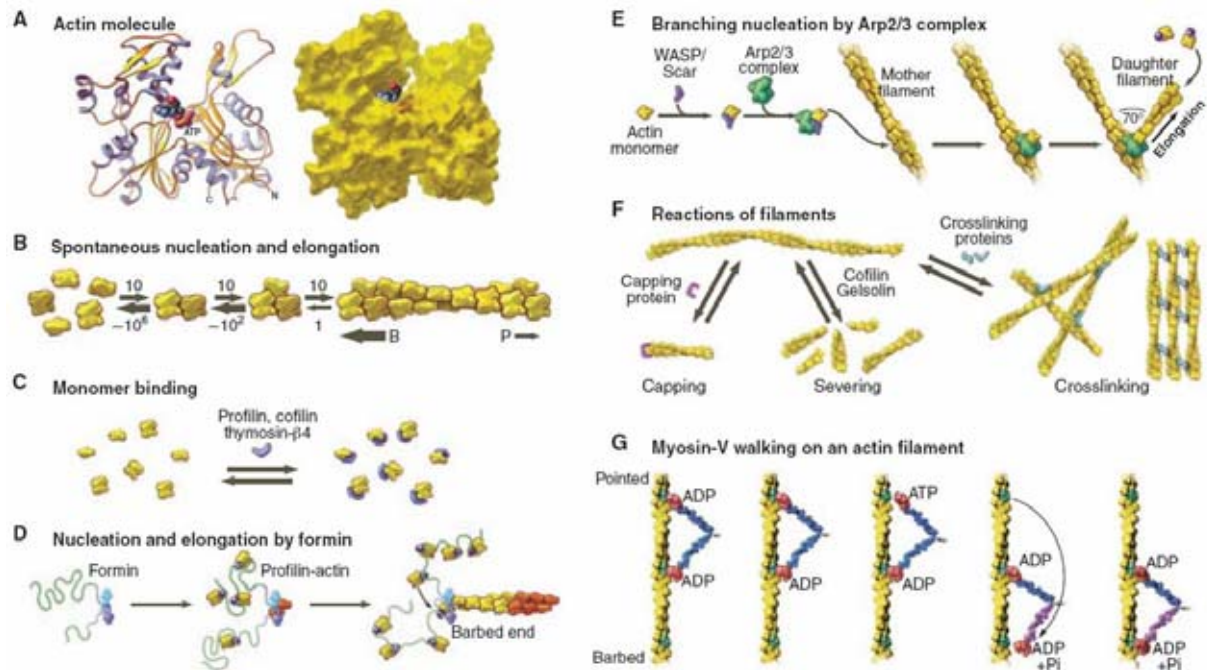


Figure 9 : Structure et régulation des filaments d'actine.

(A) Structure tridimensionnelle d'un monomère d'actine (B) Nucléation et élongation d'un filament d'actine à son extrémité barbue (B) et son extrémité pointue (P). (C) Les ligands des monomères d'actine : la thymosin-β4, la profiline et la cofiline sont impliqués dans la maintenance d'un stock de monomères d'actine (D) Nucléation et élongation des filaments d'actine par les formines à l'extrémité barbue du filament. (E) Nucléation et branchement d'un nouveau filament d'actine à un filament existant via WASP et le complexe Arp2/3 (F) Les protéines de coiffes (capping) bloquent les réactions à l'extrémité barbue du filament, la cofiline et la gelsoline sont impliquées dans le clivage des filaments, des protéines assemblent les filaments d'actine en un réseau. (G) La myosine s'associe aux filaments d'actine et glisse le long des filaments. D'après (Pollard and Cooper, 2009)

b) Molécules et modèles pour l'étude du cytosquelette d'actine

L'implication du cytosquelette d'actine dans les fonctions cellulaires a tout d'abord été mise en évidence par l'utilisation de 2 drogues bloquant la polymérisation du cytosquelette d'actine. La cytochalasine D est une toxine fongique qui inhibe la polymérisation de l'actine en se liant aux extrémités (+) des filaments d'actine. La latrunculine A est une toxine spongiée qui en se liant à l'actine-G inhibe également la polymérisation de l'actine. Puis d'autres outils ont été développés pour permettre sa visualisation. La phalloïdine est une toxine extraite de l'amanite phalloïde qui a pour particularité de se lier à l'actine-F et d'ainsi stabiliser le réseau. Couplée à une protéine fluorescente, la phalloïdine permet de visualiser les filaments d'actine. Puisque le cytosquelette d'actine est continuellement remanié dans les cellules, il est apparu important de l'observer en temps réel. Dans ce but, les cellules d'intérêt ont été transfectées avec des plamides codant pour de l'actine couplé à une protéine fluorescente. Les limites à cette technique sont la toxicité de l'actine exogène et la possibilité de ne travailler qu'avec des cellules transfectables. Récemment, la synthèse d'un peptide : la lifeAct a permis de visualiser la réorganisation du cytosquelette d'actine en temps réel dans

des cellules difficilement transfectables (Riedl et al., 2008). La lifeAct est un peptide de 17 acides aminés, capable de se lier à l'actine. Ce peptide a été extrait de la protéine Abp140, un ligand de l'actine chez la levure. Couplé à une protéine fluorescente, ce peptide marque les filaments d'actine des cellules des mammifères sans interférer avec la dynamique du cytosquelette. Finalement, la déficience en molécule régulatrice du cytosquelette d'actine représente également un modèle de choix pour déterminer le rôle du cytosquelette d'actine dans les fonctions cellulaires. Chez l'Homme, la déficience naturelle la plus étudiée est celle de la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP). Elle est le modèle choisi pour mon travail de thèse. Les déficiences naturelles en VAV1, coronine et DOCK8 chez l'Homme constituent également de bons modèles d'étude du cytosquelette d'actine. Ces déficiences ont été découvertes plus récemment et sont par conséquent moins connues (Paccani et al., 2005; Shiow et al., 2009; Shiow et al., 2008; Su et al., 2011).

c) Implication du cytosquelette d'actine dans les fonctions des lymphocytes T

L'ensemble des outils décrits précédemment ont permis de montrer que le cytosquelette d'actine joue un rôle important dans de nombreuses fonctions du lymphocyte T. Il est notamment impliqué dans le trafic membranaire, la division cellulaire, la survie ou encore dans la formation de protrusions membranaires (Firat-Karalar and Welch, 2011). Parmi les événements auxquels le cytosquelette d'actine participe dans le trafic membranaire, on peut citer l'internalisation clathrine dépendente, l'endocytose ou encore le transport vésiculaire du réticulum endoplasmique (RE) au golgi. Le cytosquelette d'actine est aussi impliqué dans la polarisation de la machinerie sécrétoire des lymphocytes T et par conséquent dans la sécrétion polarisée des cytokines et des granules lytiques (Kupfer et al., 1987). Le cytosquelette d'actine est aussi impliqué dans la formation de différentes protrusions membranaires (lamellipodes, podosomes,...) nécessaires à la migration, l'adhésion et aux interactions cellulaires (Le Clainche and Carlier, 2008). Le rôle du cytosquelette d'actine sera détaillé ci-après, dans la polarisation des lymphocytes T ainsi que dans leur migration, leur rencontre avec les cellules présentatrices de l'antigène et lors de la formation de la synapse immunologique.

d) Organisation du cytosquelette d'actine lors de la migration amiboïde

Les lymphocytes T utilisent le mode de migration amiboïde pour se déplacer rapidement dans les tissus. Ce type de migration cyclique est basé sur une succession de 3

étapes : 1) extension membranaire, 2) traction du corps cellulaire, 3) rétraction de l'arrière de la cellule. Les lymphocytes T en migration adoptent une morphologie polarisée caractérisée par la formation de 3 zones aux propriétés distinctes. Ils forment un **front de migration** riche en actine (ou leading edge) qui va leur permettre de percevoir l'environnement, une **région centrale** contenant le noyau qui va leur donner la force de migration et un **uropode** adhérent au substrat (Ponti et al., 2004; Smith et al., 2005). Comme décrit précédemment, la migration amiboïde ne requiert pas nécessairement l'adhésion des cellules à leurs substrats. En effet, lorsque la densité de l'environnement peut fournir aux cellules le contact suffisant à la génération de forces de traction, les intégrines sont alors dispensables à la migration cellulaire (Friedl et al., 1998a; Lammermann and Sixt, 2009; Renkawitz and Sixt, 2010; Woolf et al., 2007). Ce concept a été schématisé par Pinner et Sahai et est présenté en **figure 10** (Pinner and Sahai, 2009). Les auteurs comparent des cellules en migration dans différents environnements à un Homme qui escaladerait des surfaces d'adhérences différentes. Tout comme la migration cellulaire, l'escalade de l'Homme est permise par la présence de points d'ancrage au support (intégrines vs barreaux de l'échelle) ou par un environnement confiné (fibres de l'environnement vs 2 murs rapprochés).

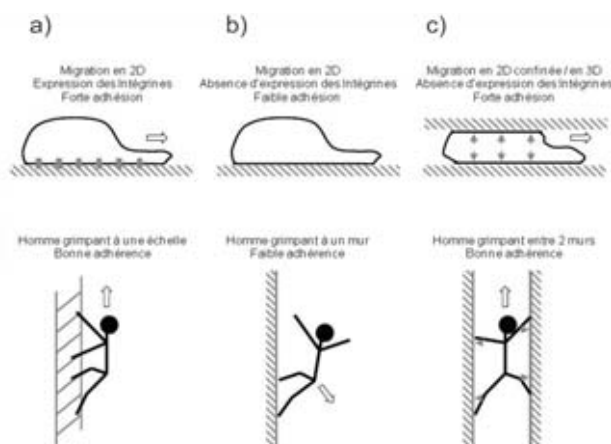


Figure 10 : En absence d'adhésion, l'environnement peut offrir les forces nécessaires à la mobilité.

(a) Une forte adhésion au substrat permet aux cellules de migrer en 2-dimensions, et à un Homme de monter à une échelle.

(b) En absence d'adhésion au substrat, les cellules ne peuvent pas migrer en 2-dimensions et un Homme ne peut pas escalader une surface lisse.

(c) Un environnement confiné offre aux cellules et à un Homme la force de friction nécessaire à leurs déplacements sur des surfaces non adhésives.

Adapté de (Pinner and Sahai, 2009).

Ainsi, les intégrines sont nécessaires à la migration cellulaire en 2-dimensions alors qu'elles sont dispensables à la migration cellulaire en 3-dimensions. En 2-dimensions, il a aussi été montré que les lymphocytes T sont capables d'adopter 2 modes de migrations amiboïdes distincts (Jacobelli et al., 2009). Le mode « walking » ou « marche » permet aux lymphocytes T de migrer très rapidement sur des surfaces peu adhésives et implique de multiples contacts de courte durée avec la surface. Ce mode de migration est dépendant de la force de contractilité générée par la Myosine-IIA. En revanche, le mode de migration « sliding » ou « glisse » est utilisé par les lymphocytes T pour migrer sur des surfaces fortement adhésives et

implique un contact continu avec la surface. Ce mode de migration est plus lent que le précédent et est principalement conduit par polymérisation de l'actine. Par la suite, le même groupe a montré qu'en 3-dimensions, les lymphocytes adoptent le mode de migration « marche », dépendant de la myosine-IIA, ce qui leur permettrait d'atteindre des vitesses de migration importantes et de passer rapidement d'une surface d'adhésion à une autre (Jacobelli et al., 2010). Le mode de migration « glisse » correspond plutôt à une migration en 2-dimensions, le long des vaisseaux sanguins par exemple.

► Polarisation cellulaire pour la migration :

La migration amiboïde implique une polarisation cellulaire qui peut être induite par les chimiokines et/ou par ICAM-1 (Dustin et al., 1997; Morin et al., 2008). La polarisation de la cellule en migration correspond à un changement dans la distribution des filaments d'actine qui passe d'une symétrie radiale dans la cellule non polarisée à une symétrie linéaire dans la cellule polarisée. De plus, l'implication du cytosquelette d'actine dans la polarisation cellulaire a été mise en évidence par l'utilisation des drogues bloquant la polymérisation de l'actine (Lee et al., 2004; Verschueren et al., 1995). Il a été montré que les protéines de polarité Scribble et Par sont impliquées dans la polarisation des lymphocytes T, puisqu'en leur absence les lymphocytes T ne se polarisent pas et sont incapables de migrer (Gerard et al., 2007; Ludford-Menting et al., 2005). Enfin, les rafts lipidiques ont aussi été impliqués dans la polarisation de la cellule en migration (Gomez-Mouton et al., 2001; Millan et al., 2002). Alors que les rafts lipidiques enrichis en gangliosides GM3 se localisent au front cellulaire, ceux enrichis en gangliosides GM1 sont enrichis à l'uropode. Leur intégrité est non seulement nécessaire à la polarisation cellulaire mais également à la distribution polarisée d'autres protéines. Les rafts lipidiques sont connectés au cytosquelette d'actine puisque la dépolymérisation de ce dernier par la latruncunline B abolit leur polarisation (Gomez-Mouton et al., 2001).

► Extensions membranaires au front de migration : le lamellipode :

Au front de migration d'une cellule polarisée pour la migration se forme un lamellipode. Il a une épaisseur d'environ 0,1 à 0,2 μm et contient des filaments d'actine courts et branchés (Abraham et al., 1999; Welch and Mullins, 2002). La dynamique du cytosquelette d'actine dans cette région a pu être observée par microscopie à fluorescence en utilisant des monomères d'actine marqués (Theriot and Mitchison, 1991). Cette étude a souligné que de nouveaux filaments d'actine sont générés à proximité de la membrane plasmique, alors qu'à

l'arrière du lamellipode les filaments d'actine formés précédemment sont dégradés. Les monomères d'actine relargués à l'arrière seront incorporés à l'avant du lamellipode. Ainsi, le flux rétrograde de l'actine au niveau du lamellipode génère une force de traction qui permet à la cellule de se déplacer vers l'avant mais aussi de passer à travers les mailles formées naturellement par la matrice extracellulaire. Néanmoins, il est pensé que la force de traction générée à la membrane n'est pas induite par l'élongation des filaments d'actine mais par l'énergie thermique libérée au niveau des nouveaux filaments convertie en énergie élastique (Pollard and Borisy, 2003). Outre les filaments d'actine, les récepteurs aux chimiokines (CCR2, CCR5 et CXCR4) sont polarisés au front de migration où ils permettent la migration directionnelle des lymphocytes T (Gomez-Mouton et al., 2001; Nieto et al., 1997). La molécule d'adhésion LFA-1 est aussi recrutée au front de migration et apparaît sous sa conformation d'affinité intermédiaire (Stanley et al., 2008). Son activation initie la formation du lamellipode des lymphocytes T au contact de ICAM-1 (Porter et al., 2002). En concert avec la taline, la vinculine, les FAK (Focal Adhesion Kinases) et l' α -actinine ; LFA-1 connecte le cytosquelette d'actine au substrat et permet ainsi la formation de nouveaux points d'adhésion au substrat (Burbach et al., 2007; Gomez-Mouton et al., 2001; Volkov et al., 1998). D'un point de vue signalétique, l'activation de LFA-1 au front de migration induit l'activité de la myosine à travers l'activation de MLCK (Smith et al., 2003). Le traitement par des inhibiteurs de MLCK, de lymphocytes T en migration sur une surface coatée en ICAM-1, conduit à la disparition des protrusions d'actine frontales, à la rétraction du corps cellulaire ainsi qu'à l'arrêt de migration. Ainsi, la signalisation LFA-1 au front cellulaire permet le lien entre adhésion, contraction et migration.

► Contraction de la région centrale :

Derrière le lamellipode, une force de contraction est nécessaire à la traction du corps cellulaire. Celle-ci est générée par la myosine qui, en s'associant aux filaments d'actine, induit leur contraction en consommant de l'ATP. Ici aussi c'est la signalisation à travers LFA-1 qui va induire l'activité de la myosine. Alors que la conformation d'affinité intermédiaire de LFA-1 est enrichie au front de migration, la conformation de forte affinité de LFA-1 s'agrège au niveau de la région centrale (Smith et al., 2005). L'engagement de la conformation de forte affinité de LFA-1 avec ICAM-1 au niveau de la région centrale est très stable. Il a été montré que la taline était impliquée dans la formation et dans la stabilisation de cette zone. En effet, l'inhibition de l'expression de la taline dans les lymphocytes T conduit à un défaut du recrutement de la conformation de forte affinité de LFA-1 dans la région centrale mais aussi à

un défaut de migration. Ainsi, ces résultats suggèrent que la taline lierait la molécule LFA-1 au cytosquelette d'actine. La région centrale représenterait ainsi une plateforme adhésive supportant les cycles d'extension et de rétraction du lamellipode mais aussi les cycles d'attachement et de détachement de l'uropode.

► Détachement de l'uropode

La fonction de l'uropode dans la migration cellulaire est encore assez mal connue. Il a été observé que l'uropode cyclait continuellement entre des phases d'accrochage au substrat, de rétraction puis de décrochage du substrat, ce qui favoriserait la migration cellulaire. Les molécules d'adhésion CD43, CD44, ICAM-1,-2 et -3 sont concentrées à l'uropode (Sanchez-Madrid and del Pozo, 1999). Il semblerait que la localisation de ces molécules à l'uropode soit sous la dépendance du cytosquelette d'actine puisqu'elles s'associent à des molécules d'ancrage au cytosquelette d'actine, les ERM (Lee et al., 2004). La myosine est également exprimée à l'uropode où elle permet le désengagement de LFA-1 de son ligand et par conséquent le décrochage de l'uropode du substrat (Morin et al., 2008). L'activation de la myosine à l'uropode est sous la dépendance de RHOK, dont l'absence d'expression empêche la désadhésion de l'uropode au substrat (Smith et al., 2003). En accord avec cette observation, il a été montré qu'à l'uropode, la molécule LFA-1 n'est pas engagée avec son ligand ICAM-1 (Smith et al., 2005).

e) Organisation du cytosquelette d'actine lors de la rencontre avec les cellules présentatrices de l'antigène

Le lymphocyte T en migration va entrer en contact avec la cellule présentatrice de l'antigène via son front de migration. Il a été montré de manière élégante, que le lamellipode est la zone la plus sensible pour la reconnaissance de l'antigène. En effet, il est 5 à 10 fois plus sensible que l'uropode (Negulescu et al., 1996). Il englobe la cellule présentatrice de l'antigène ce qui fait que la surface de contact entre les 2 cellules est très importante (Anton et al., 2002; Tskvitaria-Fuller et al., 2003). Le lamellipode est une structure très dynamique qui va permettre aux lymphocytes T de scanner la surface des cellules présentatrices de l'antigène, à la recherche des complexes CMH-peptide spécifiques. Cette dynamique est supportée par le flux rétrograde de l'actine et par des oscillations contractiles contrôlées par la myosine (Ilani et al., 2009). A l'arrière du lamellipode, la région centrale de la cellule est une zone riche en molécules d'adhésion. Au moment du contact, les premières molécules à entrer en interaction sont le couple LFA-1/ICAM-1. Cet engagement a lieu dans les cas

d'interactions non-spécifiques et spécifiques de l'antigène (Smith et al., 2003). La cellule peut alors arrêter sa migration pour former une synapse immunologique stable ou continuer de migrer et intégrer les signaux perçus sur son passage, comme décrit par le modèle de l'engagement en série (Valitutti et al., 1995b). Comme décrit dans le chapitre précédent, il semblerait que ce soit la qualité de l'interaction TCR-CMH-peptide (affinité, concentration) mais également l'environnement proximal des cellules en contact (chimiodistraktion) qui soit impliqué dans la nature de la synapse immunologique formée (synapse vs kinapse) (Henrickson et al., 2008; Skokos et al., 2007). Très récemment, il a été montré que l'interaction des lymphocytes T avec des cellules endothéliales présentant l'antigène sur leurs molécules de CMH, est facilitée par l'émission par les lymphocytes T effecteurs/mémoires de protrusions riches en actine, de type invadosome/podosome (Sage et al., 2012). L'existence de telles protrusions reste à prouver au contact de cellules présentatrices de l'antigène conventionnelles.

f) Organisation du cytosquelette d'actine lors de la formation de la synapse immunologique

L'arrêt de migration du lymphocyte T au contact de la cellule présentatrice de l'antigène, s'accompagne par un changement de morphologie du lymphocyte T qui s'arrondit alors. Ce changement de morphologie implique une rotation de 180° du flux rétrograde d'actine, favorisée par l'engagement de la molécule de costimulation CD28 avec CD80/86 (Wulfing and Davis, 1998). La formation de la synapse immunologique ne peut avoir lieu sans cette réorganisation du cytosquelette d'actine. En effet, le traitement des lymphocytes T avec la cytochalasine D ou la latrunculine A empêche sa formation (Grakoui et al., 1999). Plus précisément, il a été démontré que la formation des microregroupements de TCR (décrite dans le chapitre précédent) en périphérie de la synapse immunologique ainsi que leur transport au cSMAC est dépendant du flux rétrograde de l'actine observé à la synapse (Campi et al., 2005; Ilani et al., 2009; Varma et al., 2006). En effet, le mouvement centripète des microregroupements de TCR est plus rapide que s'il était gouverné par un simple mécanisme de diffusion. Finalement, bien que le lymphocyte T arrête de migrer pour former une synapse immunologique avec une cellule présentatrice de l'antigène, il reste très dynamique alternant entre des phases d'extension et de rétraction (Dustin et al., 1997; Valitutti et al., 1995a).

g) Les protéines régulatrices du cytosquelette d'actine

Il existe 3 protéines majeures de nucléation du cytosquelette d'actine : le complexe Arp2/3 qui branche de nouveaux filaments d'actine sur des filaments existants (**Figure 9E**), les formines qui allongent les filaments d'actine (**Figure 9D**) et les protéines de la famille de spires (spires, cordon-bleu, leimodine et JMY) qui allongent et clivent les filaments d'actine (Faix and Grosse, 2006; Goley and Welch, 2006; Qualmann and Kessels, 2009; Zuchero et al., 2009). Dans les lymphocytes T, le complexe Arp2/3 joue un rôle central dans la nucléation de l'actine (Goley and Welch, 2006). L'activation du complexe Arp2/3 est réalisée par des protéines appartenant à deux familles : la famille de WASP, comprenant WASP et N-WASP et la famille de WAVE, comprenant WAVE-1, 2 et 3. Alors que l'expression de WASP est restreinte aux cellules hématopoïétiques, N-WASP (Neural-WASP) est exprimée plus largement et doit son nom à son niveau d'expression élevé dans les neurones (Miki et al., 1996). La famille de WAVE comprend 3 membres exprimés chez les mammifères : WAVE1, 2 et 3. Alors que l'expression de WAVE-2 est ubiquitaire, WAVE-1 et 3 sont principalement enrichis au niveau cérébral. Chez l'Homme, les lymphocytes T expriment WASP, N-WASP et WAVE-2 (Nolz et al., 2006). Nous nous intéresserons plus précisément à la protéine WASP qui a fait l'objet de mes travaux de thèse et dont l'importance sera soulignée dans cette introduction par la description de la sévérité de la maladie causée par sa déficience. La structure de WASP, ses partenaires cellulaires et ses fonctions seront détaillés et comparés aux membres de sa famille dans la sous-partie suivante.

2. La protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP)

La protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) est impliquée dans le remaniement du réseau d'actine qui constitue le squelette des lymphocytes T CD4⁺. Lorsqu'ils vont recevoir des signaux extérieurs leur indiquant de se déplacer ou d'interagir avec leurs partenaires cellulaires, WASP va être socillitée. Elle va restructurer le cytosquelette d'actine de manière à induire un changement de morphologie du lymphocyte T : celui-ci adoptera alors une forme allongée pour se déplacer et s'arrondira pour interagir de manière stable avec d'autres cellules.

a) Structure et partenaires protéiques de WASP

WASP est codée par le gène *WAS* localisé en Xp11.22-p11.23. Ce sont des mutations de *WAS* conduisant au syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) qui ont permis son identification en 1987 (Peacocke and Siminovitch, 1987). *WAS* a ensuite été isolé en 1994 par clonage positionnel (Derry et al., 1994). Les 12 exons de *WAS* codent pour WASP une protéine de 502

acides aminés présentant de grandes similarités de structures avec les autres membres de sa famille : N-WASP, WAVE 1-3 (**Figure 11**). La protéine WASP contient 5 domaines fonctionnels, lui conférant une multitude de partenaires (**Figure 11 et 12**).

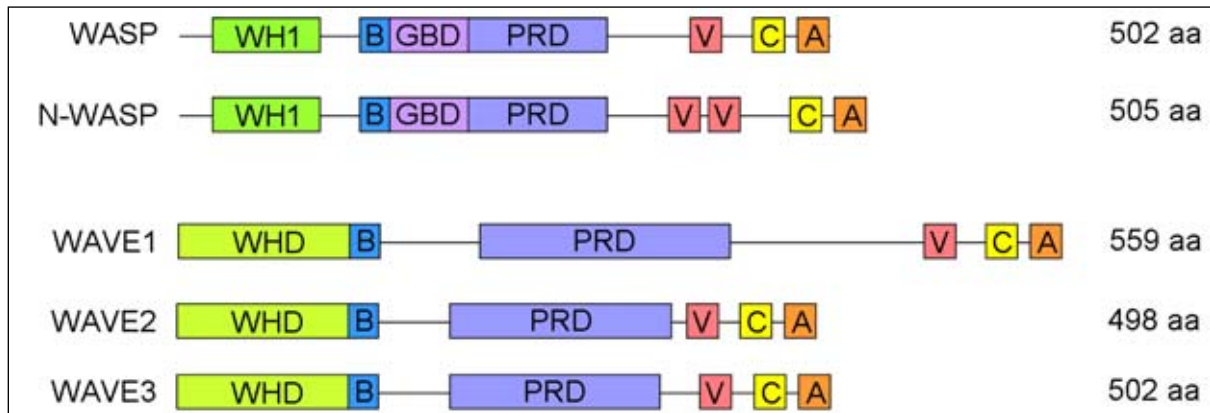


Figure 11 : Structure des protéines de la famille de WASP et de WAVE.

Représentation schématique des domaines protéiques WH1 (WASP Homology domain 1), WHD (WAVE Homology Domain), B (Basic rich domain), GBD (GTPases Binding Domain), PRD (Prolin Rich Domain), V (Verprolin homology domain), C (Cofilin homology domain) et A (Acidic domain) des protéines de la famille de WASP et de WAVE. *Adapté de (Padrick and Rosen, 2010).*

► Domaines VCA :

La partie C-terminale de la protéine est composée d'un domaine d'homologie verproline (V) aussi appelé WH2 (WASP homology domain 2), d'un domaine central d'homologie cofiline (C) et d'une région acide (A). Le domaine V de la protéine lie un monomère d'actine (actine globulaire) pendant que les domaines C et A interagissent avec le complexe Arp2/3 (Actin-related protein 2/3) permettant ainsi la nucléation de nouveaux filaments d'actine (Symons et al., 1996). Très récemment, il a été montré que l'activation du complexe Arp2/3 nécessite l'engagement de 2 sites distincts du complexe Arp2/3 avec 2 domaines VCA délivrant chacun 1 monomère d'actine (Padrick et al., 2011). Ce modèle d'activation d'Arp2/3 est en accord avec la précédente observation de WASP sous forme dimérique (Padrick et al., 2008).

► Domaine PRD :

Le domaine riche en proline (Prolin Rich Domain ; PRD) de WASP contient des sites de liaison aux protéines contenant des domaines SH3, telles que Hck, Grb2, Nck1 et 2 (Cory et al., 2002; She et al., 1997; Tomasevic et al., 2007). L'interaction de ces kinases avec WASP conduit à l'activation de WASP de manière indépendante de Cdc42.

► Domaine GBD :

Le domaine de liaison aux GTPase (GTPase binding domain ; GBD) est une séquence d'environ 85 résidus. Les 20 premiers résidus de cette séquence contiennent un motif de liaison pour les GTPases Cdc42 et Rac (Cdc42-Rac interactive binding ; CRIB) (Abdul-Manan et al., 1999). L'interaction de Cdc42 lié au GTP avec WASP lève l'auto-inhibition de la protéine maintenue par liaison intramoléculaire entre ces domaines GBD et VCA (Kim et al., 2000). Cette levée d'inhibition permet le recrutement du complexe Arp2/3 aux domaines VCA. Rac-1 semble n'avoir d'effet que sur l'activation de N-WASP mais pas sur celle de WASP (Tomasevic et al., 2007).

► Domaine B :

Le domaine B de la protéine WASP est une séquence de résidus basiques. Contrairement au domaine B de N-WASP qui lie le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) et induit l'activation de la protéine ; WASP ne répond pas au PIP2 présenté seul (Higgs and Pollard, 2000; Tomasevic et al., 2007). De plus, en présence de Cdc42 lié au GTP, le PIP2 fonctionne en synergie sur l'activation de N-WASP et à l'opposé, inhibe l'activation de WASP.

► Domaine WH1 :

La partie N-terminale de WASP contient un domaine WH1 (WASP homology domain 1) aussi appelé Ena-VASP-homology-1 domain (EVH1) qui se lie à une séquence riche en proline exprimée par les protéines de la famille de WIP (WASP interacting protein) (Ramesh et al., 1997). Dans le cytoplasme, la majorité des molécules WASP sont en interaction avec WIP (de la Fuente et al., 2007; Sasahara et al., 2002). Cette interaction stabilise la protéine WASP en empêchant sa dégradation par la calpaïne et par le protéasome (de la Fuente et al., 2007; Konno et al., 2007). En effet, le niveau d'expression de WASP est dramatiquement réduit dans les lymphocytes T inhibés pour WIP. De plus, très récemment il a été montré que l'introduction d'un peptide dérivé de WIP dans des lymphocytes T de patients exprimant des mutations au niveau du domaine WH1 de WASP, restaure le niveau d'expression de WASP ainsi que sa fonction (Massaad et al., 2011). Enfin, une étude récente a également rapporté le cas d'une patiente présentant des mutations dans le gène codant pour WIP et qui n'exprime ni WIP ni WASP (Lanzi et al., 2012). L'interaction de WIP avec WASP est également importante pour la localisation de WASP aux sites de polymérisation de l'actine (Chou et al., 2006; Ramesh et al., 1997; Sasahara et al., 2002). Cependant, en interagissant avec WASP, WIP empêche l'activation de WASP par Cdc42 (Sasahara et al., 2002). Suite à l'engagement

du TCR à la synapse immunologique, WIP est phosphorylée par la PKC θ et se désengage de WASP levant ainsi son inhibition. Le mécanisme d'inhibition de WASP par WIP a plus largement été décrit pour N-WASP et suggère que WIP stabilise les protéines de la famille de WASP dans leur conformation inactive (Martinez-Quiles et al., 2001) .

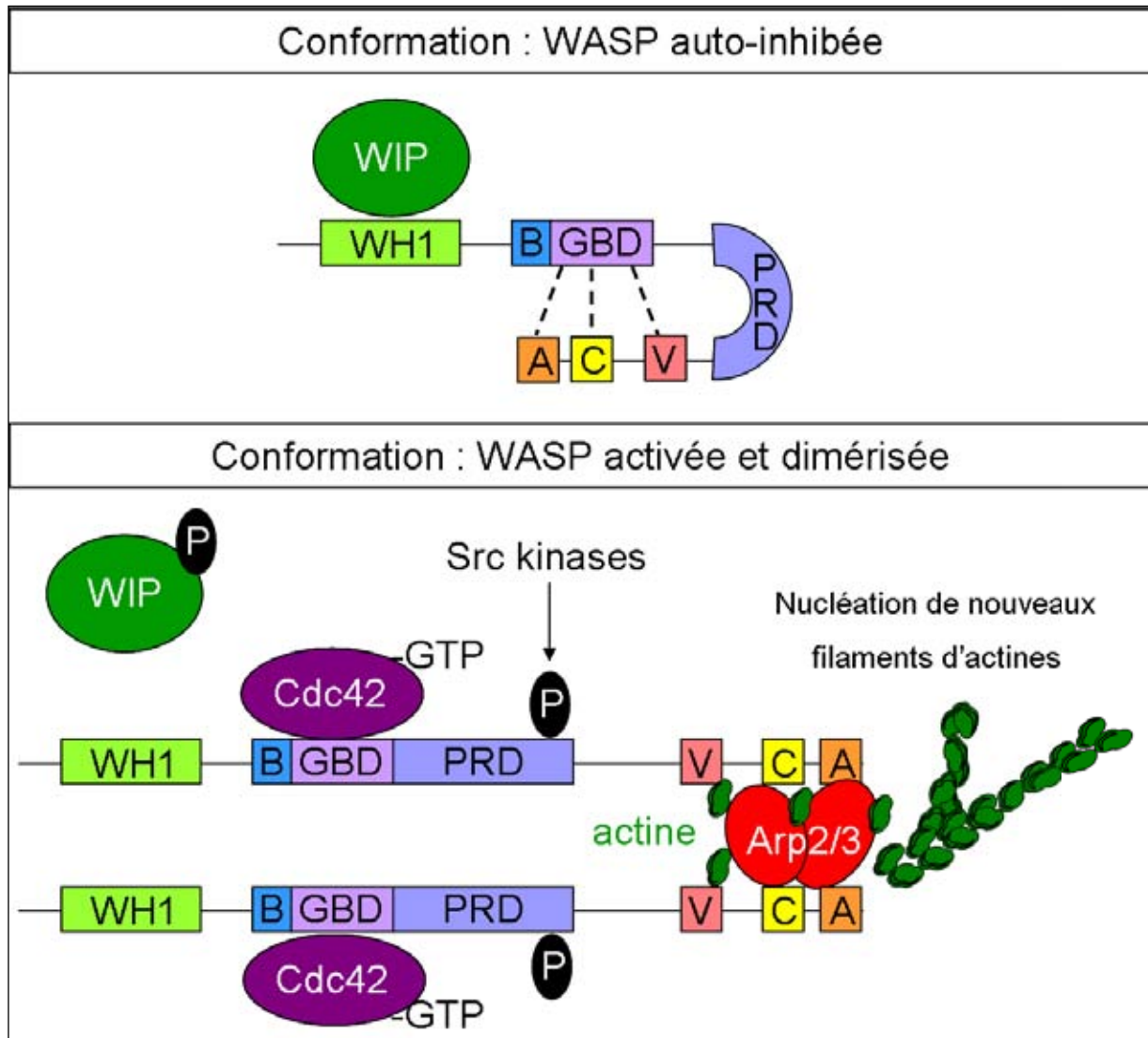


Figure 12 : Changements conformationnels de WASP.

Représentation schématique de WASP sous ses conformations auto-inhibée, activée et dimérisée. L'auto-inhibition de WASP résulte de l'interaction intramolécule entre ses domaines VCA et GDB. WIP stabilise WASP. Le Cdc42 lié au GTP entre en compétition avec le domaine VCA, pour le domaine GBD levant ainsi l'auto-inhibition de WASP et permettant au complexe Arp2/3 d'interagir avec le domaine VCA. WASP peut également être activé de manière Cdc42 indépendante par les kinases de la famille de Scr. Un complexe Arp2/3 va interagir avec 2 protéines WASP conduisant ainsi à leur dimérisation. L'activation du complexe Arp2/3 par WASP conduit à la nucléation de nouveaux filaments d'actine. *Adapté de (Thrasher and Burns, 2010).*

b) Expression et localisation de WASP dans les cellules hématopoïétiques

L'expression de WASP est restreinte aux cellules hématopoïétiques. Cette restriction est dépendante d'une région de 137 paires de bases située en aval du site d'initiation de la transcription (Petrella et al., 1998). Par fractionnement cellulaire, il a été montré que WASP

est très majoritairement exprimé dans le cytoplasme des cellules HL60, mais de manière non exclusive, puisque de faibles proportions de WASP ont également été observées dans les fractions membranaires et nucléaires (Rivero-Lezcano et al., 1995). De plus, une séquence de localisation nucléaire a été identifiée sur le gène WAS (Derry et al., 1994). L'expression nucléaire de WASP rappelle que la première fonction qui a été attribuée à la protéine est celle de facteur de transcription (Dingwall and Laskey, 1991). Puis, les études suivantes ont montré que WASP régulaient la polymérisation du cytosquelette d'actine dans le cytoplasme cellulaire et sa fonction nucléaire a quelque peu été omise (Symons et al., 1996). Par la suite, il a été montré que WASP avait également un rôle dans l'initiation de la transcription de NFAT et de la translocation de NFAT2 et de NF-kappaB indépendamment de son action sur la polymérisation de l'actine (Huang et al., 2005; Silvin et al., 2001). Ce n'est que très récemment que de nouveaux travaux ont montré que WASP était exprimé dans le noyau des lymphocytes CD4⁺ Th1 où il participe à la régulation du promoteur du gène *TBX21* (TBET) impliqué dans la différenciation Th1 (Taylor et al., 2010). Ce travail ouvre un grand champ d'investigation pour la découverte de nouvelles fonctions nucléaires pour WASP.

3. Le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS)

Le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) est une maladie génétique rare qui touche 1 à 10 naissance(s) sur 1 millions. Il est dû à des défauts du gène de la protéine WASP qui conduisent à l'absence de WASP dans toutes les cellules du système immunitaire (dont les lymphocytes T). Les patients atteints de WAS sont incapables de se protéger efficacement contre les infections virales, bactériennes ou fongiques et ont une susceptibilité au développement de cancers et de maladies auto-immunes augmentée. Sans traitement leur espérance de vie ne dépasse pas 3 ans. Les traitements prophylactiques améliorent légèrement leur qualité et leur espérance de vie mais ils ne représentent pas une solution thérapeutique. En revanche, la transplantation de moelle osseuse s'avère être le traitement de choix lorsqu'un donneur de moelle osseuse compatible est trouvé ou lorsqu'elle est réalisée au jeune âge. Pour les autres cas, la thérapie génique a été développée ces dernières années et est aujourd'hui en phase d'essai clinique. Les études pré-cliniques ainsi que les premiers résultats sont très prometteurs, mais un suivi à long terme des patients traités est nécessaire pour valider les bénéfices pour les patients.

L'importance de la fonction de WASP dans l'ensemble des cellules hématopoïétiques s'est révélée chez l'Homme par 3 maladies causées par des mutations dans le gène WAS : le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), la thrombopénie isolée liée au chromosome X (XLT ; X-linked thrombocytopenia) et la neutropénie congénitale sévère liée au chromosome X (XLN ; X-linked congénital neutropenia) (Devriendt et al., 2001; Zhu et al., 1995).

a) Historique de la découverte de WAS

WAS a été découvert en 1937 par un pédiatre allemand Alfred Wiskott (Wiskott 1937). Il a rapporté le cas de 3 frères présentant peu après leur naissance une thrombocytopénie, des diarrhées, de l'eczéma ainsi que des infections auriculaires récurrentes. Les 3 frères ont succombé très tôt aux hémorragies intestinales qui ont conduit au développement d'une septicémie. A cette époque, Alfred Wiskott avait identifié le caractère héréditaire de WAS et proposait pour origine à la maladie un dysfonctionnement des plaquettes sanguines. 70 ans plus tard, une étude a identifié la mutation génique probablement à l'origine de la maladie des 3 frères, en étudiant le génome de patients atteints de WAS dans leur descendance (Binder et al., 2006) (**Figure 13**). En 1954, Robert Aldrich établit le pedigree pour WAS d'une famille sur 6 générations et conclut que la maladie est récessive et transmise par le chromosome X (Aldrich et al., 1954).

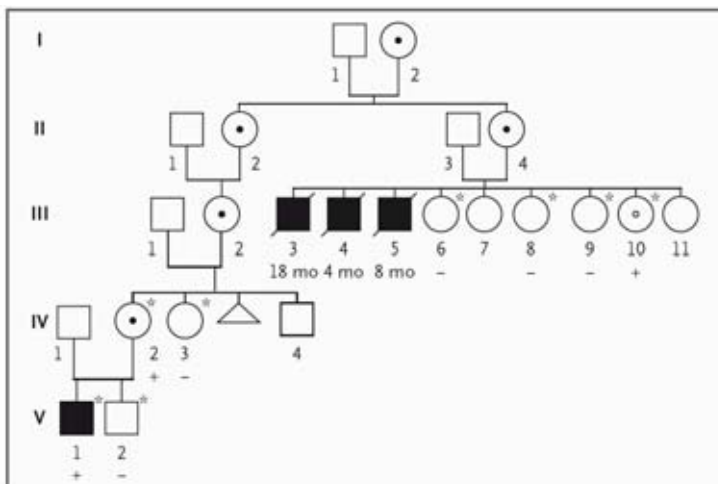


Figure 13 : Pedigree des 3 frères décrits par Wiskott en 1937.

Les symboles blancs et noirs représentent respectivement les membres de la famille non atteints et atteints par WAS. Les carrés représentent les hommes, les ronds les femmes. L'astérisque désigne les membres de la famille testés génétiquement pour la délétion 73-74AC sur le gène WAS. Les symboles + et - indique le résultat du test génétique. Les ronds contenant un point représentent les femmes obligatoirement porteuses de la délétion mais non testées génétiquement. Le triangle représente un fœtus avorté. L'âge du décès des 3 frères est indiqué. D'après (Binder et al., 2006).

b) Pathologies

► WAS :

Aujourd'hui, WAS (OMIM 301000) est définie comme une immunodéficience primaire, liée à des mutations dans WAS localisé sur le chromosome X. Ces mutations géniques conduisent à l'absence totale d'expression de WASP ou à l'expression d'une protéine tronquée dans l'ensemble des cellules hématopoïétiques des patients. L'incidence de la maladie est de 1 à 10 cas sur 1 million de naissances (Stray-Pedersen et al., 2000). WAS se caractérise par des hémorragies entraînées par une micro-trombocytopénie (plaquettes de petite taille en faible nombre), de l'eczéma, des diarrhées et des infections récurrentes causées par une

immunodéficience (Sullivan et al., 1994). Les patients présentent également une incidence accrue au développement de maladies auto-immunes et de cancers.

► XLT :

XLT (OMIM 313900) correspond à un phénotype atténué de la forme classique de WAS. Les mutations dans WAS conduisent à l'expression d'une protéine WASP mutée, non stable et par conséquent toujours faiblement exprimée. Les mutations conduisant au XLT sont très majoritairement des mutations non-sens (Zhu et al., 1997).

Les symptômes de XLT sont une thrombocytopénie congénitale, généralement sans présence d'eczéma et d'immunodéficience. L'incidence du développement de maladies auto-immunes et de cancers est très faible par rapport aux patients WAS (Albert et al., ; Canales and Mauer, 1967; Zhu et al., 1995). Plus récemment, des cas de XLT présentant une thrombocytopénie intermittente (iXLT) associée à une diminution de la taille des plaquettes ont été rapportés (Notarangelo et al., 2002).

► XLN :

XLN (OMIM 300299) est lié à des mutations gains de fonctions dans le gène WAS résultant en l'activation constitutive de WASP. Les principaux symptômes de XLN sont le développement d'infections bactériennes très rapidement après la naissance, un arrêt de la maturation myéloïde au stade promyélocyte/myélocyte, une apoptose prématurée des progéniteurs myéloïdes et un risque élevé de développer des leucémies. Plus récemment, il a également été démontré des problèmes d'activation et d'apoptose des lymphocytes T et B (Westerberg et al., 2010).

► Score clinique :

La sévérité de WAS, de XLT et de XLN peut être évaluée sur une échelle de 0 à 5 grâce à un système de score développé originellement par Zhu et al. et basé sur le développement ou non de symptômes caractéristiques (Imai et al., 2003; Zhu et al., 1997) (**Figure 14**). En 2004, sur une cohorte de 248 patients WAS/XLT, un score de 0 à 1 a été attribué à 4 patients présentant une XLT intermittente, un score de 1 à 33 patients, un score de 2 à 73 patients, un score de 3 à 29 patients, un score de 4 à 47 patients et un score de 5 à 53 patients (Jin et al., 2004).

Score	XLN 0	iXLT <1	XLT		Classic WAS		
			1	2	3	4	5
Thrombocytopenia	-	-/+	+	+	+	+	+
Small platelets	-	+	+	+	+	+	+
Eczema	-	-	-	(+)	+	++	-/(+)/+/++
Immunodeficiency	-/(+)	-	-/(+)	(+)	+	+	(+)/+
Infections	-/(+)	-	-	(+)	+	+/++	-/(+)/+/++
Autoimmunity and/or malignancy	-	-	-	-	-	-	+
Congenital neutropenia	+	-	-	-	-	-	-
Myelodysplasia	-/+	-	-	-	-	-	-

Figure 14 : Score clinique pour les patients XLN, iXLT, XLT et WAS.

Le système de score est basé sur le développement (+) ou non (-) des symptômes indiqués par les patients WAS, XLT et XLN. D'après (Albert et al., 2010)

► Corrélation Génotype-Phénotype :

Les mutations sur le gène *WAS*, l'expression de WASP ainsi que le phénotype de près de 400 patients WAS (280 patients), XLT (118 patients) et XLN (2 patients) d'origine américaine et européenne sont répertoriés et accessibles dans la base de données WASPbase datant de 2004 (Imai et al., 2003). Ces mutations couvrent l'ensemble du gène *WAS* bien que 5 régions où se concentrent un plus grand nombre de mutations aient été identifiées (Jin et al., 2004). Généralement, les mutations responsables de l'absence totale d'expression de WASP ou de l'expression d'une forme tronquée de la protéine conduisent au phénotype WAS alors que les mutations responsables de l'expression d'une protéine WASP de pleine taille mais en quantité réduite corrélerent avec le phénotype XLT (Imai et al., 2004; Imai et al., 2003; Jin et al., 2004). Sur les 280 patients atteints de WAS, 159 ont des mutations non-sens, des délétions ou des insertions avec décalage du cadre de lecture, 77 des mutations faux-sens et 44 des épissages alternatifs (Imai et al., 2003). Très récemment, les analyses d'une cohorte de 87 patients WAS originaire d'Europe centrale et d'Europe de l'est et d'une cohorte de 24 patients WAS chinois confirment la grande variabilité des types de mutations et de localisation sur le gène *WAS* (Gulacsy et al., 2011; Zhang et al., 2010). Les mutations gains de fonctions dans le domaine CRIB de *WAS* empêchent la protéine WASP d'établir sa conformation auto-inhibée et résultent donc en une activation constitutive de la protéine WASP. Ces mutations sont associées au XLN ou à des myélodysplasies (Ancliff et al., 2006; Beel et al., 2009).

► Mutations réverses :

Des mutations somatiques réverses ont été rapportées chez 10 % des patients WAS sans noter aucune corrélation avec le score clinique (Stewart et al., 2007). Ces mutations ont été observées majoritairement dans les lymphocytes T des patients mais également dans les lymphocytes B et les NK (Ariga et al., 1998; Boztug et al., 2007; Davis et al., 2008; Konno et al., 2004; Lutskiy et al., 2008; Trifari et al., 2010; Wada et al., 2004). Les mutations réverses

conduisent à la réexpression d'une protéine WASP et présentent un avantage sélectif pour les lymphocytes T et les NK mais pas pour les lymphocytes B. Néanmoins, une réexpression partielle de WASP dans les lymphocytes T et/ou les NK n'apparaît pas suffisante pour l'amélioration clinique des patients. Nous avons rapporté le cas d'un patient WAS présentant une mutation secondaire réverse conduisant à la réexpression de WASP (*Cf. Annexe 1*). Nous avons caractérisé cette nouvelle mutation et suivi ses effets fonctionnels et cliniques pendant plus de 18 ans (Trifari et al., 2010).

► Mutations WAS chez les femmes :

Les mutations récessives WAS sont héréditairement transmises par le chromosome X. Les femmes porteuses de mutations sur le gène WAS ne sont généralement pas atteintes de la maladie, car le chromosome X porteur de la mutation sera inactivé au profit de l'autre chromosome X (Fearon et al., 1988). Cependant, de très rares cas de femmes WAS/XLT ont été rapportés et sont liés à l'inactivation du chromosome sain (Andreu et al., 2003; Lutskiy et al., 2002). Lorsque qu'une mère est porteuse d'une mutation WAS, elle transmettra, statistiquement une fois sur deux, la mutation à ses enfants. Les fils qui hériteront de la mutation seront obligatoirement atteints de la maladie alors que les filles en seront porteuses. Les hommes atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich transmettront la maladie à leurs filles mais pas à leurs fils.

► Diagnostic :

Le clonage et le séquençage du gène WAS ont permis le développement d'outils moléculaires permettant de confirmer le diagnostic symptomatique des patients, d'identifier les femmes porteuses de mutations et de diagnostiquer les fœtus à risque. Ces techniques incluent le « screening » des lymphocytes pour l'expression de WASP par cytométrie de flux ou par Western-blot ainsi que le séquençage de l'ADN_c ou de l'ADN génomique pour les mutations dans le gène WAS.

c) Manifestations cliniques

► Hémorragies :

La majorité des patients WAS (80 %) développe des hémorragies plus ou moins sévères allant des épistaxis (saignements nasaux), des pétéchies (tâches rougeâtres cutanée) et des saignements buccaux pour les exemples les plus bénins jusqu'à des saignements intestinaux ou intracrâniens pour les exemples les plus sévères (Sullivan et al., 1994). 21 % des décès

chez les patients WAS sont dus à des hémorragies. Ces hémorragies ont pour origine la présence d'un nombre restreint de plaquettes de petite taille. Un seul cas de patient WAS présentant des plaquettes de taille normale a été rapporté (Patel et al., 2011). L'origine de la micro-thrombocytopenie n'est pas encore comprise. Le nombre de mégacaryocytes chez les patients s'est révélé normal (Haddad et al., 1999; Ochs et al., 1980). Etant donné que la splénectomie réalisée chez les patients WAS restaure en partie le nombre et la taille des plaquettes, un défaut dans la destruction des plaquettes est à considérer (Burns et al., 2004). L'augmentation de cette destruction pourrait être due à une exposition accrue des phosphatidylsérines à la surface des plaquettes WASP déficientes favorisant ainsi leur phagocytose par les macrophages présents dans la rate (Shcherbina et al., 1999). Il a été montré que le défaut d'exposition des phosphatidylsérines à la surface des plaquettes est lié à un défaut dans la signalisation « outside-in » des intégrines $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (Shcherbina et al., 2010). Il a également été démontré qu'en absence de WASP, les plaquettes murines sont plus sensibles à l'opsonisation ce qui favorise également leur phagocytose (Prislovsky et al., 2008). Une autre explication possible à l'augmentation de la destruction plaquettaire réside dans l'observation, chez la souris déficiente en WASP, d'auto-anticorps dirigés contre les plaquettes (Marathe et al., 2009).

► Eczéma :

Les lésions de la peau observées chez les patients WAS se rapprochent en apparence et en localisation à un eczéma atopique. 81 % des patients atteints de WAS développent de l'eczéma de manière transitoire ou chronique (Sullivan et al., 1994). Dans les cas les plus sévères, l'eczéma résiste aux thérapies et persiste à l'adolescence. L'eczéma facilite le développement d'infections opportunistes bactérienne, virale (virus de l'herpès simplex) ou fongique (*Molluscum contagiosum*). Bien que l'origine atopique de l'eczéma n'ai pas clairement été établie, le niveau élevé d'IgE mesuré chez les patients ainsi que le défaut de production de cytokines de type Th1 (favorisant la présence de cytokines de type Th2), soutiennent cette hypothèse (Imai et al., 2004; Taylor et al., 2010; Trifari et al., 2006).

► Infections récurrentes :

La majorité des patients WAS a connu des épisodes d'infections récurrentes auxquels elle peut succomber (Imai et al., 2004; Sullivan et al., 1994). Ces infections sont d'origines bactérienne, virale et fongique. Les infections bactériennes sont généralement dues à des bactéries encapsulées qui affectent l'appareil respiratoire (causant des otites et des

pneumonies), les intestins, la peau, le tractus urinaire ou le système nerveux central. Les infections virales sont majoritairement dues aux virus de l'herpès simplex, au cytomégalovirus, à l'Epstein-Barr virus et à un poxvirus causant un *Molluscum Contagiosum*. Les infections fongiques incluent les infections à *Candida*, *Aspergillus* et *Pneumocystis carinii*.

► Manifestations auto-immunes :

Le développement de maladies auto-immunes est fréquemment observé chez les patients WAS. En effet, il a été rapporté qu'entre 40 et 72 % des patients WAS européens et américains (US) et 20 % des patients WAS japonais développent des maladies auto-immunes (Dupuis-Girod et al., 2003; Imai et al., 2004; Sullivan et al., 1994). Les manifestations les plus courantes sont l'anémie hémolytique auto-immune, la vasculite cutanée, l'arthrite et les néphropathies. Moins couramment, des cas d'inflammation de l'intestin (IBD), de dermatomyosite, d'angioedème, de vasculite cérébrale, d'uvéite et de purpura thrombocytopénique idiopathique ont également été rapportés. Très fréquemment, les patients développent plusieurs manifestations auto-immunes en même temps (Dupuis-Girod et al., 2003). La prévalence au développement de maladies auto-immunes chez les patients WAS n'est pas clairement établie. Il a été proposé que les problèmes d'auto-immunité soient dus aux dommages tissulaires infligés par une inflammation chronique résultant de la clairance incomplète de pathogènes (Arkwright et al., 2002). Une autre explication au développement de maladies auto-immunes chez les patients WAS est la perte de tolérance périphérique au soi. En effet, il a été montré que les lymphocytes T régulateurs Foxp3⁺ WASP déficients présentent des défauts fonctionnels et de localisation (Adriani et al., 2007; Humblet-Baron et al., 2007; Maillard et al., 2007; Marangoni et al., 2007). Le développement de maladies auto-immunes est un facteur de risque au développement plus tardif de cancers (Sullivan et al., 1994).

► Cancers :

Le développement de cancers chez les patients WAS peut se déclencher dès l'enfance mais apparaît plus fréquemment à l'adolescence ou chez le jeune adulte. L'incidence rapportée est de 13 à 22 % des patients selon les études (Imai et al., 2004; Sullivan et al., 1994). Etant donné que l'espérance de vie des patients WAS augmente, il est raisonnable de penser que l'incidence des cancers risque également d'augmenter. Les cancers les plus répandus chez les patients WAS sont les lymphomes tel que : les myélodysplasies, les leucémies et les

lymphomes B, toujours EBV positif. L'immunodéficience semble être à l'origine du développement des lymphomes chez les patients.

d) Défauts cellulaires

WASP étant exprimée par toutes les cellules hématopoïétiques, l'ensemble des cellules du système immunitaire des patients WAS présente des défauts liés à la déficience en WASP. Les principaux défauts sont répertoriés ci-dessous et sont présentés sous forme de schéma en **Figure 15**. Une section plus détaillée sera dédiée à la description de l'impact de la déficience en WASP dans les différentes étapes de vie des lymphocytes T, décrite dans le premier chapitre.

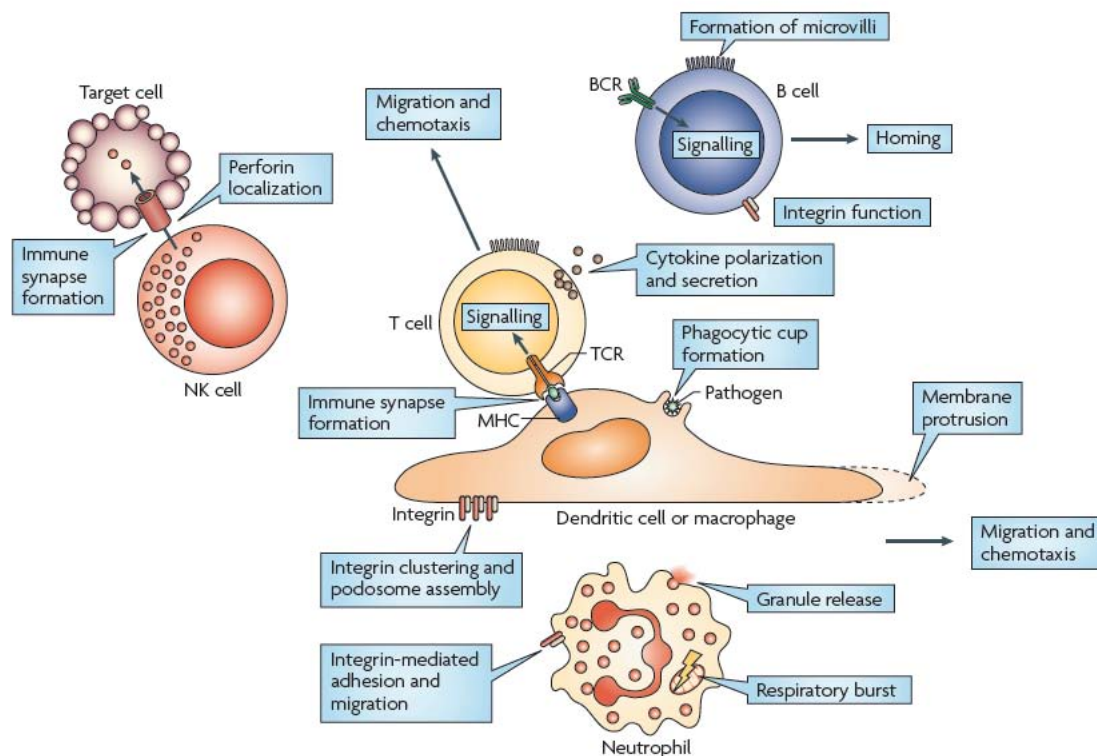


Figure 15 : Rôle de WASP dans les cellules du système immunitaire.

Représentation schématique des principales fonctions cellulaires affectées par la déficience en WASP dans les cellules de l'immunité innée (neutrophiles, NK, macrophages, cellules dendritiques) et de l'immunité adaptative (lymphocytes T et B). D'après (Thrasher and Burns, 2010)

► Cellules de l'immunité innée :

Les cellules du lignage myéloïde des patients WAS présentent des défauts de phagocytose liés à une incapacité à former les protrusions riches en actine et nécessaires à l'internalisation des pathogènes (Leverrier et al., 2001; Lorenzi et al., 2000; Tsuboi and Meerloo, 2007). Ces cellules ont également des défauts dans la formation des podosomes et du lamellipode requis

pour la migration cellulaire (Linder et al., 1999). Il en résulte que le chimiotactisme de ces cellules est affecté (Badolato et al., 1998; Binks et al., 1998; Zicha et al., 1998). En plus du défaut dans la formation de protrusions riches en actine, les cellules myéloïdes déficientes en WASP ont aussi une réponse aux intégrines anormale (Stabile et al., 2010; Zhang et al., 2006). En conséquence, ces cellules présentent des défauts d'adhésion, de migration mais aussi de dégranulation et de relargage de radicaux libres concernant les neutrophiles. Enfin, des défauts d'interactions cellulaires liés à une mauvaise organisation des synapses immunologiques ont également été décrits. Ceux-ci résultent en une activité cytotoxique réduite des cellules NK des patients WAS (Gismondi et al., 2004). Plus récemment, il a été montré chez la souris, que l'activation des lymphocytes T par des cellules dendritiques déficientes en WASP est également défectueuse (Bouma et al., 2011).

► Cellules de l'immunité adaptative :

Les lymphocytes B et T des patients WAS présentent également de nombreux défauts fonctionnels.

Les patients atteints de WAS ont un nombre réduit de **lymphocytes B** circulants, des défauts de formation des follicules B dans les organes lymphoïdes secondaires et une réponse anticorps perturbée (faible taux IgM et fort taux IgA et IgE). Plus particulièrement, la réponse humorale anti-polysaccharides qui ne nécessite pas l'aide des lymphocytes T est affectée chez les patients (Sullivan et al., 1994; Westerberg et al., 2005). Tout comme les cellules du lignage myéloïde, les lymphocytes B des patients WAS ont des défauts de migration, d'adhésion et d'interactions cellulaires (Westerberg et al., 2005). La formation de protrusions riches en actine s'avère également défectueuse (Andreu et al., 2007; Westerberg et al., 2001). En revanche, l'activation n'est pas diminuée par la déficience en WASP (Henriquez et al., 1994). Des résultats très récents montrent pour la première fois une légère augmentation de l'activation des lymphocytes B suite à la stimulation du BCR ou des TLR (Toll-Like Receptor), chez les souris déficientes pour WASP (Becker-Herman et al., 2011).

Les **lymphocytes T** des patients WAS présentent des défauts d'activation suite à l'engagement de leur TCR (Molina et al., 1993; Morales-Tirado et al., 2004). Les défauts d'activation sont plus marqués lorsque le TCR est stimulé par des anticorps anti-CD3 plutôt que par son engagement avec les complexes CMH-peptide exprimés à la surface des cellules présentatrices de l'antigène (De Meester et al., 2010). Ils peuvent être contrecarrés en augmentant la concentration en antigène ainsi que la force de la costimulation *in vitro*

(Cannon and Burkhardt, 2004). Ces défauts d'activation se traduisent par une diminution de la prolifération et de la sécrétion de cytokines (De Meester et al., 2010; Trifari et al., 2006). Alors qu'une étude montre un défaut de sécrétion restreint aux cytokines de type de Th1 chez les patients WAS, une seconde étude révèle des défauts de type Th2 chez la souris WASP déficiente (Morales-Tirado et al., 2009; Trifari et al., 2006). L'hypo-activation lymphocytaire est à relier à un défaut de formation de la synapse immunologique avec les cellules présentatrices de l'antigène (Cannon and Burkhardt, 2004). En absence de WASP, la formation et le recrutement des rafts lipidiques à la synapse immunologique sont compromis (Dupre et al., 2002). Au niveau signalétique, des défauts de translocation du facteur de transcription NFAT et d'induction de T-bet ont été décrits (Cianferoni et al., 2005; Trifari et al., 2006). Outre son rôle dans l'activation lymphocytaire, il a été montré que WASP est impliqué dans la migration des lymphocytes T humains, dirigée par la chimiokine CXCL12 (Haddad et al., 2001). En revanche, WASP ne serait pas impliqué dans la migration des lymphocytes T murins vers la chimiokine CXCL12 *in vitro*, mais serait nécessaire pour l'entrée dans les organes lymphoïdes secondaires (Blundell et al., 2008; Gallego et al., 2006; Snapper et al., 2005). La morphologie des lymphocytes T de patients est très hétérogène : certaines cellules sont anormalement allongées, d'autres ont une morphologie proéminente (Gallego et al., 1997; Kenney et al., 1986). De plus, des cellules sont dépourvues de protrusions membranaires alors qu'à la surface d'autres cellules les protrusions sont protubérantes. Au contact d'anticorps anti-CD3, les lymphocytes T de patients ne sont pas capables de s'étaler et apparaissent anormalement allongés formant des uropodes plutôt que des pseudopodes. Des protrusions membranaires anormales ont aussi été observées à la surface des lymphocytes T murins WASP déficients après stimulation par la chimiokine CXCL12 (Gallego et al., 2006). En effet, en absence de WASP, une proportion de cellules polarise l'actine à 2 pôles ou plus de la cellule plutôt que de former un front cellulaire unique enrichi en actine. L'adhésion des lymphocytes T aux anticorps anti-CD3, à la fibronectine ou aux sélectines n'est pas affectée par la déficience en WASP chez la souris (Gallego et al., 2006) et chez l'Homme (Sara Trifari, résultats non publiés). Une réduction du nombre de lymphocytes T circulant a également été rapportée chez les patients WAS (Park et al., 2004). Ceci peut s'expliquer par l'augmentation de l'apoptose spontanée des lymphocytes T déficients en WASP en comparaison à celle de donneurs sains, observée *in vitro* (Rawlings et al., 1999; Rengan et al., 2000). Le développement thymique n'apparaît que faiblement affecté par la déficience en WASP. Les patients WAS ne présentent pas de défauts de diversité du répertoire V β jusqu'à l'âge de 15 ans en moyenne puis celui-ci se restreint en comparaison à

celui de donneurs sains du même âge (Wada et al., 2005). En accord avec ces résultats, le développement thymique de souris déficientes en WASP apparaît relativement normal (Marangoni et al., 2007). Cependant une autre étude a observé un défaut de développement thymique au stade DN3 chez la souris WASP déficiente (Zhang et al., 1999). Une seconde étude a observé des défauts similaires chez les souris déficientes en WASP mais seulement lorsque les souris étaient aussi déficientes pour N-WASP (Cotta-de-Almeida et al., 2007). Concernant les lymphocytes T régulateurs, des défauts d'activation et d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T effecteurs ont été décrits en absence de WASP à la fois chez la souris et chez l'Homme (Cotta-de-Almeida et al., 2007; Marangoni et al., 2007). Dans la circulation, leur nombre est également réduit (Humblet-Baron et al., 2007; Maillard et al., 2007).

e) Thérapie

► Traitements prophylactiques :

Sans aucun traitement, l'espérance de vie des patients atteints de WAS est très faible. En effet, les 19 patients WAS rapportés par Wiskott et Aldrich n'ont pas atteint l'âge de 3 ans (Aldrich et al., 1954). Depuis plus de 25 ans, une grande variété de traitements prophylactiques a été proposée aux patients dans le but d'améliorer leur espérance et leur qualité de vie. L'efficacité de ces traitements s'est avérée meilleure lorsque le diagnostic était établi tôt. Etant donné que la réponse anticorps des patients souffrant de WAS est défectueuse, une immunoglobulinothérapie est proposée à certains patients. Celle-ci ne permet pas d'augmenter le taux de plaquettes des patients, mais elle permet de diminuer les inflammations et par conséquent le risque de septicémie (Mathew and Conley, 1995). En cas d'infections, des examens bactériologique, viral et fongique rapides sont nécessaires afin d'administrer au patient les traitements anti-microbiens adéquats. Alors que la vaccination avec des vaccins atténués peut être préconisée, la vaccination avec des vaccins vivants n'est pas recommandée chez les patients. Contre l'eczéma, des stéroïdes peuvent être administrés. Les manifestations auto-immunes, souvent liées à une auto-réactivité des cellules B, peuvent être traitées par l'administration de rituximab (anticorps anti-CD20). En cas d'hémorragie sévère, des transfusions sanguines de produits préalablement irradiés, CMV-négatifs et si possible HLA-compatibles sont réalisées. D'autre part, la splenectomie s'avère efficace pour augmenter le nombre de plaquettes sanguines et diminuer les désordres hémorragiques, néanmoins elle augmente le risque de septicémie (Lum et al, 1980; Mullen et al, 1993;

Litzman et al, 1996). Très récemment, le cas d'un patient âgé de 24 ans et ayant subi une splénectomie à l'âge de 9 ans a été rapporté (Syrigos et al., 2011). Ce patient est asymptomatique et présente un taux de plaquettes stable. Sous traitement antibiotique prophylactique, le patient n'a connu aucun épisode d'hémorragie ou de septicémie. L'exemple de ce patient montre que la splénectomie, suivi d'un traitement prophylactique de longue durée, peut représenter une solution thérapeutique pour certains patients WAS.

► Transplantation de moelle osseuse :

La première transplantation de moelle osseuse a été réalisée en 1968 pour traiter avec succès un patient SCID (Severe Combined Immunodeficiency Diseases) puis pratiquement simultanément pour traiter un patient WAS (Bach et al., 1968; Gatti et al., 1968; Good, 1987). A l'heure actuelle, la transplantation de cellules souches hématopoïétiques est le seul traitement thérapeutique pour les patients WAS. Lorsqu'elle est réalisée avec la moelle osseuse d'un donneur HLA (Human Leukocyte Antigen) identique, son taux de survie moyen à 5 ans est de 87 % (Filipovich et al., 2001). Cependant pour de nombreux patients des dons de moelle osseuse HLA identique ne sont pas disponibles. La transplantation peut alors être réalisée avec des donneurs HLA alternatifs : les taux de survie moyen à 5 ans atteignent 52 % avec des donneurs HLA apparentés au patient et 70 % avec des donneurs HLA non apparentés au patient. Le pourcentage de greffe survivant à 5 ans est augmenté lorsque la transplantation est réalisée avant l'âge de 5 ans et atteint alors 84 % avec des donneurs HLA non apparentés. Cependant, dans le cas des transplantations HLA non identique, les risques de développer un syndrome lymphoprolifératif EBV positif, des infections, des maladies auto-immunes et une maladie du greffon contre l'hôte sont largement augmentés. Lorsque la transplantation est établie avec succès, 73 % des patients ayant reçu une moelle osseuse HLA identique ou HLA non identique provenant d'un donneur non apparenté sont guéris et 20 à 27 % des patients voient leur score clinique s'améliorer. Des rétrospectives plus récentes de patients WAS ayant reçu une transplantation de moelle osseuse ou de sang de cordon ont confirmé ces résultats (Kobayashi et al., 2006; Munoz et al., 2007). Face à l'efficacité avérée de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques HLA identique pour les patients WAS et à l'indisponibilité de donneurs HLA identique pour l'ensemble des patients, la transplantation de cellules souches hématopoïétiques autologues corrigées génétiquement est apparue comme la solution à privilégier pour le futur.

► Thérapie génique :

Ces dernières années de nombreux efforts ont été fournis pour le développement de la thérapie génique pour WAS. Par rapport à la transplantation de moelle osseuse, la thérapie génique représenterait une possibilité de traitement pour les patients WAS n'ayant pas de donneurs de moelle osseuse HLA compatibles. De plus, elle permettrait d'éviter le développement de la maladie du greffon contre l'hôte mais aussi l'administration de traitements immunosuppresseurs.

En plus de l'efficacité prouvée de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques pour guérir WAS, les études de cas cliniques soutiennent la pertinence du développement de la thérapie génique pour cette maladie. En effet, par rapport aux patients WAS (qui n'expriment pas WASP), les patients XLT (qui expriment en faible quantité WASP) ont un déficit immunologique moindre. Ceci suggère qu'un faible niveau de correction serait d'un point de vue thérapeutique efficace. De plus, les exemples de mutations spontanées secondaires chez les patients WAS ont montré que WASP conférait un avantage sélectif aux lymphocytes (Konno et al., 2004; Trifari et al., 2010).

Les premiers essais :

Un vecteur dérivé du virus leucémique murin Moloney (MMLV) a été utilisé dans les premiers essais de thérapie génique afin de transférer le gène thérapeutique WAS (Dewey et al., 2006). Le MLV appartient à la famille des rétrovirus qui regroupe des virus à ARN enveloppés. Les rétrovirus expriment la rétrotranscriptase qui leur permet de synthétiser à partir du génome ARN, l'ADN. L'ADN viral s'intègre alors à l'ADN de la cellule infectée et pourra ainsi être transmis aux cellules filles. Le génome des rétrovirus comprend 3 phases ouvertes de lecture *gag*, *pol* et *env* codant pour les protéines de structure et de réplication. En plus des séquences codantes, le génome des rétrovirus contient des séquences LTR (Long Terminal Repeat), des signaux d'initiation et de terminaison de la transcription, une séquence d'encapsidation ψ , une séquence PBS (Primer Binding Site), les PPT (PolyPurine Tract) et les CTS (Central Termination Sequence). Plus précisément, le vecteur utilisé dans le premier essai de thérapie génique pour WAS a été construit de la façon suivante : l'ADNc codant pour WASP a été cloné dans le vecteur CMMP et GALV a été utilisé comme pseudotype d'enveloppe (Dewey et al., 2006). Le vecteur CMMP dérive du MMLV, par substitution des régions LTR du MMLV par celles du MPSV (MyeloProliferative Sarcoma Virus) à l'exception de la région U3 du 5'LTR du MPSV qui a été remplacée par la région promotrice

IE (Immediate Early) du CMV. Ces modifications permettent d'augmenter l'expression du transgène.

Le premier essai de thérapie génique incluant 10 patients WAS a été mené en Allemagne. Cet essai consistait à transfuser aux patients des cellules souches hématopoïétiques autologues corrigées par le vecteur de thérapie génique. Récemment, une rétrospective à 2 ans et demi de ce premier essai a rapporté les résultats des 2 premiers patients traités (Boztug et al., 2010). Les auteurs ont observé une bonne correction de l'expression de WASP dans les cellules souches hématopoïétiques, dans les plaquettes et dans les cellules lymphoïdes et myéloïdes. Les lymphocytes T, B et NK ainsi que les monocytes étaient fonctionnellement corrigés. Après le traitement, les patients ont vu leur état clinique s'améliorer avec une résolution des problèmes hémorragiques et des désordres auto-immuns. De plus, la fréquence et la sévérité des infections avaient diminué. Un des deux patients a montré une amélioration de son eczéma. Bien que le taux d'immunoglobulines mesuré chez les patients n'ait été que partiellement amélioré, la vaccination contre le tétanos, la diphtérie et l'hémophilie a été un succès. Les auteurs de ce rapport ont également montré que le vecteur de thérapie génique s'était intégré à de multiples endroits dans le génome ; préférentiellement à proximité des sites d'initiation de la transcription et au niveau des régions codantes. Une analyse informatique plus poussée (utilisation de l'outil : Inguenuity pathway analyses) montre que le vecteur de thérapie génique cible des gènes impliqués dans le développement, la prolifération et la croissance cellulaire ainsi que dans les réponses immunes et auto-immunes. Malgré les premiers résultats très encourageants, ce premier essai de thérapie génique a dû être stoppé à cause de la génotoxicité du vecteur. En effet, il a été révélé que l'un des patients avait développé une leucémie induite par l'insertion du vecteur au niveau du locus LMO2. Plusieurs cas de leucémies induites par des rétrovirus ont été précédemment rapportés chez des patients SCID et CGD (Chronic Granulomatous Disease) traités par thérapie génique (Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Howe et al., 2008; Ott et al., 2006). L'utilisation de rétrovirus codant pour un transgène sous le contrôle des LTR viraux en thérapie génique a prouvé l'efficacité de cette approche pour traiter les immunodéficiences primaires. Des progrès doivent désormais être réalisés en vectorologie pour développer des vecteurs de thérapie génique plus sûrs en limitant la transactivation génique et/ou en contrôlant l'insertion du transgène dans le génome.

Développement de nouveaux vecteurs :

Les lentivirus sont moins génotoxiques que les gammaretrovirus (Montini et al., 2006). Ces rétrovirus possèdent en plus des séquences *gag*, *pol* et *env*, des gènes de régulation (*tat* et *Rev*) et des gènes accessoires (*nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*). Des vecteurs de thérapie génique pour WASP ont été développés à partir d'un vecteur lentiviral dérivé du HIV-1 et codant pour 2 copies de l'ADNc de WASP sous le contrôle du promoteur endogène de WAS : w1.6W (Dupre et al., 2004; Galy et al., 2008). Les gènes de régulation et accessoires : *tat*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu* du lentivirus HIV-1 ont été délétés et la glycoprotéine du VSVg a été choisie pour pseudotype d'enveloppe. Les séquences enhancers et promotrices du vecteur lentiviral ont été délétés de manière à avoir un promoteur unique endogène pour WAS. Outre, la réduction du risque d'activation oncogénique, cette technologie (appelée SIN : Self-INactivating) présente l'avantage d'une régulation de WAS plus physiologique. Enfin, une séquence WPRE (Woodchuck Post transcriptional Regulatory Element) a été ajoutée à la construction afin d'augmenter l'expression du transgène.

Il a tout d'abord été démontré *in vitro* que le lentivirus généré restaure efficacement l'expression de WASP dans les cellules souches hématopoïétiques, les lymphocytes T et B et les cellules dendritiques de patients WAS (Charrier et al., 2007; Dupre et al., 2004). Puis, des études *in vivo* réalisées sur 2 souches de souris déficientes en WASP différentes ont montré une restauration à long terme de l'expression de WASP dans les cellules hématopoïétiques ainsi que la correction des fonctions des lymphocytes T et B (Dupre et al., 2006; Marangoni et al., 2009). Très récemment, une étude a également souligné une amélioration des fonctions des cellules dendritiques murines déficientes en WASP par le vecteur de thérapie génique (Catucci et al.). Les études à long terme n'ont pas révélé de génotoxicité pour le lentivirus utilisé (Marangoni et al., 2009). En effet, le profil d'insertion génomique du vecteur est apparu conforme au profil attendu pour les lentivirus et aucune évidence de mutagénèse insertionnelle n'a été observée *in vitro* et *in vivo* (Mantovani et al., 2009; Marangoni et al., 2009; Modlich et al., 2009).

La preuve de concept étant établie, les premiers essais en phase I/II de thérapie génique basés sur l'utilisation du vecteur lentiviral de 3^{ème} génération ont débuté à la fin de l'année 2009 à Londres, puis en parallèle à Paris et à Milan en 2010 ainsi qu'à Boston en 2011 (Galy and Thrasher, 2011).

Une alternative à l'utilisation des lentivirus dérivés du HIV-1 comme vecteur de thérapie génique réside dans l'emploi de vecteurs dérivés du foamy virus. Le foamy virus simien

présente l'avantage de ne pas être pathogène pour l'homme et son intégration dans le génome des primates n'a pas été associée à des oncogènes (Falcone et al., 2003; Heneine et al., 2003). Très récemment, un vecteur de transfert génique de WASP dérivé du foamy virus a été développé. Les souris déficientes en WASP ayant reçu des cellules souches hématopoïétiques préalablement corrigées par le vecteur développé, présentent une restauration de l'expression de WASP dans les lymphocytes T et B, les plaquettes et les cellules dendritiques. De plus, il a été montré que les fonctions de ces cellules étaient restaurées. L'analyse des sites d'intégration du vecteur a montré une faible préférence d'insertion aux sites d'initiation de la transcription (~ 35 %) et une faible incidence de l'intégration à proximité des oncogènes (5%) par rapport aux vecteurs gamma-rétroviraux et aux lentiviraux (Uchiyama et al., 2012).

OBJECTIFS DU TRAVAIL

La mise en place de la réponse immunitaire adaptative est contrôlée par les lymphocytes T CD4⁺. Ces cellules circulent dans l'organisme entre leur site de production, le thymus ; leur site d'activation, les organes lymphoïdes secondaires et les sites où elles exerceront leurs fonctions effectrices qui sont les organes lymphoïdes secondaires et le lieu de l'infection. C'est l'incroyable plasticité du cytosquelette d'actine qui permet aux lymphocytes T de migrer d'un site à l'autre, de pénétrer des tissus denses, de rencontrer et d'établir des interactions plus ou moins stables avec leurs partenaires cellulaires. Dans le passé, le rôle majeur du cytosquelette d'actine des lymphocytes T a clairement été établi dans les fonctions de migration ainsi qu'à la synapse immunologique. Cependant, de manière paradoxale, le rôle du cytosquelette d'actine a majoritairement été étudié dans des situations figées. **L'objectif de ce travail était de définir le rôle du cytosquelette d'actine sur la mobilité des lymphocytes T en dynamique.** Notre modèle d'étude a été la déficience en un régulateur majeur du cytosquelette d'actine des lymphocytes T : la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP). L'implication de cette protéine sur la mobilité des lymphocytes T a également été étudiée par le passé, mais uniquement dans des systèmes figés. **Ce travail permettra aussi de mieux comprendre le rôle de WASP en dynamique.** La déficience en WASP conduit au syndrome de Wiskott-Aldrich dont le tableau clinique sévère souligne l'importance de la protéine dans le contrôle de la réponse immunitaire. **L'objectif secondaire de ce projet était de mieux déchiffrer la physiopathologie de WAS et plus particulièrement de tenter d'apporter des explications au co-développement paradoxal d'immunodéficiência (infections récurrentes, cancers) et d'exacerbation de la réponse immunitaire (auto-immunité) observé chez les patients.**

RESULTATS

WASP Controls APC-Driven CD4⁺ T Cell Motility by Regulating Adhesion to ICAM-1

Fanny Lafouresse, Vinicius Cotta-de-Almeida, Gema Malet-Engra, Anne Galy,
Salvatore Valitutti, and Loïc Dupré

IMMUNOLOGY, accepté pour publication

La mobilité des lymphocytes T dans l'organisme est permise par la formation d'un front cellulaire dont la dynamique est soutenue par une réorganisation continue des filaments d'actine. Le rôle du régulateur du cytosquelette d'actine, WASP, dans la migration des lymphocytes T dirigée par les chimiokines est controversé. D'autre part son implication dans la mobilité induite par les cellules présentatrices de l'antigène non chargées en antigène exogène n'a jamais été étudiée.

L'objectif de ce travail était donc de déterminer le rôle de WASP sur la mobilité des lymphocytes T au contact de cellules présentatrices de l'antigène en condition de non infection.

Pour réaliser cette étude, nous avons produit des lignées de lymphocytes T CD4⁺ primaires pour lesquelles l'expression de WASP a été inhibée par transduction avec un shRNA ciblant WASP. En contrôle, les lymphocytes T CD4⁺ ont été transduits avec un shRNA codant pour une séquence identique en nucléotides à celle ciblant WASP mais assemblée dans le désordre. Ce modèle d'étude présente l'avantage, par rapport aux lymphocytes T de patients WAS, de prévenir les effets secondaires d'une réponse immunitaire non contrôlée, liés à l'absence de WASP. De plus, il nous a permis d'étudier la rencontre des lymphocytes T avec des cellules présentatrices de l'antigène autologues.

De manière très surprenante, nous avons montré qu'en absence de WASP, les lymphocytes T CD4⁺ ont une mobilité exacerbée au contact des cellules présentatrices de l'antigène. En effet, leur vitesse moyenne de migration est augmentée. Nous avons montré que cette augmentation est due à une réduction de la durée des phases d'arrêt de migration des lymphocytes T déficients pour WASP. En effet, au contact des cellules présentatrices de l'antigène, une plus grande proportion de lymphocytes T conserve une morphologie allongée nécessaire à la migration et s'arrondit moins fréquemment pour stopper la migration et interagir avec leurs partenaires.

Nous avons ensuite montré que l'exacerbation de la mobilité des lymphocytes T n'était pas liée à une réponse anormale aux chimiokines mais qu'elle était due à une augmentation du pourcentage de lymphocytes T capables d'adhérer, de s'allonger et de migrer en réponse à la stimulation de LFA-1 par ICAM-1. Moléculairement, ces défauts sont attribués à une distribution cellulaire de la forme de forte affinité de LFA-1 anormale.

En conséquence de cet excès de mobilité, nous avons observé un maintien favorisé de la survie homéostatique des lymphocytes T en absence de WASP, ainsi qu'une augmentation du seuil de détection des antigènes exogènes présentés par les cellules présentatrices de l'antigène.

Finalement nos résultats indiquent que WASP agit comme un frein sur la mobilité des lymphocytes T CD4⁺ au contact des cellules présentatrices de l'antigène pour permettre une interaction optimale avec ces cellules dans le contexte de la rencontre avec le soi.

Wiskott–Aldrich syndrome protein controls antigen-presenting cell-driven CD4⁺ T-cell motility by regulating adhesion to intercellular adhesion molecule-1

Fanny Lafouresse,^{1,2,3} Vinicius Cotta-de-Almeida,⁴ Gema Malet-Engra,^{1,2,3} Anne Galy,⁵ Salvatore Valitutti^{1,2,3} and Loïc Dupré^{1,2,3}

¹INSERM, U1043, ²Université Toulouse III Paul-Sabatier, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, ³CNRS, U5282, Toulouse, France, ⁴Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil and ⁵INSERM, U951, Génomex, Evry, France

doi:10.1111/j.1365-2567.2012.03620.x

Received 17 February 2012; revised 21 June 2012; accepted 28 June 2012.

Correspondence: Loïc Dupré, INSERM U1043, Purpan University Hospital, 31300 Toulouse, France.

Email: loic.dupre@inserm.fr

Senior author: Loïc Dupré

Summary

T-cell scanning for antigen-presenting cells (APC) is a finely tuned process. Whereas non-cognate APC trigger T-cell motility via chemokines and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), cognate APC deliver a stop signal resulting from antigen recognition. We tested *in vitro* the contribution of the actin cytoskeleton regulator Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP) to the scanning activity of primary human CD4⁺ T cells. WASP knock-down resulted in increased T-cell motility upon encounter with non-cognate dendritic cells or B cells and reduced capacity to stop following antigen recognition. The high motility of WASP-deficient T cells was accompanied by a diminished ability to round up and to stabilize pauses. WASP-deficient T cells migrated in a normal proportion towards CXCL12, CCL19 and CCL21, but displayed an increased adhesion and elongation on ICAM-1. The elongated morphology of WASP-deficient T cells was related to a reduced confinement of high-affinity lymphocyte function-associated antigen 1 to the mid-cell zone. Our data therefore indicate that WASP controls CD4⁺ T-cell motility upon APC encounter by regulating lymphocyte function-associated antigen 1 spatial distribution.

Keywords: antigen-presenting cell scanning; lymphocyte function-associated antigen 1; T-cell motility; Wiskott–Aldrich syndrome protein.

Introduction

Efficacious and controlled adaptive immune responses depend on fine tuning of the motility behaviour of T cells, during their search for antigen-presenting cells (APC) in lymphoid organs and peripheral tissues.¹ Intravital microscopy analysis has revealed that, in the absence of antigen, T cells crawl in an amoeboid manner within lymph nodes, cycling between highly motile and non-motile states.² In the presence of antigen, the recognition of cognate APC by the engagement of the T-cell receptor delivers a stop signal through lymphocyte-function-associated antigen 1 (LFA-1) -driven adhesion strengthening.³ This allows sustained T-cell/APC interactions to take place⁴ in the form of immunological synapses that will orchestrate the antigenic activation.^{5,6} Although T-cell

motility during scanning may appear as a random behaviour, it is controlled by adhesive and chemotactic signals provided by both cellular and extracellular components of the tissue environment.⁷ In addition to the fibroblastic reticular cell network that guides T-cell trajectories,⁸ APC themselves are key regulators of T-cell motility. Indeed, non-cognate APC trigger T-cell motility, a step required for efficient exploration of cognate APC.⁹ Moreover, non-cognate dendritic cells (DC) presenting self-antigen deliver homeostatic signals to CD4⁺ T cells that promote survival and increase responsiveness to subsequent encounters with cognate APC.^{10–12} The DC-driven CD4⁺ T-cell motility can be recapitulated *in vitro* with speed and motility behaviour comparable to those observed in lymph nodes.^{4,13} Experiments *in vitro* have shown that intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and chemo-

Abbreviations: shRNA short hairpin RNA; WAS Wiskott–Aldrich syndrome; WASP Wiskott–Aldrich syndrome protein; iDC immature dendritic cells

F. Lafouresse *et al.*

kines produced by immature DC (iDC) are responsible for the induction of T-cell motility.¹³

Although the motility signals delivered by APC contribute to setting the pulse to CD4⁺ T-cell scanning, it remains to be investigated which molecules integrate these signals from the T-cell side. Actin cytoskeleton remodelling proteins are known to be of central importance for the control of T-cell motility in response to chemokines and in complex tissue environments.¹⁴ A regulator of actin cytoskeleton in haematopoietic cells is the Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP), which deficiency causes the Wiskott–Aldrich syndrome (WAS). A combination of defects affecting T-cell activation is believed to contribute to the abnormal immune responses accounting for the high susceptibility of WAS patients to develop infections, malignancies and autoimmune disorders. In the context of WAS, T-cell encounter with APC may be reduced or delayed because WASP has been reported to regulate T-cell chemotaxis¹⁵ and homing to secondary lymphoid organs.^{16,17} Furthermore, upon encounter with cognate APC, WASP appears to tune T-cell activation by regulating immunological synapse assembly through local actin polymerization.^{18–20} Recent studies based on live imaging have further defined the role of WASP as a molecule promoting symmetry and focused T-cell receptor engagement at the immunological synapse.^{21,22}

Given the evidence of a functional contribution of WASP to T-cell migration and immunological synapse dynamics, we investigated whether WASP could regulate T-cell scanning. In particular, we focused on the phase of T-cell motility driven by non-cognate APC. Primary human CD4⁺ T cells in which WASP was knocked-down with a short hairpin RNA (shRNA) -encoding lentiviral vector elongated abnormally and displayed a reduced propensity to pause at the contact with autologous iDC. The abnormal scanning behaviour of WASP-deficient T cells was linked to a spatial dispersion of high-affinity LFA-1. Our study therefore unravels a new role of WASP as a brake that controls T-cell motility during APC scanning.

Materials and methods

Cell lines

Blood samples from patients with WAS and healthy donors were obtained following standard ethical procedures and as per French Bioethics law and with the approval of the local ethics committee. Patients WAS₁ and WAS₂ were reported by Calvez *et al.*²² and are known to have defective WASP expression. Patient WAS₄ was reported by Trifari *et al.*²³ and is known to express WASP in half of his CD4⁺ T cells as a result of spontaneous corrective mutation. CD4⁺ T cells were directly

isolated from the blood of healthy donors by negative depletion using Rosette Sep (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Vβ₂⁺ CD4⁺ T cells were then positively selected by incubating the CD4⁺ T cells with a phycoerythrin (PE) -labelled anti-T-cell receptor Vβ₂ monoclonal antibody (mAb; Beckman Coulter, Fullerton, CA) followed by magnetic sorting (StemCell Technologies). Freshly isolated Vβ₂⁺ CD4⁺ T cells were expanded with anti-CD3/CD28-coated Dynabeads (Invitrogen, Carlsbad, CA) in RPMI-1640 containing 5% human serum and 100 U/ml interleukin-2. The Vβ₂⁺ CD4⁺ T cell lines were restimulated as described above every 19–21 days. Vβ₂⁺ CD4⁺ T cells from a WAS patient and a control healthy donor were generated as previously described.²² The Vβ₂⁺ CD4⁺ T cells were used for functional assays when they had regained a resting state (14–21 days after activation). Epstein–Barr virus-transformed B cells (JY cell line) were cultured in complete medium (RPMI-1640 containing 10% fetal calf serum). CD14⁺ cells were obtained by positive magnetic cell purification (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and differentiated into iDC by a 6-day culture in complete medium supplemented with interleukin-4 and granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (R&D Systems, Minneapolis, MN). The phenotype of the different cell types was assessed by FACS analysis (FACSCalibur; BD Biosciences, San Jose, CA) using PE-labelled anti-TCRVβ₂ mAb (Beckman Coulter), PE-CY5-labelled anti-CD4 mAb, FITC-labelled anti-CD14 mAb, PE-Cy5-labelled anti-CD11c mAb, FITC-labelled anti-HLA-DR, DP, DQ mAb, PE-labelled anti-CD83 mAb and FITC-labelled anti-CD86 mAb (all from BD Biosciences). Results were analysed with the FLOWJO software (Tree Star, Ashland, OR). Purity of Vβ₂⁺ CD4⁺ T cells and iDC was routinely between 95 and 99%.

Transduction with shRNA-encoding lentiviral vectors

At day 3 after stimulation with anti-CD3/CD28-coated beads, Vβ₂⁺ CD4⁺ T cells were transduced with previously optimized lentiviral vectors encoding green fluorescent protein (GFP) and two copies of the shRNA sequences targeting WAS or an irrelevant control (scramble).²⁴ Transduction was performed at a multiplicity of infection of 30 over 6 h in RPMI-1640 containing 5% human serum, interleukin-2 (100 U/ml) and polybrene (4 μg/ml). At day 10 after transduction, GFP-positive CD4⁺ T cells were sorted on a FACSAria II sorter (BD Biosciences). Transduced cells were analysed for GFP and WASP expression by FACS. Cells were fixed/permeabilized, labelled with anti-WASP mAb (5A5; BD Biosciences) followed by A647-labelled GAM-IgG2a mAb (Invitrogen) and subsequently acquired on a FACSCalibur cytometer and analysed using the FLOWJO software. The inhibition of WASP expression was

assessed in parallel by Western blot, as previously described.²² Proliferation of transduced T cells was measured by liquid scintillation counting of [³H]thymidine incorporation following stimulation for 72 hr with immobilized anti-CD3 mAb (OKT3; ebiosciences, San Diego, CA).

Expression analysis of chemokines, chemokine receptors and ICAM-1/LFA-1

The JY cells and iDC were fixed with 1% paraformaldehyde, then stained with anti-CXCL12 mAb (K15C, kindly provided by F. Arenzana-Seisdedos) or an anti-CCL19 mAb (R&D systems) followed by A488-labelled GAM IgG2a or A488-labelled GAM IgG2b mAb, respectively (Invitrogen) or with PE-labelled anti-ICAM-1 Ab (BD Biosciences). CD4⁺ T cells were incubated with PE-labelled anti-CXCR4 antibody or with an A647-labelled anti-CCR7 antibody (both from BD Pharmingen, San Jose, CA). Expression of LFA-1 conformation was measured by a 5-min incubation with the following antibodies: HI111 (Biolegend, San Diego, CA), KIM127 (kindly provided by N. Hogg), 24 (Abcam, Cambridge, UK), then incubated for an additional 5 min with 1 µg/ml CXCL12 (Peprotech, London, UK), washed and incubated with A647-labelled anti-IGg1 mAb (Invitrogen). All samples were subsequently acquired on a FACScan or FACSCalibur cytometer (BD Biosciences) and analysed using the FlowJo software.

Survival assay

Vβ₂⁺ CD4⁺ T cells (1 × 10⁵) were cultured alone or in the presence of iDC (0.5 × 10⁵) in serum-free medium. After 2, 4 and 6 days of culture, cells were harvested and stained with 7-AAD (BD Biosciences). Expression of 7-AAD was subsequently measured on a FACSCalibur cytometer (BD Biosciences) and analysed with the FlowJo software. Cell survival was determined as the percentage of 7-AAD-positive T cells over total T cells.

Transwell assay

Migration assays were performed in 24-chamber plates using Transwell inserts with 5-µm pores (Costar, Cambridge, MA). Vβ₂⁺ CD4⁺ T cells (5 × 10⁵) were placed onto the upper chamber in serum-free medium while the lower chamber was filled with serum-free medium supplemented or not with CXCL12, CCL19 or CCL21 (Peprotech) at the indicated concentration. After 2 hr of incubation at 37° in 5% CO₂, cells that migrated into the lower chamber were harvested and counted with reference beads (Calibration beads; BD Biosciences) on a FACSCalibur cytometer (BD Biosciences). The percentage of migrating cells was determined as follows: number of

migrating cells (lower chamber)/total number of cells (input) × 100. To measure JY cell-driven Vβ₂⁺ CD4⁺ T-cell transmigration, PFA-fixed JY cells loaded or not with TSST-1 superantigen (Toxin Technology, Sarasota, FL) were incubated for 8 min with T cells at the JY : T-cell ratio indicated and then transferred onto the upper chamber of a Transwell. Following 3-hr incubation at 37° in 5% CO₂, the percentage of transmigrating T cells was determined as above.

Video microscopy

Vβ₂⁺ CD4⁺ T cells (0.2 × 10⁵) and APC (0.1 × 10⁵) were incubated for 8 min and transferred to poly-D-lysine-coated Lab-Tek chambers (Nunc, Rochester, NY). Under some conditions, T cells were pre-treated overnight with pertussis toxin (Calbiochem, Darmstadt, Germany) or for 1 hr with anti-LFA-1 blocking antibody (HI111). Cells were recorded at 37° in 5% CO₂ on an LSM 510 confocal microscope equipped with a × 40–1.3 oil immersion Plan-Apochromat objective (CarlZeiss AG, Jena, Germany). Using the multi-position macro of the Zeiss LSM IMAGE BROWSER, the different cell types were recorded in parallel for 2 hr. For each film, 20 cells were tracked with the MANUAL TRACKING plugin of the IMAGEJ software (U.S National Institutes of Health, Bethesda, MD). Tracks were plotted by fixing the starting location of each cell at the x-y graph origin using the CHEMOTAXIS TOOLS OF IBDI (Martinsried, Germany). Motility parameters, including mean velocity, accumulated distance, maximal distance from origin, instantaneous velocity, pause frequency and pause duration were calculated using IBDI chemotaxis tools and a macro developed by D. Sapède (INSERM). For the measurement of adhesion to ICAM-1, CD4⁺ T cells were incubated for 10 min on Lab-Tek chambers coated with recombinant ICAM-1/Fc chimera (10 µg/ml; R&D Systems). Cells were recorded over 5 min at 37° in 5% CO₂ on an LSM 510 confocal microscope equipped with a × 40–1.3 oil immersion Plan-Apochromat objective. Adhesion was calculated as the fraction of cells adhering to the coated surface in relation to the total number of cells. Adherent cells were identified by the emission of various protrusions over the ICAM-1-coated surface, whereas non-adherent cells were identified as inert cells floating above the bottom of the chambers. The roundness coefficient of the cells was measured after 10-min incubation on ICAM-1 by drawing the outline of each cell using the LIVEWIRE 2D plugin of IMAGEJ and applying the Roundness Coefficient of IMAGEJ.

Immunofluorescence staining

To investigate the spatial distribution of LFA-1 under its intermediate-affinity and high-affinity conformations, Vβ₂⁺ CD4⁺ T cells were seeded for 30 min at 37° onto

F. Lafouresse *et al.*

glass slides (Erie Scientific, Portsmouth, NH) coated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ recombinant ICAM-1/Fc chimera, then fixed with 3% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% saponin and 3% BSA. Cells were stained with anti-WASP antibody (H-250; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and with either KIM127 or 24 antibody, followed by A647-labelled anti-rabbit antibody and A546-labelled anti-IgG1 antibody (both from Invitrogen). F-actin was stained with A350-labelled phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR). Slides were mounted with in 90% glycerol-PBS containing 2.5% 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (Fluka, Geneva, Switzerland) and examined with an LSM 710 confocal microscope equipped with a $\times 63$ -1.4 oil immersion Plan-Apochromat objective (CarlZeiss AG). The profile of 24 and KIM-127 antibody staining intensity was measured on IMAGEJ by tracing a line along the longitudinal T-cell axis, from the leading edge to the tip of the uropod. To compare the distribution of the high-affinity and intermediate-affinity LFA-1 in WASP-positive and WASP-depleted cells, the area under the curve for the 24 antibody staining was calculated at the mid-body (10–14 μm) and the area under the curve for the KIM127 antibody staining was calculated at the cell front (1–3 μm) and at the cell rear (12–22 μm). To investigate local actin polarization and cell morphology, $V\beta_2^+$ CD4^+ T cells were incubated with latex beads pre-coated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ recombinant ICAM-1/Fc chimera at a 2 : 1 cell to bead ratio for 30 min. Cell-bead conjugates were seeded on poly-D-lysine-coated glass slides, then fixed with 3% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% saponin and 3% BSA. Cells were stained with anti-WASP antibody (H-250; Santa Cruz Biotechnology) followed by A633-labelled anti-rabbit antibody (Invitrogen) and with A546-labelled phalloidin (Molecular Probes). Slides were mounted with 90% glycerol-PBS containing 2.5% 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane and examined with an LSM 710 confocal microscope equipped with a $\times 63$ -1.4 oil immersion Plan-Apochromat objective (CarlZeiss AG).

Results

Generation of WASP-deficient primary human CD4^+ T cells

To investigate the role of WASP in the scanning behaviour of human CD4^+ T cells, its expression was knocked-down in $V\beta_2^+$ CD4^+ T cells purified from the blood of healthy donors. For that purpose, CD4^+ T cells were transduced with a lentiviral vector encoding two copies of a WASP-specific shRNA (shWASP) and expressing GFP as a reporter gene, allowing purification of transduced cells by flow cell sorting. WASP expression was efficiently inhibited in transduced cells as shown by flow cytometry and confirmed by Western blot analysis (Fig. 1a,b). In comparison, the transduction of primary human CD4^+

T cells with a control vector encoding a control scramble shRNA and GFP (shControl) had no effect on WASP expression. In shWASP CD4^+ T cells, WASP expression remained at undetectable levels following several stimulation cycles, indicating that a stable inhibition of WASP expression was achieved (data not shown). The shRNA-mediated WASP knock-down approach was then validated at a functional level because shWASP CD4^+ T cells harboured a proliferation defect following TCR stimulation (Fig. 1c), as previously described for CD4^+ T cells from WAS patients.²² Therefore, primary human CD4^+ T cells transduced with the shWASP lentiviral vector can be used as a relevant model to study the role of WASP in T-cell scanning.

Increased motility of WASP-deficient CD4^+ T cells upon contact with non-cognate APC

To first investigate the role of WASP in non-cognate APC-induced T-cell motility, live CD4^+ T cells and fixed Epstein-Barr virus-transformed B cells (JY cell line) were seeded in the upper chamber of a Transwell. T-cell motility was assessed as the capacity of T cells to transmigrate to the lower Transwell chamber within 3 hr. In the absence of JY cells, approximately 10% of control and WASP-deficient CD4^+ T cells were able to transmigrate (Fig. 2a). In the presence of JY cells, the transmigration of control CD4^+ T cells was increased, thereby revealing JY cell-induced T-cell motility. Reproducibly, the JY cell-induced motility of shWASP T cells was higher than that of control T cells (+41% on average). The increased motility of WASP-deficient T cells was confirmed when titrating down the number of JY cells and thereby reducing the JY : T ratio (see Supplementary material, Fig. S1a). Given the increased motility of WASP-deficient CD4^+ T cells upon encounter with non-cognate JY cells, we next assessed their capacity to stop upon encounter with JY cells presenting increasing concentrations of TSST-1 superantigen (Fig. 2b). At high superantigen doses (1 and 10 ng/ml), the JY cell-induced transmigration of both shControl and shWASP CD4^+ T cells was prevented, indicating that WASP deficiency did not alter the sensing of the superantigen-driven stop signal. Nevertheless, shWASP CD4^+ T cells remained more mobile than shControl cells in the presence of JY cells presenting a lower dose of TSST-1 (0.1 ng/ml). To investigate the functional consequence of the increased motility of shWASP CD4^+ T cells, cell survival promoted by APC was measured over 6 days of culture (Fig. 2c). In the absence of APC, the mortality rate of shWASP CD4^+ T cells was slightly increased compared with shControl CD4^+ T cells. As expected, the presence of APC (iDC) strongly diminished the mortality of shControl CD4^+ T cells. Interestingly, iDC reduced spontaneous death of shWASP CD4^+ T cells to a level comparable to that of

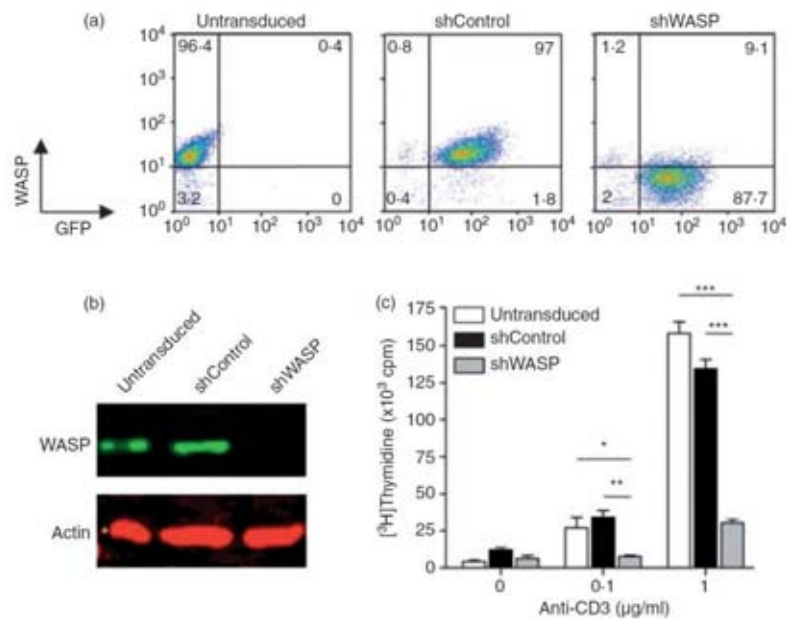


Figure 1. Short hairpin (sh) RNA-mediated Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP) knock-down in primary human CD4⁺ T cells. Representative example of CD4⁺ T cells transduced with lentiviral vectors encoding green fluorescent protein (GFP) and either shControl or shWASP. (a) Untransduced and GFP-sorted shControl and shWASP CD4⁺ T cells were analysed for GFP and WASP expression by flow cytometry. (b) Untransduced and GFP-sorted shControl and shWASP CD4⁺ T cells were analysed for WASP expression by Western blot. (c) Anti-CD3-induced proliferation of untransduced and GFP-sorted shControl and shWASP CD4⁺ T cells was measured by [³H]thymidine incorporation. Data correspond to the mean ± SEM of three replicates. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 unpaired *t* test.

shControl CD4⁺ T cells. Collectively, these data reveal that the abnormally high APC-driven T-cell motility observed in WASP-deficient T cells may counteract their capacity to stop following antigen recognition and neutralize their increased spontaneous death.

WASP-deficient CD4⁺ T cells pause less upon contact with non-cognate APC

To better characterize the high motility behaviour of WASP-deficient CD4⁺ T cells in the presence of non-cognate APC, we tracked shControl and shWASP CD4⁺ T cells by real-time microscopy as they encountered autologous iDC (Fig. 3a) or JY cells (see Supplementary material, Fig. S1b). In the presence of non-cognate APC, CD4⁺ T cells acquired a random motile behaviour as illustrated by their multidirectional migratory paths. Notably, the proportion of fast-migrating CD4⁺ T cells (> 1.8 µm/min, red tracks) was higher for shWASP CD4⁺ T cells than for shControl CD4⁺ T cells. WASP-deficient T cells were very motile within a confined area relatively close to their starting position (Fig. 3a and Supplementary material, Fig. S1b). Accordingly, the analysis of APC-induced motility parameters (Fig. 3b and Supplementary material, Fig. S1c) showed that, compared with shControl CD4⁺ T cells, shWASP CD4⁺ T cells acquired a higher mean velocity and an increased

accumulated distance, without moving further away from their origin. We then investigated whether the increased motility of shWASP CD4⁺ T cells was related to a higher instantaneous speed. The speed of both shControl and shWASP CD4⁺ T cells fluctuated over time within a comparable range of 0 – 25 µm/min. However, when considering the alternation of motile phases (white areas) and pauses (grey areas), shWASP CD4⁺ T cells spent less time in pause than control cells over the observation period (Figs. 3c and Supplementary material, Fig. S2a). This was linked to a decreased pause length rather than to a reduced pause frequency (see Supplementary material, Fig. S2b). Together, these data show that in the context of non-cognate iDC encounter, WASP-deficient T cells harbour a restless scanning behaviour because of a reduced ability to pause.

WASP-deficiency promotes CD4⁺ T-cell adhesion to ICAM-1

T-cell motility induced by non-cognate APC has been shown to depend on both chemokines and ICAM-1 present at the APC surface.¹³ Using pertussis toxin, we first confirmed in our model that signalling through chemokine receptors was contributing to APC-induced T-cell motility (Fig. 4a). Blocking the stimulation through chemokine receptors affected APC-induced motility of

F. Lafouresse *et al.*

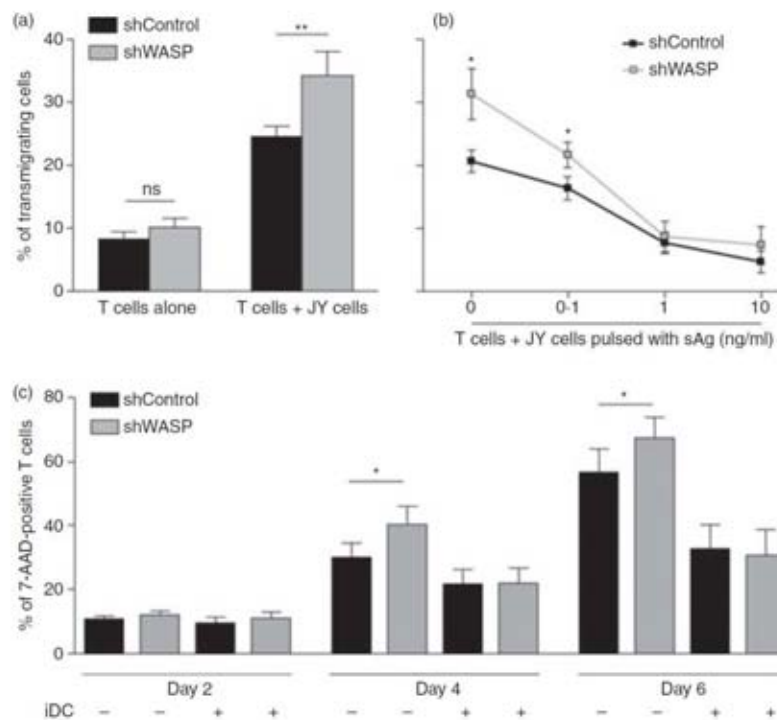


Figure 2. Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP) -deficient CD4⁺ T cells are hyper-motile at the contact with JY cells. (a) short hairpin (sh) Control or shWASP CD4⁺ T cells were seeded in the upper chamber of a Transwell with or without fixed JY cells in the absence of antigen at a 1 : 2 JY cell to T-cell ratio. Percentage of transmigrating cells was calculated as the fraction of CD4⁺ T cells that migrated to the lower chambers, filled with serum-free medium, within 3 hr. The figure represents the mean ± SEM of 13 independent experiments performed with a total of six donors. (b) The shControl or shWASP CD4⁺ T cells were incubated with fixed JY cells pulsed with increasing concentrations of TSST-1 superantigen. Percentage of transmigrating cells was calculated as in (a). Data correspond to the mean ± SEM of three independent experiments performed with two donors. (c) Either shControl or shWASP CD4⁺ T cells were cultured in serum-free medium over 6 days with or without immature dendritic cells. T-cell mortality was assessed by measuring 7-AAD-positive cells. Data correspond to the mean ± SEM of five independent experiments performed with four donors. **P* < 0.05; ***P* < 0.01 paired *t* test.

WASP-deficient T cells, indicating that the increased motility of these cells may be driven by an abnormal response to chemokines. We investigated in our model whether the main chemokines recognized by CD4⁺ T cells were present at the surface of APC. Whereas CCL19 was bound at the surface of both iDC and JY cells, CXCL12 was detected only at the surface of iDC (Fig. 4b). The basal expression of the corresponding chemokine receptors CXCR4 and CCR7 was not altered in shWASP CD4⁺ T cells compared with shControl CD4⁺ T cells (Fig. 4c). Moreover, WASP deficiency did not interfere with CXCR4 internalization following CXCL12 stimulation (data not shown). Using a Transwell assay, we unexpectedly observed that shWASP CD4⁺ T cells migrated toward CXCL12, in a dose–response manner, as efficiently as shControl and untransduced CD4⁺ T cells (Fig. 4d). The shWASP CD4⁺ T cells also migrated normally toward CCL19 and CCL21 (Fig. 4d). To confirm that WASP deficiency did not alter human CD4⁺ T-cell migration

toward chemokines *in vitro*, the chemotactic responses of CD4⁺ T cells isolated from patients with WAS and from healthy donors were compared. The WAS CD4⁺ T cells expressed normal levels of CXCR4 and CCR7 (see Supplementary material, Fig. S3a) and were able to migrate toward CXCL12, CCL19 and CCL21, as efficiently as control CD4⁺ T cells (see Supplementary material, Fig. S3b, c). Among the patients studied here, WAS₄ patient had the particularity of being able to express WASP in approximately half of his CD4⁺ T cells as the result of a spontaneous corrective mutation in the WAS gene (see Supplementary material, Fig. S3d). The proportion of WASP-positive and WASP-negative CD4⁺ T cells from WAS₄ patient was preserved in those cells that had migrated toward CXCL12 at the two concentrations tested. This reveals that neither WASP-positive nor WASP-negative CD4⁺ T cells had a chemotactic advantage in this assay. Together, these results clearly demonstrate that in primary human CD4⁺ T cells, WASP

WASP controls T-cell scanning

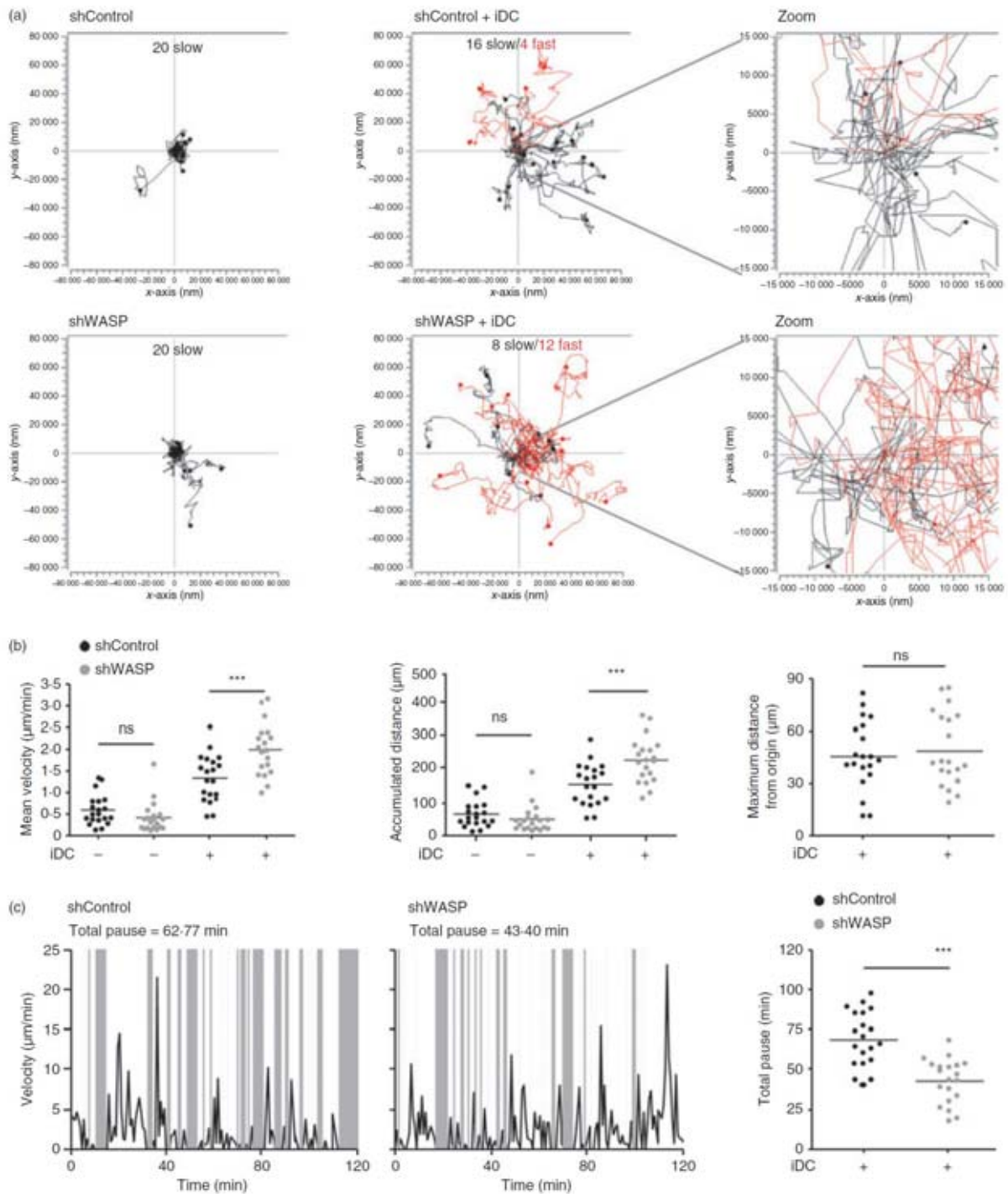


Figure 3. Upon contact with non-cognate immature dendritic cells (iDC), Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) -deficient CD4⁺ T cells adopt a hyper-motile behaviour with reduced pause. Short hairpin (sh) Control and shWASP CD4⁺ T cells alone or with autologous iDC were recorded during 120 min with a time lapse of 46.5 seconds. (a) Motility tracks of 20 individual T cells and corresponding zooms centred around the starting location. Tracks of fast (mean velocity > 1.8 $\mu\text{m}/\text{min}$) and slow (mean velocity < 1.8 $\mu\text{m}/\text{min}$) migrating T cells are shown in red and black, respectively. (b) Mean velocity, accumulated distance and maximum distance from origin of 20 individual shControl and shWASP T cells are shown. (c) Fluctuation of instantaneous velocity over 120 min of one representative shControl T cell and one representative shWASP T cell. Corresponding analysis of total time spent in pause over 120 min of 20 individual shControl and shWASP T cells. Data are from one representative experiment out of four experiments performed with two donors. ****P* < 0.001 unpaired *t* test.

F. Lafouresse *et al.*

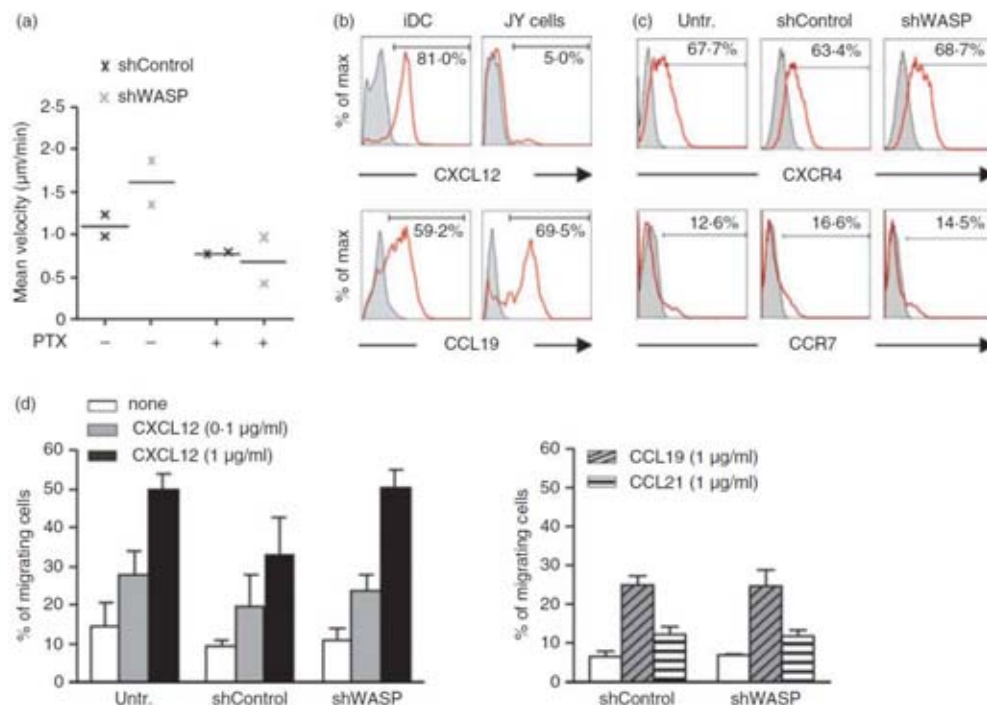


Figure 4. Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP) -deficient CD4⁺ T cells migrate in a normal proportion toward CXCL12, CCL19 and CCL21. (a) Short hairpin (sh) Control and shWASP CD4⁺ T cells treated or not with pertussis toxin were video recorded, during 120 min with a time lapse of 46.5 seconds, upon contact with JY cells and the mean velocity of 20 individual T cells was measured. Results show the mean of two experiments performed with two donors. (b) CXCL12 and CCL19 expression on immature dendritic cells (iDC) and JY cells. Staining with corresponding isotype controls is shown in grey. (c) CXCR4 and CCR7 expression on untransduced, shControl and shWASP CD4⁺ T cells. Staining with corresponding isotype controls is shown in grey. (d) Untransduced, shControl or shWASP CD4⁺ T cells were seeded in the upper chamber of a Transwell, and the percentage of migrating cells was calculated as the fraction of CD4⁺ T cells that migrated to the lower chamber, filled with the indicated chemokine, within 2 hr. Data correspond to the mean ± SEM of three independent experiments performed with three donors. No statistical difference was revealed by paired *t*-test.

is dispensable for *in vitro* migration toward CXCL12, CCL19 and CCL21.

We then examined whether WASP may rather be involved in adhesion to ICAM-1 in our model. Using anti-LFA-1 blocking antibody, we confirmed that signaling through LFA-1 was also contributing to APC-induced T-cell motility (Fig. 5a). Blocking the stimulation through LFA-1 inhibited the increased APC-induced motility of WASP-deficient T cells, indicating that this dysfunction may be induced by an abnormal response to ICAM-1. As expected, ICAM-1 was present at the surface of both iDC and JY cells (Fig. 5b). Total LFA-1 as well as LFA-1 under intermediate-affinity and high-affinity conformation was expressed at comparable levels in shWASP and shControl CD4⁺ T cells (Fig. 5c,d). Furthermore, intermediate-affinity and high-affinity LFA-1 levels increased similarly in shWASP and shControl CD4⁺ T cells upon CXCL12 stimulation. Clearly however, a higher percentage of WASP-deficient CD4⁺ T cells adhered on ICAM-1-coated slides compared with control

cells (Fig. 5e). These results show that in the absence of WASP, CD4⁺ T cells were more prone to adhere on ICAM-1, even if they expressed normal levels of LFA-1 under its different conformations. This implies that the abnormally high APC-driven motility of WASP-deficient T cells may be related to an abnormal adhesion to ICAM-1, rather than to an abnormal chemotactic ability.

Increased ICAM-1-driven elongation in WASP-deficient T cells

How to reconcile the increased ICAM-1 adhesion with the enhanced motility observed in WASP-deficient T cells? To answer this question, we first analysed the morphology of these cells upon ICAM-1 stimulation. The proportion of WASP-deficient T cells that elongated on ICAM-1-coated slides was increased compared with control cells (Fig. 6a). This was further illustrated by the measurement of cell roundness showing that in the

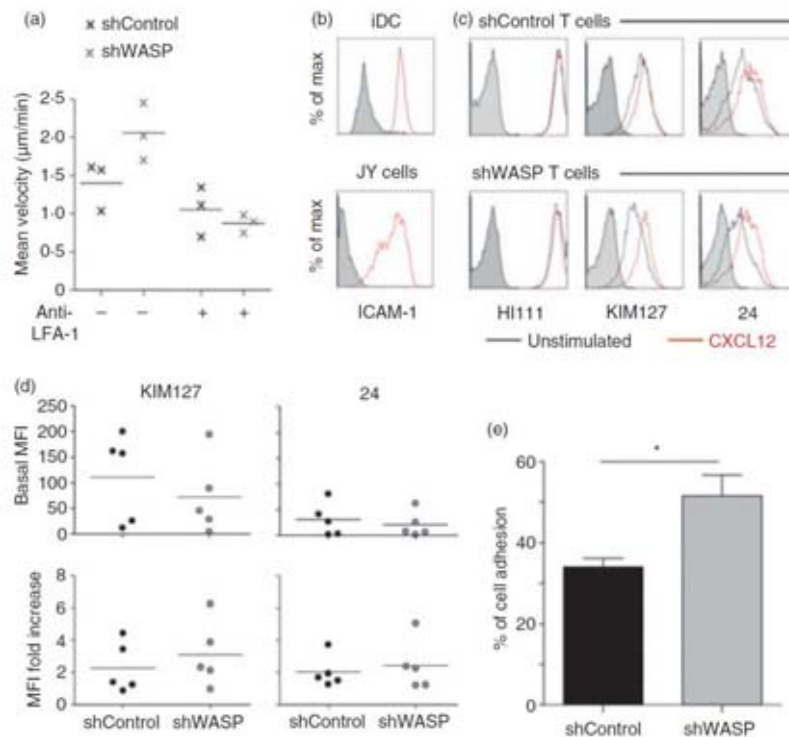


Figure 5. Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP)-deficient CD4⁺ T cells display an increased adhesion on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). (a) Short hairpin (sh) Control and shWASP CD4⁺ T cells treated or not with blocking anti-lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) antibody were video recorded, during 120 min with a time lapse of 46.5 seconds, upon contact with JY cells and the mean velocity of 20 individual T cells was measured. Results show the mean of three experiments performed with three donors. (b) ICAM-1 expression on immature dendritic cells (iDC) and JY cells. Staining with corresponding isotype control is shown in grey. (c) LFA-1 expression under its total (HI111), intermediate-affinity (KIM127) and high-affinity (24) conformations on shControl and shWASP CD4⁺ T cells either unstimulated or stimulated with CXCL12. Staining with corresponding isotype controls is shown in grey. (d) KIM127 and 24 basal geometric mean fluorescence intensity (MFI) values and MFI fold increase upon CXCL12 stimulation of three independent experiments performed with five donors are shown. No statistical difference was revealed by paired *t*-test. (e) Percentage of adhesive shControl and shWASP CD4⁺ T cells on ICAM-1-coated slides. Data correspond to the mean ± SEM of four independent experiments performed with three donors. A total number of 265 shControl and 265 shWASP CD4⁺ T cells were counted. **P* < 0.05 Mann–Whitney *U*-test.

absence of WASP the fraction of round cells diminished. CD4⁺ T cells were then incubated with ICAM-1-coated latex beads, to investigate F-actin polymerization at the site of ICAM-1 stimulation. As shown in Fig. 6(b), most of the control T cells establishing contacts with beads remained relatively spherical (morphology 'type 1'). In accordance with the data above, a higher percentage of WASP-deficient T cells elongated upon contact with ICAM-1-coated latex beads (morphology 'type 2'). Both shControl and shWASP CD4⁺ T cells displayed polarized actin cytoskeleton surrounding the beads. However, in contrast to control cells, a substantial proportion of WASP-deficient CD4⁺ T cells establishing contacts with beads protruded actin-rich structures away from the bead-contact sites (morphology 'type 3'). Finally, we used real-time microscopy to study morphology dynamics of shControl and shWASP CD4⁺ T cells upon encounter

with non-cognate iDC (Fig. 6c and Supplementary material, Videos S1 and S2). In agreement with their elongation on ICAM-1, WASP-deficient CD4⁺ T cells coming into contact with iDC stretched extensively. This morphology was associated to motility. Interestingly, actively scanning WASP-deficient CD4⁺ T cells remained in close contact with APC, occasionally losing contact for a short time when crawling from one APC to another. Indeed, their elongated shape was characterized by a uropod that appeared to stick to iDC (red arrows) and a dynamic leading edge. Compared with control T cells, WASP-deficient T cells in contact with iDC displayed a reduced propensity to round up (white arrows). These results therefore link the increased adhesiveness of WASP-deficient T cells to a higher propensity to elongate and to actively scan an APC-rich environment. Moreover, these data corroborate the notion that the increased propensity

F. Lafouresse *et al.*

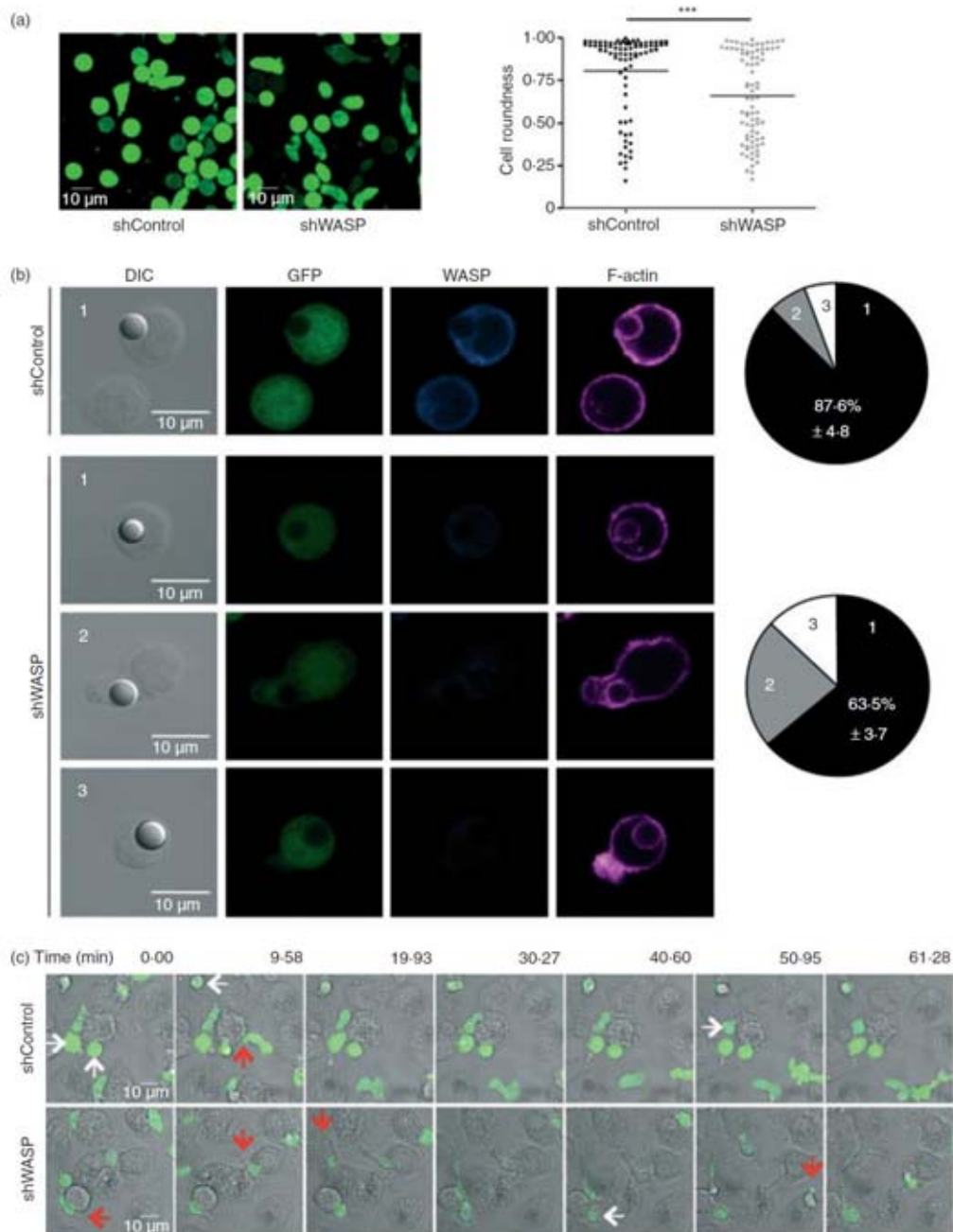


Figure 6. Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-deficient CD4⁺ T cells elongate on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and immature dendritic cells (iDC). (a) Representative images of green fluorescent protein-positive (GFP⁺) short hairpin (sh) Control and shWASP CD4⁺ T cells adhering to ICAM-1. Roundness coefficient of 83 shControl and 83 shWASP CD4⁺ T cells upon adhesion to ICAM-1. Data are from two independent experiments performed with two donors. ****P* < 0.001 unpaired *t*-test. (b) Representative images of GFP⁺ shControl and shWASP CD4⁺ T cells in conjugation with ICAM-1-coated beads and immunostained for WASP and F-actin. Percentage of T cells displaying three distinct morphological types defined as follows are represented: type 1: spherical cells with polymerized actin surrounding the bead; type 2: elongated cells; type 3: protruded actin-rich structures away from the bead contact site. Data represent mean ± SEM of two experiments performed with three donors. (c) Movie sequences of shControl and shWASP T cells at the contact of iDC; white arrows indicate cells that round up and red arrows indicate adherent uropods. Results are representative of four experiments performed.

of WASP-deficient T cells to elongate is driven by abnormal integration of ICAM-1 stimulation.

Dispersed high-affinity LFA-1 localization in WASP-deficient T cells

The precise localization of LFA-1 under its intermediate-affinity and high-affinity conformations is key to the tuning of T-cell adhesive properties,²⁵ so the staining with KIM127 and 24 antibodies (revealing intermediate-affinity and high-affinity LFA-1, respectively) was compared in WASP-deficient and control T cells. Both WASP-deficient and control T cells that adhered to ICAM-1 adopted a polarized morphology with a front enriched in F-actin and a uropod at the rear (Fig. 7a). KIM127 staining showed comparable distribution in both cell types with a narrow enrichment at the front and a wide distribution towards the rear (Fig. 7a,b). Staining with 24 in control T cells was concentrated at the mid-body. However, in WASP-deficient T cells the intensity of the 24 staining at the mid-body was significantly diminished. Instead, WASP-deficient T cells displayed an abnormally broad pattern of high-affinity LFA-1 distribution, which extended along the uropod. These data therefore strongly suggest that the increased propensity of WASP-deficient T cells to adhere to ICAM-1 was a consequence of a defect in restricting high-affinity LFA-1 to the mid-cell region. Altogether, our data suggest that the restless scanning behaviour of WASP-deficient CD4⁺ T cells might be, at least in part, consecutive to an inability to restrict high-affinity LFA-1 and to stabilize arrest phases at the contact with APC.

Discussion

The function of APC is generally viewed through the restricted angle of cognate interactions with T cells. However, most APC/T-cell encounters *in vivo* are non-cognate. Interactions between steady-state iDC and T cells are expected to take place frequently, either in secondary lymphoid organs or in peripheral tissues. In this context, a key function of DC is to activate T-cell motility to promote efficient scanning. The present study provides insight into the molecular mechanisms regulating the motility programme acquired by effector CD4⁺ T cells upon encounter with iDC and B cells.

Here, we identify the actin cytoskeleton regulator WASP as a key controller of APC-driven T-cell motility. Our study shows that WASP deficiency in primary human CD4⁺ T cells enhanced APC-induced motility *in vitro*. The cause of the enhanced motility of WASP-deficient CD4⁺ T cells was directly related to a decreased length of time spent under arrest. In contrast to control CD4⁺ T cells, WASP-deficient CD4⁺ T cells did not transiently round up upon APC encounter, a phase of

scanning normally associated to speed reduction.²⁶ Instead, at the contact with APC, WASP-deficient CD4⁺ T cells displayed an abnormally sustained migrating morphology characterized by an active leading edge and an elongated uropod. It has been shown that DC-mediated T-cell survival is dependent on cell-to-cell contact and that it may be driven by signalling originating from the uropod.²⁷ It would therefore be interesting to test whether the elongated uropod observed in WASP-deficient T cells contributes to their high propensity to survive at the contact with iDC. In our *in vitro* setting, the enhanced motility and the elongated morphology of WASP-deficient T cells did not permit them to reach further distances and to contact more DC. Indeed, the motility of WASP-deficient T cells was restricted to a confined area and this appeared to be related to the fact that WASP-deficient T cells were sticking to APC through their uropod. In apparent contrast, WASP-deficient T cells transmigrated at an increased rate in our Transwell assay. This might be explained by an enhanced scanning activity leading these cells to contact membrane pores more frequently. Moreover, the elongated morphology of WASP-deficient T cells may have facilitated their transmigration. It remains to be tested how the abnormal morphology and the restless scanning of WASP-deficient T cells, observed here *in vitro*, could impact scanning in dense matrices and in natural tissue environments.

The APC-driven T-cell motility is known to be driven by chemokines and ICAM-1.¹³ Both chemotaxis in response to various chemokines^{15,16,28,29} and adhesion to ICAM-1^{30–32} have been reported, in different cell types, to depend on the presence of WASP. Therefore, how could WASP deficiency exacerbate APC-driven T-cell motility? In agreement with previous studies reporting that WASP is dispensable for murine T-cell chemotaxis *in vitro*,^{16,17,33} we clearly show that WASP-deficiency, both in shWASP and WAS patient T cells, does not alter chemotaxis to CXCL12. This finding was reinforced by the direct comparison of the chemotaxis of WASP-positive and WASP-negative CD4⁺ T cells originating from a revertant patient. The discrepancy with a previous study reporting defective CXCL12-driven chemotaxis in CD3⁺ T cells from WAS patients¹⁵ may be linked to differences in the nature and the maturation stage of the T cells studied. Furthermore, our data indicate that WASP is dispensable to chemotaxis towards CCL19 and CCL21, although the migratory response towards these chemokines was low, as expected for effector T cells expressing low levels of CCR7.

In contrast to their normal ability to migrate in response to chemokines, WASP-deficient T cells adhered at an abnormally high rate on ICAM-1. This result is in accordance with the increased ability of CD4⁺ T cells from WAS patients to form conjugates with non-cognate APC.²² The increased adhesion of WASP-deficient T cells

F. Lafouresse et al.

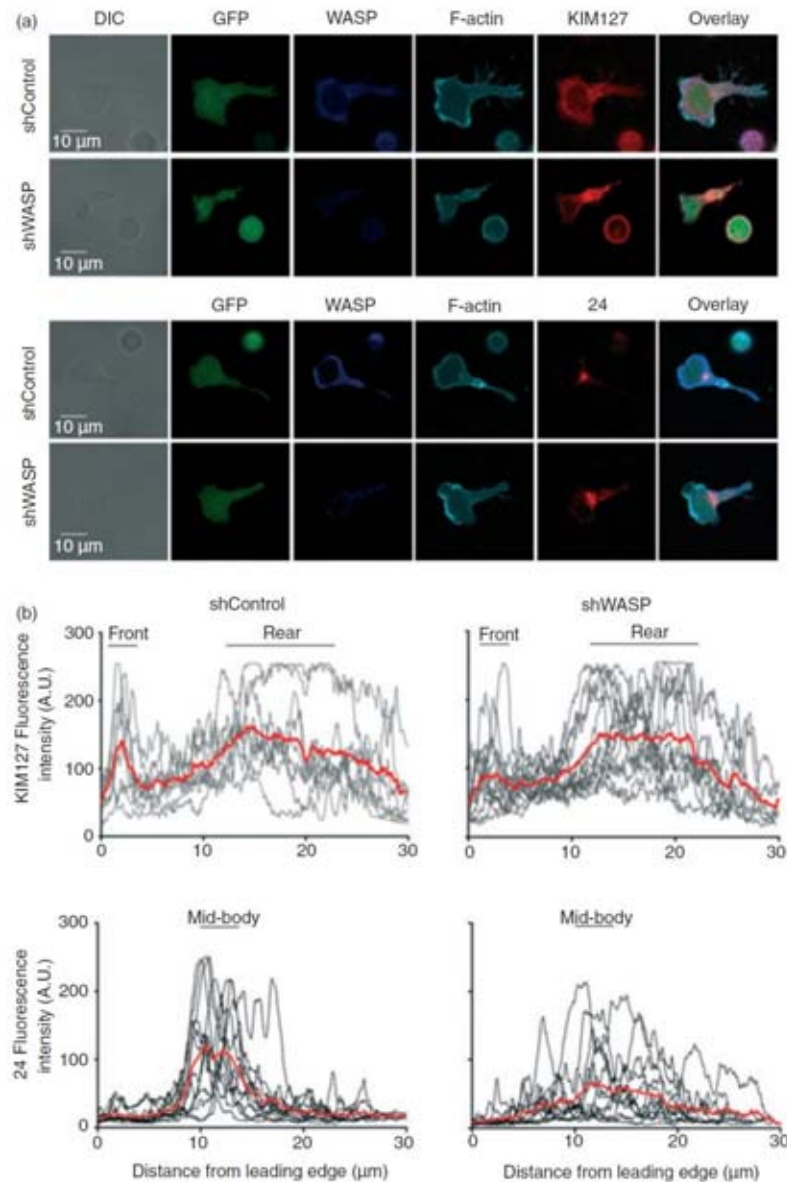


Figure 7. Adhesive Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-deficient CD4⁺ T cells display an abnormal localization of high-affinity lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). (a) One representative image of green fluorescent protein-positive (GFP⁺) short hairpin (sh) Control and shWASP CD4⁺ T cells adherent to intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), immunostained for WASP, F-actin, and KIM127 (upper panel) or 24 (lower panel). (b) KIM127 and 24 monoclonal antibody fluorescence intensity profiles, from the leading edge to the tip of the uropod. Mean fluorescence intensity of 9–13 individual T cells is represented in red. The black bars define the cell regions that were considered for area under the curve calculations. No statistical difference was found between the KIM127 staining of shControl and shWASP CD4⁺ T cells. The 24 staining at the mid-body was reduced in shWASP CD4⁺ T cells compared with shControl CD4⁺ T cells ($P = 0.025$ unpaired *t*-test). Data are from one representative experiment out of three experiments performed with three donors.

mirrored an increased proportion of elongated cells that were prompt to move. The exacerbated response of WASP-deficient T cells to ICAM-1 was neither the result of an abnormal expression level of LFA-1 nor of an abnormal conformational activation of LFA-1 following ICAM-1 engagement. However, WASP deficiency resulted

in a loose confinement of high-affinity LFA-1 to the mid-cell focal zone and a dispersion towards the uropod. During T-cell scanning of DC surfaces, LFA-1 is dynamically redistributed from the leading edge to the mid-cell zone where it forms a signalling platform.²⁷ WASP deficiency might therefore affect the spatial organization of LFA-1

signalling. Previous studies have brought to light the concept that the spatial confinement and the dynamics of intermediate-affinity and high-affinity LFA-1 pools are controlled by physical links with the actin cytoskeleton.^{25,34} Intermediate-affinity LFA-1 linked to α -actinin-1 permits new adhesions at the leading edge, whereas high-affinity LFA-1 linked to talin provides a central adhesive platform at the mid-cell region. It can be assumed that the widening of the high-affinity LFA-1 spatial distribution in WASP-deficient T cells is the result of a defective anchorage to the actin network. In favour of this hypothesis is the observation in natural killer cells that WASP is recruited by talin to the site of LFA-1 engagement to promote localized actin polymerization.³¹ However, in contrast to our data, WASP-deficient natural killer cells fail to adhere to ICAM-1 and fail to polymerize actin at the site of LFA-1 engagement. T cells may therefore have a molecular control of integrin anchorage to the cytoskeleton less strictly dependent on WASP than natural killer cells. The experiments based on the incubation of WASP-deficient T cells with ICAM-1-coated beads show that WASP is dispensable to actin polymerization at the site of LFA-1 engagement, although a mild defect could not be excluded. Interestingly, the contact with ICAM-1-coated beads promoted the formation of actin-rich protrusions away from the contact site, suggesting a decoupling between LFA-1 engagement and actin polymerization. We therefore propose that, in the absence of WASP, both abnormal anchorage of high-affinity LFA-1 to the actin cytoskeleton and LFA-1 signalling into aberrant actin remodelling lead to elongated restless cells.

Our results indicate that during the scanning of APC, WASP favours T-cell stability rather than motility. The role of WASP as a gatekeeper of APC-driven T-cell motility may, at least in part, account for the combination of exacerbated response to self-antigen and defective response to certain pathogens observed in WASP.^{35,36} On the one hand, the restless scanning of APC presenting self-antigen might favour the activation of auto-reactive T-cell precursors. Of interest, the morphology of WASP-deficient T cells sticking to iDC via their uropod is reminiscent of the previously described ICAM-1/LFA-1-dependent tethered adhesion on chemokine-bearing APC, a mechanism shown to prepare T cells for antigenic stimulation.³⁷ The exacerbation of tethered adhesion in the context of WASP deficiency may lead to increased sensitivity to self-antigen. On the other hand, our data indicate that the reduced ability of WASP-deficient T cells to stabilize pauses upon inspection of APC is impacting on their capacity to stop in the context of cognate antigen presentation. An increased threshold for antigen-driven stop in WASP-deficient T cells would reduce the capacity of these cells to respond optimally to low affinity antigen or to antigen present at low concentrations. In conclusion, the present study highlights the fact that APC

are endowed with the capacity to activate a WASP-controlled motility programme in effector T cells. It will be interesting to address the contribution of the abnormal T-cell scanning identified here in the physiopathology of WAS, using *in vivo* imaging in WASP knockout mice. Moreover, the murine model would permit the study the role of WASP in the scanning activity of naive T cells. Another open question is whether WASP regulation of T-cell scanning also applies to regulatory T cells because Foxp3⁺ regulatory T cells are functionally impaired in WAS patients and in WASP-deficient mice.^{38–40}

Acknowledgements

We thank Nancy Hogg for providing the anti-LFA-1 KIM127 antibody and Fernando Arenzana-Seisdedos for providing the anti-CXCL12 antibody. We thank Sophie Allard and Daniel Sapède from the IFR150 microscopy platform (Toulouse). We are grateful to Khalil Seye and Véronique Parietti for help with lentiviral vector production and to Zilton Vasconcelos and Maria-Ignes Elsas for help with Transwell experiments and helpful discussions. We also thank Christophe Viret for helpful discussion and Josipa Spoljaric for manuscript editing.

This work was supported by the French National Research Agency (ANR-07-MRAR-022-02 grant 'Physio-WAS' to AG and LD), by the Region Midi-Pyrénées (to LD) and by an INSERM-FIOCRUZ cooperation grant (to FL, LD and VC-A). VC-A is supported by the Brazilian Ministry of Health, CNPq and FAPERJ.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- 1 Dustin ML. Stop and go traffic to tune T cell responses. *Immunity* 2004; **21**:305–14.
- 2 Miller MJ, Wei SH, Cahalan MD, Parker I. Autonomous T cell trafficking examined *in vivo* with intravital two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**:2604–9.
- 3 Dustin ML, Bromley SK, Kan Z, Peterson DA, Unanue ER. Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**:3909–13.
- 4 Miller MJ, Hejazi AS, Wei SH, Cahalan MD, Parker I. T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**:998–1003.
- 5 Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 1998; **395**:82–6.
- 6 Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999; **285**:221–7.
- 7 Cahalan MD, Parker I. Choreography of cell motility and interaction dynamics imaged by two-photon microscopy in lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 2008; **26**:585–626.
- 8 Bajenoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N, Germain RN. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* 2006; **25**:989–1001.
- 9 Fischer UB, Jacovetty EL, Medeiros RB *et al*. MHC class II deprivation impairs CD4 T cell motility and responsiveness to antigen-bearing dendritic cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**:7181–6.

F. Lafouresse *et al.*

- 10 Kondo T, Cortese I, Markovic-Plese S, Wandinger KP, Carter C, Brown M, Leitman S, Martin R. Dendritic cells signal T cells in the absence of exogenous antigen. *Nat Immunol* 2001; **2**:932–8.
- 11 Hochweller K, Wabnitz GH, Samstag Y, Suttner J, Hammerling GJ, Garbi N. Dendritic cells control T cell tonic signaling required for responsiveness to foreign antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**:5931–6.
- 12 Rey P, Sospedra M, Barbour B, Trautmann A. Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 2001; **2**:925–31.
- 13 Real E, Kaiser A, Raposo G, Amara A, Nardin A, Trautmann A, Donnadieu E. Immature dendritic cells (DCs) use chemokines and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin, to stimulate CD4⁺ T cells in the absence of exogenous antigen. *J Immunol* 2004; **173**:50–60.
- 14 Samstag Y, Eibert SM, Klemke M, Wabnitz GH. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J Leukoc Biol* 2003; **73**:30–48.
- 15 Haddad E, Zagaza JL, Louache F *et al.* The interaction between Cdc42 and WASP is required for SDF-1-induced T-lymphocyte chemotaxis. *Blood* 2001; **97**:33–8.
- 16 Snapper SB, Meeu P, Nguyen D *et al.* WASP deficiency leads to global defects of directed leukocyte migration *in vitro* and *in vivo*. *J Leukoc Biol* 2005; **77**:993–8.
- 17 Gallego MD, de laFuente MA, Anton IM, Snapper S, Fulbrigg R, Geha RS. WIP and WASP play complementary roles in T cell homing and chemotaxis to SDF-1 α . *Int Immunol* 2006; **18**:221–32.
- 18 Dupre L, Aiuti A, Trifari S, Martino S, Saracco P, Bordignon C, Roncarolo MG. Wiskott–Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity* 2002; **17**:157–66.
- 19 Badour K, Zhang J, Siminovich KA. Involvement of the Wiskott–Aldrich syndrome protein and other actin regulatory adaptors in T cell activation. *Semin Immunol* 2004; **16**:395–407.
- 20 Cannon JL, Burkhardt JK. Differential roles for Wiskott–Aldrich syndrome protein in immune synapse formation and IL-2 production. *J Immunol* 2004; **173**:1658–62.
- 21 Sims TN, Soos TJ, Xenias HS *et al.* Opposing effects of PKC θ and WASP on symmetry breaking and relocation of the immunological synapse. *Cell* 2007; **129**:773–85.
- 22 Calvez R, Lafouresse F, De Meester J, Galy A, Valitutti S, Dupre L. The Wiskott–Aldrich syndrome protein permits assembly of a focused immunological synapse enabling sustained T-cell receptor signaling. *Haematologica* 2011; **96**:1415–23.
- 23 Trifari S, Scaramuzza S, Catucci M *et al.* Revertant T lymphocytes in a patient with Wiskott–Aldrich syndrome: analysis of function and distribution in lymphoid organs. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**:439–48.
- 24 Jeanson-Leh L, Blondeau J, Galy A. Optimization of short hairpin RNA for lentiviral-mediated RNAi against WAS. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **362**:498–503.
- 25 Smith A, Carrasco YR, Stanley P, Kieffer N, Batista FD, Hogg N. A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. *J Cell Biol* 2005; **170**:141–51.
- 26 Negulescu PA, Krasieva TB, Khan A, Kerschbaum HH, Cahalan MD. Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigens. *Immunity* 1996; **4**:421–30.
- 27 Storim J, Brocker EB, Friedl P. A dynamic immunological synapse mediates homeostatic TCR-dependent and -independent signaling. *Eur J Immunol* 2010; **40**:2741–50.
- 28 Badolato R, Sozzani S, Malacarne F *et al.* Monocytes from Wiskott–Aldrich patients display reduced chemotaxis and lack of cell polarization in response to monocyte chemoattractant protein-1 and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J Immunol* 1998; **161**:1026–33.
- 29 Westerberg L, Larsson M, Hardy SJ, Fernandez C, Thrasher AJ, Severinson E. Wiskott–Aldrich syndrome protein deficiency leads to reduced B-cell adhesion, migration, and homing, and a delayed humoral immune response. *Blood* 2005; **105**:1144–52.
- 30 Zhang H, Schaff UY, Green CE *et al.* Impaired integrin-dependent function in Wiskott–Aldrich syndrome protein-deficient murine and human neutrophils. *Immunity* 2006; **25**:285–95.
- 31 Mace EM, Zhang J, Siminovich KA, Takei F. Elucidation of the integrin LFA-1-mediated signaling pathway of actin polarization in natural killer cells. *Blood* 2010; **116**:1272–9.
- 32 Stabile H, Carlino C, Mazza C *et al.* Impaired NK-cell migration in WAS/XLT patients: role of Cdc42/WASP pathway in the control of chemokine-induced β_2 integrin high-affinity state. *Blood* 2010; **115**:2818–26.
- 33 Blundell MP, Bouma G, Calle Y, Jones GE, Kinnon C, Thrasher AJ. Improvement of migratory defects in a murine model of Wiskott–Aldrich syndrome gene therapy. *Mol Ther* 2008; **16**:836–44.
- 34 Stanley P, Smith A, McDowall A, Nicol A, Zicha D, Hogg N. Intermediate-affinity LFA-1 binds α -actinin-1 to control migration at the leading edge of the T cell. *EMBO J* 2008; **27**:62–75.
- 35 Schurman SH, Candotti F. Autoimmunity in Wiskott–Aldrich syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2003; **15**:446–53.
- 36 Ochs HD, Thrasher AJ. The Wiskott–Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2006; **117**:725–38.
- 37 Friedman RS, Jacobelli J, Krummel MF. Surface-bound chemokines capture and prime T cells for synapse formation. *Nat Immunol* 2006; **7**:1101–8.
- 38 Maillard MH, Cotta-de-Almeida V, Takeshima F, Nguyen DD, Michetti P, Nagler C, Bhan AK, Snapper SB. The Wiskott–Aldrich syndrome protein is required for the function of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Exp Med* 2007; **204**:381–91.
- 39 Humblet-Baron S, Sather B, Anover S *et al.* Wiskott–Aldrich syndrome protein is required for regulatory T cell homeostasis. *J Clin Invest* 2007; **117**:407–18.
- 40 Marangoni F, Trifari S, Scaramuzza S, *et al.* WASP regulates suppressor activity of human and murine CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ natural regulatory T cells. *J Exp Med* 2007; **204**:369–380.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP)-deficient CD4⁺ T cells are hyper-motile at the contact with JY cells.

Figure S2. Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP)-deficient CD4⁺ T cells are hyper-motile at the contact with immature dendritic cells.

Figure S3. CD4⁺ T cells isolated from patients with Wiskott–Aldrich syndrome migrate normally toward CXCL12, CCL19 and CCL21.

Video S1. Scanning of immature DC by control T cells.

Video S2. Scanning of immature DC by Wiskott–Aldrich syndrome protein-deficient T cells.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Supplementary Figure Legends

Figure S1. WASP-deficient CD4⁺ T cells are hyper-motile at the contact with JY cells. (a) Percentage of transmigrating shControl or shWASP CD4⁺ T cells following incubation with fixed JY cells in the absence of Ag at the indicated JY cell/T cell ratio. Data represent the results of one representative experiment out of 9. (b) ShControl and shWASP CD4⁺ T cells alone or with JY cells were recorded during 120 min with a time lapse of 46.5 s. Motility tracks of 20 individual T cells and corresponding zooms centered around the starting location. Tracks of fast (mean velocity > 1.8 $\mu\text{m}/\text{min}$) and slow (mean velocity < 1.8 $\mu\text{m}/\text{min}$) migrating T cells are shown in red and black, respectively. (c) Mean velocity of the T cells analyzed in B. Data are from 1 representative experiment out of 10 experiments performed with 4 donors. * $p < 0.05$ unpaired t test.

Figure S2. WASP-deficient CD4⁺ T cells are hyper-motile at the contact with iDC. ShControl and shWASP CD4⁺ T cells incubated with autologous iDC were recorded during 120 min with a time lapse of 46.5 s. (a) Instantaneous velocity of 3 representative shControl T cells and 3 representative shWASP T cells. (b) Number of pauses and pause duration, represented as mean \pm SEM of 20 individual shControl and shWASP T cells. Results are representative of 4 experiments performed with 2 donors. *** $p < 0.001$ unpaired t test.

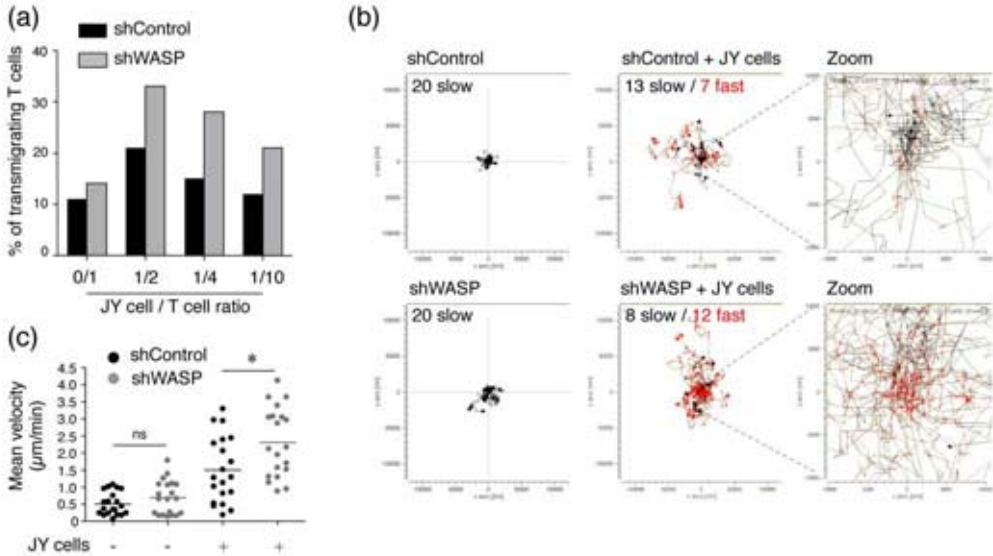
Figure S3. CD4⁺ T cells isolated from WAS patients migrate normally toward CXCL12, CCL19 and CCL21. (a) CXCR4 and CCR7 expression on CD4⁺ T cells from a healthy donor and a WAS patient (WAS₂). Stainings with corresponding isotype controls are shown in grey. (b) CD4⁺ T cells from a healthy donor and a WAS patient (WAS₂) were seeded in the upper chamber of a Transwell and the lower chambers were filled with the indicated chemokines.

The percentage of transmigrating cells was calculated as the fraction of CD4⁺ T cells that had migrated to the lower chambers within 2 h. Data correspond to the mean \pm SEM of 3 independent experiments. No statistical difference was revealed by a paired *t* test. (c) CD4⁺ T cells from 4 healthy donors and from 3 WAS patients (WAS₁, WAS₂, WAS₄) were seeded in the upper chamber of a Transwell and the lower chambers were filled with the indicated concentration of CXCL12. The percentage of transmigrating cells was calculated as the fraction of CD4⁺ T cells that had migrated to the lower chambers within 2 h. Note that each individual healthy donor or WAS patient is represented by a symbol (\blacktriangle : WAS₁; \bullet : WAS₂; \blacksquare : WAS₄) and was tested once or twice. Mean \pm SEM are shown. No statistical difference was revealed by a paired *t* test. (d) WASP expression analysis showing the proportion of WASP-expressing revertant CD4⁺ T cells in WAS₄ patient before migration (input). The proportion of WASP-expressing CD4⁺ T cells was assessed in parallel in cells that had migrated toward the indicated concentration of CXCL12.

Video 1. Scanning of iDC by control T cells. GFP⁺ shControl CD4⁺ T cells were imaged at the contact with iDC by confocal microscopy (LSM 510, Carl Zeiss) during 61.28 min with a time-lapse of 43.8 s. Results are representative of 4 experiments performed.

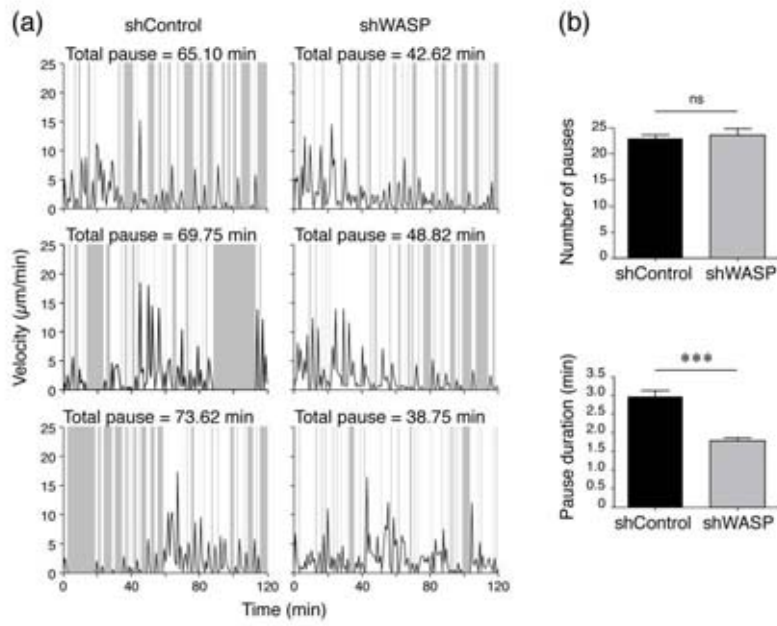
Video 2. Scanning of iDC by WASP-deficient T cells. GFP⁺ shWASP CD4⁺ T cells were imaged at the contact with iDC by confocal microscopy (LSM 510, Carl Zeiss) during 61.28 min with a time-lapse of 43.8 s. Results are representative of 4 experiments performed.

Supplementary Figure S1

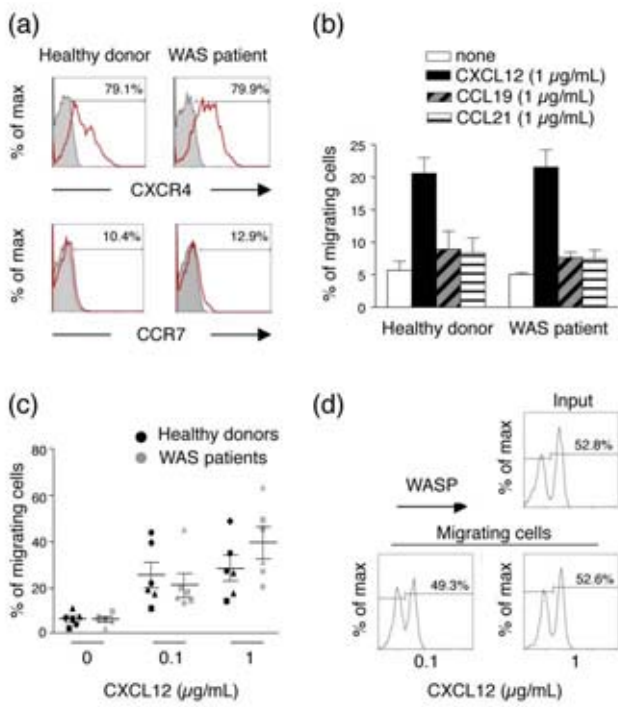


Supplementary Figure S2

Lafouresse *et al.*



Supplementary Figure S3



The Wiskott-Aldrich syndrome protein permits assembly of a focused immunological synapse enabling sustained T-cell receptor signaling

Ronan Calvez, Fanny Lafouresse, Julie De Meester, Anne Galy, Salvatore Valitutti, and Loïc Dupré

Haematologica (Calvez et al., 2011)

La reconnaissance à la surface d'une cellule présentatrice de l'antigène du complexe CMH-II-peptide, par un lymphocyte T CD4⁺ conduit à une interaction prolongée entre les 2 cellules et à la formation de la synapse immunologique (Grakoui et al., 1999; Monks et al., 1998). Cette dernière nécessite le bon assemblage du cytosquelette d'actine (Valitutti et al., 1995a). Il a été démontré que WASP était recruté à la synapse immunologique au niveau des rafts lipidiques et était nécessaire à sa formation (Cannon and Burkhardt, 2004; Dupre et al., 2002). En conséquence les lymphocytes T déficients pour WASP présentent des défauts de prolifération et de sécrétion de cytokines (Trifari et al., 2006). En revanche, le rôle particulier de WASP dans la formation dynamique de la synapse immunologique ainsi que dans son organisation moléculaire n'est pas connu.

Pour étudier cette question, nous avons purifié et produit des lignées primaires de lymphocytes T CD4⁺ Vβ2 de patients WAS et de donneurs sains. Puis, nous avons observé par microscopie en 3-dimensions les synapses immunologiques formées au contact de cellules présentatrices de l'antigène (lymphocytes B transformés par le virus de l'EBV) chargées en TSST-1 (superantigène reconnu par le TCR Vβ2).

Nous avons montré que les lymphocytes T CD4⁺ déficients pour WASP ont une morphologie anormalement allongée au contact des cellules présentatrices de l'antigène. De plus, l'actine des lymphocytes T de patients WAS n'est pas polarisée à la synapse immunologique mais les lymphocytes émettent des protrusions riches en actine en dehors de l'aire de contact cellulaire. Plus précisément, nous avons montré que les synapses immunologiques formées sont plus longues, que le MTOC n'est pas correctement polarisé à la synapse et que les phospho-tyrosines ne sont pas confinées à la synapse. La restauration de l'expression de WASP dans les lymphocytes T de patients par transduction avec un vecteur de thérapie génique corrige les défauts observés. Nous avons également étudié la dynamique de la formation de la synapse immunologique par microscopie confocale en temps réel. Nous avons observés que les synapses immunologiques formées par les lymphocytes T de patients

Résultats : WASP drives immunological synapse focusing

WAS ne sont pas stables. En effet, en accord avec leur morphologie allongée, les lymphocytes T de patients WAS sont très mobiles à la surface des cellules présentatrices de l'antigène. En parallèle, nous avons montré que le signal calcique résultant de cette interaction était erratique, plutôt que soutenu comme observés chez les lymphocytes T de donneurs sains.

Finale­ment nos analyses dynamiques en temps réel et moléculaires en 3-dimensions montrent que suite à l'activation du TCR, WASP est nécessaire à la stabilisation du contact cellulaire ainsi qu'à l'organisation moléculaire de la synapse immunologique.

The Wiskott-Aldrich syndrome protein permits assembly of a focused immunological synapse enabling sustained T-cell receptor signaling

Ronan Calvez,^{1,2} Fanny Lafouresse,^{1,2} Julie De Meester,^{1,2} Anne Galy,³ Salvatore Valitutti,^{1,2} and Loïc Dupré^{1,2}

¹INSERM, U1043, Toulouse, France; ²Université Toulouse III Paul-Sabatier, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France and ³INSERM, U951, Génomex, Evry, France

Acknowledgments: we are extremely grateful to the patients and their families. We thank Maria-Grazia Roncarolo and Anna Villa (San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy) for providing patients' samples. We wish to thank Sophie Allard and Daniel Sapède from the IFR150 microscopy platform (Toulouse). We also thank Josipa Spoljaric for manuscript editing.

Funding: this work was supported by the European Community (Marie Curie Excellence grant, contract MEXT-CT-2005-025032 to LD), by the French National Research Agency (ANR-maladies rares grant "PhysioWAS" to AG and LD) and by the Association pour la Recherche sur le Cancer ("Subvention Libre" to SV).

Manuscript received on January 7, 2011. Revised version arrived on May 16, 2011. Manuscript accepted on June 3, 2011.

Correspondence:
Loïc Dupré, INSERM U1043, Purpan University Hospital, 31300 Toulouse, France.
Phone: international +33.0562744588.
Fax: international +33.0562744558.
E-mail: loic.dupre@inserm.fr

The online version of this article has a Supplementary Appendix.

ABSTRACT

Background

T-cell activation relies on the assembly of the immunological synapse, a structure tightly regulated by the actin cytoskeleton. The precise role of the Wiskott-Aldrich syndrome protein, an actin cytoskeleton regulator, in linking immunological synapse structure to downstream signaling remains to be clarified.

Design and Methods

To address this point, CD4⁺ T cells from patients with Wiskott-Aldrich syndrome were stimulated with antigen-presenting cells. The structure and dynamics of the immunological synapse were studied by confocal and video-microscopy.

Results

Upon stimulation by antigen-presenting cells, Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient T cells displayed reduced cytokine production and proliferation. Although Wiskott-Aldrich syndrome T cells formed conjugates with antigen-presenting cells at normal frequency and exhibited normal T-cell receptor down-regulation, they emitted actin-rich protrusions away from the immunological synapse area and their microtubule organizing center failed to polarize fully towards the center of the immunological synapse. In parallel, abnormally dispersed phosphotyrosine staining revealed unfocused synaptic signaling in Wiskott-Aldrich syndrome T cells. Time-lapse microscopy confirmed the anomalous morphology of Wiskott-Aldrich syndrome T-cell immunological synapses and showed erratic calcium mobilization at the single-cell level.

Conclusions

Taken together, our data show that the Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for the assembly of focused immunological synapse structures allowing optimal signal integration and sustained calcium signaling.

Key words: T lymphocytes, Wiskott-Aldrich syndrome, immunological synapse.

Citation: Calvez R, Lafouresse F, De Meester J, Galy A, Valitutti S, and Dupré L. The Wiskott-Aldrich syndrome protein permits assembly of a focused immunological synapse enabling sustained T-cell receptor signaling. *Haematologica* 2011;96(10):1415-1423. doi:10.3324/haematol.2011.040204

©2011 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Introduction

Adaptive immunity relies on specific antigen recognition by T cells. Rapidly moving T cells scan secondary lymphoid organs in search for antigen-presenting cells (APC). Upon cognate antigen encounters through their T-cell receptors (TCR), T cells stop and spread on the APC to form a prolonged contact known as the immunological synapse (IS).^{1,2} The molecular organization at the IS regulates TCR signal integration and subsequent T-cell activation.³ Importantly, integrity of the actin cytoskeleton is necessary for IS assembly and sustained signal integration.^{4,5} However, it remains poorly understood how the actin cytoskeleton regulates IS architecture and stability precisely, as well as early signaling events.

Multiple actin-regulatory proteins control specific actin remodeling patterns and dynamics at the IS.⁶ Among them, the hematopoietic-specific actin regulator Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is of particular interest because its deficiency results in severe immunodeficiency as a consequence of multiple cellular defects.⁷ WASP is known to regulate T-cell activation, as revealed by reduced proliferation and cytokine production in T cells from Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) patients following TCR triggering.⁸ The protein is normally rapidly recruited to the plasma membrane in association with lipid rafts⁹ and is activated by GTP-bound Cdc42 at the site of TCR stimulation.¹⁰ WASP nucleates actin through the Arp2/3 complex, which forms new actin branches on the sides of existing actin filaments. The assembly of a branched actin network allows the formation of lamellipodial membrane extensions that build the leading edge of migrating T cells and the peripheral ring of T cells that spread on the APC surface during IS formation.^{3,11,12} The WASP-family protein WAVE2, rather than WASP itself, appears essential for the assembly of the T-cell lamellipodium and the IS, thereby putting in question the precise function of WASP during T-cell morphology remodeling in the context of antigen recognition.¹³ The role of WASP at the IS has been studied using naïve T cells from different TCR transgenic WASP-KO mice. Conflicting results have been obtained concerning whether WASP regulates actin polymerization at the IS and whether it is required for conjugate formation and correct IS assembly.^{14,15} Real-time observation of WASP-KO T cells on lipid bilayers presenting peptide-MHC complexes has recently revealed that WASP acts as a stabilizer of IS symmetry.¹⁶ However, the role of WASP at the IS has been further challenged by the discovery that this protein can also be present in the nucleus, where it participates in the regulation of cytokine gene transcription.¹⁷ In this context, the real-time observation of WASP-deficient T cells contacting APC is still missing and would help to elucidate whether WASP links IS dynamics and architecture to downstream T-cell signaling and activation.

In this study we employed time-lapse and 3-dimensional (3-D) microscopy approaches to study CD4⁺Vβ2⁺ T-cell lines derived from WAS patients, following stimulation with Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B cells loaded with the superantigen TSST-1. This allowed us to define how WASP deficiency affects IS structure and early T-cell activation.

Design and methods

CD4⁺Vβ2⁺ T-cell lines

CD4⁺Vβ2⁺ T-cell lines were established from blood samples of two WAS patients known to have defective WASP expression

(patient WAS1 was reported by De Meester *et al.*¹⁸ and patient WAS2 by Dupre *et al.*⁹). Blood samples from healthy donors were used as controls. Blood samples from patients and healthy donors were obtained following standard ethical procedures (Helsinki protocol) and with the approval of the relevant Internal Review Boards. Details on the CD4⁺Vβ2⁺ T-cell lines and the JY cells used as APC are provided in the *Online Supplementary Design and Methods*.

Analysis of Wiskott-Aldrich syndrome protein expression by western blot

T lymphocytes were lysed for 30 min on ice in a modified RIPA buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 1% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 0.2 mM AEBSE, 1 mM Na₂VO₄, 1 mM NaF and a protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich). After clearing the supernatants by centrifugation, lysates were boiled in reducing sample buffer, separated through 7.5% SDS-polyacrylamide and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with Odyssey blocking buffer (LI-COR Biosciences, Nebraska, USA) and incubated overnight at 4°C with anti-WASP (H250, Santa Cruz) and anti-β-actin (AC15, Sigma) antibodies. After washing, goat anti-rabbit IgG-IR Dye 800CW (LI-COR Biosciences) and goat anti-mouse-Alexa Fluor680 monoclonal antibodies (Molecular Probes) were added. WASP and β-actin expression was visualized and recorded on an Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

Proliferation

T cells (2×10⁶/mL) were incubated with 2.5 μM CFSE in serum-free medium for 8 min at 37°C. Labeling was then quenched with ice-cold RPMI/5% HS before washing the cells by centrifugation. CFSE-labeled T cells (1×10⁶) were then mixed with JY cells (1×10⁶), preloaded or not with the indicated concentration of TSST-1, in 96-well plates. Alternatively, CFSE-labeled T cells were stimulated with phytohemagglutinin (1 μg/mL) and human interleukin-2 (100 IU/mL). Proliferation was assessed after 3 days by analysis of the CFSE dilution on a BD FACScalibur and data were analyzed using FlowJo software.

Confocal microscopy analysis of immunological synapse assembly

CD4⁺ T cells (1×10⁶) were mixed with JY cells (1×10⁶) which were either unpulsed or pulsed with 10 ng/mL TSST-1, centrifuged for 2 min at 1500 rpm and incubated for 10 min at 37°C to allow conjugate formation. Cell conjugates were then allowed to sediment onto poly-L-lysine coated slides (Erie Scientific). After a total incubation time of 10, 25 or 60 min, cells were fixed for 15 min at room temperature with 3% paraformaldehyde and subsequently permeabilized with 0.1% saponin, 3% bovine serum albumin. One part of the cell conjugates was stained with phalloidin-AlexaFluor-488 (Molecular Probes) and with anti-WASP antibodies (H-250; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) followed by donkey anti-rabbit-AlexaFluor-555 antibodies (Invitrogen). Another part of the cell conjugates was stained with anti-α-tubulin IgG1 monoclonal antibodies (Sigma) followed by goat anti-mouse IgG1-AlexaFluor-488 antibodies (Invitrogen), anti-phosphotyrosine IgG2b monoclonal antibodies (clone pY99 from Santa Cruz Biotechnology) followed by goat anti-mouse IgG2b-AlexaFluor-633 antibodies (Invitrogen) and anti-CD45 IgG2a monoclonal antibodies (clone 9.4 produced from an hybridoma from the ATCC, Manassas, VA, USA) followed by goat anti-mouse IgG2a-AlexaFluor-546 antibodies. Slides were mounted with Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). Randomly selected conjugates were examined with a LSM 710 confocal microscope equipped with a x63-1.4 oil immersion Plan-Apochromat objective (Carl Zeiss AG, Jena, Germany).

Analysis of calcium mobilization

B-EBV cells (JY) were loaded with 10 ng/mL TSST-1 for 1 h at 37°C and then stained with 2 μM DDAO. Washed DDAO-labeled JY cells were then seeded onto poly-L-lysine-coated LabTek glass slides and incubated for 1 h at 37°C. In the meantime, T cells were labeled with 1 μM Fluo-4-AM (Molecular Probes) for 45 min at 37°C, washed and then dropped onto the JY-coated slides. Fluorescence measurements were done at 37°C/5% CO₂ on a Zeiss LSM-510 confocal microscope equipped with a x63-1.4 oil immersion Plan-Apochromat objective (Carl Zeiss AG). Images were collected with a zoom of 0.7, recorded every 17.9 sec and processed using the LSM software. The stability of T-cell/APC contacts was assessed by counting the proportion of T cells staying for 25 min within one cell diameter of their initial position, relative to the APC. To quantify changes in intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) at the single cell level, T cells were incubated with 2.5 μM Fura 2-AM (Molecular Probes) for 45 min at 37°C in Hepes-buffered RPMI supplemented with 5% fetal calf serum. TSST-1-pulsed JY cells (10 ng/mL) were allowed to adhere to poly-L-lysine-coated LabTek glass slides for 1 h at 37°C, before the addition of the Fura-2-loaded T cells. Fluorescence measurements were done at 37°C/5% CO₂ on a Zeiss axiovert 200M inverted microscope equipped with a charge-coupled device camera (Princeton Instruments, Trenton, NJ, USA), an arc-xenon lamp, a computer-controlled monochromator (PIL Photonics, Planegg, Germany) and a 40× oil-objective at 37°C, 5% CO₂. Cells were sequentially excited at 340 and 380 nm every 5 sec by the monochromator. The 510 nm-emission was collected with the charge-coupled device camera and analyzed with the calcium-imaging software, Metafluor (Universal Imaging, West Chester, PA, USA). Calculation of the 340 nm to 380 nm ratios corresponding to [Ca²⁺]_i rises was done on T cells forming prolonged conjugates with APC.

Results

Human CD4⁺ T cells require Wiskott-Aldrich syndrome protein for optimal activation by superantigen-loaded antigen-presenting cells

Untransformed CD4⁺Vβ2⁺ T cells from a healthy donor and a WASP-deficient WAS patient (Figure 1A-B) were compared for their ability to proliferate and produce cytokines in response to EBV-transformed B cells loaded with different concentrations of TSST-1, a superantigen known to stimulate CD4⁺Vβ2⁺ T cells. In contrast to control CD4⁺ T cells, WASP-deficient CD4⁺ T cells failed to proliferate in response to a dose of 1 ng/mL TSST-1 (Figure 1C). Although they did proliferate at higher doses (10 and 100 ng/mL), both the proportion and the number of cell divisions were reduced when compared to control cells (Figure 1C and *Online Supplementary Figure S1A*). The intrinsic ability of WAS T cells to proliferate was not affected since they proliferated normally in response to phytohemagglutinin plus interleukin-2 (Figure 1C). It is noteworthy that the proliferative capacity of WAS Vβ2⁺ CD4⁺ T cells upon APC stimulation was found to be less severely affected than that observed following stimulation with immobilized anti-CD3/CD28 monoclonal antibodies (*Online Supplementary Figure S1A-B*). The reduced proliferative capacity of WAS Vβ2⁺ CD4⁺ T cells was directly attributable to the lack of WASP expression since re-expression of WASP by means of a lentiviral vector led to improved APC- and anti-CD3/CD28 monoclonal antibody-evoked proliferation

(*Online Supplementary Figure S2A-B*). In line with the proliferative defect, when compared to T cells from healthy donors, only half of the WAS T cells produced interleukin-2 at all the TSST-1 doses tested (*Online Supplementary Figure S3*). The proportion of WAS cells that produced interferon-γ following TSST-1 stimulation was only moderately affected. More importantly, the amount of cytokines (interleukin-2 and interferon-γ) produced per cell, as assessed by mean fluorescence intensity, was strongly reduced in the WAS T cells at each dose of TSST-1 (*Online Supplementary Figure S3*). The intrinsic ability of the WAS T cells to produce interleukin-2 and interferon-γ did not, however, appear to be compromised, since PMA/ionomycin stimulation resulted in similar percentages of healthy donors' cells and WAS T cells producing cytokines. These data extend previous findings in the murine model of WAS¹⁸ by showing that, in the context of APC stimulation, human CD4⁺ T cells require WASP for optimal activation.

Aberrant morphology of Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient T cells upon contact with antigen-presenting cells

Given the actin reorganization activity of WASP, we studied the morphology of WAS CD4⁺ T cells at contact with APC, following staining of fixed conjugates with fluorescent phalloidin. A majority of control T cells entering in contact with unpulsed APC had a round morphology and F-actin was distributed as cortical actin and within short filopodia (morphological category "inert", Figure 2A-B). In contrast, a majority of WAS T cells contacting unpulsed APC displayed activated morphological appearances, including either distorted shapes with actin protrusions away from the APC (morphological category "distorted") or elongated shapes wrapping the APC with one pole enriched in actin (morphological category "kinapse") (Figure 2A-B). As expected, upon contact with TSST-1-loaded APC, most control T cells displayed a round or slightly flattened shape with short actin-rich protrusions contacting the APC (morphological category "synapse", Figure 2A-B). In contrast again, the majority of WAS T cells contacting TSST-1-loaded APC belonged to the morphological categories "distorted" or "kinapse" (Figure 2A-B). The aberrant morphology of WAS T cells did not, however, result in a reduced ability to form conjugates with APC (*Online Supplementary Figure S4*). Together, these data suggest that in the context of WASP deficiency, actin reorganization and cell shape remodeling upon APC encounter do not proceed in a tightly controlled or focused way.

Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient CD4⁺ T cells fail to assemble focused immunological synapses

We then tested the hypothesis that aberrant actin reorganization and morphology of WAS CD4⁺ T cells may result in the assembly of an IS with abnormal structure and altered signaling capabilities. The size of the mature IS formed after 25 min of conjugation and the distribution of markers of T-cell polarization (MTOC), molecular segregation (CD45) and TCR engagement (phosphorylated tyrosine, pTyr) were investigated by analyzing confocal planes spanning the center of conjugate contact areas and by visualizing 3-D reconstructions of z-stack series. In agreement with the propensity of WAS T cells to adopt a kinapse-type morphology, WAS CD4⁺ T cells in contact with TSST-1-loaded APC appeared to have a slightly increased IS length as compared to control cells (Figures 3 and 4A). IS length

returned to normal following lentiviral vector-mediated correction of WASP expression. In both healthy donors' cells and WAS CD4⁺ T cells, contact with TSST-1-loaded APC induced polarization of the MTOC towards the contact area (Figure 3). However, measurement of the distance between the MTOC and IS center showed that WAS CD4⁺ T cells did not fully polarize their MTOC toward the IS center (Figure 4A). This defect was directly linked to WASP deficiency since transfer of WAS gene led to full MTOC polarization (Figure 4A). Stimulation of healthy donors' cells and WAS CD4⁺ T cells with TSST-1-loaded APC induced similarly high CD45 exclusion from the synaptic area (Figures 3 and 4A). We did, however, note that when in contact with unpulsed APC, WAS CD4⁺ T cells displayed a significant level of CD45 exclusion, which was not observed in control cells. Intense phosphorylation of tyrosine residues was induced in most of the healthy donors' cells and WAS CD4⁺ T cells upon conjugation with TSST-1-loaded APC (Figure 3). However, tyrosine phosphorylation in WAS T cells appeared to be more dispersed than that in control T cells and could be detected both inside and outside the confinements of the contact areas (Figure 3). When comparing the ratio of pTyr intensity at the IS and that outside the IS, WAS T cells were clearly less efficient than control T cells in enriching pTyr specifically at the IS (Figure 4A). The defect in focusing pTyr at the IS was directly attributed to WASP deficiency since WAS gene transfer corrected this defect. Analysis of the pTyr staining fluorescence intensity along the perimeter of WAS CD4⁺ T cells indicated that, in contrast to control cells, pTyr activation occurred at dispersed islands, both inside and outside the confinements of the IS area (one representative cell is shown in Figure 4B and three additional cells are shown in *Online Supplementary Figure S5A*). The dispersed pTyr activation of WAS T cells can also be well appreciated in 3-D animations from additional conjugates (*Online Supplementary Videos 1-6*). Following stimulation with superantigen-pulsed APC, normal T cells displayed a phosphorylated CD3 ζ (pCD3 ζ) signal at the IS appearing as dots coincident with the pTyr staining (*Online Supplementary Figure S5B-C*), thereby indicating a productive engagement of the TCR activation complex. In WAS T cells, although the signal for pCD3 ζ appeared weaker, it was observed in association with the pTyr staining both inside and outside the confinements of the IS (*Online Supplementary Figure S5B-C*). These data suggest that the sites of TCR signaling follow an abnormally dispersed pattern in WAS T cells. However, this abnormal localization of TCR activation did not result in an abnormal rate of TCR down-regulation (*Online Supplementary Figure S6*). The above-mentioned data revealing incomplete polarization and unfocused activation of WAS T cells were obtained from the study of T cells engaged in conjugates with APC for the intermediate period of 25 min. To provide a kinetic assessment of the WAS T cell phenotype, MTOC polarization and pTyr activation were measured in parallel in WAS and healthy donors' T cells after 10, 25 and 60 min of APC contact. The inability of WAS T cells to fully polarise the MTOC was already present at 10 min and extended over 60 min (*Online Supplementary Figure S7*). Interestingly, WAS T cells appeared to have a fairly normal capacity to induce pTyr at the IS after 10 min of contact with superantigen-pulsed APC, but failed to maintain this marker of activation at later time points. Collectively, this spatio-temporal analysis of the IS architecture indicates that WAS T cells fail to properly polarize the MTOC towards

the IS center and that although they initially activate pTyr in the confinement of the IS, they fail to sustain active signaling at the IS.

Abnormal behavior and erratic intracellular calcium mobilization in Wiskott-Aldrich syndrome CD4⁺ T cells upon encounter with superantigen-loaded antigen-presenting cells

Using time-lapse microscopy, we then evaluated the dynamic behavior of WAS CD4⁺ T cells at contact with APC. In parallel, the ability of these cells to be efficiently activated was assessed by single-cell [Ca²⁺]_i measurements. Upon encounter with a TSST-1-loaded APC, control CD4⁺ T cells rapidly stopped their locomotion to form prolonged and relatively stable conjugates with the APC (Figure 5A). A limited scanning activity was observed in the form of cycles of membrane protrusions and retractions at the edges of the T-cell/APC contact (*Online Supplementary Video 7*). In contrast, most WAS CD4⁺ T cells displayed an abnormal behavior, in agreement with the aberrant morphologies observed in fixed cells. WAS CD4⁺ T cells appeared prone to adopt an elongated morphology associated with prolonged migratory activity along the APC surface (Figure 5A and *Online Supplementary Video 8*). A quantitative analysis comparing 50 healthy donors' cells and 50 WAS T cells revealed that although WAS CD4⁺ T cells established prolonged contacts with APC, a reduced proportion of these cells was able to engage in stable contacts (Figure 5B). Since T cells had been pre-loaded with the Fluo-4 dye, we could investigate

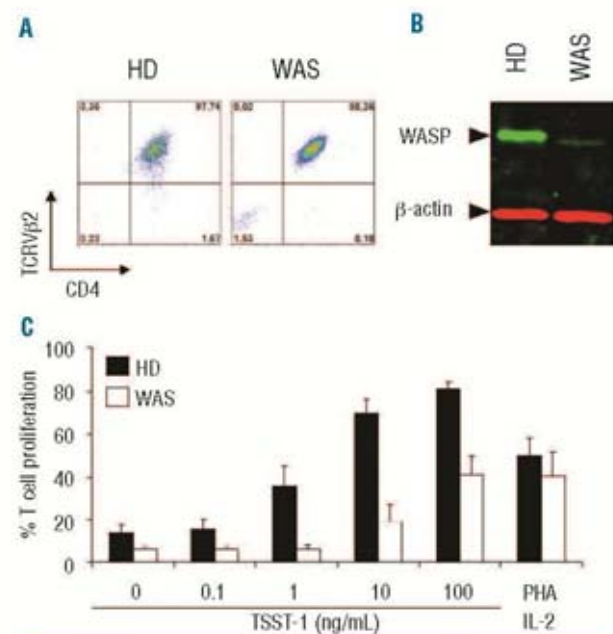


Figure 1. WASP is required for optimal APC-induced T cell activation. (A) CD4⁺Vβ2⁺ T-cell lines generated from a healthy donor (HD) and a WAS patient (WAS) were assessed for their purity. (B) WASP expression levels were confirmed in these lines by western blot analysis. (C) CFSE-labeled HD and WAS T cells were stimulated with EBV-B cells (APC) loaded with the indicated concentrations of the super-antigen TSST-1 (or PHA/IL-2, 1 μg/mL/100 IU/mL). Dilution of CFSE in dividing cells was assessed by flow cytometry 3 days after stimulation.

whether the abnormal behavior of WAS T cells on contact with APC was associated with a reduced ability to mobilize intracellular calcium. Whereas control CD4⁺ T cells displayed a rapid and prolonged rise in calcium as they formed a stable contact with APC, WAS CD4⁺ T cells showed only intermittent increases in calcium, as they were scanning the APC (Figure 5A and *Online Supplementary Video 7, 8*). To assess calcium signaling in WAS CD4⁺ T cells more precisely, [Ca²⁺]_i fluxes were measured at the single-cell level using the Fura-2 dye. CD4⁺ T cells interacting with unpulsed APC exhibited either no or only very transient patterns of calcium mobilization (*data not shown*). As shown by the representative examples depicted in Figure 5C, most control T cells exhibited a rapid and steady burst of calcium mobilization upon encountering a TSST-1-loaded APC. In contrast, WAS CD4⁺ T cells displayed irregular and very unstable calcium mobilization patterns, with intermittent spikes occur-

ring periodically. A quantitative analysis comparing 13 healthy donors' cells and 16 WAS T cells revealed that the maximum [Ca²⁺]_i (usually corresponding to the rapid initial calcium rise) reached comparable values in both types of cells (Figure 5D), indicating that WAS T cells were normally sensitive to TSST-1 at the surface of the APC. However, further analysis confirmed that the calcium levels in WAS T cells were less stable than in T cells from healthy donors since the time spent above a theoretical 50% threshold (half way between maximum Fura-2 ratio and the minimum ratio) was lower in WAS T cells than in healthy donors' cells over a fixed period of time after the initial peak (Figure 5D). Furthermore, measurement of the time before a cell reached the 50% threshold after the initial burst of calcium clearly showed that WAS T cells were not able to maintain a sustained intracellular calcium level following APC contact (Figure 5F). In conclusion, our data clearly indicate that WAS

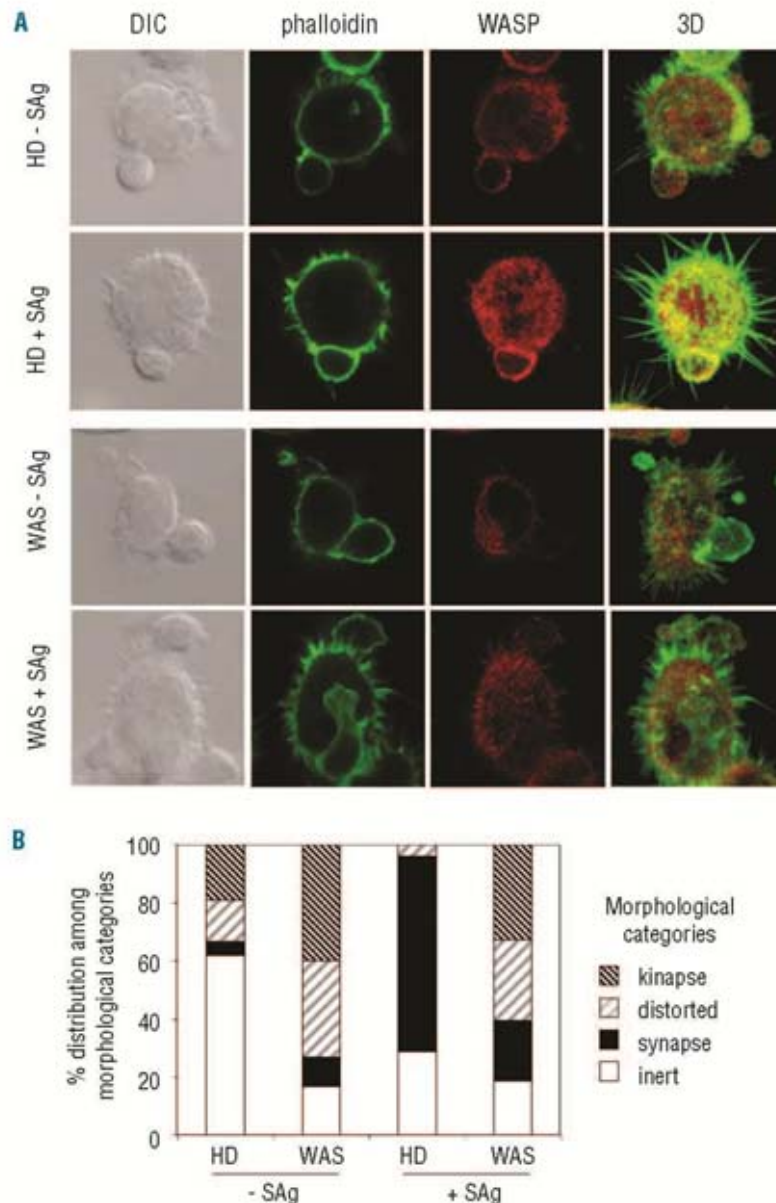


Figure 2. Abnormal morphology of WASP-deficient T cells. (A) Healthy donor (HD) and WAS CD4⁺Vβ2⁺ T cells were incubated for 30 min with APC pulsed with 10 ng/mL TSST-1 (+SAg) or not (-SAg). Cells were then fixed and stained for F-actin (green) and WASP (red). One representative T-cell/APC conjugate per condition is shown as a 3-D reconstruction from confocal sections. (B) HD and WAS T cells were classified into four morphological categories: round shape without actin-rich protrusions (inert); round or slightly flattened shape with actin-rich protrusions in contact with the APC (synapse); round to distorted shape with diverse actin protrusions away from the APC (distorted); elongated shape wrapping the APC with one pole enriched in actin (kinapse). Seventy-three T cells of each type were considered for the morphology evaluation. The presented data are representative of three experiments with one patient and three additional experiments with another patient.

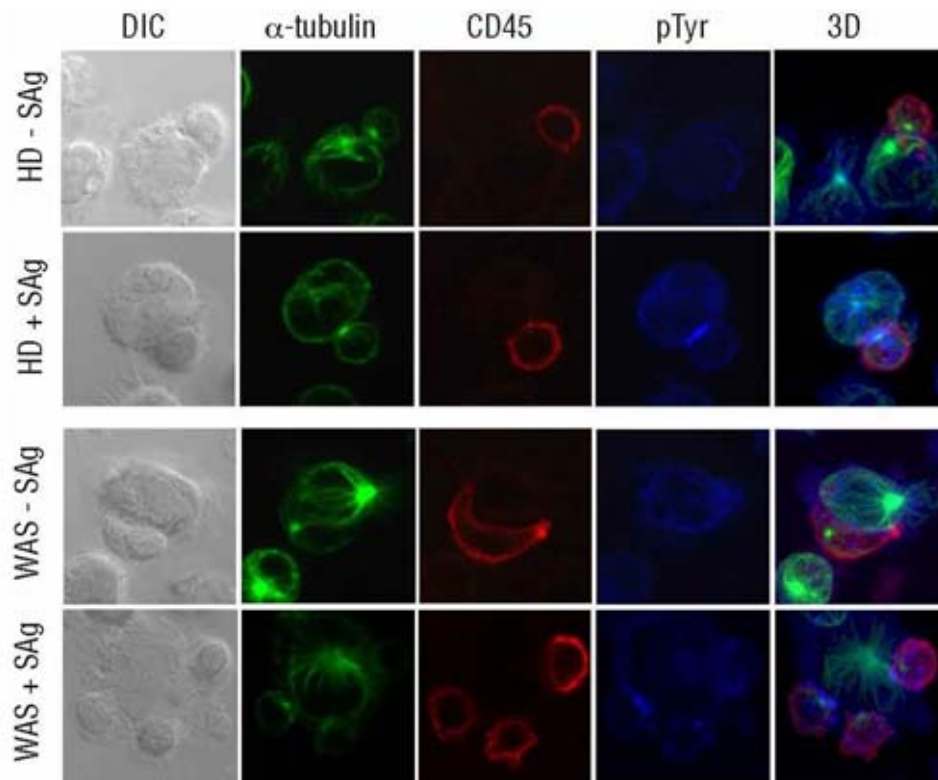


Figure 3. Structural and molecular defects at the WAS T cell IS. Healthy donor (HD) and WAS CD4⁺Vβ2⁺ T cells were incubated for 30 min with APC pulsed with 10 ng/mL TSST-1 (+SAg) or not (-SAg). Cells were then fixed and stained for α-tubulin (green), CD45 (red) and phosphotyrosine (blue). Representative T-cell/APC conjugates are shown as transmission light (DIC), confocal sections through the IS plane and 3-D reconstruction (overlay of α-tubulin, CD45 and phosphotyrosine). The presented data are from one experiment representative of six experiments. Similar data were obtained with T-cell lines from a distinct WAS patient and healthy donor.

T cells can undergo an initial rise in $[Ca^{2+}]_i$ similarly to control cells, but that they fail to maintain a sustained calcium flux, necessary for optimal T-cell activation.

Discussion

By providing a comprehensive view on the contribution of the actin regulator WASP to IS assembly, this study contributes to a better understanding of the complex interplay between actin dynamics and the regulation of TCR-driven signaling. Time-lapse and 3-D microscopy analysis of primary T-cell lines derived from WAS patients showed that WASP is required for the morphological stabilization of T cells upon APC encounter. In association with their aberrant morphology, WASP-deficient T cells assemble a poorly focused IS, characterized by incomplete polarization, spatially dispersed TCR signaling and erratic calcium mobilization. These defects may underlie, at least in part, the functional defect of WAS T cells which are characterized by reduced proliferation and cytokine production.

The elongated morphology of WAS T cells upon APC conjugation supports the notion that WASP is not necessary for the formation of the lamellipodium during IS assembly, a step that appears to be under the control of the WASP-family protein WAVE2.¹⁷ Murine models have yielded contradictory results on whether WASP participates in the cytoskeletal architecture of the IS.^{14,15,19} Our live and 3-D microscopy data on T cells from WAS patients strongly support a major role of WASP in shaping the T-cell cytoskeletal architecture during an APC encounter and IS assembly. Indeed, WAS T cells display an aberrant morphology, form abnormal actin-rich protrusions and polarize their MTOC

incompletely. This phenotype is consistent with the disorganized cytoskeleton polarization of WASP-deficient T cells in response to immobilized anti-CD3 monoclonal antibody²⁰ and chemokines.²¹ It is also in line with the finding that Arp2/3 knocked-down T cells produce disorganized actin-rich protrusions over the APC surface.²² The incomplete polarization of the MTOC is also in agreement with the reduced ability of cytotoxic T lymphocytes from WAS patients to fully polarize their lytic granules towards the IS center.¹⁸ The observation that a substantial proportion of WAS T cells is abnormally elongated and motile at the contact with APC is reminiscent of the recently described motile synapse, termed kinapse and characterized as a moving adhesive junction, with a leading lamellipodium.²³ A role for WASP in setting a synapse behavior, rather than a kinapse behavior, is supported by the finding that WASP promotes IS symmetry to counteract PKC-θ-mediated IS destabilization, in a model of naïve WASP-KO T cells interacting with lipid bilayers presenting peptide-MHC complexes.¹⁶ However, the aberrant actin structures observed in a number of WAS T cells suggest that WASP deficiency does not simply result in the formation of physiological kinapses as an alternative to classical synapses, but rather results in the formation of non-physiological unstable synapses.

Our data show that even if WAS T cells assemble unstable synapses, they maintain the ability to form prolonged conjugates with APC, as previously reported,^{15,24} and to engage their TCR. Activation defects in WAS T cells are, therefore, most likely related to the abnormal IS structure and molecular organization. Our study strongly suggests that WASP links controlled remodeling of actin-rich structures at the IS and positioning of the MTOC to the distribu-

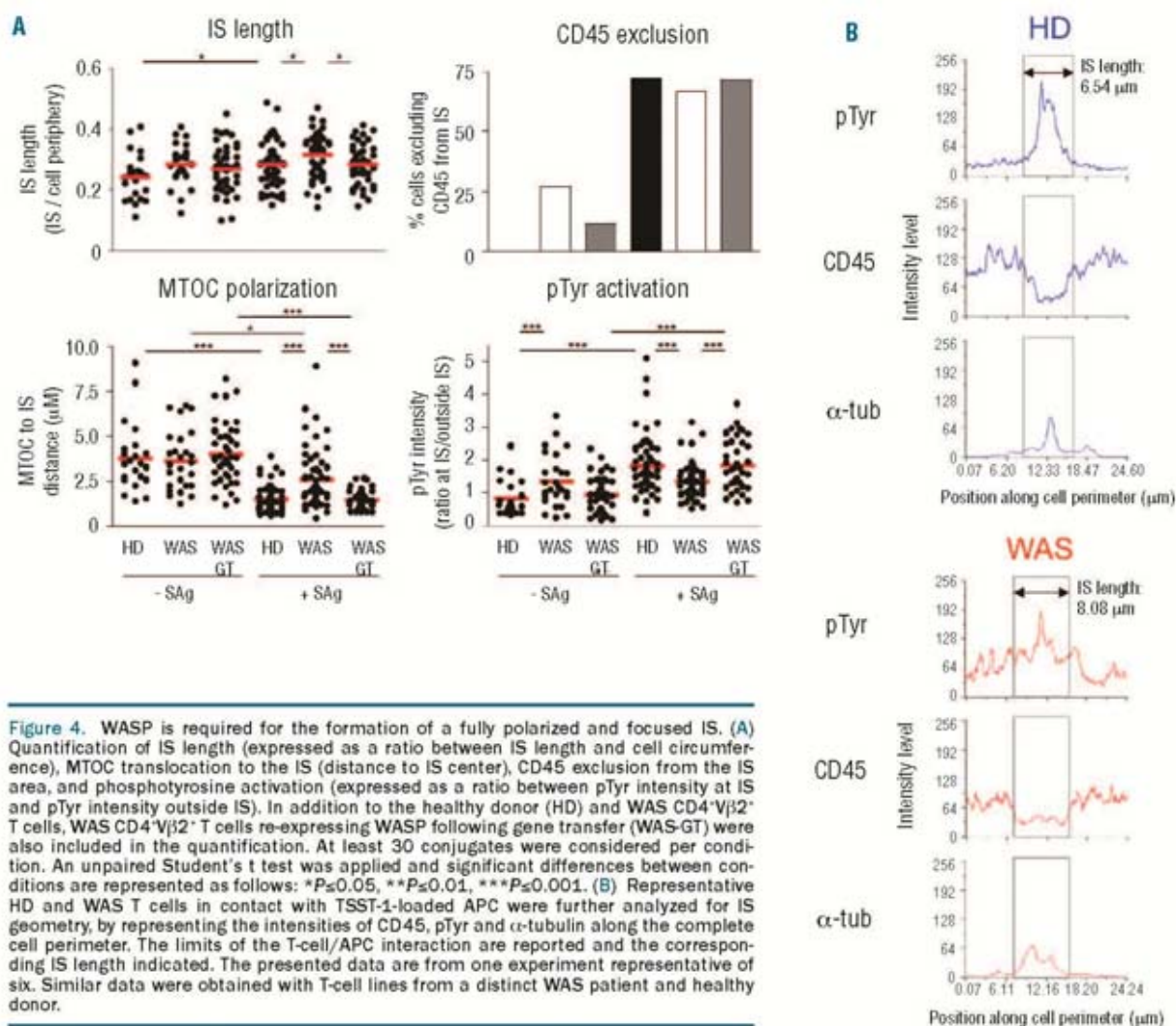


Figure 4. WASP is required for the formation of a fully polarized and focused IS. (A) Quantification of IS length (expressed as a ratio between IS length and cell circumference), MTOC translocation to the IS (distance to IS center), CD45 exclusion from the IS area, and phosphotyrosine activation (expressed as a ratio between pTyr intensity at IS and pTyr intensity outside IS). In addition to the healthy donor (HD) and WAS CD4⁺V β 2⁺ T cells, WAS CD4⁺V β 2⁺ T cells re-expressing WASP following gene transfer (WAS-GT) were also included in the quantification. At least 30 conjugates were considered per condition. An unpaired Student's t test was applied and significant differences between conditions are represented as follows: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. (B) Representative HD and WAS T cells in contact with TSST-1-loaded APC were further analyzed for IS geometry, by representing the intensities of CD45, pTyr and α -tubulin along the complete cell perimeter. The limits of the T-cell/APC interaction are reported and the corresponding IS length indicated. The presented data are from one experiment representative of six. Similar data were obtained with T-cell lines from a distinct WAS patient and healthy donor.

tion of signaling complexes during TCR activation. This is in part supported by the fact that the WAS T-cell polarization defect appears to precede the activation defect. Indeed, our kinetic study indicates that the reduced ability to polarize the MTOC towards the APC is already present early after conjugate formation, while pTyr activation is normally focused within the early IS, but then becomes abnormally spread at later times. The distribution of pTyr staining outside the IS confinement in WAS T cells is in accordance with the role of Arp2/3-dependent actin remodeling in promoting central TCR/MHC accumulation.²⁵ Very interestingly, the actin cytoskeleton has recently been proposed to play a key role in the formation and motility of TCR microclusters observed in T cells contacting planar membrane bilayers as surrogate APC.²⁴ Although we could not assess whether WASP participates in actin-driven TCR microcluster dynamics in T-cell/APC conjugates, we did verify that the dots of pTyr activation were coincident with the activation of the TCR/CD3 complex, as revealed by specific staining for pCD3 ζ . It remains to be investigated whether the abnormal spatial activation of WAS T cells applies to other key signaling molecules of

the TCR activation complex. The dispersed distribution of TCR-driven activation may prevent coordinated signal integration, thereby resulting in the erratic pattern of calcium mobilization observed in WAS T cells. Indeed, the flux of [Ca²⁺]_i has been shown to result from the collection of individual TCR stimulation events occurring at the IS.²⁷ If, in addition, one considers the high motility of WAS T cells on APC, it is possible that the dispersed foci of pTyr are transient and only deliver short shots of activation. Such a dispersed and transient activation pattern could prove sufficient to induce efficient TCR internalization, similarly to the situation described for motile naïve T cells in lymph nodes.²⁸ However, it may not enable sustained calcium mobilization. This hypothesis is supported by the finding that recently activated T cells forming kinapses *in vivo* engage their TCR efficiently but fail to accumulate the signaling molecule LAT at the IS and emit only short calcium spikes.²⁹ Since an initial wave of [Ca²⁺]_i is required for the stop signal³⁰ and since the [Ca²⁺]_i signaling pattern regulates the shape and stability of T cells contacting APC,³¹ it may be argued that a primary defect in calcium mobilization is responsible for the phenotype of WAS T cells. However,

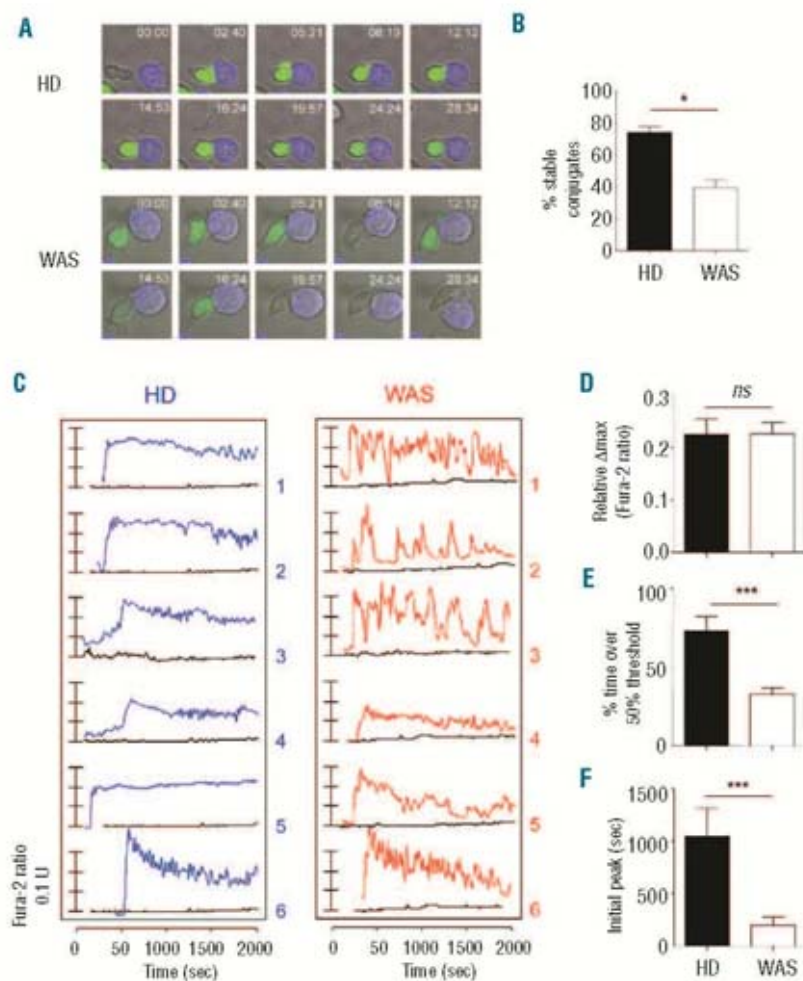


Figure 5. Erratic calcium mobilization in WAS T cells. (A) Movie sequences over 28 min 34 sec of CD4⁺V β 2⁺ T cells from a healthy donor (HD) and a WAS patient interacting with B-EBV B cells (blue) pulsed with 10 ng/mL TSST-1. T cells were loaded with Fluo-4 to visualize the rise in intracellular calcium concentration (green). The representative HD T cell forms a relatively stable contact with the APC and displays a sustained rise in intracellular calcium, whereas the representative WAS T cell forms an unstable contact with the APC and displays intermittent rises in intracellular calcium. (B) The relative proportion of stable T/APC contacts was assessed by considering 50 HD and 50 WAS T cells contacting an APC for at least 25 min. A stable contact was defined as a T cell staying for 25 min within one cell diameter of its initial position, relative to the APC. The data shown were obtained from 18 video sequences and correspond to the mean \pm SEM of three independent experiments. *P* values were calculated using a two-tailed Mann-Whitney test. (C) Measurements of the 340 nm to 380 nm ratios corresponding to [Ca²⁺]_i mobilization in six representative Fura 2-AM-labeled HD and WAS T cells forming prolonged conjugates with TSST-1-pulsed APC. (D) The relative maximum calcium variation (Δ_{max}) per cell was calculated by subtracting the median value of the ten lowest 340/380 (I_{min}) ratio values to the median of the ten highest ratio values (I_{max}) observed in individual cells over a fixed period of time of 30 min. (E) The 50% threshold value was calculated for each individual cell over a fixed period of time (30 min) as (I_{max}-I_{min})/2. The percent of time spent over that threshold value was then determined on a single cell basis over the same fixed period of time. (F) The initial peak duration corresponds to the amount of time the intracellular calcium ratio stayed over the 50% threshold after the initial calcium peak. Values represented in the analysis (D-F) correspond to 13 (HD) and 16 (WAS) individual T cells analyzed in a total of three independent experiments. *P* values were calculated using a two-tailed Mann and Whitney test.

the fact that WAS T cells show no defect in the intensity of the initial wave of [Ca²⁺]_i, but fail to maintain sustained [Ca²⁺]_i strongly indicates that the abnormal calcium mobilization pattern is a consequence rather than a cause of the disorganized WAS T-cell IS. Previous studies have failed to detect major TCR proximal signaling defects in WASP-deficient T cells, apart from a partially reduced calcium mobilization.^{9,32} Our data strongly suggest that this global reduction is due to erratic calcium mobilization at the single cell level. It is conceivable that this abnormal pattern of calcium mobilization plays a major role in the reduced activation of WASP-deficient T cells following antigen stimulation. In the context of APC, the proliferation and cytokine production defects of WASP-deficient CD4⁺ T-cell lines appeared less pronounced than those previously observed after stimulation with anti-CD3/CD28 monoclonal antibodies (Online Supplementary Figure 1A-B), and would, therefore, be compatible with the observed calcium mobilization defect. In agreement, studies conducted in WASP-KO mice have shown only partially reduced to even normal T-cell proliferation or interleukin-2 production in response to APC stimulation.^{15,33,34} Furthermore, reduction in proliferation and production of cytokines has been attributed to, at least in part, compromised TCR-mediated NFAT-transcrip-

tional activation,³⁵ a pathway highly sensitive to fluctuations in [Ca²⁺]_i.³⁶

In conclusion, our study shows that, following an APC encounter, the actin regulator WASP controls spatial confinement of TCR activation at the IS. Our data further link focused TCR activation to sustained calcium flux and downstream activation. In apparent contrast with our findings, a role for WASP in the nucleus of T cells has been recently established, showing that it controls the transcriptional regulation of T-bet at the chromatin level.¹⁷ We, therefore, need to consider that WASP may play parallel but non-redundant roles in distinct intracellular compartments, converging towards a fine-tuning of key signaling pathways and transcriptional programs.

Authorship and Disclosures

The information provided by the authors about contributions from persons listed as authors and in acknowledgments is available with the full text of this paper at www.haematologica.org.

Financial and other disclosures provided by the authors using the ICMJE (www.icmje.org) Uniform Format for Disclosure of Competing Interests are also available at www.haematologica.org.

References

- Monks C, Freiberg B, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*. 1998;395(6697):82-6.
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science (New York, NY)*. 1999;285(5425):221-7.
- Dustin ML. The cellular context of T cell signaling. *Immunity*. 2009;30(4):482-92.
- Valitutti S, Dessing M, Aktories K, Gallati H, Lanzavecchia A. Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J Exp Med*. 1995;181(2):577-84.
- Dustin ML, Cooper JA. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol*. 2000;1(1):23-9.
- Billadeu DD, Nolz JC, Gomez TS. Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(2):131-43.
- Thrasher AJ, Burns SO. WASP: a key immunological multitasker. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):182-92.
- Trifari S, Sitia G, Aiuti A, Scaramuzza S, Marangoni F, Guidotti LG, et al. Defective Th1 cytokine gene transcription in CD4+ and CD8+ T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients. *J Immunol*. 2006;177(10):7451-61.
- Dupre L, Aiuti A, Trifari S, Martino S, Saracco F, Bordignon C, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity*. 2002;17(2):157-66.
- Cannon JL, Labno C, Bosco G, Seth A, McGavin H, Siminovich K, et al. WASP recruitment to the T cell:APC contact site occurs independently of Cdc42 activation. *Immunity*. 2001;15(2):249-59.
- Bunnell SC, Kapoor V, Tribble RP, Zhang W, Samelson LE. Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT. *Immunity*. 2001;14(3):315-29.
- Barda-Saad M, Braiman A, Titerence R, Bunnell SC, Barr VA, Samelson LE. Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton. *Nat Immunol*. 2005;6(1):80-9.
- Nolz JC, Gomez TS, Zhu F, Li S, Medeiros RB, Shimizu Y, et al. The WAVE2 complex regulates actin cytoskeletal reorganization and CRAC-mediated calcium entry during T cell activation. *Curr Biol*. 2006;16(1):24-34.
- Badour K, Zhang J, Shi F, McGavin MK, Rampersad V, Hardy LA, et al. The Wiskott-Aldrich syndrome protein acts downstream of CD2 and the CD2AP and PSTPIP1 adaptors to promote formation of the immunological synapse. *Immunity*. 2003;18(1):141-54.
- Cannon JL, Burkhardt JK. Differential roles for Wiskott-Aldrich syndrome protein in immune synapse formation and IL-2 production. *J Immunol*. 2004;173(3):1658-62.
- Sims TN, Soos TJ, Xenias HS, Dubin-Thaler B, Hofman JM, Waite JC, et al. Opposing effects of PKC θ and WASp on symmetry breaking and relocation of the immunological synapse. *Cell*. 2007;129(4):773-85.
- Taylor MD, Sadhukhan S, Kottagada P, Ramgopal A, Sarkar K, D'Silva S, et al. Nuclear role of WASp in the pathogenesis of dysregulated Th1 immunity in human Wiskott-Aldrich syndrome. *Sci Transl Med*. 2010;2(37):37ra44.
- De Meester J, Calvez R, Valitutti S, Dupre L. The Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates CTL cytotoxicity and is required for efficient killing of B cell lymphoma targets. *J Leukoc Biol*. 2010;88(5):1031-40.
- Badour K, Zhang J, Shi F, Leng Y, Collins M, Siminovich KA. Fyn and PTP-PEST-mediated regulation of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) tyrosine phosphorylation is required for coupling T cell antigen receptor engagement to WASP effector function and T cell activation. *J Exp Med*. 2004;199(1):99-112.
- Gallego MD, Santamaria M, Pena J, Molina JJ. Defective actin reorganization and polymerization of Wiskott-Aldrich T cells in response to CD3-mediated stimulation. *Blood*. 1997;90(8):3089-97.
- Gallego MD, de la Fuente MA, Anton IM, Snapper S, Fuhlbrigge R, Geha RS. WIP and WASP play complementary roles in T cell homing and chemotaxis to SDF-1 α . *Int Immunol*. 2006;18(2):221-32.
- Gomez TS, Kumar K, Medeiros RB, Shimizu Y, Leibson PJ, Billadeu DD. Formins regulate the actin-related protein 2/3 complex-independent polarization of the centrosome to the immunological synapse. *Immunity*. 2007;26(2):177-90.
- Dustin ML. Cell adhesion molecules and actin cytoskeleton at immune synapses and kinapses. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(5):529-33.
- Krawczyk C, Oliveira-dos-Santos A, Sasaki T, Griffiths E, Ohashi PS, Snapper S, et al. Vav1 controls integrin clustering and MHC/peptide-specific cell adhesion to antigen-presenting cells. *Immunity*. 2002;16(3):331-43.
- Tskvitaris-Fuller I, Rozelle AL, Yin HL, Wulfig C. Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization. *J Immunol*. 2003;171(5):2287-95.
- Campi G, Varma R, Dustin ML. Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J Exp Med*. 2005;202(8):1031-6.
- Irvine DJ, Purbhoo MA, Krogsgaard M, Davis MM. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature*. 2002;419(6909):845-9.
- Friedman RS, Beemiller P, Sorensen CM, Jacobelli J, Krummel MF. Real-time analysis of T cell receptors in naive cells in vitro and in vivo reveals flexibility in synapse and signaling dynamics. *J Exp Med*. 2010;207(12):2733-49.
- Azar GA, Lemaire F, Robey EA, Bousso P. Subcellular dynamics of T cell immunological synapses and kinapses in lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(8):3675-80.
- Negulescu PA, Krasieva TB, Khan A, Kerschbaum HH, Cahalan MD. Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity*. 1996;4(5):421-30.
- Donnadieu E, Bismuth G, Trautmann A. Antigen recognition by helper T cells elicits a sequence of distinct changes of their shape and intracellular calcium. *Curr Biol*. 1994;4(7):584-95.
- Zhang J, Shehabeldin A, da Cruz LAG, Butler J, Soman A-K, McGavin M, et al. Antigen receptor-induced activation and cytoskeletal rearrangement are impaired in Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient lymphocytes. *J Exp Med*. 1999;190(9):1329-41.
- Marangoni F, Trifari S, Scaramuzza S, Panaroni C, Martino S, Notarangelo LD, et al. WASP regulates suppressor activity of human and murine CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) natural regulatory T cells. *J Exp Med*. 2007;204(2):369-80.
- Le Bras S, Massaad M, Koduru S, Kumar L, Oyoshi MK, Hartwig J, et al. WIP is critical for T cell responsiveness to IL-2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(18):7519-24.
- Cianferoni A, Massaad M, Feske S, de la Fuente MA, Gallego L, Ramesh N, et al. Defective nuclear translocation of nuclear factor of activated T cells and extracellular signal-regulated kinase underlies deficient IL-2 gene expression in Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(6):1864-71.
- Oh-hora M, Rao A. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(3):250-8.

The Wiskott-Aldrich syndrome protein permits assembly of a focused immunological synapse enabling sustained T-cell receptor signaling

Ronan Calvez,^{1,2} Fanny Lafouresse,^{1,2} Julie De Meester,^{1,2} Anne Galy,³ Salvatore Valitutti,^{1,2} and Loïc Dupré^{1,2}

¹INSERM, U1043, Toulouse, France; ²Université Toulouse III Paul-Sabatier, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France and ³INSERM, U951, Génomexon, Evry, France

Citation: Calvez R, Lafouresse F, De Meester J, Galy A, Valitutti S, and Dupré L. The Wiskott-Aldrich syndrome protein permits assembly of a focused immunological synapse enabling sustained T-cell receptor signaling. *Haematologica* 2011;96(10):1415-1423. doi:10.3324/haematol.2011.040204

Supplementary Design and Methods

Cell lines

CD4⁺ T cells were isolated by negative depletion using Rosette Sep (StemCell Technologies). CD4⁺Vβ2⁺ T cells were then positively selected by incubating the CD4⁺ T cells with an anti-T-cell receptor (TCR) Vβ2 monoclonal antibody (Beckman Coulter) followed by magnetic sorting using beads coated with GAM-antibody (Miltenyi). CD4⁺Vβ2⁺ T cells were cultured in RPMI 1640, 5% human serum and 100 U/mL human interleukin-2. They were expanded by repeated stimulation every 19-21 days with either anti-CD3/CD28 coated beads¹ or feeder cells.² Cell purity was assessed by flow cytometry (FACSscan, Becton Dickinson) using fluorescein isothiocyanate-labeled anti-CD4 monoclonal antibody (Becton Dickinson) and phycoerythrin-labeled anti-T-cell receptor Vβ2 (Beckman Coulter) and was routinely between 95% and 99% pure. To restore WASP expression stably in WAS CD4⁺Vβ2⁺ T cells, a single transduction was performed as previously described³ with the w1.6W lentiviral vector (VSVg-pseudotyped self-inactivating lentiviral vector containing human WAS promoter/cDNA in its clinical configuration: pCCL backbone and mutated WPRE sequence⁴). Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B cells (JY) were cultured in RPMI 1640, supplemented with 10% fetal calf serum, non-essential amino acids, sodium pyruvate, penicillin, streptomycin and 50 μM 2-mercaptoethanol. For superantigen loading, JY cells were incubated with the indicated concentration of TSST-1 for 1 h at 37°C/5% CO₂ in complete medium and washed twice to remove unbound TSST-1.

Intracytoplasmic cytokine staining

T cells (1×10⁶) were stimulated with an equal number of CMFDA-labeled B-EBV cells (JY) preloaded with the indicated concentration of TSST-1, or with PMA (0.25 μM) plus ionomycin (2.5 μM). Brefeldin A (BD Plug) was added, at a concentration of 1 μg/mL, after 1 h of stimulation to promote cytokine accumulation, and the incubation was carried on for another 3 h. Cells were then collected, fixed in BD Perm/Fix solution, stained with anti-human interleukin-2-phycoerythrin or anti-human interferon-γ-Alexa647 monoclonal antibodies (BD Pharmingen) and analyzed on a FACSCalibur. Data were analyzed using FlowJo software.

Detection of CD3ζ phosphorylation by confocal microscopy

Healthy donors' cells and WAS CD4⁺Vβ2⁺ T cells were incubated for 25 min with APC pulsed with 10 ng/mL TSST-1. Cell conjugates were then fixed and stained with anti-phosphotyrosine monoclonal antibodies (clone pY99 from Santa Cruz Biotechnology) and with anti-pCD3ζ antibodies (rabbit monoclonal antibody recognizing pY142 from Eptomics, Burlingame, CA, USA).

Analysis of cell morphology and immunological synapse structure from confocal images

T-cell morphology and F-actin distribution were analyzed by examining the phalloidin-stained conjugates along the z-axis. Three-dimensional images were obtained by processing z-stacks (approximately 30 stacks per conjugate) with Imanis software (Bitplane AG, Zurich, Switzerland). For the study of immunological synapse (IS) structure, images (planes through the center of the IS and 3-dimensional reconstructions) were obtained without processing with the Zen file browser (Carl Zeiss). Using single planes through the center of the IS, IS length and markers of T-cell polarization (MTOC) distance to IS center were measured using the single line function of MetaMorph software (Universal Imaging Corporation). The relative distribution of CD45 and pTyr inside and outside the IS area was obtained from the corresponding staining intensity profile along the cell perimeter, using MetaMorph software (line scan width 6). CD45 was considered excluded from the IS when the corresponding staining intensity was higher outside than inside the IS area. Phosphotyrosine activation at the IS was assessed as the ratio between pTyr intensity at the IS *versus* pTyr intensity outside the IS.

Measurement of the rate of conjugate formation

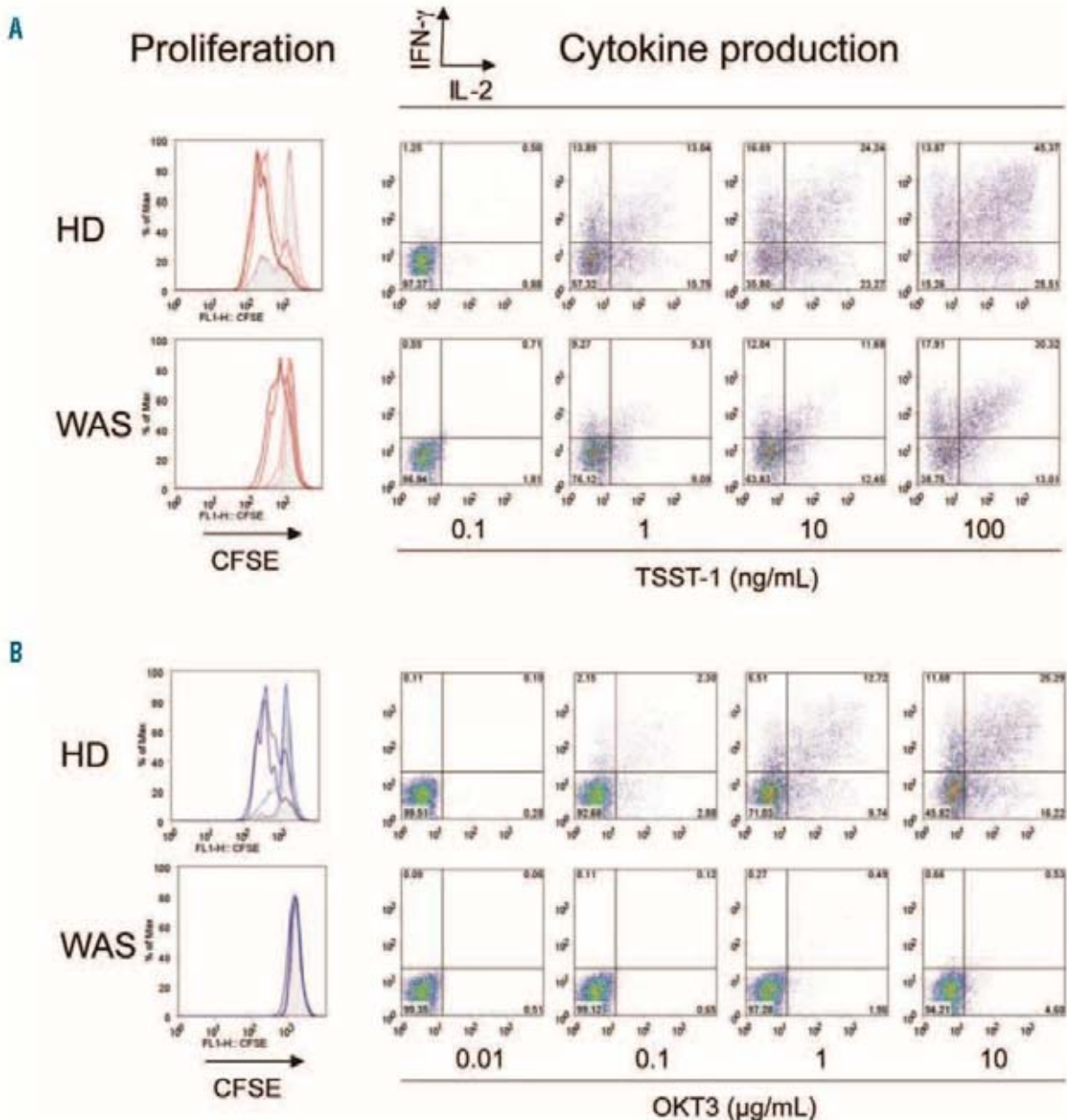
JY cells were pulsed with 10 ng/mL TSST-1, labeled with 1 μM CMTMR, washed and resuspended at a cell density of 4×10⁶/mL. T cells were labeled with 0.5 μM CMFDA and resuspended at 4×10⁶/mL. T cells and B cells (100 μL of each) were mixed in a 5 mL FACS tube, sedimented by centrifugation and incubated for various time at 37°C. After incubation, conjugates were fixed in 4% PFA and read on a BD FACScalibur. The percentage of T cells was defined as the proportion of CMTMR/CMFDA⁺ events within the CMFDA⁺ population.

T-cell receptor down-regulation

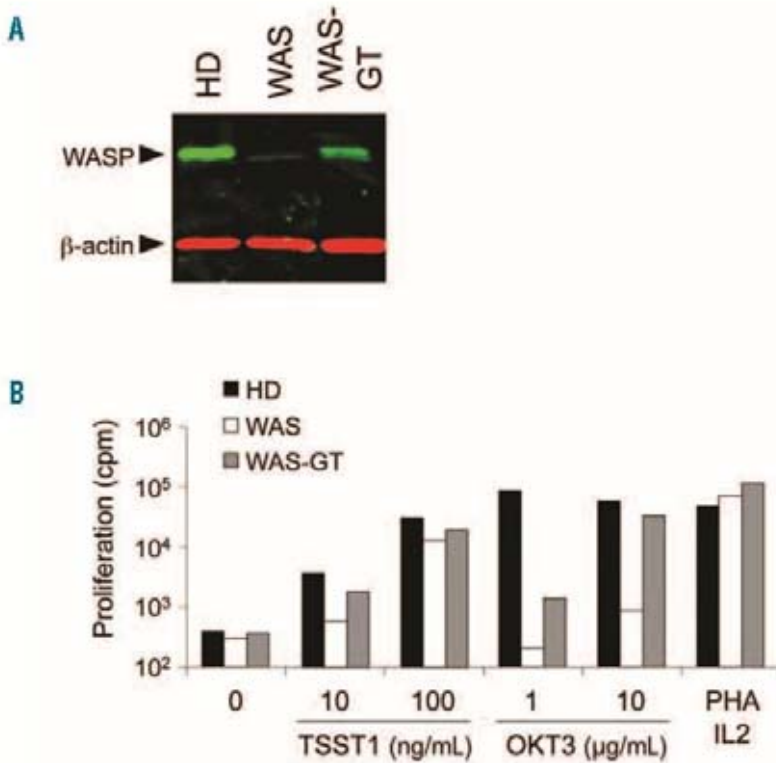
TSST-1-pulsed and unpulsed JY cells were labeled with 1 μM CMTMR. CMTMR-labeled JY cells (1×10⁶) were then mixed with an equal number of T cells in U-bottomed 96-well plates. After 3 h at 37°C/5% CO₂, cells were resuspended in phosphate-buffered saline/10 mM EDTA on ice and washed in FACS buffer (phosphate-buffered saline/0.5% bovine serum albumin). TCR surface expression was assessed by staining with an anti-CD3 monoclonal antibody (OKT3, eBioscience) followed by a GAM-IgG2a-AlexaFluor-488 secondary antibody. TCR/CD3 expression level in stimulated T cells was expressed as the percentage of the level of CD3 in T cells stimulated by unpulsed B-EBV cells.

References

- Bertrand E, Esquerre M, Petit AE, Rodrigues M, Duchez S, Delon J, et al. Activation of the ancestral polarity regulator protein kinase C ζ at the immunological synapse drives polarization of Th cell secretory machinery toward APCs. *J Immunol.* 2010;185(5):2887-94.
- Dupre L, Aiuti A, Trifari S, Martino S, Saracco P, Bordignon C, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity.* 2002;17(2):157-66.
- Dupre L, Trifari S, Follenzi A, Marangoni E, Lain de Lera T, Bernad A, et al. Lentiviral vector-mediated gene transfer in T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients leads to functional correction. *Mol Ther.* 2004;10(5):903-15.
- Marangoni E, Bosticardo M, Chamier S, Draghici E, Lucci M, Scamuzza S, et al. Evidence for long-term efficacy and safety of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome in preclinical models. *Mol Ther.* 2009;17(6):1073-82.

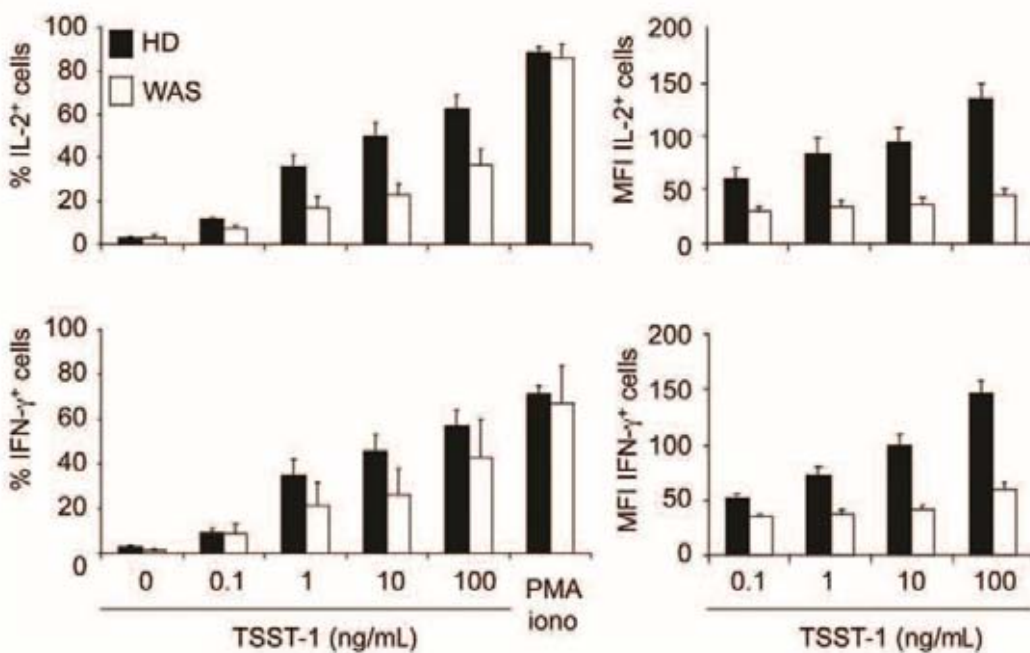


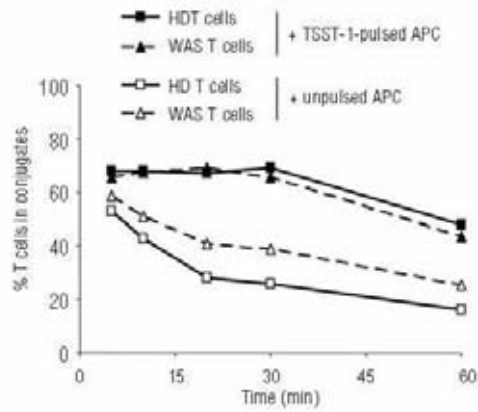
Online Supplementary Figure S1. T-cell activation by TSST-1-loaded APC and immobilized anti-CD3 antibody. (A) Flow cytometry histograms and density plots showing the proliferative and cytokine production responses of healthy donor (HD) and WAS T cells in response to the indicated concentrations of TSST-1 presented by JY cells. (B) Flow cytometry histograms and density plots showing the proliferative and cytokine production responses of HD and WAS T cells in response to the indicated concentrations of immobilized anti-CD3 antibody (OKT3).



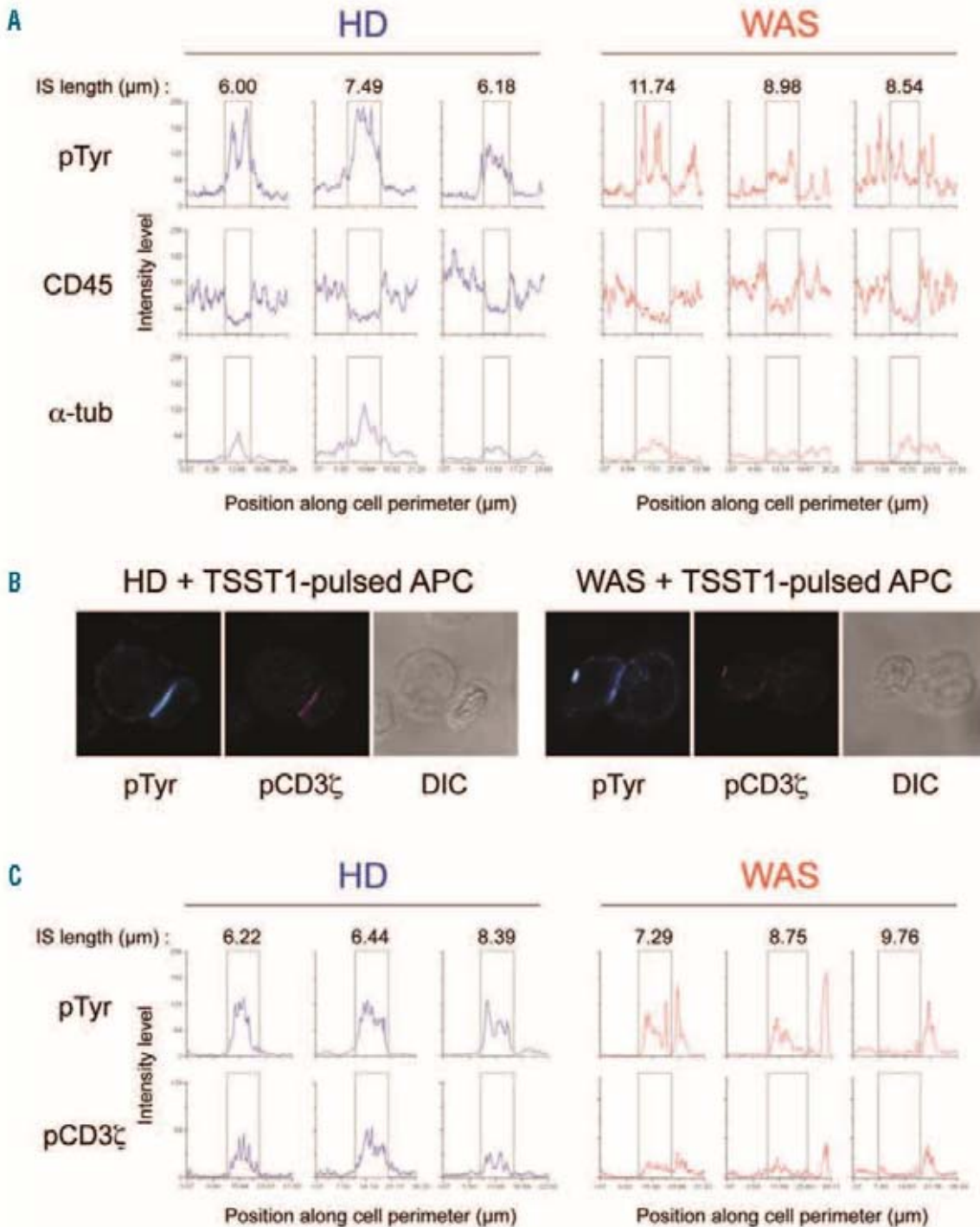
Online Supplementary Figure S2. WAS gene transfer restores the proliferative potential of WAS T cells. (A) Purified CD4⁺VE β 2⁺ T cells from a WAS patient were transduced with a lentiviral vector encoding WASP under the human WASP promoter (LVw1.6W) and WASP expression level was assessed by western blot. (B) TSST-1-, anti-CD3- and PHA/IL2-induced proliferation in HD, WAS and WASP reconstituted WAS T cells.

Online Supplementary Figure S3. WASP is required for cytokine production following APC stimulation. Healthy donor (HD) and WAS T cells were stimulated with EBV-B cells presenting the indicated concentrations of TSST-1 (or PMA/ionomycin, 100 nM/1 μ M) for 4 h. Intracellular production of interleukin-2 (IL-2) and interferon (IFN- γ) was quantified by flow cytometry [percentage of cytokine-producing cells and mean fluorescence intensity (MFI) in cytokine-producing cells]. Data represent the average \pm SEM of seven (CFSE proliferation) and six (cytokine production) independent experiments.

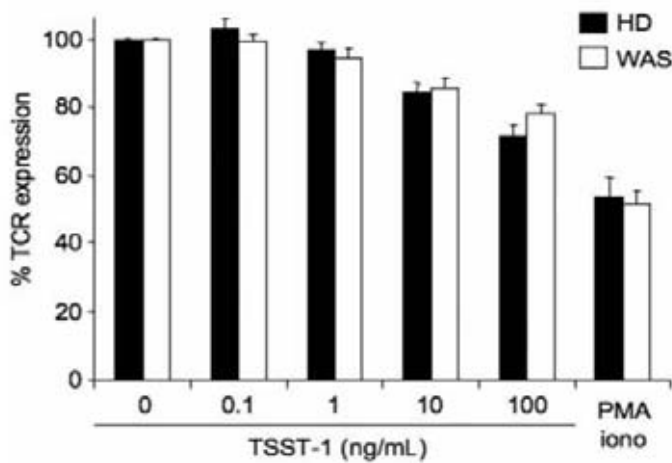




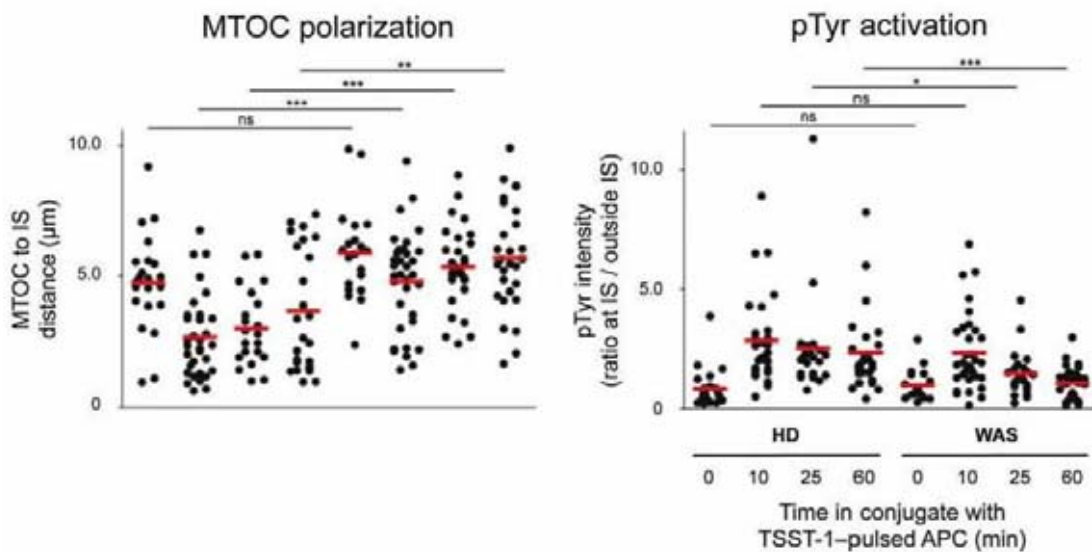
Online Supplementary Figure S4. Normal conjugate formation and TCR engagement in WAS T cells. CMFDA-labeled CD4⁺Vβ2⁺ T cells from either a healthy donor (HD) or a WAS patient were allowed to form conjugates with CMTMR-labeled EBV-B cells pulsed or not with 10 ng/mL TSST-1. The percentage of T cells in conjugates with APC was assessed at different time points by flow cytometry as the proportion of CMFDA⁺/CMTMR⁺ events (conjugates) among CMFDA⁺ events (T cells). Data are from one experiment representative of three performed.



Online Supplementary Figure S5. Phosphotyrosine outside the confinement of the IS in WASP-deficient T cells coincides with phosphorylated CD3 ζ . (A) Representative healthy donor (HD) and WAS T cells in contact with TSST-1-loaded APC were analyzed for IS geometry by representing the intensities of CD45, pTyr and α -tubulin along the complete cell perimeter. The limits of the T cell/APC interaction are reported and the corresponding IS length indicated. (B) HD and WAS CD4⁺V β 2⁺ T-cells were incubated for 25 min with APC pulsed with 10 ng/mL TSST-1. Cells were then fixed and stained for phosphotyrosine (cyan) and for the phosphorylated form of CD3 ζ (pink). One representative T-cell/APC conjugate per condition is shown. (C) Representative HD and WAS T cells in contact with 24 TSST-1-loaded APC were analyzed for the distribution of pTyr and pCD3 ζ along the cell perimeter. The limits of the T-cell/APC interaction are reported and the corresponding IS length indicated.



Online Supplementary Figure S6. Normal rate of TCR engagement in WAS T cells. Healthy donor (HD) and WAS CD4⁺Vβ2⁺ T cells were stimulated for 4 h with EBV-B cells presenting the indicated amount of TSST-1 (or PMA/ionomycin). TCR expression levels in stimulated T cells were then assessed by flow cytometry and expressed as the percentage of the TCR levels detected on T cells stimulated with non-pulsed APC. Results are the average ± SEM of three independent experiments.



Online Supplementary Figure S7. Defective MTOC polarization in WAS T cells precedes abnormal pTyr distribution. MTOC translocation to the IS (distance to IS center) and phosphotyrosine activation (expressed as a ratio between pTyr intensity at IS and pTyr intensity outside IS) were assessed in parallel in healthy donor (HD) and WAS CD4⁺Vβ2⁺ T cells after conjugation with unpulsed APC ("0") or after 10, 25 or 60 min conjugation with TSST1-pulsed APC. At least 30 conjugates were considered per condition. An unpaired Student's t test was applied and significant differences between conditions are represented as follows: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Video 1. 360° animation of a 3-D reconstruction showing the contact of a healthy donor T cell with an unpulsed APC. Staining for α -tubulin appears in green, staining for CD45 appears in red and staining for phosphotyrosine appears in blue. [SEE VIDEO FILE](#)

Video 2. 360° animation of a 3-D reconstruction showing the contact of a healthy donor T cell with a TSST1-pulsed APC. Staining for α -tubulin appears in green, staining for CD45 appears in red and staining for phosphotyrosine appears in blue. [SEE VIDEO FILE](#)

Video 3. 360° animation of a 3-D reconstruction showing the contact of a WAS T cell with a TSST1-pulsed APC. Staining for α -tubulin appears in green, staining for CD45 appears in red and staining for phosphotyrosine appears in blue. [SEE VIDEO FILE](#)

Video 4. 360° animation of a 3-D reconstruction showing the contact of a WAS T cell with a TSST1-pulsed APC. Staining for α -tubulin appears in green, staining for CD45 appears in red and staining for phosphotyrosine appears in blue. [SEE VIDEO FILE](#)

Video 5. 360° animation of a 3-D reconstruction showing the contact of a WASP-reconstituted WAS T cell with a TSST1-pulsed APC. Staining for α -tubulin appears in green, staining for CD45 appears in red and staining for phosphotyrosine appears in blue. [SEE VIDEO FILE](#)

Video 6. 360° animation of a 3-D reconstruction showing the contact of a WASP-reconstituted WAS T cell with a TSST1-pulsed APC. Staining for α -tubulin appears in green, staining for CD45 appears in red and staining for phosphotyrosine appears in blue. [SEE VIDEO FILE](#)

Video 7. Time-lapse video recording of a healthy donor T cell entering in contact with a TSST-1-pulsed APC (blue). The T cell was loaded with Fura-4 to visualize rises in intracellular calcium. [SEE VIDEO FILE](#)

Video 8. Time-lapse video recording of a WAS T cell entering in contact with a TSST-1-pulsed APC (blue). The T cell was loaded with Fura-4 to visualize rises in intracellular calcium. [SEE VIDEO FILE](#)

DISCUSSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Les résultats présentés seront tout d'abord discutés d'un **point de vue fondamental** autour de l'implication de WASP dans les différentes étapes permettant aux lymphocytes T de mettre en place la réponse immunitaire adaptative. La place de WASP en tant que régulateur du cytosquelette d'actine sera appréciée au niveau cellulaire puis au niveau moléculaire. Dans une seconde partie, les résultats obtenus seront discutés d'un **point de vue physiopathologique**.

I. Rôle de WASP dans la dynamique des lymphocytes T : point de vue fondamental

1. Au niveau cellulaire

De part la fonction de régulateur du cytosquelette d'actine décrite pour la protéine WASP, il est rationnel d'imaginer que WASP soit impliquée dans toutes les fonctions pour lesquelles une bonne organisation du cytosquelette d'actine est requise. Dans ce travail, nous avons expérimenté le rôle de WASP dans les fonctions de mobilité des lymphocytes T et d'interaction avec les cellules présentatrices de l'antigène.

De manière surprenante, nous avons clairement montré que WASP n'était pas requis pour la **migration dirigée par les chimiokines** : CXCL12, CCL19 et CCL21 des lymphocytes T CD4⁺ *in vitro*. Ces résultats sont à première vue en désaccord avec une étude précédente montrant une diminution du pourcentage de migration des lymphocytes T CD3⁺ de patients WAS (Haddad et al., 2001). Contrairement à nos travaux qui ont consisté en l'étude de la migration d'une population purifiée en lymphocytes T CD4⁺, Haddad et al. ont évalué le pourcentage de lymphocytes T CD3⁺ en migration parmi les cellules mononuclées du sang périphérique. La réduction du pourcentage de lymphocytes T de patients WAS capable de migrer en réponse aux chimiokines pourrait s'expliquer dans l'étude de Haddad et al. par : 1/ un effet négatif des cellules mononuclées du sang périphérique WASP déficientes sur la migration des lymphocytes T ou 2/ un effet positif des cellules mononuclées du sang périphérique WASP positives sur la migration des lymphocytes T de donneurs sains. D'autre part, alors que nous avons étudié la migration de lymphocytes T CD4⁺ primaires, Haddad et al. ont analysés la migration de lymphocytes T CD3⁺ fraîchement isolés du sang. Des différences de proportion en lymphocytes T naïfs vs effecteurs/mémoires ainsi que de niveau

d'expression des récepteurs aux chimiokines peuvent être à l'origine des résultats contradictoires obtenus entre les 2 études. En revanche, bien que des défauts de migration vers les organes lymphoïdes secondaires aient été observés *in vivo* chez les souris WASP déficientes, la migration des lymphocytes T murins en réponse à la chimiokine CXCL12 n'est pas affectée par la déficience en WASP *in vitro* (Gallego et al., 2006). De même, *in vitro*, les lymphocytes T CD3⁺ murins déficients pour WASP migrent dans des proportions comparables en réponse à la chimiokine CXCL12, avant et après restauration de l'expression de WASP (Blundell et al., 2008). *In vivo*, nous avons également montré de manière indirecte dans une étude précédente (*Cf. Annexe 1*), que l'expression de WASP présente un avantage sélectif à la migration des lymphocytes T vers les organes lymphoïdes secondaires (Trifari et al., 2010). Suite à une mutation corrective spontanée, une partie des lymphocytes T du patient WAS étudié dans ce travail ré-exprime WASP. Chez ce patient, la proportion de lymphocytes T WASP positifs observée dans la rate est largement augmentée en comparaison à celle notée dans le sang. Finalement, l'origine des défauts de migration des lymphocytes T vers les organes lymphoïdes secondaires observés *in vivo* en absence de WASP est à chercher ailleurs que dans leur capacité à migrer en réponse aux chimiokines et reste à être identifiée.

La réponse à cette question réside peut être dans un défaut des lymphocytes T déficients pour WASP à s'extravaser à travers les HEV, passage obligé pour **l'entrée dans les organes lymphoïdes secondaires**. En effet, le processus de transmigration diffère de la migration en 2 ou 3-dimensions à plusieurs niveaux. Tout d'abord, elle a lieu dans un environnement mouvementé par le flux sanguin et par conséquent requiert une forte adhésion des lymphocytes T aux cellules endothéliales. Ensuite, elle implique qu'à travers cette interaction, les lymphocytes T scannent la surface des cellules endothéliales pour finalement trouver le lieu de leur passage à travers ou entre les cellules endothéliales. La majorité des cellules du système immunitaire vont émettre des protrusions riches en actine à la surface des HEV qui vont faciliter le passage trans-endothélial (Muller, 2011). Ce n'est que très récemment que la formation de protrusions capables de palper la surface des cellules endothéliales a été observée sur les lymphocytes T (Carman et al., 2007; Shulman et al., 2012). Alors que Carman et al. ont décrit des protrusions de type podosome à la surface des lymphocytes T interagissant avec les cellules endothéliales, Shulman et al. ont rapporté des protrusions adhésives et invasives comparables aux filopodes. Dans les 2 études, l'absence des protrusions décrites conduit à un défaut de transmigration des lymphocytes T. En accord avec le rôle clairement établi de WASP dans la formation de podosomes par les macrophages

et les cellules dendritiques (Burns et al., 2001; Calle et al., 2004; Linder et al., 1999), Carman et al. ont montré qu'en absence de WASP, les protrusions de type podosome ne sont plus formées à la surface des lymphocytes T. En conséquence, leur passage trans-cellulaire est très largement réduit alors que leur passage para-cellulaire n'est pas affecté (Carman et al., 2007). Le passage trans-cellulaire étant minoritairement utilisé par les lymphocytes T par rapport au passage para-cellulaire (Marchesi and Gowans, 1964), ces résultats ne semblent pas suffisants à eux seuls pour expliquer la réduction de la migration lymphocytaire vers les organes lymphoïdes secondaires en absence de WASP. Alors que de manière surprenante, aucune distinction dans les molécules d'adhésion impliquées dans les passages trans- et para-endothélial n'a été rapportée, WASP apparaît comme impliqué seulement dans le passage trans-cellulaire. Par conséquent, il serait intéressant de comprendre si les protrusions formées à la surface des lymphocytes T sont distinctes pour les 2 types de passage. On se demande également, si le cytosquelette d'actine est nécessaire et contrôlé par d'autres régulateurs que WASP pour le passage para-cellulaire. Enfin, on peut envisager que les protrusions décrites par Shulman et al., de nature différente de celles décrites par Carman et al. soient strictement impliquées dans le passage para-cellulaire ou dans des étapes distinctes de la diapédèse.

A l'instar des macrophages qui sont capables d'adapter leur mode de migration à leur environnement (Van Goethem et al., 2010), nous avons tenté de comprendre si les lymphocytes T pouvaient former des protrusions invasives/dégradatrices pour **migrer dans des tissus denses**. Nous avons montré qu'ils n'étaient pas capables de pénétrer dans des matrices denses de Matrigel alors qu'ils traversent rapidement des matrices de collagène (*Cf. Annexe 2*). En parallèle, nous avons testé leur capacité à former des protrusions invasives de type podosome et à dégrader la matrice extracellulaire. Sur les différents substrats testés (fibronectine, ICAM-1) et dans les différentes conditions de stimulations expérimentées (PMA, CXCL12), nous n'avons pas observé la formation de podosome à la surface des lymphocytes T. Ces cellules n'étaient également pas capables de dégrader la matrice. En accord avec ces résultats, nous avons également montré que la migration des lymphocytes T dans des matrices de collagène de différentes densités n'est pas affectée par la déficience en WASP (résultats non présentés).

Jusque très récemment, des **protrusions de type podosome/filopode** n'avaient été observées à la surface des lymphocytes T qu'au contact des cellules endothéliales (Carman et al., 2007; Schumann et al., 2010). La morphologie plane de ces cellules permet d'observer par

microscopie la zone de contact entre le lymphocyte T et la cellule endothéliale dans un plan focal et à haute résolution. L'intérêt particulier des cellules endothéliales réside aussi dans leur fonction de cellules présentatrices de l'antigène pour les lymphocytes T effecteurs/mémoires (Perez et al., 1998; Shiao et al., 2007). En effet, il a été montré qu'après induction de l'expression des molécules de CMH-II par stimulation avec de l'IFN- γ , les cellules endothéliales sont capables d'activer des lymphocytes T effecteurs/mémoires. Ainsi, l'étude de l'interaction entre une cellule endothéliale et un lymphocyte T présente les mêmes avantages en termes de résolution d'image que le modèle artificiel, développé par le groupe de M. Dustin, des bicouches lipidiques et des anticorps anti-CD3 adsorbés sur un support en verre (Dustin et al., 2007). Ce modèle d'étude a permis à Sage et al. de montrer dans des travaux très récents que les lymphocytes T établissent des protrusions de type invadosome (invadopode/podosome) leur permettant d'interagir étroitement avec les cellules endothéliales (Sage et al., 2012). Dans le modèle des bicouches lipidiques, ces protrusions sont également formées par les lymphocytes T, mais leur observation est délicate car elles sont quelque peu réprimées par la rigidité de la surface avec laquelle elles interagissent. Finalement, les auteurs de ces travaux ont aussi observé des invadosomes à la zone de contact entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice de l'antigène conventionnelle (lymphocytes B, cellules dendritiques) en analysant finement les conjugués établis dans le plan focal du microscope.

La formation des invadosomes précède la signalisation calcique et favorise l'activation lymphocytaire. Au regard de ces résultats, les auteurs proposent le terme de podo-synapse pour décrire ce type d'interaction. Les molécules classiquement recrutées à la synapse immunologique (TCR, PKC- θ , Zap-70, P-Tyr) sont aussi enrichies dans ces structures. Les invadopodes sont également enrichis en molécules classiquement observées dans les invadosomes/podosomes (LFA-1, F-actine, taline). Précédemment des microcontacts enrichis en F-actine, WASP et TCR avaient aussi été observés à la surface des lymphocytes T (Bunnell et al., 2002; Seminario and Bunnell, 2008). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle de WASP dans la formation de ces protrusions nouvellement identifiées sur les lymphocytes T mais très bien caractérisées à la surface des macrophages et des cellules dendritiques (Burns et al., 2001; Calle et al., 2004; Linder et al., 1999). Un défaut de formation des invadosomes des lymphocytes T en absence de WASP, pourrait expliquer l'instabilité des synapses immunologiques formées avec les cellules présentatrices de l'antigène et l'hypo-activation lymphocytaire qui en résulte. Dans le contexte des rencontres des lymphocytes T avec les cellules présentatrices de l'antigène en absence d'antigène, un

défaut de formation des invadosomes en absence de WASP pourrait expliquer la diminution de la durée des arrêts de migration à l'origine de l'hypermobilité des lymphocytes T.

Finalement, de nombreuses questions restent en suspens autour de la formation des protrusions de types podosomes à la surface des lymphocytes T. Ces structures ont été observées uniquement lorsque les lymphocytes sont au contact de partenaires cellulaires. On peut se demander alors si le contact cellulaire est nécessaire à la formation de ces protrusions. Dans ce cas quel serait le mécanisme d'induction des protrusions par les partenaires cellulaires ? Il est également possible que ces protrusions soient aussi formées en absence de partenaires cellulaires. Au contact de la matrice extracellulaire, les protrusions des lymphocytes T pourraient être réprimées et par conséquent plus difficiles à mettre en évidence. Ainsi dans notre étude, la résolution microscopique a pu être une limite à leur observation (*Cf. Annexe 2*). D'autre part, nos tentatives de mise en évidence de ces protrusions ont été réalisées seulement sur cellules fixées, après marquage des molécules connues comme enrichies dans ce type de structure : F-actine, vinculine, taline, cortactine, WASP (*Cf. Annexe 2* et résultats non présentés). Il serait intéressant de poursuivre ce travail, par des observations sur cellules vivantes en temps réel. Avec cet objectif, nous avons transfecté des lymphocytes T avec un plasmide codant pour la lifeAct couplée à la protéine de fluorescence mcherry (**Figure 16**). Malgré un faible pourcentage de cellules transfectées et une mortalité cellulaire élevée, les résultats obtenus sont prometteurs en termes de qualité de marquage de l'actine. En effet, nous sommes capables de visualiser de manière très fine, la dynamique des protrusions riches en actine émises par les lymphocytes T.

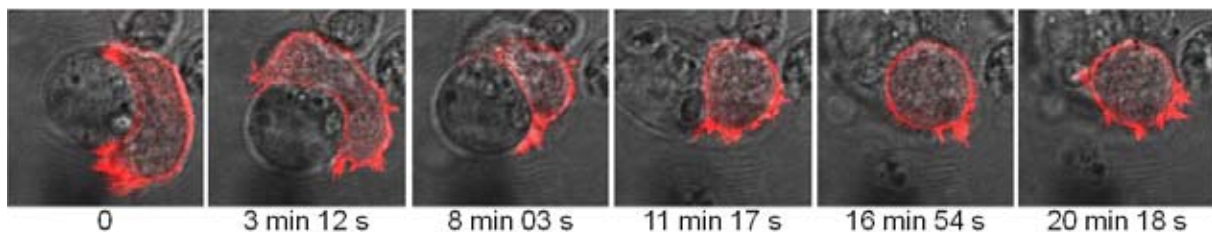


Figure 16 : Observation en temps réel de la dynamique de l'actine d'un lymphocyte T.

Séquence d'images représentant un lymphocyte T CD4⁺ transfecté avec un plasmide codant pour la lifeAct-mcherry (rouge) au contact d'un lymphocyte B (JY). Images réalisées sur un microscope confocal 510, objectif 63X, zoom 3. Superposition de la transmission (DIC) et de la fluorescence mcherry.

Nous pourrions également utiliser la microscopie électronique pour mettre en évidence l'existence ou non de ces protrusions sur les lymphocytes T au contact de la matrice extracellulaire. Enfin, un challenge pour le futur serait de prouver l'existence des protrusions de type podosome à la surface des cellules présentatrices de l'antigène observées *in vitro*,

dans des systèmes *in vivo* et d'en étudier la dynamique. A nouveau, la microscopie électronique serait un outil précieux pour observer ces structures à la surface des lymphocytes T comme cela a été montré au niveau des HEV de vaisseaux inflammés chez le cochon d'Inde (Carman et al., 2007; Shulman et al., 2009). La dynamique des protrusions pourraient être suivie par marquage des lymphocytes T avec de la lifeAct-couplée à une protéine fluorescente et/ou avec des anticorps (Fab) non-bloquants anti-LFA-1 (clone 24 : reconnaissant la conformation de haute affinité de LFA-1), couplés à une protéine fluorescente (Smith et al., 2005; Starnes et al., 2011). Les lymphocytes T seraient observés par microscopie confocale en temps réel au contact des cellules endothéliales chargées en antigène.

Une étape très peu étudiée et pourtant clef dans l'activation des lymphocytes T est leur **rencontre avec les cellules présentatrices de l'antigène chargées en antigène du soi**. Lors de ces interactions les cellules présentatrices de l'antigène induisent la mobilité des lymphocytes T, leur survie et leur activation homéostatique (Delon et al., 1998; Kondo et al., 2001; Real et al., 2004; Revy et al., 2001). De manière très surprenante, nous avons montré que dans cette étape WASP agit comme un frein à la mobilité des lymphocytes T induite par les cellules présentatrices de l'antigène. Les conséquences à l'hyper-mobilité des lymphocytes T déficients pour WASP sont : 1/ une élévation du seuil du signal d'arrêt de migration induit par la reconnaissance des complexes CMH-peptide et 2/ une augmentation de la survie cellulaire. Nous avons également tenté de comprendre qu'elles pouvaient être les conséquences de l'hyper-mobilité lymphocytaire observée en absence de WASP sur l'activation homéostatique. Pour cela nous avons mesuré l'expression des marqueurs d'activation précoce : CD25, CD40L et CD69 à la surface des lymphocytes T, après 24, 48 et 72 heures de culture en présence ou en absence de cellules dendritiques immatures (**Figure 17** et résultats non présentés). Dans notre système, la présence de cellules dendritiques ne conduit pas de manière reproductible à une augmentation de l'expression des marqueurs d'activation précoce sur les cellules WASP positives (shControl) ou WASP négatives (shWASP). En contrôle positif, nous avons vérifié que la présence de TSST-1 à la surface des cellules dendritiques augmentait le niveau d'expression des marqueurs d'activation étudiés.

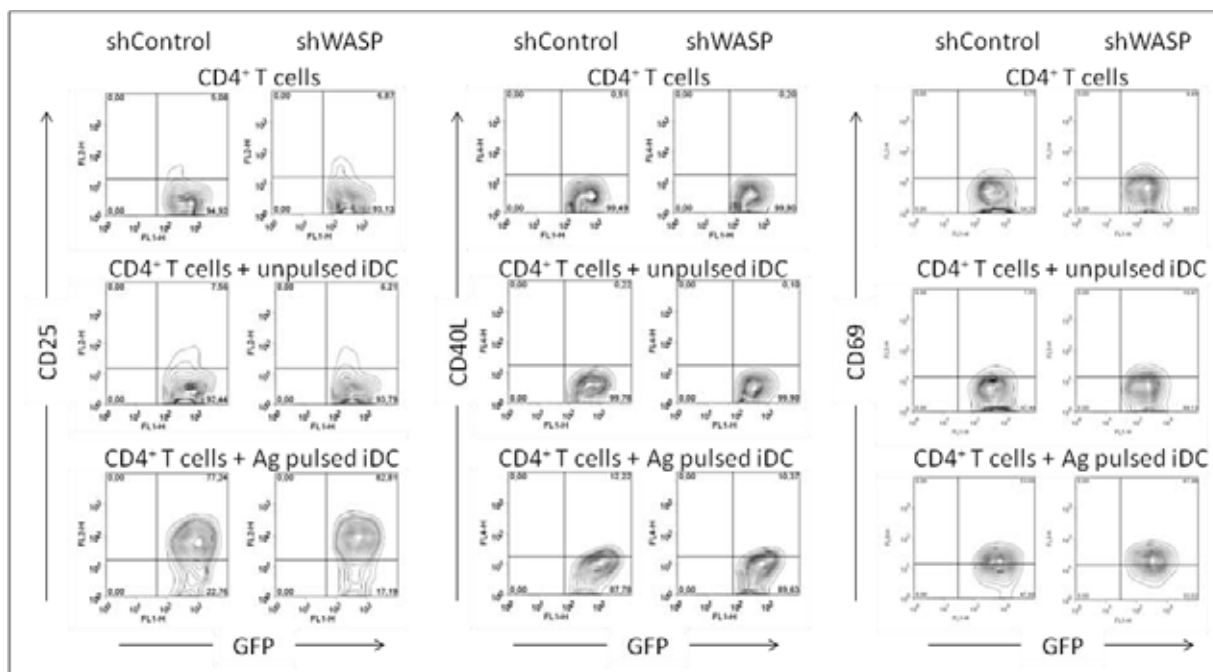


Figure 17 : Expression de CD25, CD40L et CD69 à la surface des lymphocytes T incubés seuls ou en présence de cellules dendritiques immatures.

Les lymphocytes T CD4⁺ WASP positifs (shControl) ou WASP négatifs (shWASP) ont été incubés pendant 24h seuls ou en présence de cellules dendritiques non-chargées (unpulsed iDC) ou chargées en TSST-1 (Ag pulsed iDC). L'expression des marqueurs d'activation précoce : CD25, CD40L et CD69 a été mesurée à la surface des lymphocytes T GFP⁺ transduits avec les vecteurs shControl ou shWASP codant pour la GFP.

Sans plus de succès, nous avons également analysé la prolifération des lymphocytes T au contact de cellules dendritiques immatures non chargées en antigène, par dilution du CFSE ou incorporation de thymidine tritiée après différents temps de culture. Le paramètre le plus étudié précédemment pour révéler une activation homéostatique des lymphocytes T par les cellules présentatrices de l'antigène est la mesure des flux calciques dans les lymphocytes T (Delon et al., 1998; Real et al., 2004; Revy et al., 2001). Dans notre modèle, il serait par conséquent intéressant de suivre en temps réel la fluctuation du calcium lymphocytaire au contact des cellules dendritiques. Au regard de l'hyper-mobilité et de la survie favorisée des lymphocytes T en absence de WASP, on pourrait s'attendre à une augmentation de l'intensité maximale des flux calciques et/ou à un meilleur maintien de la signalisation. Néanmoins, bien que la signalisation calcique soit le reflet d'une activation lymphocytaire, elle est également observée au cours de la migration lymphocytaire et précède les arrêts de migration. Ainsi l'analyse de la fluctuation calcique apparaît délicate dans notre système et devra être associée à une analyse morphologique rendant compte de l'activité du lymphocyte T.

L'activation homéostatique diminue le seuil d'activation antigène spécifique (Stefanova et al., 2002). Il serait par conséquent intéressant d'étudier dans le contexte de la déficience en WASP les conséquences de l'activation homéostatique sur la rencontre

successive avec des cellules dendritiques chargées en antigène pathogène. Des paramètres non modifiés par l'absence de WASP dans l'activation antigénique devront être analysés afin de les dissocier des conséquences de l'activation homéostatique en absence de WASP. L'internalisation du TCR n'étant pas affectée par la déficience en WASP dans le contexte de l'activation antigénique, elle représente un paramètre de choix pour cette étude. On peut également se demander si l'hyper-mobilité des lymphocytes T observée en absence de WASP favorise la recherche des rares cellules présentatrices de l'antigène chargées en antigène spécifique. Dans notre modèle, nous avons montré que la mobilité accrue des lymphocytes T WASP déficients ne leur permet pas de scanner une région plus large au cours des 2 heures d'acquisition réalisées. En effet, les lymphocytes T sont confinés aux cellules dendritiques avoisinantes. Il serait pertinent d'analyser l'impact de la déficience en WASP sur la mobilité des lymphocytes T dans l'environnement complexe qu'est l'organe lymphoïde secondaire. En effet, notre modèle d'étude s'affranchit des chimiokines sécrétées par les cellules stromales, du réseau de FRC et de l'organisation en zone des organes lymphoïdes secondaires, qui sont autant de paramètres qui influencent la mobilité lymphocytaire. Nous pourrions étudier la mobilité des lymphocytes T humains WASP déficients dans des explants tissulaires par microscopie biphotonique. Ce travail pourrait également être réalisé dans des modèles d'animaux WASP déficients.

Nos travaux ont aussi montré qu'une plus grande proportion de lymphocytes T déficients pour WASP présente une **morphologie allongée** au contact des cellules dendritiques ou de la molécule d'adhésion ICAM-1. Nous pouvons imaginer qu'en absence de WASP, les lymphocytes T sont moins rigides si l'on considère que leur cytosquelette est moins bien organisé. Une moindre rigidité faciliterait la déformation cellulaire et par conséquent le passage à travers les pores étroits des membranes dans nos expériences de Transwell. Cette hypothèse est soutenue par le phénotype des lymphocytes T déficients en septines, une famille de protéines qui s'associe aux fibres de stress (Tooley et al., 2009). En absence de septines, les lymphocytes T perdent leur rigidité, s'allongent anormalement et leur transmigration en Transwell est augmentée. Afin d'évaluer la rigidité des lymphocytes T WASP déficients, nous pourrions mesurer la déformabilité des lymphocytes T par une analyse microscopique de leur morphologie en 3-dimensions, comme réalisé précédemment (Faure et al., 2004).

En parallèle de l'augmentation de la proportion de lymphocytes T allongés en absence de WASP, nous avons mesuré une augmentation du pourcentage de **cellules adhérentes à ICAM-1**. Ceci corrèle avec notre observation de l'augmentation du pourcentage de conjugués formés avec les cellules présentatrices de l'antigène non chargées en antigène. De plus, l'inactivation des molécules ERM dans les lymphocytes T conduit à une augmentation de l'adhésion aux cellules présentatrices de l'antigène chargées ou non en antigène exogène, associée à une perte de rigidité cellulaire (Faure et al., 2004). Puisqu'il a été montré que l'adhésion à ICAM-1 diminue le seuil de détection des antigènes présentés à la surface des cellules présentatrices de l'antigène (Randriamampita et al., 2003), il est envisageable qu'en absence de WASP la détection des antigènes du soi par les lymphocytes T soit augmentée. Pour étudier cette hypothèse, en complément des expériences proposées précédemment pour évaluer l'activation homéostatique, nous pourrions traiter les lymphocytes T avec des anticorps bloquants dirigés contre LFA-1.

Les contacts établis par les lymphocytes T naïfs avec les **cellules dendritiques matures** sont plus stables que ceux réalisés avec les cellules dendritiques immatures, même en absence d'antigène (Benvenuti et al., 2004). D'autre part, Kaiser et al. ont montré que les cellules dendritiques matures mais pas les immatures, induisent la mobilité des lymphocytes T naïfs (Kaiser et al., 2005). Notre étude de la rencontre entre lymphocytes T effecteurs/mémoires et cellules présentatrices de l'antigène en absence d'antigène exogène a été réalisée avec des cellules dendritiques immatures. Compte tenu de la divergence du potentiel des cellules dendritiques en fonction de leur état de maturation, il serait intéressant de reproduire notre étude au contact de cellules dendritiques matures. Les défauts observés en absence de WASP pourraient être exacerbés dans ces conditions. Il serait également pertinent d'étudier la mobilité des lymphocytes T naïfs WASP déficients, au contact de cellules dendritiques non chargées en antigène. Cependant, notre accès très limité aux échantillons sanguins de patients et l'incompatibilité de notre stratégie d'inhibition de l'expression de WASP avec la conservation d'un phénotype naïf pour les lymphocytes T, ne nous ont techniquement pas permis d'étudier cette question. Ce travail pourrait en revanche être réalisé chez l'animal WASP déficient.

Nous avons étudié les effets de la déficience en WASP dans les lymphocytes T sur leur mobilité et leur rencontre avec les cellules présentatrices de l'antigène. Cependant, il est important de ne pas omettre que chez les patients WAS, toutes les cellules du système

immunitaire sont déficientes pour WASP, y compris les cellules présentatrices de l'antigène. **Quelles sont conséquences de la déficience en WASP dans les cellules dendritiques sur les lymphocytes T ?** Cette question a été étudiée chez la souris WASP déficiente au niveau des organes lymphoïdes secondaires par microscopie biphotonique (Pulecio et al., 2008). Les auteurs de ces travaux montrent que la durée des contacts établis entre les cellules dendritiques WASP déficientes et les lymphocytes T CD8 naïfs sauvages en présence d'antigène est réduite alors que la déficience en WASP n'a pas d'effet sur les rencontres en absence d'antigène. De plus, la mobilité des lymphocytes T CD8 naïfs sauvages dans les organes lymphoïdes de souris WASP déficiente est augmentée et en conséquence leur activation est diminuée. On imagine facilement une sommation des défauts observés dans le contexte d'une rencontre entre une cellule dendritique et lymphocyte T tous deux déficients en WASP.

Une forte homologie de séquence et une grande conservation de l'organisation en domaines ont été rapportées entre WASP, N-WASP et les protéines de la famille de WAVE. Par conséquent, **une compensation de la perte d'expression de WASP par ses homologues** est envisageable. Dans les macrophages, il a été montré que WASP et N-WASP jouaient des rôles différents dans la formation des podosomes (Nusblat et al., 2010). Cependant, la surexpression de N-WASP dans des macrophages déficients pour WASP permet une restauration de la formation des podosomes (Isaac et al., 2010). Dans les lymphocytes T de patients WAS, il n'a pas été observé d'augmentation de l'expression de N-WASP ou de WAVE-2 en condition de non stimulation et de stimulation par des anticorps anti-CD3 (résultats non présentés, Ronan Calvez). En revanche, nous n'avons pas vérifié le niveau d'activation de ces molécules.

2. Au niveau moléculaire

Dans cette section nous discuterons de la place de WASP dans les cascades de signalisation conduisant à la polymérisation du cytosquelette d'actine suite à l'activation des récepteurs aux chimiokines, du TCR et de LFA-1 à la membrane.

En tant que régulateur du cytosquelette d'actine WASP intègre et transmet les signaux provenant des récepteurs membranaires pour remodeler le cytosquelette d'actine et ainsi permettre à la cellule d'exercer ses fonctions. A priori, nous pourrions imaginer qu'en absence

de WASP aucune protrusion membranaire riche en actine n'est formée suite à l'activation des récepteurs aux chimiokines, du TCR ou de LFA-1. A l'inverse, nos résultats et ceux de d'autres groupes montrent qu'en absence de WASP de nombreuses protrusions membranaires sont formées mais leur localisation et leur structure sont anormales (Calvez et al., 2011; Gallego et al., 2006; Gallego et al., 1997).

Le groupe de J. Bertoglio a montré dans des lignées de lymphocytes T que la stimulation par la **chimiokine** CXCL12 induisait l'activation de Cdc42 et son association avec WASP (Haddad et al., 2001). De plus, le blocage de l'interaction entre Cdc42 et WASP résulte en une perte de l'activité chimiotactique des lymphocytes T en réponse à CXCL12. Comme discuté précédemment nos travaux sont en désaccord avec cette étude et montre que WASP n'est pas nécessaire à la migration des lymphocytes T CD4⁺ en réponse aux chimiokines *in vitro*. Cependant, nous avons montré dans une étude précédente (*Cf. Annexe 1*) que WASP colocalise au front de migration avec la F-actine et à l'uropode avec le MTOC en réponse à la chimiokine CXCL12 (Trifari et al., 2010). Il serait intéressant d'étudier ici l'activité de WASP au front de migration et à l'uropode en dynamique. En effet, on peut envisager que dans notre modèle cellulaire, WASP soit impliqué dans la voie de signalisation sous les récepteurs aux chimiokines mais qu'en son absence des mécanismes de compensation se mettent en place. Pour cela, nous pourrions transfecter nos cellules avec un biosenseur de WASP de type split-YFP (**Figure 16**) (Lim et al., 2007).

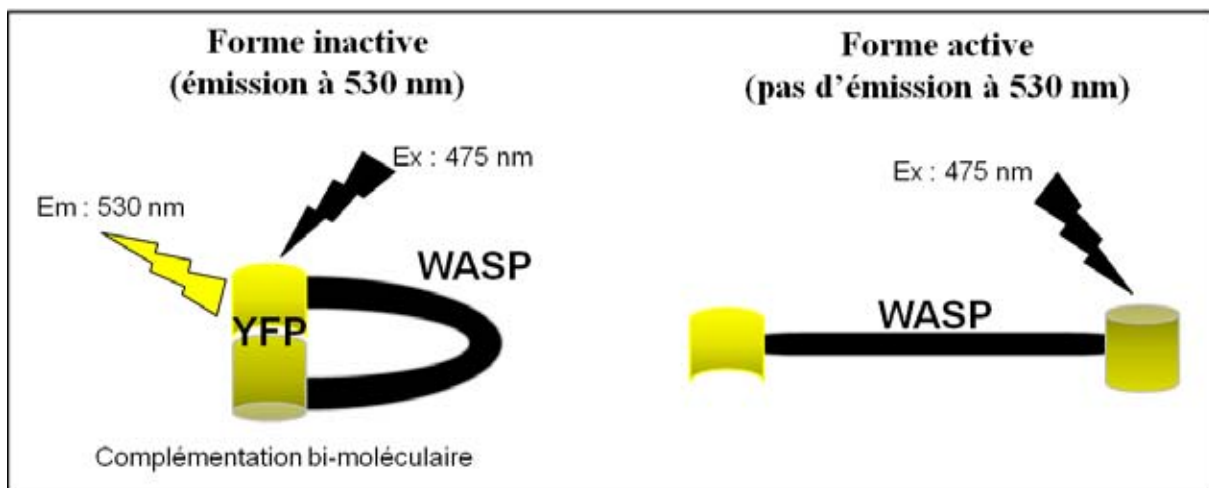


Figure 18 : Principe de fonctionnement du biosenseur WASP.

Sous sa forme inactive, la protéine WASP adopte une conformation repliée d'auto-inhibition. L'interaction intramoléculaire de WASP est levée par son activation. Le fluorochrome YFP est scindé en 2 à chaque extrémité de la protéine. Ce dernier ne pourra être excité (Ex) à 475 nm que lorsque ces 2 fragments seront en interaction, c'est-à-dire lorsque WASP adoptera une conformation inactive. Dans ce cas, l'émission (Em) de fluorescence sera détectée à 530 nm.

Le principe de ce biosenseur repose sur le changement de conformation de WASP entre sa forme inactive et active. Le fluorochrome YFP scindé en 2 est greffé à chaque extrémité de la protéine WASP et n'est par conséquent excitable que lorsque WASP est sous sa forme inactive. Il serait également pertinent de mesurer le niveau d'activation du complexe Arp2/3 (molécule effectrice de WASP) dans les lymphocytes WASP positifs et WASP négatifs stimulés par la chimiokine CXCL12.

Suite à l'**activation du TCR**, il a été montré que Zap-70 s'accumule au niveau des rafts lipidiques qui sont requis pour former la synapse immunologique (Dykstra et al., 2003; Sasahara et al., 2002). Le recrutement de Zap-70 conduit à l'accumulation de Cdc42, sous sa forme liée au GTP, à la synapse immunologique puis à la phosphorylation de Slp-76 (Zeng et al., 2003). Slp-76 recrute alors WASP et Vav-1. L'activation de Cdc42 par Vav-1 conduit à l'activation de WASP. Il a aussi été montré que WASP pouvait être activé à la synapse immunologique par phosphorylation par la kinase Fyn. Nos résultats précisent le rôle de WASP dans la dynamique de la formation de la synapse immunologique. En effet, ils montrent que WASP n'est pas requis pour l'engagement du TCR mais qu'il est impliqué dans l'organisation moléculaire de la synapse immunologique. Par conséquent, il serait intéressant d'étudier la dynamique des microregroupements de TCR et des molécules associées en absence de WASP lors de la formation de la synapse immunologique.

Nous avons également montré que la protéine WASP n'est pas impliquée dans la **signalisation « inside-out » induite par les chimiokines** et conduisant au **changement de conformation de LFA-1**. En effet, dans notre étude le traitement par la chimiokine CXCL12 de lymphocytes T CD4⁺ inhibés pour WASP induit une augmentation de l'expression des conformations d'affinité intermédiaire et forte de LFA-1 comparable à celle observée sur les lymphocytes T CD4⁺ contrôles. Des résultats similaires ont été observés dans les lymphocytes T CD4⁺ de patients WAS (résultats non présentés). Nos données sont aussi en accord avec 2 études précédentes montrant que Cdc42, la protéine activatrice principale pour WASP, ne joue pas de rôle sur l'activation de LFA-1 induite par les chimiokines (Bolomini-Vittori et al., 2009; Shulman et al., 2009). Toutefois, une étude récente a montré que WASP serait nécessaire pour remplir cette même fonction dans les NK (Stabile et al., 2010).

L'engagement de la conformation de forte affinité de LFA-1 (signalisation « outside-in ») à la surface des lymphocytes T avec son ligand ICAM-1 est impliqué à la fois dans les phases de migration et d'arrêt de migration (Shulman et al., 2009). Ceci apparaît à première vue contradictoire. La distinction entre migration et arrêt de migration réside dans l'engagement des protrusions membranaires riches en conformation de forte affinité de LFA-1 avec ICAM-1. En effet, alors qu'un engagement stable de LFA-1 avec ICAM-1 est nécessaire à l'arrêt de migration, un engagement cyclique constant est indispensable à la migration lymphocytaire. Ce mécanisme a été décrit pour les lymphocytes T effecteurs à la surface des cellules endothéliales et sur des surfaces adsorbées avec la molécule ICAM-1. Puisque les cellules dendritiques expriment également ICAM-1 à leur surface et que les cellules endothéliales ont aussi été décrites comme des cellules présentatrices de l'antigène, on peut envisager que le même type de protrusions membranaires soit formé par les lymphocytes T au contact des cellules dendritiques. En support de cette hypothèse, la formation de prolongements membranaires de type filopode enrichis en conformation de forte affinité de LFA-1 a été observée à la surface des lymphocytes T au contact de cellules dendritiques (Sage et al., 2012).

Dans notre étude nous avons observé que la conformation de forte affinité de LFA-1 n'était pas confinée à la région centrale de la cellule en migration mais était dispersée jusque dans l'uropode. Cette dispersion est en faveur d'un allongement cellulaire et de l'adhésion. Cependant la dispersion de LFA-1 explique-t-elle la diminution des temps d'arrêt cellulaire observée en absence de WASP ? Si l'on se réfère aux travaux de Shulman et al., l'instabilité des phases d'arrêt de migration devrait se traduire par une réduction du temps d'engagement de la conformation de forte affinité de LFA-1 avec ICAM-1. De même, on peut imaginer un lien entre l'instabilité des synapses immunologiques formées en absence de WASP et une réduction du temps d'engagement de LFA-1 avec ICAM-1. Ceci pourrait également expliquer les défauts de reformation de la synapse immunologique observés en absence de WASP (Sims et al., 2007). Il apparaît donc important de suivre en temps réel l'engagement cyclique de LFA-1 dans les contextes de la mobilité induite par les cellules dendritiques immatures et lors de la formation de la synapse immunologique. Cela pourrait être réalisé par marquage de la conformation de haute affinité de LFA-1 avec des anticorps (Fab) non-bloquants couplés à une protéine fluorescente (Smith et al., 2005).

En poursuivant notre réflexion autour de cette hypothèse, on peut imaginer que WASP aurait un rôle équivalent à celui proposé pour la formation et le désassemblage des podosomes à la surface des monocytes (**Figure 19**), dans l'engagement et le désengagement des protrusions

membranaires riches en LFA-1 dans les lymphocytes T (Monypenny et al., 2011). En effet, il a été montré un défaut de formation des podosomes à la surface des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques déficientes pour WASP (Burns et al., 2001; Calle et al., 2004; Linder et al., 1999). Plus récemment, il a également été montré que la forme active de WASP était aussi impliquée dans la dissolution de ces structures à travers son clivage par la calpaïne (Macpherson et al., 2012).

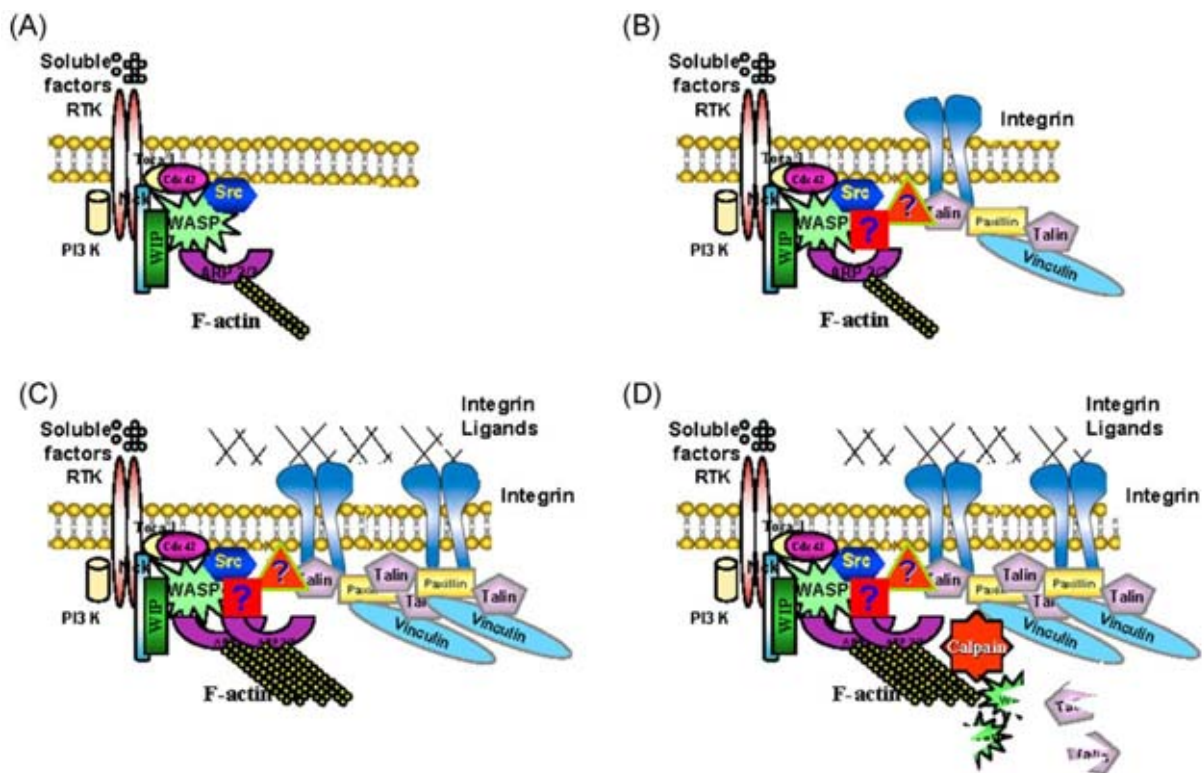


Figure 19 : Assemblage et dissolution des podosomes par WASP.

(A) La liaison de facteurs solubles tels que les chimiokines à leur récepteur, conduit au recrutement et à l'interaction de la PI3K, de Cdc42, de WASP et de WIP. Le recrutement de GEF conduit à l'activation de Cdc42, de WASP puis à l'activation du complexe Arp2/3, qui induit la polymérisation de l'actine. (B) Les intégrines sous leur conformation de forte affinité sont alors recrutées au niveau des filaments d'actine naissants. WASP et WIP sont impliqués dans la liaison entre les filaments d'actine et les intégrines. Les podosomes sont ainsi formés (C) Les intégrines sous leur conformation de forte affinité s'engagent alors avec ICAM-1. Cet engagement conduit à une nouvelle vague d'activation de la PI3K et de Cdc42, conduisant à l'activation de WASP, du complexe Arp2/3 et à la polymérisation du cytosquelette d'actine. Ceci engendre une stabilisation des podosomes formés. (D) L'activation de la calpaïne conduit au clivage de WASP et de la taline résultant en la dissolution des podosomes. D'après (Monypenny et al., 2011).

De plus l'inhibition de Cdc42 par la Secramine A diminue le pourcentage de cellules en migration sur une surface adsorbée en ICAM-1, ainsi que la formation des protrusions membranaires riches en LFA-1.

II. Rôle de WASP dans la dynamique des lymphocytes T : point de vue physiopathologie

Il est généralement admis que les lymphocytes T jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de WAS. Face à la sévérité de la maladie, les défauts de fonction des lymphocytes T déficients pour WASP n'apparaissent pas aussi drastiques que pensé. En revanche, ils touchent la majorité des « étapes de vie » de ces cellules. Les manifestations cliniques graves des patients seraient donc à relier à une accumulation de « petits » défauts plutôt qu'à la perte totale de l'une de leurs fonctions. Au delà des lymphocytes T, toutes les cellules du système immunitaire sont touchées par la déficience en WASP et la majorité de leurs fonctions sont aussi impactées. Nous avons vu que la réduction de fonction de certaines cellules du système immunitaire (les cellules dendritiques notamment) a des répercussions sur l'activité des lymphocytes T. C'est donc une sommation de défauts qui serait à l'origine de la physiopathologie de WAS.

Un paradoxe d'ordre immunologique non résolu dans la physiopathologie de WAS réside dans le développement d'une immunodéficiência se manifestant par des infections récurrentes et des cancers, parallèlement à des maladies auto-immunes rendant compte d'une exacerbation de la réponse immunitaire. Ce paradoxe est commun à de nombreuses immunodéficiencies primaires et est aujourd'hui encore mal compris (Schuetz et al., 2010). Les résultats obtenus au cours de ma thèse complètent nos connaissances sur l'origine de l'immunodéficiência et des manifestations auto-immunes et apportent des pistes à explorer dans le futur.

L'immunodéficiência observée en absence de WASP est aisément reliée à la réduction de l'activation des lymphocytes T. Alors qu'*in vitro* la réduction de l'activation des lymphocytes T suite à leur stimulation avec des anticorps anti-CD3 est tout d'abord apparue drastique, ce défaut s'est révélé bien moins prononcé dans le contexte d'une activation plus physiologique, par les cellules présentatrices de l'antigène (Cannon and Burkhardt, 2004; De Meester et al., 2010). Dans notre étude nous avons montré qu'en amont de l'activation lymphocytaire induite par les cellules présentatrices de l'antigène, WASP est nécessaire aux lymphocytes T pour migrer et scanner la surface des cellules présentatrices de l'antigène à la recherche de leur antigène spécifique. Nous avons aussi montré que WASP est impliquée

dans la qualité des rencontres, dans la formation de la synapse immunologique ainsi que dans son organisation moléculaire et sa stabilité. Ainsi, la sommation des défauts observés en absence de WASP dans les différentes étapes conduisant à l'activation lymphocytaire pourrait expliquer l'immunodéficience observée chez les patients WAS.

L'origine des désordres auto-immuns apparaît plus floue dans le contexte de la déficience en WASP. Etant donné que les manifestations autoimmunes apparaissent tardivement dans le développement de la maladie, il a été proposé qu'elles soient le résultat d'une mauvaise clairance des pathogènes et de leurs antigènes suite à des infections récurrentes (Fairweather et al., 2001). Les infections chroniques mèneraient à un environnement inflammatoire à l'origine de dommages tissulaires et cellulaires importants. Ainsi l'environnement immunogène pourrait être à l'origine des développements autoimmuns.

Le développement de maladies auto-immunes chez les patients WAS est aussi expliqué par une activation exacerbée des lymphocytes B et des défauts d'activation et de fonctions effectrices des lymphocytes T régulateurs (Becker-Herman et al., 2011; Marangoni et al., 2007).

Nous avons montré qu'en absence de WASP, les contacts entre lymphocytes T effecteurs et cellules présentatrices de l'antigène sont instables et que la synapse immunologique est désorganisée sur un plan moléculaire. Ces défauts contribuent à l'hypoactivation lymphocytaire observée en absence de WASP. De la même façon, il serait aussi intéressant d'étudier la dynamique de la rencontre entre lymphocytes T régulateurs et cellules présentatrices de l'antigène ainsi que l'organisation moléculaire des synapses immunologiques formées. En effet, des défauts similaires à ceux observés sur les lymphocytes T effecteurs pourraient aussi être à l'origine du défaut d'activation des lymphocytes T régulateurs (Marangoni et al., 2007).

Nous avons aussi démontré qu'en absence de WASP, la survie homéostatique des lymphocytes T induite par les cellules dendritiques est favorisée. Puisqu'un contact est nécessaire pour l'induction de survie des lymphocytes T par les cellules dendritiques (Revy et al., 2001), nous proposons que les lymphocytes T autospécifiques soit majoritairement protégés de l'apoptose spontanée. Ainsi en absence de WASP, un enrichissement en cellules autospécifiques est envisageable. Ceci pourrait expliquer la restriction du répertoire V β

observée chez les patients WAS à partir de l'âge de 15 ans (Wada et al., 2005). Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de reproduire l'expérience que nous avons précédemment réalisée avec des $CD4^+ V\beta 2$, avec des lymphocytes T $CD4^+$ totaux. Nous analyserions ensuite le répertoire $V\beta$ des cellules qui ont été protégées de l'apoptose par les cellules dendritiques.

Selon le modèle de la rencontre en série entre lymphocyte T et cellules présentatrices de l'antigène (**Figure 20**), la fréquence des interactions définit l'issue de ces rencontres (Friedl and Gunzer, 2001). En effet, des rencontres fréquentes vont conduire à l'activation du lymphocyte T, alors que des rencontres trop rares induiront l'anergie du lymphocyte T. En absence de WASP nous avons montré que les lymphocytes T étaient plus mobiles au contact de cellules présentatrices de l'antigène non chargées en antigène. Dans notre modèle nous n'avons pas pu mesurer la fréquence des interactions car la concentration en cellules dendritiques et les protrusions membranaires qu'elles émettent permettent aux lymphocytes T de contacter plusieurs cellules dendritiques en même temps. De plus, les lymphocytes scannent la surface des cellules dendritiques en 3-dimensions ; nos acquisitions en 2-dimensions ne nous permettent pas d'identifier de manière univoque toutes les interactions intermittentes établies. Cependant, nous pouvons imaginer qu'une augmentation de la mobilité des lymphocytes T en absence de WASP, leur permette d'établir des contacts plus fréquents avec les cellules présentatrices de l'antigène. Une augmentation de la fréquence des contacts établis favoriserait l'activation lymphocytaire au détriment de l'induction d'anergie. Dans le contexte de la rencontre avec des cellules dendritiques présentant des antigènes du soi, ceci favoriserait l'activation de cellules autoréactives.

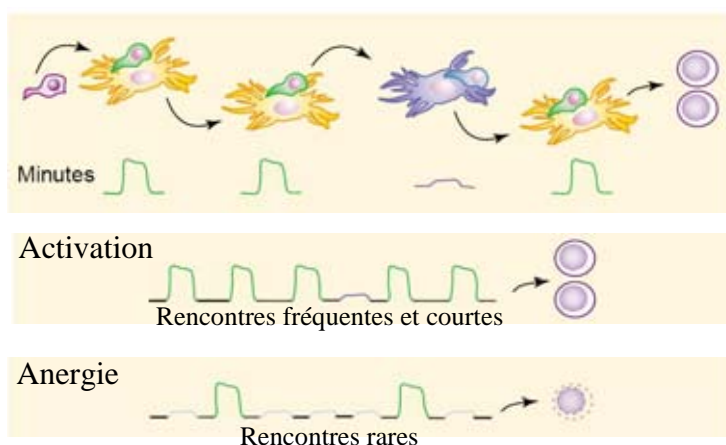


Figure 20 : Modèle des rencontres en série.

Le modèle des rencontres en série entre lymphocytes T et cellules présentatrices de l'antigène propose que des rencontres fréquentes et de courte durée conduisent à l'activation des lymphocytes T alors que des rencontres rares induisent leur anergie. Adaptée de (Friedl and Gunzer, 2001)

Finalement, alors que des progrès considérables sont réalisés pour la thérapie génique pour WAS et que les résultats des premiers essais cliniques sont encourageants, la

physiopathologie de cette maladie est encore très mal comprise. Nos résultats permettent de mieux comprendre le rôle de WASP dans la dynamique de la rencontre entre cellules présentatrices de l'antigène et lymphocytes T. Une bonne régulation de ces interactions est la clef à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptée. Pour la première fois, les interactions entre lymphocytes T humains et cellules dendritiques dans le contexte de WASP ont été expérimentées en dynamique. Nos travaux ouvrent encore de nombreux champs d'investigation quant au rôle de WASP. Particulièrement, les recherches sur l'origine des désordres autoimmuns méritent d'être approfondies. En effet, les patients WAS traités par transplantation de moelle osseuse développent des maladies autoimmunes (Ozsahin et al., 2008). Cette complication est associée à la présence résiduelle de lymphocytes T déficients pour WASP. Ces derniers seraient à l'origine des manifestations auto-immunes malgré la présence de lymphocytes T de donneurs sains. Le suivi à long terme des patients traités par thérapie génique révélera aussi si le même type de complications se développe.

ANNEXES

Revertant T lymphocytes in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome: Analysis of function and distribution in lymphoid organs

Sara Trifari, PhD,^{a#} Samantha Scaramuzza, PhD,^{a*} Marco Catucci, MS,^{a,b} Maurilio Ponzone, MD,^c Luca Mollica, PhD,^d Robert Chiesa, MD,^a Federica Cattaneo, MD,^a Fanny Lafouresse, MS,^{e,f} Ronan Calvez, PhD,^{e,f} William Vermi, MD,^g Daniela Medicina, MS,^g Maria Carmina Castiello, MS,^a Francesco Marangoni, PhD,^a Marita Bosticardo, PhD,^a Claudio Doglioni, MD,^c Maurizio Caniglia, MD,^h Alessandro Aiuti, MD,^{a,i} Anna Villa, MD,^{a,j} Maria-Grazia Roncarolo, MD,^{a,b} and Loïc Dupré, PhD^{e,f} Milan, Brescia, Rome, and Segrate, Italy, and Toulouse, France

Background: The Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) is a rare genetic disease characterized by thrombocytopenia, immunodeficiency, autoimmunity, and hematologic malignancies. Secondary mutations leading to re-expression of WAS protein (WASP) are relatively frequent in patients with WAS.

Objective: The tissue distribution and function of revertant cells were investigated in a novel case of WAS gene secondary mutation.

Methods: A vast combination of approaches was used to characterize the second-site mutation, to investigate revertant cell function, and to track their distribution over a 18-year clinical follow-up.

Results: The WAS gene secondary mutation was a 4-nucleotide insertion, 4 nucleotides downstream of the original deletion.

This somatic mutation allowed the T-cell-restricted expression of a stable, full-length WASP with a 3-amino acid change compared with the wild-type protein. WASP⁺ T cells appeared early in the spleen (age 10 years) and were highly enriched in a mesenteric lymph node at a later time (age 23 years). Revertant T cells had a diversified T-cell-receptor repertoire and displayed *in vitro* and *in vivo* selective advantage. They proliferated and produced cytokines normally on T-cell-

receptor stimulation. Consistently, the revertant WASP correctly localized to the immunologic synapse and to the leading edge of migrating T cells.

Conclusion: Despite the high proportion of functional revertant T cells, the patient still has severe infections and autoimmune disorders, suggesting that re-expression of WASP in T cells is not sufficient to normalize immune functions fully in patients with WAS. (J Allergy Clin Immunol 2010;125:439-48.)

Key words: Primary immunodeficiency, Wiskott-Aldrich syndrome, secondary mutation

The Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) is a rare X-linked immunodeficiency, characterized by thrombocytopenia, eczema, and a high frequency of infections, autoimmunity, and hematologic malignancies.¹ WAS is a result of mutations in the gene encoding the WAS protein (WASP), which is expressed in hematopoietic cells.^{2,3} WASP controls actin cytoskeleton remodeling by promoting Arp2/3-dependent actin nucleation in response to extracellular stimuli. In resting cells, WASP is stabilized by WASP-interacting protein and adopts an autoinhibited conformation.⁴ On stimulation, Cdc42 binds to WASP, which releases the intramolecular interaction, thereby allowing actin nucleation.⁵ WASP controls several immune cell functions, including adhesion and chemotaxis,⁶⁻¹¹ assembly of immunologic synapses,^{12,13} production of cytokines by T cells,¹⁴ regulatory T-cell activity,¹⁵ natural killer (NK)-cell lytic activity,¹⁶ and B-cell homeostasis.^{17,18} Consequently, clinical manifestations associated with WAS arise from the combination of impaired hematopoietic cell migration, defects in intercellular communication, and lineage-specific developmental defects.

Somatic revertant mosaicism has been reported in approximately 10% of patients with WAS,¹⁹ without preferences of age or clinical score. The mechanisms responsible for this high incidence of reversion remain unclear.²⁰ Expression of revertant WASP has been reported mainly in T cells,²¹⁻²⁷ but also in B cells^{28,29} and NK cells.²⁹⁻³¹ The frequency and diversity of these secondary genetic events is most likely underestimated, as illustrated by multiple revertant genotypes within individual patients with WAS.^{27,29,32}

We report here a novel case of somatic mosaicism in a patient with WAS leading to the expression of a functional, point-mutated WASP in T cells. The function of revertant T cells and their localization in secondary lymphoid organs were investigated.

From ^athe San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (HSR-TIGET), Milan; ^bthe Vita-Salute San Raffaele University, Milan; ^cthe Pathology Unit, Unit of Lymphoid Malignancies, San Raffaele Scientific Institute, Milan; ^dthe Biomolecular NMR Laboratory, Dulbecco Telethon Institute c/o San Raffaele Scientific Institute, Milan; ^ethe Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U563, Toulouse; ^fthe Toulouse III Paul-Sabatier University, Center of Physiopathology of Toulouse Purpan; ^gthe Department of pathology, University of Brescia; ^hthe Bone Marrow Transplant Unit, Hematology Division, Bambino Gesù Children's Hospital IRCCS, Rome; ⁱthe Department of Public Health and Cell Biology, University of Rome Tor Vergata; and ^jthe Institute for Biomedical Technologies (ITB-CNR), Segrate.

#Current address: the Department of Immunology/Early Discovery, Genentech Inc, South San Francisco.

*These authors contributed equally to this work.

Supported by the Telethon Foundation (A.V. and M.-G.R.), CARIPLO (NOBEL grant to A.V. and M.-G.R.), the Italian Health Ministry (RF2007: Giovani Ricercatori grant to M.B.), and the European Community (Marie Curie Excellence grant, contract MEXT-CT-2005-025032 to L.D.).

Disclosure of potential conflict of interest: S. Trifari is an employee of Genentech. The rest of the authors have declared that they have no conflict of interest.

Received for publication May 28, 2009; revised November 4, 2009; accepted for publication November 23, 2009.

Reprint requests: Loïc Dupré, PhD, INSERM U563, Purpan University Hospital, 31300 Toulouse, France. E-mail: loic.dupre@inserm.fr.

0091-6749/\$36.00

© 2010 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

doi:10.1016/j.jaci.2009.11.034

Abbreviations used

aa:	Amino acid
HD:	Healthy donor
NK:	Natural killer
TCR:	T-cell receptor
WAS:	Wiskott-Aldrich syndrome
WASP:	Wiskott-Aldrich syndrome protein
wt:	Wild-type

These findings are discussed in the context of the clinical status of the patient.

METHODS**Patients and cell lines**

Patient W4 is a 28-year old man with a full-blown WAS (clinical score 5). His clinical evolution is detailed in Table I. No HLA-matched sibling or unrelated donor was available, and he was not a candidate for HLA-mismatched related donor transplant. Patients W1, W2, and W6 have been previously described,¹⁴ as well as patient W31.³³ Patient W10 carries a 5-nucleotide deletion in exon 10 (positions 1115-1119) resulting in a stop codon (codon 445). Blood samples from patients and age-matched healthy donors (HDs) were obtained following standard ethical procedures (Helsinki protocol) and with the approval of the concerned internal review boards. Spleen, bone marrow, and lymph node samples were collected for therapeutic or diagnostic purposes.

Untransformed T-cell lines were generated by stimulating PBMCs with 1 μ g/mL phytohemagglutinin and 100 IU/mL recombinant human IL-2 (Chiron, Uxbridge, UK). T-cell clones were generated from the phytohemagglutinin/IL-2-stimulated cells by limiting dilution. A feeder mixture consisting of irradiated allogeneic PBMCs (1×10^6 /mL), EBV-transformed B cells (JY cell line, 1×10^5 /mL), and 1 μ g/mL phytohemagglutinin was used to expand the cells. At day three, 50 IU/mL recombinant human IL-2 was added to the cultures. T-cell lines and clones were restimulated every 2 weeks.

DNA analysis

For the mutational status analysis of the WAS gene, Genomic DNA was extracted from PBMCs, primary T cells, and EBV cell lines by using QIAmp DNA blood mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). For T-cell clones, DNA was extracted from a pellet of 0.5 to 1×10^6 cells. Exon 6 was amplified by PCR using Taq DNA Polymerase (Roche, Basel, Switzerland) and the following primers: forward 5'-CTAGAAAAGTCCCCTCTCATG-3'; reverse, 5'-CCAACTCCTCATCCTCCATC-3'. The PCR product was visualized on 1.5% agarose gels, purified, and cloned in a TA vector (Invitrogen, Carlsbad, Calif). Positive clones were subsequently selected and sequenced.

For the size distribution analysis of T-cell receptor (TCR) rearrangements, freshly isolated PBMCs were stained with WASP and CD3 as described. WASP⁺ and WASP⁻ T cells were sorted with a MoFlo cell sorter (Beckman Coulter, Brea, Calif). DNA was prepared by using the QIAmp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen). As described in detail in this article's Online Repository (Methods section) at www.jacionline.org, PCR amplifications were performed by using the IdentiClone™ TCR β Gene Clonality Assay (InVivoScribe Technologies, San Diego, Calif) applying the BIOMED-2 multiplex PCR protocols³⁴ that amplify all TCR β CDR3 regions.

Flow-cytometry analysis of WASP expression

Staining of WASP on whole blood was performed after fixation/permeabilization (Fix&Perm kit; BD Pharmingen, San Diego, Calif) by incubation with anti-WASP 5A5 mAbs (BD Pharmingen) conjugated to AlexaFluor-488 (Microscale Protein Labeling kit; Invitrogen). Surface staining was performed with anti-CD3-APC (tandem conjugates of allophycocyanin), anti-CD19-APC,

anti-CD27-phycoerythrin, anti-CD16-phycoerythrin, anti-CD56-APC, and anti-CD14-phycoerythrin mAbs (all from BD Pharmingen). Staining of WASP on cultured T cells was performed with AlexaFluor-488-conjugated anti-WASP 5A5 mAbs. Alternatively, unconjugated anti-WASP 5A5 mAbs followed by anti-IgG_{2a}-phycoerythrin mAbs (Southern Biotechnology, Birmingham, Ala) were used. Samples were analyzed on a FACSCanto or FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) and processed with the FCSEXPRESS or FlowJo softwares.

Western blot analysis of WASP expression

T lymphocytes were lysed in a RIPA buffer supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, Saint Louis, Mo). Lysates were boiled, separated through 7.5% SDS-polyacrylamide, and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked and incubated with anti-WASP (H250; Biotechnology, Santa Cruz, Calif) and anti- β -actin (AC15; Sigma) antibodies, followed by goat antirabbit IgG-IR Dye 800CW (LI-COR Biosciences, Lincoln, Neb) and goat antimouse-AlexaFluor-680 mAbs (Molecular Probes, Eugene, Ore). WASP and β -actin expression was recorded on an Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

Analysis of WASP localization by confocal microscopy

To induce a migratory phenotype, CD4⁺ T cells were incubated 20 minutes at 37°C onto poly-L-lysine treated slides coated with 100 ng/mL CXCL12 (Preprotech, London, UK). Cells were fixed/permeabilized and stained with phalloidin-AlexaFluor-488 (Molecular Probes) and anti-WASP Abs (H-250; Santa Cruz Biotechnology) followed by donkey antirabbit-AlexaFluor-555 Abs (Invitrogen), and anti- α -tubulin IgG₁ mAb (Sigma) followed by goat antimouse IgG₁-AlexaFluor-633 Abs (Invitrogen). After mounting (Vectashield; Vector Laboratories, Burlingame, Calif), samples were examined on a Zeiss LSM510 confocal microscope ($\times 63$ -1.4 oil immersion objective). To induce immunologic synapse formation, CD4⁺ T cells were incubated 20 minutes at 37°C with JY cells (ratio 2:1) pulsed with superantigens (100 ng/mL Staphylococcal Enterotoxin B, Staphylococcal Enterotoxin E and Toxic Shock Syndrome Toxin-1). Cell conjugates were transferred onto poly-L-lysine-coated slides and processed as described, with the exception that the α -tubulin staining was replaced by a CD2 staining (anti-CD2 IgG₁ mAbs from BD followed by goat antimouse IgG₁-AlexaFluor-633 Abs).

Analysis of WASP expression in tissue biopsies

Formalin-fixed or Bouin-fixed specimens (spleen and lymph node or bone marrow, respectively) were paraffin-embedded. Four-micrometer-thick sections were cut, deparaffinized, and stained with hematoxylin-eosin for routine histopathological examination. In parallel, tissue sections were stained with anti-CD3, anti-paired box gene 5 (PAX5) mAbs (Dako) and anti-WASP mAbs (clone D1; Santa Cruz Biotechnology) after antigen retrieval with TRIS-EDTA. Reactions were developed with horseradish peroxidase polymer (Lab Vision, Ipswich, Mass), and sections were counterstained with hematoxylin.

Proliferation and cytokine production

Proliferation was assessed by liquid scintillation counting of ³H-thymidine incorporation in T-cell lines and clones stimulated for 72 hours with antibody-coated latex beads, as previously described.¹⁷

Intracytoplasmic cytokines were measured in PBMCs stimulated with beads coated with 10 μ g/mL anti-CD3 and anti-CD28 mAbs. After 3 hours, 10 μ g/mL Brefeldin A (Calbiochem-Merck, Nottingham, UK) was added. After an additional 3 hours, cells were stained with anti-CD4-phycoerythrin-cyanine5 and anti-CD8-APC mAbs (BD). Cells were then fixed/permeabilized and stained with anti-WASP-AlexaFluor-488 plus anti-human IL-2-phycoerythrin or anti-human IFN- γ -phycoerythrin mAbs (BD). Analysis was performed on a FACSCanto cytometer, and data were processed with the FCSEXPRESS software (De Novo Software, Los Angeles, Calif).

TABLE 1. Clinical follow-up of patient W4 with WAS

Age	Clinical events	Laboratory data	Treatments
Birth	Hematoma Eczematous skin areas	Hyperbilirubinemia Thrombocytopenia (30,000/cubic millimeter) with small platelets Decreased lymphocyte counts Decreased IgM/IgG Increased IgA/IgE	Intravenous Immunoglobulins (IV Ig) Hydrocortisone
1½ y*	Eczematous skin areas	Thrombocytopenia (30,000- 40,000/cubic millimeter)	IV Ig Hydrocortisone
8 y	Bronchopneumonia Varicella zoster infection	Antismooth muscle reactivity Positive direct and indirect Coombs tests	
9 y	Autoimmune hemolytic anemia		Steroid treatment†
10 y	Autoimmune hemolytic anemia	Persistent thrombocytopenia	Splenectomy‡
12 y	Hemorrhagic vasculitis Migratory joint pain and swelling	Decreased platelet counts (10,000/cubic millimeter)	Prednisone therapy
13 y	Hemorrhagic vasculitis Migratory joint pain and swelling	Autoimmune work-up negative except for mildly positive direct Coombs test	Nonsteroidal anti- inflammatory drugs alternated with steroid therapy (transitory clinical improvement)
20 y	Increased incidence of viral and bacterial infectious complications	<i>Molluscum contagiosum</i> and pyodermitis	IV Ig Treatment of infectious episodes
23 y	Severe pyodermitis with satellite inguinal lymphadenitis	Multiple abdominal lymphadenopathy Reactive adenitis positive for <i>Staphylococcus aureus</i> § Bone marrow dyshematopoiesis	IV Ig Aggressive intravenous antibiotics Transient steroid treatment
27 y	Severe pyodermitis associated with subcutaneous adenitis	Positivity for <i>Staphylococcus aureus</i>	IV Ig Antibacterial prophylaxis Steroid treatment

*Diagnosis of WAS established.

†The patient has been steroid-dependent since then.

‡Splenectomy led to transient resolution of the hemolysis and normalization of platelet counts.

§Mesenteric lymph node laparoscopic biopsy failed to show lymphoproliferative disorder.

||Bone marrow biopsy failed to show either lymphoid or myeloid proliferation.

RESULTS

Revertant WASP expression in T lymphocytes of a patient with WAS

The patient with WAS studied here (W4) was known to carry a single nucleotide deletion introducing a premature stop codon (Jin et al,³⁵ patient 126-B). However, flow-cytometry analysis revealed expression of WASP in a fraction of peripheral blood T cells (Fig 1, A). In a sample collected when the patient was 25 years old, WASP expression was detected in approximately 50% of peripheral blood T cells (both in CD4⁺ and CD8⁺ T cells; see this article's Fig E1 in the Online Repository at www.jacionline.org), but not in B cells, NK cells, or monocytes. Complementary data also failed to show WASP expression in megakaryocytes (see this article's Fig E2 in the Online Repository at www.jacionline.org). HLA typing confirmed that WASP⁺ T cells did not derive from the engraftment of cells from the mother or others (data not shown). The region containing the germline mutation in the WAS gene was sequenced, confirming the t570 point deletion in exon 6, leading to frame shift and premature stop at codon 260 (sequence W4 in Fig 1, B). A secondary 4-nucleotide (gcgc) insertion was also detected, 4 nucleotides downstream of the original deletion (sequence W4R in Fig 1, B). This insertion was predicted to lead to restoration of the reading frame with a LP→RPR amino acid (aa) substitution. The revertant W4R sequence was found in DNA clones established from both a peripheral blood-derived T-cell line and from an abdominal lymph node biopsy, but not from an EBV B-cell line (data not shown). Flow-cytometry analysis of a T-cell line showed that revertant WASP expression level was comparable to that of wild-type (wt) WASP in HD T cells (Fig

1, C). This is in contrast with the reduced expression of WASP observed in W6 patient, a patient with X-linked thrombocytopenia carrying a single aa substitution. In agreement with the predicted W4R sequence, Western blot analysis showed normal molecular weight for the revertant WASP (Fig 1, D). A modeling analysis predicted that the revertant protein would adopt a conformation closely related to that of the wt one (see this article's Fig E3 in the Online Repository at www.jacionline.org). Taken together, these data indicate that patient W4 is a novel case of secondary WAS gene mutation and suggest that the stability of the revertant protein may be preserved.

Correct subcellular localization of revertant WASP

Subcellular localization of revertant WASP was analyzed by confocal microscopy. As shown in Fig 2, A, WASP staining of W4 CD4⁺ T cells clearly discriminated WASP⁻ (empty arrows) from WASP⁺ revertant T cells. Similarly to wt WASP, revertant WASP distributed beneath the plasma membrane and colocalized with cortical actin. In the revertant W4 T cells that polarized in response to CXCL12, revertant WASP localized normally at the F-actin-rich leading edge lamellipodia (Fig 2, A, lower panels, filled arrows). As indicated by the α -tubulin costaining, both wt and revertant WASP were also enriched around the microtubule-organizing center, at the basis of the uropod. As shown in Fig 2, B (upper panels), revertant WASP colocalized normally with cortical actin in T cells at the contact with unpulsed APC. On contact with superantigen-pulsed APC, revertant WASP and actin redistributed to the immunologic synapse, as revealed by the polarization of CD2 (Fig 2, B, lower panels, white arrows).

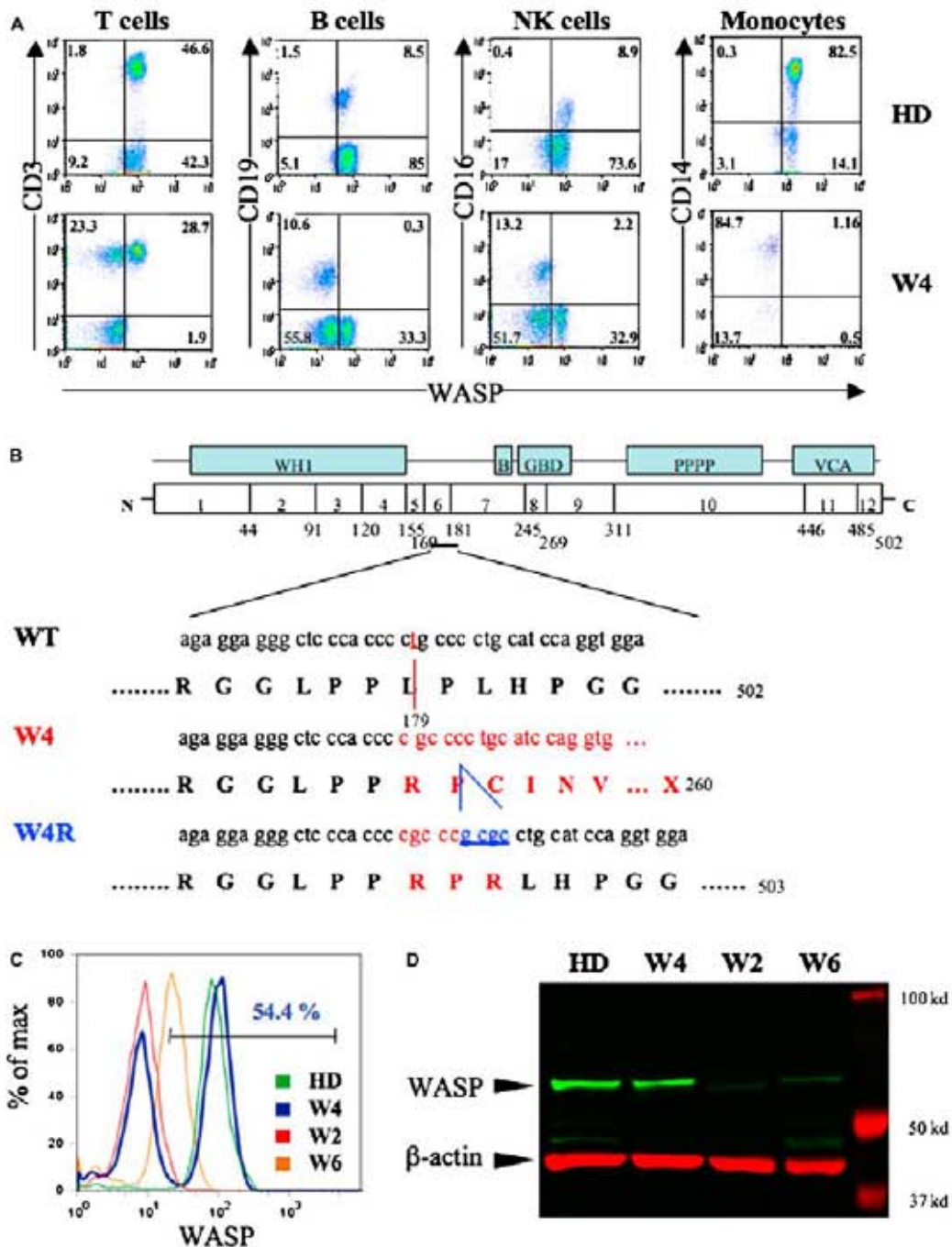


FIG 1. Characterization of revertant WASP expression caused by secondary site mutation. **A**, Flow-cytometry analysis of WASP expression in patient W4 (age 25 years) and HD PBMCs, in combination with CD3, CD19, CD16, and CD14 stainings. **B**, Nucleotide and aa sequences of W4 germ-line (W4) and secondary (W4R) mutations. **C**, Flow-cytometry and **D**, Western blot analysis of WASP expression in CD4⁺ T-cell lines from 1 HD and patients W4, W2, and W6.

Together, these data indicate that revertant WASP displays a normal subcellular localization, at resting state and on stimulation.

Selective advantage and TCR diversity of revertant T cells

From the age 20 to 28 years, the fraction of WASP⁺ T cells (both CD4⁺ and CD8⁺) in the blood of patient W4 progressively increased from approximately 10% to 70% (Fig 3, A). This

indicates that WASP⁺ revertant T cells had a selective growth advantage *in vivo* over WASP⁻ T cells. Interestingly, on T-cell culture, a further rapid increase of the percentage of WASP⁺ cells was observed (Fig 3, A). To study revertant T-cell TCR repertoire diversity, WASP⁺ and WASP⁻ peripheral blood T cells were sorted to analyze separately the size distribution of the major TCR V β rearrangements. Similarly to T cells isolated from a HD, WASP⁺ T cells exhibited a diversified TCR size distribution.

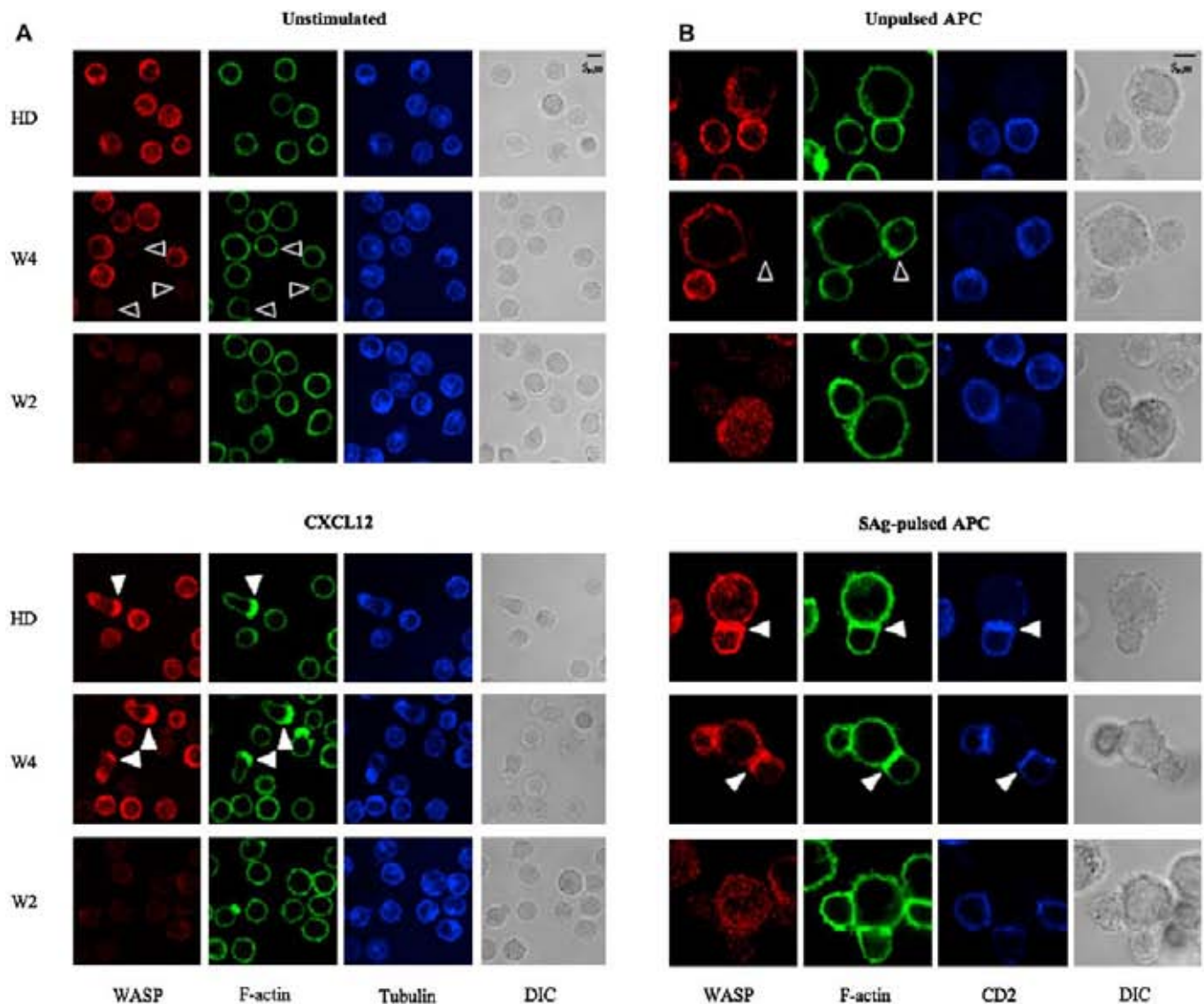


FIG 2. WASP subcellular localization. HD, patient W4, and patient W2 CD4⁺ T cells stimulated with CXCL12 (A) or superantigen (SAg)-pulsed APC (B) and costained for WASP, F-actin, α -tubulin, or CD2. Differential interference contrast (DIC) is shown in parallel. Empty arrows indicate WASP-negative cells. Filled arrows indicate CXCL12-induced lamellipodial protrusion enriched in WASP and F-actin (A) or immunologic synapses enriched in WASP, F-actin, and CD2 (B). Results representative of 3 independent experiments.

In contrast, WASP⁺ T cells appeared to have a more restricted pattern, suggesting reduced TCR repertoire diversity (Fig 3, B).

Normal response to TCR stimulation in revertant T cells

To assess the TCR-driven proliferation of W4 revertant T cells, a T-cell line enriched in WASP⁺ T cells (70%) was stimulated with anti-CD3 mAbs and compared with T-cell lines from 2 WASP⁻ patients (W2 and W10) and 4 HDs (1-4). As shown in Fig 4, A, W4 T cells proliferated at low concentrations of anti-CD3 mAbs (0.005-0.1 μ g/mL), similarly to control T cells. This was in contrast with the WASP⁻ T cells that failed to proliferate at these concentrations. At higher concentrations, W4 T cells reached a proliferation plateau lower than that of HD T cells,

probably because of residual WASP⁻ T cells. The production of IL-2 and IFN- γ was then tested in the peripheral CD4⁺ T cells of the patient. On anti-CD3/CD28 mAb stimulation, approximately one third of HD and WASP⁺ W4 T cells produced IL-2 (Fig 4, B). Conversely, only a very small proportion of WASP⁻ W4 T cells produced IL-2, similarly to WASP⁻ W31 T cells. W4 revertant T cells also produced IFN- γ on stimulation, in a proportion and at levels similar to those of HD T cells (Fig 4, B). To assess more precisely the impact of the secondary mutation on WASP expression and on TCR-driven proliferation, CD4⁺ T-cell clones were generated from patient W4 (n = 34). In the W4 T-cell clones, WASP expression was either negative (as in representative clone W4 3.19) or positive (as in representative clone W4 03.2) and correlated with the absence or presence of the W4R secondary mutation, respectively (Fig 5, A).

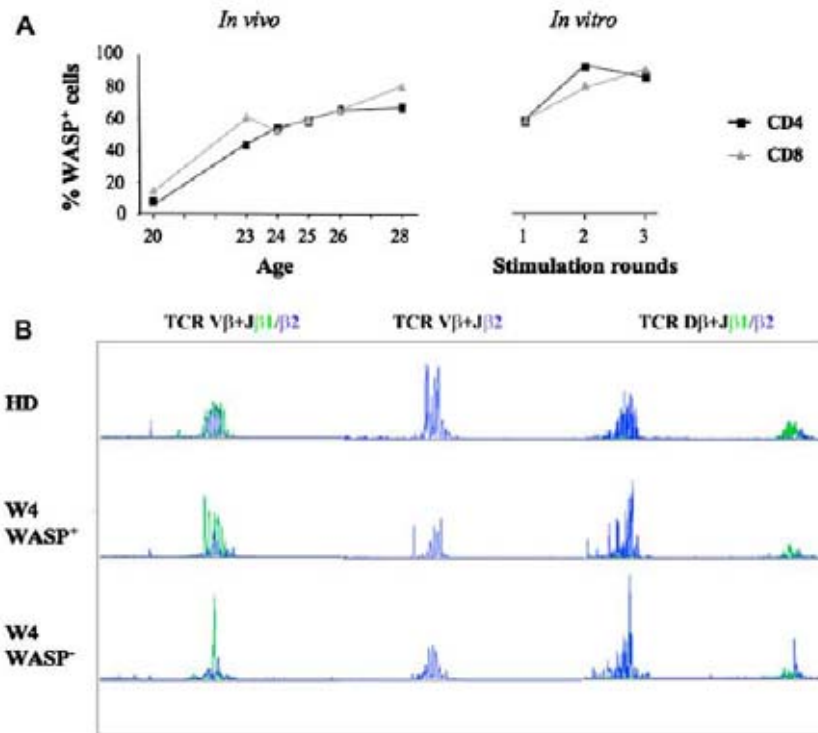


FIG 3. Expansion and TCR diversity of revertant T cells. **A**, Flow-cytometry analysis of WASP expression in patient W4 peripheral blood CD4⁺ and CD8⁺ T cells along time (age 20-28 years) and in a T-cell line stimulated and expanded *in vitro* (from PBMCs obtained at age 25 years). **B**, Size distribution of the major TCRβ rearrangements (Vβ-Jβ1/2.2/2.6/2.7; Vβ-Jβ2.1/2.3/2.4/2.5; Dβ-Jβ, as indicated by green and blue) analyzed on peripheral blood T cells from a HD and on sorted WASP⁺ and WASP⁻ peripheral blood T cells from patient W4.

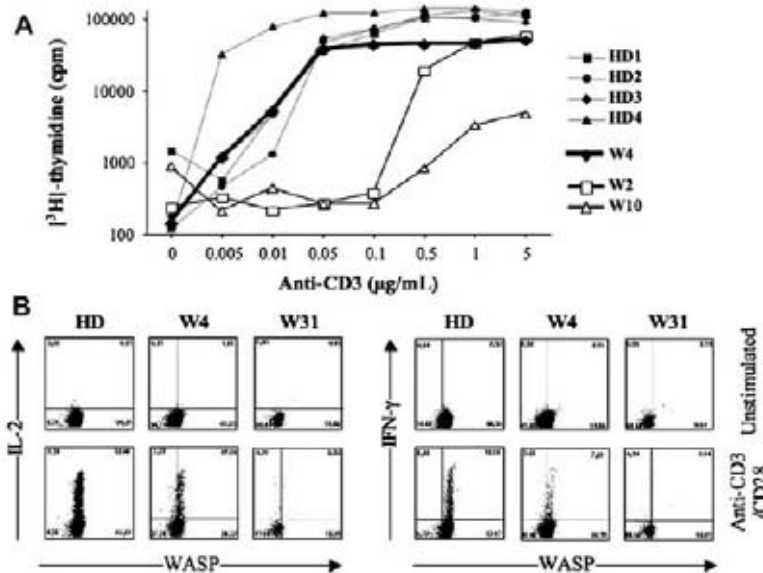


FIG 4. Proliferation and cytokine production. **A**, Anti-CD3/CD28 mAb-driven proliferation in counts per minute (cpm) of T cell lines from HDs and patients W4, W2, and W10. **B**, Anti-CD3/CD28 mAb-driven production of IL-2 and IFN-γ in peripheral blood CD4⁺ T cells from a HD and patients W4 and W31.

Importantly, all WASP⁺ clones analyzed (n = 11) carried the same secondary mutation, and WASP expression levels were comparable in W4 WASP⁺ and HD clones (mean fluorescence intensity, 68.8 ± 10.0 and 71.3 ± 13.8, respectively). Analysis of

TCR diversity in the WASP⁺ clones showed diversified Vβ use (see this article's Table E1 in the Online Repository at www.jacionline.org), confirming the TCR repertoire diversity observed in fresh revertant T cells. On stimulation with anti-CD3/CD28

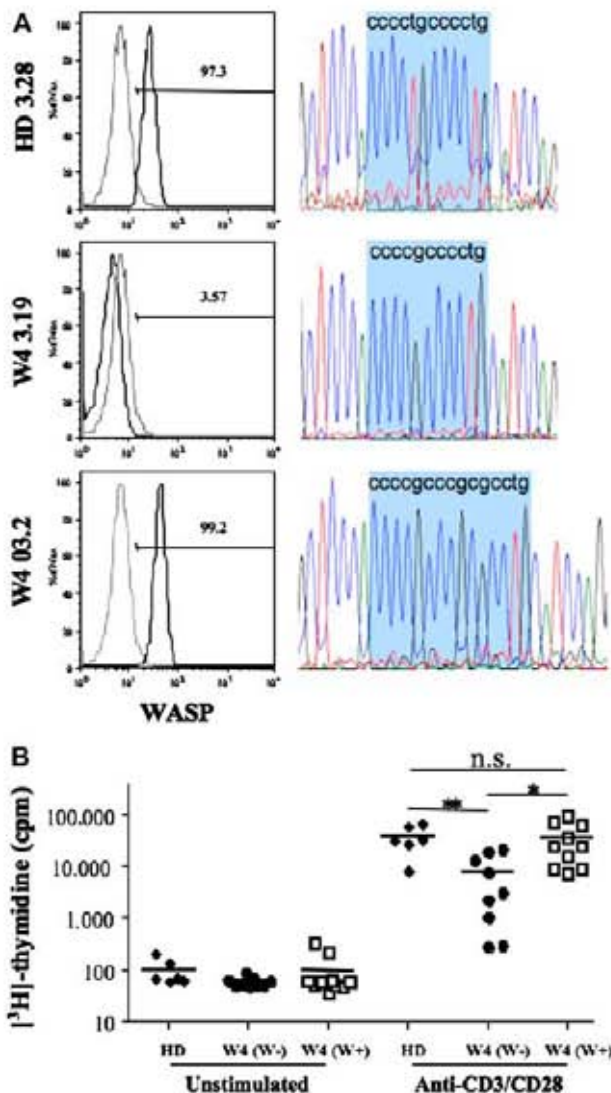


FIG 5. Analysis of T-cell clones. **A**, Flow-cytometry analysis of WASP expression in representative CD4⁺ T-cell clones with corresponding sequence (1 clone from a HD; 1 WASP⁻ and 1 WASP⁺ clone from patient W4, age 23 years). **B**, Anti-CD3/CD28 mAb-driven proliferation in counts per minute (cpm) of CD4⁺ T-cell clones from 1 HD and patient W4 (divided according to WASP expression). The average of 3 different experiments is shown (**P* < .05; ***P* < .01; n.s., not significant).

mAbs, the WASP⁺ revertant T-cell clones proliferated at levels similar to those of control HD T-cell clones, whereas the WASP⁻ T-cell clones proliferated more heterogeneously and to lower levels (Fig 5, B). These results demonstrate that only 1 type of reverse mutation was likely to be responsible for the expression of WASP in revertant T cells, which showed normal proliferation and cytokine production.

Early accumulation of revertant T cells in T-cell zones of lymphoid tissues

We then developed an immunohistologic analysis of WASP to track the distribution of revertant cells within different hematopoietic tissues. WASP staining was first validated in control tissues (see this article's Fig E4 in the Online Repository at

www.jacionline.org). The analysis of the spleen from patient W4, removed at the age of 10 years, revealed that WASP was already expressed by a large amount of cells in the white pulp, mainly in periarteriolar sheets (Fig 6, A). A parallel CD3 staining suggests that WASP⁺ cells corresponded to T cells and that the majority of T cells were indeed WASP⁺ (Fig 6, B). This finding shows that the expansion of revertant T cells likely started more than a decade before their detection in the blood. A mesenteric lymph node biopsy (age 23 years) was highly enriched in WASP⁺ lymphocytes (Fig 6, C), identified as CD3⁺ T cells belonging to paracortical areas and B-cell follicles (Fig 6, D). This was indirectly confirmed by the absence of colocalization between WASP and the B-cell marker Pax5 (Fig 6, E). In the bone marrow (age 23 years), most of the analyzed area showed rare WASP⁺ lymphoid cells (Fig 6, F). Loose aggregates of WASP⁺ lymphoid cells corresponding to mature T-cell aggregates were observed (Fig 6, G), as confirmed by CD3 staining on parallel sections (data not shown). Together, these data suggest that WASP⁺ T cells have a strong selective advantage *in vivo* and localize correctly to secondary lymphoid organs.

DISCUSSION

Cases of somatic revertant mosaicisms have been reported in different inherited disorders,³⁶ including primary immunodeficiencies.³⁷⁻³⁹ In WAS, the frequency of spontaneous revertant mutations is estimated to be 10%.^{19,20} Remarkably, multiple reverse mutations occurring at distinct sites in the WAS gene were found in single patients.^{27,29,32} These reversion cases are unique in that they provide relevant information about the role of WASP in the development, function, and homeostasis of hematopoietic cells. We report here the case of a patient with WAS expressing a functional revertant WASP mutant in T cells. For the first time in such a case, revertant WASP expression was tracked over time in various hematopoietic organs.

The original mutation was a single-base deletion causing a frame shift and a premature stop codon, leading to the loss of WASP expression. We identified a novel 4-nucleotide insertion, 4 nucleotides downstream the original mutation. This region of the WAS gene has not been described as a mutational hotspot. However, the high CG content and the presence of 2 cytosine tracts surrounding the original mutation may have favored secondary insertion. This event restored the reading frame and allowed mutant protein expression with a predicted LP→RPR aa change. Modeling analysis indicated that the overall conformation of the mutant protein would be preserved. Because the mutation lies in exon 6, which does not encode any known function or binding domain of the protein, the function of the revertant protein may also be preserved.

Revertant WASP displayed a normal colocalization with F-actin both in resting and activated conditions, suggesting that revertant WASP is functional during chemotaxis and antigen stimulation. Consistently, the presence of revertant T cells in the T-cell zone of the spleen and of a mesenteric lymph node indicates that revertant T cells migrated and distributed normally to secondary lymphoid organs. In addition, revertant T cells displayed normal TCR-driven proliferation even at low-dose anti-CD3 mAbs, and normal IL-2 and IFN- γ production, suggesting that they could respond to physiological doses of antigen. Together, these data indicate that revertant WASP is functional, the best evidence being the selective advantage of revertant T cells *in vivo*.

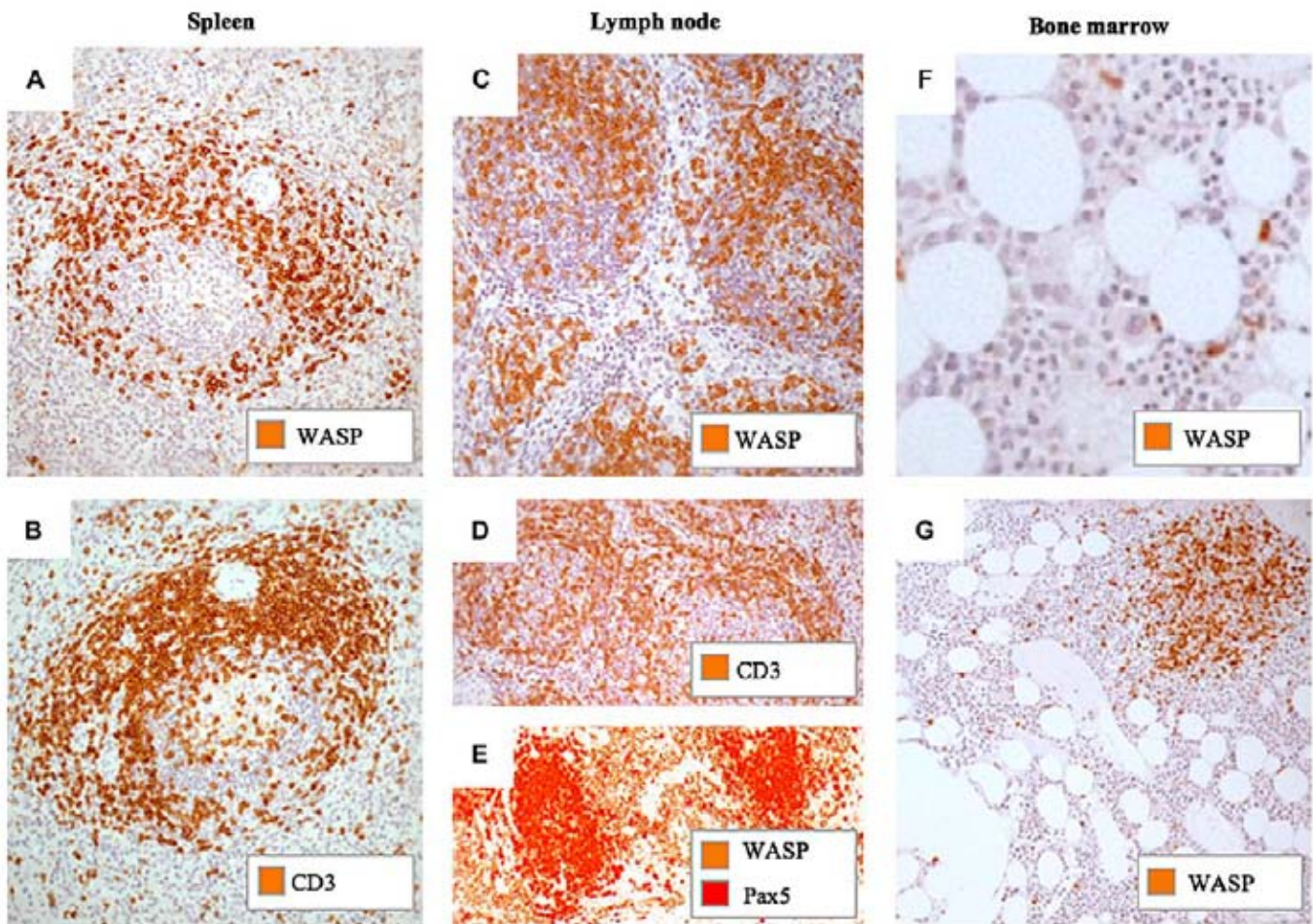


FIG 6. Lymphoid tissue distribution of revertant WASP expression. Histologic analysis of WASP expression in lymphoid tissues from patient W4, including spleen (A and B) collected at age 10 years, and lymph node (C-E) and bone marrow (F and G) collected at age 23 years. Stainings for WASP (A, C, E, F, and G) and CD3 (B and D) on adjacent sections or Pax5 as costaining (E). Pictures taken with a $\times 10$ (G) or $\times 20$ (A-F) objective show representative areas of each tissue.

The detection of a high proportion of WASP⁺ cells in the spleen (age 10 years) suggests that the reverse mutation event occurred early in life. Accumulation of WASP⁺ cells may have been favored by white-pulp hypoplasia (data not shown). Given the apparently higher enrichment of revertant T cells in the lymph node compared with the blood, it can be speculated that revertant T cells may have used secondary lymphoid organs as reservoirs. This observation is reminiscent of the preferential enrichment within the spleen of genetically corrected T cells that developed after gene therapy in WAS-knockout mice.^{40,41} Revertant T-cell chimerism in the blood may depend on the properties of the revertant protein but also on the nature and strength of the stimuli encountered. Interestingly, sorted WASP⁺ revertant peripheral blood T cells had a normally diversified TCR repertoire, whereas the WASP⁻ T-cell counterpart displayed reduced diversity, as expected for adult patients with WAS.⁴² This suggests that revertant WASP expression occurred as early as in a T-cell progenitor and that it helped maintaining a diversified TCR repertoire in the progeny. Alternatively, the secondary mutation event may have occurred in a more primitive hematopoietic progenitor, although our approaches failed to reveal WASP expression in B cells, NK cells, megakaryocytes, or myeloid cells. We found higher

percentages of revertant T cells within the memory, compared with the naive, subset (Fig E1), suggesting that part of the selective pressure may have occurred on antigen stimulation. Possibly, the few WASP⁺ cells detected in the bone marrow could be resident central memory T cells.⁴³ Together, the detection of revertant T cells in multiple lymphoid organs points toward a normal homing and survival of WASP⁺ T cells.

Our follow-up study indicates that although apparently functional revertant T cells started to expand early in life, the patient presented a high incidence of viral and bacterial infections and developed autoimmunity. Several explanations may account for the observed clinical course. Progressive restoration of WASP expression restricted to the T-cell compartment is probably not sufficient to ameliorate significantly the immune control of infectious episodes, in particular in the context of immunosuppressive therapy. In comparison, patients with X-linked thrombocytopenia, expressing from birth residual WASP in all hematopoietic lineages, appear not to have recurrent infections.⁴⁴ The autoimmune manifestations may also be caused by the presence of residual WASP-negative autoreactive lymphocytes, as suggested by the striking observation that a majority of patients with WAS with mixed chimerism after hematopoietic stem cell

transplantation develop autoimmunity.⁴⁵ Moreover, revertant WASP expression may have variable outcomes in restoring functions in distinct CD4⁺ T-cell subpopulations involved in the control versus triggering of autoimmunity. We previously reported defective suppressive activity in regulatory T cells isolated from the patient,¹⁵ although we could not determine whether they expressed revertant WASP. On the other hand, preliminary data indicate enrichment of WASP⁺ cells within the CD4⁺CD161⁺ T cells (Fig E5), suggesting a biased selective advantage in T_H17 cells.⁴⁶

In summary, clinical improvement after genetic reversion most probably depends on the size, diversity, and function of the revertant cell pool. In the context of WAS gene therapy strategies, optimal therapeutic effects will also depend on those parameters. Current strategies target gene delivery to hematopoietic stem cells potentially to correct all hematopoietic cell lineages.^{47,48} In addition, the high incidence of reversion cases in patients with WAS should be taken into consideration during the evaluation of the best therapeutic options, including gene therapy.

We are grateful to all the patients and their families, especially to patient W4 and his family, for their strong involvement in the study. We thank Robert Bredius, Silvana Martino, and Luigi Notarangelo for providing patient samples for this study. We thank Katharina Fleischhauer for the HLA typing study. We thank Sophie Allard from the IFR150 microscopy platform (Toulouse). We thank Grazia Andolfi and Massimiliano Mirolo for excellent technical assistance. We thank Marina Brambilla for the immunohistology analysis.

Clinical implications: Given the high rate of secondary mutations in patients with WAS, this study provides key information relevant to the clinical follow-up of these patients.

REFERENCES

- Burns S, Cory GO, Vainchenker W, Thrasher AJ. Mechanisms of WASP-mediated hematologic and immunologic disease. *Blood* 2004;104:3454-62.
- Dery J, Ochs H, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich Syndrome. *Cell* 1994;78:635-44.
- Greer W, Shehabeldin A, Schulman J, Junker A, Siminovitch K. Identification of WASP mutations, mutation hotspots and genotype-phenotype disparities in 24 patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Hum Genet* 1996;98:685-90.
- Konno A, Kirby M, Anderson SA, Schwartzberg PL, Candotti F. The expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is dependent on WASP-interacting protein (WIP). *Int Immunol* 2007;19:185-92.
- Kim A, Kakalis L, Abdul-Manan N, Liu G, Rosen M. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* 2000;404:151-8.
- Badolato R, Sozzani S, Malacame F, Bresciani S, Fiorini M, Borsanti A, et al. Monocytes from Wiskott-Aldrich patients display reduced chemotaxis and lack of cell polarization in response to monocyte chemoattractant protein-1 and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J Immunol* 1998;161:1026-33.
- Binks M, Jones G, Brickell P, Kinnon C, Katz D, Thrasher A. Intrinsic dendritic cell abnormalities in Wiskott-Aldrich syndrome. *Eur J Immunol* 1998;28:3259-67.
- Linder S, Nelson D, Weiss M, Aepelbacher M. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:9648-53.
- Haddad E, Zugaza JL, Louache F, Debili N, Crouin C, Schwarz K, et al. The interaction between Cdc42 and WASP is required for SDF-1-induced T-lymphocyte chemotaxis. *Blood* 2001;97:33-8.
- Calle Y, Chou HC, Thrasher AJ, Jones GE. Wiskott-Aldrich syndrome protein and the cytoskeletal dynamics of dendritic cells. *J Pathol* 2004;204:460-9.
- Carman CV, Sage PT, Sciuto TE, de la Fuente MA, Geha RS, Ochs HD, et al. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity* 2007;26:784-97.
- Dupre L, Aiuti A, Trifari S, Martino S, Saracco P, Bordignon C, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity* 2002;17:157-66.
- Borg C, Jalil A, Laderach D, Maruyama K, Wakasugi H, Charrier S, et al. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* 2004;104:3267-75.
- Trifari S, Sita G, Aiuti A, Scaramuzza S, Marangoni F, Guidotti LG, et al. Defective Th1 cytokine gene transcription in CD4⁺ and CD8⁺ T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients. *J Immunol* 2006;177:7451-61.
- Marangoni F, Trifari S, Scaramuzza S, Panaroni C, Martino S, Notarangelo LD, et al. WASP regulates suppressor activity of human and murine CD4⁺(+)CD25⁺(+) FOXP3⁺ natural regulatory T cells. *J Exp Med* 2007;204:369-80.
- Orange JS, Ramesh N, Remold-O'Donnell E, Sasahara Y, Koopman L, Byrne M, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:11351-6.
- Meyer-Bahlburg A, Becker-Herman S, Humblet-Baron S, Khim S, Weber M, Bouma G, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency in B cells results in impaired peripheral homeostasis. *Blood* 2008;112:4158-69.
- Westerberg LS, de la Fuente MA, Wermeling F, Ochs HD, Karlsson MC, Snapper SB, et al. WASP confers selective advantage for specific hematopoietic cell populations and serves a unique role in marginal zone B-cell homeostasis and function. *Blood* 2008;112:4139-47.
- Stewart DM, Candotti F, Nelson DL. The phenomenon of spontaneous genetic reversions in the Wiskott-Aldrich syndrome: a report of the workshop of the ESID Genetics Working Party at the XIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Budapest, Hungary October 4-7, 2006. *J Clin Immunol* 2007;27:634-9.
- Davis BR, Candotti F. Revertant somatic mosaicism in the Wiskott-Aldrich syndrome. *Immunol Res* 2009;44:127-31.
- Ariga T, Yamada M, Sakiyama Y, Tatsuzawa O. A case of Wiskott-Aldrich syndrome with dual mutations in exon 10 of the WASP gene: an additional de novo one-base insertion, which restores frame shift due to an inherent one-base deletion, detected in the major population of the patient's peripheral blood lymphocytes. *Blood* 1998;92:699-701.
- Wada T, Schurman S, Otsu M, Garabedian E, Ochs H, Nelson D, et al. Somatic mosaicism in Wiskott-Aldrich syndrome suggests in vivo reversion by a DNA slippage mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:8697-702.
- Wada T, Konno A, Schurman S, Garabedian E, Anderson S, Kirby M, et al. Second-site mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) protein gene causes somatic mosaicism in two WAS siblings. *J Clin Invest* 2003;111:1389-97.
- Wada T, Schurman SH, Jagadeesh GJ, Garabedian EK, Nelson DL, Candotti F. Multiple patients with revertant mosaicism in a single Wiskott-Aldrich syndrome family. *Blood* 2004;104:1270-2.
- Humblet-Baron S, Sather B, Anover S, Becker-Herman S, Kasprovicz D, Khim S, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for regulatory T cell homeostasis. *J Clin Invest* 2007;117:407-18.
- Boztug K, Baumann U, Ballmaier M, Webster D, Sandrock I, Jacobs R, et al. Large granular lymphocyte proliferation and revertant mosaicism: two rare events in a Wiskott-Aldrich syndrome patient. *Haematologica* 2007;92:e43-5.
- Davis BR, Dicola MJ, Prokopyshyn NL, Rosenberg JB, Moratto D, Muul LM, et al. Unprecedented diversity of genotypic revertants in lymphocytes of a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 2008;111:5064-7.
- Konno A, Wada T, Schurman SH, Garabedian EK, Kirby M, Anderson SM, et al. Differential contribution of Wiskott-Aldrich syndrome protein to selective advantage in T- and B-cell lineages. *Blood* 2004;103:676-8.
- Boztug K, Germeshausen M, Avedillo Diez I, Gulacsy V, Diestelhorst J, Ballmaier M, et al. Multiple independent second-site mutations in two siblings with somatic mosaicism for Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Genet* 2008;74:68-74.
- Lutskiy MI, Beardsley DS, Rosen FS, Remold-O'Donnell E. Mosaicism of NK cells in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 2005;106:2815-7.
- Du W, Kumaki S, Uchiyama T, Yachie A, Yeng Looi C, Kawai S, et al. A second-site mutation in the initiation codon of WAS (WASP) results in expansion of subsets of lymphocytes in an Wiskott-Aldrich syndrome patient. *Hum Mutat* 2006;27:370-5.
- Lutskiy MI, Park JY, Remold SK, Remold-O'Donnell E. Evolution of highly polymorphic T cell populations in siblings with the Wiskott-Aldrich syndrome. *PLoS ONE* 2008;3:e3444.
- van Belzen MJ, Boogaard MW, ten Dam MM, Losekoot M, Bredius RGM. A silent variant in the WAS gene causing Wiskott-Aldrich syndrome. Presented at the annual meeting of The American Society of Human Genetics, November 11-15, 2008, Philadelphia, Pennsylvania, poster 501/T, page 128 of the meeting proceedings.
- van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17:2257-317.

35. Jin Y, Mazza C, Christie JR, Giliani S, Fiorini M, Mella P, et al. Mutations of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation. *Blood* 2004;104:4010-9.
36. Hirschhorn R. In vivo reversion to normal of inherited mutations in humans. *J Med Genet* 2003;40:721-8.
37. Hirschhorn R, Yang DR, Puck JM, Huie ML, Jiang CK, Kurlandsky LE. Spontaneous in vivo reversion to normal of an inherited mutation in a patient with adenosine deaminase deficiency. *Nat Genet* 1996;13:290-5.
38. Stephan V, Wahn V, Le Deist F, Dirksen U, Broker B, Muller-Fleckenstein I, et al. Atypical X-linked severe combined immunodeficiency due to possible spontaneous reversion of the genetic defect in T cells. *N Engl J Med* 1996;335:1563-7.
39. Tone Y, Wada T, Shibata F, Toma T, Hashida Y, Kasahara Y, et al. Somatic revertant mosaicism in a patient with leukocyte adhesion deficiency type 1. *Blood* 2007;109:1182-4.
40. Dupre L, Marangoni F, Scaramuzza S, Trifari S, Hernandez RJ, Aiuti A, et al. Efficacy of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome using a WAS promoter/cDNA-containing lentiviral vector and nonlethal irradiation. *Hum Gene Ther* 2006;17:303-13.
41. Marangoni F, Bosticardo M, Charrier S, Draghici E, Locci M, Scaramuzza S, et al. Evidence for long-term efficacy and safety of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome in preclinical models. *Mol Ther* 2009;17:1073-82.
42. Wada T, Schurman SH, Garabedian EK, Yachie A, Candotti F. Analysis of T-cell repertoire diversity in Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 2005;106:3895-7.
43. Mazo IB, Honczarenko M, Leung H, Cavanagh LL, Bonasio R, Weninger W, et al. Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8+ T cells. *Immunity* 2005;22:259-70.
44. Imai K, Morio T, Zhu Y, Jin Y, Itoh S, Kajiwara M, et al. Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood* 2004;103:456-64.
45. Ozsahin H, Cavazzana-Calvo M, Notarangelo LD, Schulz A, Thrasher AJ, Mazzolari E, et al. Long-term outcome following hematopoietic stem-cell transplantation in Wiskott-Aldrich syndrome: collaborative study of the European Society for Immunodeficiencies and European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 2008;111:439-45.
46. Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med* 2008;205:1903-16.
47. Dewey RA, Diez IA, Ballmaier M, Filipovich A, Greil J, Gungor T, et al. Retroviral WASP gene transfer into human hematopoietic stem cells reconstitutes the actin cytoskeleton in myeloid progeny cells differentiated in vitro. *Exp Hematol* 2006;34:1161-9.
48. Charrier S, Dupre L, Scaramuzza S, Jeanson-Leh L, Blundell MP, Danos O, et al. Lentiviral vectors targeting WASP expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients. *Gene Ther* 2007;14:415-28.

METHODS

Size distribution analysis of TCR β rearrangements

Three PCR reactions targeting the large majority of complete and incomplete TCR β rearrangements (TCR β A: V β -J β 1/2.2/2.6/2.7; TCR β B: V β -J β 2.1/2.3/2.4/2.5; TCR β C: D β -J β) were performed. Negative controls (without template) and polyclonal and monoclonal controls were included for each experiment. Two microliters of PCR product was diluted 10-fold in formamide-containing 500 ROX DNA size standard (Applied Biosystems, Foster City, Calif) and denatured (95°C for 5 minutes) before separation in a high-resolution denaturing polyacrylamide gel (POP7 polymer; Applied Biosystems) and detection via a scanning laser using an automated ABI 3130 Genetic Analyzer. Analysis of PCR products was performed by GeneMapper software (Applied Biosystems) analysis.

Modeling method used to study the polypeptide fragment mapping the secondary mutation

Models of the secondary structures of the sequences spanning residues 163-192 of the wt protein (WT) and 163-193 of the revertant W4 patient protein (W4R) were initially predicted by using 3 different programs: PSIPRED,^{E1} SSPPRO/3DPRO,^{E2} and APSSP2.^{E3} Molecular Dynamics (MD) simulations were then performed on shorter peptides excluding the unstructured C terminal regions. Each polypeptide chain was put in a cubic box (6.8 × 6.8 × 6.8 nm³), solvated, and neutralized by adding a sodium ion for each negative charge. The systems energy was minimized by using the steepest descent method. Thirty-nanosecond simulations were performed (pressure = 1 bar, Temperature = 300 Kelvin degrees, Particle Mesh Ewald electrostatics) using the LINear Constraint Solver algorithm for bond length constraint.^{E4,E5} To obtain a more reliable structure, Replica Exchange Molecular Dynamics (REMD)^{E6,E7} simulations were performed in the canonical ensemble (constant number of particles, constant volume and constant temperature) using the simulation parameters previously adopted by means of 16 replicas (total simulation time, 32 ns for each system) ranging from 300 to 345 K.^{E8} An exchange was attempted every 500 steps, with the acceptance ratio computed according to the Metropolis criterion.^{E6} The average exchange probability was 9.3% ± 2.2%, a level ensuring an efficient exploration of the conformational space for polypeptide chains.^{E6} The MD and REMD calculations were performed by using the GRoningen Machine for Chemical Simulation 3.2.1 system and an IBM eServer Blade-Center equipped with 28 double-processor JS20 Blades (56 PPC64 2.8 GHz processors) and Myrinet communication system. Secondary structure analysis was performed on the resulting trajectories using the DSSP program. Images were obtained using the Visual Molecular Dynamics software (Beckman Institute, Urbana, Ill).

RESULTS

Revertant WASP is expressed equally in peripheral CD4⁺ and CD8⁺ T cells and preferentially in memory T cells

As the W4 patient reached 24 years of age, revertant WASP appeared to be expressed in approximately 50% of peripheral blood T cells, with comparable percentages in CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Fig E1). Higher percentages of WASP⁺ revertant T cells were present within the memory T cell subset (CD45RA⁻) than the naive T-cell subset (CD45RA⁺; Fig E1).

Revertant WASP is not detected in megakaryocytes

We investigated by confocal microscopy whether WASP would be expressed in megakaryocytes. For that purpose, megakaryocytes were differentiated from CD34⁺ cells by stimulation with human *thrombopoietin* (10 ng/mL), human FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (20 ng/mL), and human stem cell factor (50 ng/mL). After 11 days of differentiation, cells were seeded on fibrinogen-coated glass slides (1 mg/mL), fixed

with 4% paraformaldehyde, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS. Nonspecific binding was blocked in PBS-BSA 2%, and cells were incubated with phycoerythrin-conjugated anti-CD41 and with anti-WASP Abs revealed with goat antirabbit Alexa-488 Abs. 4'-6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride was applied for nucleus staining and cells were analyzed by laser scanning microscopy (Leica confocal microscope TSC SP2) with a 63× oil objective. The representative images shown in Fig E2 clearly indicate that, in contrast with the control, no WASP expression could be detected in the megakaryocytes derived from the CD34⁺ cells of the patient W4.

Structure modeling of the WASP fraction surrounding the reversion event predicts preserved stability

To investigate further the impact of the predicted LP→RPR aa change on the folding of the revertant WASP, we modeled the corresponding fractions (30-31 aa long) of the wt and revertant proteins. MD simulations showed that both sequences folded as an extended random coil, with the exception of a short region exhibiting an α -helical/turn structure (Fig E3, A). REMD simulations (done on 19-20 aa polypeptides) indicated that the structural configurations were energetically stable and located in a deep potential energy minimum, increasing the reliability of the initial computational model. The secondary structure content, sampled during the whole MD simulation, showed that the helical content of the WT peptide was overall less stable than the one present in the W4R peptide (Fig E3, B). The WT peptide presented a mixed population of helical and hydrogen bonded turn states during the whole simulation time, whereas a net separation between helix and turn was detected in the W4R peptide, indicating an increased flexibility of residues 11 to 14. However, the presence of an arginine in the C-terminus part of the W4R sequence would allow the formation of a β -bridge between residues 3 and 4 and residues 17 and 18. As a result, the W4R peptide was predicted to be slightly more rigid than the WT peptide. Altogether, this model shows that although the revertant RPR sequence is expected to increase local rigidity, the overall structure and stability of the revertant protein should be preserved.

Immunohistologic analysis of WASP in control hematopoietic tissues

We developed a WASP staining on control tissues including spleen, lymph node, and bone marrow from control donors (not affected by WAS). In control spleen and lymph node, WASP was expressed in the cytoplasm (mainly beneath the plasma membrane) of B and T lymphocytes as well as in monocytes and macrophages, but not in erythroid cells (Fig E4, A and B), whereas in normal bone marrow (Fig E4, C), WASP was absent from erythroid precursors but clearly expressed by myeloid precursors and megakaryocytes.

Clonal analysis confirms diversified V β use in revertant W4 CD4⁺ T cells

CD4⁺ T-cell clones were generated from a blood sample collected as patient W4 was 23 years of age. After analysis of WASP expression by flow cytometry, the clones were classified as WASP-negative or WASP-positive (revertant; Table E1).

Analysis of TCR V β expression by flow cytometry (TCR V β Repertoire Kit including the determination of 24 TCR V β ; Beckman Coulter-Immunotech, Marseille, France) clearly shows a highly diversified V β usage in the W4 WASP⁺ clones, similar to that of W4 WASP⁻ clones and control clones generated from an healthy donor.

Preferential enrichment of revertant WASP⁺ cells within the CD4⁺CD161⁺ T-cell subset

To investigate the proportion of WASP⁺ revertant cells within the T_H17 subset, freshly isolated PBMCs were stained for CD4, CD161, and WASP. CD4⁺CD161⁺ T cells have been shown to correspond to the T_H17-cell subset. These cells were found in apparently reduced proportions in W4 CD4⁺ T cells (Fig E5). Further analysis of WASP expression clearly showed a higher enrichment in WASP⁺ cells within the CD4⁺CD161⁺ T cells (85%) compared with CD4⁺CD161⁻ T cells (63%). This suggests that CD4⁺CD161⁺ T_H17 T cells

underwent a stronger selective advantage than the rest of the CD4⁺ T cells.

REFERENCES

- E1. Bryson K, McGuffin L, Marsden R, Ward J, Sodhi J, Jones D. Protein structure prediction servers at University College London. *Nucleic Acids Res* 2005;33:W36-8.
- E2. Cheng J, Randall A, Sweredoski M, Baldi P. SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic Acids Res* 2005;33:W72-6.
- E3. Solovyev VV, Salamov AA. Predicting alpha-helix and beta-strand segments of globular proteins. *Comput Appl Biosci* 1994;10:661-9.
- E4. Berendsen HJC, Postma JPM, DiNola A, Haak JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 1984;81:3684-90.
- E5. Darden TA, York DM, Pedersen LG. Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 1993;98:10089-92.
- E6. Sugita Y, Okamoto Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chem Phys Lett* 1999;314:141-51.
- E7. Mitsutake A, Sugita Y, Okamoto Y. Generalized-ensemble algorithms for molecular simulations of biopolymers. *Biopolymers* 2001;60:96-123.
- E8. Seibert MM, Patriksson A, Hess B, van der Spoel D. Reproducible polypeptide folding and structure prediction using molecular dynamics simulations. *J Mol Biol* 2005;354:173-83.

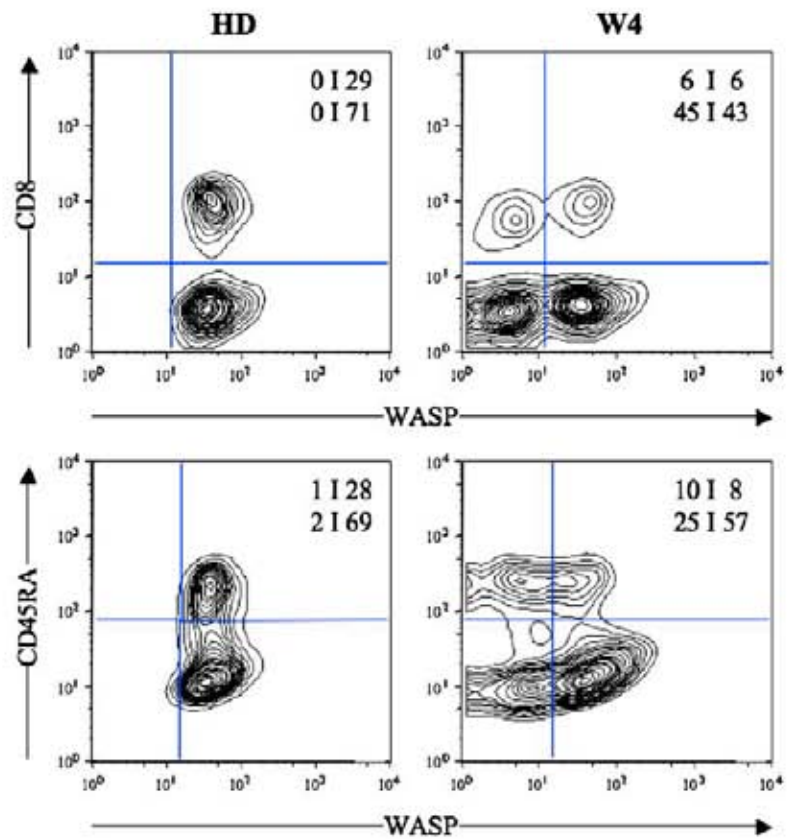


FIG E1. Revertant WASP expression in CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets from patient W4. PBMCs were purified from a blood sample collected when the patient was 24 years of age. Expression of CD8 and WASP (*upper panels*) or CD45RA and WASP (*lower panels*) was analyzed by flow cytometry in T cells gated on the basis of CD3 expression.

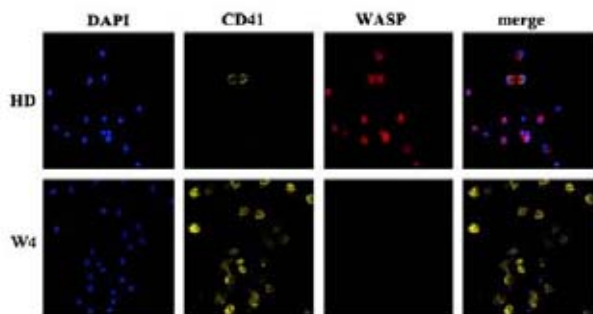


FIG E2. Analysis of WASP expression in megakaryocytes. Confocal microscopy analysis of megakaryocytes differentiated from CD34⁺ cells of a HD and the patient W4. Cells were colabelled with 4'-6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI; blue) to identify nuclei, the specific megakaryocyte marker CD41 (yellow), and WASP (red).

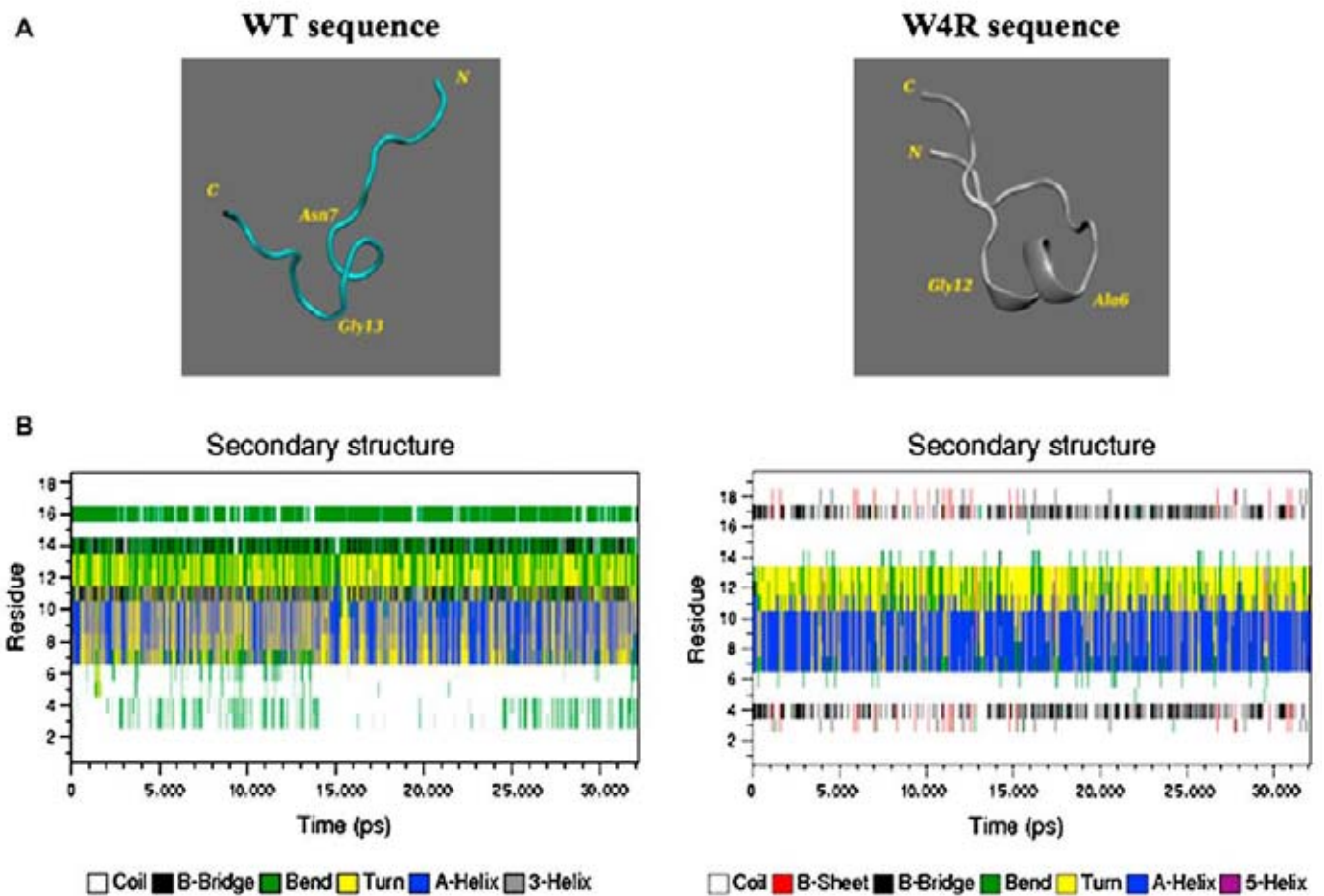


FIG E3. Structure modeling of the protein fraction surrounding the reversion event. **A,** Schematic representation of the average structure of MD simulations for the WT and for the W4R peptide. The residues are numbered according to internal enumeration of the model peptides (163→1). **B,** Secondary structure content of WT and W4R peptides computed during the 32,000-picosecond (ps) MD simulations using the DSSP algorithm as implemented in the GROningen Machine for Chemical Simulation suite.

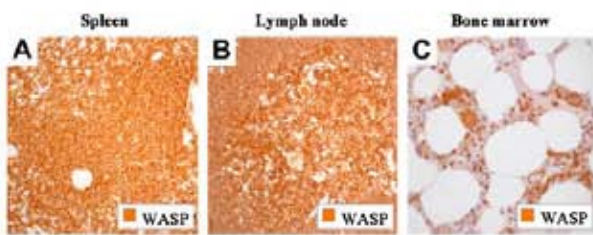


FIG E4. Physiological lymphoid tissue distribution of WASP expression. Histologic analysis of WASP expression in normal human lymphoid tissues, including spleen (A), lymph node (B), and bone marrow (C). WASP-specific staining appears in *brown*, whereas hematoxylin counterstaining appears in *blue*. Pictures taken with a $\times 20$ objective show representative areas of each tissue.

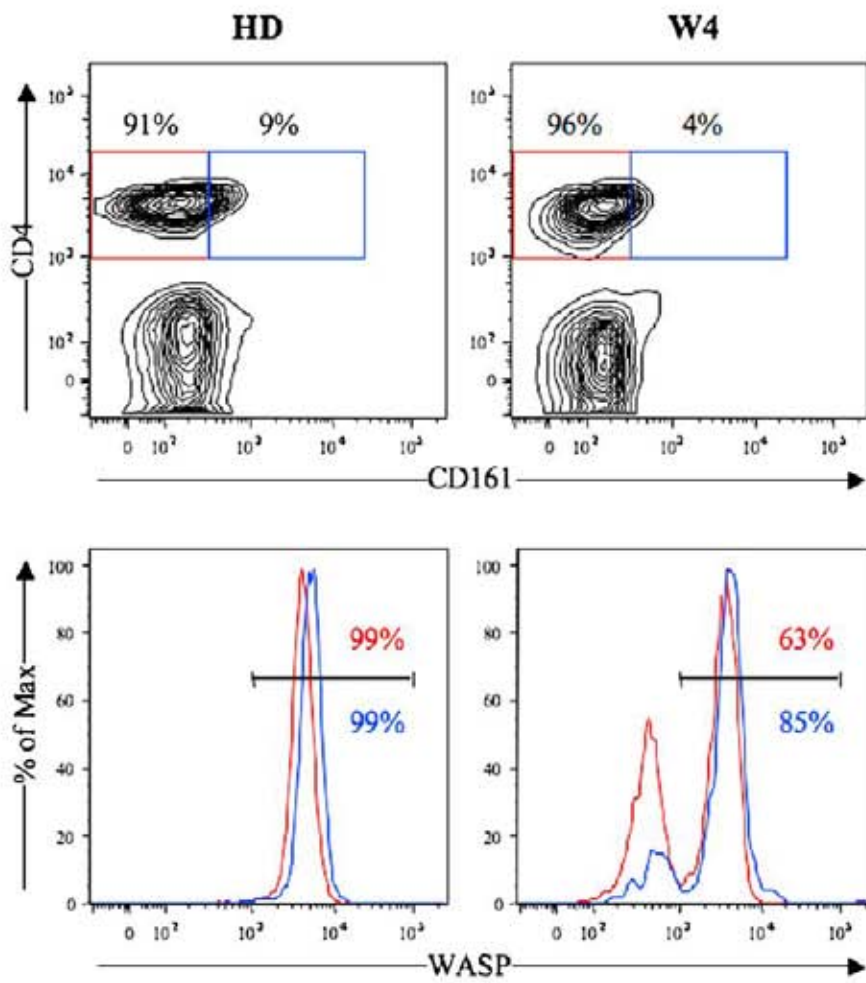


FIG E5. Revertant WASP expression in CD4⁺CD161⁺ and CD4⁺CD161⁻ T cells. PBMCs from a healthy donor and from patient W4 (age 27 years) were analyzed by flow cytometry for the expression of CD4, CD161, and WASP. *Upper panels* show the distribution of CD161 expression in CD4⁺ gated lymphocytes, and *lower panels* show the expression of WASP in the CD161⁻ (red) and CD161⁺ (blue) subpopulations. Max, Maximum.

TABLE E1. Distribution of WASP and V β expression in T-cell clones

HD	WASP	V β	W4	WASP	V β	W4	WASP	V β
1.10	+	1	03.6	-	1	03.1	+	1
1.38	+	1	1.4	-	2	1.47	+	1
1.13	+	3	1.78	-	4	1.48	+	1
03.2	+	3	3.31	-	4	03.18	+	2
03.1	+	5.1	1.87	-	5.1	1.53	+	3
03.12	+	5.3	3.19	-	5.1	1.7	+	3
03.4	+	13.2	1.34	-	7.1	1.84	+	4
1.4	+	13.6	3.29	-	8	03.2	+	5.1
1.40	+	14	3.13	-	13.6	1.58	+	7.1
3.28	+	17	03.3	-	14	1.16	+	8
1.14	+	18	3.73	-	14	03.10	+	9
						03.12	+	9
						3.23	+	13.1
						3.40	+	13.1
						1.14	+	13.6
						1.41	+	17
						3.32	+	21.3
						3.5	+	22
						3.39	+	22
						3.47	+	22
n = 11*		9/24†	n = 11*		8/24†	n = 20*		13/24†

*Number of clones analyzed.

†Number of different V β T-cell receptors found in the analyzed clones (out of 24 V β T-cell receptors tested).



Blood leukocytes and macrophages of various phenotypes have distinct abilities to form podosomes and to migrate in 3D environments

Céline Cougoule^{a,b}, Emeline Van Goethem^{a,b}, Véronique Le Cabec^{a,b}, Fanny Lafouresse^{c,d,e}, Loïc Dupré^{c,d,e}, Vikram Mehraj^f, Jean-Louis Mège^f, Claire Lastrucci^{a,b}, Isabelle Maridonneau-Parini^{a,b,*}

^a CNRS, IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale), 205 route de Narbonne, BP 64182, F-31077 Toulouse, France

^b Université de Toulouse, UPS, IPBS, F-31077 Toulouse, France

^c INSERM, U1043, Toulouse, France

^d CNRS, U5282, Toulouse, France

^e Université de Toulouse, UPS, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France

^f Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses Tropicales et Emergentes, CNRS, UMR6236, Aix-Marseille Université, Marseille, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 March 2012

Received in revised form 18 July 2012

Accepted 19 July 2012

Keywords:

Migration
3D-environments
Podosomes
Macrophage polarization
T lymphocytes
Neutrophils
Monocytes
Inflammation

ABSTRACT

Leukocytes migrate through most tissues in the body, a process which takes place in 3D environments. We have previously shown that macrophages use the amoeboid migration mode in porous matrices such as fibrillar collagen I and the mesenchymal mode involving podosomes and matrix proteolysis in dense matrices such as Matrigel. Whether such a plasticity may apply to other leukocytes and to all subsets of macrophages is unknown. Here, we therefore provide a comparative analysis of the *in vitro* 3D migration modes adopted by primary human leukocytes. Blood-derived monocytes, neutrophils and T lymphocytes were found to use the amoeboid mode in a porous fibrillar collagen I matrix but were unable to infiltrate dense Matrigel and to form podosomes. M2-polarized macrophages and elicited peritoneal macrophages formed podosome rosettes, degraded the ECM and infiltrated both matrices. In contrast, M1 macrophages were motionless in 2D and 3D environments, whilst resident macrophages, devoid of podosomes, were only able to use the amoeboid mode. Thus, we conclude that whereas all leukocytes use the amoeboid mode to migrate through porous matrices, it is only certain macrophages that can adopt the mesenchymal mode that permits migration through dense matrices. Interestingly, the acquisition of mesenchymal migration capacity by macrophages correlates with the presence of podosomes and with their capacity to organize those as rosettes, which appears to be modulated by their differentiation and polarization states. As a perspective, specific control of the mesenchymal migration would be a potential target for therapeutic approaches aiming at decreasing macrophage tissue infiltration.

© 2012 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Trafficking of leukocytes is a key process for immune cell development and host defence (reviewed in Friedl and Weigelin, 2008). Leukocytes are able to migrate through most tissues in the body and, *in vivo*, they encounter both 2-dimensional (2D) and 3-dimensional (3D) environments. 2D migration takes place along surfaces such as inner vessel walls and inner epithelial surfaces, whereas 3D migration takes place inside tissues composed of cells

and extracellular matrix (ECM) protein scaffolds with heterogeneous composition and architecture.

We have shown that macrophages derived from blood monocytes (MDMs) can use either the amoeboid migration mode, a movement of rounded or ellipsoid cells that squeeze in and glide along the pores and gaps of a porous ECM, e.g. fibrillar collagen I (Friedl and Weigelin, 2008; Van Goethem et al., 2010) or the mesenchymal migration mode characterized by elongated cell morphology and requirement for proteases to progress in a non-porous environment such as Matrigel or gelled collagen I (Van Goethem et al., 2010). In environments with heterogeneous architecture, they combine the two migration modes (Guiet et al., 2011). From those studies, we concluded that the architecture of the matrix dictates the choice of the migration mode. Macrophages form podosomes constitutively in 2D environments (Linder, 2007).

* Corresponding author at: IPBS CNRS UMR5089, 205 route de Narbonne, BP 64182, F-31077 Toulouse, France. Tel.: +33 05 61 17 54 58; fax: +33 05 61 17 59 94.

E-mail address: isabelle.maridonneau-parini@ipbs.fr (I. Maridonneau-Parini).

Podosomes are characterized as cell structures with proteolytic activity directed at the ECM, with a core of F-actin surrounded by a ring of adhesion receptors and actin-associated proteins such as vinculin and paxillin. In dense matrices, macrophages dig holes and form specialized F-actin rich structures called 3D podosomes at the tip of cell protrusions where proteolytic degradation of the matrix takes place (Van Goethem et al., 2010, 2011). We have previously proposed that podosomes are an essential requirement of the mesenchymal mode (Cougoule et al., 2010; Guet et al., 2012), for the following reasons. First, 3D-podosomes are not formed in macrophages that use the amoeboid migration mode (Van Goethem et al., 2010). Second, Hck and Filamin A are two proteins involved in podosome stability, podosome organization as rosettes and ECM degradation, and both proteins are necessary for mesenchymal migration of macrophages but dispensable for amoeboid migration.

Macrophages can adopt the mesenchymal mode to infiltrate dense matrices (Van Goethem et al., 2010). The other leukocytes have been described to use the amoeboid migration mode (Friedl and Weigel, 2008; Sabeh et al., 2009) but whether they can adopt the mesenchymal mode has not been investigated. Neutrophils have been described to use the amoeboid mode to infiltrate fibrillar collagen I (Sabeh et al., 2009) and podosome-related structures have been observed in murine neutrophils but the organization of vinculin as a ring and matrix proteolytic activity have not been documented to unequivocally characterize these structures (Calle et al., 2008; Szczur et al., 2006). T lymphocytes have been described to use the amoeboid migration mode in fibrillar collagen I (Wolf et al., 2003) and to also use podosome-related structures to palpate the surface of the endothelium to do transcellular diapedesis (Carman et al., 2007) and antigen recognition (Sage et al., 2012) but these structures have not been shown to have a proteolytic activity, a requisite to call them podosomes. Podosome structures have been largely characterized in monocyte-derived cells such as macrophages, osteoclasts and dendritic cells (Linder et al., 2011), but whether monocytes form podosome structures was never investigated. Thus, we investigated the ability of human blood-derived T lymphocytes, neutrophils and monocytes to migrate in a dense matrix in relation to their capacity to form podosome structures.

Macrophages exhibit various phenotypes as they polarize in response to environmental cues and can be broadly classified in two main groups: classically activated macrophages (or M1) and alternatively activated macrophages (or M2) (Delavary et al., 2011; Martinez et al., 2008, 2009; Mosser and Edwards, 2008; Murray and Wynn, 2011). Macrophages differentiate as M1 macrophages in response to IFN- γ and microbial products such as LPS. They typically take part in the initial immune response to invading microorganisms and promote T helper (Th) 1 immunity. M2 macrophages are obtained in response to IL4 or IL13 and are involved in the resolution phase of inflammation and tissue healing by promoting Th2 immunity (Delavary et al., 2011; Mege et al., 2011). Moreover, M2 macrophages have impaired phagocytosis capacity (Krysko et al., 2011; Varin et al., 2010). Because *in vitro* polarization of macrophages triggers phenotypes at the two extremes of a continuum of phenotypes which occur *in vivo*, we also studied the migration of macrophages collected from the peritoneal cavity in resting and acute inflammatory conditions was also studied.

For this study we thus set out to explore the 3D migration capacity of a variety of blood-derived leukocyte populations such as neutrophils, T lymphocytes and monocytes in porous (fibrillar collagen I) and dense (Matrigel) matrices polymerized *in vitro*. Since macrophages constitute a heterogeneous population *in vivo*, we also examined different macrophage subpopulations.

Materials and methods

Cell preparations

Blood samples from healthy donors were obtained following standard ethical procedures and with the approval of the concerned Internal Review Boards.

Human monocytes: Monocytes were isolated from blood (Etablissement Français du Sang, Toulouse, France) as previously described (Van Goethem et al., 2010). Those were then maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 1% FCS and seeded on matrices polymerized in transwells (5×10^4) or ECM-coated coverslips (10^5).

Human neutrophils: Neutrophils were isolated from the same source by the dextran-Ficoll method as previously described (Le Cabec and Maridonneau-Parini, 1994). Cells were then maintained in RPMI 1640 supplemented with HEPES (10 mM), pH 7.4 for 20 min at 37°C in suspension for recovery and layered down on matrices (5×10^4) or on ECM-coated coverslips (10^5). FCS at 1% final concentration was added after 1 h.

Human macrophages: Human macrophages derived from CD14-sorted monocytes (MDMs) were differentiated in the presence of M-CSF (20 ng/mL, Peprotech) as previously described (Van Goethem et al., 2010). After 7 days of differentiation, macrophages were polarized using either IFN- γ 20 ng/mL (100 U/mL-Roche) or IL4 (20 ng/mL-Miltenyi Biotec) for 18 h to obtain M1 and M2 polarized macrophages, respectively. TNF α (10 ng/mL) was also used to induce M1 polarization. All culture media contained M-CSF at 10 ng/mL during the polarization processes. MDMs had been serum starved for 4 h, harvested as previously described (Van Goethem et al., 2010), suspended in RPMI 1640 medium supplemented with 1% FCS, M-CSF (10 ng/mL) and the indicated cytokine and seeded on matrices (3×10^4) or ECM-coated coverslips (10^5).

Human lymphocytes: CD4 $^+$ T cells were isolated by negative depletion using Rosette Sep (StemCell Technologies), cultured and expanded in RPMI 1640, 5% human serum, 100 U/mL IL2 in the presence of anti-CD3/CD28 coated Dynabeads (Invitrogen), with a bead:cell ratio of 1:1. Fresh IL2 was added every 3–4 days. CD4 $^+$ T cells were restimulated as above every 19–21 days. When CD4 $^+$ T cells were used, 14–21 days after activation, they were regaining a resting phenotype. Cell purity was assessed by FACS analysis (FACScan, Becton Dickinson) using PE-CY5-labelled anti-CD4 mAb (BD Biosciences) and was routinely between 95 and 99%. Cells were suspended in RPMI 1640 supplemented with 0.5% human serum and seeded on matrices (5×10^4) or ECM-coated coverslips (10^5).

Murine macrophages: Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) from C57Bl6/J mice were obtained as previously described (Cougoule et al., 2010) and polarized using murine recombinant cytokines (ImmunoTools) according to the protocol described above for human macrophages. BMDMs had been serum starved for 4 h, harvested as previously described (Cougoule et al., 2010), suspended in RPMI 1640 supplemented with 1% FCS, 10 ng/mL M-CSF and the indicated cytokine, and seeded on matrices (5×10^4) or ECM-coated coverslips (10^5).

Tissue macrophages: C57Bl6/J mice were purchased from Charles River Inc. All experiments were performed with 6–12-week old female mice according to animal protocols approved by the Animal Care and Use committee of the Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale. Resident cells were collected by peritoneal lavages performed in control mice as previously described (Cougoule et al., 2010). Peritoneal elicited cells were collected 4 days after an intra-peritoneal injection of 0.5 mL of 4% thioglycolate Brewer (Sigma) as previously described (Cougoule et al., 2010). Collected cells were spun down (300 g) for 5 min, the pellet was suspended in RPMI 1640 medium and cells were layered down

on matrices (5×10^4) or ECM-coated coverslips (10^5). Medium was supplemented with 1% FCS after 1 h.

Matrix preparations

Collagen I (Nutragen – Nutacon; 2 mg/mL final concentration) or Matrigel (BD Biosciences, batches from 8 to 12 mg/mL) were polymerized as a thick layer (1–1.5 mm) in the upper Transwell chambers, as described (Van Goethem et al., 2010).

3D migration

Cells were seeded on the top of the matrices at the indicated concentration (see above). For all the cell types studied, the lower chambers were filled with RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS. For T lymphocytes and monocytes/macrophages, CXCL12 (1 μ g/mL) and M-CSF (50 ng/mL) were added respectively. The percentage of 3D migration in fibrillar collagen I and in Matrigel was manually quantified after 24 h and 72 h, respectively using the ImageJ software.

2D migration

2D migration was performed in uncoated-8 μ m porous transwells (BD Biosciences). Cells had been serum starved for 3 h. M1 or M2 polarized (3×10^4) MDMs were seeded in the upper chamber. The lower chamber was filled with 1 mL of RPMI 1640 supplemented with 10% of FCS and 50 ng/mL M-CSF. The migration assay was carried out overnight. The cells on the upper face were then removed using a cotton swab and the cells on the lower side were fixed with paraformaldehyde (3.7%; Sigma), permeabilized with Triton X-100 (0.1%; Sigma) and stained with Texas Red-coupled phalloidin (1/1000, Molecular Probes, Invitrogen) and DAPI [4,6-diamidino-2-phenylindole] (5 ng/mL, Sigma) to visualize F-actin and nuclei. The number of cells was then counted with a Leica DM-RB fluorescence microscope.

Matrix degradation assay

Coverslips were coated with 0.2 mg/mL FITC coupled-gelatin (Molecular Probes) as previously described (Cougoule et al., 2010). Macrophages or other leukocytes were cultured on FITC-coupled gelatin. For T lymphocytes, the gelatin-FITC had been coated with either fibronectin or ICAM-1 (10 μ g/mL) for 1 h at 37 °C. After 24 h in culture, cells were fixed, processed for F-actin staining and observed by fluorescence microscopy. Quantification of the matrix degradation was assessed as previously described (Cougoule et al., 2010).

Immunofluorescence microscopy

BMDMs, murine tissue macrophages and other leukocytes had been cultured for 24 h on glass coverslips coated either with fibronectin, fibrinogen (10 μ g/mL; Sigma) or nothing, or with ICAM-1 Fc chimera (10 μ g/mL, R&D system) for T lymphocytes. Based on our previous data showing that macrophages spread on glass, coated or not with ECM proteins, spontaneously form podosomes after 15–30 min, we investigated podosome formation in blood-derived leukocytes at different time points starting from 60 min till 24 h. Cells were fixed with paraformaldehyde (3.7%; Sigma), permeabilized with Triton X-100 (0.1%; Sigma), and stained with anti-vinculin antibody (clone HVin-1, dilution 1/300; Sigma) followed by Alexa488-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (1/1000; Cell Signalling Technology), Texas Red-coupled phalloidin and DAPI. Slides were visualized with a Leica DM-RB fluorescence microscope or with an LSM710 confocal microscope

Table 1

Sequence primers used to characterize the M1 and M2 marker expression.

Primer	Sequence
Human markers	
hCXCL9-R	TCT-TTT-GGC-TGA-CCT-GTT-TCT-C
hCXCL9-L	AGT-GGT-GTT-CTT-TTC-CTC-TTG-G
hINDO-R	CAA-AAT-AGG-AGG-CAG-TTC-CAG-T
hINDO-L	TCA-TCT-CAC-AGA-CCA-CAA-GTC-A
hTNF-R	AGG-AGG-GGG-TAA-TAA-AGG-GAT-T
hTNF-L	CAT-CTA-TCT-GGG-AGG-GGT-CTT-C
hIL-15R	GTT-AGC-AGA-TAG-CCA-GCC-CAT-AC
hIL-15 L	TAC-TCA-AAG-CCA-CGG-TAA-ATC-C
hALOX15-R	GGG-GGC-TGA-AAT-AAC-CAA-AG
hALOX15-L	AAC-TTC-CAC-CAG-GCT-TCT-CTC
hCCL13-R	ATG-TGA-AGC-AGC-AAG-TAG-ATG-G
hCCL13-L	GAG-CAG-AGA-GGC-AAA-GAA-ACA
hDCSIGN-R	CAG-CAG-AGG-AAA-GAG-AGA-GAG-G
hDCSIGN-L	AGA-AGG-GTA-GGA-CTG-GAT-GTT-G
hFNI-R	CCA-CAG-AGT-AGA-CCA-CAC-CAC-T
hFNI-L	ACA-CCT-GGA-GCA-AGA-AGG-ATA-A
Murine markers	
mTNF-R	TCTGAAAGGTCTGAAGGTAGGA
mTNF-L	AGAAACACAAGATGCTCGGACA
mCXCL10-R	CGT-CAT-TTT-CTG-CCT-CAT-CCT
mCXCL10-L	TCT-GCT-CAT-CAT-TCT-TTT-TCA-TCG
mIL12p40-R	GACACGCCTGAAGAAGATGAC
mIL12p40-L	GCCATTCCACATGCTACTGC
mMR-R	CATGAGGCTTCTCTGCTTCTG
mMR-L (<i>Mrc1</i>)	TTGCCGTCTGAAGTGAAGTGG
mYIM1/2-R	CCACTGAAGTCATCCATGTC
mYIM1/2-L	GGGCATACCTTTATCCTGAG
mArg2-R	TGGATCAAACCTTGCCTCTC
mArg2-L	GCCGATCAAATGCTCTGTCC

For each species, the M1 and M2 markers are presented in regular and italic case, respectively.

equipped with an x63-1.4 oil immersion Plan-Apochromat objective (CarlZeiss AG, Jena, Germany).

M1/M2 transcriptional profiles of macrophages

RNAs were extracted from MDMs, BMDMs, resident and elicited mouse macrophages using RNeasy Mini Kit (Qiagen) with a DNase I step to eliminate DNA contaminants, as recently described (Ben Amara et al., 2010). The quantity and the quality of RNA were assessed using Nanodrop (Thermo Science, Maurens-Scopont, France) and 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Massy, France), respectively. Real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was carried out as recently described (Ben Amara et al., 2010). In brief, reverse transcription of 150 ng of RNA was performed with the MMLV-RT kit (Invitrogen). cDNA was obtained using oligo(dT) primers and M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) and qPCR experiments were performed using SYBR Green Fast Master Mix (Roche Diagnostics, Meylan, France) and a SmartCycler (Cepheid, Maurens-Scopont, France). The M1 and M2 genes were selected according to a previously published list of M1 and M2 genes (Martinez et al., 2006; Tantibhedhyangkul et al., 2011). The primers were designed using Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) (Table 1). Results were normalized using the housekeeping gene β -actin and are expressed as fold change (FC) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta\Delta Ct = (Ct_{Target} - Ct_{Actin})_{assay} - (Ct_{Target} - Ct_{Actin})_{control}$.

Podosome life time measurement

CD14-sorted human monocytes were seeded in 8-wells coverglass Labtek chambers (10^5 cells/wells) and differentiated in the presence of M-CSF (20 ng/mL). At day 3, cells were washed twice with PBS and transduced with a mCherry-Lifeact lentiviral vector to visualize F-actin structures. Briefly, the transduction was initiated by adding 200 μ L/well of a mix of RPMI 1640 without FCS and the

lentiviral vector (10^6 effective viral particles for 10^6 macrophages). After 1h30, 400 μ L of complete medium was added. At day 6, the culture medium was removed and MDMs were polarized as described above. After 24 h, cells were imaged using an inverted microscope (Leica DMIRB, Leica Microsystems) equipped with a motorized stage and an incubator chamber to maintain the temperature and CO₂ concentration constant. Images were acquired with the Metamorph software, every 20 s in one z-plane for 40 min, and on 10 separate fields per cell type. Quantification of podosome life-span was measured manually from two independent experiments, using the ImageJ software for podosomes appearing and disappearing during the time-course of the experiment and results were expressed as the mean \pm SEM of 100 podosomes from 10 cells.

Statistics

All data in the text and figures are expressed as mean (\pm SEM) and unpaired *T*-test statistical analysis was carried out with the Prism 4.0 software. A *p* value of less than .05 was considered significant (**p* < .05, ***p* < .01, ****p* < .001).

Results

T lymphocytes, neutrophils and monocytes use the amoeboid but not the mesenchymal migration mode

To study the 3D migration ability of leukocytes, we used two different matrices with distinct architectures which were polymerized as thick layers (>1 mm) to create a 3D environment (Van Goethem et al., 2010). Fibrillar collagen I is a porous matrix into which macrophages and other leukocytes have been shown to use the amoeboid migration mode (Sabeih et al., 2009; Van Goethem et al., 2010; Wolf et al., 2003). Matrigel is purified from a mouse sarcoma which, when used at 10 mg/mL, forms a dense and poorly porous extracellular matrix. In Matrigel, MDMs and BMDMs have been shown to migrate using the protease-dependent mesenchymal mode (Cougoule et al., 2010; Van Goethem et al., 2010) whilst neutrophils have been shown not to migrate into it (Steadman et al., 1997).

T cell motility through 3D matrices was induced by the chemokine CXCL12, a ligand for CXCR4. We mainly studied cultured primary human CD4⁺ *T* cells. Those express CXCR4 homogeneously whilst freshly isolated *T* lymphocytes express heterogeneous CXCR4 levels (Bleul et al., 1997). *T* lymphocytes infiltrated fibrillar collagen I and exhibited a pear shape characteristic of the amoeboid migration mode (Fig. 1A and B, left panel, arrow) but they did not infiltrate Matrigel (Fig. 1A and B, right panel). Similarly, freshly isolated total *T* cells were unable to infiltrate Matrigel but migrated readily in fibrillar collagen matrices (data not shown). Next, the presence of podosomes was examined. To optimize cell spreading, a prerequisite for podosome formation, *T* lymphocytes were seeded on ICAM-1 coated coverslips and treated or not with PMA for 24 h. Even under these conditions, no podosome structure could be observed in *T* lymphocytes. Some displayed actin dots, but those were not surrounded by vinculin, a hallmark of podosomes (Fig. 1C, inset a) and failed to degrade the gelatin-FITC covered with ICAM-1 (Fig. 1D) or fibronectin (data not shown). Treatment with PMA, although it increased cell spreading, still did not trigger proteolytic activity towards ECM (data not shown). Thus, despite our efforts to provide favourable conditions, we could not get *T* lymphocytes neither to form podosomes, nor to exhibit proteolytic activity on ECM nor to migrate into Matrigel.

Neutrophils freshly isolated from blood infiltrated fibrillar collagen I (Fig. 1A and B) with a rounded cell shape but did not infiltrate Matrigel (Fig. 1A and B). Occasionally, a few F-actin dots with almost

a regular ring of vinculin were noticed (Fig. 1C, inset b), but on glass, on fibronectin or vitronectin, neutrophils generally failed to form podosomes (Fig. 1C, inset a), and failed to degrade the matrix of FITC-gelatin (Fig. 1D). As the diaporesis step could be critical “to switch” cells to a competent migration phenotype in dense matrices, we then tested the migration ability of inflammatory neutrophils harvested from the mouse peritoneal cavity 12 h after injection of thioglycollate. At this time point, neutrophils accounted for $77.4 \pm 4.7\%$ (*n* = 5) of the collected cells (Fig. S1). Despite the inflammatory context from which they were obtained, elicited neutrophils still did not infiltrate Matrigel and did not form podosomes (data not shown).

Similarly, freshly isolated monocytes infiltrated the matrix of fibrillar collagen I with the typical amoeboid rounded cell shape (Fig. 1A and B) but not Matrigel (Fig. 1A and B). They formed F-actin dots which were not surrounded by vinculin and thus were not considered as podosomes (Fig. 1C). After 4–5 days on Matrigel, some monocytes did acquire the capacity to infiltrate the matrix with the characteristic elongated cell shape (Fig. 1B). At day 6, the percentage of cells into the matrix was quantified (Fig. 1A) and was similar to that previously described for macrophages after 7 days of differentiation in culture dishes (Van Goethem et al., 2010), suggesting that differentiation is required to infiltrate dense matrices.

Thus, none of the leukocytes studied here were found to have the capacity to infiltrate Matrigel or to form podosomes, suggesting that these cells are unable to use the protease-dependent mesenchymal mode.

In vitro polarized M1 or M2 human and mouse macrophages display distinct 3D migration abilities

Next, we investigated whether the 3D migration ability of monocyte-derived macrophages (MDMs) was regulated during macrophage polarization.

Human M1 and M2 MDMs were generated by IFN- γ - and IL4-treatment, respectively. Using a combination of 8 polarization markers, we checked that IFN- γ - and IL4-stimulated macrophages exhibited typical M1 and M2 profiles when compared to non-polarized MDMs that we called here M0 (Fig. 2A).

The migration ability of M1 and M2-polarized MDMs was examined in comparison with M0. M2 MDMs were able to migrate into fibrillar collagen I and Matrigel (Fig. 2B) with the typical cell shape of amoeboid and mesenchymal migration, respectively (Fig. 2C). They exhibited comparable migration ability than M0 macrophages (Fig. 2B and C). In marked contrast, IFN- γ -polarized M1 MDMs were unable to migrate into fibrillar collagen I or in Matrigel (Fig. 2B), and stayed at the top of the matrices where they displayed a rounded cell shape (Fig. 2C). To ensure that inhibition of the migration was the result of M1 polarization, MDMs were also polarized using TNF α (Mantovani et al., 2004). TNF α -treated MDMs did not migrate in fibrillar collagen I or in Matrigel (data not shown) confirming that M1 macrophages are defective in both migration modes.

To test the 2D migration ability of M1 and M2 macrophages, a standard transwell assay was used. As shown in Fig. 2D, M1 MDMs were also motionless in those conditions, while M2 were migrating even more efficiently than M0 macrophages. Taken together, these results show that M1 MDMs were defective for both 3D and 2D migration whereas M2 MDMs remained competent for all types of migration: 2D and 3D migration into fibrillar collagen I and Matrigel. The presence of podosomes was examined in M1 and M2 MDMs layered on fibrinogen. Individual podosomes were observed in 100% of the M1 and M2 macrophages. Live observations of mCherry-Lifeact-expressing M1 and M2 MDMs revealed that the lifetime of individual podosomes in M1 MDMs was 625 ± 59 s while it was 411 ± 42 s in M2 macrophages (*p* = 0.0037, *n* = 100 podosomes/condition) (to compare with podosomes in

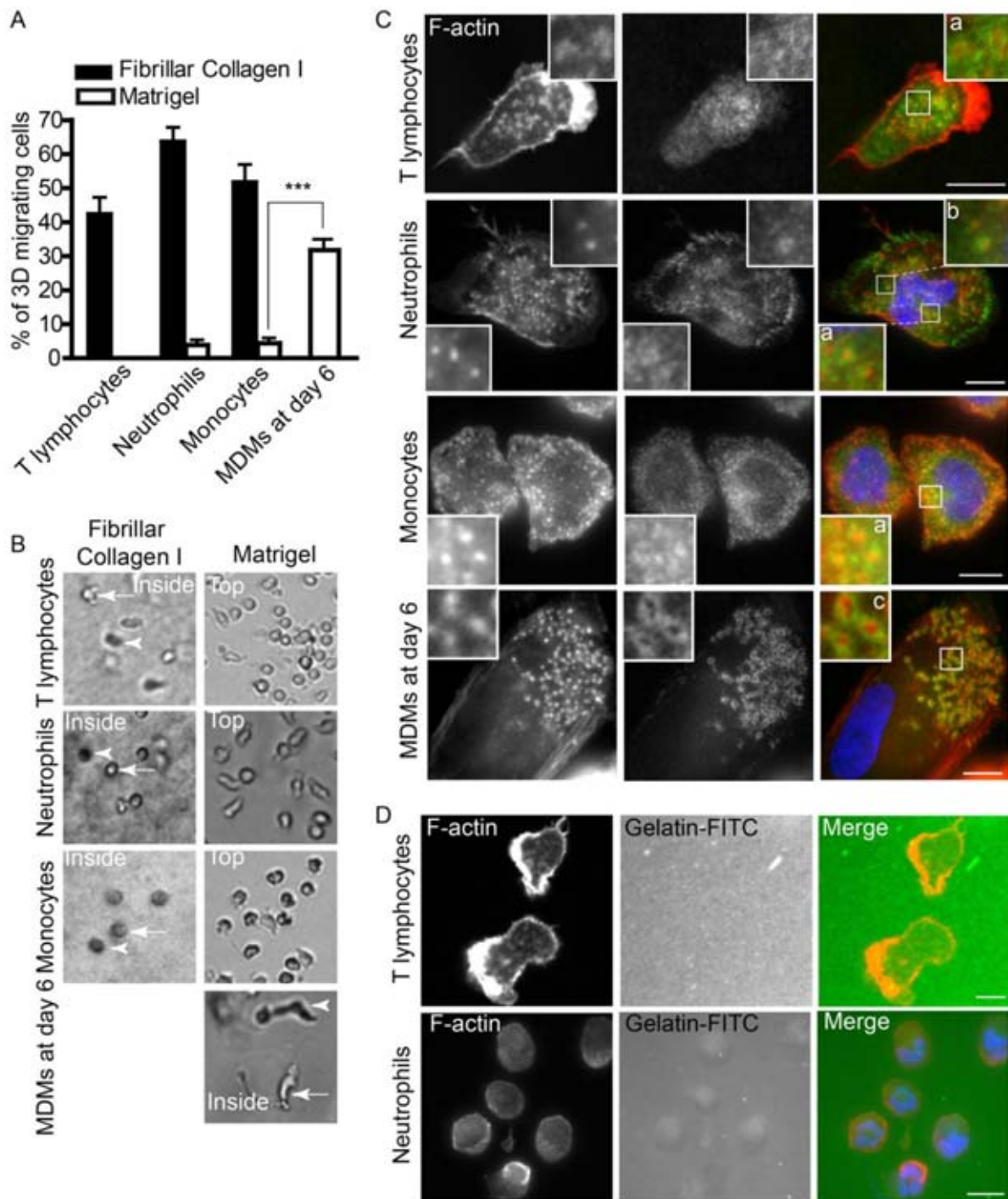


Fig. 1. T lymphocytes, neutrophils and monocytes only use the amoeboid migration mode. (A) Cells were seeded at the top of a thick layer of fibrillar collagen I or Matrigel and the 3D cell migration was quantified after 24 h and 72 h, respectively. T lymphocytes, neutrophils and monocytes infiltrated the matrix of fibrillar collagen I but did not infiltrate Matrigel. After 6 days on the matrix, monocyte-derived macrophages (MDMs) which had acquired the capacity to infiltrate Matrigel were quantified as described in the section "Materials and methods". Results are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicates. *** $p < 0.001$. (B) T lymphocytes, neutrophils and monocytes migrating either inside fibrillar collagen I (left panels, arrows) or on top of the Matrigel matrix (right panels, arrows) are shown. Arrowheads show cells at a distinct depth in the matrices. (C) T lymphocytes were seeded on ICAM-1 coated coverslips (without PMA treatment) for 24 h, neutrophils were seeded on glass coverslips for 1 h, monocytes and macrophages were seeded on glass coverslips for 24 h. All cells were fixed and permeabilized. F-actin was stained with Texas Red-coupled phalloidin, vinculin was stained with primary and AlexaFluor 488-coupled secondary antibodies, and nuclei with DAPI. T lymphocytes, neutrophils and monocytes formed F-actin dots but vinculin did not form a ring around the actin core (insets (a)). Inset (b) illustrates the presence of few F-actin dots with a quite regular ring of vinculin in neutrophils. Inset (c) illustrates the organization of classical podosomes with a ring of vinculin in MDMs after 6 days of culture. Scale bars: 10 μ m, insets = 3 \times magnification. (D) T lymphocytes and neutrophils seeded on FITC-coupled gelatin coated on glass coverslips and cultured either overnight or for 5 h, respectively, were fixed and stained for F-actin and nuclei and microscopically examined. Neither T lymphocytes nor neutrophils degraded FITC-coupled gelatin. Scale bars: 10 μ m.

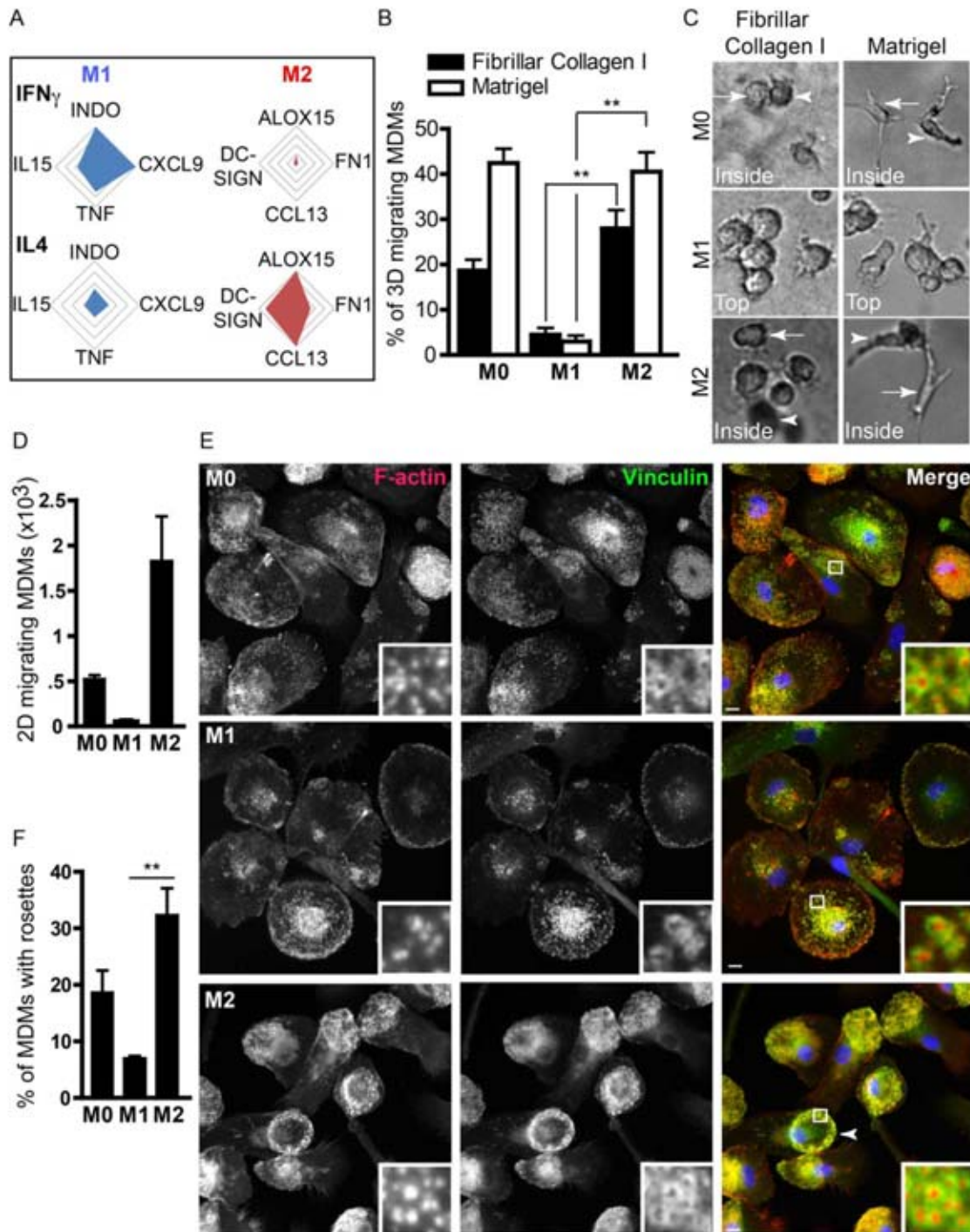


Fig. 2. M2 but not M1 human macrophages migrate in 3D matrices. MDMs were stimulated with nothing (M0), IFN- γ or IL4 to induce M1 and M2 polarization respectively. (A) Total mRNA was extracted and the expression of 4 M1-related genes (IL15, INDO, TNF, CXCL9) and M2-related genes (DC-SIGN, ALOX15, CCL13, FN1) was measured by real time RT-PCR. Results are expressed as fold change (FC) compared to M0 macrophages and represent the mean of three experiments. They are presented as radar plots with a maximum increase of 4 folds. (B) M0, M1 and M2 MDMs were harvested and seeded on top of a thick layer of fibrillar collagen I or Matrigel and cell migration was quantified from triplicate samples after 24h and 72h, respectively. Results are expressed as mean \pm SEM of four independent experiments. $**p < 0.01$. (C) M0 and M2 MDMs are shown inside fibrillar collagen I or in Matrigel while M1 macrophages which mostly do not infiltrate matrices are shown at the top. Arrowheads show cells deeper in the matrices. (D) 2D migration of M0, M1 and M2 MDMs through uncoated transwells. MDMs that reached the lower chamber were microscopically counted. Results are expressed as mean \pm SEM of two independent experiments. (E) M0, M1 and M2 MDMs were seeded on fibrinogen-coated glass coverslips for 24 h, fixed, permeabilized and F-actin was stained with Texas Red-coupled phalloidin, vinculin with primary and AlexaFluor 488-coupled secondary antibodies, and nuclei with DAPI. M1 MDMs harbor individual podosomes (inset) while M2 MDMs harbor podosome rosettes (arrowhead and inset). Scale bar = 10 μ m, insets = 6 \times magnification. (F) Quantification of podosome rosettes in M0, M1 and M2 MDMs. Podosome structures were counted in at least 100 cells in duplicate samples, in three separate experiments. $**p < 0.01$.

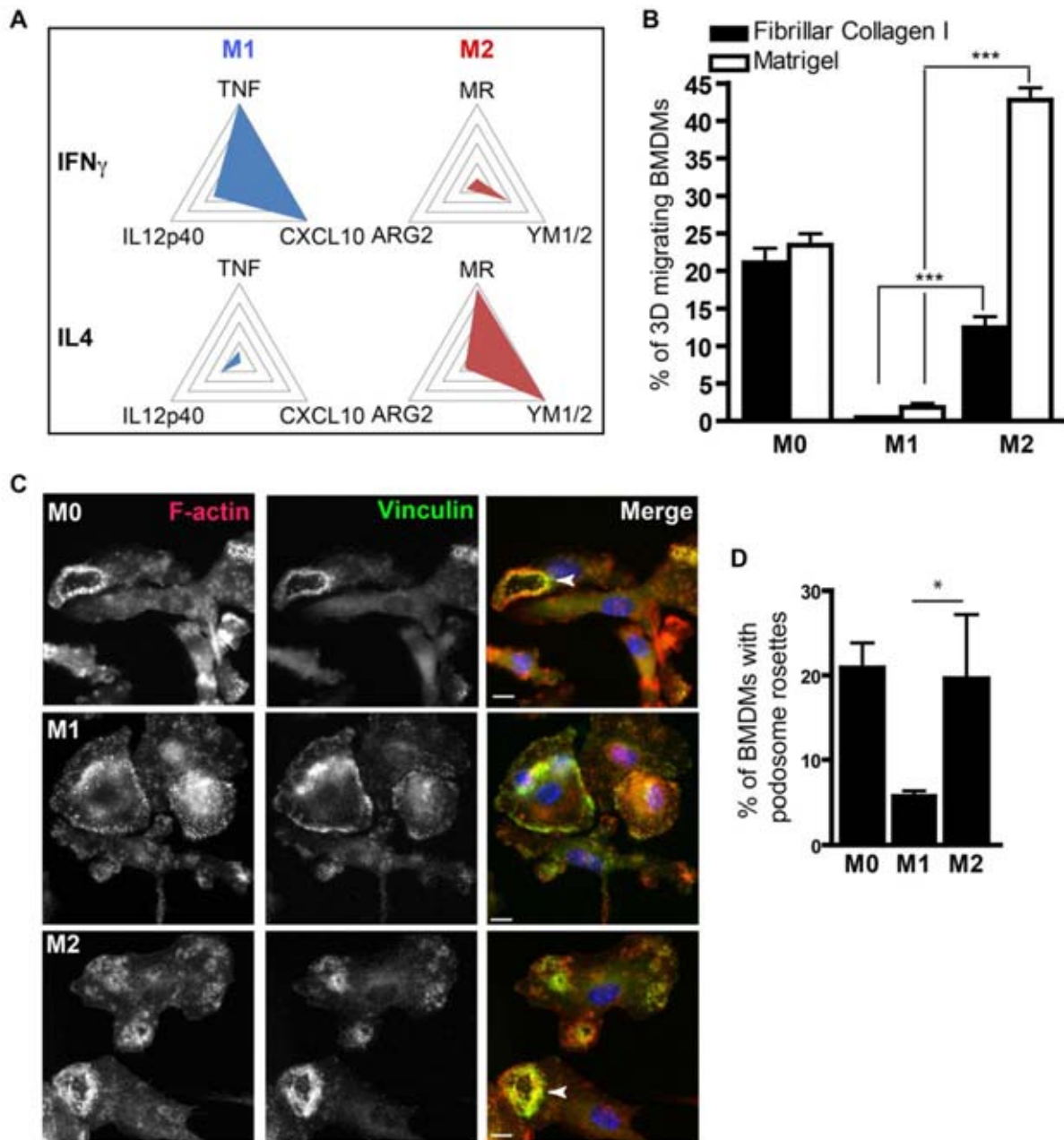


Fig. 3. M2 but not M1 mouse macrophages migrate in 3D matrices. Mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were stimulated with nothing, IFN- γ or IL4 to induce M0, M1 and M2 polarization, respectively. (A) Total mRNA was extracted and the expression of 3 M1-related genes (TNF α , CXCL10, IL12p40) and M2-related genes (Manose Receptor (MR), YM1/2, Arginase 2 (ARG2)) was measured by real time RT-PCR. The results are expressed as fold change compared to M0 BMDMs and represent the mean of three experiments. They are presented as radar plots with a maximum increase of 4 folds. (B) M0, M1 and M2 BMDMs were harvested and seeded on top of a thick layer of fibrillar collagen I or Matrigel and the 3D cell migration was quantified after 24 h and 72 h respectively from triplicate samples. Results are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments, *** p < 0.001. (C) M0, M1 and M2 BMDMs were seeded on fibronectin-coated glass coverslips for 24 h, fixed, permeabilized and F-actin was stained with Texas Red-coupled phalloidin, vinculin with primary and AlexaFluor 488-coupled secondary antibodies, and nuclei with DAPI. M1 BMDMs form few podosome rosettes while M0 and M2 BMDMs harbor podosome rosettes (arrowheads). Scale bar = 10 μ m. (D) Quantification of podosome rosettes in M0, M1 and M2 BMDMs. Podosome structures were counted in at least 100 cells in duplicate samples, in three independent experiments. * p < 0.05.

M0 macrophages which is approximately 400 s (Bhuwania et al., 2012)). These results indicate that M1 macrophages have a reduced podosome turnover compared to M2. In murine bone marrow derived macrophages (BMDMs), we have previously reported that the organization of podosomes as rosettes is required for mesenchymal migration (Cougoule et al., 2010). Thus, we quantified podosome rosettes in M0, M1 and M2 MDMs layered on fibrinogen. As shown in Fig. 2E and F, similarly to M0, M2 MDMs efficiently

organized their podosomes as clusters and rosettes while M1 MDMs hardly formed these structures. The presence of rosettes has been correlated with enhanced ECM proteolytic activity (Cougoule et al., 2010) but somewhat surprisingly, M1 MDMs were found to degrade gelatin-FITC with the same efficiency as M0 and M2 cells (Fig. 4C). One noticeable difference, however, was that M1 MDMs harbored a "sitting" cell shape on gelatin-FITC with a large degradation area under the cells, whereas M2 MDMs harbored a

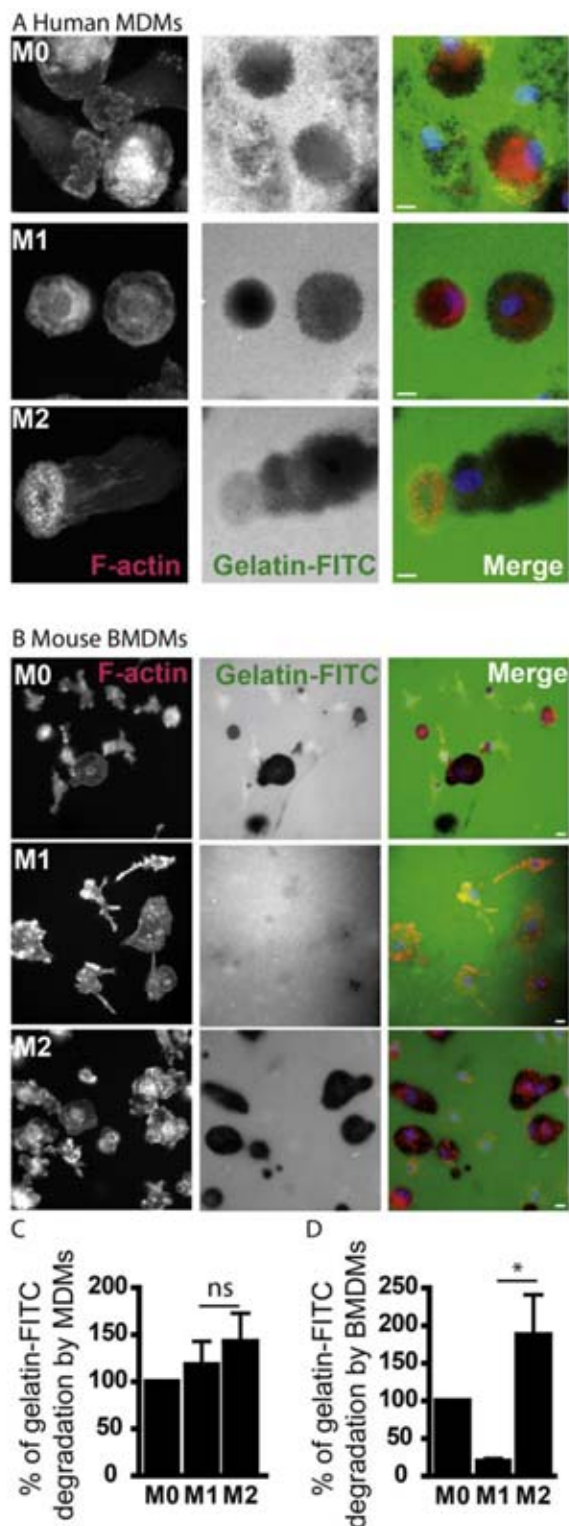


Fig. 4. (A) M0, M1 and M2 MDMs were seeded on FITC-coupled gelatin coated on glass coverslips, cultured overnight, fixed and stained for F-actin and nuclei and microscopically examined. Scale bar: 10 μ m. (B) M1 BMDMs are defective in gelatin-FITC degradation. M0, M1 and M2 BMDMs were seeded on FITC-coupled gelatin coated on glass coverslips and incubated overnight, fixed and stained for F-actin and nuclei. Scale bar: 10 μ m. (C) Quantification of gelatin-FITC degradation by M0, M1 and M2 MDMs. The percentage of degradation corresponds to the number of pixels of degradation for 100 pixels of cell surface. Results are expressed as mean \pm SEM

“migrating” phenotype characterized by a polarized shape with podosomes or podosome rosettes localized at the leading edge (Fig. 4A). Thus the proteolytic activity of M1 macrophages which form more stable podosomes appeared to be similar to M2 cells which form podosome rosettes and are motile.

Differences have been described between human and murine polarized macrophages (Martinez et al., 2006). We thus investigated the migration capacity of polarized mouse macrophages derived from bone marrow (BMDMs). Those were polarized in M1 and M2 BMDMs, as controlled by analysis of the expression of six polarization markers (Fig. 3A). Similarly to human macrophages, M1 BMDMs did not migrate into fibrillar collagen I or Matrigel while M2 BMDMs did and even better than M0 macrophages in Matrigel (Fig. 3B). In addition, 100% of mouse M1 and M2 macrophages formed individual podosomes when layered on fibronectin but only M2 BMDMs organized their podosomes as rosettes (Fig. 3C and D). The only difference between human and mouse cells we observed in our experiments was that mouse M1 BMDMs showed relatively low gelatin-FITC degradation capacity (Fig. 4B and D). Taken together, these results indicate that the M1 polarization process is characterized by a motionless phenotype, the inability to organize podosomes as rosettes and an heterogeneous capacity to degrade the matrix, while M2 polarized cells are able to migrate effectively in both matrices, form rosettes and degrade the matrix.

The migration ability of elicited macrophages differs from that of resident macrophages

We next examined the ability of resident and elicited macrophages harvested from the mouse peritoneal cavity to migrate in 3D matrices, to form podosome structures and degrade gelatin-FITC. Elicited macrophages were collected 4 days after intraperitoneal injection of thioglycollate.

We compared the expression of 6 biomarkers between elicited and resident macrophages to characterize their polarization profiles. As shown in Fig. 5A, elicited macrophages displayed a combined expression of the M1 and M2 markers.

While both cell types migrated in fibrillar collagen I, only elicited macrophages migrated in Matrigel (Fig. 5B and C), formed podosome rosettes (Fig. 5D and E) and degraded the gelatin-FITC matrix (Fig. 5F and G).

Thus resident and elicited macrophages which are known to exert distinct functionalities (Gordon and Mantovani, 2011) exhibit distinct migration behavior, providing further information about the phenotypic heterogeneity of tissue macrophages.

Discussion

The data presented herein extend our knowledge of the 3D migration ability of several leukocyte populations into thick extracellular matrices. We observe that (i) circulating leukocytes use the amoeboid mode, do not form podosomes and are unable to infiltrate dense matrices and (ii) the migration of macrophages, which have been previously shown to use the amoeboid and the mesenchymal mode in porous and dense matrices, respectively, is strongly influenced by polarization and the tissue environment.

3D migration takes place when leukocytes enter interstitial tissues beyond vessels and the basal membrane. The architecture of interstitial tissues is heterogeneous, ranging from loose fibrillar regions to dense compact connective tissue with submicron

(n = 3). (D) Quantification of the percentage of gelatin-FITC degradation by M0, M1 and M2 BMDMs. The percentage of degradation corresponds to the number of pixels of degradation for 100 pixels of cell surface. Results are expressed as mean \pm SEM (n = 3), *p < 0.05.

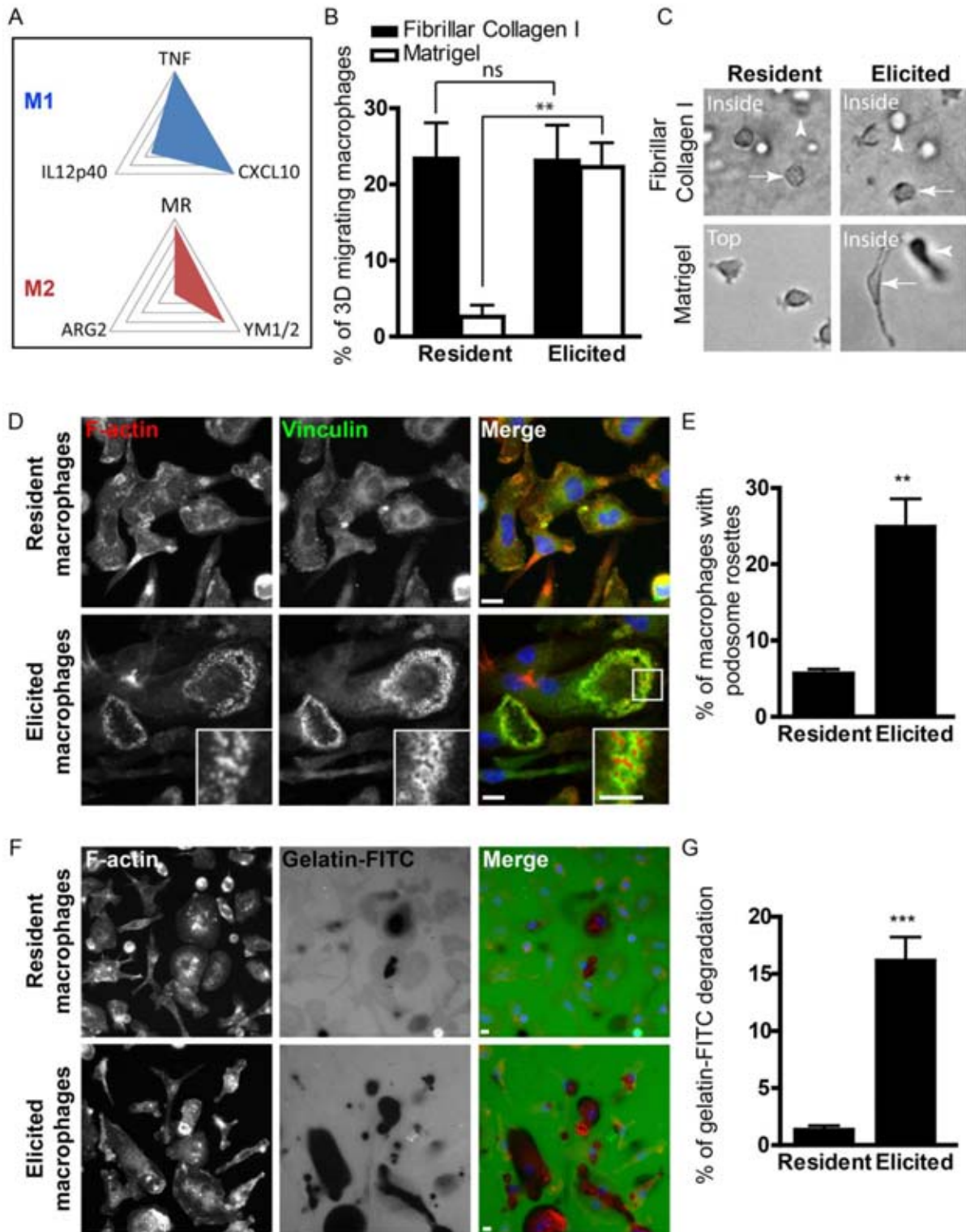


Fig. 5. Elicited but not resident macrophages use the mesenchymal migration mode. Resident and elicited macrophages were harvested from mouse peritoneal cavity. Elicited macrophages were collected 4 days after an intraperitoneal injection of thioglycollate. (A) Total mRNA was extracted from resident and elicited macrophages and the expression of 3 M1 related genes (TNF, CXCL10, IL12p40) and 3 M2 related genes (MR, YM1/2, ARG2) was measured by real time RT-PCR. The results are expressed as FC of elicited on resident macrophages and represent the mean of 3 experiments. They are presented as radar plots with a maximum increase of 4 folds. (B) Resident and elicited macrophages were harvested and seeded on top of a thick layer of fibrillar collagen I or Matrigel and 3D cell migration was quantified after 24 h and 72 h respectively from triplicate samples. Results are expressed as mean \pm SEM of five independent experiments, *** $p < 0.001$. (C) Resident macrophages migrating inside fibrillar collagen I (arrow) or on top of Matrigel are shown. Elicited macrophages migrating inside fibrillar collagen I or Matrigel are shown (arrow). Arrowheads show cells at a different depth in matrices. (D) Tissue macrophages were seeded on fibronectin-coated glass coverslips for 24 h, fixed, permeabilized and F-actin was stained with Texas Red-coupled

spacing (Egeblad et al., 2010; Larsen et al., 2006). Thus two matrices which have been described in detail in a previous report (Van Goethem et al., 2010) were used to mimic the architectural heterogeneity of interstitial tissues. In fibrillar collagen I, neutrophils, T lymphocytes and human macrophages have been described to use the amoeboid migration mode (Nourshargh et al., 2010; Sabeih et al., 2009; Van Goethem et al., 2010; Wolf et al., 2003). Herein, we compared, in the same experiments, the migration capacity of leukocytes in porous fibrillar collagen I and in a dense Matrigel. We confirm the ability of monocytes, neutrophils and T lymphocytes to migrate using the amoeboid mode in fibrillar collagen I, and we show that they do not infiltrate Matrigel. Using the experimental conditions which trigger the formation of podosomes in macrophages, dendritic cells and osteoclasts (Linder et al., 2011), namely on glass coated or not with ECM proteins, we observed that T lymphocytes, neutrophils and monocytes do not form podosomes, according to the definition of these cell structures which implicates an actin dot surrounded by a ring of vinculin and a proteolytic activity towards the ECM (Linder et al., 2011). It has been reported that T lymphocytes form podosome-like structures during trans-cellular migration through the endothelium (Carman et al., 2007) and scanning for antigen on antigen presenting cells (Sage et al., 2012). In those experiments, however, the proteolytic activity of those structures was not established, a requisite for qualifying these structures as podosomes.

That neutrophils, monocytes and T lymphocytes are unable to infiltrate Matrigel is surprising as these cells are expected to migrate in most tissues. One hypothesis is that steps of differentiation might be missing. For our experiments, we have used cells isolated from blood which were then differentiated *in vitro*. Thus, compared to the *in vivo* context, diapedesis is by-passed and this step could be critical "to switch" cells to a competent migration phenotype in dense matrices. Using elicited neutrophils which had accomplished this step of diapedesis, however, we found that those cells still did not form podosomes, nor did T lymphocytes differentiated with anti-CD3/CD28 Abs in the presence of IL2 for 2–3 weeks acquire the capacity to migrate in Matrigel. Since neutrophils and lymphocytes are small cells which might glide into small pores (Van Goethem et al., 2011), another hypothesis is that leukocytes unable to use the mesenchymal mode would only infiltrate loose areas in tissues. In agreement with this proposal, a recent report on lung tumor biopsies shows that T lymphocytes are unable to cross dense fibers of ECM proteins surrounding tumor islets and remain in regions of loose tissue (Salmon et al., 2012). It should be noted that neutrophils have a segmented nucleus which might facilitate infiltration into poorly porous tissues. In fact, a recent report shows that in tumor microenvironments, the nuclei of infiltrated neutrophils are even more segmented than control neutrophils (Fridlender et al., 2009), suggesting that, by modifying their nuclear morphology, neutrophils could more easily squeeze in poorly porous tissues such as tumors (Egeblad et al., 2010) using the amoeboid migration. In the case of migration into the dense Matrigel matrix, used in our experiments at approximately 10 mg/mL, the size of the pores is apparently too narrow (see a scanning electron microscopy picture of the architecture of Matrigel in Van Goethem et al. (2010)) to allow neutrophil migration. A previous report has shown that neutrophils can infiltrate Matrigel in a protease-independent manner when it is diluted to 3 mg/mL (Steadman et al., 1997) indicating

that a lower density allows neutrophils to infiltrate Matrigel using the amoeboid mode.

In conclusion, these three types of leukocytes are unable to migrate in matrices which require the formation of paths in a protease-dependent manner, while they migrate in porous 3D environments using the amoeboid mode. Thus, if the same rules apply *in vivo*, we would expect to find these cells only in porous tissue areas.

In marked contrast, when monocytes (from human blood) differentiate in macrophages, they become able to infiltrate Matrigel using the mesenchymal migration mode (Van Goethem et al., 2010, this report). Similar observations have been made with mouse macrophages differentiated from bone marrow (Cougoule et al., 2010). Because macrophages have a large plasticity, we examined the migration of polarized and of tissue macrophages to get further insight into their respective 3D migration abilities. Macrophages polarized as M1 or M2 exhibit distinct functions. M1 macrophages are involved in the early phase of the inflammatory response (Bystrom et al., 2008; Mege et al., 2011), they release inflammatory mediators and bactericidal products and they actively ingest microorganisms and cellular debris (Liddiard et al., 2011). We report that M1 macrophages do not migrate in 2D and 3D environments. Despite the fact that distinct molecular mechanisms govern 2D and 3D migration (Harunaga and Yamada, 2011), these results suggest that a common step may be inactivated. The observation that macrophages become motionless under inflammatory processes is important as it might contribute to maintain macrophages at the site of infection to clean out bacteria and release toxic bactericidal products only in limited tissue areas (Laskin et al., 2011). M1 BMDMs have been shown to adhere to extracellular matrices to a higher extent than M2 (Vereyken et al., 2011) and, in the same line, we report that podosomes in M1 cells are more stable than in M2 macrophages. M2 macrophages have been characterized as anti-inflammatory cells with healing properties to curtail inflammation after an infection or an injury and promote to return the body to homeostasis (Delavary et al., 2011; Serhan and Savill, 2005). It has been reported that mouse M2 BMDMs have a higher 2D motility towards conditioned medium than their M1 counterpart (Vereyken et al., 2011). Similar results were obtained here with human M2 MDMs, and we showed further that mouse and human M2 macrophages can migrate in both fibrillar collagen I and Matrigel, and form podosomes that they organize as rosettes. Interestingly, M2 polarization induces an increase in fibronectin transcript which is involved in cell adhesion and migration processes and in cathepsin C, a lysosomal protease which could be involved in mesenchymal migration (Martinez et al., 2006; Verollet et al., 2011). Moreover, Hck, which regulates the formation of podosome rosettes and the protease-dependent 3D migration of macrophages (Cougoule et al., 2010), is activated during the process of M2-polarization (Bhattacharjee et al., 2011). M2 macrophages are also associated with pathological contexts such as persistent infections (tuberculosis, leprosy, Whipple's disease (Mege et al., 2011)). In the light of our results, it would be interesting to examine whether M2 macrophages facilitate host dissemination of pathogens. M2 macrophages are also described in chronic autoimmunity, obesity, fibrosis and cancer (Fairweather and Cihakova, 2009; Gordon and Martinez, 2010; Mosser and Edwards, 2008; Sica and Mantovani, 2012)). In several tumor models, macrophages have

phalloidin, vinculin with primary and AlexaFluor 488-coupled secondary antibodies, and nuclei with DAPI. Elicited macrophages organized their podosomes as rosettes (insets). Scale bars: 10 μ m, inset = 3 \times magnification. (E) Quantification of podosome rosettes in resident and elicited macrophages. Podosome structures were counted in at least 100 cells in duplicate samples ($n=5$). ** $p<0.01$. (F) Resident and elicited macrophages were seeded on FITC-coupled gelatin coated on glass coverslips and incubated overnight, fixed and stained for F-actin and nuclei. Resident macrophages poorly degrade FITC-coupled gelatin. Elicited macrophages degraded large areas of gelatin-FITC. Scale bars: 10 μ m. (G) Quantification of FITC-coupled gelatin degradation by resident and elicited macrophages. The percentage of degradation corresponds to the number of pixels of degradation for 100 pixels of cell surface. Results are expressed as mean \pm SEM ($n=5$). *** $p<0.001$.

been shown to be polarized as M2 and to enhance malignancy and tumor cell invasiveness (Qian and Pollard, 2010; Ruffell et al., 2012) notably by remodeling the extracellular matrix to open paths to tumor cells (Gocheva et al., 2010; Guet et al., 2011).

Despite the fact that *in vitro* polarization is clearly a simplified model, results on cell migration provide new striking differences between M1 and M2 macrophages, namely that 2D and 3D migration is an exclusive property of M2 macrophages.

We also report that resident and elicited peritoneal macrophages have distinct migration abilities. Elicited peritoneal macrophages, harvested 4 days after thioglycollate injection, were found to up-regulate both M1 and M2 markers as previously reported (Schif-Zuck et al., 2011; Stables et al., 2011) and to migrate in both fibrillar collagen I and Matrigel. At this time point, the inflammatory response initiated by thioglycollate is reaching the resolution phase (C. Lastrucci et al., unpublished data) and macrophages are thus not expected to die locally but to migrate to the draining lymph nodes (Bellingan et al., 1996; Randolph, 2008). For this, motile functions in 3D environments would be necessary.

Resident macrophages originate either from blood monocytes which migrate to tissues in non-inflammatory conditions or from resident cells which self-renew by transient proliferation after inflammatory episodes (Davies et al., 2011; Jenkins et al., 2011). One of the functions of resident macrophages is to sample the tissue in search of foreign particles. We show that peritoneal resident macrophages migrate in fibrillar collagen I but not in Matrigel. As previously described (Isaac et al., 2010), we observed that resident macrophages do not form podosome rosettes and they do not degrade gelatin-FITC. Consequently, in contrast to elicited macrophages, residents have a limited migration ability which might confine them to their tissue of residence. In future, it will be interesting to explore whether resident macrophages collected from tissues with distinct biophysical properties (porosity, stiffness) have distinct migration abilities compared to peritoneal macrophages.

We have previously shown that migration of human and mouse macrophages in dense matrices such as Matrigel or gelled collagen I is: (i) inhibited by protease inhibitors, (ii) independent of ROCK, a key effector of the amoeboid migration, (iii) dependent on the macrophage ability to organize its podosomes as rosettes and to degrade the ECM, (iv) characterized by an elongated cell shape with 3D podosomes at the tip of cell protrusions (Van Goethem et al., 2010, 2011; Verollet et al., 2011). This mode of migration has been called mesenchymal migration (Cougoule et al., 2010; Van Goethem et al., 2010, 2011; Verollet et al., 2011) by analogy to a migration mode used by tumor cells (Wolf and Friedl, 2011). Taken together with our previous studies, we show that cells which are able to infiltrate Matrigel with the characteristic mesenchymal phenotype (MDMs, BMDMs, human and mouse M2 macrophages, mouse elicited macrophages) form podosomes, organize them as rosettes and degrade the ECM while cells which do not infiltrate Matrigel (T lymphocytes, neutrophils, monocytes and resident macrophages) do not form podosomes. Although podosomes are required for the mesenchymal mode, the presence of podosomes does not certify the mesenchymal migration ability since M1 MDMs do form podosomes and degrade the matrix but are motionless. Interestingly, M1 macrophages do not organize their podosomes as rosettes. Hck and Filamin A, which regulate the mesenchymal but not the amoeboid migration mode, also regulate the organization of podosomes as rosettes (Cougoule et al., 2010; Guet et al., 2012), further supporting the view that these podosome suprastructures are involved in the 3D migration of macrophages in dense matrices (Van Goethem et al., 2011).

In conclusion, this is the first study compiling a detailed analysis of the capacity of human primary blood-derived leukocytes and macrophages to migrate in 3D environments, form podosomes,

organize them as rosettes and degrade the ECM. Our results highlight that none of the blood-derived leukocytes studied here do form podosomes or infiltrate a dense matrix of concentrated Matrigel. Thus we suspect that these leukocytes would more likely localize in loose areas of tissues. In addition, our results extend our knowledge on the diversity of macrophage phenotypes by showing that M2 and elicited macrophages use the mesenchymal mode while M1 polarized and resident macrophages do not. Tissues infiltrated by macrophages are often a negative sign of disease progression, including for cancer and chronic inflammation. These diseases are also often characterized by tissue densification (Egeblad et al., 2010) which would likely require the mesenchymal migration. A potential outcome of our work is to consider pathways regulating specifically the mesenchymal migration of macrophages as potential targets for therapeutic approaches.

Acknowledgments

We thank Jean-Michel Sappayrolles, M. Waqar Aslam and Annie Béhar for technical assistance with macrophage preparations. We thank TRI (Toulouse Réseau Imagerie) and Anexplo GenoToul facilities at the IPBS and Sophie Allard from the IFR150 microscopy platform (Toulouse). We also thank the BiVic facility (Toulouse, France) for the production of lentivirus carrying mCherry-Lifeact construct. This study was supported in part by ARC #2010-120-1733, ANR 2010-01301, FRM DEQ 20110421312. EVG was supported by La Ligue contre le cancer, CL by a Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche fellowships.

Appendix A. Supplementary data

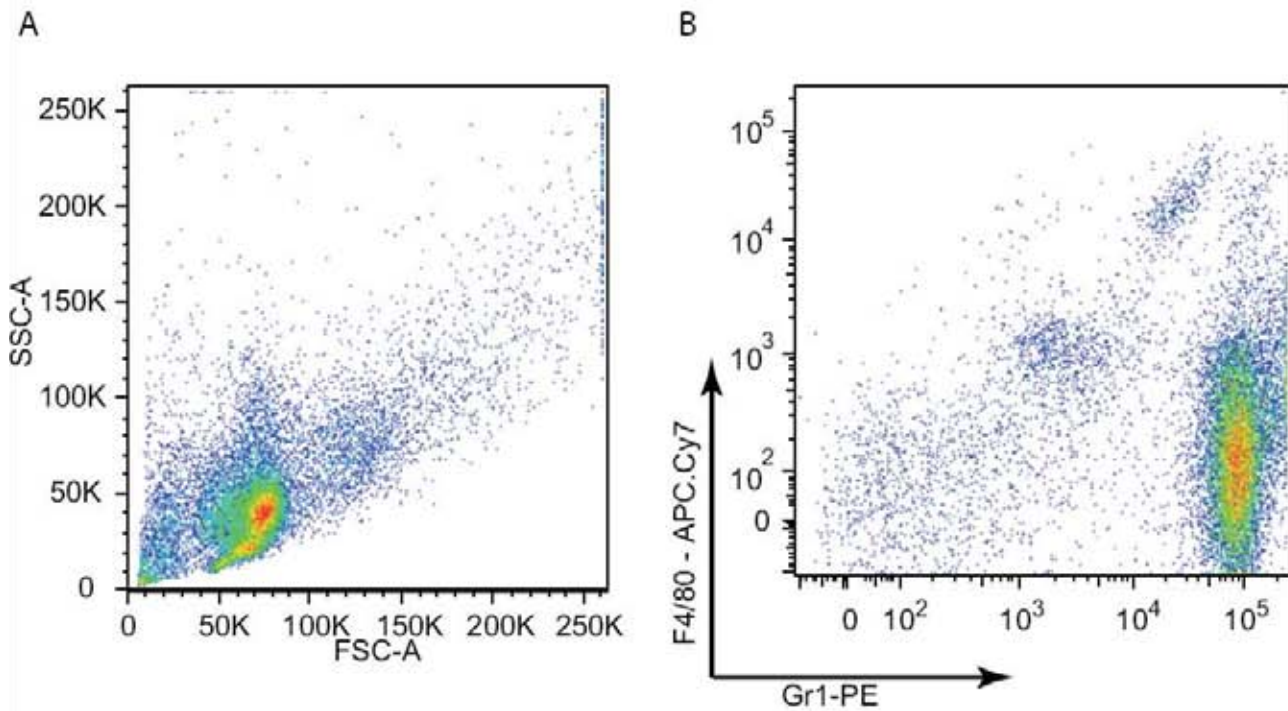
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.07.002>.

References

- Bellingan, G.J., Caldwell, H., Howie, S.E., Dransfield, I., Haslett, C., 1996. In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes. *J. Immunol.* 157, 2577–2585.
- Ben Amara, A., Ghigo, E., Le Priol, Y., Lepolard, C., Salcedo, S.P., Lemichez, E., Bretelle, F., Capo, C., Mege, J.L., 2010. *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, replicates within trophoblasts and induces a unique transcriptional response. *PLoS One* 5, e15315.
- Bhattacharjee, A., Pal, S., Feldman, G.M., Cathcart, M.K., 2011. Hck is a key regulator of gene expression in alternatively activated human monocytes. *J. Biol. Chem.* 286, 36709–36723.
- Bhuwanya, R., Cornifine, S., Fang, Z., Kruger, M., Luna, E.J., Linder, S., 2012. Supervillin couples myosin-dependent contractility to podosomes and enables their turnover. *J. Cell Sci.* 125, 2300–2314.
- Bleul, C.C., Wu, L., Hoxie, J.A., Springer, T.A., Mackay, C.R., 1997. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1925–1930.
- Bystrom, J., Evans, I., Newson, J., Stables, M., Toor, I., van Rooijen, N., Crawford, M., Colville-Nash, P., Farrow, S., Gilroy, D.W., 2008. Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood* 112, 4117–4127.
- Calle, Y., Anton, I.M., Thrasher, A.J., Jones, G.E., 2008. WASP and WIP regulate podosomes in migrating leukocytes. *J. Microsc.* 231, 494–505.
- Carman, C.V., Sage, P.T., Sciuto, T.E., de la Fuente, M.A., Geha, R.S., Ochs, H.D., Dvorak, H.F., Dvorak, A.M., Springer, T.A., 2007. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity* 26, 784–797.
- Cougoule, C., Le Cabec, V., Poincloux, R., Al Saati, T., Mege, J.L., Tabouret, G., Lowell, C.A., Laviolette-Malirat, N., Maridonneau-Parini, I., 2010. Three-dimensional migration of macrophages requires Hck for podosome organization and extracellular matrix proteolysis. *Blood* 115, 1444–1452.
- Davies, L.C., Rosas, M., Smith, P.J., Fraser, D.J., Jones, S.A., Taylor, P.R., 2011. A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. *Eur. J. Immunol.* 41, 2155–2164.
- Delavary, B.M., van der Veer, W.M., van Egmond, M., Niessen, F.B., Beelen, R.H., 2011. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology* 216, 753–762.
- Egeblad, M., Rasch, M.G., Weaver, V.M., 2010. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 697–706.
- Fairweather, D., Cihakova, D., 2009. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *J. Autoimmun.* 33, 222–230.

- Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., Albelda, S.M., 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 16, 183–194.
- Friedl, P., Weigelin, B., 2008. Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat. Immunol.* 9, 960–969.
- Gocheva, V., Wang, H.W., Gadea, B.B., Shree, T., Hunter, K.E., Garfall, A.L., Berman, T., Joyce, J.A., 2010. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.* 24, 241–255.
- Gordon, S., Mantovani, A., 2011. Diversity and plasticity of mononuclear phagocytes. *Eur. J. Immunol.* 41, 2470–2472.
- Gordon, S., Martinez, F.O., 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32, 593–604.
- Guiet, R., Van Goethem, E., Cougoule, C., Balor, S., Valette, A., Al Saati, T., Lowell, C.A., Le Cabec, V., Maridonneau-Parini, I., 2011. The process of macrophage migration promotes matrix metalloproteinase-independent invasion by tumor cells. *J. Immunol.* 187, 3806–3814.
- Guiet, R., Verollet, C., Lamsoul, I., Cougoule, C., Poincloux, R., Labrousse, A., Calderwood, D.A., Glogauer, M., Lutz, P.G., Maridonneau-Parini, I., 2012. Macrophage mesenchymal migration requires podosome stabilization by filamin A. *J. Biol. Chem.* 287, 13051–13062.
- Harunaga, J.S., Yamada, K.M., 2011. Cell-matrix adhesions in 3D. *Matrix Biol.* 30, 363–368.
- Isaac, B.M., Ishihara, D., Nusblat, L.M., Gevrey, J.C., Dovas, A., Condeelis, J., Cox, D., 2010. N-WASP has the ability to compensate for the loss of WASP in macrophage podosome formation and chemotaxis. *Exp. Cell Res.* 316, 3406–3416.
- Jenkins, S.J., Ruckerl, D., Cook, P.C., Jones, L.H., Finkelman, F.D., van Rooijen, N., MacDonald, A.S., Allen, J.E., 2011. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* 332, 1284–1288.
- Krysko, O., Holtappels, G., Zhang, N., Kubica, M., Deswarte, K., Derycke, L., Claeys, S., Hammad, H., Brusselle, G.G., Vandenabeele, P., Krysko, D.V., Bachert, C., 2011. Alternatively activated macrophages and impaired phagocytosis of *S. aureus* in chronic rhinosinusitis. *Allergy* 66, 396–403.
- Larsen, M., Artym, V.V., Green, J.A., Yamada, K.M., 2006. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 463–471.
- Laskin, D.L., Sunil, V.R., Gardner, C.R., Laskin, J.D., 2011. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51, 267–288.
- Le Cabec, V., Maridonneau-Parini, I., 1994. Annexin 3 is associated with cytoplasmic granules in neutrophils and monocytes and translocates to the plasma membrane in activated cells. *Biochem. J.* 303 (Pt 2), 481–487.
- Liddiard, K., Rosas, M., Davies, L.C., Jones, S.A., Taylor, P.R., 2011. Macrophage heterogeneity and acute inflammation. *Eur. J. Immunol.* 41, 2503–2508.
- Linder, S., 2007. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol.* 17, 107–117.
- Linder, S., Wiesner, C., Himmel, M., 2011. Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 185–211.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M., 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686.
- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., Mantovani, A., 2006. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J. Immunol.* 177, 7303–7311.
- Martinez, F.O., Helming, L., Gordon, S., 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 451–483.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M., 2008. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* 13, 453–461.
- Mege, J.L., Mehraj, V., Capo, C., 2011. Macrophage polarization and bacterial infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 24, 230–234.
- Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969.
- Murray, P.J., Wynn, T.A., 2011. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J. Leukoc. Biol.* 89, 557–563.
- Nourshargh, S., Hordijk, P.L., Sixt, M., 2010. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 366–378.
- Qian, B.Z., Pollard, J.W., 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39–51.
- Randolph, G.J., 2008. Emigration of monocyte-derived cells to lymph nodes during resolution of inflammation and its failure in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 19, 462–468.
- Ruffell, B., Affara, N.I., Coussens, L.M., 2012. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.* 33 (3), 119–126.
- Sabeh, F., Shimizu-Hirota, R., Weiss, S.J., 2009. Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *J. Cell Biol.* 185, 11–19.
- Sage, P.T., Varghese, L.M., Martinelli, R., Sciuto, T.E., Kamei, M., Dvorak, A.M., Springer, T.A., Sharpe, A.H., Carman, C.V., 2012. Antigen recognition is facilitated by invadosome-like protrusions formed by memory/effector T cells. *J. Immunol.* 188, 3686–3699.
- Salmon, H., Franciszkiewicz, K., Damotte, D., Dieu-Nosjean, M.C., Validire, P., Trautmann, A., Mami-Chouaib, F., Donnadiou, E., 2012. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J. Clin. Invest.* 122 (3), 899–910.
- Schif-Zuck, S., Gross, N., Assi, S., Rostoker, R., Serhan, C.N., Ariel, A., 2011. Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b low macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids. *Eur. J. Immunol.* 41, 366–379.
- Serhan, C.N., Savill, J., 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* 6, 1191–1197.
- Sica, A., Mantovani, A., 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122, 787–795.
- Stables, M.J., Shah, S., Camon, E.B., Lovering, R.C., Newson, J., Bystrom, J., Farrow, S., Gilroy, D.W., 2011. Transcriptomic analyses of murine resolution-phase macrophages. *Blood* 118, e192–e208.
- Steadman, R., St John, P.L., Evans, R.A., Thomas, G.J., Davies, M., Heck, L.W., Abrahamson, D.R., 1997. Human neutrophils do not degrade major basement membrane components during chemotactic migration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 993–1004.
- Szczur, K., Xu, H., Atkinson, S., Zheng, Y., Filippi, M.D., 2006. Rho GTPase CDC42 regulates directionality and random movement via distinct MAPK pathways in neutrophils. *Blood* 108, 4205–4213.
- Tantibhedhyangkul, W., Prachason, T., Waywa, D., El Filali, A., Ghigo, E., Thongnopkahun, W., Raouf, D., Suputtamongkol, Y., Capo, C., Limwongse, C., Mege, J.L., 2011. Orientia tsutsugamushi stimulates an original gene expression program in monocytes: relationship with gene expression in patients with scrub typhus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1028.
- Van Goethem, E., Guiet, R., Balor, S., Charriere, G.M., Poincloux, R., Labrousse, A., Maridonneau-Parini, I., Le Cabec, V., 2011. Macrophage podosomes go 3D. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 224–236.
- Van Goethem, E., Poincloux, R., Gauffre, F., Maridonneau-Parini, I., Le Cabec, V., 2010. Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J. Immunol.* 184, 1049–1061.
- Varin, A., Mukhopadhyay, S., Herbein, G., Gordon, S., 2010. Alternative activation of macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion. *Blood* 115, 353–362.
- Vereyken, E.J., Heijnen, P.D., Baron, W., de Vries, E.H., Dijkstra, C.D., Teunissen, C.E., 2011. Classically and alternatively activated bone marrow derived macrophages differ in cytoskeletal functions and migration towards specific CNS cell types. *J. Neuroinflammation* 8, 58.
- Verollet, C., Charriere, G.M., Labrousse, A., Cougoule, C., Le Cabec, V., Maridonneau-Parini, I., 2011. Extracellular proteolysis in macrophage migration: losing grip for a breakthrough. *Eur. J. Immunol.* 41, 2805–2813.
- Wolf, K., Friedl, P., 2011. Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends Cell Biol.* 21, 736–744.
- Wolf, K., Muller, R., Borgmann, S., Brocker, E.B., Friedl, P., 2003. Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases. *Blood* 102, 3262–3269.

Cougoule et al.
Supplemental Figure 1



A: FSC/SSC profile of peritoneal elicited cells 12h after 4% thioglycollate injection. **B:** F4/80 and Gr1 cell surface expression of peritoneal elicited cells. About 70% of the collected cells were neutrophils characterized by their F4/80 low and Gr1 high staining.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abdul-Manan, N., Aghazadeh, B., Liu, G. A., Majumdar, A., Ouerfelli, O., Siminovitch, K. A., and Rosen, M. K. (1999). Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the 'Wiskott-Aldrich syndrome' protein. *Nature* 399, 379-383.
- Abraham, V. C., Krishnamurthi, V., Taylor, D. L., and Lanni, F. (1999). The actin-based nanomachine at the leading edge of migrating cells. *Biophys J* 77, 1721-1732.
- Adriani, M., Aoki, J., Horai, R., Thornton, A. M., Konno, A., Kirby, M., Anderson, S. M., Siegel, R. M., Candotti, F., and Schwartzberg, P. L. (2007). Impaired in vitro regulatory T cell function associated with Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Immunol* 124, 41-48.
- Agece, W. W. (2006). Tissue-tropic effector T cells: generation and targeting opportunities. *Nat Rev Immunol* 6, 682-692.
- Agus, D. B., Surh, C. D., and Sprent, J. (1991). Reentry of T cells to the adult thymus is restricted to activated T cells. *J Exp Med* 173, 1039-1046.
- Alam, S. M., Travers, P. J., Wung, J. L., Nasholds, W., Redpath, S., Jameson, S. C., and Gascoigne, N. R. (1996). T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* 381, 616-620.
- Albert, M. H., Bittner, T. C., Nonoyama, S., Notarangelo, L. D., Burns, S., Imai, K., Espanol, T., Fasth, A., Pellier, I., Strauss, G., *et al.* (2010). X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options. *Blood* 115, 3231-3238.
- Aldrich, R. A., Steinberg, A. G., and Campbell, D. C. (1954). Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhea. *Pediatrics* 13, 133-139.
- Allenspach, E. J., Cullinan, P., Tong, J., Tang, Q., Tesciuba, A. G., Cannon, J. L., Takahashi, S. M., Morgan, R., Burkhardt, J. K., and Sperling, A. I. (2001). ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity* 15, 739-750.
- Alon, R., and Dustin, M. L. (2007). Force as a facilitator of integrin conformational changes during leukocyte arrest on blood vessels and antigen-presenting cells. *Immunity* 26, 17-27.
- Ancliff, P. J., Blundell, M. P., Cory, G. O., Calle, Y., Worth, A., Kempinski, H., Burns, S., Jones, G. E., Sinclair, J., Kinnon, C., *et al.* (2006). Two novel activating mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood* 108, 2182-2189.
- Anderson, A. O., and Anderson, N. D. (1976). Lymphocyte emigration from high endothelial venules in rat lymph nodes. *Immunology* 31, 731-748.
- Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., and Mathis, D. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298, 1395-1401.
- Andreu, N., Aran, J. M., and Fillat, C. (2007). Novel membrane cell projection defects in Wiskott-Aldrich syndrome B cells. *Int J Mol Med* 20, 445-450.
- Andreu, N., Pujol-Moix, N., Martinez-Lostao, L., Oset, M., Muniz-Diaz, E., Estivill, X., Volpini, V., and Fillat, C. (2003). Wiskott-Aldrich syndrome in a female with skewed X-chromosome inactivation. *Blood Cells Mol Dis* 31, 332-337.
- Andrew, D. P., Spellberg, J. P., Takimoto, H., Schmits, R., Mak, T. W., and Zukowski, M. M. (1998). Transendothelial migration and trafficking of leukocytes in LFA-1-deficient mice. *Eur J Immunol* 28, 1959-1969.
- Anton, I. M., de la Fuente, M. A., Sims, T. N., Freeman, S., Ramesh, N., Hartwig, J. H., Dustin, M. L., and Geha, R. S. (2002). WIP deficiency reveals a differential role for WIP and the actin cytoskeleton in T and B cell activation. *Immunity* 16, 193-204.

- Appay, V., Zaunders, J. J., Papagno, L., Sutton, J., Jaramillo, A., Waters, A., Easterbrook, P., Grey, P., Smith, D., McMichael, A. J., *et al.* (2002). Characterization of CD4(+) CTLs *ex vivo*. *J Immunol* *168*, 5954-5958.
- Arbones, M. L., Ord, D. C., Ley, K., Ratech, H., Maynard-Curry, C., Otten, G., Capon, D. J., and Tedder, T. F. (1994). Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* *1*, 247-260.
- Ariga, T., Yamada, M., Sakiyama, Y., and Tatsuzawa, O. (1998). A case of Wiskott-Aldrich syndrome with dual mutations in exon 10 of the WASP gene: an additional *de novo* one-base insertion, which restores frame shift due to an inherent one-base deletion, detected in the major population of the patient's peripheral blood lymphocytes. *Blood* *92*, 699-701.
- Arkwright, P. D., Abinun, M., and Cant, A. J. (2002). Autoimmunity in human primary immunodeficiency diseases. *Blood* *99*, 2694-2702.
- Asperti-Boursin, F., Real, E., Bismuth, G., Trautmann, A., and Donnadieu, E. (2007). CCR7 ligands control basal T cell motility within lymph node slices in a phosphoinositide 3-kinase-independent manner. *J Exp Med* *204*, 1167-1179.
- Azzali, G., Arcari, M. L., and Caldara, G. F. (2008). The "mode" of lymphocyte extravasation through HEV of Peyer's patches and its role in normal homing and inflammation. *Microvasc Res* *75*, 227-237.
- Bach, F. H., Albertini, R. J., Joo, P., Anderson, J. L., and Bortin, M. M. (1968). Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* *2*, 1364-1366.
- Bachmann, M. F., McKall-Faienza, K., Schmits, R., Bouchard, D., Beach, J., Speiser, D. E., Mak, T. W., and Ohashi, P. S. (1997). Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* *7*, 549-557.
- Badolato, R., Sozzani, S., Malacarne, F., Bresciani, S., Fiorini, M., Borsatti, A., Albertini, A., Mantovani, A., Ugazio, A. G., and Notarangelo, L. D. (1998). Monocytes from Wiskott-Aldrich patients display reduced chemotaxis and lack of cell polarization in response to monocyte chemoattractant protein-1 and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J Immunol* *161*, 1026-1033.
- Badour, K., Zhang, J., and Siminovitch, K. A. (2004). Involvement of the Wiskott-Aldrich syndrome protein and other actin regulatory adaptors in T cell activation. *Semin Immunol* *16*, 395-407.
- Baekkevold, E. S., Yamanaka, T., Palframan, R. T., Carlsen, H. S., Reinholt, F. P., von Andrian, U. H., Brandtzaeg, P., and Haraldsen, G. (2001). The CCR7 ligand *elc* (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *J Exp Med* *193*, 1105-1112.
- Bajenoff, M., Egen, J. G., Koo, L. Y., Laugier, J. P., Brau, F., Gleichhaus, N., and Germain, R. N. (2006). Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* *25*, 989-1001.
- Bargatze, R. F., and Butcher, E. C. (1993). Rapid G protein-regulated activation event involved in lymphocyte binding to high endothelial venules. *J Exp Med* *178*, 367-372.
- Bargatze, R. F., Jutila, M. A., and Butcher, E. C. (1995). Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV *in situ*: the multistep model confirmed and refined. *Immunity* *3*, 99-108.
- Barreiro, O., Yanez-Mo, M., Serrador, J. M., Montoya, M. C., Vicente-Manzanares, M., Tejedor, R., Furthmayr, H., and Sanchez-Madrid, F. (2002). Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J Cell Biol* *157*, 1233-1245.
- Baxter, R. C., Binoux, M., Clemmons, D. R., Conover, C., Drop, S. L., Holly, J. M., Mohan, S., Oh, Y., and Rosenfeld, R. G. (1998). Recommendations for nomenclature of the

insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) superfamily. *Growth Horm IGF Res* 8, 273-274.

Becker-Herman, S., Meyer-Bahlburg, A., Schwartz, M. A., Jackson, S. W., Hudkins, K. L., Liu, C., Sather, B. D., Khim, S., Liggitt, D., Song, W., *et al.* (2011). WASp-deficient B cells play a critical, cell-intrinsic role in triggering autoimmunity. *J Exp Med* 208, 2033-2042.

Beel, K., Cotter, M. M., Blatny, J., Bond, J., Lucas, G., Green, F., Vanduppen, V., Leung, D. W., Rooney, S., Smith, O. P., *et al.* (2009). A large kindred with X-linked neutropenia with an I294T mutation of the Wiskott-Aldrich syndrome gene. *Br J Haematol* 144, 120-126.

Beeson, C., Rabinowitz, J., Tate, K., Gutgemann, I., Chien, Y. H., Jones, P. P., Davis, M. M., and McConnell, H. M. (1996). Early biochemical signals arise from low affinity TCR-ligand reactions at the cell-cell interface. *J Exp Med* 184, 777-782.

Beglova, N., Blacklow, S. C., Takagi, J., and Springer, T. A. (2002). Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nat Struct Biol* 9, 282-287.

Beltman, J. B., Maree, A. F., Lynch, J. N., Miller, M. J., and de Boer, R. J. (2007). Lymph node topology dictates T cell migration behavior. *J Exp Med* 204, 771-780.

Benoist, C., and Mathis, D. (1989). Positive selection of the T cell repertoire: where and when does it occur? *Cell* 58, 1027-1033.

Benvenuti, F., Lagaudriere-Gesbert, C., Grandjean, I., Jancic, C., Hivroz, C., Trautmann, A., Lantz, O., and Amigorena, S. (2004). Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J Immunol* 172, 292-301.

Benz, C., Heinzl, K., and Bleul, C. C. (2004). Homing of immature thymocytes to the subcapsular microenvironment within the thymus is not an absolute requirement for T cell development. *Eur J Immunol* 34, 3652-3663.

Berlin-Rufenach, C., Otto, F., Mathies, M., Westermann, J., Owen, M. J., Hamann, A., and Hogg, N. (1999). Lymphocyte migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice. *J Exp Med* 189, 1467-1478.

Berlin, C., Berg, E. L., Briskin, M. J., Andrew, D. P., Kilshaw, P. J., Holzmann, B., Weissman, I. L., Hamann, A., and Butcher, E. C. (1993). Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74, 185-195.

Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., and Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 68, 729-777.

Billadeau, D. D., Nolz, J. C., and Gomez, T. S. (2007). Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol* 7, 131-143.

Binder, V., Albert, M. H., Kabus, M., Bertone, M., Meindl, A., and Belohradsky, B. H. (2006). The genotype of the original Wiskott phenotype. *N Engl J Med* 355, 1790-1793.

Binks, M., Jones, G. E., Brickell, P. M., Kinnon, C., Katz, D. R., and Thrasher, A. J. (1998). Intrinsic dendritic cell abnormalities in Wiskott-Aldrich syndrome. *Eur J Immunol* 28, 3259-3267.

Blanchard, N., Decraene, M., Yang, K., Miro-Mur, F., Amigorena, S., and Hivroz, C. (2004). Strong and durable TCR clustering at the T/dendritic cell immune synapse is not required for NFAT activation and IFN-gamma production in human CD4+ T cells. *J Immunol* 173, 3062-3072.

Blattman, J. N., Antia, R., Sourdive, D. J., Wang, X., Kaech, S. M., Murali-Krishna, K., Altman, J. D., and Ahmed, R. (2002). Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med* 195, 657-664.

- Blundell, M. P., Bouma, G., Calle, Y., Jones, G. E., Kinnon, C., and Thrasher, A. J. (2008). Improvement of migratory defects in a murine model of Wiskott-Aldrich syndrome gene therapy. *Mol Ther* *16*, 836-844.
- Bolomini-Vittori, M., Montresor, A., Giagulli, C., Staunton, D., Rossi, B., Martinello, M., Constantin, G., and Laudanna, C. (2009). Regulation of conformer-specific activation of the integrin LFA-1 by a chemokine-triggered Rho signaling module. *Nat Immunol* *10*, 185-194.
- Bossi, G., and Griffiths, G. M. (2005). CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle. *Semin Immunol* *17*, 87-94.
- Bouma, G., Mendoza-Naranjo, A., Blundell, M. P., de Falco, E., Parsley, K. L., Burns, S. O., and Thrasher, A. J. (2011). Cytoskeletal remodeling mediated by WASp in dendritic cells is necessary for normal immune synapse formation and T-cell priming. *Blood* *118*, 2492-2501.
- Bouso, P., Bhakta, N. R., Lewis, R. S., and Robey, E. (2002). Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* *296*, 1876-1880.
- Boztug, K., Baumann, U., Ballmaier, M., Webster, D., Sandrock, I., Jacobs, R., Lion, T., Preuner, S., Germeshausen, M., Hansen, G., *et al.* (2007). Large granular lymphocyte proliferation and revertant mosaicism: two rare events in a Wiskott-Aldrich syndrome patient. *Haematologica* *92*, e43-45.
- Boztug, K., Schmidt, M., Schwarzer, A., Banerjee, P. P., Diez, I. A., Dewey, R. A., Bohm, M., Nowrouzi, A., Ball, C. R., Glimm, H., *et al.* (2010). Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med* *363*, 1918-1927.
- Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Forster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* *192*, 1545-1552.
- Bromley, S. K., Peterson, D. A., Gunn, M. D., and Dustin, M. L. (2000). Cutting edge: hierarchy of chemokine receptor and TCR signals regulating T cell migration and proliferation. *J Immunol* *165*, 15-19.
- Brossard, C., Feuillet, V., Schmitt, A., Randriamampita, C., Romao, M., Raposo, G., and Trautmann, A. (2005). Multifocal structure of the T cell - dendritic cell synapse. *Eur J Immunol* *35*, 1741-1753.
- Bunnell, S. C., Hong, D. I., Kardon, J. R., Yamazaki, T., McGlade, C. J., Barr, V. A., and Samelson, L. E. (2002). T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *J Cell Biol* *158*, 1263-1275.
- Burbach, B. J., Medeiros, R. B., Mueller, K. L., and Shimizu, Y. (2007). T-cell receptor signaling to integrins. *Immunol Rev* *218*, 65-81.
- Burns, S., Cory, G. O., Vainchenker, W., and Thrasher, A. J. (2004). Mechanisms of WASp-mediated hematologic and immunologic disease. *Blood* *104*, 3454-3462.
- Burns, S., Thrasher, A. J., Blundell, M. P., Machesky, L., and Jones, G. E. (2001). Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* *98*, 1142-1149.
- Butcher, E. C., and Picker, L. J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* *272*, 60-66.
- Cahalan, M. D., and Parker, I. (2008). Choreography of cell motility and interaction dynamics imaged by two-photon microscopy in lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* *26*, 585-626.
- Cahill, R. N., Frost, H., and Trnka, Z. (1976). The effects of antigen on the migration of recirculating lymphocytes through single lymph nodes. *J Exp Med* *143*, 870-888.
- Calle, Y., Chou, H. C., Thrasher, A. J., and Jones, G. E. (2004). Wiskott-Aldrich syndrome protein and the cytoskeletal dynamics of dendritic cells. *J Pathol* *204*, 460-469.

- Calvez, R., Lafouresse, F., De Meester, J., Galy, A., Valitutti, S., and Dupre, L. (2011). The Wiskott-Aldrich syndrome protein permits assembly of a focused immunological synapse enabling sustained T-cell receptor signaling. *Haematologica* *96*, 1415-1423.
- Campbell, J. J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M. A., Thompson, D. A., and Butcher, E. C. (1998). Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* *279*, 381-384.
- Campbell, J. J., Pan, J., and Butcher, E. C. (1999). Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J Immunol* *163*, 2353-2357.
- Campi, G., Varma, R., and Dustin, M. L. (2005). Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J Exp Med* *202*, 1031-1036.
- Canales, M. L., and Mauer, A. M. (1967). Sex-linked hereditary thrombocytopenia as a variant of Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med* *277*, 899-901.
- Cannon, J. L., and Burkhardt, J. K. (2004). Differential roles for Wiskott-Aldrich syndrome protein in immune synapse formation and IL-2 production. *J Immunol* *173*, 1658-1662.
- Carlsen, H. S., Haraldsen, G., Brandtzaeg, P., and Baekkevold, E. S. (2005). Disparate lymphoid chemokine expression in mice and men: no evidence of CCL21 synthesis by human high endothelial venules. *Blood* *106*, 444-446.
- Carman, C. V., Sage, P. T., Sciuto, T. E., de la Fuente, M. A., Geha, R. S., Ochs, H. D., Dvorak, H. F., Dvorak, A. M., and Springer, T. A. (2007). Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity* *26*, 784-797.
- Carman, C. V., and Springer, T. A. (2004). A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol* *167*, 377-388.
- Castellino, F., Huang, A. Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C., and Germain, R. N. (2006). Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* *440*, 890-895.
- Catucci, M., Prete, F., Bosticardo, M., Castiello, M. C., Draghici, E., Locci, M., Roncarolo, M. G., Aiuti, A., Benvenuti, F., and Villa, A. (2011). Dendritic cell functional improvement in a preclinical model of lentiviral-mediated gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome. *Gene Ther*.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* *5*, 919-923.
- Celli, S., Garcia, Z., and Bousso, P. (2005). CD4 T cells integrate signals delivered during successive DC encounters in vivo. *J Exp Med* *202*, 1271-1278.
- Charrier, S., Dupre, L., Scaramuzza, S., Jeanson-Leh, L., Blundell, M. P., Danos, O., Cattaneo, F., Aiuti, A., Eckenberg, R., Thrasher, A. J., *et al.* (2007). Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients. *Gene Ther* *14*, 415-428.
- Cho, Y., and De Bruyn, P. P. (1979). The endothelial structure of the postcapillary venules of the lymph node and the passage of lymphocytes across the venule wall. *J Ultrastruct Res* *69*, 13-21.
- Chou, H. C., Anton, I. M., Holt, M. R., Curcio, C., Lanzardo, S., Worth, A., Burns, S., Thrasher, A. J., Jones, G. E., and Calle, Y. (2006). WIP regulates the stability and localization of WASP to podosomes in migrating dendritic cells. *Curr Biol* *16*, 2337-2344.
- Cianferoni, A., Massaad, M., Feske, S., de la Fuente, M. A., Gallego, L., Ramesh, N., and Geha, R. S. (2005). Defective nuclear translocation of nuclear factor of activated T cells

and extracellular signal-regulated kinase underlies deficient IL-2 gene expression in Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 116, 1364-1371.

Cinamon, G., Shinder, V., and Alon, R. (2001). Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines. *Nat Immunol* 2, 515-522.

Cory, G. O., Garg, R., Cramer, R., and Ridley, A. J. (2002). Phosphorylation of tyrosine 291 enhances the ability of WASp to stimulate actin polymerization and filopodium formation. Wiskott-Aldrich Syndrome protein. *J Biol Chem* 277, 45115-45121.

Cotta-de-Almeida, V., Westerberg, L., Maillard, M. H., Onaldi, D., Wachtel, H., Meelu, P., Chung, U. I., Xavier, R., Alt, F. W., and Snapper, S. B. (2007). Wiskott Aldrich syndrome protein (WASP) and N-WASP are critical for T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15424-15429.

Cullinan, P., Sperling, A. I., and Burkhardt, J. K. (2002). The distal pole complex: a novel membrane domain distal to the immunological synapse. *Immunol Rev* 189, 111-122.

Cyster, J. G., Ansel, K. M., Reif, K., Ekland, E. H., Hyman, P. L., Tang, H. L., Luther, S. A., and Ngo, V. N. (2000). Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev* 176, 181-193.

Das, V., Nal, B., Dujeancourt, A., Thoulouze, M. I., Galli, T., Roux, P., Dautry-Varsat, A., and Alcover, A. (2004). Activation-induced polarized recycling targets T cell antigen receptors to the immunological synapse; involvement of SNARE complexes. *Immunity* 20, 577-588.

Davis, B. R., Dicola, M. J., Prokopishyn, N. L., Rosenberg, J. B., Moratto, D., Muul, L. M., Candotti, F., and Michael Blaese, R. (2008). Unprecedented diversity of genotypic revertants in lymphocytes of a patient with Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 111, 5064-5067.

de la Fuente, M. A., Sasahara, Y., Calamito, M., Anton, I. M., Elkhali, A., Gallego, M. D., Suresh, K., Siminovich, K., Ochs, H. D., Anderson, K. C., *et al.* (2007). WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 926-931.

De Meester, J., Calvez, R., Valitutti, S., and Dupre, L. (2010). The Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates CTL cytotoxicity and is required for efficient killing of B cell lymphoma targets. *J Leukoc Biol* 88, 1031-1040.

de Paz, J. L., Moseman, E. A., Noti, C., Polito, L., von Andrian, U. H., and Seeberger, P. H. (2007). Profiling heparin-chemokine interactions using synthetic tools. *ACS Chem Biol* 2, 735-744.

Delon, J., Bercovici, N., Raposo, G., Liblau, R., and Trautmann, A. (1998). Antigen-dependent and -independent Ca²⁺ responses triggered in T cells by dendritic cells compared with B cells. *J Exp Med* 188, 1473-1484.

Delon, J., Kaibuchi, K., and Germain, R. N. (2001). Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* 15, 691-701.

Depoil, D., Zaru, R., Guiraud, M., Chauveau, A., Harriague, J., Bismuth, G., Utzny, C., Muller, S., and Valitutti, S. (2005). Immunological synapses are versatile structures enabling selective T cell polarization. *Immunity* 22, 185-194.

Derry, J. M., Ochs, H. D., and Francke, U. (1994). Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 78, 635-644.

Devriendt, K., Kim, A. S., Mathijs, G., Frints, S. G., Schwartz, M., Van Den Oord, J. J., Verhoef, G. E., Boogaerts, M. A., Fryns, J. P., You, D., *et al.* (2001). Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Genet* 27, 313-317.

Dewey, R. A., Avedillo Diez, I., Ballmaier, M., Filipovich, A., Greil, J., Gungor, T., Happel, C., Maschan, A., Noyan, F., Pannicke, U., *et al.* (2006). Retroviral WASP gene

transfer into human hematopoietic stem cells reconstitutes the actin cytoskeleton in myeloid progeny cells differentiated in vitro. *Exp Hematol* *34*, 1161-1169.

Dingwall, C., and Laskey, R. A. (1991). Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci* *16*, 478-481.

Dransfield, I., Cabanas, C., Craig, A., and Hogg, N. (1992). Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. *J Cell Biol* *116*, 219-226.

Dupre, L., Aiuti, A., Trifari, S., Martino, S., Saracco, P., Bordignon, C., and Roncarolo, M. G. (2002). Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity* *17*, 157-166.

Dupre, L., Marangoni, F., Scaramuzza, S., Trifari, S., Hernandez, R. J., Aiuti, A., Naldini, L., and Roncarolo, M. G. (2006). Efficacy of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome using a WAS promoter/cDNA-containing lentiviral vector and nonlethal irradiation. *Hum Gene Ther* *17*, 303-313.

Dupre, L., Trifari, S., Follenzi, A., Marangoni, F., Lain de Lera, T., Bernad, A., Martino, S., Tsuchiya, S., Bordignon, C., Naldini, L., *et al.* (2004). Lentiviral vector-mediated gene transfer in T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients leads to functional correction. *Mol Ther* *10*, 903-915.

Dupuis-Girod, S., Medioni, J., Haddad, E., Quartier, P., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., de Saint Basile, G., Delaunay, J., Schwarz, K., Casanova, J. L., *et al.* (2003). Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome: risk factors, clinical features, and outcome in a single-center cohort of 55 patients. *Pediatrics* *111*, e622-627.

Dustin, M. L. (2008). T-cell activation through immunological synapses and kinapses. *Immunol Rev* *221*, 77-89.

Dustin, M. L., Bromley, S. K., Kan, Z., Peterson, D. A., and Unanue, E. R. (1997). Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 3909-3913.

Dustin, M. L., Starr, T., Varma, R., and Thomas, V. K. (2007). Supported planar bilayers for study of the immunological synapse. *Curr Protoc Immunol Chapter 18*, Unit 18 13.

Dykstra, M., Cherukuri, A., Sohn, H. W., Tzeng, S. J., and Pierce, S. K. (2003). Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu Rev Immunol* *21*, 457-481.

Ehrlich, L. I., Oh, D. Y., Weissman, I. L., and Lewis, R. S. (2009). Differential contribution of chemotaxis and substrate restriction to segregation of immature and mature thymocytes. *Immunity* *31*, 986-998.

Evans, R., Lellouch, A. C., Svensson, L., McDowall, A., and Hogg, N. (2011). The integrin LFA-1 signals through ZAP-70 to regulate expression of high-affinity LFA-1 on T lymphocytes. *Blood* *117*, 3331-3342.

Fairweather, D., Kaya, Z., Shellam, G. R., Lawson, C. M., and Rose, N. R. (2001). From infection to autoimmunity. *J Autoimmun* *16*, 175-186.

Faix, J., and Grosse, R. (2006). Staying in shape with formins. *Dev Cell* *10*, 693-706.

Falcone, V., Schweizer, M., and Neumann-Haefelin, D. (2003). Replication of primate foamy viruses in natural and experimental hosts. *Curr Top Microbiol Immunol* *277*, 161-180.

Faroudi, M., Zaru, R., Paulet, P., Muller, S., and Valitutti, S. (2003). Cutting edge: T lymphocyte activation by repeated immunological synapse formation and intermittent signaling. *J Immunol* *171*, 1128-1132.

Faure, S., Salazar-Fontana, L. I., Semichon, M., Tybulewicz, V. L., Bismuth, G., Trautmann, A., Germain, R. N., and Delon, J. (2004). ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nat Immunol* *5*, 272-279.

- Fearon, E. R., Kohn, D. B., Winkelstein, J. A., Vogelstein, B., and Blaese, R. M. (1988). Carrier detection in the Wiskott Aldrich syndrome. *Blood* 72, 1735-1739.
- Filipovich, A. H., Stone, J. V., Tomany, S. C., Ireland, M., Kollman, C., Pelz, C. J., Casper, J. T., Cowan, M. J., Edwards, J. R., Fasth, A., *et al.* (2001). Impact of donor type on outcome of bone marrow transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome: collaborative study of the International Bone Marrow Transplant Registry and the National Marrow Donor Program. *Blood* 97, 1598-1603.
- Firat-Karalar, E. N., and Welch, M. D. (2011). New mechanisms and functions of actin nucleation. *Curr Opin Cell Biol* 23, 4-13.
- Fischer, U. B., Jacovetty, E. L., Medeiros, R. B., Goudy, B. D., Zell, T., Swanson, J. B., Lorenz, E., Shimizu, Y., Miller, M. J., Khoruts, A., and Ingulli, E. (2007). MHC class II deprivation impairs CD4 T cell motility and responsiveness to antigen-bearing dendritic cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7181-7186.
- Fisher, P. J., Bulur, P. A., Vuk-Pavlovic, S., Prendergast, F. G., and Dietz, A. B. (2008). Dendritic cell microvilli: a novel membrane structure associated with the multifocal synapse and T-cell clustering. *Blood* 112, 5037-5045.
- Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Williams, L. M., Dooley, J. L., Farr, A. G., and Rudensky, A. Y. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22, 329-341.
- Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23-33.
- Foss, D. L., Donskoy, E., and Goldschneider, I. (2001). The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. *J Exp Med* 193, 365-374.
- Frauwirth, K. A., and Thompson, C. B. (2004). Regulation of T lymphocyte metabolism. *J Immunol* 172, 4661-4665.
- Friedl, P., and Brocker, E. B. (2002). TCR triggering on the move: diversity of T-cell interactions with antigen-presenting cells. *Immunol Rev* 186, 83-89.
- Friedl, P., den Boer, A. T., and Gunzer, M. (2005). Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 5, 532-545.
- Friedl, P., Entschladen, F., Conrad, C., Niggemann, B., and Zanker, K. S. (1998a). CD4+ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize beta1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion. *Eur J Immunol* 28, 2331-2343.
- Friedl, P., and Gunzer, M. (2001). Interaction of T cells with APCs: the serial encounter model. *Trends Immunol* 22, 187-191.
- Friedl, P., Zanker, K. S., and Brocker, E. B. (1998b). Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc Res Tech* 43, 369-378.
- Friedman, R. S., Jacobelli, J., and Krummel, M. F. (2006). Surface-bound chemokines capture and prime T cells for synapse formation. *Nat Immunol* 7, 1101-1108.
- Gallego, M. D., de la Fuente, M. A., Anton, I. M., Snapper, S., Fuhlbrigge, R., and Geha, R. S. (2006). WIP and WASP play complementary roles in T cell homing and chemotaxis to SDF-1alpha. *Int Immunol* 18, 221-232.
- Gallego, M. D., Santamaria, M., Pena, J., and Molina, I. J. (1997). Defective actin reorganization and polymerization of Wiskott-Aldrich T cells in response to CD3-mediated stimulation. *Blood* 90, 3089-3097.
- Galy, A., Roncarolo, M. G., and Thrasher, A. J. (2008). Development of lentiviral gene therapy for Wiskott Aldrich syndrome. *Expert Opin Biol Ther* 8, 181-190.

- Galy, A., and Thrasher, A. J. (2011). Gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* *11*, 545-550.
- Garboczi, D. N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q. R., Biddison, W. E., and Wiley, D. C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* *384*, 134-141.
- Garcia-Alvarez, B., de Pereda, J. M., Calderwood, D. A., Ulmer, T. S., Critchley, D., Campbell, I. D., Ginsberg, M. H., and Liddington, R. C. (2003). Structural determinants of integrin recognition by talin. *Mol Cell* *11*, 49-58.
- Garcia, K. C., Degano, M., Stanfield, R. L., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., Teyton, L., and Wilson, I. A. (1996). An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* *274*, 209-219.
- Gatti, R. A., Meuwissen, H. J., Allen, H. D., Hong, R., and Good, R. A. (1968). Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* *2*, 1366-1369.
- Gerard, A., Mertens, A. E., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. (2007). The Par polarity complex regulates Rap1- and chemokine-induced T cell polarization. *J Cell Biol* *176*, 863-875.
- Germain, R. N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* *2*, 309-322.
- Ghandour, H., Cullere, X., Alvarez, A., Luscinskas, F. W., and Mayadas, T. N. (2007). Essential role for Rap1 GTPase and its guanine exchange factor CalDAG-GEFI in LFA-1 but not VLA-4 integrin mediated human T-cell adhesion. *Blood* *110*, 3682-3690.
- Giannoni, F., Barnett, J., Bi, K., Samodal, R., Lanza, P., Marchese, P., Billetta, R., Vita, R., Klein, M. R., Prakken, B., *et al.* (2005). Clustering of T cell ligands on artificial APC membranes influences T cell activation and protein kinase C theta translocation to the T cell plasma membrane. *J Immunol* *174*, 3204-3211.
- Girard, J. P., Baekkevold, E. S., Yamanaka, T., Haraldsen, G., Brandtzaeg, P., and Amalric, F. (1999). Heterogeneity of endothelial cells: the specialized phenotype of human high endothelial venules characterized by suppression subtractive hybridization. *Am J Pathol* *155*, 2043-2055.
- Gismondi, A., Cifaldi, L., Mazza, C., Giliani, S., Parolini, S., Morrone, S., Jacobelli, J., Bandiera, E., Notarangelo, L., and Santoni, A. (2004). Impaired natural and CD16-mediated NK cell cytotoxicity in patients with WAS and XLT: ability of IL-2 to correct NK cell functional defect. *Blood* *104*, 436-443.
- Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* *150*, 4244-4252.
- Goldrath, A. W., and Bevan, M. J. (1999). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* *402*, 255-262.
- Goley, E. D., and Welch, M. D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 713-726.
- Gomez-Mouton, C., Abad, J. L., Mira, E., Lacalle, R. A., Gallardo, E., Jimenez-Baranda, S., Illa, I., Bernad, A., Manes, S., and Martinez, A. C. (2001). Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 9642-9647.
- Good, R. A. (1987). Bone marrow transplantation for immunodeficiency diseases. *Am J Med Sci* *294*, 68-74.
- Gowans, J. L., and Knight, E. J. (1964). The Route of Re-Circulation of Lymphocytes in the Rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* *159*, 257-282.

Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., and Dustin, M. L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.

Gretz, J. E., Anderson, A. O., and Shaw, S. (1997). Cords, channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex. *Immunol Rev* 156, 11-24.

Gretz, J. E., Norbury, C. C., Anderson, A. O., Proudfoot, A. E., and Shaw, S. (2000). Lymph-borne chemokines and other low molecular weight molecules reach high endothelial venules via specialized conduits while a functional barrier limits access to the lymphocyte microenvironments in lymph node cortex. *J Exp Med* 192, 1425-1440.

Gudima, G. O., Vorobjev, I. A., and Chentsov Yu, S. (1988). Centriolar location during blood cell spreading and motion in vitro: an ultrastructural analysis. *J Cell Sci* 89 (Pt 2), 225-241.

Gulacsy, V., Freiburger, T., Shcherbina, A., Pac, M., Chernyshova, L., Avcin, T., Kondratenko, I., Kostyuchenko, L., Prokofjeva, T., Pasic, S., *et al.* (2011). Genetic characteristics of eighty-seven patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Mol Immunol* 48, 788-792.

Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T., and Nakano, H. (1999). Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 189, 451-460.

Gunn, M. D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J. G., Rosen, S. D., and Williams, L. T. (1998). A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 258-263.

Gunzer, M., Schafer, A., Borgmann, S., Grabbe, S., Zanker, K. S., Brocker, E. B., Kampgen, E., and Friedl, P. (2000). Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity* 13, 323-332.

Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., *et al.* (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.

Haddad, E., Cramer, E., Riviere, C., Rameau, P., Louache, F., Guichard, J., Nelson, D. L., Fischer, A., Vainchenker, W., and Debili, N. (1999). The thrombocytopenia of Wiskott Aldrich syndrome is not related to a defect in proplatelet formation. *Blood* 94, 509-518.

Haddad, E., Zugaza, J. L., Louache, F., Debili, N., Crouin, C., Schwarz, K., Fischer, A., Vainchenker, W., and Bertoglio, J. (2001). The interaction between Cdc42 and WASP is required for SDF-1-induced T-lymphocyte chemotaxis. *Blood* 97, 33-38.

Hale, J. S., and Fink, P. J. (2009). Back to the thymus: peripheral T cells come home. *Immunol Cell Biol* 87, 58-64.

Hashimoto-Tane, A., Yokosuka, T., Sakata-Sogawa, K., Sakuma, M., Ishihara, C., Tokunaga, M., and Saito, T. (2011). Dynein-driven transport of T cell receptor microclusters regulates immune synapse formation and T cell activation. *Immunity* 34, 919-931.

Heneine, W., Schweizer, M., Sandstrom, P., and Folks, T. (2003). Human infection with foamy viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 277, 181-196.

Henrickson, S. E., Mempel, T. R., Mazo, I. B., Liu, B., Artyomov, M. N., Zheng, H., Peixoto, A., Flynn, M. P., Senman, B., Junt, T., *et al.* (2008). T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation. *Nat Immunol* 9, 282-291.

Henriquez, N. V., Rijkers, G. T., and Zegers, B. J. (1994). Antigen receptor-mediated transmembrane signaling in Wiskott-Aldrich syndrome. *J Immunol* 153, 395-399.

Higgs, H. N., and Pollard, T. D. (2000). Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J Cell Biol* *150*, 1311-1320.

Hixenbaugh, E. A., Goeckeler, Z. M., Papaiya, N. N., Wysolmerski, R. B., Silverstein, S. C., and Huang, A. J. (1997). Stimulated neutrophils induce myosin light chain phosphorylation and isometric tension in endothelial cells. *Am J Physiol* *273*, H981-988.

Hochweller, K., Wabnitz, G. H., Samstag, Y., Suffner, J., Hammerling, G. J., and Garbi, N. (2010). Dendritic cells control T cell tonic signaling required for responsiveness to foreign antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 5931-5936.

Hogg, N., and Bates, P. A. (2000). Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes. *Matrix Biol* *19*, 211-222.

Hogg, N., Patzak, I., and Willenbrock, F. (2011). The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat Rev Immunol* *11*, 416-426.

Hollander, G. A., Wang, B., Nichogiannopoulou, A., Platenburg, P. P., van Ewijk, W., Burakoff, S. J., Gutierrez-Ramos, J. C., and Terhorst, C. (1995). Developmental control point in induction of thymic cortex regulated by a subpopulation of prothymocytes. *Nature* *373*, 350-353.

Howe, S. J., Mansour, M. R., Schwarzwaelder, K., Bartholomae, C., Hubank, M., Kempski, H., Brugman, M. H., Pike-Overzet, K., Chatters, S. J., de Ridder, D., *et al.* (2008). Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest* *118*, 3143-3150.

Huang, J. H., Cardenas-Navia, L. I., Caldwell, C. C., Plumb, T. J., Radu, C. G., Rocha, P. N., Wilder, T., Bromberg, J. S., Cronstein, B. N., Sitkovsky, M., *et al.* (2007). Requirements for T lymphocyte migration in explanted lymph nodes. *J Immunol* *178*, 7747-7755.

Huang, W., Ochs, H. D., Dupont, B., and Vyas, Y. M. (2005). The Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates nuclear translocation of NFAT2 and NF-kappa B (RelA) independently of its role in filamentous actin polymerization and actin cytoskeletal rearrangement. *J Immunol* *174*, 2602-2611.

Hugues, S., Fetler, L., Bonifaz, L., Helft, J., Amblard, F., and Amigorena, S. (2004). Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol* *5*, 1235-1242.

Humble, J. G., Jayne, W. H., and Pulvertaft, R. J. (1956). Biological interaction between lymphocytes and other cells. *Br J Haematol* *2*, 283-294.

Humblet-Baron, S., Sather, B., Anover, S., Becker-Herman, S., Kasprovicz, D. J., Khim, S., Nguyen, T., Hudkins-Loya, K., Alpers, C. E., Ziegler, S. F., *et al.* (2007). Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for regulatory T cell homeostasis. *J Clin Invest* *117*, 407-418.

Huse, M., Lillemeier, B. F., Kuhns, M. S., Chen, D. S., and Davis, M. M. (2006). T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. *Nat Immunol* *7*, 247-255.

Iezzi, G., Karjalainen, K., and Lanzavecchia, A. (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* *8*, 89-95.

Iida, T., Ohno, H., Nakaseko, C., Sakuma, M., Takeda-Ezaki, M., Arase, H., Kominami, E., Fujisawa, T., and Saito, T. (2000). Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4+ T cells. *J Immunol* *165*, 5062-5068.

Ilani, T., Vasiliver-Shamis, G., Vardhana, S., Bretscher, A., and Dustin, M. L. (2009). T cell antigen receptor signaling and immunological synapse stability require myosin IIA. *Nat Immunol* *10*, 531-539.

- Imai, K., Morio, T., Zhu, Y., Jin, Y., Itoh, S., Kajiwara, M., Yata, J., Mizutani, S., Ochs, H. D., and Nonoyama, S. (2004). Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood* *103*, 456-464.
- Imai, K., Nonoyama, S., and Ochs, H. D. (2003). WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) gene mutations and phenotype. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* *3*, 427-436.
- Indrasingh, I., Chandi, G., and Vettivel, S. (2002). Route of lymphocyte migration through the high endothelial venule (HEV) in human palatine tonsil. *Ann Anat* *184*, 77-84.
- Isaac, B. M., Ishihara, D., Nusblat, L. M., Gevrey, J. C., Dovas, A., Condeelis, J., and Cox, D. (2010). N-WASP has the ability to compensate for the loss of WASP in macrophage podosome formation and chemotaxis. *Exp Cell Res* *316*, 3406-3416.
- Jacobelli, J., Bennett, F. C., Pandurangi, P., Tooley, A. J., and Krummel, M. F. (2009). Myosin-IIA and ICAM-1 regulate the interchange between two distinct modes of T cell migration. *J Immunol* *182*, 2041-2050.
- Jacobelli, J., Friedman, R. S., Conti, M. A., Lennon-Dumenil, A. M., Piel, M., Sorensen, C. M., Adelstein, R. S., and Krummel, M. F. (2010). Confinement-optimized three-dimensional T cell amoeboid motility is modulated via myosin IIA-regulated adhesions. *Nat Immunol* *11*, 953-961.
- Jalkanen, S. T., Bargatze, R. F., Herron, L. R., and Butcher, E. C. (1986). A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. *Eur J Immunol* *16*, 1195-1202.
- Jin, S., Umemoto, E., Tanaka, T., Shimomura, Y., Tohya, K., Kunizawa, K., Yang, B. G., Jang, M. H., Hirata, T., and Miyasaka, M. (2008). Nepmucin/CLM-9, an Ig domain-containing sialomucin in vascular endothelial cells, promotes lymphocyte transendothelial migration in vitro. *FEBS Lett* *582*, 3018-3024.
- Jin, Y., Mazza, C., Christie, J. R., Giliani, S., Fiorini, M., Mella, P., Gandellini, F., Stewart, D. M., Zhu, Q., Nelson, D. L., *et al.* (2004). Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation. *Blood* *104*, 4010-4019.
- Kaiser, A., Donnadieu, E., Abastado, J. P., Trautmann, A., and Nardin, A. (2005). CC chemokine ligand 19 secreted by mature dendritic cells increases naive T cell scanning behavior and their response to rare cognate antigen. *J Immunol* *175*, 2349-2356.
- Kaizuka, Y., Douglass, A. D., Varma, R., Dustin, M. L., and Vale, R. D. (2007). Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 20296-20301.
- Kamata, T., Tieu, K. K., Tarui, T., Puzon-McLaughlin, W., Hogg, N., and Takada, Y. (2002). The role of the CPNKEKEK sequence in the beta(2) subunit I domain in regulation of integrin alpha(L)beta(2) (LFA-1). *J Immunol* *168*, 2296-2301.
- Kashiwazaki, M., Tanaka, T., Kanda, H., Ebisuno, Y., Izawa, D., Fukuma, N., Akimitsu, N., Sekimizu, K., Monden, M., and Miyasaka, M. (2003). A high endothelial venule-expressing promiscuous chemokine receptor DARC can bind inflammatory, but not lymphoid, chemokines and is dispensable for lymphocyte homing under physiological conditions. *Int Immunol* *15*, 1219-1227.
- Kaslow, H. R., and Burns, D. L. (1992). Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *Faseb J* *6*, 2684-2690.
- Katakai, T., Hara, T., Sugai, M., Gonda, H., and Shimizu, A. (2004). Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. *J Exp Med* *200*, 783-795.
- Kato, S. (1997). Thymic microvascular system. *Microsc Res Tech* *38*, 287-299.

- Kenney, D., Cairns, L., Remold-O'Donnell, E., Peterson, J., Rosen, F. S., and Parkman, R. (1986). Morphological abnormalities in the lymphocytes of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* *68*, 1329-1332.
- Kim, A. S., Kakalis, L. T., Abdul-Manan, N., Liu, G. A., and Rosen, M. K. (2000). Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* *404*, 151-158.
- Kim, C. H., Pelus, L. M., White, J. R., and Broxmeyer, H. E. (1998). Differential chemotactic behavior of developing T cells in response to thymic chemokines. *Blood* *91*, 4434-4443.
- Kim, C. H., Rott, L. S., Clark-Lewis, I., Campbell, D. J., Wu, L., and Butcher, E. C. (2001). Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med* *193*, 1373-1381.
- Klein, L., and Kyewski, B. (2000). Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. *Curr Opin Immunol* *12*, 179-186.
- Kobayashi, R., Ariga, T., Nonoyama, S., Kanegane, H., Tsuchiya, S., Morio, T., Yabe, H., Nagatoshi, Y., Kawa, K., Tabuchi, K., *et al.* (2006). Outcome in patients with Wiskott-Aldrich syndrome following stem cell transplantation: an analysis of 57 patients in Japan. *Br J Haematol* *135*, 362-366.
- Kondo, T., Cortese, I., Markovic-Plese, S., Wandinger, K. P., Carter, C., Brown, M., Leitman, S., and Martin, R. (2001). Dendritic cells signal T cells in the absence of exogenous antigen. *Nat Immunol* *2*, 932-938.
- Konno, A., Kirby, M., Anderson, S. A., Schwartzberg, P. L., and Candotti, F. (2007). The expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is dependent on WASP-interacting protein (WIP). *Int Immunol* *19*, 185-192.
- Konno, A., Wada, T., Schurman, S. H., Garabedian, E. K., Kirby, M., Anderson, S. M., and Candotti, F. (2004). Differential contribution of Wiskott-Aldrich syndrome protein to selective advantage in T- and B-cell lineages. *Blood* *103*, 676-678.
- Kraal, G., and Mebius, R. E. (1997). High endothelial venules: lymphocyte traffic control and controlled traffic. *Adv Immunol* *65*, 347-395.
- Krummel, M. F., and Allison, J. P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* *182*, 459-465.
- Kunkel, E. J., Ramos, C. L., Steeber, D. A., Muller, W., Wagner, N., Tedder, T. F., and Ley, K. (1998). The roles of L-selectin, beta 7 integrins, and P-selectin in leukocyte rolling and adhesion in high endothelial venules of Peyer's patches. *J Immunol* *161*, 2449-2456.
- Kupfer, A., Mosmann, T. R., and Kupfer, H. (1991). Polarized expression of cytokines in cell conjugates of helper T cells and splenic B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 775-779.
- Kupfer, A., Swain, S. L., and Singer, S. J. (1987). The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. *J Exp Med* *165*, 1565-1580.
- Kwan, J., and Killeen, N. (2004). CCR7 directs the migration of thymocytes into the thymic medulla. *J Immunol* *172*, 3999-4007.
- Lammermann, T., Bader, B. L., Monkley, S. J., Worbs, T., Wedlich-Soldner, R., Hirsch, K., Keller, M., Forster, R., Crichtley, D. R., Fassler, R., and Sixt, M. (2008). Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* *453*, 51-55.
- Lammermann, T., and Sixt, M. (2009). Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Curr Opin Cell Biol* *21*, 636-644.
- Lanzi, G., Moratto, D., Vairo, D., Masneri, S., Delmonte, O., Paganini, T., Parolini, S., Tabellini, G., Mazza, C., Savoldi, G., *et al.* (2012). A novel primary human

immunodeficiency due to deficiency in the WASP-interacting protein WIP. *J Exp Med* 209, 29-34.

Le Clainche, C., and Carlier, M. F. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev* 88, 489-513.

Lee, J. H., Katakai, T., Hara, T., Gonda, H., Sugai, M., and Shimizu, A. (2004). Roles of p-ERM and Rho-ROCK signaling in lymphocyte polarity and uropod formation. *J Cell Biol* 167, 327-337.

Lee, K. H., Dinner, A. R., Tu, C., Campi, G., Raychaudhuri, S., Varma, R., Sims, T. N., Burack, W. R., Wu, H., Wang, J., *et al.* (2003). The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science* 302, 1218-1222.

Lee, K. H., Holdorf, A. D., Dustin, M. L., Chan, A. C., Allen, P. M., and Shaw, A. S. (2002). T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 295, 1539-1542.

Leupin, O., Zaru, R., Laroche, T., Muller, S., and Valitutti, S. (2000). Exclusion of CD45 from the T-cell receptor signaling area in antigen-stimulated T lymphocytes. *Curr Biol* 10, 277-280.

Leverrier, Y., Lorenzi, R., Blundell, M. P., Brickell, P., Kinnon, C., Ridley, A. J., and Thrasher, A. J. (2001). Cutting edge: the Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for efficient phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol* 166, 4831-4834.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, 678-689.

Lim, R. P., Misra, A., Wu, Z., and Thanabalu, T. (2007). Analysis of conformational changes in WASP using a split YFP. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 1085-1089.

Lind, E. F., Prockop, S. E., Porritt, H. E., and Petrie, H. T. (2001). Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* 194, 127-134.

Linder, S., Nelson, D., Weiss, M., and Aepfelbacher, M. (1999). Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9648-9653.

Lindquist, R. L., Shakhar, G., Dudziak, D., Wardemann, H., Eisenreich, T., Dustin, M. L., and Nussenzweig, M. C. (2004). Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nat Immunol* 5, 1243-1250.

Lorenzi, R., Brickell, P. M., Katz, D. R., Kinnon, C., and Thrasher, A. J. (2000). Wiskott-Aldrich syndrome protein is necessary for efficient IgG-mediated phagocytosis. *Blood* 95, 2943-2946.

Ludford-Menting, M. J., Oliaro, J., Sacirbegovic, F., Cheah, E. T., Pedersen, N., Thomas, S. J., Pasam, A., Iazzolino, R., Dow, L. E., Waterhouse, N. J., *et al.* (2005). A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation. *Immunity* 22, 737-748.

Luther, S. A., Tang, H. L., Hyman, P. L., Farr, A. G., and Cyster, J. G. (2000). Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12694-12699.

Lutskiy, M. I., Park, J. Y., Remold, S. K., and Remold-O'Donnell, E. (2008). Evolution of highly polymorphic T cell populations in siblings with the Wiskott-Aldrich Syndrome. *PLoS One* 3, e3444.

Lutskiy, M. I., Sasahara, Y., Kenney, D. M., Rosen, F. S., and Remold-O'Donnell, E. (2002). Wiskott-Aldrich syndrome in a female. *Blood* 100, 2763-2768.

Mace, E. M., Zhang, J., Siminovitch, K. A., and Takei, F. (2010). Elucidation of the integrin LFA-1-mediated signaling pathway of actin polarization in natural killer cells. *Blood* 116, 1272-1279.

- Macpherson, L., Monypenny, J., Blundell, M. P., Cory, G. O., Tome-Garcia, J., Thrasher, A. J., Jones, G. E., and Calle, Y. (2012). Tyrosine phosphorylation of WASP promotes calpain-mediated podosome disassembly. *Haematologica* 97, 687-691.
- Maillard, M. H., Cotta-de-Almeida, V., Takeshima, F., Nguyen, D. D., Michetti, P., Nagler, C., Bhan, A. K., and Snapper, S. B. (2007). The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for the function of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 204, 381-391.
- Mamdouh, Z., Mikhailov, A., and Muller, W. A. (2009). Transcellular migration of leukocytes is mediated by the endothelial lateral border recycling compartment. *J Exp Med* 206, 2795-2808.
- Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., Quackenbush, E., Xie, J., Milligan, J., Thornton, R., Shei, G. J., Card, D., Keohane, C., *et al.* (2002). Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 296, 346-349.
- Mantovani, J., Charrier, S., Eckenberg, R., Saurin, W., Danos, O., Perea, J., and Galy, A. (2009). Diverse genomic integration of a lentiviral vector developed for the treatment of Wiskott-Aldrich syndrome. *J Gene Med* 11, 645-654.
- Marangoni, F., Bosticardo, M., Charrier, S., Draghici, E., Locci, M., Scaramuzza, S., Panaroni, C., Ponzoni, M., Sanvito, F., Doglioni, C., *et al.* (2009). Evidence for long-term efficacy and safety of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome in preclinical models. *Mol Ther* 17, 1073-1082.
- Marangoni, F., Trifari, S., Scaramuzza, S., Panaroni, C., Martino, S., Notarangelo, L. D., Baz, Z., Metin, A., Cattaneo, F., Villa, A., *et al.* (2007). WASP regulates suppressor activity of human and murine CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) natural regulatory T cells. *J Exp Med* 204, 369-380.
- Marathe, B. M., Prislovsky, A., Astrakhan, A., Rawlings, D. J., Wan, J. Y., and Strom, T. S. (2009). Antiplatelet antibodies in WASP(-) mice correlate with evidence of increased in vivo platelet consumption. *Exp Hematol* 37, 1353-1363.
- Marchesi, V. T., and Gowans, J. L. (1964). The Migration of Lymphocytes through the Endothelium of Venules in Lymph Nodes: an Electron Microscope Study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 159, 283-290.
- Martinez-Quiles, N., Rohatgi, R., Anton, I. M., Medina, M., Saville, S. P., Miki, H., Yamaguchi, H., Takenawa, T., Hartwig, J. H., Geha, R. S., and Ramesh, N. (2001). WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nat Cell Biol* 3, 484-491.
- Massaad, M. J., Ramesh, N., Le Bras, S., Giliani, S., Notarangelo, L. D., Al-Herz, W., Notarangelo, L. D., and Geha, R. S. (2011). A peptide derived from the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) protein-interacting protein (WIP) restores WAS protein level and actin cytoskeleton reorganization in lymphocytes from patients with WAS mutations that disrupt WIP binding. *J Allergy Clin Immunol* 127, 998-1005 e1001-1002.
- Mathew, P., and Conley, M. E. (1995). Effect of intravenous gammaglobulin (IVIG) on the platelet count in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Pediatr Allergy Immunol* 6, 91-94.
- Matloubian, M., Lo, C. G., Cinamon, G., Lesneski, M. J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M. L., Proia, R. L., and Cyster, J. G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427, 355-360.
- Mazerolles, F., Barbat, C., Hivroz, C., and Fischer, A. (1996). Phosphatidylinositol 3-kinase participates in p56(lck)/CD4-dependent down-regulation of LFA-1-mediated T cell adhesion. *J Immunol* 157, 4844-4854.
- McEvoy, L. M., Sun, H., Frelinger, J. G., and Butcher, E. C. (1997). Anti-CD43 inhibition of T cell homing. *J Exp Med* 185, 1493-1498.

Mempel, T. R., Henrickson, S. E., and Von Andrian, U. H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* *427*, 154-159.

Michie, S. A., and Rouse, R. V. (1989). Traffic of mature lymphocytes into the mouse thymus. *Thymus* *13*, 141-148.

Miki, H., Miura, K., and Takenawa, T. (1996). N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *Embo J* *15*, 5326-5335.

Millan, J., Hewlett, L., Glyn, M., Toomre, D., Clark, P., and Ridley, A. J. (2006). Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat Cell Biol* *8*, 113-123.

Millan, J., Montoya, M. C., Sancho, D., Sanchez-Madrid, F., and Alonso, M. A. (2002). Lipid rafts mediate biosynthetic transport to the T lymphocyte uropod subdomain and are necessary for uropod integrity and function. *Blood* *99*, 978-984.

Miller, M. J., Hejazi, A. S., Wei, S. H., Cahalan, M. D., and Parker, I. (2004a). T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 998-1003.

Miller, M. J., Safrina, O., Parker, I., and Cahalan, M. D. (2004b). Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *J Exp Med* *200*, 847-856.

Miller, M. J., Wei, S. H., Cahalan, M. D., and Parker, I. (2003). Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 2604-2609.

Miller, M. J., Wei, S. H., Parker, I., and Cahalan, M. D. (2002). Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* *296*, 1869-1873.

Mionnet, C., Sanos, S. L., Mondor, I., Jorquera, A., Laugier, J. P., Germain, R. N., and Bajenoff, M. (2011). High endothelial venules as traffic control points maintaining lymphocyte population homeostasis in lymph nodes. *Blood* *118*, 6115-6122.

Misslitz, A., Pabst, O., Hintzen, G., Ohl, L., Kremmer, E., Petrie, H. T., and Forster, R. (2004). Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J Exp Med* *200*, 481-491.

Modlich, U., Navarro, S., Zychlinski, D., Maetzig, T., Knoess, S., Brugman, M. H., Schambach, A., Charrier, S., Galy, A., Thrasher, A. J., *et al.* (2009). Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors. *Mol Ther* *17*, 1919-1928.

Molina, I. J., Sancho, J., Terhorst, C., Rosen, F. S., and Remold-O'Donnell, E. (1993). T cells of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome have a restricted defect in proliferative responses. *J Immunol* *151*, 4383-4390.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V. E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* *68*, 869-877.

Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* *395*, 82-86.

Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Ponzoni, M., Bartholomae, C., Sergi, L., Benedicenti, F., Ambrosi, A., Di Serio, C., *et al.* (2006). Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol* *24*, 687-696.

Monypenny, J., Chou, H. C., Banon-Rodriguez, I., Thrasher, A. J., Anton, I. M., Jones, G. E., and Calle, Y. (2011). Role of WASP in cell polarity and podosome dynamics of myeloid cells. *Eur J Cell Biol* *90*, 198-204.

- Morales-Tirado, V., Johansson, S., Hanson, E., Howell, A., Zhang, J., Siminovitch, K. A., and Fowell, D. J. (2004). Cutting edge: selective requirement for the Wiskott-Aldrich syndrome protein in cytokine, but not chemokine, secretion by CD4⁺ T cells. *J Immunol* *173*, 726-730.
- Morales-Tirado, V., Sojka, D. K., Katzman, S. D., Lazarski, C. A., Finkelman, F. D., Urban, J. F., and Fowell, D. J. (2009). Critical requirement for the Wiskott-Aldrich syndrome protein in Th2 effector function. *Blood* *115*, 3498-3507.
- Mori, K., Itoi, M., Tsukamoto, N., Kubo, H., and Amagai, T. (2007). The perivascular space as a path of hematopoietic progenitor cells and mature T cells between the blood circulation and the thymic parenchyma. *Int Immunol* *19*, 745-753.
- Morin, N. A., Oakes, P. W., Hyun, Y. M., Lee, D., Chin, Y. E., King, M. R., Springer, T. A., Shimaoka, M., Tang, J. X., Reichner, J. S., and Kim, M. (2008). Nonmuscle myosin heavy chain IIA mediates integrin LFA-1 de-adhesion during T lymphocyte migration. *J Exp Med* *205*, 195-205.
- Moser, M., Legate, K. R., Zent, R., and Fassler, R. (2009). The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* *324*, 895-899.
- Moussion, C., and Girard, J. P. (2011). Dendritic cells control lymphocyte entry to lymph nodes through high endothelial venules. *Nature* *479*, 542-546.
- Muller, W. A. (2003). Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* *24*, 327-334.
- Muller, W. A. (2011). Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annu Rev Pathol* *6*, 323-344.
- Munoz, A., Olive, T., Martinez, A., Bureo, E., Maldonado, M. S., Diaz de Heredia, C., Sastre, A., and Gonzalez-Vicent, M. (2007). Allogeneic hemopoietic stem cell transplantation (HSCT) for Wiskott-Aldrich syndrome: a report of the Spanish Working Party for Blood and Marrow Transplantation in Children (GETMON). *Pediatr Hematol Oncol* *24*, 393-402.
- Nagakubo, D., Murai, T., Tanaka, T., Usui, T., Matsumoto, M., Sekiguchi, K., and Miyasaka, M. (2003). A high endothelial venule secretory protein, mac25/angiomodulin, interacts with multiple high endothelial venule-associated molecules including chemokines. *J Immunol* *171*, 553-561.
- Nandagopal, S., Wu, D., and Lin, F. (2011). Combinatorial guidance by CCR7 ligands for T lymphocytes migration in co-existing chemokine fields. *PLoS One* *6*, e18183.
- Negulescu, P. A., Krasieva, T. B., Khan, A., Kerschbaum, H. H., and Cahalan, M. D. (1996). Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity* *4*, 421-430.
- Neote, K., Mak, J. Y., Kolakowski, L. F., Jr., and Schall, T. J. (1994). Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. *Blood* *84*, 44-52.
- Nieto, M., Frade, J. M., Sancho, D., Mellado, M., Martinez, A. C., and Sanchez-Madrid, F. (1997). Polarization of chemokine receptors to the leading edge during lymphocyte chemotaxis. *J Exp Med* *186*, 153-158.
- Nishida, N., Xie, C., Shimaoka, M., Cheng, Y., Walz, T., and Springer, T. A. (2006). Activation of leukocyte beta2 integrins by conversion from bent to extended conformations. *Immunity* *25*, 583-594.
- Nolte, M. A., Belien, J. A., Schadee-Eestermans, I., Jansen, W., Unger, W. W., van Rooijen, N., Kraal, G., and Mebius, R. E. (2003). A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp. *J Exp Med* *198*, 505-512.
- Nolz, J. C., Gomez, T. S., Zhu, P., Li, S., Medeiros, R. B., Shimizu, Y., Burkhardt, J. K., Freedman, B. D., and Billadeau, D. D. (2006). The WAVE2 complex regulates actin cytoskeletal reorganization and CRAC-mediated calcium entry during T cell activation. *Curr Biol* *16*, 24-34.

- Norcross, M. A. (1984). A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann Immunol (Paris)* *135D*, 113-134.
- Notarangelo, L. D., Mazza, C., Giliani, S., D'Aria, C., Gandellini, F., Ravelli, C., Locatelli, M. G., Nelson, D. L., Ochs, H. D., and Notarangelo, L. D. (2002). Missense mutations of the WASP gene cause intermittent X-linked thrombocytopenia. *Blood* *99*, 2268-2269.
- Nusblat, L. M., Dovas, A., and Cox, D. (2010). The non-redundant role of N-WASP in podosome-mediated matrix degradation in macrophages. *Eur J Cell Biol* *90*, 205-212.
- O'Keefe, J. P., Blaine, K., Alegre, M. L., and Gajewski, T. F. (2004). Formation of a central supramolecular activation cluster is not required for activation of naive CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 9351-9356.
- Ochs, H. D., Slichter, S. J., Harker, L. A., Von Behrens, W. E., Clark, R. A., and Wedgwood, R. J. (1980). The Wiskott-Aldrich syndrome: studies of lymphocytes, granulocytes, and platelets. *Blood* *55*, 243-252.
- Ochs, H. D., and Thrasher, A. J. (2006). The Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol* *117*, 725-738; quiz 739.
- Okada, T., and Cyster, J. G. (2007). CC chemokine receptor 7 contributes to Gi-dependent T cell motility in the lymph node. *J Immunol* *178*, 2973-2978.
- Okada, T., Ngo, V. N., Ekland, E. H., Forster, R., Lipp, M., Littman, D. R., and Cyster, J. G. (2002). Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med* *196*, 65-75.
- Ott, M. G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Kuhlcke, K., Schilz, A., Kunkel, H., *et al.* (2006). Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EV11, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* *12*, 401-409.
- Ozsahin, H., Cavazzana-Calvo, M., Notarangelo, L. D., Schulz, A., Thrasher, A. J., Mazzolari, E., Slatter, M. A., Le Deist, F., Blanche, S., Veys, P., *et al.* (2008). Long-term outcome following hematopoietic stem-cell transplantation in Wiskott-Aldrich syndrome: collaborative study of the European Society for Immunodeficiencies and European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* *111*, 439-445.
- Pabst, R. (1988). The spleen in lymphocyte migration. *Immunol Today* *9*, 43-45.
- Paccani, S. R., Boncristiano, M., Patrussi, L., Ulivieri, C., Wack, A., Valensin, S., Hirst, T. R., Amedei, A., Del Prete, G., Telford, J. L., *et al.* (2005). Defective Vav expression and impaired F-actin reorganization in a subset of patients with common variable immunodeficiency characterized by T-cell defects. *Blood* *106*, 626-634.
- Padrick, S. B., Cheng, H. C., Ismail, A. M., Panchal, S. C., Doolittle, L. K., Kim, S., Skehan, B. M., Umetani, J., Brautigam, C. A., Leong, J. M., and Rosen, M. K. (2008). Hierarchical regulation of WASP/WAVE proteins. *Mol Cell* *32*, 426-438.
- Padrick, S. B., Doolittle, L. K., Brautigam, C. A., King, D. S., and Rosen, M. K. (2011). Arp2/3 complex is bound and activated by two WASP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, E472-479.
- Padrick, S. B., and Rosen, M. K. (2010). Physical mechanisms of signal integration by WASP family proteins. *Annu Rev Biochem* *79*, 707-735.
- Page, D. M., Kane, L. P., Onami, T. M., and Hedrick, S. M. (1996). Cellular and biochemical requirements for thymocyte negative selection. *Semin Immunol* *8*, 69-82.
- Pappu, R., Schwab, S. R., Cornelissen, I., Pereira, J. P., Regard, J. B., Xu, Y., Camerer, E., Zheng, Y. W., Huang, Y., Cyster, J. G., and Coughlin, S. R. (2007). Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* *316*, 295-298.

- Park, J. Y., Kob, M., Prodeus, A. P., Rosen, F. S., Shcherbina, A., and Remold-O'Donnell, E. (2004). Early deficit of lymphocytes in Wiskott-Aldrich syndrome: possible role of WASP in human lymphocyte maturation. *Clin Exp Immunol* 136, 104-110.
- Pasvolsky, R., Feigelson, S. W., Kilic, S. S., Simon, A. J., Tal-Lapidot, G., Grabovsky, V., Crittenden, J. R., Amariglio, N., Safran, M., Graybiel, A. M., *et al.* (2007). A LAD-III syndrome is associated with defective expression of the Rap-1 activator CalDAG-GEFI in lymphocytes, neutrophils, and platelets. *J Exp Med* 204, 1571-1582.
- Patel, P. D., Samanich, J. M., Mitchell, W. B., and Manwani, D. (2011). A unique presentation of Wiskott-Aldrich syndrome in relation to platelet size. *Pediatr Blood Cancer* 56, 1127-1129.
- Peacocke, M., and Siminovitch, K. A. (1987). Linkage of the Wiskott-Aldrich syndrome with polymorphic DNA sequences from the human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3430-3433.
- Pelletier, A. J., van der Laan, L. J., Hildbrand, P., Siani, M. A., Thompson, D. A., Dawson, P. E., Torbett, B. E., and Salomon, D. R. (2000). Presentation of chemokine SDF-1 alpha by fibronectin mediates directed migration of T cells. *Blood* 96, 2682-2690.
- Perez, V. L., Henault, L., and Lichtman, A. H. (1998). Endothelial antigen presentation: stimulation of previously activated but not naive TCR-transgenic mouse T cells. *Cell Immunol* 189, 31-40.
- Peschon, J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Ramsdell, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., Park, L. S., Ziegler, S. F., Williams, D. E., Ware, C. B., *et al.* (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 180, 1955-1960.
- Petrella, A., Doti, I., Agosti, V., Giarrusso, P. C., Vitale, D., Bond, H. M., Cuomo, C., Tassone, P., Franco, B., Ballabio, A., *et al.* (1998). A 5' regulatory sequence containing two Ets motifs controls the expression of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) gene in human hematopoietic cells. *Blood* 91, 4554-4560.
- Pinner, S. E., and Sahai, E. (2009). Integrin-independent movement of immune cells. *F1000 Biol Rep* 1, 67.
- Pittet, M. J., and Mempel, T. R. (2008). Regulation of T-cell migration and effector functions: insights from in vivo imaging studies. *Immunol Rev* 221, 107-129.
- Plotkin, J., Prockop, S. E., Lepique, A., and Petrie, H. T. (2003). Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J Immunol* 171, 4521-4527.
- Pollard, T. D., and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
- Pollard, T. D., and Cooper, J. A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326, 1208-1212.
- Ponti, A., Machacek, M., Gupton, S. L., Waterman-Storer, C. M., and Danuser, G. (2004). Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science* 305, 1782-1786.
- Poo, W. J., Conrad, L., and Janeway, C. A., Jr. (1988). Receptor-directed focusing of lymphokine release by helper T cells. *Nature* 332, 378-380.
- Porritt, H. E., Gordon, K., and Petrie, H. T. (2003). Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice. *J Exp Med* 198, 957-962.
- Porter, J. C., Bracke, M., Smith, A., Davies, D., and Hogg, N. (2002). Signaling through integrin LFA-1 leads to filamentous actin polymerization and remodeling, resulting in enhanced T cell adhesion. *J Immunol* 168, 6330-6335.

- Poznansky, M. C., Olszak, I. T., Evans, R. H., Wang, Z., Foxall, R. B., Olson, D. P., Weibrecht, K., Luster, A. D., and Scadden, D. T. (2002). Thymocyte emigration is mediated by active movement away from stroma-derived factors. *J Clin Invest* 109, 1101-1110.
- Prislovsky, A., Marathe, B., Hosni, A., Bolen, A. L., Nimmerjahn, F., Jackson, C. W., Weiman, D., and Strom, T. S. (2008). Rapid platelet turnover in WASP(-) mice correlates with increased ex vivo phagocytosis of opsonized WASP(-) platelets. *Exp Hematol* 36, 609-623.
- Pulecio, J., Tagliani, E., Scholer, A., Prete, F., Fetler, L., Burrone, O. R., and Benvenuti, F. (2008). Expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein in dendritic cells regulates synapse formation and activation of naive CD8+ T cells. *J Immunol* 181, 1135-1142.
- Qualmann, B., and Kessels, M. M. (2009). New players in actin polymerization--WH2-domain-containing actin nucleators. *Trends Cell Biol* 19, 276-285.
- Raab, M., Wang, H., Lu, Y., Smith, X., Wu, Z., Strebhardt, K., Ladbury, J. E., and Rudd, C. E. (2010). T cell receptor "inside-out" pathway via signaling module SKAP1-RapL regulates T cell motility and interactions in lymph nodes. *Immunity* 32, 541-556.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R., and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10, 547-558.
- Ramesh, N., Anton, I. M., Hartwig, J. H., and Geha, R. S. (1997). WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14671-14676.
- Randriamampita, C., Boulla, G., Revy, P., Lemaitre, F., and Trautmann, A. (2003). T cell adhesion lowers the threshold for antigen detection. *Eur J Immunol* 33, 1215-1223.
- Raulet, D. H., Garman, R. D., Saito, H., and Tonegawa, S. (1985). Developmental regulation of T-cell receptor gene expression. *Nature* 314, 103-107.
- Rawlings, S. L., Crooks, G. M., Bockstoe, D., Barsky, L. W., Parkman, R., and Weinberg, K. I. (1999). Spontaneous apoptosis in lymphocytes from patients with Wiskott-Aldrich syndrome: correlation of accelerated cell death and attenuated bcl-2 expression. *Blood* 94, 3872-3882.
- Real, E., Kaiser, A., Raposo, G., Amara, A., Nardin, A., Trautmann, A., and Donnadieu, E. (2004). Immature dendritic cells (DCs) use chemokines and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin, to stimulate CD4+ T cells in the absence of exogenous antigen. *J Immunol* 173, 50-60.
- Redmond, W. L., and Sherman, L. A. (2005). Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes. *Immunity* 22, 275-284.
- Reiss, Y., Proudfoot, A. E., Power, C. A., Campbell, J. J., and Butcher, E. C. (2001). CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med* 194, 1541-1547.
- Rengan, R., Ochs, H. D., Sweet, L. I., Keil, M. L., Gunning, W. T., Lachant, N. A., Boxer, L. A., and Omann, G. M. (2000). Actin cytoskeletal function is spared, but apoptosis is increased, in WAS patient hematopoietic cells. *Blood* 95, 1283-1292.
- Renkawitz, J., and Sixt, M. (2010). Mechanisms of force generation and force transmission during interstitial leukocyte migration. *EMBO Rep* 11, 744-750.
- Revy, P., Sospedra, M., Barbour, B., and Trautmann, A. (2001). Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 2, 925-931.
- Riedl, J., Crevenna, A. H., Kessenbrock, K., Yu, J. H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T. A., Werb, Z., *et al.* (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* 5, 605-607.

- Rivero-Lezcano, O. M., Marcilla, A., Sameshima, J. H., and Robbins, K. C. (1995). Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains. *Mol Cell Biol* 15, 5725-5731.
- Sage, P. T., and Carman, C. V. (2009). Settings and mechanisms for trans-cellular diapedesis. *Front Biosci* 14, 5066-5083.
- Sage, P. T., Varghese, L. M., Martinelli, R., Sciuto, T. E., Kamei, M., Dvorak, A. M., Springer, T. A., Sharpe, A. H., and Carman, C. V. (2012). Antigen recognition is facilitated by invadosome-like protrusions formed by memory/effector T cells. *J Immunol* 188, 3686-3699.
- Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H. J., and von Boehmer, H. (1994). Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* 266, 1208-1212.
- Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22, 531-562.
- Salas, A., Shimaoka, M., Phan, U., Kim, M., and Springer, T. A. (2006). Transition from rolling to firm adhesion can be mimicked by extension of integrin alphaLbeta2 in an intermediate affinity state. *J Biol Chem* 281, 10876-10882.
- Salmi, M., and Jalkanen, S. (2001). VAP-1: an adhesin and an enzyme. *Trends Immunol* 22, 211-216.
- Samstag, Y., Eibert, S. M., Klemke, M., and Wabnitz, G. H. (2003). Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J Leukoc Biol* 73, 30-48.
- Sanchez-Madrid, F., and del Pozo, M. A. (1999). Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo J* 18, 501-511.
- Sanos, S. L., Nowak, J., Fallet, M., and Bajenoff, M. (2011). Stromal cell networks regulate thymocyte migration and dendritic cell behavior in the thymus. *J Immunol* 186, 2835-2841.
- Sasahara, Y., Rachid, R., Byrne, M. J., de la Fuente, M. A., Abraham, R. T., Ramesh, N., and Geha, R. S. (2002). Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation. *Mol Cell* 10, 1269-1281.
- Scheinecker, C., McHugh, R., Shevach, E. M., and Germain, R. N. (2002). Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med* 196, 1079-1090.
- Schenkel, A. R., Mamdouh, Z., and Muller, W. A. (2004). Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol* 5, 393-400.
- Schmits, R., Kundig, T. M., Baker, D. M., Shumaker, G., Simard, J. J., Duncan, G., Wakeham, A., Shahinian, A., van der Heiden, A., Bachmann, M. F., *et al.* (1996). LFA-1-deficient mice show normal CTL responses to virus but fail to reject immunogenic tumor. *J Exp Med* 183, 1415-1426.
- Scholer, A., Hugues, S., Boissonnas, A., Fetler, L., and Amigorena, S. (2008). Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8+ T cell memory. *Immunity* 28, 258-270.
- Schuetz, C., Niehues, T., Friedrich, W., and Schwarz, K. (2010). Autoimmunity, autoinflammation and lymphoma in combined immunodeficiency (CID). *Autoimmun Rev* 9, 477-482.
- Schumann, K., Lammermann, T., Bruckner, M., Legler, D. F., Polleux, J., Spatz, J. P., Schuler, G., Forster, R., Lutz, M. B., Sorokin, L., and Sixt, M. (2010). Immobilized chemokine fields and soluble chemokine gradients cooperatively shape migration patterns of dendritic cells. *Immunity* 32, 703-713.
- Schurman, S. H., and Candotti, F. (2003). Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 15, 446-453.

Scimone, M. L., Aifantis, I., Apostolou, I., von Boehmer, H., and von Andrian, U. H. (2006). A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 7006-7011.

Scollay, R. G., Butcher, E. C., and Weissman, I. L. (1980). Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur J Immunol* *10*, 210-218.

Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M. F., and Ohashi, P. S. (1999). Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* *17*, 829-874.

Seminario, M. C., and Bunnell, S. C. (2008). Signal initiation in T-cell receptor microclusters. *Immunol Rev* *221*, 90-106.

Shakhar, G., Lindquist, R. L., Skokos, D., Dudziak, D., Huang, J. H., Nussenzweig, M. C., and Dustin, M. L. (2005). Stable T cell-dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity in vivo. *Nat Immunol* *6*, 707-714.

Shamri, R., Grabovsky, V., Gauguet, J. M., Feigelson, S., Manevich, E., Kolanus, W., Robinson, M. K., Staunton, D. E., von Andrian, U. H., and Alon, R. (2005). Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat Immunol* *6*, 497-506.

Shcherbina, A., Cooley, J., Lutskiy, M. I., Benarafa, C., Gilbert, G. E., and Remold-O'Donnell, E. (2010). WASP plays a novel role in regulating platelet responses dependent on alphaIIb beta3 integrin outside-in signalling. *Br J Haematol* *148*, 416-427.

Shcherbina, A., Rosen, F. S., and Remold-O'Donnell, E. (1999). Pathological events in platelets of Wiskott-Aldrich syndrome patients. *Br J Haematol* *106*, 875-883.

She, H. Y., Rockow, S., Tang, J., Nishimura, R., Skolnik, E. Y., Chen, M., Margolis, B., and Li, W. (1997). Wiskott-Aldrich syndrome protein is associated with the adapter protein Grb2 and the epidermal growth factor receptor in living cells. *Mol Biol Cell* *8*, 1709-1721.

Shiao, S. L., Kirkiles-Smith, N. C., Shepherd, B. R., McNiff, J. M., Carr, E. J., and Pober, J. S. (2007). Human effector memory CD4+ T cells directly recognize allogeneic endothelial cells in vitro and in vivo. *J Immunol* *179*, 4397-4404.

Shimonaka, M., Katagiri, K., Nakayama, T., Fujita, N., Tsuruo, T., Yoshie, O., and Kinashi, T. (2003). Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J Cell Biol* *161*, 417-427.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M., and et al. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* *68*, 855-867.

Shiow, L. R., Paris, K., Akana, M. C., Cyster, J. G., Sorensen, R. U., and Puck, J. M. (2009). Severe combined immunodeficiency (SCID) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) associated with a Coronin-1A mutation and a chromosome 16p11.2 deletion. *Clin Immunol* *131*, 24-30.

Shiow, L. R., Roadcap, D. W., Paris, K., Watson, S. R., Grigorova, I. L., Lebet, T., An, J., Xu, Y., Jenne, C. N., Foger, N., et al. (2008). The actin regulator coronin 1A is mutant in a thymic egress-deficient mouse strain and in a patient with severe combined immunodeficiency. *Nat Immunol* *9*, 1307-1315.

Shulman, Z., Cohen, S. J., Roediger, B., Kalchenko, V., Jain, R., Grabovsky, V., Klein, E., Shinder, V., Stoler-Barak, L., Feigelson, S. W., et al. (2012). Transendothelial migration of lymphocytes mediated by intraendothelial vesicle stores rather than by extracellular chemokine depots. *Nat Immunol* *13*, 67-76.

Shulman, Z., Shinder, V., Klein, E., Grabovsky, V., Yeger, O., Geron, E., Montresor, A., Bolomini-Vittori, M., Feigelson, S. W., Kirchhausen, T., et al. (2009). Lymphocyte crawling and transendothelial migration require chemokine triggering of high-affinity LFA-1 integrin. *Immunity* *30*, 384-396.

Sigmundsdottir, H., and Butcher, E. C. (2008). Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. *Nat Immunol* 9, 981-987.

Silvin, C., Belisle, B., and Abo, A. (2001). A role for Wiskott-Aldrich syndrome protein in T-cell receptor-mediated transcriptional activation independent of actin polymerization. *J Biol Chem* 276, 21450-21457.

Sims, T. N., Soos, T. J., Xenias, H. S., Dubin-Thaler, B., Hofman, J. M., Waite, J. C., Cameron, T. O., Thomas, V. K., Varma, R., Wiggins, C. H., *et al.* (2007). Opposing effects of PKC θ and WASp on symmetry breaking and relocation of the immunological synapse. *Cell* 129, 773-785.

Singer, A., Adoro, S., and Park, J. H. (2008). Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol* 8, 788-801.

Singer, A., and Bosselut, R. (2004). CD4/CD8 coreceptors in thymocyte development, selection, and lineage commitment: analysis of the CD4/CD8 lineage decision. *Adv Immunol* 83, 91-131.

Sixt, M., Engelhardt, B., Pausch, F., Hallmann, R., Wendler, O., and Sorokin, L. M. (2001). Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Cell Biol* 153, 933-946.

Sixt, M., Kanazawa, N., Selg, M., Samson, T., Roos, G., Reinhardt, D. P., Pabst, R., Lutz, M. B., and Sorokin, L. (2005). The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity* 22, 19-29.

Skokos, D., Shakhar, G., Varma, R., Waite, J. C., Cameron, T. O., Lindquist, R. L., Schwickert, T., Nussenzweig, M. C., and Dustin, M. L. (2007). Peptide-MHC potency governs dynamic interactions between T cells and dendritic cells in lymph nodes. *Nat Immunol* 8, 835-844.

Smith, A., Bracke, M., Leitinger, B., Porter, J. C., and Hogg, N. (2003). LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment. *J Cell Sci* 116, 3123-3133.

Smith, A., Carrasco, Y. R., Stanley, P., Kieffer, N., Batista, F. D., and Hogg, N. (2005). A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. *J Cell Biol* 170, 141-151.

Snapper, S. B., Meelu, P., Nguyen, D., Stockton, B. M., Bozza, P., Alt, F. W., Rosen, F. S., von Andrian, U. H., and Klein, C. (2005). WASP deficiency leads to global defects of directed leukocyte migration in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* 77, 993-998.

Spangrude, G. J., Braaten, B. A., and Daynes, R. A. (1984). Molecular mechanisms of lymphocyte extravasation. I. Studies of two selective inhibitors of lymphocyte recirculation. *J Immunol* 132, 354-362.

Springer, T. A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425-434.

Stabile, H., Carlino, C., Mazza, C., Giliani, S., Morrone, S., Notarangelo, L. D., Notarangelo, L. D., Santoni, A., and Gismondi, A. (2010). Impaired NK-cell migration in WAS/XLT patients: role of Cdc42/WASp pathway in the control of chemokine-induced beta2 integrin high-affinity state. *Blood* 115, 2818-2826.

Stanley, P., Smith, A., McDowall, A., Nicol, A., Zicha, D., and Hogg, N. (2008). Intermediate-affinity LFA-1 binds alpha-actinin-1 to control migration at the leading edge of the T cell. *Embo J* 27, 62-75.

Starnes, T. W., Cortesio, C. L., and Huttenlocher, A. (2011). Imaging podosome dynamics and matrix degradation. *Methods Mol Biol* 769, 111-136.

Stefanova, I., Dorfman, J. R., and Germain, R. N. (2002). Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature* 420, 429-434.

- Stefanova, I., Dorfman, J. R., Tsukamoto, M., and Germain, R. N. (2003). On the role of self-recognition in T cell responses to foreign antigen. *Immunol Rev* *191*, 97-106.
- Stein, J. V., Rot, A., Luo, Y., Narasimhaswamy, M., Nakano, H., Gunn, M. D., Matsuzawa, A., Quackenbush, E. J., Dorf, M. E., and von Andrian, U. H. (2000). The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6Ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules. *J Exp Med* *191*, 61-76.
- Steinman, R. M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M. C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* *21*, 685-711.
- Stewart, D. M., Candotti, F., and Nelson, D. L. (2007). The phenomenon of spontaneous genetic reversions in the Wiskott-Aldrich syndrome: a report of the workshop of the ESID Genetics Working Party at the XIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Budapest, Hungary October 4-7, 2006. *J Clin Immunol* *27*, 634-639.
- Stinchcombe, J. C., and Griffiths, G. M. (2003). The role of the secretory immunological synapse in killing by CD8+ CTL. *Semin Immunol* *15*, 301-305.
- Stockton, B. M., Cheng, G., Manjunath, N., Ardman, B., and von Andrian, U. H. (1998). Negative regulation of T cell homing by CD43. *Immunity* *8*, 373-381.
- Stoll, S., Delon, J., Brotz, T. M., and Germain, R. N. (2002). Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* *296*, 1873-1876.
- Stoop, R., Gal, I., Glant, T. T., McNeish, J. D., and Mikecz, K. (2002). Trafficking of CD44-deficient murine lymphocytes under normal and inflammatory conditions. *Eur J Immunol* *32*, 2532-2542.
- Storim, J., Brocker, E. B., and Friedl, P. (2010). A dynamic immunological synapse mediates homeostatic TCR-dependent and -independent signaling. *Eur J Immunol* *40*, 2741-2750.
- Stray-Pedersen, A., Abrahamsen, T. G., and Froland, S. S. (2000). Primary immunodeficiency diseases in Norway. *J Clin Immunol* *20*, 477-485.
- Su, H. C., Jing, H., and Zhang, Q. (2011). DOCK8 deficiency. *Ann N Y Acad Sci* *1246*, 26-33.
- Sullivan, K. E., Mullen, C. A., Blaese, R. M., and Winkelstein, J. A. (1994). A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Pediatr* *125*, 876-885.
- Suzuki, J., Yamasaki, S., Wu, J., Koretzky, G. A., and Saito, T. (2007). The actin cloud induced by LFA-1-mediated outside-in signals lowers the threshold for T-cell activation. *Blood* *109*, 168-175.
- Symons, M., Derry, J. M., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U., and Abo, A. (1996). Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* *84*, 723-734.
- Syrgios, K. N., Makrilia, N., Neidhart, J., Moutsos, M., Tsimpoukis, S., Kiagia, M., and Saif, M. W. (2011). Prolonged survival after splenectomy in Wiskott-Aldrich syndrome: a case report. *Ital J Pediatr* *37*, 42.
- Taylor, M. D., Sadhukhan, S., Kottangada, P., Ramgopal, A., Sarkar, K., D'Silva, S., Selvakumar, A., Candotti, F., and Vyas, Y. M. (2010). Nuclear role of WASp in the pathogenesis of dysregulated TH1 immunity in human Wiskott-Aldrich syndrome. *Sci Transl Med* *2*, 37ra44.
- Theriot, J. A., and Mitchison, T. J. (1991). Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature* *352*, 126-131.
- Thrasher, A. J., and Burns, S. O. (2010). WASP: a key immunological multitasker. *Nat Rev Immunol* *10*, 182-192.

- Tomasevic, N., Jia, Z., Russell, A., Fujii, T., Hartman, J. J., Clancy, S., Wang, M., Beraud, C., Wood, K. W., and Sakowicz, R. (2007). Differential regulation of WASP and N-WASP by Cdc42, Rac1, Nck, and PI(4,5)P2. *Biochemistry* *46*, 3494-3502.
- Tooley, A. J., Gilden, J., Jacobelli, J., Beemiller, P., Trimble, W. S., Kinoshita, M., and Krummel, M. F. (2009). Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility. *Nat Cell Biol* *11*, 17-26.
- Trautmann, A., and Valitutti, S. (2003). The diversity of immunological synapses. *Curr Opin Immunol* *15*, 249-254.
- Trifari, S., Scaramuzza, S., Catucci, M., Ponzoni, M., Mollica, L., Chiesa, R., Cattaneo, F., Lafouresse, F., Calvez, R., Vermi, W., *et al.* (2010). Revertant T lymphocytes in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome: analysis of function and distribution in lymphoid organs. *J Allergy Clin Immunol* *125*, 439-448 e438.
- Trifari, S., Sitia, G., Aiuti, A., Scaramuzza, S., Marangoni, F., Guidotti, L. G., Martino, S., Saracco, P., Notarangelo, L. D., Roncarolo, M. G., and Dupre, L. (2006). Defective Th1 cytokine gene transcription in CD4+ and CD8+ T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients. *J Immunol* *177*, 7451-7461.
- Tskvitaria-Fuller, I., Rozelle, A. L., Yin, H. L., and Wulfing, C. (2003). Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization. *J Immunol* *171*, 2287-2295.
- Tsuboi, S., and Meerloo, J. (2007). Wiskott-Aldrich syndrome protein is a key regulator of the phagocytic cup formation in macrophages. *J Biol Chem* *282*, 34194-34203.
- Uchiyama, T., Adriani, M., Jagadeesh, G. J., Paine, A., and Candotti, F. (2012). Foamy Virus Vector-mediated Gene Correction of a Mouse Model of Wiskott-Aldrich Syndrome. *Mol Ther* *20*, 1270-1279.
- Usui, T., Murai, T., Tanaka, T., Yamaguchi, K., Nagakubo, D., Lee, C. M., Kiyomi, M., Tamura, S., Matsuzawa, Y., and Miyasaka, M. (2002). Characterization of mac25/angiomodulin expression by high endothelial venule cells in lymphoid tissues and its identification as an inducible marker for activated endothelial cells. *Int Immunol* *14*, 1273-1282.
- Valitutti, S., Dessing, M., Aktories, K., Gallati, H., and Lanzavecchia, A. (1995a). Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J Exp Med* *181*, 577-584.
- Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E., and Lanzavecchia, A. (1995b). Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* *375*, 148-151.
- van der Merwe, P. A. (2000). Modeling costimulation. *Nat Immunol* *1*, 194-195.
- Van Goethem, E., Poincloux, R., Gauffre, F., Maridonneau-Parini, I., and Le Cabec, V. (2010). Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J Immunol* *184*, 1049-1061.
- van Meerwijk, J. P., Marguerat, S., Lees, R. K., Germain, R. N., Fowlkes, B. J., and MacDonald, H. R. (1997). Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. *J Exp Med* *185*, 377-383.
- Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T., and Dustin, M. L. (2006). T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity* *25*, 117-127.
- Verschueren, H., van der Taelen, I., Dewit, J., De Braekeleer, J., De Baetselier, P., Aktories, K., and Just, I. (1995). Effects of Clostridium botulinum C2 toxin and cytochalasin D on in vitro invasiveness, motility and F-actin content of a murine T-lymphoma cell line. *Eur J Cell Biol* *66*, 335-341.

- Volkov, Y., Long, A., and Kelleher, D. (1998). Inside the crawling T cell: leukocyte function-associated antigen-1 cross-linking is associated with microtubule-directed translocation of protein kinase C isoenzymes beta(I) and delta. *J Immunol* *161*, 6487-6495.
- von Andrian, U. H., and Mempel, T. R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* *3*, 867-878.
- von Boehmer, H. (2005). Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate. *Nat Rev Immunol* *5*, 571-577.
- Wada, T., Schurman, S. H., Garabedian, E. K., Yachie, A., and Candotti, F. (2005). Analysis of T-cell repertoire diversity in Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* *106*, 3895-3897.
- Wada, T., Schurman, S. H., Jagadeesh, G. J., Garabedian, E. K., Nelson, D. L., and Candotti, F. (2004). Multiple patients with revertant mosaicism in a single Wiskott-Aldrich syndrome family. *Blood* *104*, 1270-1272.
- Wagner, N., Lohler, J., Kunkel, E. J., Ley, K., Leung, E., Krissansen, G., Rajewsky, K., and Muller, W. (1996). Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature* *382*, 366-370.
- Walker, L. S., and Abbas, A. K. (2002). The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* *2*, 11-19.
- Wang, S., Voisin, M. B., Larbi, K. Y., Dangerfield, J., Scheiermann, C., Tran, M., Maxwell, P. H., Sorokin, L., and Nourshargh, S. (2006). Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *J Exp Med* *203*, 1519-1532.
- Wang, Y. J., Li, W. H., Wang, J., Xu, K., Dong, P., Luo, X., and Yin, H. L. (2004). Critical role of PIP5KI{gamma}87 in InsP3-mediated Ca(2+) signaling. *J Cell Biol* *167*, 1005-1010.
- Watanabe, N., Wang, Y. H., Lee, H. K., Ito, T., Wang, Y. H., Cao, W., and Liu, Y. J. (2005). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* *436*, 1181-1185.
- Wei, S. H., Safrina, O., Yu, Y., Garrod, K. R., Cahalan, M. D., and Parker, I. (2007). Ca2+ signals in CD4+ T cells during early contacts with antigen-bearing dendritic cells in lymph node. *J Immunol* *179*, 1586-1594.
- Welch, M. D., and Mullins, R. D. (2002). Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol* *18*, 247-288.
- Westerberg, L., Greicius, G., Snapper, S. B., Aspenstrom, P., and Severinson, E. (2001). Cdc42, Rac1, and the Wiskott-Aldrich syndrome protein are involved in the cytoskeletal regulation of B lymphocytes. *Blood* *98*, 1086-1094.
- Westerberg, L., Larsson, M., Hardy, S. J., Fernandez, C., Thrasher, A. J., and Severinson, E. (2005). Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency leads to reduced B-cell adhesion, migration, and homing, and a delayed humoral immune response. *Blood* *105*, 1144-1152.
- Westerberg, L. S., Meelu, P., Baptista, M., Eston, M. A., Adamovich, D. A., Cotta-de-Almeida, V., Seed, B., Rosen, M. K., Vandenberghe, P., Thrasher, A. J., *et al.* (2010). Activating WASP mutations associated with X-linked neutropenia result in enhanced actin polymerization, altered cytoskeletal responses, and genomic instability in lymphocytes. *J Exp Med* *207*, 1145-1152.
- Wilson, N. S., El-Sukkari, D., Belz, G. T., Smith, C. M., Steptoe, R. J., Heath, W. R., Shortman, K., and Villadangos, J. A. (2003). Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* *102*, 2187-2194.
- Wiskott A. Familiärer, angeborener Morbus Werlhofii *Monatsschr Kinderheilkd* *1937*;68:212-216

- Witt, C. M., Raychaudhuri, S., Schaefer, B., Chakraborty, A. K., and Robey, E. A. (2005). Directed migration of positively selected thymocytes visualized in real time. *PLoS Biol* 3, e160.
- Wolf, K., Muller, R., Borgmann, S., Brocker, E. B., and Friedl, P. (2003). Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases. *Blood* 102, 3262-3269.
- Woolf, E., Grigorova, I., Sagiv, A., Grabovsky, V., Feigelson, S. W., Shulman, Z., Hartmann, T., Sixt, M., Cyster, J. G., and Alon, R. (2007). Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces. *Nat Immunol* 8, 1076-1085.
- Worbs, T., Mempel, T. R., Bolter, J., von Andrian, U. H., and Forster, R. (2007). CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 204, 489-495.
- Wulfing, C., and Davis, M. M. (1998). A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* 282, 2266-2269.
- Yamazaki, S., Iyoda, T., Tarbell, K., Olson, K., Velinzon, K., Inaba, K., and Steinman, R. M. (2003). Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 198, 235-247.
- Yokosuka, T., and Saito, T. (2009). Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. *Immunol Rev* 229, 27-40.
- Yokosuka, T., Sakata-Sogawa, K., Kobayashi, W., Hiroshima, M., Hashimoto-Tane, A., Tokunaga, M., Dustin, M. L., and Saito, T. (2005). Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nat Immunol* 6, 1253-1262.
- Zachariah, M. A., and Cyster, J. G. (2010). Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction. *Science* 328, 1129-1135.
- Zeng, R., Cannon, J. L., Abraham, R. T., Way, M., Billadeau, D. D., Bubeck-Wardenberg, J., and Burkhardt, J. K. (2003). SLP-76 coordinates Nck-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein recruitment with Vav-1/Cdc42-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein activation at the T cell-APC contact site. *J Immunol* 171, 1360-1368.
- Zhang, H., Schaff, U. Y., Green, C. E., Chen, H., Sarantos, M. R., Hu, Y., Wara, D., Simon, S. I., and Lowell, C. A. (2006). Impaired integrin-dependent function in Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient murine and human neutrophils. *Immunity* 25, 285-295.
- Zhang, J., Shehabeldin, A., da Cruz, L. A., Butler, J., Somani, A. K., McGavin, M., Kozieradzki, I., dos Santos, A. O., Nagy, A., Grinstein, S., *et al.* (1999). Antigen receptor-induced activation and cytoskeletal rearrangement are impaired in Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient lymphocytes. *J Exp Med* 190, 1329-1342.
- Zhang, Z. Y., Xiao, H. Q., Jiang, L. P., Zhou, Y., Zhao, Q., Yu, J., Liu, W., Yang, X. Q., and Zhao, X. D. (2010). Analysis of clinical and molecular characteristics of Wiskott-Aldrich syndrome in 24 patients from 23 unrelated Chinese families. *Pediatr Allergy Immunol* 21, 522-532.
- Zhu, Q., Watanabe, C., Liu, T., Hollenbaugh, D., Blaese, R. M., Kanner, S. B., Aruffo, A., and Ochs, H. D. (1997). Wiskott-Aldrich syndrome/X-linked thrombocytopenia: WASP gene mutations, protein expression, and phenotype. *Blood* 90, 2680-2689.
- Zhu, Q., Zhang, M., Blaese, R. M., Derry, J. M., Junker, A., Francke, U., Chen, S. H., and Ochs, H. D. (1995). The Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked congenital thrombocytopenia are caused by mutations of the same gene. *Blood* 86, 3797-3804.
- Zicha, D., Allen, W. E., Brickell, P. M., Kinnon, C., Dunn, G. A., Jones, G. E., and Thrasher, A. J. (1998). Chemotaxis of macrophages is abolished in the Wiskott-Aldrich syndrome. *Br J Haematol* 101, 659-665.

Bibliographie

Zuchero, J. B., Coutts, A. S., Quinlan, M. E., Thangue, N. B., and Mullins, R. D. (2009). p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nat Cell Biol* *11*, 451-459.

Mots-clés :

- 1- Syndrome de Wiskott-Aldrich
- 2- Migration
- 3- Interactions cellulaires
- 4- Synapse immunologique
- 5- Adhésion
- 6- Chimiotactisme
- 7- Lymphocytes T CD4+

RESUME

Les lymphocytes T CD4⁺ sont des acteurs clés dans l'orchestration d'une réponse immunitaire dirigée spécifiquement contre un pathogène. L'efficacité de la réponse immunitaire dépend de la génération de lymphocytes T CD4⁺, de l'acquisition de leurs fonctions effectrices et de l'exercice de ces dernières. Ces différentes étapes se déroulent successivement dans différents sites spécialisés de l'organisme. Ceci impose aux lymphocytes T CD4⁺ une grande mobilité ainsi que l'établissement de contacts privilégiés avec les cellules présentatrices de l'antigène, responsables de leur différenciation et de leur activation. La mobilité ainsi que les interactions cellulaires des lymphocytes T CD4⁺ requièrent une réorganisation continue de leur cytosquelette d'actine. Un des régulateurs majeurs du cytosquelette d'actine des lymphocytes T est la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) dont la déficience provoque le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), une immunodéficiência primaire sévère. Le dysfonctionnement des lymphocytes T est généralement considéré comme la cause majeure du dérèglement du système immunitaire observé chez les patients WAS.

Mes travaux de thèse ont consisté à étudier l'implication de WASP dans la mobilité des lymphocytes T CD4⁺ humains, au cours des phases de migration et de rencontre avec les cellules présentatrices de l'antigène dans les contextes d'interaction non spécifique (antigènes du soi) et spécifique de l'antigène (antigènes exogènes).

Nous avons tout d'abord montré que WASP n'est pas requis pour la migration dirigée par les chimiokines des lymphocytes T CD4⁺ *in vitro*. Ensuite, nous nous sommes intéressés au rôle de WASP dans l'interaction des lymphocytes T CD4⁺ avec des cellules présentatrices de l'antigène présentant des antigènes du soi. Dans cette situation, il a été précédemment décrit que les cellules présentatrices de l'antigène induisaient la mobilité des lymphocytes T et participaient au maintien de l'homéostasie lymphocytaire. De façon surprenante, nous avons observé que l'absence de WASP conduisait à une mobilité anormalement élevée des lymphocytes T CD4⁺ au contact des cellules présentatrices de l'antigène. Nous avons ensuite montré que cet excès de mobilité était lié à une adhésion LFA-1/ICAM-1 anormalement régulée. En conséquence de cet excès de mobilité, nous avons également observé un maintien favorisé de la survie homéostatique lymphocytaire. Enfin, nous avons poursuivi cette étude dans un contexte d'interaction avec des cellules présentatrices de l'antigène présentant des antigènes exogènes. Dans cette situation, il est connu que l'engagement du TCR avec les antigènes exogènes induit un arrêt de mobilité des lymphocytes T. Nous avons observé qu'en absence de WASP, les lymphocytes T CD4⁺ présentaient des défauts d'arrêt de migration sur les cellules présentatrices de l'antigène. Nous avons aussi montré un défaut d'organisation moléculaire de la synapse immunologique, formée entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice de l'antigène. En conséquence de cette mauvaise organisation, des défauts de prolifération et de production de cytokines des lymphocytes T ont été révélés.

Finalement, nos résultats indiquent que WASP agirait comme un frein sur la mobilité des lymphocytes T CD4⁺ au contact des cellules présentatrices de l'antigène pour permettre une interaction cellulaire optimale dans le contexte de la rencontre avec le soi et le non-soi. Nous proposons que ces défauts soient en partie responsables des symptômes auto-immuns et de l'immunodéficiência observés chez les patients WAS.

ABSTRACT

CD4⁺ T cells orchestrate immune response directed specifically against pathogens. Immune response efficiency depends on the maturation of CD4⁺ T lymphocytes and on their ability to exert effectors functions. These steps occur successively in different sites of the organism in which T cells will interact with multiple antigen presenting cells. Tissue homing and antigen presenting cell scanning require a very high and regulated migratory capacity. This is in part controlled by actin cytoskeleton reorganization. A key regulator of actin cytoskeleton in T lymphocyte is the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) which deficiency in humans causes the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS), a severe primary immunodeficiency. T cell dysfunction is contributing to the immune system dysregulation observed in WAS patients.

My thesis research consisted in studying the role of WASP in human CD4⁺ T lymphocyte motility, in real time, during their migration phases and during antigen presenting cell encounter in the context of both non specific (self antigens) and specific interactions (exogenous antigens).

First, we demonstrated that WASP is not required for CD4⁺ T lymphocyte chemotaxis *in vitro*. Then, we investigated the role of WASP in CD4⁺ T lymphocyte interaction with antigen presenting cells presenting self-antigens. In this context, it was previously described that antigen-presenting cells drive T cell motility and maintain T cell homeostasis. Surprisingly, we observed that the absence of WASP lead to an abnormally high CD4⁺ T cell motility at the contact with antigen presenting cells. Then, we showed that this increased motility is linked to an abnormal regulation of LFA-1/ICAM-1 adhesion. Consequently of this exacerbated motility, we also observed that T cell homeostatic survival is favored. Finally, we pursued our study in the context of exogenous antigen encounter. In this condition, it is known that TCR engagement with exogenous antigens drive T cell migration arrest. We observed that in the absence of WASP, CD4⁺ T lymphocytes are unable to stop efficiently at the contact with antigen presenting cells. We also demonstrated that signaling molecules at the immunological synapse established between T lymphocytes and antigen presenting cells are dispersed in the absence of WASP. Consequently to this defective organization, we showed that CD4⁺ T cell proliferation and cytokine production are impaired.

All together, our results indicate that WASP acts as a brake on CD4⁺ T cell motility at the contact with antigen presenting cells permitting optimal cellular interaction in the context of self and non-self encounter. We hypothesized that these defects could be in part responsible for the autoimmune development and immunodeficiency observed in WAS patients.