

## Thèse de Doctorat

Cassie-Marie PEIGNÉ

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie-Santé

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Immunologie

Unité de recherche : Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers  
Inserm U892 / CNRS 6299

Soutenue le 24 février 2016

## Modalités fines d'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 humains : mécanismes de détection du stress cellulaire et implication de la butyrophiline BTN3A/CD277

### JURY

|                      |                                                                                                                             |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Rapporteurs :        | Daniel OLIVE, PU-PH, Université Aix-Marseille<br>Virginie LAFONT, CR1, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier |
| Examineurs :         | Bruno MARTIN, CR1, Institut Cochin, Paris<br>Richard BREATHNACH, PU, Université de Nantes                                   |
| Directeur de Thèse : | Emmanuel SCOTET, DR, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers                                                      |

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Emmanuel Scotet d'avoir accepté de diriger ma thèse. Merci de m'avoir encadrée et conseillée durant ces cinq dernières années même quand les résultats n'étaient pas toujours au beau fixe.

Merci à Daniel Olive et Virginie Lafont d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et également à Bruno Martin d'avoir accepté d'être examinateur de ces travaux.

Un grand merci à la team BTN3, Alexandra, Marie-Claude, Richard et Fabienne, sans qui le projet ne serait pas là où il en est. Merci encore à Richard d'avoir aussi accepté d'être l'examineur de ma thèse et d'avoir pris le temps de répondre à mes questions quand j'en avais besoin. Merci aussi pour tes blagues, ça m'a donné matière à réflexion. Merci aussi à Marie-Claude pour son oreille attentive et ses chocolats de la saint Nicolas.

Merci au reste de l'équipe γδ, et en particulier Ulrich et Lucile. Sans vous et votre ami Michel, on s'amuserait quand même beaucoup moins et je ne sais pas de quoi on parlerait à table. Merci de m'avoir écoutée et conseillée pendant ces deux dernières années. Vous avez rendu les journées beaucoup plus drôles. Merci aussi à Noémie et Cynthia pour l'aide que vous apportez sur ces projets.

Merci à Lola pour m'avoir aidée sur la fin. Bon courage pour prendre la relève de ce projet aussi compliqué qu'intéressant. Je suis sûre que ton cauchemar ne se réalisera pas et que tu vas gérer comme une chef. Une fois débarrassée de moi, la chance devrait te sourire à nouveau.

Merci aux autres membres de l'équipe 1 qui ne font pas partie du monde merveilleux des γδ. Merci Laëtitia pour ton aide précieuse, que ce soit pour la thèse ou pour l'enseignement, ça m'a vraiment permis d'avancer. Merci à Mélinda pour sa bonne humeur, on devrait l'avoir notre diplôme gommette. Merci à Marie-Claire pour ses anecdotes qui n'arrivent qu'à elle et pour toutes nos discussions voyage. Merci à Xavier pour son aide (en particulier avec le poste d'ATER). Merci à Jocelyn (alias DJ Jojo) d'être là pour mettre l'ambiance et de nous tenir au courant des « derniers » potins. Merci à Henri de s'être souvenu de mon nom. Merci Jeanne d'être toujours partante pour les coups fourrés. Merci aussi à Béa et à Régine pour leur aide technique. Merci à tous les membres de cette équipe qui la rendent vraiment très agréable et vivante.

Merci Steven pour tes conseils, pour m'avoir fait découvrir ce projet et la microscopie. Je te laisse avec cette phrase qui résume une grande partie de nos conversations et que tu tenais à ce que je cite : « Synthétiser de la merde, c'est pas facile ».

Un grand merci à tous les membres du club des thésards anonymes pas si anonymes que ça. Nos réunions vont me manquer. Merci à Leslie d'avoir été ma co-thésarde, c'était plus facile de faire les choses ensemble. Sans ta grande expérience du monitorat pour m'aider, j'aurais vraiment eu du mal. Sans toi ça aurait été moins drôle au sein de « l'équipe 1 ». Merci à Charlotte (et aussi Kevin) d'avoir été là à tous les moments (les bons et les mauvais). Vous êtes encore mieux qu'une hotline et un coach sportif réunis ensemble. Merci à Kristell et Romain pour les soirées n'importe quoi que vous seuls savez faire. Même si vous ne connaissez rien à l'immunologie, je vous aime bien quand même. Merci PJG de m'avoir soutenue moralement pendant l'écriture de cette thèse avec tes GIFs de motivation. Que serais-je devenue sans tous ces lolcats... Merci à Maëva et Carole pour leur gentillesse quotidienne. Merci aussi aux autres membres (Marie, Sophie, Jessie,...) de ce club presque exclusivement féminin (désolé Romain).

Merci aussi à mes amis non doctorants qui ont su être là, même si ils ne comprenaient pas tout ce qu'il se passait. Merci à Soojin d'avoir cru en moi, même si tu devrais croire plus en toi. 고마워 친구야 ! 난 박사 되었다 !! 근대 곧 백수 될거야~~ (그래서 난 천재 아닌데). Merci aussi à Rym pour ces conseils et ces suggestions bien pensés visant toujours pile où il faut. Il faudrait qu'on collabore un de ces jours. Merci aussi à Nolwenn, Charline, Fleur et Yating pour vos encouragements.

Un énorme merci à mes parents pour m'avoir soutenue tout au long de cette thèse et en particulier pendant la rédaction, même lorsqu'elle a failli faire brûler la maison. C'était une étape difficile et sans vous je n'y serais pas arrivée. Merci au reste de la famille pour vos messages réguliers provenant des quatre coins de la France. Merci aussi Louise, Marine et Hugo, ça me fait tellement plaisir que vous soyez là.

# Sommaire

---

|                                                                                                                                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I. Table des illustrations</b>                                                                                                                               | <b>3</b>  |
| <b>II. Liste des abréviations</b>                                                                                                                               | <b>4</b>  |
| <b>III. Introduction</b>                                                                                                                                        | <b>6</b>  |
| <b>A. Les lymphocytes T <math>\gamma\delta</math></b>                                                                                                           | <b>7</b>  |
| 1. Introduction                                                                                                                                                 | 7         |
| 2. Positionnement des LT $\gamma\delta$ dans le système immunitaire                                                                                             | 7         |
| 3. Le TCR $\gamma\delta$                                                                                                                                        | 9         |
| 4. Développement thymique des LT $\gamma\delta$                                                                                                                 | 10        |
| 5. Rôle des LT $\gamma\delta$                                                                                                                                   | 14        |
| 6. Modalités d'activation antigénique des LT $\gamma\delta$                                                                                                     | 19        |
| <b>B. Modalités d'activation des LT V<math>\gamma</math>9V<math>\delta</math>2</b>                                                                              | <b>26</b> |
| 1. Généralités                                                                                                                                                  | 26        |
| 2. Fonctions des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2                                                                                                                    | 27        |
| 3. Régulation du signal : co-récepteurs/molécules d'adhésion                                                                                                    | 35        |
| 4. L'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 : rôle des PAg                                                                                      | 37        |
| <b>C. Rôle de la butyrophiline BTN3A1 dans l'activation antigénique des LT V<math>\gamma</math>9V<math>\delta</math>2</b>                                       | <b>48</b> |
| 1. Généralités sur les BTN3A                                                                                                                                    | 48        |
| 2. Structure des protéines BTN3A                                                                                                                                | 52        |
| 3. Rôle de l'isoforme BTN3A1 dans l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2                                                                                  | 57        |
| 4. Modalités de l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 induite par les PAg et médiée par la protéine BTN3A1 et introduction du sujet de thèse | 66        |
| <b>IV. Résultats</b>                                                                                                                                            | <b>69</b> |
| <b>A. Question I : les PAg interagissent-ils directement avec la protéine BTN3A1 ?</b>                                                                          | <b>70</b> |
| 1. Introduction                                                                                                                                                 | 70        |
| 2. Résultats                                                                                                                                                    | 70        |
| 3. Discussion                                                                                                                                                   | 93        |
| <b>B. Question II : quelles sont les protéines partenaires recrutées par BTN3A1 lors de l'activation des LT V<math>\gamma</math>9V<math>\delta</math>2 ?</b>    | <b>98</b> |
| 1. Introduction                                                                                                                                                 | 98        |
| 2. Résultats                                                                                                                                                    | 99        |
| 3. Discussion                                                                                                                                                   | 105       |

|                                                                                                                                                                                                                  |                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| <b>C. Question III : quels sont les rôles joués par chacun des domaines de la protéine BTN3A1 en lien avec l'activation antigénique des LT V<math>\gamma</math>9V<math>\delta</math>2 induite par les PAgS ?</b> | <b>108</b>        |
| 1. Introduction                                                                                                                                                                                                  | 108               |
| 2. Résultats                                                                                                                                                                                                     | 109               |
| 3. Discussion                                                                                                                                                                                                    | 132               |
| <b><u>V. Discussion</u></b>                                                                                                                                                                                      | <b><u>134</u></b> |
| <b><u>VI. Annexes</u></b>                                                                                                                                                                                        | <b><u>142</u></b> |
| <b><u>VII. Bibliographie</u></b>                                                                                                                                                                                 | <b><u>220</u></b> |

# I. Table des illustrations

**Figure 1 :** Les LT  $\gamma\delta$  se situent à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

**Figure 2 :** Génération programmée au cours du développement thymique des LT  $\gamma\delta$  murins.

**Figure 3 :** Modèle où la force du signal TCR détermine l'engagement dans la lignée  $\alpha\beta$  ou la lignée  $\gamma\delta$ , et la différenciation des fonctions effectrices lors du développement thymique.

**Figure 4 :** Développement programmé des LT  $\gamma\delta$  chez l'Homme.

**Figure 5 :** Fonctions effectrices majeures des LT  $\gamma\delta$ .

**Figure 6 :** Structure tridimensionnelle du TCR  $\gamma\delta$ .

**Figure 7 :** Distributions des différentes longueurs de CDR3 dans les chaînes de récepteurs spécifiques d'antigènes.

**Figure 8 :** Modulation de l'activation des LT  $\gamma\delta$  via le TCR et/ou ses co-récepteurs.

**Figure 9 :** Modalités de reconnaissance des antigènes du Soi par les LT  $\gamma\delta$ .

**Figure 10 :** Recombinaison et épissage de l'ARN générant la chaîne de TCR Vgamma9-JP-C1.

**Figure 11 :** Synapses immunitaire et lytique formées par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

**Figure 12 :** Synthèse des isoprénoïdes chez la bactérie et l'humain.

**Figure 13 :** Exemples de phosphoantigènes caractérisés, induisant l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

**Figure 14 :** Structure des aminobisphosphonates.

**Figure 15 :** Surface de reconnaissance antigénique du TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 du clone T G115.

**Figure 16 :** Comparaison structurelle des superfamilles B7 et Butyrophiline.

**Figure 17 :** Organisation des domaines des protéines BTN3A.

**Figure 18 :** Distribution et classification par famille des protéines contenant un domaine SP1a/Ryanodine receptor (SPRY)/B20.2.

**Figure 19 :** Rôle clé joué par la molécule BTN3A1 dans l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 médiée par les PAGs.

**Figure 20 :** Représentation schématique de l'organisation de la partie extracellulaire des BTN3A.

**Figure 21 :** Modèle de la régulation de l'architecture des protéines BTN3A par les anticorps agoniste 20.1 et antagoniste 103.2.

**Figure 22 :** Différentes étapes du processus d'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 induit par les PAGs.

**Figure 23 :** Trois modes d'action hypothétiques de l'induction de l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par les PAGs.

**Figure 24 :** Mise en évidence de protéines partenaires de BTN3A1 par la technique du double-hybride chez la levure.

**Figure 25 :** Immunoprécipitation des protéines ZKSCAN4 et ZNF350 avec la protéine BTN3A1.

**Figure 26 :** Non reproductivité des résultats pour les protéines ZNF350 et ZKSCAN4.

**Figure 27 :** La protéine BTN3A1 est très présente dans les zones d'adhésion de la membrane cellulaire.

**Figure 28 :** modèle hypothétique du mode d'action de la protéine BTN3A1 lors de l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 induite par les PAGs.

**Table 1 :** Différents ligands de TCR  $\gamma\delta$  murins ou humains.

**Table 2 :** Plasticité fonctionnelle des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2

## II. Liste des abréviations

|         |                                                      |
|---------|------------------------------------------------------|
| ABP     | AminoBisPhosphonate                                  |
| ADCC    | Antibody Dependant Cell-mediated Cytotoxicity        |
| BrHPP   | BromoHydrin d'Isopentenyl PyroPhosphate              |
| BTN     | Butyrophiline                                        |
| CMH     | Complexe Majeur d'Histocompatibilité                 |
| CMV     | Cytomégalovirus                                      |
| CPA     | Cellule Présentatrice d'Antigène                     |
| DAMP    | Damage-Associated Molecular Pattern                  |
| DC      | Dendritic Cell                                       |
| DETC    | Dendritic Epidermal T Cell                           |
| DMAPP   | DiMethylallyl PyroPhosphate                          |
| EBV     | Epstein-Barr Virus                                   |
| FDPS    | Farnesyl DiPhosphate Synthase                        |
| FLIM    | Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy             |
| FPP     | Farnesyl DiPhosphate                                 |
| FRAP    | Fluorescence Recovery After Photobleaching           |
| FRET    | Fluorescence Resonance Energy Transfert              |
| HA      | Hémagglutinine du virus de la grippe humain          |
| GEF     | Guanine Exchange Factor                              |
| HCV     | Virus de l'Hépatite C                                |
| HEK     | Human Embryonic Kidney                               |
| HMG-CoA | $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -MethylGlutaryl-Coenzyme A |
| ICOS    | Inducible T Cell CO-Stimulator                       |
| IEL     | Lymphocyte Intra-Epithelial                          |
| IFN     | Interféron                                           |
| Ig      | Immunoglobuline                                      |
| iNKT    | invariant Natural Killer T cell                      |
| IP      | ImmunoPrécipitation                                  |
| IPP     | Isopentenyl PyroPhosphate                            |
| KD      | Knock Down                                           |
| KO      | Knock Out                                            |
| KRAB    | Krüppel Associated Box                               |
| LT      | Lymphocyte T                                         |
| MAIT    | Mucosal Associated Invariant T cell                  |
| MVA     | Mévalonate                                           |
| NK      | Natural Killer                                       |
| NKG2D   | Natural Killer Group 2, member D                     |
| NKR     | Natural Killer Receptor                              |
| NLR     | Nod Like Receptor                                    |
| PAMP    | Pathogen-Associated Molecular Pattern                |
| PAg     | PhosphoAntigène                                      |
| PBL     | Peripheral Blood Lymphocyte                          |
| PBMC    | Cellules Mononuclées du Sang Périphérique            |
| PRPF40A | Pre mRNA Processing Factor 40 homologue A            |
| PRR     | Pattern Recognition Receptor                         |

|       |                                                                |
|-------|----------------------------------------------------------------|
| SCID  | ImmunoDéficiency Combinée Sévère                               |
| SPR   | Résonnance Plasmonique de Surface                              |
| TCR   | T Cell Receptor                                                |
| TIRF  | Total Internal Reflection Fluorescence                         |
| TLR   | Toll Like Receptor                                             |
| TM    | Trans-Membranaire                                              |
| TNF   | Tumor Necrosis Factor                                          |
| TRAIL | Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand        |
| TRIM  | Tripartite Motif                                               |
| UACA  | Uveal Autoantigen with Coiled-coil domains and Ankyrin repeats |
| VIH   | Virus de l'Immunodéficience Humaine                            |
| WB    | Western Blot                                                   |

## **III. Introduction**

## A. Les lymphocytes T $\gamma\delta$

### 1. Introduction

Le système immunitaire est composé de nombreuses populations cellulaires ayant chacune leurs caractéristiques propres. Les lymphocytes T (LT) sont une population majeure dans ce système et peuvent être divisés en deux catégories suivant le récepteur qu'ils expriment : les LT  $\alpha\beta$  qui expriment un récepteur des cellules T (TCR)  $\alpha\beta$  et les LT  $\gamma\delta$  qui expriment un TCR  $\gamma\delta$ .

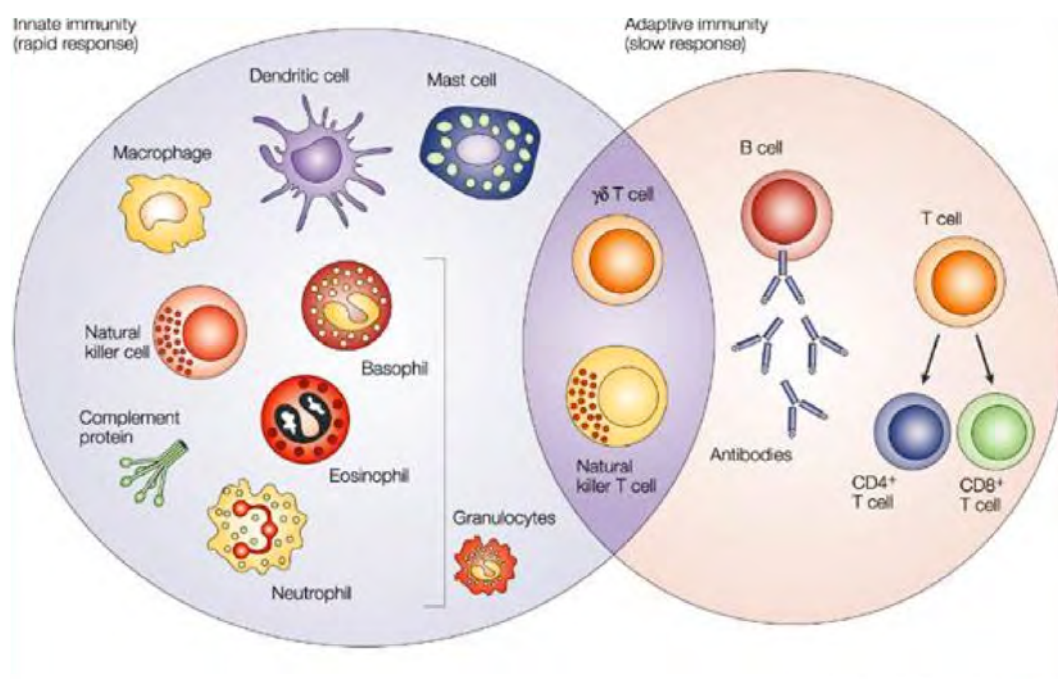
Les LT  $\gamma\delta$  ont été découverts il y a maintenant plus de 30 ans. C'est l'identification d'une nouvelle chaîne de TCR appelée  $\gamma$  [1, 2], différente des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  déjà décrites, qui va suggérer l'existence d'un nouveau type de TCR. Cette hypothèse se confirme quelque temps après par la découverte d'une population de LT exprimant cette chaîne  $\gamma$  ainsi qu'une deuxième chaîne (ni  $\alpha$  ni  $\beta$ ) qui sera appelée chaîne  $\delta$  [3].

### 2. Positionnement des LT $\gamma\delta$ dans le système immunitaire

Le système immunitaire est constitué de deux composantes majeures : l'immunité innée et l'immunité adaptative, chacune présentant des caractéristiques propres.

L'immunité innée représente la première ligne de défense de l'organisme face aux infections. Elle est la plus rapide (quelques heures) et la moins spécifique des deux. Ses acteurs les plus importants sont les monocytes, les neutrophiles, les macrophages, les cellules NK (Natural Killer) et les cellules dendritiques ainsi que les molécules solubles de reconnaissance de pattern (ex : complément). Ces cellules possèdent des récepteurs appelés PRR (Pattern Recognition Receptor) capables de reconnaître des PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern) et des DAMPs (Damage-Associated Molecular Pattern).

L'immunité adaptative quand à elle met plusieurs jours à se mettre en place. Elle intervient en cas d'échec de l'immunité innée à éliminer totalement le pathogène. Elle va faire preuve d'une très grande spécificité vis-à-vis du pathogène qu'elle cible. Elle est composée de LT  $\alpha\beta$  et de LB. Ces cellules sont capables de cibler spécifiquement des antigènes (Ag) exprimés par ces pathogènes et d'induire une réponse adaptée. L'immunité adaptative est aussi capable de mettre en place une réponse mémoire. Des lymphocytes (T ou B) spécifiques des Ag du pathogène seront conservés dans le temps afin de pouvoir réagir plus rapidement si une nouvelle infection par ce pathogène arrivait.



**Figure 1 : Les LT  $\gamma\delta$  se situent à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative** (d'après Dranoff, 2004) [4]

Certaines cellules comme les LT  $\gamma\delta$ , les iNKT (invariant Natural Killer T cell), ou les MAIT (Mucosal Associated Invariant T cell) n'appartiennent à aucune de ces deux catégories. On les appelle alors cellules de l'immunité transitionnelle car elles se situent à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (**Figure 1**). Leur vitesse de réactivité se rapproche de la première catégorie tandis que leurs fonctions effectrices et leurs récepteurs (réarrangement V(D)J du TCR) sont semblable à celle de l'immunité adaptative.

### 3. Le TCR $\gamma\delta$

#### a) *Diversité*

Les LT  $\gamma\delta$  sont caractérisés par les chaînes de TCR qu'ils expriment. À l'instar du TCR des LT  $\alpha\beta$ , celui des LT  $\gamma\delta$  va subir les mécanismes de recombinaison somatique V(D)J. Les segments variables obtenus (V $\gamma$  et V $\delta$ ) permettront de les classer en différentes sous-populations. Dans ce manuscrit, ils seront nommés en utilisant la nomenclature de Heilig et Tonegawa [5] pour la souris et de Lefranc et Rabitts [6] pour l'humain.

La souris possède environ 10 gènes V associés au TCR  $\delta$  et 6 gènes V associés à 3 gènes de région constante pour la chaîne  $\gamma$  : V $\gamma$ 1J $\gamma$ 4C $\gamma$ 4, V $\gamma$ 2J $\gamma$ 2C $\gamma$ 2, et V $\gamma$ 5, 6, 4 et 7 qui sont réarrangés avec J $\gamma$ 1C $\gamma$ 1. L'Homme quand à lui possède 8 gènes V associés au TCR  $\delta$  et 4 sous-groupes de gènes pour la chaîne  $\gamma$  : les seuls fonctionnels sont les V $\gamma$ 2, 3, 4, 5 et 8 dans le sous-groupe V $\gamma$ I, et le V $\gamma$ 9 dans le sous-groupe V $\gamma$ II [7].

Le nombre de combinaisons de gènes V possibles chez les LT  $\gamma\delta$  est plus faible que chez les LT  $\alpha\beta$  car ils possèdent moins de gènes V. Ce nombre est encore plus réduit du fait des conditions d'appariement des chaînes  $\gamma$  avec les chaînes  $\delta$  [8] laissant supposer un faible nombre de ligands reconnus par les TCR  $\gamma\delta$ . Néanmoins, ces TCR possèdent la plus grande diversité potentielle de la boucle CDR3 pour la chaîne de TCR  $\delta$  [9]. En résumé, les LT  $\gamma\delta$  possèdent une diversité combinatoire très faible, mais celle-ci est compensée par une diversité jonctionnelle élevée. Le nombre de TCR  $\gamma\delta$  différents est donc théoriquement très élevé. Cela pourrait permettre en théorie une reconnaissance d'antigènes beaucoup plus variés qu'on ne le pense [10].

#### b) *Conservation entre les espèces*

Une première étude comparative des gènes codant pour le TCR  $\gamma\delta$  avait montré d'importantes similarités mais aussi quelques différences entre l'Homme et le chimpanzé [11]. Une autre étude, plus récente, a montré que cette différence de

conservation chez les primates se situe sur le locus  $\gamma$  [12]. À l'inverse du locus  $\delta$  très conservé, le locus  $\gamma$  s'est fortement diversifié au cours de l'évolution à l'exception des gènes V $\gamma$ 9, 10, et 11.

Les gènes murins semblent eux peu conservés avec ceux des primates. Les quelques gènes V murins apparaissant comme homologues à ceux des primates appartiennent au locus  $\delta$  (exemples d'homologues murins/primates : DV6/V $\delta$ 1, DV4/V $\delta$ 2, DV5/V $\delta$ 3) [12, 13]. Les gènes V $\gamma$  murins quand à eux ne présentent quasiment pas de conservation avec ceux des primates sauf pour les gènes TRGV1, 2, 3 et 4 qui sont homologues du gène V $\gamma$ 11 primate [12, 14].

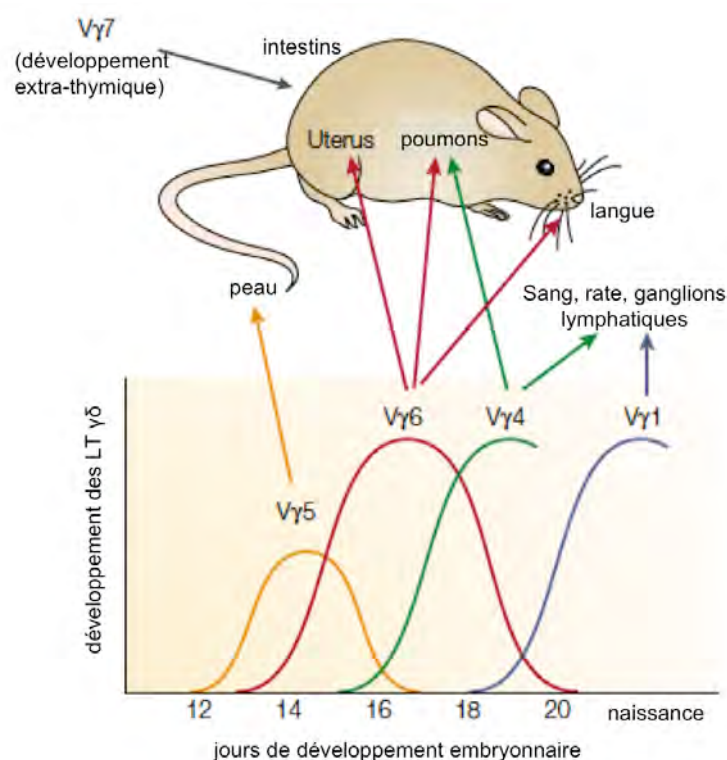
Ces données génétiques corrélerent avec l'observation de sous-population de LT  $\gamma\delta$  aux fonctions similaires entre l'Homme et les autres primates et ne possédant pas d'équivalent chez la souris (ex : LT  $\gamma$ 9 $\delta$ 2 humains).

#### **4. Développement thymique des LT $\gamma\delta$**

La plupart des études sur le développement thymique des LT  $\gamma\delta$  ont été réalisées chez la souris. Les LT  $\gamma\delta$  apparaissent dès les premiers stades du développement thymique chez le fœtus, avant les LT  $\alpha\beta$ . Ces deux populations proviennent du même précurseur commun CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> (double négatif, DN) [15, 16]. C'est via les recombinaisons V(D)J de leur TCR que les deux populations vont se séparer définitivement en arrivant au stade DN3 dans le thymus [17-19]. La diversité structurelle des LT  $\gamma\delta$  va dépendre de cette recombinaison. Théoriquement, elle peut atteindre 10<sup>16</sup> TCR différents, mais en réalité le nombre de TCR  $\gamma\delta$  détectés en périphérie est beaucoup plus restreint. Ce phénomène est dû en majeure partie aux mécanismes mis en place lors du développement thymique des LT  $\gamma\delta$  au stade fœtal et en périphérie au stade précoce de la vie. Seules certaines combinaisons V $\gamma$ V $\delta$  sont utilisées, avec parfois des TCR invariants et des séquences jonctionnelles identiques aboutissant à une localisation préférentielle dans certains tissus de ces sous-populations [20-22].

### a) Chez la souris

Chez la souris, les sous-populations exprimant un TCR particulier vont émigrer par vagues successives du thymus et aller se localiser dans des tissus bien déterminés ou elles auront des fonctions en rapport avec cette localisation [23]. Les  $V\gamma 5^+$  vont émigrer en premier du thymus au jour embryonnaire E13, suivis par les  $V\gamma 6^+$  qui commencent à émigrer en E14 et pour finir, les  $V\gamma 4^+$  et les  $V\gamma 1^+$  à partir du jour E16. Chacune de ces populations ira ensuite rejoindre sa localisation tissulaire préférentielle (**Figure 2**).



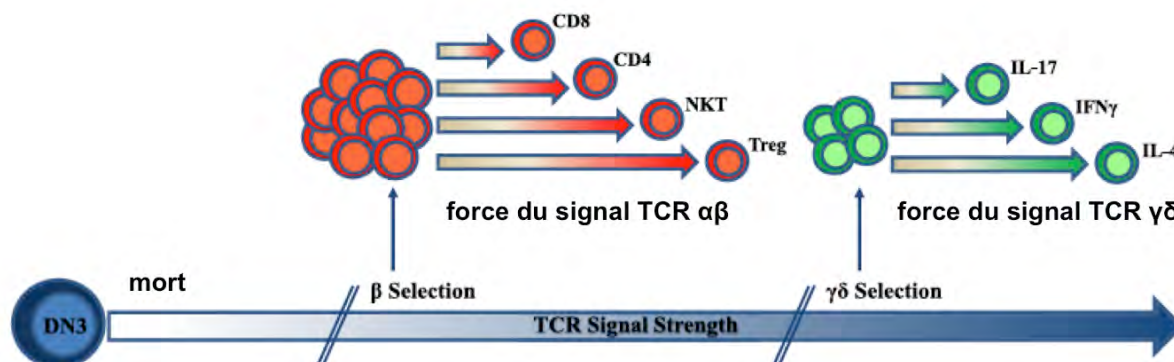
**Figure 2 : Génération programmée au cours du développement thymique des LT  $\gamma\delta$  murins.**

Les différentes sous-populations de LT  $\gamma\delta$  portant des TCR composés de régions V $\gamma$  spécifiques sont exportées du thymus par vagues successives, à des périodes définies du développement fœtal et néonatal. Par la suite, chacune de ces populations migre vers un tissu spécifique, généralement épithélial, où elle résidera chez l'adulte et tiendra des fonctions précises. Le développement de certains LT  $\gamma\delta$  V $\gamma 7$  localisés dans les épithélia intestinaux pourrait se dérouler à l'extérieur du thymus. (D'après Carding et al, 2002) [23]

Une fois sortie du thymus, ces populations auront des localisations différentes mais aussi des fonctions effectrices différentes. Les populations  $\gamma\delta$  murines peuvent être divisées en trois grandes catégories effectrices : les productrices d'IL-17, les productrices d'IFN- $\gamma$  et les productrices d'IL-4 [24]. Trois modèles ont été avancés pour expliquer le rôle du TCR dans l'engagement vers une catégorie effectrice lors du développement thymique.

Le premier modèle appelé modèle instructionnel, suggère que le progéniteur commun aux LT  $\gamma\delta$  et  $\alpha\beta$  est capable de donner chacune des lignées via les signaux reçus par son pré-TCR ou son TCR  $\gamma\delta$  [18, 25].

Le modèle stochastique quand à lui indique que les progéniteurs T sont pré-assignés soit à la lignée  $\alpha\beta$  soit à la lignée  $\gamma\delta$  et que seuls ceux qui réussissent à réarranger un TCR qui correspond à leur affectation survivent [26]. Ces deux modèles sont assez anciens et ne corroborent pas avec les dernières données.



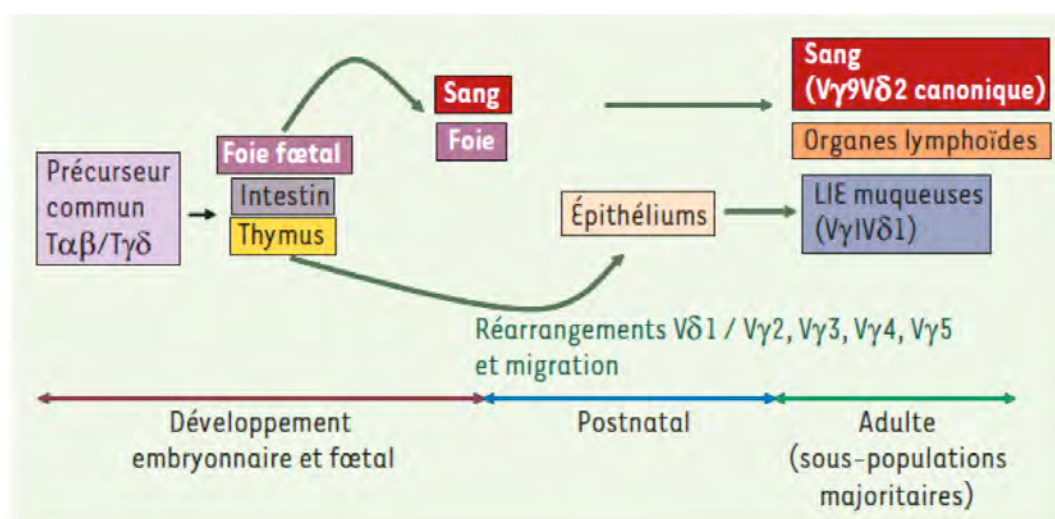
**Figure 3 : Modèle où la force du signal TCR détermine l'engagement dans la lignée  $\alpha\beta$  ou la lignée  $\gamma\delta$ , et la différenciation des fonctions effectrices lors du développement thymique.**

La bifurcation finale entre la lignée  $\alpha\beta$  et la lignée  $\gamma\delta$  se produit au stade DN3 des cellules T. Les thymocytes DN3 qui ont réarrangés une chaîne TCR $\beta$  fonctionnelle reçoivent un signal pré-TCR faible ( $\beta$ -selection) et deviennent des T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>. Après le réarrangement de la chaîne  $\alpha$  et la sélection positive, l'augmentation croissante de la force du signal TCR va amener ces cellules à se différencier respectivement en CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, NKT et Treg. À l'inverse, les thymocytes DN3 qui ont réarrangés des chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  fonctionnelles vont recevoir un fort signal TCR afin de subir la sélection  $\gamma\delta$  et de rester CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>. L'augmentation du signal TCR va induire différentes fonctions effectrices : cellules productrices d'IL-17 pour les faibles signaux, cellules productrices d'IFN- $\gamma$  pour les signaux forts, et production d'IL-4 pour les cellules recevant un signal TCR très fort (d'après Zarin et al, 2015) [27].

Un modèle plus récent basé sur la force du signal TCR a donc été proposé afin de réconcilier les deux hypothèses [28, 29] (**Figure 3**). Ce modèle suggère que les faibles signaux de TCR engendreraient les lignées  $\alpha\beta$  tandis que les signaux forts mèneraient à la lignée  $\gamma\delta$  [30]. La modulation de ce signal TCR permettrait ensuite d'obtenir les différentes fonctions effectrices des LT  $\gamma\delta$  et  $\alpha\beta$  [31, 32]. Des données récentes suggèrent aussi un rôle joué par la voie Notch en parallèle de celui du TCR lors de la différenciation fonctionnelle. Un signal Notch fort associé à un signal TCR faible engendrerait des LT  $\gamma\delta$  producteurs d'IL-17, tandis qu'un signal fort de TCR mènerait ces LT à la production d'INF- $\gamma$  [33-35]. Ces modèles actuels suggèrent donc une interaction entre les signaux de la voie Notch et ceux du TCR, qui aboutirait à un développement et une programmation fonctionnelle différente des LT  $\gamma\delta$ .

## b) Chez les primates

Ces données, obtenues chez la souris, sont probablement généralisables aux autres espèces. Chez l'Homme, par exemple, les réarrangements des gènes du TCR $\delta$  sont détectés dès la 8<sup>ème</sup> semaine de développement fœtal et concernent seulement les régions V $\delta$ 2, V $\gamma$ 8, V $\gamma$ 9 et V $\gamma$ 11. Par la suite, une première vague de migration de LT  $\gamma\delta$  vers le sang et le foie intervient, participant notamment à la mise en place du répertoire V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 du sang périphérique, qui constituera la sous-population majeure des LT  $\gamma\delta$  chez l'adulte. Après la naissance, les réarrangements impliquent les segments géniques V $\delta$ 1 et plus rarement V $\delta$ 3 et V $\delta$ 5, dont les localisations anatomiques seront principalement épithéliales [36]. Ces différentes vagues sont représentées dans la **Figure 4**.



**Figure 4 : Développement programmé des LT  $\gamma\delta$  chez l'Homme.**

Comme chez la souris, les LT  $\gamma\delta$  humains sont les premiers à se développer dans le thymus. On distingue principalement deux vagues de développement de sous-populations de LT  $\gamma\delta$ , qui, comme chez la souris, seront localisées dans des compartiments différents chez l'adulte, avec des fonctions spécifiques (d'après Catros et al, 2010) [37].

Les LT  $\gamma\delta$  en général (murins et primates) ne subissent pas exactement les mêmes processus de maturation dans le thymus que les LT  $\alpha\beta$ . Ils ne passent donc pas par la sélection positive ou négative au sens propre du terme. En revanche l'engagement fort ou non du TCR va avoir un impact fonctionnel sur les LT  $\gamma\delta$ . Ils vont avoir des fonctions effectrices différentes. Un engagement fort du TCR mènera à des cellules productrices d'INF- $\gamma$ , et à l'inverse, un engagement faible rendra les cellules productrices d'IL-17 [38]. Pour illustrer ce mécanisme, nous pouvons prendre

en exemple la population de LT  $\gamma\delta$  nommée DETC (Dendritic Epidermal T Cells). Ces cellules, autrement appelées V $\gamma$ 5V $\delta$ 1, sont présentes dans l'épiderme des souris. De récentes études ont montrées que le développement thymique de cette population était dépendant de l'expression d'une protéine appelée Skint1, apparentée à la famille des butyrophilines. Les DETC vont émigrer du thymus après un engagement fort de leur TCR  $\gamma\delta$  avec cette protéine Skint1. Chez des souris présentant une mutation de la protéine, le nombre de DETC va être grandement réduit. De plus les V $\gamma$ 5V $\delta$ 1 restantes seront productrices d'IL-17 et seront redirigées vers le péritoine et l'utérus [34, 39, 40].

## 5. Rôle des LT $\gamma\delta$

La présence et la fonction des LT  $\gamma\delta$  varient en fonction de la localisation tissulaire, des différentes espèces mais aussi au sein des individus.

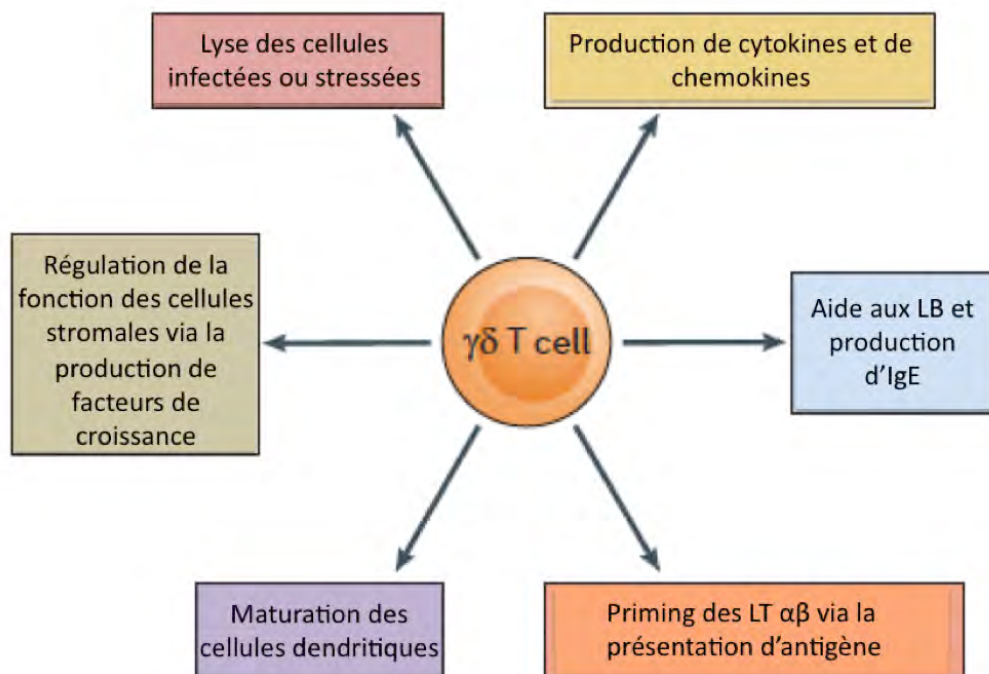
### a) *Localisation*

Les LT  $\gamma\delta$  ne constituent pas la fraction majeure de LT présente dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires. On trouve à l'inverse une fraction enrichie de ces cellules dans les épithéliums et les muqueuses où elles peuvent être en contact direct avec le milieu extérieur. Ces LT  $\gamma\delta$  expriment généralement un TCR invariant ou presque, spécifique d'un tissu. Chez la souris, on retrouve en général les V $\gamma$ 5 dans l'épiderme, les V $\gamma$ 7 dans l'épithélium intestinal, les V $\gamma$ 4 et les V $\gamma$ 6 dans les épithéliums urovaginal et pulmonaire [23]. Ces sous-populations de LT  $\gamma\delta$  représentent parfois jusqu'à la majorité des LT dans ces tissus.

Chez l'Homme, la plupart des LT  $\gamma\delta$  intra-épithéliaux expriment un TCR V $\delta$ 1 ou V $\delta$ 3. Les LT  $\gamma\delta$  peuvent aussi être présents dans le sang où ils représentent 1 à 5% de PBL CD3<sup>+</sup>. Ces PBL exprimeront alors majoritairement le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 [41].

## b) Fonctions effectrices des LT $\gamma\delta$

Les LT  $\gamma\delta$  sont capables de s'activer très rapidement car leurs fonctions effectrices sont généralement en lien avec leur localisation tissulaire. La fréquence élevée de ces sous-populations dans un tissu permet donc une réponse rapide sans sélection ou expansion préalable. Le déclenchement rapide d'une réponse est aussi facilité par le phénotype pré-activé de plusieurs sous-populations. Cette réponse se traduit par la mise en place des fonctions effectrices variées qui peuvent se combiner (**Figure 5**). Les différentes réponses effectrices décrites ci-dessous ont été observées en grande majorité dans des travaux effectués *in vitro/ex vivo*.



**Figure 5 : Fonctions effectrices majeures des LT  $\gamma\delta$ .**

Les LT  $\gamma\delta$  ont un rôle central dans la défense de l'hôte vis-à-vis du stress infectieux et tumoral. Ils sont capables de mettre en place six mécanismes majeurs. 1) Les LT  $\gamma\delta$  peuvent lyser directement et éliminer les cellules infectées ou stressées via la production de granzymes. 2) Elles produisent un large panel de cytokines et de chemokines afin de réguler les autres cellules (du système immunitaire ou non). 3) Elles peuvent venir en aide aux LB et promouvoir la production d'IgE. 4) Elles permettent le priming des LT  $\alpha\beta$  via la présentation d'antigènes. 5) Elles peuvent déclencher la maturation des cellules dendritique (DC). 6) Elles peuvent réguler la fonction des cellules stromales via la production de facteurs de croissance (d'après Vantourout et al, 2013) [38].

## (1) Cytotoxicité

Les LT  $\gamma\delta$  sont capables de reconnaître et de détruire des cellules infectées ou transformées grâce à leur forte capacité cytotoxique. Ils peuvent mettre en place deux mécanismes distincts afin d'induire la mort de la cellule cible.

Le premier mécanisme va permettre aux LT  $\gamma\delta$  de libérer des granules lytiques présents dans leur cytoplasme. Ces granules contiennent des granzymes A, B et M, des granulysines et de la perforine [42, 43]. Les LT  $\gamma\delta$  sont aussi capable de sécréter des molécules bactériostatiques appelées défensines [44]. Ces différentes molécules vont être capables de tuer un large spectre de pathogènes bactériens, mycosiques et parasitaires [45]. Les LT  $\gamma\delta$  peuvent aussi induire la production de molécules antibactériennes par d'autres types cellulaires [46].

Par un second mécanisme, les LT  $\gamma\delta$  vont induire l'apoptose des cellules cibles en activant différents récepteurs de mort exprimés à leur surface. Ils vont engager les récepteurs de mort (FAS ou TRAILR) en surexprimant leurs ligands (respectivement FASL et TRAIL) [47].

## (2) Production de cytokines et de chimiokines

Les LT  $\gamma\delta$  peuvent produire de nombreuses cytokines ayant chacune un rôle différent. La production de TNF- $\alpha$  et d'INF- $\gamma$  va permettre de résister contre les virus et les pathogènes intracellulaires. Les bactéries extracellulaires ou les champignons seront ciblées par l'IL-17 en permettant le recrutement de neutrophiles sur le lieu de l'inflammation [48]. La production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 va permettre de lutter contre les parasites extracellulaires. Ces réponses cytokiniques peuvent parfois engendrer des réactions délétères comme l'autoimmunité (pour l'IFN- $\gamma$  et l'IL-17 [49-51]), de l'allergie ou de l'asthme (pour l'IL-4 et l'IL-13). Les LT  $\gamma\delta$  sont capables d'inhiber les réponses de cellules effectrices innées ou adaptatives par la production de cytokines immuno-suppressives (ex : IL-10 [52, 53]). Les LT  $\gamma\delta$  peuvent produire des chimiokines qui vont servir à recruter d'autres cellules du système immunitaire sur le site de l'inflammation mais aussi à moduler leur activité [54]. Ils peuvent aussi promouvoir la réparation et le maintien des tissus épithéliaux par la production de facteurs de croissance (Keratinocyte Growth Factor 1 et 2) ou de survie (fibropellin) de cellules épithéliales [55]. Pour revues, voir [56-59].

### (3) Présentation d'Ag/fonction d'APC

Des résultats *in vitro*, obtenus par l'équipe de B. Moser, montrent que les LT  $\gamma\delta$  peuvent acquérir des caractéristiques de cellules présentatrices d'Ag professionnelles (CPA). Après stimulation par des Ag microbiens, ces cellules deviennent capables de présenter des antigènes aux LT  $\alpha\beta$  naïfs et d'induire leur activation [60-63]. Ces LT  $\gamma\delta$  activés se mettent aussi à exprimer la molécule CCR7. Cette molécule est caractéristique des cellules se rendant dans les ganglions lymphatiques comme les cellules dendritiques ou les LT  $\alpha\beta$ . Ces résultats suggèrent un rôle joué par les LT  $\gamma\delta$  dans l'activation des LT  $\alpha\beta$ . Cependant, leur capacité à agir en tant que cellule présentatrice d'antigène professionnelle *in vivo* reste à démontrer même si de récents résultats ont mis en évidence une population de LT  $\gamma\delta$  Foxp3- LAP+ capable d'agir en temps que véritable CPA et d'induire Foxp3 dans des LT CD4+ *in vitro* et *in vivo* [64]. D'autres résultats mettent aussi en évidence le rôle d'intermédiaire entre l'immunité innée et l'immunité adaptative qu'ont les LT  $\gamma\delta$ . Ils sont capables d'aider les LB et d'induire la production d'IgE mais aussi d'aider à la maturation des cellules dendritiques [65, 66].

#### **c) Rôle des LT $\gamma\delta$ *in vivo***

Les LT  $\gamma\delta$  ont trois grands rôles physiologiques. Tout d'abord ils vont permettre le maintien de l'intégrité physique des barrières épithéliales grâce à leur localisation préférentielle. Pour cela, ils vont promouvoir la croissance et la réparation de l'épithélium, la mise en place d'une réponse pro-inflammatoire précoce après une lésion ainsi que des fonctions immunorégulatrices. Deuxièmement, les LT  $\gamma\delta$  jouent un rôle important dans l'immunité anti-infectieuse. Ils sont capables de reconnaître un large panel de pathogènes intra et extracellulaires (bactéries, parasites et virus). Pour finir, ils vont aussi avoir un rôle non négligeable dans l'immunité anti-tumorale en participant activement à la surveillance des tumeurs [67].

La majorité des sous-populations de LT  $\gamma\delta$ , chez la souris, sont localisées dans les épithélia. On les appelle alors des lymphocytes intra-épithéliaux (IEL). Les IEL  $\gamma\delta$  constituent ici, une des premières lignes de défense dans les barrières épithéliales [68]. Ils sont capables de reconnaître et d'éliminer divers pathogènes ou

cellules infectées. Ils permettent le maintien de l'intégrité des barrières épithéliales (ex : maintien des jonctions serrées entre les membranes des cellules de l'épithélium intestinal [69], réparation de l'épithélium via la production de KGF [55]). Ils peuvent aussi migrer au sein de l'épithélium (entre le compartiment intra-épithélial et la lamina propria) afin de maximiser leur surveillance [70]. Certains travaux suggèrent que les IEL  $\gamma\delta$  pourraient jouer un rôle dans la balance réponse immunitaire/tolérance en particulier dans l'intestin avec la flore commensale [71, 72].

Chez l'Homme, les sous-populations de LT  $\gamma\delta$  se divisent en deux grandes catégories : les V $\delta$ 2+ et les V $\delta$ 2-. Les V $\delta$ 2+ expriment les chaînes de TCR V $\gamma$ 9 et V $\delta$ 2 tandis que les V $\delta$ 2- utilisent majoritairement les chaînes de TCR V $\delta$ 1 et V $\delta$ 3 associées à diverses chaînes V $\gamma$ . Ces deux catégories de LT  $\gamma\delta$  diffèrent généralement par leur développement thymique, leur localisation, leurs fonctions effectrices et leurs contextes d'activation.

Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont présents dans le sang circulant et ont un rôle très important dans l'immunité anti-infectieuse et anti-tumorale. Ils sont capables de reconnaître un large spectre de cellules stressées ou infectées. Les fonctions physiologiques de cette population seront abordées de manière détaillée dans la deuxième partie de cette introduction.

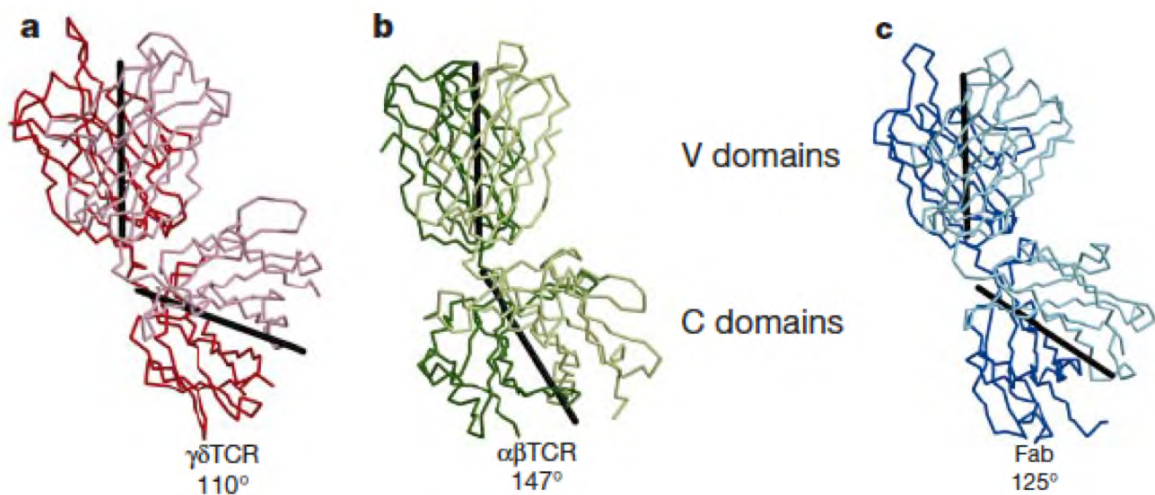
Les LT V $\delta$ 2- quand à eux, sont généralement localisés dans les épithéliums et les muqueuses. Ils ont un rôle essentiel dans l'immunité anti-infectieuse et sont capable de reconnaître des bactéries intracellulaires (ex : Mycobacteria, Listeria, Borrelia) mais aussi des virus (ex : HIV, CMV) [20, 73, 74]. Ces populations V $\delta$ 1 et V $\delta$ 3 sont fortement amplifiées chez des individus immuno-déprimés subissant une réactivation du CMV (Cytomégalo virus) [75, 76]. De récents résultats montrent que ces LT V $\delta$ 2- induit par le CMV peuvent avoir de nombreuses fonctions, incluant une activité anti-virale directe [77]. Ces résultats sont supportés par des données obtenues chez la souris montrant un rôle protecteur des LT  $\gamma\delta$  contre l'infection par le CMV [78, 79]. Les LT V $\delta$ 2- peuvent aussi avoir un rôle dans l'immunité anti-tumorale [80]. Récemment l'équipe de Julie Déchanet-Merville a mis en évidence une sous-population de LT V $\delta$ 2- exprimant le TCR V $\gamma$ 4V $\delta$ 5 capable de reconnaître des cellules infectées par le CMV et des cellules tumorales via la protéine EPCR [81]. Diverses publications ont donc suggérées que les LT V $\delta$ 2- soient utilisés

comme les LT V $\delta$ 2+ en immunothérapie anti-tumorale [82, 83] tout en rappelant que la capacité anti-tumorale de ces deux sous-populations peut varier en fonction du type de tumeur ciblé [84].

## 6. Modalités d'activation antigénique des LT $\gamma\delta$

L'activation antigénique des LT  $\gamma\delta$  est déclenchée via le TCR et des molécules de costimulation. À l'instar des LT  $\alpha\beta$ , ils possèdent un TCR capable de reconnaître un antigène. Cependant cette activation antigénique ne se déroule pas selon les mêmes modalités que pour les LT  $\alpha\beta$ . En effet, les LT  $\gamma\delta$  ne reconnaissent pas des complexes peptides/CMH et leur capacité à reconnaître une cellule cible n'est pas limitée par la restriction CMH.

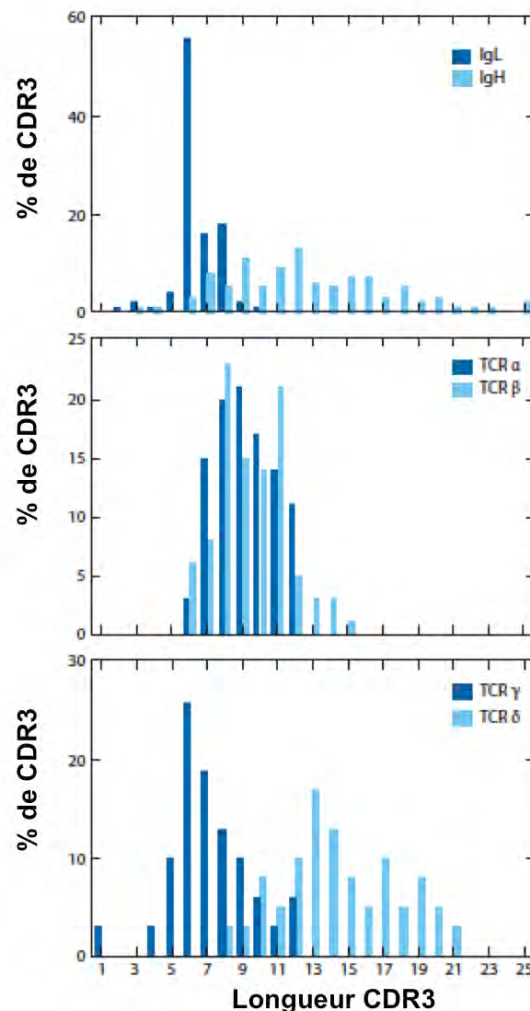
Des études suggèrent que le mode de reconnaissance des antigènes par le TCR  $\gamma\delta$  serait plus proche de celui des Immunoglobulines (Ig) que celui du TCR  $\alpha\beta$  [9, 85, 86].



**Figure 6 : Structure tridimensionnelle du TCR  $\gamma\delta$ .**

Structure d'un TCR  $\gamma\delta$  humain de type V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 (clone G115) (a), d'un TCR  $\alpha\beta$  (b), et de la partie Fab d'une immunoglobuline (c). Les traits noirs représentent l'angle formé entre les domaines C et V. Les chaînes  $\gamma$ ,  $\beta$  et lourdes sont en couleurs claires tandis que les chaînes  $\delta$ ,  $\alpha$  et légères sont en couleurs foncées (D'après Allison et al, 2001 [7]).

Premièrement, la structure tridimensionnelle du TCR  $\gamma\delta$  est différente de celle du TCR  $\alpha\beta$  (**Figure 6**). L'angle formé entre les domaines C et V est plus prononcé dans un TCR  $\gamma\delta$  que dans un TCR  $\alpha\beta$ . Le TCR  $\gamma\delta$  ressemble donc d'avantage, d'un point de vue structurel, au fragment Fab d'une Immunoglobuline.



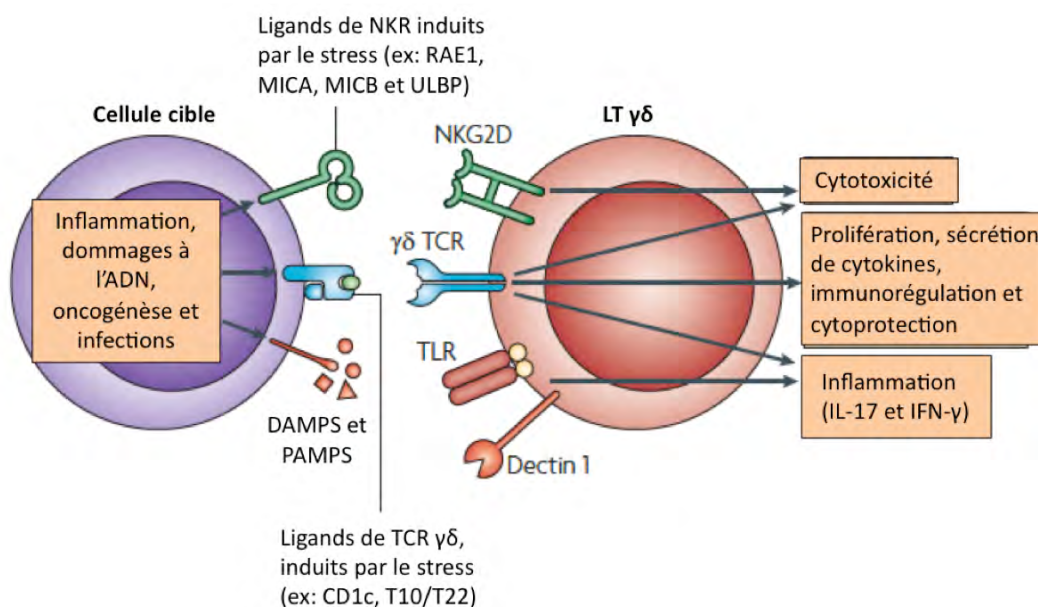
**Figure 7 : Distributions des différentes longueurs de CDR3 dans les chaînes de récepteurs spécifiques d'antigènes.**

La longueur du CDR3 est définie à 4 acides aminés de moins que le nombre d'acides aminés entre le triplet GXG dans la région J, ou G est une glycine et X n'importe quel acide aminé, et la cystéine la plus proche précédant la région V, comme décrit dans Rock et al, 1994 [9]. Les histogrammes montrent le pourcentage de séquences CDR3 à une longueur donnée dans les différentes familles de chaînes humaines. D'après Chien et al, 2014 [87].

Des analyses structurales montrent que la longueur des boucles de CDR3 dans le TCR est critique pour l'interaction avec l'antigène. En comparant la longueur de ces boucles dans les TCR  $\alpha\beta$ ,  $\gamma\delta$  et les Ig (**Figure 7**), on s'aperçoit que le TCR  $\gamma\delta$  est plus proche des Ig que du TCR  $\alpha\beta$ . Les longueurs de CDR3 ne varient pas beaucoup au sein du TCR  $\alpha\beta$ , car celui-ci doit toujours être capable de contacter à la

fois le CMH et le peptide. À l'inverse, chez les Ig, les CDR3 de la chaîne légère sont courts et de longueurs conservées, tandis que sur la chaîne lourde, ils sont longs avec un large panel de longueurs. Cela permettrait aux Igs de reconnaître une grande variété de surfaces antigéniques allant de petits composés organique à de grandes molécules protéiques. Dans le TCR  $\gamma\delta$ , les CDR3 de la chaîne  $\gamma$  sont courts et de longueurs proches, tandis que sur la chaîne  $\delta$ , ils sont longs avec un large panel de longueurs. Cela laisse donc penser que leur capacité de reconnaissance est similaire à celle des Igs.

Comme d'autres populations T, la réponse des LT  $\gamma\delta$  est finement modulée par d'autres récepteurs, en plus du TCR  $\gamma\delta$  (**Figure 8**).



**Figure 8 : Modulation de l'activation des LT  $\gamma\delta$  via le TCR et/ou ses co-récepteurs.**

Les LT  $\gamma\delta$  sont capables de reconnaître des cellules stressées ou infectées, via leur TCR et/ou des récepteurs non polymorphiques de type NKR, TLR ou NLR. L'activation isolée, additionnelle, ou synergique de ces récepteurs va aboutir à différents types de réponses effectrices, modulant ainsi la capacité de réponse de ces LT. D'après Bonneville et al, 2010 [41].

À l'inverse des LT  $\alpha\beta$ , très peu de LT  $\gamma\delta$  expriment les co-récepteurs CD4 et CD8. Cependant, ils expriment de nombreux récepteurs non clonaux ayant un rôle dans la modulation de leur activation. Ils possèdent des récepteurs aux cytokines, permettant d'augmenter et de prolonger leur réponse en présence de cytokines pro-inflammatoires.

Ces LT  $\gamma\delta$  expriment aussi de nombreux récepteurs de type PRR (Pattern Recognition Receptor) comme des TLRs (Toll Like Receptor) qui reconnaissent des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern), des NLRs (Nod Like Receptor) qui reconnaissent des DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern), et des Dectins [88]. Ces récepteurs agissent généralement en tant que costimulateurs du signal TCR chez les LT  $\gamma\delta$  de primates. Cependant, certains LT  $\gamma\delta$  murins et bovins peuvent s'activer directement via des ligands du TLR2, de manière TCR-indépendante.

Les LT  $\gamma\delta$  présentent à leur surface des récepteurs inhibiteurs ou activateurs de type NKR (Natural Killer Receptor). Ces récepteurs sont aussi exprimés par les NK et les LT mémoires. L'engagement de ces récepteurs peut jouer sur le seuil d'activation des LT. Différents récepteurs sont exprimés par les LT  $\gamma\delta$  comme ceux de types Ig-like (KIR2D, KIR3D), ceux partagés avec les LT  $\alpha\beta$  (ex : LFA1, CD27, CD28) et ceux de type lectine C dont le plus connu est NKG2D. NKG2D (Natural Killer Group 2, member D) est très exprimés par les LT  $\gamma\delta$  et joue un très grand rôle dans leur capacité de reconnaissance des cellules infectées ou tumorales. Il est capable de reconnaître des molécules apparentées au CMH, comme RAE1 chez la souris, ou MICA/MICB et ULBP chez l'Homme, et surexprimées en cas de stress cellulaire [89]. Il agit généralement en temps que costimulateur, en parallèle de l'engagement du TCR, en augmentant la réponse cytotoxique du LT [90, 91]. Cependant, certaines équipes ont montré que l'activation du récepteur NKG2D était capable de déclencher une réponse  $\gamma\delta$ , sans engagement du TCR. Il a été montré que des LT  $\gamma\delta$  intra-épithéliaux murins pouvaient lyser des cellules tumorales seulement sur engagement de NKG2D [92], mais aussi que des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 humains pouvaient exprimer des marqueurs d'activation comme CD69, après fixation de ligands de NKG2D sans engagement du TCR [93]. Les mécanismes définissant l'activation, dépendante ou indépendante du TCR, de NKG2D ne sont pas encore bien définis. La tâche est d'autant plus complexe que certains ligands de NKG2D, comme MICA, se sont avérés être aussi des ligands de certains TCR  $\gamma\delta$ .

### a) Ligands de TCR $\gamma\delta$

La diversité combinatoire des TCR  $\gamma\delta$  étant dans la réalité assez limitée, on peut imaginer que les ligands associés sont eux-mêmes peu diversifiés et conservés au cours de l'évolution. Ce n'est pourtant pas le cas. Ils peuvent être de nature très variée : protéique ou lipidique, endogène ou exogène, ce qui corrèle avec la reconnaissance antigénique de type Ig du TCR  $\gamma\delta$ . Voici quelques exemples de molécules identifiées comme étant capables de se lier à un TCR  $\gamma\delta$  ou de déclencher une réponse  $\gamma\delta$  :

| Sous-populations de LT $\gamma\delta$      | Ligands                                | Références |
|--------------------------------------------|----------------------------------------|------------|
| <b>Souris</b>                              |                                        |            |
| Divers (0,1-1% des LT $\gamma\delta$ )     | T10/T22                                | [94-97]    |
| Clone Vy2V $\delta$ 5                      | I-E <sup>b,k,s</sup>                   | [98, 99]   |
| Clone Vy2V $\delta$ 8                      | HSV-glycoprotéine I                    | [100, 101] |
| Clones Vy1                                 | Cardiolipin, $\beta$ 2-glycoprotéine I | [102, 103] |
| Divers (0,02-0,4% des LT $\gamma\delta$ )  | Phycoérythrine                         | [104]      |
| Clones Vy1                                 | Insuline peptide (B:9-23)              | [105]      |
| <b>Homme</b>                               |                                        |            |
| V $\delta$ 1 (IEL)                         | MICA/MICB                              | [106, 107] |
| Vy9V $\delta$ 2                            | ULBP4                                  | [108]      |
| Clones V $\delta$ 1                        | CD1c                                   | [109]      |
| V $\delta$ 1 dans le sang                  | CD1d-sulphatide                        | [110, 111] |
| V $\delta$ 1 dans le sang                  | CD1d- $\alpha$ -GalCer                 | [112]      |
| Vy4V $\delta$ 5                            | EPCR                                   | [81]       |
| Divers (0,025% des $\gamma\delta$ du sang) | Phycoérythrine                         | [104]      |
| Vy1.3V $\delta$ 2                          | Histidyl-tRNA-synthétase               | [113]      |
| Vy9V $\delta$ 2                            | F1-ATPase                              | [114]      |
| Vy9V $\delta$ 2                            | Phosphoantigènes-BTN3A1                | [115-118]  |

**Table 1 : Différents ligands de TCR  $\gamma\delta$  murins ou humains.**

MICA/MICB : MHC class I polypeptid-related sequence A ou B ; ULBP : Cytomegalovirus UL16 Binding Protein ; CD1 : Cluster of Differentiation ; EPCR : Endothelial Protein C Receptor.

Les antigènes (Ag) de TCR  $\gamma\delta$  les mieux caractérisés à ce jour, sont les molécules murines T10 et T22, apparentées au CMH de classe I. Elles sont associées à la chaîne  $\beta$ 2m, mais sont incapables de présenter des peptides [119, 120]. Elles sont directement reconnues par le TCR  $\gamma\delta$  [121]. Entre 0,1 à 1% des LT  $\gamma\delta$  chez la souris (IEL ou LT de la rate) peuvent fixer ces molécules. Les LT  $\gamma\delta$  de la rate expriment généralement une chaîne Vy1 ou Vy4 tandis que les IEL utilisent plutôt la chaîne Vy7. Cependant, ces trois types de TCR sont capables de fixer les

molécules T10/122 [122]. Ces résultats suggèrent que la spécificité d'utilisation des chaînes V $\gamma$  reflète l'origine tissulaire plutôt que la spécificité antigénique des LT  $\gamma\delta$ .

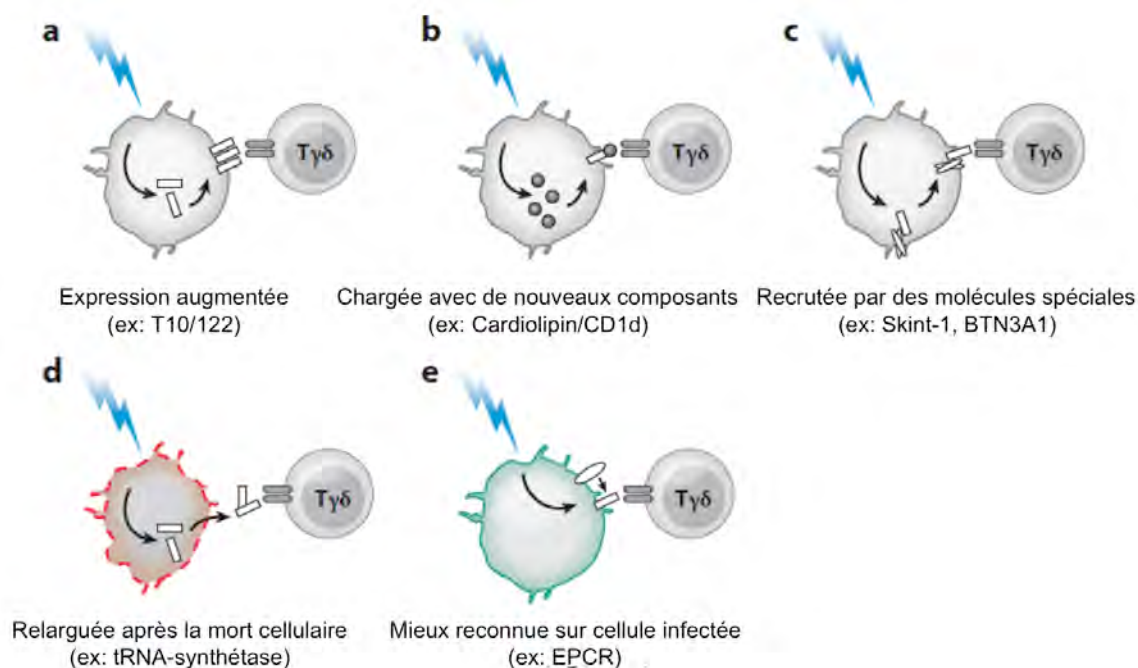
Les molécules MICA et MICB, sont elles aussi des molécules apparentées au CMH de classe I, chez l'Homme. Ce sont des molécules induites par le stress et leur structure est très proche des molécules T10/T22 chez la souris [123]. Elles sont elles aussi reconnues par un TCR  $\gamma\delta$  mais la comparaison s'arrête là. En effet, l'interaction entre MICA et le TCR  $\gamma\delta$  concerné, est beaucoup plus faible et plus lente que l'interaction entre les TCR  $\gamma\delta$  et les molécules T10/T22 [121, 124].

Les LT  $\gamma\delta$  humains sont aussi capable de reconnaître des antigènes lipidiques, comme la cardiolipin, le sulfatide, ou l' $\alpha$ -GalCer, associés à la molécule CD1d [110, 112, 125]. C'est une glycoprotéine qui est aussi apparentée au CMH de classe I. Elle peut présenter des antigènes lipidiques à sa surface. Elle est majoritairement reconnue par les LT portant la chaîne V $\gamma$ 1 et circulants dans le sang. Parallèlement, la molécule EPCR, reconnue par les LT V $\gamma$ 4V $\delta$ 5, possède une homologie significative avec les molécules CD1 et le CMH de classe I.

En résumé, assez peu de ligands de TCR  $\gamma\delta$  ont été identifiés et ils sont tous très différents entre eux, de par leur nature (protéique, lipidique) ou leur structure. Il n'est donc pour l'instant pas possible d'émettre une vision uniforme de la nature des ligands des TCR  $\gamma\delta$ .

### ***b) Régulation de la reconnaissance des antigènes du soi***

De nombreux ligands du TCR  $\gamma\delta$  énoncés précédemment, sont des molécules du Soi. Elles sont donc exprimées de manière constitutive à la surface de cellules saines. Leur capacité à induire une réponse  $\gamma\delta$  est déclenchée ou augmentée lors d'une infection ou d'un stress tumoral dans la cellule. Il y a généralement un seuil à dépasser pour permettre l'activation du LT  $\gamma\delta$ .



**Figure 9 : Modalités de reconnaissance des antigènes du Soi par les LT  $\gamma\delta$ .**

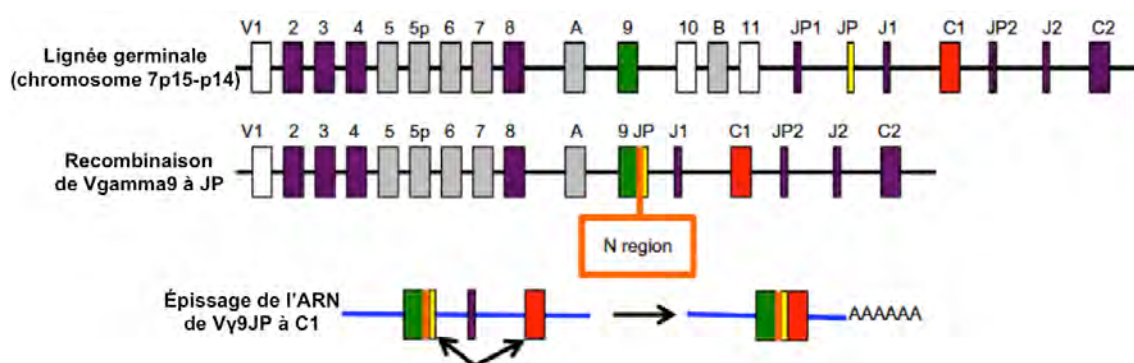
La reconnaissance des molécules du Soi par les LT  $\gamma\delta$  peut être déclenchée/améliorée par : (a) l'augmentation de l'expression de surface comme pour les molécules T10/122 sur les monocytes après une infection par l'Influenza Virus ; (b) l'acquisition de nouveaux composants, d'origine microbienne ou provenant de l'hôte, comme l'association de la cardiolipin avec le CD1d ; (c) le recrutement de protéines de la famille du récepteur B7 comme Skint-1 et BTN3A1 ; (d) le relarguage par apoptose, comme la tRNA-synthétase ; et (e) une meilleure reconnaissance sur les cellules infectées, comme l'EPCR (Endothelial Protein C Receptor). D'après Chien et al, 2014 [87].

Ces molécules du Soi vont utiliser différents mécanismes, détaillés dans la **Figure 9**, afin de déclencher une réponse chez les LT  $\gamma\delta$ . Elles peuvent augmenter leur expression de surface en cas de stress, comme par exemple les molécules T10/122 [126, 127]. Ces molécules peuvent aussi se charger avec de nouveaux composants, d'origine microbienne ou provenant de l'hôte, comme dans le cas du CD1d chargé avec la cardiolipin [125]. Ces mécanismes de reconnaissance peuvent aussi inclure le recrutement de molécules de la famille du récepteur B7, comme Skint1 et BTN3A1 [40, 117]. Des molécules, ordinairement intracellulaires comme les tRNA synthétases ou la F1-ATPase, peuvent se retrouver présentées aux LT  $\gamma\delta$ , du à la transformation ou à la mort des cellules stressées [113, 114]. Certaines molécules, comme l'EPCR, peuvent être beaucoup mieux reconnues quand elles sont exprimées à la surface de cellules infectées [81]. Les cytokines jouent un rôle important aussi, en permettant aux LT  $\gamma\delta$  de reconnaître certaines molécules en leur présence. Cependant certains mécanismes sont encore mal décrits, et en particulier pour le système LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2/ BTN3A1-phosphoantigènes, qui sera plus largement détaillé dans ce document.

## B. Modalités d'activation des LT Vy9Vδ2

### 1. Généralités

Au cours de ce travail de thèse, nous allons nous intéresser à une population particulière de LT  $\gamma\delta$  : les LT Vy9Vδ2 (parfois appelés Vy2Vδ2 selon la nomenclature de Seidman [128]). Ils sont présents seulement chez les primates. Dans cette étude nous allons nous concentrer sur les LT Vy9Vδ2 humains. Ils représentent 1 à 5% des LT CD3+ et jusqu'à 80% des LT  $\gamma\delta$  dans le sang circulant. Ils expriment une chaîne de TCR Vy9 toujours associée à une chaîne Vδ2.



**Figure 10 : Recombinaison et épissage de l'ARN générant la chaîne de TCR Vgamma9-JP-C1.**

Structure du locus de la chaîne gamma humaine et étapes de l'assemblage de la chaîne Vgamma9JPC1. La figure décrit une portion du chromosome 7 (p15-p14) humain et n'est pas dessinée à l'échelle. Dans la lignée germinale sont présents 14 gènes ou pseudogènes de chaînes Vgamma, 5 segments J et 2 régions constantes. Les régions violettes, vertes jaunes et rouges représentent des séquences fonctionnelles. Les régions grises sont des pseudogènes. Les régions blanches sont des cadres de lecture ouverte qui ne sont pas fonctionnels. La région N indique la zone de N addition de nucléotide et identifie la diversité jonctionnelle introduite durant la recombinaison V-J. Les séquences ne possédant pas de région N sont considérées comme germinales. Adapté depuis International ImMunoGeneTics information system® visible sur le site internet suivant : <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/TRGID268.html> (D'après Pauza et al, 2015) [129].

Malgré une diversité jonctionnelle importante, la majorité du répertoire Vy9Vδ2 présente une même recombinaison spécifique de la chaîne Vy9 (**Figure 10**) [130, 131]. Cette chaîne Vy9 subit généralement une recombinaison jusqu'au segment JP, et son ARN est épissé jusqu'au segment C1. Elle forme alors la chaîne Vy9-JP-C1 et s'associe préférentiellement avec la chaîne Vδ2 [132]. Deux hypothèses tentent de justifier l'utilisation préférentielle d'une seule recombinaison VJ. Premièrement, cela pourrait être dû à l'orientation des chaînes Vy en relation avec les segments J [132, 133]. La deuxième hypothèse quand à elle, suggère que la présence majoritaire de

cette population V $\gamma$ 9-JP-C1 est due à une sélection positive dans le sang périphérique en lien avec la spécificité antigénique partagée par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 chez l'adulte [130, 134]. En dépit de cette recombinaison préférentielle de la chaîne V $\gamma$ 9, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 vont tout de même présenter une certaine diversité grâce à la région N du TCR, dans laquelle va se faire des délétions et des additions aléatoires de nucléotides durant la recombinaison V-J [129]. Cette diversité du TCR va se ressentir dans la capacité de prolifération de ces LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 après activation antigénique [135].

Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 commencent à émigrer du thymus au stade fœtal pour aller dans le sang. Alors qu'ils vont représenter la grande majorité des LT  $\gamma\delta$  circulants chez l'adulte, le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 est rarement exprimé par les thymocytes humains [136, 137]. Cette proportion augmente progressivement dans le sang en terme de nombre absolu et en proportion parmi les LT CD3+, jusqu'à l'âge de 8 ans. De plus, en avançant dans l'âge, la proportion de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 exprimant le marqueur mémoire CD45RO+ augmente [138]. Chez l'adulte, la majorité des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 circulants sont des cellules mémoires CD45RO+, tandis que les LT V $\delta$ 1 sont généralement des cellules naïves CD45RA+ [139]. Ces différentes observations supportent l'idée selon laquelle l'augmentation du nombre de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 dans le sang avec l'âge est due à une sélection/expansion extrathymique de ces LT. Plus tard dans la vie d'adulte, la complexité du répertoire circulant de la chaîne V $\gamma$ 9 décline [140], probablement à cause d'une sélection positive continue et de la diminution de la synthèse de nouvelles cellules. De plus, on sait que la sélection positive est active tout au long de la vie adulte car des patients, recevant une greffe de moelle osseuse, sont capables de reconstituer un répertoire de TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 similaire à celui d'individus sains [141, 142].

## **2. Fonctions des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2**

Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 se situent dans en périphérie dans le sang circulant chez l'humain adulte. Ils exercent de nombreuses fonctions, en particulier dans la lutte contre le stress infectieux et tumoral.

### **a) Immunité anti-infectieuse**

Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont capables de s'activer rapidement dans un contexte infectieux et de s'amplifier de manière locale ou systématique [143]. Ils peuvent alors atteindre jusqu'à 80% des LT CD3+ en périphérie en quelques jours seulement [144]. Des données ont montré que ces LT pouvaient être largement amplifiés chez des patients souffrant de diverses infections virales, bactériennes ou parasitaires. Ils peuvent reconnaître une large gamme de bactéries et de parasites. Régulièrement, ces données d'amplification ont été complétées par des études *in vitro* mettant en évidence une activation directe des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 au contact de cellules infectées ou de parasites. Elles ont pu mettre en évidence une large réactivité des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 vis-à-vis de bactéries gram+ (la plupart des mycobactéries [145, 146], et *Listeria monocytogenes* [147]), et de bactéries gram- (*Brucella melitensis* [148], *Escherichia coli* [149], *Francisella tularensis* [150], *Salmonella typhimurium* [151] et *Yersinia enterocolitica* [152]). Au niveau des parasites, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont capables de reconnaître *Plasmodium falciparum* [153], *Leishmania brasiliensis* [154] et *Toxoplasma gondii* [155].

La réactivité anti-virale des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 est, quand à elle, moins bien caractérisée en comparaison avec celle des LT V $\delta$ 2- et du CMV. Cependant, l'amplification périphérique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, associée parfois à une activité antivirale a été montrée dans certaines infections par le coronavirus [156], le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) [157, 158], l'HCV (Virus de l'Hépatite C) [159, 160], le virus de la grippe [161-163] et l'EBV (Virus Epstein-Barr) [164]. Dans le cas des infections par le VIH ou l'HCV, on observe généralement une diminution du nombre de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 circulants avec le temps, associée à une anergie fonctionnelle de ces cellules [165]. La plupart des activités antivirales décrites, l'ont été *in vitro* et doivent être encore confirmées *in vivo*.

### **b) Surveillance des tumeurs**

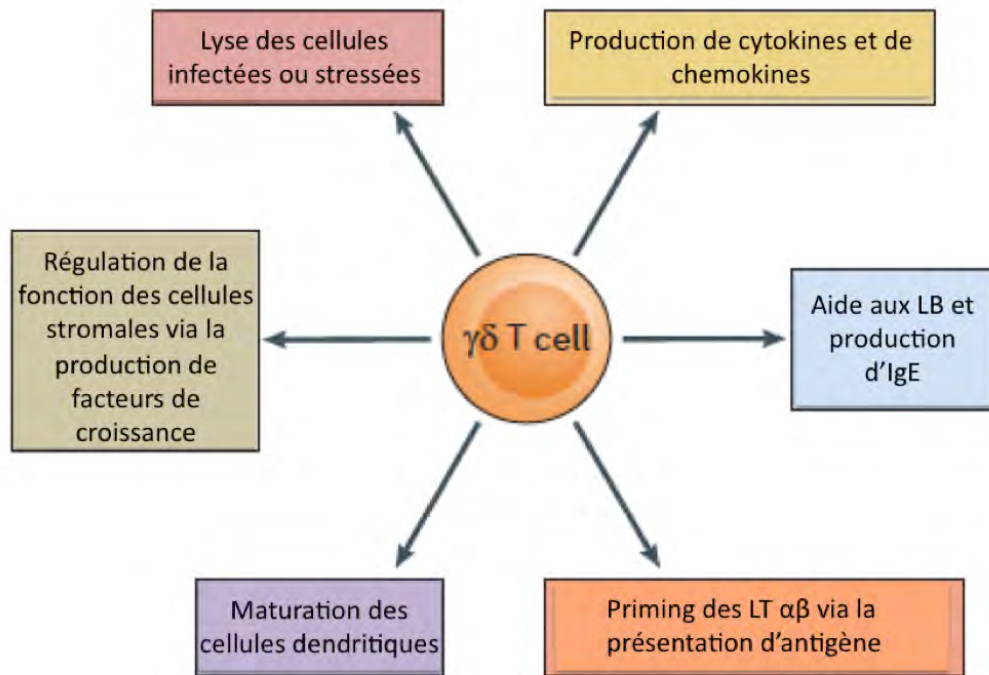
Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ont été surtout étudiés pour leur capacité anti-tumorale à la fois *in vitro* et *in vivo*. Leur activité anti-tumorale a tout d'abord été démontrée vis-à-vis de tumeurs hématopoïétiques comme la lignée Daudi issue de lymphome de

Burkitt [166]. Ils sont capables de reconnaître d'autres cancers circulants comme le myélome [167], le lymphome thymique et l'érythroleucémie [168]. Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont capables de lyser *in vitro* ces différentes lignées de cancer et peuvent s'amplifier fortement en périphérie *in vivo* chez les patients atteints. Par la suite, cette activité anti-tumorale *in vitro* a été confirmée dans de nombreux autres types de tumeurs solides d'origines diverses : sein [169, 170], rein [171, 172], mélanome [20], colon [173], pancréas [174], prostate [175] et poumons [176]. Il a également été montré *in vivo* que les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 infiltraient un grand nombre de ces tumeurs. Par la suite, afin de démontrer le potentiel anti-tumoral des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 *in vivo*, des modèles de souris immunodéprimées SCID (ImmunoDéficiency Combinée Sévère) dans lesquelles ont été « reconstitué » un système immunitaire « humain » par injection de PBMC (Cellules Mononuclées du Sang Périphérique), ont été utilisées. Ces souris ont été greffées avec divers carcinomes humains (nasopharynx [177], pancréatique [178], vessie [179]), des tumeurs du sein [180] ou des mélanomes [178]. En règle générale, il a été observé une infiltration des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 au sein des tumeurs, une diminution de la progression de celles-ci et une augmentation de la survie des souris traitées. Cependant la réactivité des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 *in vivo* ou envers des tumeurs fraîches semble moins efficace que celle envers les lignées tumorales.

Toutes ces démonstrations *in vitro* et *in vivo* avaient pour but final d'amener les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 à être exploités dans des protocoles d'immunothérapies anti-cancéreuses chez l'Homme. Divers essais cliniques ont été entrepris, sur des patients de cancers hématologiques ou de tumeurs solides. Ces essais utilisent généralement deux stratégies différentes : soit le transfert adoptif de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 autologues préalablement amplifiés *ex vivo*, soit l'amplification directement *in vivo* chez le patient, en utilisant des traitement activateurs des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 (décrit plus tard dans cette introduction). Des résultats encourageants ont été obtenus avec parfois même des régressions tumorales. Cependant, de nombreux patients ne répondent pas à ces traitements [181]. Diverses raisons peuvent être avancées dont l'épuisement des réponses des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 et l'équilibre difficile pour les traitements IL-2 et ABP entre efficacité et toxicité. Cela justifie le fait que les mécanismes d'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 doivent être décrits de manière plus précise afin d'augmenter l'efficacité de ces traitements.

### c) Fonctions effectrices

Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 présentent les fonctions effectrices majoritaires des LT  $\gamma\delta$ , décrites dans la partie précédente (pour rappel, voici la **Figure 5** présentée précédemment et résumant ces fonctions).



**Figure 5 : Fonctions effectrices majeures des LT  $\gamma\delta$ .**

Les LT  $\gamma\delta$  ont un rôle central dans la défense de l'hôte vis-à-vis du stress infectieux et tumoral. Ils sont capables de mettre en place six mécanismes majeurs. 1) Les LT  $\gamma\delta$  peuvent lyser directement et éliminer les cellules infectées ou stressées via la production de granzymes. 2) Elles produisent un large panel de cytokines et de chemokines afin de réguler les autres cellules (du système immunitaire ou non). 3) Elles peuvent venir en aide aux LB et promouvoir la production d'IgE. 4) Elles permettent le priming des LT  $\alpha\beta$  via la présentation d'antigènes. 5) Elles peuvent déclencher la maturation des cellules dendritique (DC). 6) Elles peuvent réguler la fonction des cellules stromales via la production de facteurs de croissance (d'après Vantourout et al, 2013) [38].

Après activation antigénique, ils mettent en place une réponse de type Th1 [182-184]. Celle-ci se caractérise par une production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  ainsi qu'une forte activité cytotoxique [185, 186]. Cependant, des études *in vitro* ont montré que les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 pouvaient se polariser différemment en fonction des cytokines présentes et du signal du TCR  $\gamma\delta$ . À la place d'un phénotype Th1, ils peuvent exprimer des fonctions effectrices de type Th2, Th17, Tfh (T helper folliculaire) ou Treg [187-191]. Les conditions permettant l'une ou l'autre de ces polarisation sont résumées dans le tableau suivant (**Table 2**).

| Sous population de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2                     | Activation du TCR | Cytokines                                                  | Facteurs de transcription de polarisation                                                                    | Molécules effectrices         | réfs       |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|------------|
| LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 du sang chez l'adulte                  | +                 | IL-12 ou IL-18                                             | <i>T-bet</i> Th1-like, <i>eomesodermin</i>                                                                   | IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ | [187]      |
|                                                                    | +                 | IL-4                                                       | <i>Gata-3</i> Th2-like                                                                                       | IL-4                          | [187]      |
|                                                                    | +                 | IL-15 + TGF- $\beta$                                       | <i>Foxp3</i> Treg-like                                                                                       | IL-10, TGF- $\beta$           | [191]      |
|                                                                    | +                 | IL-6 + IL-23 + IL-1 $\beta$ + TGF- $\beta$ + agonistes Ahr | <i>ROR<math>\gamma</math>t</i> Th17-like                                                                     | IL-17                         | [192]      |
|                                                                    | +                 | IL-23 + IL-1 $\beta$ + TGF- $\beta$                        | <i>ROR<math>\gamma</math>t</i> Th1/17 like, <i>ROR<math>\gamma</math>t</i> , <i>T-bet</i> Th22, <i>FOXO4</i> | IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-22  | [193]      |
|                                                                    | +                 | IL-2                                                       | Fonctions APC <i>ND</i>                                                                                      | CMH classes I et II           | [194, 195] |
| LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 du sang et des amygdales chez l'adulte | +                 | IL-21                                                      | <i>Bcl6</i> Tfh-like                                                                                         | IL-4, IL-10, CXCL13           | [189, 190] |
| LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 de type Th1                            | -                 | IFN de type I                                              | <i>ND</i> Th1-like                                                                                           | IFN- $\gamma$                 | [196]      |
| LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 de sang de cordon                      | +                 | IL-6 + IL-1 $\beta$ + TGF- $\beta$                         | Th17-like, <i>ROR<math>\gamma</math>t</i> Th22-like, <i>FOXO4</i>                                            | IL-17, IL-22                  | [193]      |
|                                                                    | +                 | IL-6 + IL-1 $\beta$ + TGF- $\beta$ + IL-23                 | <i>ROR<math>\gamma</math>t</i> , <i>T-bet</i> Th1/17-like                                                    | IFN- $\gamma$ , IL-17         | [193]      |

**Table 2 : Plasticité fonctionnelle des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2**  
(Adapté de Lafont et al, 2014 [197])

En plus de cette plasticité fonctionnelle, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 vont aider au contrôle de l'infection en interagissant finement avec les autres cellules de l'immunité présentes.

### (1) Maturation des DC

Premièrement, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 peuvent aider à la maturation des DC. La maturation des DC est généralement déclenchée via la reconnaissance de signaux de danger par leurs TLR. Cependant, elle peut aussi être déclenchée par le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  [198]. Des données récentes ont montrées que les NK sont capables de stimuler la capacité de cross-présentation des DC via la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  [199]. Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont une source significative de ces deux cytokines. Ils est donc probable qu'ils puissent influencer eux aussi ce processus. Diverses études *in vitro* de co-culture de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 activés avec des DC immatures montrent une augmentation de l'expression de marqueurs APC et de molécules de co-stimulation. Des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 activés peuvent stimuler l'expression de HLA-DR, CD86 et CD83 sur des DC immatures, en l'absence d'autres stimuli [200]. Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 peuvent aussi induire, suivant les conditions de culture, l'expression de CMH de classe I, CD25, CD40, CD80 ainsi que l'augmentation de l'expression de CCR7 sur les DC [201-

204]. En retour, les DC vont activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par des mécanismes TCR-indépendants, majoritairement via la production d'IFNs de type I [196, 205, 206]. Cela aura pour effet d'induire la prolifération des LT [207], et d'augmenter leur production de médiateurs cytotoxique et pro-inflammatoire comme la perforine, l'INF- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  [201, 205, 208]. Ce système d'entraide entre les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 et les DC a fait l'objet de nombreuses études. Des données récentes *in vitro*, ont montré que des DC infectées par *Mycobacterium tuberculosis* ou *Brucella*, et dont la maturation était incomplète ou inhibée, pouvaient activer des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 et devenir complètement matures par la suite [209, 210]. Divers essais fonctionnels ont montré que les DC devenues matures grâce aux LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, peuvent ensuite polariser des LT CD4<sup>+</sup> vers un phénotype Th1 [211]. Cependant, au vu de la plasticité fonctionnelle des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, il reste à étudier si dans certaines conditions, ils ne peuvent pas mener les DC à polariser les LT CD4<sup>+</sup> naïfs en d'autres phénotypes (Th2, Th17, Th22 ou Treg).

## (2) Différentiation des monocytes

Chez l'humain, il a été montré *in vitro* que les monocytes sont capables de se différencier en DC, quand ils sont en présence de GM-CSF et d'IL-4 [212]. Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont capables d'activer les monocytes grâce à leur sécrétion d'INF- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$ , de GM-CSF et d'IL-4 [182, 187, 188, 213]. Diverses études *in vitro* ont montré que la co-culture de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 activés avec des monocytes induisait des changements morphologiques des monocytes [214], ainsi que l'expression à leur surface de marqueurs APC (ex : CD40, CD86 et HLA-DR) et de marqueurs DC (ex : CD83 et CD209) [215]. Le phénotype exprimé par les monocytes activés est ainsi très proche de celui des DC inflammatoires. Ils sont ensuite capables de présenter des protéines bactériennes ou des superantigènes à des LT CD4<sup>+</sup> induisant chez eux la sécrétion d'INF- $\gamma$  [215]. Ces données sont soutenues par des observations faites *in vivo*, lors d'essais cliniques. Par exemple, on a pu observer une augmentation de l'expression de surface des marqueurs CD14, CD40, CD80 et d'HLA-DR sur les monocytes CD14<sup>+</sup> circulants chez des patients après administration de zolédronate afin de traiter leur ostéoporose, hors le zolédronate est capable d'activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 [216]. Il semble donc y avoir un lien *in vivo* entre activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 et activation des monocytes. Les mécanismes d'action du zolédronate vis-à-vis des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 seront discutés par la suite.

### (3) Interactions avec les neutrophiles

Les neutrophiles font partie des premières cellules de l'immunité à être recrutées sur un site inflammatoire, en particulier lors d'infections bactériennes. Une fois activés, ils peuvent exprimer différents phénotypes et avoir des fonctions diverses dont celle de faciliter la différenciation des monocytes et la maturation des DC, mais ils peuvent aussi interagir avec les LT [217-219]. Chez l'humain, dans des contextes infectieux ou inflammatoire, les neutrophiles peuvent exprimer du CMH de classe II ainsi que d'autres marqueurs de surface liés aux cellules APC [220, 221]. Les neutrophiles et les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont généralement co-recrutés sur les sites infectieux et vont donc pouvoir interagir ensemble. Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 activés vont induire la chimiotaxie et la phagocytose des neutrophiles [192, 222]. En retour ils vont pouvoir devenir senseurs des composés microbiens relargués par la phagocytose des neutrophiles. Cette idée d'échange entre les deux populations immunes est soutenue par des résultats récents obtenus par Davey et al. Dans un système *in vitro* de co-culture de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 activés avec des neutrophiles, ils ont mis en évidence un effet anti-apoptotique des LT sur les neutrophiles [143]. De plus, les neutrophiles se sont aussi mis à exprimer de nombreux marqueurs liés aux cellules APC comme CD40, CD54, CD64, CD83 ainsi que des molécules du CMH de classe I et II. Ces neutrophiles ont ensuite été capables de présenter des antigènes et d'activer des LT CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> [223]. Ces données supportent un modèle dans lequel les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 seraient capable de réagir rapidement à des composés microbiens relâchés après phagocytose par les neutrophiles, et en retour, ils pourraient induire la différenciation des neutrophiles en APC, via la production de GM-CSF, d'INF- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ .

### (4) Aide aux LB

Lors d'une infection, les LB vont subir l'hypermutation somatique, la commutation isotypique et la maturation d'affinité dans les centres germinatifs, afin de produire des anticorps spécifiques, clés de la réponse humorale. La mise en œuvre de ces processus nécessite généralement la présence de LT appelés T<sub>FH</sub> pour Follicular Helper [224, 225]. De nombreuses données suggèrent que cette fonction de T<sub>FH</sub> n'est pas seulement attribuable aux LT CD4<sup>+</sup>. En effet, des patients

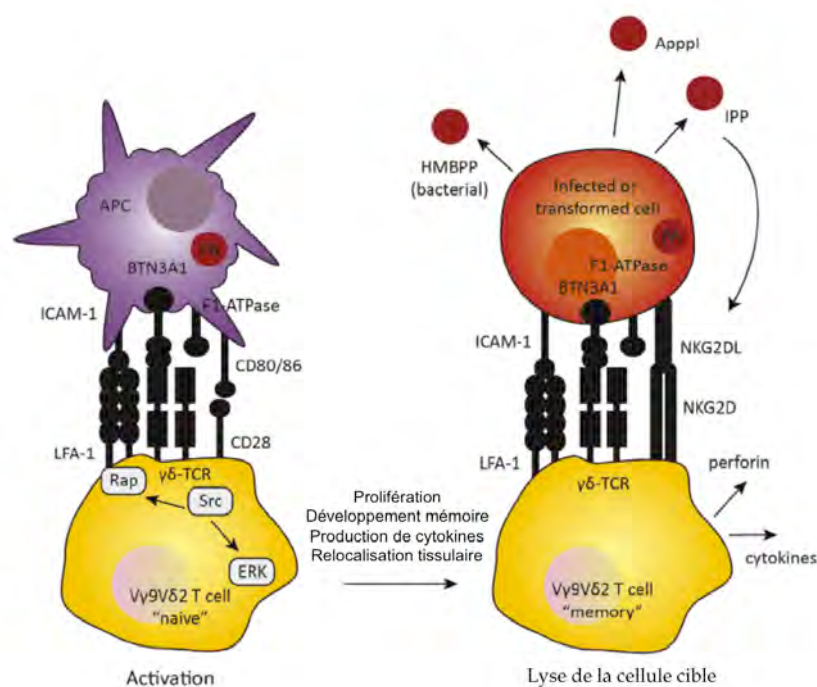
ayant une déficience en LT  $\alpha\beta$ , présentent toujours une production normale, voir élevée, d'anticorps, signe que les LT  $\gamma\delta$  doivent aussi assumer une partie du travail [76, 226, 227]. Des données *in vitro* ont montrées que les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 activés pouvaient aider les LB via l'expression de CD40L, ICOS (Inducible T Cell Co-Stimulator) et la production d'IL-4 et d'IL-10 [60, 228], qui sont essentiel au maintien des centres germinatifs. D'autres résultats ont mis en évidence la capacité des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 à agir en collaboration avec les LT  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> pour réguler le recrutement des cellules dans les centres germinatifs [189, 190]. Ces LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 activés peuvent aussi induire l'expression de marqueurs APC sur les LB, comme CD40, CD86 et HLA-DR, permettant ainsi aux LB de mieux interagir avec les LT<sub>FH</sub> [66, 189].

#### (5) Activation des LT $\alpha\beta$ : fonction d'APC

En plus de leur capacité à promouvoir la maturation des DC et induire des caractéristiques d'APC chez les monocytes, les neutrophiles et les LB, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 peuvent agir directement en tant qu'APC et activer les LT  $\alpha\beta$  [61]. Ils sont capables de devenir des APC professionnelles en assimilant des antigènes exogènes via des processus d'endocytose [63] ou de phagocytose [229], et en les présentant à des LT CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> naïfs [61, 62]. Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 activés vont pouvoir charger des antigènes exogènes sur leurs CMH de classe I et II [230, 231]. Ils induisent ensuite généralement une polarisation des LT CD4<sup>+</sup> en Th1 en raison de leur production de cytokines pro-inflammatoire mais reste à être étudié en détail du fait de la plasticité fonctionnelle des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Certaines données ont montré que les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 pouvaient inhiber leurs fonctions cytotoxiques dès lors qu'ils acquièrent la fonction d'APC [232]. Ils ont donc suggéré un modèle dans lequel les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 lysaient les cellules stressées ou activées pour ensuite récupérer les protéines relarguées et les présenter comme antigènes aux LT LT CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Si ce modèle s'avère exact, cela pourrait ouvrir de nombreuses voies dans l'utilisation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 dans des protocoles d'immunothérapies ou de vaccins [233, 234]. La majorité de ces informations a été observées *in vitro*. Il faudrait donc confirmer *in vivo* ce rôle d'APC joué par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 dans des conditions physiologiques ou infectieuses. Seules des données indirectes ont pu être obtenues, comme l'observation de l'augmentation de l'expression d'HLA-DR par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 activés, chez des patients infectés ou présentant une inflammation [147, 235, 236].

### 3. Régulation du signal : co-récepteurs/molécules d'adhésion

En plus du signal TCR, l'engagement d'autres co-récepteurs est nécessaire à la régulation de l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 expriment les mêmes co-récepteurs que les LT  $\gamma\delta$  en général. Ces récepteurs ont été décrits dans la partie A.6 de cette introduction. La régulation du signal passe généralement par les récepteurs aux cytokines, les co-récepteurs, les TLR, les NKR activateurs ou inhibiteurs, les récepteurs Fc et les molécules d'adhésion (**Figure 11**).



**Figure 11 : Synapses immunitaire et lytique formées par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.**

Durant l'activation, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 interagissent avec des cellules présentatrices de PAg, induisant un signal TCR. L'interaction est initiée quand le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 reconnaît des cellules exprimant un complexe BTN3A1/PAg. La co-stimulation du récepteur CD28 par CD80/86 est nécessaire, et cette interaction est stabilisée par l'interaction entre LFA-1 et ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1). La signalisation via les kinases Src va promouvoir l'activation de LFA-1 et des changements transcriptionnels médiés par ERK, induisant ainsi la prolifération et la production de cytokines. Quand un LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 rencontre une cellule cible exprimant un ligand de NKG2D et des PAg, une lyse de la cellule cible médiée par la perforine va s'ensuivre. D'après Wiemer et al, 2014 [237].

Les récepteurs aux cytokines vont permettre d'obtenir une prolifération maximale, en particulier via la fixation de l'IL-2 [238]. Le signal de costimulation via le récepteur CD28 est nécessaire à la prolifération. En effet quand on bloque les molécules CD80/86 par des anticorps, cela inhibe la prolifération des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 induite par les PAg [239]. Après activation, en plus de leur expansion, les LT

V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont capables de lyser directement la cellule cible. Cette activité cytotoxique est médiée par le récepteur NKG2D présent sur le LT. Celui-ci est capable de reconnaître des ligands induits par le stress sur la cellule cible (ex : molécules de la famille du CMH MICA ou MICB). La fonction cytotoxique est dépendante de NKG2D mais elle fonctionne en synergie avec la reconnaissance des PAgS par le TCR. Lorsque bloque l'un ou l'autre de ces récepteurs, cela diminue partiellement la capacité cytotoxique du LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 [91, 240].

Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 expriment également des récepteurs aux fragments Fc des Ig (Fc $\gamma$ RIIIA/CD16). Ces récepteurs sont également présents sur les cellules NK et ont un rôle dans leur activité cytotoxique via l'ADCC (Antibody Dependant Cell-mediated Cytotoxicity). Chez les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, la stimulation de ce récepteur entraîne une augmentation de la production de TNF après activation du TCR par les PAgS [241]. Des résultats *in vitro* plus récents ont montrés que la stimulation de ce récepteur augmente la capacité cytotoxique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en présence de diverses cellules tumorales [242, 243].

Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 expriment aussi des molécules d'adhésion qui vont participer à la formation et à la stabilisation de la synapse immunologique. Les trois complexes suivant ont été identifiés comme jouant un rôle dans l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 : LFA-1/ICAM-1, CD2/LFA-3 et CD6/CD166 [244]. La plus importante de ces molécules d'adhésion est LFA-1. L'interaction LFA-1/ICAM-1 est nécessaire mais pas suffisante à l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 [245]. L'engagement de ce récepteur serait impliqué dans l'action cytotoxique du LT mais n'aurait pas d'effet sur sa prolifération et sa production de cytokines [246, 247]. À l'inverse, l'engagement de la molécule CD2 influencerait la production de cytokines et la prolifération du LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 mais n'impacterait pas son activité cytotoxique [246]. L'engagement du récepteur CD6 par la molécule CD166 semble jouer un rôle activateur pour le LT. L'équipe de Y. Kato a montré une corrélation entre le taux d'expression de CD166 sur les cellules cibles et la capacité de ces cellules à activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Une fois formé, ce complexe CD6/CD166 va être recruté au centre de la synapse immunologique et être colocalisé avec le complexe TCR/CD3. Ces molécules d'adhésion vont donc jouer un rôle important dans la stabilisation de la synapse immunologique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 [248].

#### 4. L'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 : rôle des PAg

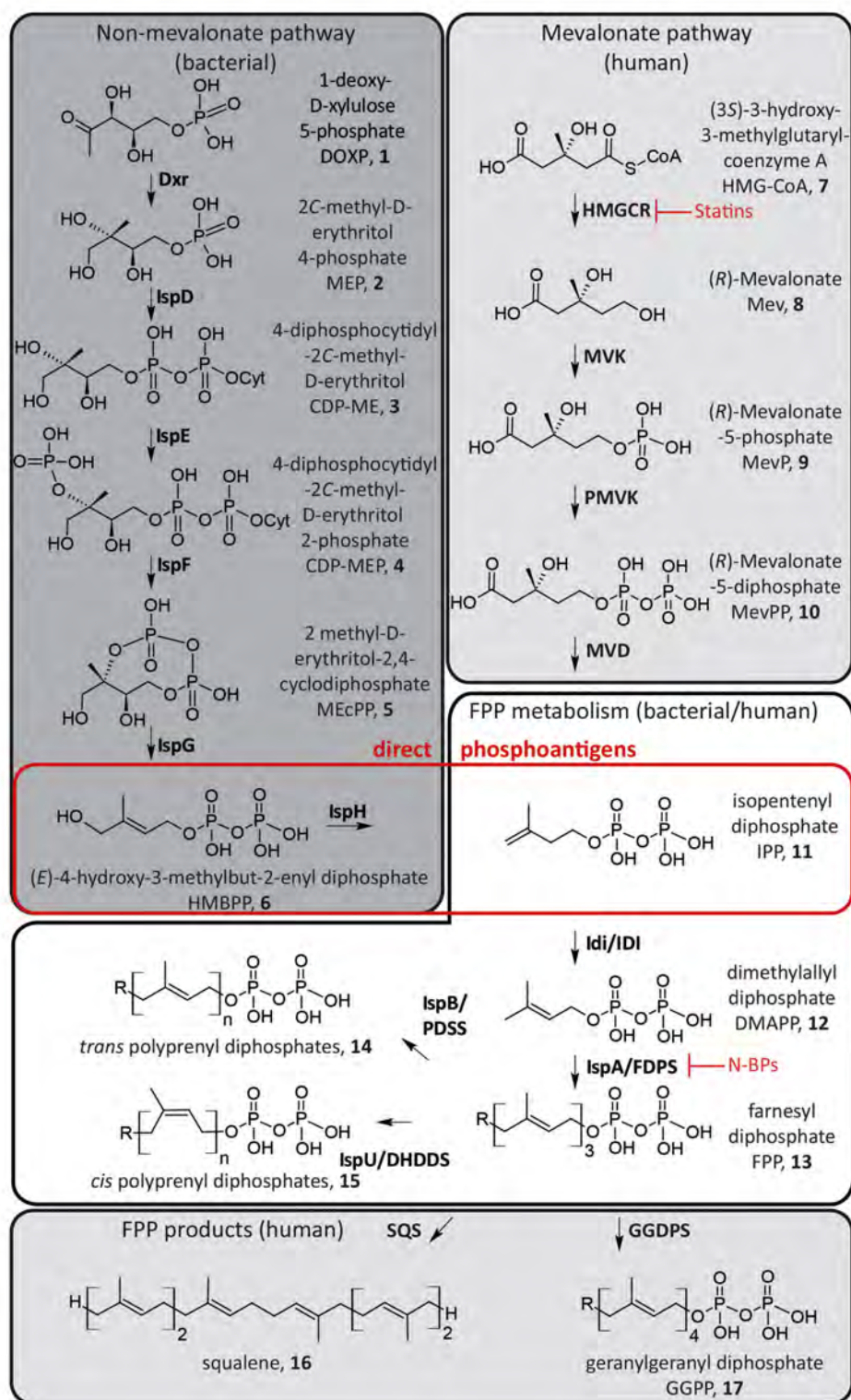
Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ont de nombreux contextes activateurs. Ils peuvent reconnaître des cellules infectées tout comme des cellules tumorales. Cependant, malgré une diversité jonctionnelle très grande en théorie, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 dans le sang chez l'adulte expriment des caractéristiques jonctionnelles communes, probablement à cause d'une sélection en périphérie. Ils doivent donc être capable de reconnaître des antigènes apparentés de structure proche. L'activation antigénique du LT est déclenchée par la reconnaissance et l'engagement de son TCR avec un antigène exprimé à la surface des cellules cibles.

##### a) **Découverte**

Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 se sont avérés capables de réagir *in vitro*, vis-à-vis d'extraits bactériens dont *Mycobacterium tuberculosis*. C'est en isolant et en étudiant la composition de ces extraits bactériens que l'on a pu mettre en évidence les premiers antigènes des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Il s'agissait de carbohydrates de faible poids moléculaire, capable de se lier aux lectines et résistant aux protéases [249]. Ces antigènes, nommés TUBag 1-4 (Tuberculosis antigen 1 à 4), ont été ensuite caractérisés structurellement, et contenaient tous un groupement pyrophosphate indispensable pour leur activité activatrice [115]. On les a donc appelés phosphoantigènes ou PAg. Par la suite, une équipe a purifié et identifié un de ces antigènes comme étant de l'IPP (Isopentenyl PyroPhosphate) [250]. L'IPP est un intermédiaire central des voies de synthèse des isoprénoïdes. Les isoprénoïdes sont essentiels au métabolisme cellulaire, et de nombreux composés dérivent de cette voie (ex : cholestérol, hormones stéroïdiennes, vitamines). L'IPP est donc naturellement produit chez tous les êtres vivants, eucaryotes ou procaryotes, expliquant donc ainsi en partie la large réactivité des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 pour de nombreux pathogènes.

La synthèse d'IPP peut passer par deux voies métaboliques différentes suivant les organismes (**Figure 12**). Chez les eucaryotes (animaux et plantes) et les Archaeobactéries, elle passe par la voie des mévalonates (ou MVA). Le mévalonate, produit par l'enzyme HMG-CoA ( $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -MethylGlutaryl-Coenzyme A), est un intermédiaire clé de cette voie. La deuxième voie est appelée DOXP/MEP à cause de ses 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> intermédiaires (respectivement, 1-DeOxy-D-Xylulose-5-Phosphate et 1-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphate). Elle est retrouvée chez la plupart des Eubactéries et des parasites protozoaires [251]. Il a donc été suggéré que les autres antigènes reconnus par les LT Vy9V $\delta$ 2 dans les extraits mycobactériens seraient des intermédiaires de cette voie [252, 253]. Ainsi, l'équipe de Jomaa a pu mettre en évidence un intermédiaire clé de cette voie pour l'activation des LT Vy9V $\delta$ 2 : l'HMBPP ((E)-4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl pyrophosphate) [254]. En se basant sur l'antigénicité de diverses espèces bactériennes, ils ont montré qu'en supprimant deux enzymes en amont de la voie DOXP/MEP, cela inhibait la reconnaissance par les LT Vy9V $\delta$ 2, tandis que la suppression d'une enzyme terminale de cette voie augmentait fortement la reconnaissance par les LT [254, 255]. Dans le deuxième cas, l'antigène accumulé s'est avéré être l'HMBPP [256].

L'HMBPP a une bioactivité 30 000 fois plus forte que l'IPP, permettant ainsi de discriminer efficacement les cellules saines des cellules infectées. L'IPP quant à lui, du fait de son caractère ubiquitaire, est produit naturellement dans les cellules mammaliennes. Il s'agit donc par conséquent d'un Ag du Soi. Il a été montré qu'il joue un rôle dans la reconnaissance des cellules tumorales par les LT Vy9V $\delta$ 2. En effet, les cellules tumorales montrent une dérégulation de la voie des mévalonates et donc une augmentation de la concentration intracellulaire en IPP [257]. C'est cette augmentation qui permettrait aux LT Vy9V $\delta$ 2 de discriminer les cellules saines des cellules stressées, dont les cellules tumorales [258]. C'est le cas de la lignée Daudi (lymphome de Burkitt) dont la reconnaissance par les LT Vy9V $\delta$ 2 est directement corrélée avec la production d'IPP [258].



**Figure 12 : Synthèse des isoprénoides chez la bactérie et l'humain.**

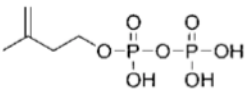
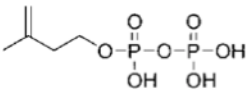
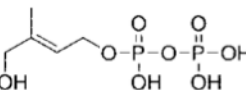
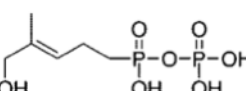
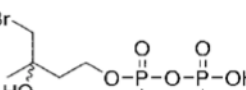
Les bactéries produisent les isoprénoides via la voie DOXP/MEP (non mévalonate), tandis que les humains produisent les isoprénoides via la voie des mévalonates (MVA). Les phosphoantigènes HMBPP et IPP sont des intermédiaires de la voie de synthèse des isoprénoides. Abréviations : HMGCR : HMG-CoA Réductase ; MVK : Mévalonate Kinase ; PMVK : PhosphoMévalonate Kinase ; MVD : Phosphomévalonate Décarboxylase ; IDI : Ipp Isomérase ; FDPS : Farnesyl DiPhosphate Synthase ; GGDPS : GeranylGeranyl DiPhosphate Synthase ; SQS : Squalène Synthase ; DHDDS : DeHydrodolichyl DiPhosphate Synthase ; PDSS Polyprenyl DiPhosphate Synthase ; FPP, Farnesyl DiPhosphate. D'après Wiemer et al, 2014 [237].

## b) Molécules agonistes des LT Vy9Vδ2

Les molécules capables d'activer les LT Vy9Vδ2 peuvent être séparées en deux catégories : les molécules activatrices directes et les molécules activatrices indirectes.

### (1) Molécules activatrices directes

La première catégorie contient les PAg au sens propre du terme. Elle regroupe des intermédiaires de la voie des isoprénoïdes produites par les microorganismes, les plantes ou les animaux. Elle contient également leurs équivalents synthétiques produits chimiquement. Les composés les plus connus et les mieux caractérisés sont représentés dans la **Figure 13**.

| Phosphoantigènes                                                                                                    | EC50     | Molécule                                                                             | Type                                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| IPP<br>Isopentenyl pyrophosphate                                                                                    | 50-500μM |  | Naturel<br>(Vertébrés)                    |
| DMAPP<br>Dimethylallyl pyrophosphate                                                                                | 0,23μM   |  | Naturel<br>(Vertébrés et microorganismes) |
| HDMAPP / HMBPP<br>(2E)-1-hydroxy-2-methyl-but-2-enyl 4-diphosphate / (E)-4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl pyrophosphate | 39-70pM  |  | Naturel<br>(Microorganismes)              |
| C-HDMAPP<br>(2E)-1-hydroxy-2-methylpent-2-enyl-pyrophosphonate<br><i>Picostim</i>                                   | 91pM     |  | Synthétique                               |
| BrHPP<br>Bromohydrin d'isopentenyl pyrophosphate<br><i>Phosphostim</i>                                              | 20-50nM  |  | Synthétique                               |

**Figure 13 : Exemples de phosphoantigènes caractérisés, induisant l'activation des LT Vy9Vδ2.** Ces phosphoantigènes sont soit d'origine naturelle, soit d'origine synthétique. Ils peuvent induire différents degrés d'activation des LT Vy9Vδ2, avec des valeurs d'EC50 qui peuvent varier suivant les donneurs humains. Les EC 50 proviennent des références suivantes : [259-262]. D'après Harly et al, 2015 [263].

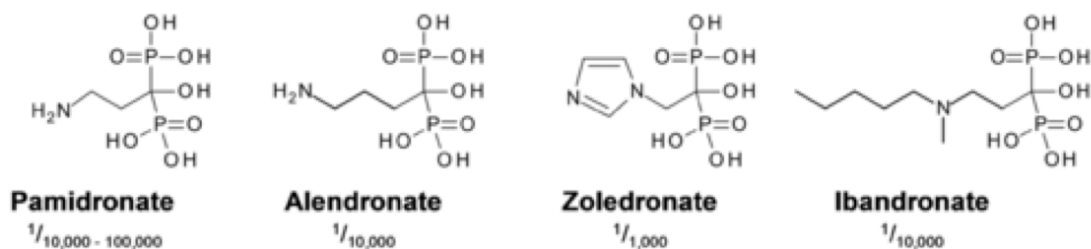
L'HMBPP (ou HDMAPP (2E)-1-hydroxy-2-méthyl-but-2-enyl-4-diphosphate) et l'IPP sont les PAg principaux les mieux caractérisés à ce jour. L'HMBPP est synthétisé chez les bactéries et permet la reconnaissance des cellules infectées, tandis que l'IPP est produit de manière ubiquitaire et permet la reconnaissance des cellules tumorales par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Le DMAPP (DiMéthylallyl PyroPhosphate) est un isomère de l'IPP. Il est lui aussi exprimé dans les cellules humaines et joue un rôle dans la reconnaissance des cellules tumorales par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 [258]. Le c-HDMAPP et le BrHPP (BromoHydrine PyroPhosphate) sont des analogues synthétiques des phosphoantigènes naturels. Ils sont produits et commercialisés par la société Innate Pharma, sous les noms de Picostim et Phosphostim, respectivement. Divers composés phosphorylés non naturels ont été synthétisés au cours du temps, mais le c-HDMAPP et le BrHPP restent les plus connus et sont utilisés en essais cliniques [264-266]. Le BrHPP en particulier permet d'amplifier les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 à partir de PBL du sang jusqu'à 95% [259].

Ces PAg synthétiques ont été comparés aux PAg naturels en terme d'activité agoniste vis-à-vis des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 [259, 267]. Ces études ont pu mettre en évidence des caractéristiques structurales essentielles à l'antigénicité des PAg. La présence d'un groupement pyrophosphate est nécessaire et la vitesse de son hydrolyse est corrélée à l'activité biologique du composé [264, 268]. La perte d'un phosphate du groupement pyrophosphate diminue l'activité du PAg de 20 à 240 fois [269]. Ces différents PAg ont toute une gamme d'activité agoniste en terme d'EC<sub>50</sub> en fonction des groupements qu'ils possèdent. Ces EC<sub>50</sub> peuvent aussi varier en fonction des donneurs humains de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. L'HMBPP reste à ce jour le PAg naturel le plus puissant identifié en terme d'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

## (2) Molécules activatrices indirectes

Cette deuxième catégorie renferme des composés capables d'inhiber des enzymes de la voie de synthèse des isoprénoïdes. Cela va avoir pour conséquence l'accumulation d'IPP dans les cellules, induisant ainsi de manière indirecte l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Cette catégorie regroupe les aminobisphosphonates (ABP) et les alkylamines.

Les aminobisphosphonates (ABP) font partie de la famille des bisphosphonates. Ce sont des composés pharmacologiques utilisés notamment contre la résorption osseuse. Ils sont généralement administrés dans le cadre de traitements contre la maladie de Paget [270], des tumeurs osseuses [271-274] et l'ostéoporose [275]. Le mécanisme d'action des ABP est basé sur l'inhibition de l'enzyme Farnesyl DiPhosphate Synthase (FDPS) [276]. Pour rappel, la FDPS est une enzyme de la voie de synthèse des isoprénoïdes qui transforme l'IPP en FPP (Farnesyl DiPhosphate) (voir **Figure 12**). L'inhibition de la FDPS par les ABP va mener à la diminution de synthèse de FPP. Cela va entraîner la perte de prénylation des protéines GTP menant ainsi à l'apoptose des ostéoclastes et des cellules tumorales [277, 278]. L'effet activateur des ABP vis-à-vis des LT Vγ9Vδ2 a été décrit pour la première fois chez des patients traités avec du pamidronate. Après leur premier traitement, ces patients présentaient une réaction de phase aiguë avec une augmentation du nombre de LT Vγ9Vδ2 circulants [279]. Par la suite, des études ont montré une corrélation absolue entre l'inhibition de la FDPS et l'activation des LT Vγ9Vδ2 [280]. Les ABP sont capables d'activer indirectement les LT Vγ9Vδ2 car l'inhibition de la FDPS va mener à l'accumulation d'IPP dans les cellules. Les LT Vγ9Vδ2 ne vont donc pas reconnaître directement les ABP mais plutôt l'accumulation d'IPP endogène induite par l'inhibition de la FDPS. Des preuves de cette voie d'activation indirecte des LT Vγ9Vδ2 par les ABP ont été apportées en premier par l'équipe de Gober. Ils ont montré que l'activation des LT Vγ9Vδ2 par l'ABP Zolédronate pouvait être bloqué par de la Mevastatin [258]. La Mevastatin est un composé pharmacologique de la famille des statines. Ces molécules sont capables d'inhiber l'enzyme HMG-CoA réductase. Cette enzyme est présente en amont dans la voie des mévalonates. Son inhibition par les statines va donc empêcher la production d'IPP (voir **Figure 12**) [281]. L'accumulation d'IPP induite par les ABP est donc bloquée par les statines, et les LT Vγ9Vδ2 ne peuvent plus s'activer. Des résultats similaires ont été obtenus avec la lignée Daudi. Cette lignée de lymphome de Burkitt est naturellement reconnue par les LT Vγ9Vδ2 car elle présente un niveau intracellulaire d'IPP très élevé. Lorsque cette lignée est traitée par des statines, elle n'est plus capable d'activer les LT Vγ9Vδ2 [258].



**Figure 14 : Structure des aminobisphosphonates.**

Leur activité agoniste sur les LT Vγ9Vδ2 est comparée à celle de l'HMBPP (l'activité de l'HMBPP est représentée par le 1). D'après Riganti et al, 2012 [282].

Les ABP les plus utilisés en tant que molécules activatrices des LT Vγ9Vδ2 sont le Pamidronate et le Zolédronate. Ils sont généralement utilisés en recherche ou en essais clinique afin d'induire l'activation des LT Vγ9Vδ2. Leur activité agoniste en comparaison de celle de l'HMBPP est indiquée sur la **Figure 14**.

Les alkylamines sont des composés sécrétés par les bactéries commensales ou pathogènes et sont retrouvés de manière ubiquitaire dans les fluides humains. Elles sont aussi produites à partir de la L-theanine présente dans le thé, les pommes ou le vin [283]. Ces molécules sont capables d'activer les LT Vγ9Vδ2 indirectement de la même manière que les ABP [284]. Elles induisent elles aussi une inhibition de la FDPS et donc une accumulation d'IPP endogène [285]. Tout comme les ABP, leur capacité activatrice des LT Vγ9Vδ2 est inhibée par les statines. Cependant leur utilisation nécessite de plus fortes concentrations que les ABP pour activer les LT Vγ9Vδ2.

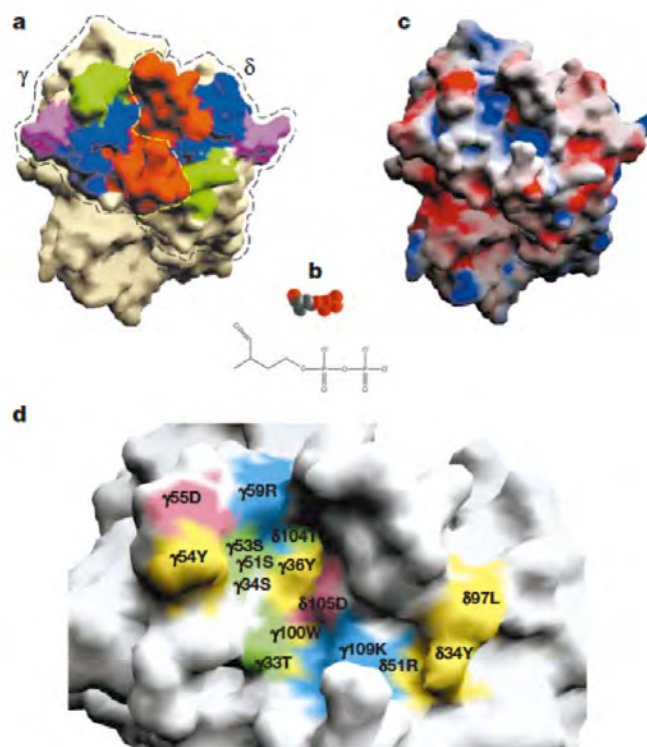
### **c) Mécanismes d'activation antigénique des LT Vγ9Vδ2**

Les LT Vγ9Vδ2 peuvent être activés par les PAg dans des contextes infectieux et tumoraux. Cependant la base moléculaire de cette activation via la reconnaissance d'antigène non peptidique n'est pas encore bien définie.

## (1) Implication du TCR

L'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par les PAgS est dépendante du TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. L'implication du TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 dans l'activation par les PAgS a été mise en évidence par des expériences de transfert de TCR dans des lignées Jurkat. La lignée Jurkat provient de LT  $\alpha\beta$  d'origine leucémique. Elle possède toute la machinerie transductionnelle nécessaire à l'activation TCR mais n'exprime pas de TCR  $\alpha\beta$  en surface à cause d'une déficience en chaîne  $\beta$ . Cette lignée peut être transfectée avec des gènes codant pour un TCR d'intérêt afin de l'utiliser comme lignée reporter de l'activation impliquant ce TCR. Le transfert du TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 dans cette lignée a suffi à rendre ces cellules capables de reconnaître la lignée tumorale Daudi, des extraits mycobactériens contenant du HMBPP, une grande variété de lignées tumorales humaines après traitement par des ABP et une série de PAgS synthétiques incluant l'IPP et le cHDMAPP [245, 258, 269, 286-288].

Ces données ont été complétées par des expériences de blocage du TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ou du CD3 par des anticorps monoclonaux. Le blocage du TCR a eu pour effet d'inhiber la réactivité des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 vis à vis des PAgS [115, 250, 289]. L'ensemble de ces résultats montre donc bien que la présence du TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 est nécessaire et suffisante pour une détection efficace de PAgS synthétiques, ou provenant d'extraits mycobactériens, de cellules tumorales ou de cellules sensibilisées avec des ABP. La cascade de signalisation induite par l'activation du TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 va être semblable à celle des autres LT. Cette activation passe par des protéines kinases Src, menant au final à l'activation des voies MAPK et calciques [290, 291]. Cela va induire la prolifération cellulaire, la production de cytokines mais aussi impacter la motilité et l'adhésion. En effet, l'engagement du TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 va induire l'augmentation de l'expression de la protéine d'adhésion LFA-1 (Lymphocyte Function Associated antigen) [246]. Après stimulation, le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 va être internalisé afin de diminuer sa capacité de restimulation. Certaines études ont montré que l'importance de cette internalisation était dépendante du PAg. En effet l'IPP semble induire une internalisation beaucoup plus importante du TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, par rapport au BrHPP, alors que son activité agoniste est plus faible [268, 292].



**Figure 15 : Surface de reconnaissance antigénique du TCR Vγ9Vδ2 du clone T G115.**

(a) La surface du TCR est colorée par boucle CDR (CDR1, bleue ; CDR2, vert ; HV4, rose et CDR3 en rouge). (b) Le PAg 3-formyl-1-butyl-pyrophosphate est décrit en dessin et en structure 3D (à la même échelle que le TCR en (a) et en (c)). (c) La surface potentielle du TCR en codée en couleur. Elle va du rouge (-10 kT) au bleu (+10 kT). Le haut de la molécule, contenant les boucles CDR, fait face aux spectateurs. La fente entre les deux boucles CDR3 contient des points chargés positivement (bleu), recouvrant la zone de fixation des PAgs. (d) Agrandissement de la fente montrant la localisation des résidus chargés (négatifs en rouge, positifs en bleu), hydrophobe (en jaune) et polaires (en vert). D'après Allison et al, 2001 [7].

Plusieurs hypothèses ont été développées afin de définir le mécanisme permettant aux LT Vγ9Vδ2 de détecter les PAgs. Le premier mécanisme proposé fut celui de l'interaction directe. Les PAgs seraient relargués par les microbes ou les cellules stressées et pourraient interagir directement et spécifiquement avec le TCR Vγ9Vδ2 afin de déclencher l'activation des LT. Des données obtenues par diverses équipes sont allées dans un premier temps dans le sens de cette hypothèse. Ces résultats ont montré que cette reconnaissance des PAgs est dépendante de résidus dans la région CDR3 de la chaîne Vγ9 ainsi qu'un résidu hydrophobe au début de la région CDR3 de la chaîne Vδ2 [293-296]. Ils ont suggéré l'existence d'une zone de fixation des PAgs sur le TCR Vγ9Vδ2 qui serait basique, avec la présence de résidus arginine et lysine chargés positivement dans les régions CDR3γ et CDR1δ [269]. La cristallisation d'un TCR Vγ9Vδ2 du clone T G115 a permis de confirmer l'existence de cette poche basique dans le sillon du TCR [7] (**Figure 15**). Dans cette structure cristallographique la boucle CDR3 δ dépassait du reste de la molécule. Cette

conformation est similaire à celle du TCR  $\gamma\delta$  murin capable de lier la molécule T22 [94]. Des données complémentaires de mutagenèse ont montré l'importance d'une lysine et d'un glutamate, chargés positivement et négativement, présents dans le segment J $\gamma$ 1.2 du CDR3 $\gamma$ . La mutation de ces résidus abroge totalement la reconnaissance des PAgS par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 [294, 296].

## (2) Contact cellulaire requis

Ce mécanisme d'interaction directe entre les PAgS et le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 n'a jamais pu être réellement documenté. En effet, toutes les tentatives visant à démontrer une interaction directe entre les PAgS et le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 de manière biophysique ou biochimique ont échoué (ex : co-cristallisation, dialyse à l'équilibre ou microcalorimétrie)[7, 144]. De plus, diverses études ont montré qu'un contact cellulaire entre le LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 et sa cellule cible était nécessaire pour l'activation du LT. Des expériences d'activation de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par des PAgS solubles ont montré que ceux-ci n'étaient activés qu'en cas de contact membranaire avec d'autres cellules, alors que les cellules individualisées ne s'activaient pas [297, 298]. Dans le cas des PAgS solubles, la cellule présentatrice peut être un LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 (auto-présentation). En parallèle, des expériences de sensibilisation via les ABP ont mis en évidence la nécessité d'une interaction cellulaire espèce-spécifique. Il a été montré que seules les cellules humaines ou primates non humaines étaient capables d'activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 après sensibilisation par les ABP, alors que l'effet pharmacologique des ABP n'est pas restreint à ces espèces [245, 248]. Ces observations ont été confirmées par des expériences de marquage de cellules sensibilisées par des PAgS par des tétramères de TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 de macaque. Ces tétramères sont capables de se fixer seulement sur les cellules humaines et pas les cellules murines. Le traitement de ces cellules par des protéases inhibe totalement la fixation des tétramères [299]. Ces résultats suggèrent indirectement la nécessité de déterminants protéiques associés à la membrane et espèce-spécifiques lors de l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

### (3) Molécule présentatrice des PAGs ?

Le manque de preuve de liaison direct des PAGs avec le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, la petite taille des PAGs, et la nécessité d'un contact cellulaire espèce-spécifique permettait de proposer que les PAGs soient présentés par une molécule présentatrice d'antigène. Une étude approfondie du rôle des CDR du TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 dans la reconnaissance de cellules sensibilisées par des PAGs a montré une zone de contact beaucoup plus large que celle initialement décrite avec les PAGs, suggérant une interaction possible avec un complexe moléculaire [300]. En outre, l'utilisation de PAGs photosensibles capables de former des liaisons covalentes avec des molécules proches a apporté des preuves à l'existence de ces molécules présentatrices de PAGs. Ces PAGs se sont associés à la surface des cellules avec des molécules inconnues, non polymorphiques et largement distribuées, et ont pu activer des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 [301]. Par ailleurs, diverses études visant à caractériser des composés synthétiques, analogues des PAGs, ont révélé que ces composés pouvaient interférer avec l'activité activatrice des PAGs [261, 264, 301]. Ces observations suggèrent l'existence d'une compétition entre les différents PAGs et analogues, et l'existence d'un nombre limité de site de liaisons sur la même molécule exprimée par les cellules cibles.

Toutes ces données suggèrent l'existence d'une molécule présente à la surface des cellules cibles et ayant un rôle dans la reconnaissance des PAGs. Cette molécule serait une protéine membranaire non polymorphique, ubiquitaire et conservée chez les primates (humain et non-humain), mais restreinte à ces seules espèces et distincte des molécules de présentation classique. Dans un premier temps, l'ecto-F1-ATPase avait été suggérée en temps que molécule présentatrice de PAGs. Des expériences réalisées par notre équipe avaient montré que l'ecto-F1-ATPase était capable d'interagir avec le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en présence d'une forme délipidée de l'Apolipoprotéine A1 (Apo A1), et d'activer les LT [114]. L'équipe d'E. Champagne a tenté de concilier les modèles d'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par les PAGs et par l'ecto-F1-ATPase et proposant un modèle dans lequel l'ecto-F1-ATPase se lierait avec un PAG nucléotidique appelé Apppl et pourrait ainsi interagir avec le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 et activer les LT [302-304]. Cependant cette molécule ne correspond pas à tous les critères. En effet elle n'est pas conservée uniquement chez les

primates mais dans tout le règne animal et son empreinte moléculaire ne correspond pas à celle observée sur les CDR du TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

Plus récemment l'implication d'une nouvelle protéine correspondant à tous les critères décrits ci-dessus a été découvert. Il s'agit de la protéine BTN3A1 (ou butyrophiline 3 isoforme A1). Cette protéine ainsi que son rôle précis dans l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sera décrit dans la suite de cette introduction et dans les résultats.

## **C. Rôle de la butyrophiline BTN3A1 dans l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2**

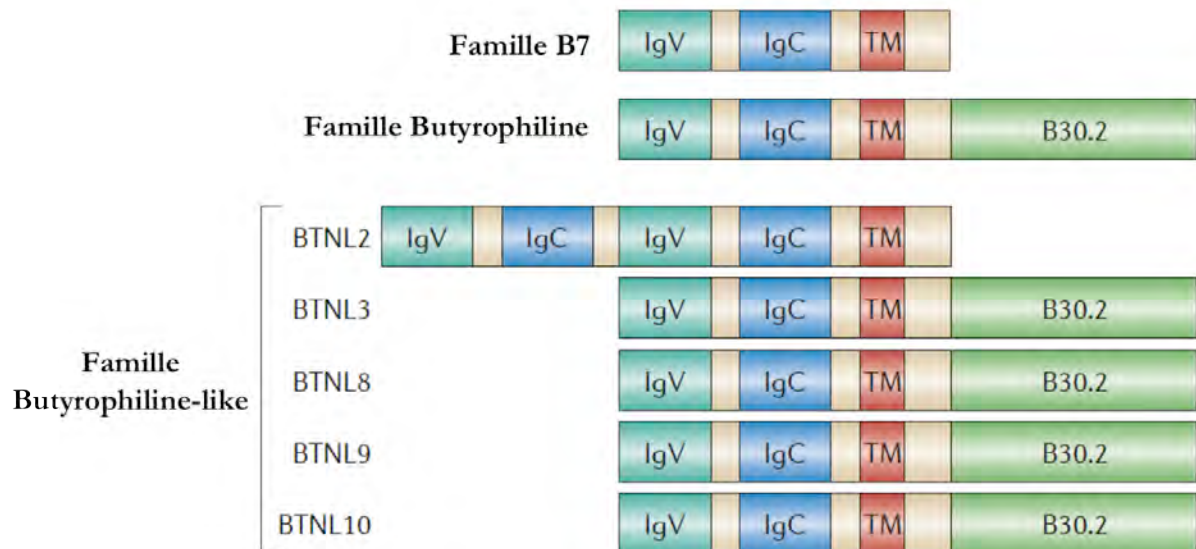
Des données récentes ont démontré que la protéine BTN3A1 (isoforme de BTN3A, appelée CD277) pouvait peut-être jouer ce rôle de molécule présentatrice de PAg, permettant ainsi l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

### **1. Généralités sur les BTN3A**

#### **(1) Les butyrophilines : membres de la super famille des Ig**

La protéine BTN3A1 est une glycoprotéine de type I, membre de la famille des butyrophilines (BTN). Ces protéines font parties de la super famille des Ig (IgSF) au même titre que les molécules de la famille B7. Les IgSF regroupent les TCR, les BCR ainsi que des protéines dont les domaines extracellulaires sont similaires aux domaines Ig des TCR et des BCR (domaine Ig-like) [305]. Ces domaines IgSF sont présents sur des protéines impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques (ex : développement, différenciation, activation, adhésion, régulation) [306-310]. Ces domaines IgSF sont très répandus dans le système immunitaire adaptif. Les protéines les portant vont avoir de nombreux rôles impliquant des interactions récepteur-ligand centrales dans la biologie des LT (ex : TCR, CD3, CD4, CD8, CD80,

CD86). Ces domaines IgSF regroupent généralement un domaine IgV (pour Variable) et un domaine IgC (pour Constant). Seuls les BCR et les TCR possèdent des vrais domaines IgV et IgC. Les domaines IgV et IgC exprimés par les autres membres de la famille sont légèrement différents, en particulier le domaine IgV-like qui ne partage pas l'hyper-variabilité propre au domaine IgV des récepteurs de l'immunité adaptative mais seulement une homologie de structure.



**Figure 16 : Comparaison structurelle des superfamilles B7 et Butyrophiline.**

La caractéristique principale des familles B7, Butyrophiline et Butyrophiline-like est l'inclusion de domaines extracellulaires Ig-like, typiquement un domaine IgV et un domaine IgC. Dans quelques cas, comme pour BTNL2 et l'homologue 3 de B7 (B7H3), ces domaines sont répétés aboutissant à quatre domaines extracellulaires. Aucun membre de la famille B7 identifié à ce jour ne contient de domaine intracellulaire identifiable. À l'inverse, c'est une caractéristique commune des familles BTN et BTNL. Seuls BTN3A2 (membre des BTN) et BTNL2 ne possèdent pas de domaine intracellulaire. TM : domaine transmembranaire. D'après Arnett et al, 2014 [311].

Les molécules de la famille B7 font partie des IgSF car elles possèdent deux domaines extracellulaires de type Ig-like [308]. Les membres les plus connus de cette famille sont les molécules B7.1 et B7.2 (autrement appelées CD80 et CD86). Ces protéines sont connues pour être essentielles dans le priming des LT naïfs. Leur interaction avec le récepteur CD28 exprimé sur les LT est un signal de costimulation nécessaire, en plus du signal TCR, pour permettre l'activation des LT [312, 313]. Elles peuvent aussi avoir une action inhibitrice vis à vis des LT en se fixant sur leur récepteur CTLA-4 [314, 315]. Les butyrophilines (BTN) ont tout d'abord été identifiées comme étant des molécules B7-like. Elles possèdent une homologie structurelle avec les molécules B7 au niveau des domaines extracellulaires IgV et

IgC [311] (**Figure 16**). De plus, au niveau phylogénétique, les molécules BTN partagent un ancêtre commun avec les molécules de la famille B7 [316]. Ces données suggèrent une fonction immunologique probable des protéines de la famille BTN.

Le premier membre de la famille des BTN a été identifié en 1990. Il s'agit de la protéine BTN1A1, isolée à partir de lait de vache [317]. BTN1A1, très exprimée dans les glandes mammaires des vaches, représente la protéine majeure associée avec les gouttelettes lipidiques dans le lait. Les BTN sont exprimées via les gènes *Btn*. Ce sous-groupe, contenant minimum 10 gènes, est présent chez la plupart des espèces. À ce jour, 11 gènes ont été identifiés chez la souris et 13 gènes chez l'humain. Ils sont localisés dans le même locus que le CMH de classe I, sur le chromosome 6p chez l'Homme [318]. Cependant, au cours de l'évolution, ces gènes ont beaucoup divergé chez les espèces. Chez la souris, la famille BTN ne possède que deux membres : BTN1A1 et BTN2A1. À l'inverse chez l'Homme, il existe trois sous-famille de BTN : BTN1A, BTN2A et BTN3A. La sous-famille BTN1A ne contient qu'un seul membre : BTN1A1. Il s'agit de l'orthologue du membre fondateur de la famille BTN, ainsi que du gène murin BTN1A1 [319]. La sous-famille BTN2A comprend trois copies d'un même gène : BTN2A1, BTN2A2, et BTN2A3. Ces trois gènes partagent 88% d'identité de séquence en acides aminés, et BTN2A1 est l'orthologue du gène du même nom chez la souris. Pour finir, la dernière sous-famille BTN3A comprend elle aussi trois gènes : BTN3A1, BTN3A2 et BTN3A3. D'autres gènes présentant une grande homologie de séquence avec les gènes BTN ont été identifiés. Ils ont été regroupés dans une nouvelle famille appelée BTN-like (BTNL). Cette famille comprend par exemple la protéine Skint1, abordée en première partie de cette introduction.

Étant donné la découverte assez récente de cette famille de protéines, leurs fonctions ainsi que leurs partenaires moléculaires restent encore mal décrit. La molécule BTN1A1 a été la première décrite comme ayant un rôle dans la régulation de la quantité de lipide et la taille des gouttelettes lipidiques dans le lait des mammifères [320]. Sa fonction est essentiellement portée par son domaine intracellulaire B30.2 [321]. Les protéines BTN chez l'humain semble jouer des rôles assez divers [322] mais plusieurs études ont rapporté des fonctions immunomodulatrices de ces protéines [323]. Elles auraient un rôle dans l'activation

des LT et des NK [311, 316, 324-329], et dans la modulation des maladies auto-immunes [330, 331]. La famille des BTNL est mieux décrite dans la littérature. Elle a de nombreuses fonctions immunomodulatrices [332, 333]. Certains de ces membres, comme BTNL2, semblent avoir des fonctions proches de celles des molécules B7, dont celle d'inhiber les LT [334-337]. La protéine Skint1 quand à elle, fait aussi partie des BTNL, et joue un rôle dans la sélection thymique et l'activation des LT  $\gamma\delta$  dermiques murins [39, 40]. Pour une revue des différents membres de la famille BTN et leurs fonctions, voir Afrache et al, 2012 [338].

## (2) Expression des molécules BTN3A

Il existe des gènes *Btn* chez de nombreuses espèces. Cependant si on se concentre sur la sous-famille BTN3A, celle-ci semble présente seulement chez les humains [324, 339] et tous les primates non-humains portant des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 [340]. À l'inverse, de manière intéressante il n'y a pas d'orthologue des gènes BTN3A chez les rongeurs (ceux-ci ne possédant pas d'équivalent des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2). Une étude récente a mis en évidence l'émergence commune des gènes TCR V $\gamma$ 9, V $\delta$ 2 et BTN3A au sein des mammifères placentaires [341]. Cette étude suggère l'existence d'un lien fonctionnel évolutif fort entre l'expression du TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 et des protéines BTN3A.

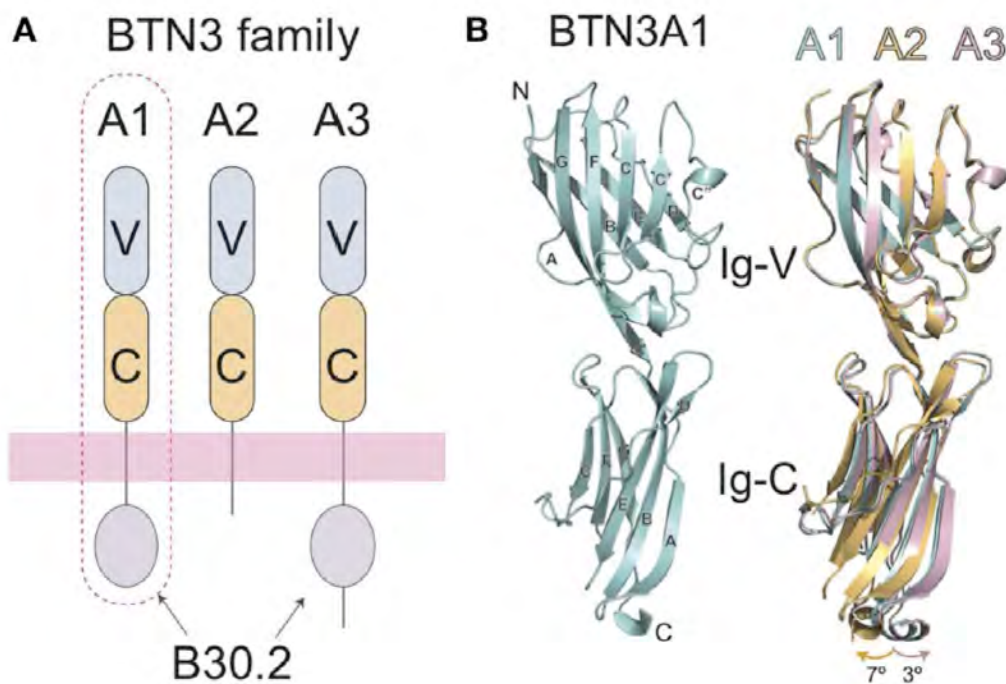
Chez l'Homme les protéines BTN2A et BTN3A, contrairement à la protéine BTN1A1, s'expriment dans de nombreux tissus [342]. L'expression des protéines BTN3A semble ubiquitaire à la surface des cellules humaines. Elles sont exprimées par tous les PBMC [326, 339] et tous les types cellulaires testés à ce jour (ex : cellules tumorales, CPA) [324, 327]. Cependant, ces données d'expression protéiques prennent en compte l'ensemble des BTN3A. En effet, les domaines extracellulaires des trois isoformes de BTN3A sont très homologues (>95%), et ne peuvent donc pas être différenciés par les Ac existants. Seule une étude portant sur les taux d'expression d'ARNm a montré qu'au niveau transcriptionnel, BTN3A3 est très peu présente dans les cellules immunes, tandis que l'isoforme BTN3A2 est majoritaire dans les cellules NK [324].

## 2. Structure des protéines BTN3A

### (1) Isoformes des protéines BTN3A

La famille BTN3A contient trois protéines ou isoformes, chacune codée par un gène différent : BTN3A1, BTN3A2 et BTN3A3 (**Figure 17 A**). Leur partie extracellulaire est composée d'un domaine IgV et d'un domaine IgC. Ces domaines sont extrêmement conservés entre les trois isoformes (>95% d'homologie). La diversité de séquence entre ces trois isoformes est surtout concentrée au niveau des domaines transmembranaires et intracellulaire. Seules BTN3A1 et BTN3A3 possèdent un domaine intra-cellulaire B30.2 et celui-ci est peu conservé entre les deux isoformes. L'isoforme BTN3A2 est une forme tronquée sans réelle partie intracellulaire car le gène BTN3A2 est dépourvu de l'exon final codant pour le domaine intracellulaire [343].

Ces trois isoformes peuvent subir un épissage alternatif. Les gènes BTN3A peuvent être découpés en huit (BTN3A2) ou neuf (BTN3A1 et BTN3A3) exons qui correspondent aux différents domaines structuraux des protéines. Une étude a montré la présence de produits d'épissage alternatif dans plusieurs types cellulaires mais aussi l'épissage plus fréquent du domaine B30.2 chez les protéines BTN3A par rapport aux protéines BTN2A [342].



**Figure 17 : Organisation des domaines des protéines BTN3A.**

(A) Les domaines extracellulaires des BTN3A font partie de la super famille B7 avec du côté membranaire un domaine IgC, et du côté N-terminal un domaine IgV. Les domaines extracellulaires sont très similaires chez les trois isoformes. Ils sont reliés, via un domaine transmembranaire, à des domaines intracellulaires très différents chez les trois protéines. BTN3A1 et BTN3A3 contiennent toutes les deux un domaine intracellulaire B30.2 tandis que BTN3A2 n'en a pas. BTN3A1, qui est entourée de pointillés rouges, est l'isoforme nécessaire à l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 induite par les PAgS. (B) La structure 3D du domaine extracellulaire de BTN3A1 est représenté en bleu (gauche) et est superposée avec celles des isoformes A2 et A3 représentées en jaune et rose, respectivement. Les structures sont très homologues, avec seulement quelques variations dans les angles des régions charnières entre les domaines IgC et IgV. D'après Gu et al, 2014 [344].

## (2) Domaines extracellulaires Ig-like

Les protéines BTN3A possèdent des domaines extracellulaires de type Ig-like, caractéristiques de leur appartenance à la famille IgSF. Ces domaines IgSF ne possèdent pas d'activité enzymatique, mais sont généralement capables d'interagir avec de nombreuses protéines, et la spécificité de cette interaction est située en partie N-terminale (ex : CD80). Ces domaines sont constitués d'une partie IgV, située en partie N-terminale, et d'une partie IgC située au niveau de la membrane au niveau proximal. Les protéines BTN3A possèdent un domaine IgC-like de type I, semblable à ceux des molécules du CMH de classe I et II, de la  $\beta$ 2-microglobuline, des Ig et du TCR [308]. Le domaine IgV est le plus conservé des deux domaines au sein des trois isoformes. Un seul acide aminé diffère entre BTN3A3 et les deux autres isoformes.

Même au niveau structurel les domaines extracellulaires des trois isoformes sont très homologues avec seulement quelques variations dans les angles des régions charnières entre les domaines IgV et IgC (**Figure 17 B**). La conservation très forte de ces domaines, et en particulier le domaine IgV, suggère un rôle de celui-ci dans des interactions protéiques de type récepteur/ligand, nécessaire à la fonction de ces protéines. De plus, les domaines IgV sont généralement capables de former des homo/hétérodimères via une interaction en trans et/ou en cis avec d'autres domaines IgV. À ce jour, le(s) ligand(s) des protéines BTN3A n'ont pas encore été identifié(s). De nombreuses protéines ont été proposées, dont les ligands connus des protéines B7 (CD28, CTLA-4, PD-1, ICOS et BTLA) ou la lectine DC-SIGN capable d'interagir avec BTN2A1, mais elles ont toutes été éliminées pour cette participation [339, 345].

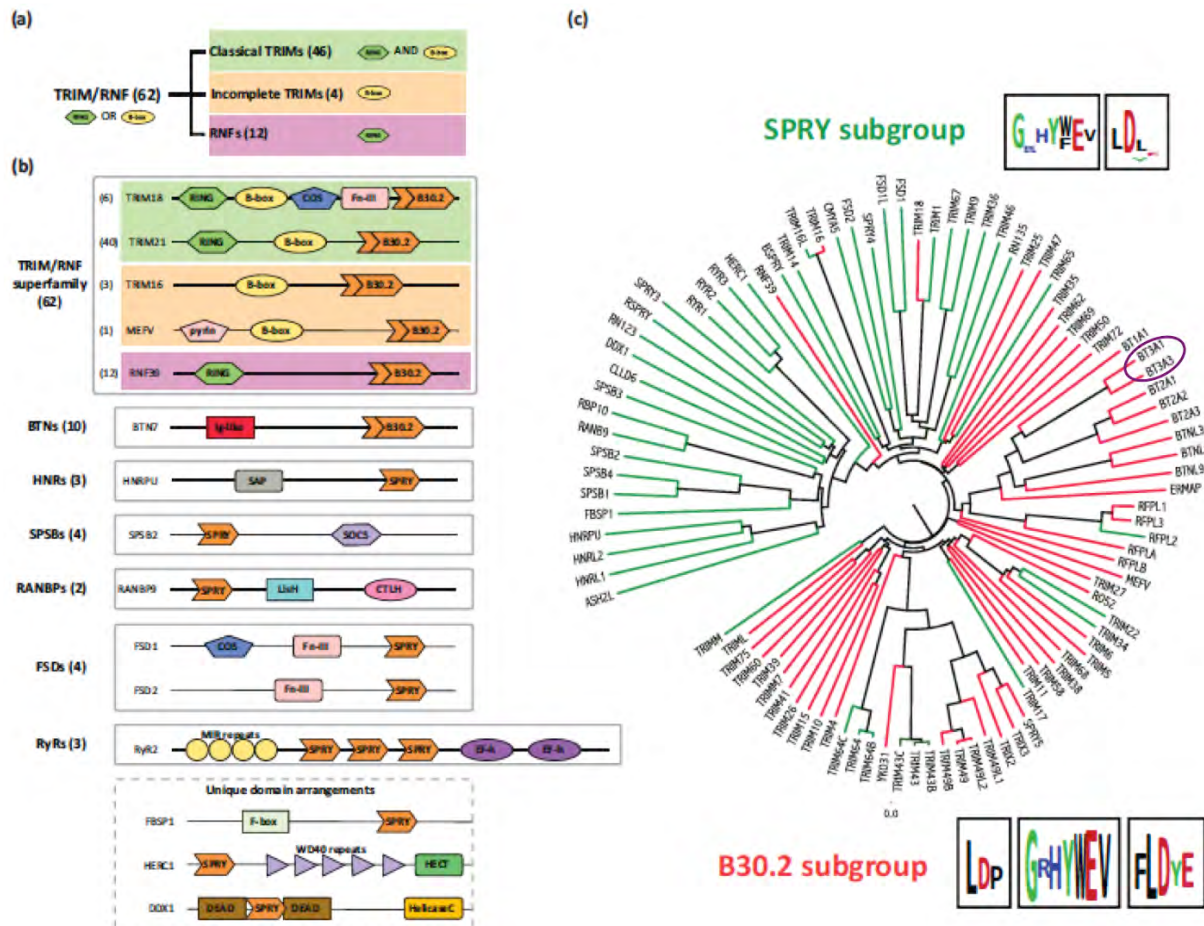
### (3) Domaine intracellulaire B30.2

Les isoformes BTN3A1 et BTN3A3 possèdent toutes deux un domaine intracellulaire B30.2. Cependant celui de BTN3A3 n'est homologue qu'à 86% avec celui de BTN3A1 (en terme de séquence d'acides aminés). Ce domaine B30.2 est rattaché au domaine transmembranaire via une superhélice. La protéine BTN3A2 est une version tronquée des BTN3A, elle ne possède donc pas de domaine B30.2 mais seulement la superhélice en intracellulaire. L'isoforme BTN3A3 possède en plus une extension C-terminale de 70 acides aminés à la suite de son domaine B30.2 [344].

Ce domaine B30.2 est aussi appelé domaine PRY/SPRY dans la littérature. Il s'agit d'un domaine PRY associé à un domaine SPRY en C-terminal. Il est considéré comme un homologue au domaine SPRY dont il serait issu. Ces domaines SPRY et B30.2 sont présents seulement chez les eucaryotes supérieurs. On les retrouve dans 15 grandes familles de protéines qui sont détaillées dans la **Figure 18 (b)**. Ces deux domaines sont retrouvés dans des types de protéines vraiment différents (protéines transmembranaires, protéines intracellulaires, protéines sécrétées). Ces protéines sont réparties en deux sous groupes : le sous-groupe SPRY (car elles possèdent seulement un domaine SPRY) et le sous-groupe B30.2 (car elles possèdent un domaine SPRY associé avec un domaine PRY) (**Figure 18 (c)**).

Le domaine B30.2 est décrit comme un domaine d'interaction protéine/protéine. Chez l'Homme, il est présent dans deux grandes familles de protéines : la famille TRIM (Tripartite Motif) et la famille BTN. Dans les deux cas, il est en position C-terminal des protéines. Les fonctions de ce domaine B30.2 chez l'Homme ne sont pas encore très bien décrites. L'étude des protéines TRIM a cependant montré que ce domaine semblait impliqué dans l'immunité innée (ex : signalisation anti-viral via la protéine TRIM25, limitation de l'infection rétrovirale par TRIM5 $\alpha$ ) [346-349] mais aussi dans des phénomènes d'autoimmunité [350]. Une étude a mis en évidence une conservation inter-espèce de ces domaines chez les primates, suggérant ainsi une pression de sélection positive au cours de l'évolution [351].

La plupart des protéines portant un domaine B30.2 ont été décrites comme étant capables de former naturellement des homodimères [321, 350, 352], des trimères [353] et même des multimères de niveaux supérieurs [354, 355] par le biais de leur domaine intracellulaire. Ces phénomènes de multimérisations semblent être importants dans la fonction de ces protéines. Le domaine B30.2 semble nécessaire sans toutefois être suffisant dans ces phénomènes. Une étude a pu mettre en évidence dans des cristaux la formation de dimères de la protéine sRFLP1 via le domaine B30.2. Celui-ci était capable d'interagir avec un autre domaine B30.2 via sa boucle C-terminale [350].



**Figure 18 : Distribution et classification par famille des protéines contenant un domaine SPIA/Ryanodine receptor (SPRY)/B20.2.**

(a) L'organisation de la superfamille TRIM (Tripartite Motif) et RNF (Zinc Finger de type RING (Really Interesting New Gene)) dépend du type de domaine du zinc finger : les TRIM classiques sont caractérisés par un TRIM entier qui contient au moins une boîte B et un domaine RING (superhélice non montrée) ; les TRIM incomplets possèdent seulement une boîte B et les RNF seulement un domaine RING. (b) En se basant sur la composition des domaines et leurs arrangements, il existe 15 familles de protéines contenant un domaine SPRY/B30.2. Cinq d'entre elles appartiennent à la superfamille TRIM/RNF, et les autres sont : les butyrophilines (BTN), les ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (HNR), les protéines SPSB limitatrices du signal cytokinique contenant un domaine SPRY (SOCS), les protéines liants Ran (RANBP), les fibronectines de type III et les protéines contenant un domaine SPRY (FSD), les canaux calciques à récepteur ryanodine (RyR), les protéines contenant un domaine F-box/SPRY (FBSP), les protéines (HERC) contenant des homologues du domaine E6-AP C-terminal (HECT) et du domaine régulateur de la condensation du chromosome 1-like (RCC), la protéine DDX1 contenant une boîte DEAD (asp-glu-ala-asp). La composition des domaines est extraite de Uniprot. Le nombre de membre de chaque famille est précisé entre parenthèses. Les protéines ne possédant pas les domaines additionnels accessoires ne sont pas incluses (TRIMM, TRIM16L, Ash2L, Chronic Lymphocytic Leukemia Deletion region gene 6 protein (CLLD6), SPRY3 et SPRY4). (c) L'arbre phylogénétique a été créé avec FigTree en utilisant des multiples alignements de séquences générés par ClustalW, en utilisant une protéine Gonnet en échelle de poids. Les séquences de 103 domaines SPRY et B30.2 sont alignées. Les domaines contenant toutes les signatures peptidiques (LDP, WEVE et LDYE) sont classés en temps que B30.2 (en rouge), tandis que ceux qui n'ont que les deux dernières (WEVE et LDYE) sont classés SPRY (en vert). Les séquences LOGOS sont générées avec le logiciel WebLogo, en utilisant les multiples alignements générés pour tous les SPRY (en haut à droite) et les B30.2 (en bas à droite). Les molécules BTN3A sont entourées en violet. D'après Perfetto et al, 2013 [356].

Le domaine B30.2 étant décrit comme une zone d'interaction protéine/protéine, il paraît intéressant de définir au mieux les ligands avec lesquels il

pourrait interagir afin de comprendre plus précisément ces fonctions. Diverses études portant sur la structure tridimensionnelle de ce domaine, sur son interaction avec son ligand (co-cristallisation) et sur l'analyse des mutations du domaine, ont permis de définir quelques caractéristiques de l'interaction entre les domaines B30.2 et leurs ligands [357-360]. Les domaines B30.2 possèdent au moins deux zones disjointes pouvant accueillir différents ligands. La localisation de ces zones semble particulièrement bien conservée entre les différents domaines B30.2 cristallisés. Cependant, la structure de ces zones est considérablement variable d'une protéine à une autre. La structure de ces zones semblerait déterminante dans la spécificité du domaine B30.2 vis-à-vis de son partenaire moléculaire. Au vu de la grande variabilité de ces zones, il semble vraiment difficile de prévoir la nature des interactants des domaines B30.2. Ceux-ci vont pouvoir être très variés, allant des petites molécules jusqu'aux protéines intégrales. Les quelques interactants identifiés pour l'instant corrélerent avec cette définition. Au départ de ma thèse, il n'y avait pas de candidat identifié pouvant interagir avec le domaine B30.2 des BTN3A. Les ligands identifiés pour les autres BTN ne se fixaient pas sur le domaine B30.2 de BTN3A1 et BTN3A3 (ex : xanthine oxydase qui se fixe sur le domaine B30.2 de BTN1A1 [321]). De plus en plus d'études suggèrent que les domaines B30.2 fonctionnent comme des modules adaptateurs permettant l'assemblage de complexes macromoléculaires de manière analogue aux domaines SH2, SH3 et WW [356]. Certaines études envisagent même un rôle de récepteur transmetteur d'un signal pour les protéines possédant un domaine B30.2, via la phosphorylation de celui-ci [326]. De fait, la présence ou non d'un domaine B30.2, et la séquence de celui-ci risque d'impacter fortement la fonction des différentes protéines BTN3A.

### **3. Rôle de l'isoforme BTN3A1 dans l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2**

Récemment de nombreuses recherches se sont intéressées à la protéine BTN3A1. Il semblerait que cette protéine joue un rôle non négligeable dans le mécanisme d'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par les PAg. Cette protéine remplit tous les critères définis précédemment comme étant importants pour une molécule capable de détecter les PAg : elle est membranaire, ubiquitaire, conservée chez les

primates mais restreinte à ces espèces et elle est différente des molécules de présentation classiques. Je vais développer à présent les résultats qui ont mis à jour son implication dans l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 et qui ont mené aux hypothèses de ce projet de thèse.

#### (1) Les anticorps anti-CD277

La découverte de l'implication de la protéine BTN3A1 dans l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 s'est faite de manière assez fortuite. L'équipe de D. Olive a généré divers anticorps monoclonaux de souris dirigés contre les protéines BTN3A (Acms anti-BTN3A ou anti-CD277). Ils ont observé que la culture de PBMC humains en présence de ces Acms et d'IL-2 aboutissait à une amplification spécifique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Une collaboration entre notre équipe et celle de D. Olive s'est alors mise en place afin d'éclaircir le lien entre le marquage des protéines BTN3A et l'amplification spécifique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Ces travaux de recherche ont abouti à une publication dans le journal Blood en 2012 dont je suis 3<sup>ème</sup> auteur (Harly et al, 2012 [117]).

#### (2) La molécule BTN3A1 joue un rôle clé dans l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2

Ces travaux en collaboration avec l'équipe de D. Olive ont permis de mettre en évidence deux points importants : les protéines BTN3A sont nécessaires mais pas suffisante pour déclencher l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en présence de PAgS, et cette fonction est portée entièrement par l'isoforme BTN3A1. L'équipe de D. Olive nous a fourni deux anticorps monoclonaux murins dirigés vers les protéines BTN3A : l'anticorps 20.1 (autrement appelé anticorps agoniste) et l'anticorps 103.2 (autrement appelé anticorps antagoniste). Les domaines extracellulaires des protéines BTN3A étant très homologues, les Ac anti-CD277 reconnaissent les trois isoformes sans distinction.

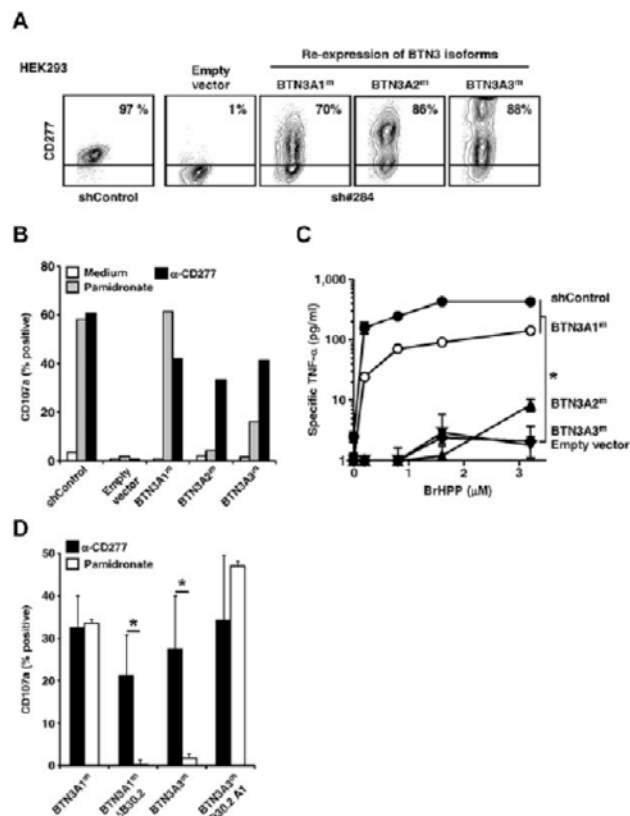
L'utilisation de ces anticorps dans divers tests fonctionnels d'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 a mené à de nombreuses observations. Premièrement lorsque différents

types de cellules sont incubés avec l'Ac 20.1, celles-ci sont automatiquement reconnues et lysées par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, de manière semblable à des cellules sensibilisées par des PAgS solubles ou des ABP. À l'inverse l'incubation avec l'Ac 103.2 bloque totalement la lyse de cellules normalement reconnues par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, comme des cellules infectées par *Mycobacterium Bovis* (BCG), des cellules tumorales ou des cellules sensibilisées par des ABP. C'est de ces deux observations que les Ac 20.1 et 103.2 tiennent leurs noms d'Ac agoniste et antagoniste (ou bloquant).

L'Ac agoniste 20.1 est capable de rendre sensible n'importe quelle cellule à la reconnaissance et à la lyse des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, du moment que cette cellule soit d'origine humaine ou primate et qu'elle exprime les protéines BTN3A. Nous avons mesuré l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 via leur production de TNF $\alpha$ , d'INF- $\beta$  ainsi que leur expression de la molécule CD107a/b. Cette molécule est un marqueur de la dégranulation et permet donc d'observer l'activité cytotoxique des LT. Nous avons pu observer que l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par l'Ac 20.1 est semblable en terme d'intensité à celle induite par des PAgS solubles ou des ABP. L'Ac 20.1, tout comme les PAgS et les ABP, n'active que les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 et n'a aucun impact sur les autres populations T. La dépendance du TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 dans cette activation a été démontrée par des transferts de TCR dans des cellules Jurkat. La présence du TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 dans ces cellules humaines est suffisante pour induire l'activation par l'Ac20.1 et elle nécessite un contact cellulaire. La fonction des protéines BTN3A est donc spécifique aux LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

Afin d'étudier plus en détail le rôle des protéines BTN3A dans l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, nous avons éteint stablement l'expression de ces protéines dans une lignée HEK 293 (Human Embryonic Kidney). Nous avons utilisé un shRNA capable de cibler les trois isoformes de BTN3A. L'abolition de l'expression des protéines BTN3A à la surface ces cellules cibles abroge totalement la reconnaissance de celles-ci par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, de la même manière que l'Ac antagoniste 103.2. La sensibilisation de ces cellules BTN3A négatives par des PAgS solubles ou des ABP n'engendre plus aucune reconnaissance de ces cellules par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Les protéines BTN3A semblent donc nécessaires à l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par les PAgS.

Nous avons ensuite cherché à savoir quelle était l'isoforme clé dans ce mécanisme d'activation des LT Vγ9Vδ2. Pour cela nous avons utilisé la lignée HEK293 n'exprimant plus de BTN3A endogène. Cette lignée a été retransfectée sélectivement avec chacune des isoformes de BTN3A, dans lesquelles a été introduit une mutation silencieuse dans la séquence cible du shRNA anti-BTN3A. Nous avons donc obtenu trois lignées exprimant chacune une seule des isoformes de BTN3A afin d'étudier leur rôle indépendamment (**Figure 19 A**).



**Figure 19 : Rôle clé joué par la molécule BTN3A1 dans l'activation des LT Vγ9Vδ2 médiée par les PAgS.**

**(A)** Expression de surface des molécules BTN3A sur des cellules HEK 293 transduites avec un shRNA #284 ciblant les molécules BTN3A. Ce shRNA abroge l'expression des BTN3A endogènes. Ces cellules ont été retransfectées sélectivement avec chacune des isoformes de BTN3A, mutées silencieusement dans la séquence cible du shRNA (BTN3A1m, BTN3A2m, et BTN3A3m). Le shRNA control est une séquence aléatoire, et empty vector est un plasmide vide. Données représentatives de plus de trois expériences indépendantes. **(B)** Expression de la molécule CD107a sur les LT Vγ9Vδ2 après coculture avec les lignées HEK293 réexprimant sélectivement les trois isoformes BTN3A1m, BTN3A2m et BTN3A3m et prétraitées pendant 2h avec des ABP (pamidronate, 250μM) ou l'anticorps agoniste 20.1 (10μg/mL). **(C)** Production de TNF-α par les LT Vγ9Vδ2 après coculture avec les lignées HEK293 réexprimant sélectivement les trois isoformes BTN3A1m, BTN3A2m et BTN3A3m et des doses croissantes de PAgS solubles (BrHPP). Les données sont des moyennes ±SD et sont représentatives de 3 expériences indépendantes. \*P<0,5 (Test de Student apparié). **(D)** Expression de CD107a sur des LT Vγ9Vδ2 après coculture avec des cellules HEK293 exprimant les protéines BTN3A1 ou BTN3A3 en taille entière, une version tronquée de la protéine BTN3A1 sans son domaine intracellulaire B30.2 (BTN3A1mΔB30.2) ou une chimère de la protéine BTN3A3 assemblée avec le domaine intracellulaire B30.2 de BTN3A1 (BTN3A3mB30.2A1). Les cellules cibles ont été prétraitées pendant 2h avec des ABP (pamidronate, 250μM) ou l'anticorps agoniste 20.1 (10μg/mL). Les données sont des moyennes ±SD du pourcentage de LT Vγ9Vδ2 CD107a+ (n=3). \*P<0,5 (Test de Student). D'après Harly et al, 2012 [117].

Ces trois lignées ont ensuite été sensibilisées, soit par l'Ac agoniste 20.1, soit par des ABP ou des PAgS solubles. Lorsque la sensibilisation était faite par des PAgS solubles ou des ABP, seule la lignée exprimant l'isoforme BTN3A1 était capable d'activer les LT Vγ9Vδ2. À l'inverse, les trois isoformes permettent l'activation des LT Vγ9Vδ2 après traitement par l'Ac agoniste 20.1 (**Figure 19 B et C**). Les isoformes BTN3A ne diffèrent essentiellement que par leur domaine intracellulaire. Ces données suggèrent donc que le domaine B30.2 de l'isoforme BTN3A1 joue un rôle dans l'activation des LT Vγ9Vδ2 par les PAgS. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons réalisés une forme tronquée de la protéine BTN3A1 ne possédant plus son domaine intracellulaire B30.2, et une forme chimérique de la protéine BTN3A3 dans laquelle son domaine B30.2 a été échangé avec celui de l'isoforme BTN3A1. Ces formes ont été transfectées dans les cellules HEK293 shRNA anti-BTN3A, puis les cellules ont été sensibilisées par des ABP ou par l'Ac agoniste 20.1. Après stimulation par des ABP, la forme tronquée de BTN3A1 n'est plus du tout capable d'activer les LT Vγ9Vδ2. À l'inverse, la forme chimérique de BTN3A3 possédant le domaine B30.2 de BTN3A1 devient capable d'activer les LT Vγ9Vδ2, contrairement à la forme naturelle de cette isoforme. La sensibilisation par l'Ac agoniste 20.1 quand à elle permet l'activation des LT Vγ9Vδ2 avec toutes les formes de BTN3A. Ces résultats mis tous ensemble suggèrent donc que la protéine BTN3A1 est essentielle à l'activation antigénique des LT Vγ9Vδ2 par les PAgS, et que son domaine B30.2 est clé dans ce mécanisme. À l'inverse l'activation des LT Vγ9Vδ2 par l'Ac agoniste 20.1 fonctionne avec toutes les isoformes de BTN3A. Cet Ac se fixe sur la partie extracellulaire des isoformes, ce qui pourrait expliquer qu'il n'a pas besoin d'un domaine intracellulaire pour fonctionner.

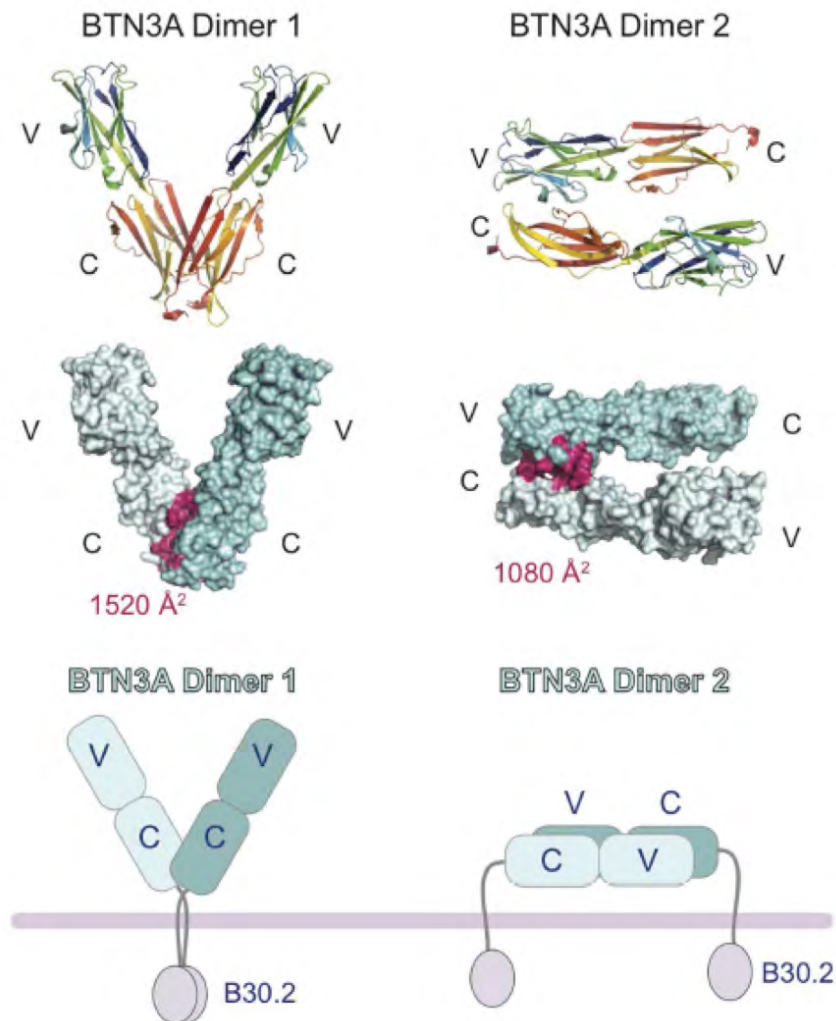
Nous avons aussi pu observer une corrélation entre la mobilité de la protéine BTN3A1 à la surface de la cellule cible et l'activation du LT Vγ9Vδ2. Plus la protéine BTN3A1 est peu mobile à la surface de la cellule cible, plus celle-ci va pouvoir activer le LT Vγ9Vδ2. La technique du FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) en microscopie confocale nous a permis de mettre en évidence un ralentissement de la protéine BTN3A1 à la surface des cellules cibles quand celles-ci sont traitées avec des ABP. Lorsqu'on traite ensuite ces cellules avec des statines, qui inhibe l'effet des ABP sur l'accumulation des PAgS endogènes, la protéine BTN3A1 retrouve une mobilité normale. À l'inverse, le traitement ABP n'a aucun effet

sur la mobilité de l'isoforme BTN3A2. Ce ralentissement de la molécule BTN3A1 à la surface des cellules semble donc induit par l'accumulation de PAgS endogènes, et nécessite la présence du domaine B30.2. De manière intéressante, l'Ac 20.1 semble mimer l'effet des PAgS et induit le même type de ralentissement de mobilité mais sur les trois isoformes. À l'inverse, l'Ac antagoniste 103.2 va rendre les molécules BTN3A totalement immobiles à la surface des cellules, où elles vont former des agrégats. Ce phénomène explique probablement l'action bloquante de cet Ac.

Nos résultats ont donc montré un rôle essentiel joué par la protéine BTN3A1 et en particulier son domaine intracellulaire B30.2 dans la détection des PAgS, induisant l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Nos résultats ont été depuis confirmés par d'autres équipes de recherche [361]. Il a même été montré que l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 induite par les Ac anti-CD277 produit la même cascade de signalisation dans le LT que l'activation par les PAgS [362].

### (3) Mécanismes d'action des anticorps anti-CD277 sur les protéines BTN3A

Afin de mieux comprendre le rôle de la protéine BTN3A1 dans l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, il paraissait intéressant d'étudier les mécanismes d'action des Ac anti-CD277 20.1 et 103.2. Ces anticorps peuvent reconnaître les trois isoformes de BTN3A. En partant de l'hypothèse que ces anticorps pouvaient peut-être induire ou stabiliser les molécules BTN3A dans des conformations actives ou inactives, l'équipe d'E. Adams a étudié les structures cristallographiques des domaines extracellulaires des BTN3A. Ils ont pu observer deux interfaces dimériques (**Figure 20**).

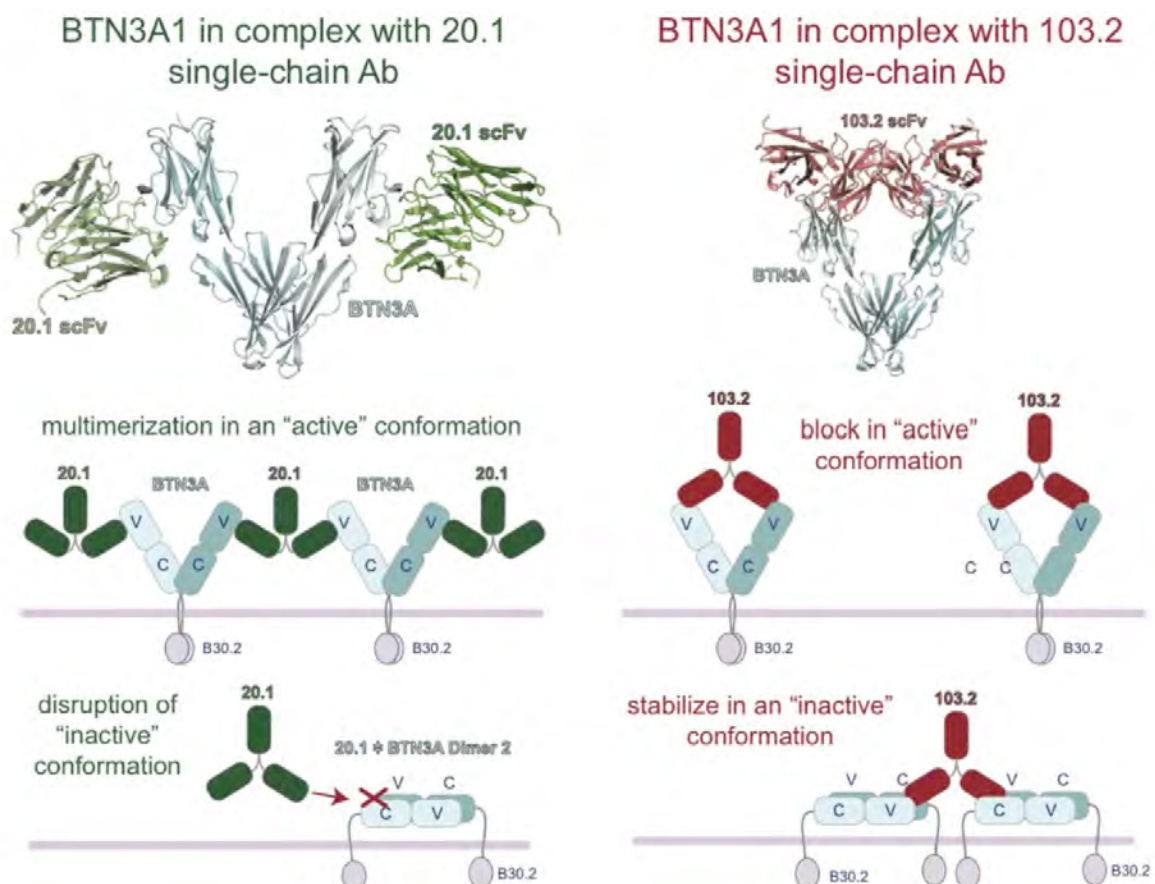


**Figure 20 : Représentation schématique de l'organisation de la partie extracellulaire des BTN3A.**

Les domaines extracellulaires sont représentés en deux états dimériques différents dans les structures cristallines. Le dimère 1 (à gauche) s'associe via les domaines IgC et forme un dimère en forme de V, plaçant ainsi les deux domaines intracellulaires B30.2 proches l'un de l'autre. Le dimère 2 (à droite) s'associe dans un mode tête-à-queue, avec le domaine IgV d'un des monomères de BTN3A qui interagit avec le domaine IgC de l'autre. Cela donnerait des dimères disposés de manière parallèle à la surface de la cellule, avec les deux domaines intracellulaires B30.2 séparés l'un de l'autre. Les résidus de l'interface de contact sont colorés en rose et indiqués sur la représentation de surface des deux formes dimériques (panneau du milieu). D'après Gu et al, 2014 [344].

Ces interfaces dimériques se présentent sous deux formes, l'une en forme de V dans laquelle les domaines C-terminaux sont proches l'un de l'autre, et la deuxième de type tête-à-queue, nécessitant que la molécule BTN3A soit à plat, parallèle à la surface de la cellule. Les résidus présents dans les surfaces d'interaction des dimères sont assez bien conservés entre les trois isoformes de BTN3A. Les domaines extracellulaires des trois isoformes peuvent donc probablement former des hétérodimères et adopter les deux types de conformation à la surface des cellules. En utilisant des domaines extracellulaires solubles, ils ont pu mettre en évidence l'existence d'homodimères stables de BTN3A en solution. Ces

dimères étaient tous en conformation 1 (forme V) [340]. Cela n'exclu pourtant pas l'existence des deux formes dimériques à la surface des cellules, le dimère 2 nécessitant peut-être l'aide des domaines transmembranaires et intracellulaires, non présents dans les formes solubles, pour se stabiliser. Ils se sont ensuite intéressés aux sites de fixations et au mode d'action des anticorps 20.1 et 103.2. Pour cela ils ont réalisé des co-cristallisation entre la protéine BTN3A1 et des fragments simple chaîne (scFv) de ces anticorps (présence seulement du domaine V de liaison à l'antigène) (**Figure 21**).



**Figure 21 : Modèle de la régulation de l'architecture des protéines BTN3A par les anticorps agoniste 20.1 et antagoniste 103.2.**

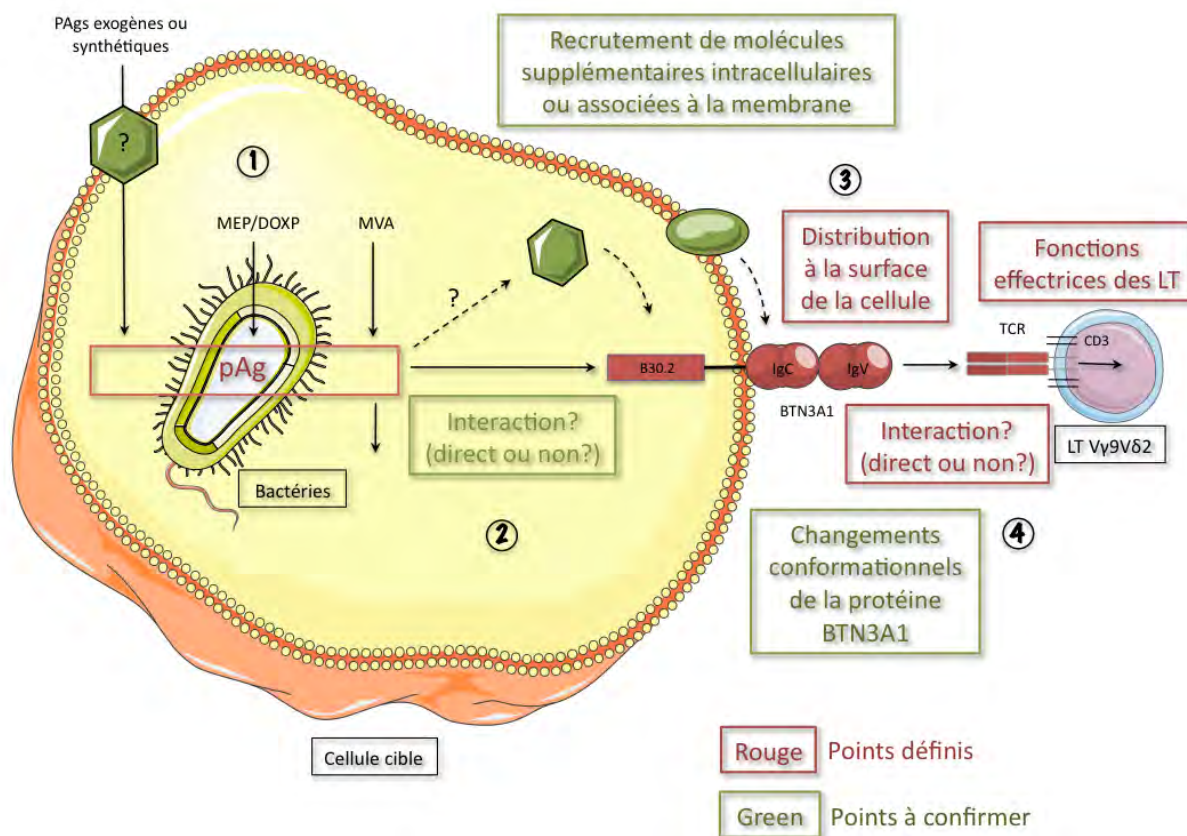
Structures des domaines extracellulaires des protéines BTN3A (en bleu) formant un complexe avec des fragments chaîne simple (scFv) des anticorps agoniste 20.1 (en vert) et antagoniste 103.2 (en rouge). L'anticorps 20.1 ne peut pas atteindre les deux coté du dimère 1 afin d'occuper les deux sites de liaison, il est donc plus probable qu'il agit en multimérisant les protéines BTN3A à la surface de la cellule. L'anticorps 20.1 se lie sur le domaine IgV à l'endroit de l'interface de dimérisation de la conformation 2 et par conséquent perturber la formation de ce dimère sur la surface des cellules. L'anticorps 103.2 peut se fixer sur les deux conformations dimériques, pouvant ainsi potentiellement soit bloquer la conformation active 1, soit stabiliser la conformation inactive 2 à la surface des cellules. D'après Gu et al, 2014 [344].

L'analyse structurale de complexes BTN3A1/scFV a pu mettre en évidence que les deux anticorps ne se fixent pas sur les mêmes épitopes. Le site de liaison de l'anticorps 20.1 est positionné de telle manière que l'anticorps ne peut se fixer de manière divalente sur une protéine car les sites de liaison sont trop distants. Pour que l'Ac 20.1 puisse occuper les deux sites de liaison dans la conformation 1, cela nécessiterait l'engagement de deux dimères de BTN3A. Par conséquent, la fixation de cet anticorps pourrait permettre de relier entre eux les dimères à la surface des cellules. Le site de fixation de l'Ac 20.1 sur le dimère 2 se situe dans la zone d'interaction pour la formation du dimère. Cela suggère donc que la fixation de l'Ac 20.1 serait en compétition avec la formation de dimères de type 2, permettant ainsi la sélection et la stabilisation des dimères 1. L'épitope de fixation de l'Ac 103.2 est accessible sur les deux dimères, l'Ac 103.2 peut donc se fixer de manière divalente sur un dimère de type 1, et peut fixer entre eux des dimères de type 2 [340].

La capacité potentielle de l'Ac 20.1 à fixer les molécules BTN3A entre elles à la surface des cellules est en accord avec les données obtenues en FRAP sur le ralentissement de la mobilité de la protéine BTN3A1 à la surface des cellules après incubation avec l'Ac 20.1. L'équipe d'E. Adams propose le modèle suivant : les molécules BTN3A, dans des conditions physiologiques non stimulatrices, seraient présentes à la surface des cellules dans la conformation inactive 2, et ne pourraient donc pas activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Après addition de l'Ac 20.1, les molécules BTN3A passeraient de la conformation 2 à la conformation 1. Elles seraient liées entre elles à la surface de la cellule via la fixation d'un Ac 20.1 sur deux dimères BTN3A. Elles seraient ainsi converties dans une conformation stimulatrice qui serait capable d'activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. L'Ac 103.2 quand à lui pourrait soit bloquer l'accès à une zone de la protéine BTN3A1 importante pour l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, soit stabiliser les dimères en conformation inactive 2, lui conférant ainsi une activité inhibitrice, même en présence de PAgS.

#### 4. Modalités de l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 induite par les PAgS et médiée par la protéine BTN3A1 et introduction du sujet de thèse

Ces résultats ont permis de décrire un nouveau mode d'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 induit par les PAgS impliquant la protéine BTN3A1 dont les étapes sont détaillées dans la **figure 22**. Les PAgS vont s'accumuler en intracellulaire dans les cellules cibles. Ils vont provenir soit de la voie endogène des mévalonates (ex : dérèglement métabolique dans les cellules tumorales), soit de la voie MEP/DOXP présente dans les microorganismes (ex : cellules infectées par des bactéries). Il existe aussi des PAgS exogènes mais on ne sait pas encore, comme pour les PAgS synthétiques, par quel moyen ils vont être internalisés dans les cellules, ou si ils agissent en extracellulaire. Les PAgS sont des composés qui, nous le supposons, ne traversent pas bien les membranes lipidiques des cellules, on suppose donc qu'ils vont utiliser un mode de transport (de type import/export) qui n'a pas encore été identifié. Cette accumulation de PAgS en intracellulaire va être détecté par la protéine BTN3A1. On ne sait pas si la protéine BTN3A1 détecte et interagit directement avec les PAgS, ou si cela passe par d'autres protéines partenaires intracellulaires. La protéine BTN3A1 va ensuite changer sa distribution à la surface de la cellule et sa mobilité va être ralentie. Ces signaux vont être détectés par le LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 de manière TCR-dépendante. Le LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 va s'activer et mettre en place ces différentes fonctions effectrices (ex : prolifération, production de cytokines, cytotoxicité).



**Figure 22 : Différentes étapes du processus d'activation des LT Vγ9Vδ2 induit par les PAg.**

Toutes les étapes et les molécules colorées en rouge ont déjà été identifiées, tandis que celles en vert doivent encore être confirmées. (1) Les PAg s'accumulent en intracellulaire via la voie endogène des MVA ou la voie MEP/DOXP des microorganismes. Les PAg exogènes peuvent être internalisés via des transporteurs membranaires qui n'ont pas encore été définis. (2) Les PAg vont interagir de manière direct ou indirect avec la protéine BTN3A1. Des partenaires intracellulaires ou membranaires pourraient être recrutés par les PAg ou BTN3A1. (3) Après interaction avec les PAg, la molécule BTN3A1 va changer sa distribution à la surface de la cellule. Il est probable qu'elles subissent aussi des changements conformationnels et qu'elle recrute des protéines partenaires pas encore définies. (4) Ces signaux sont détectés par les LT Vγ9Vδ2, d'une manière dépendante du TCR. Cependant il reste encore à définir si l'interaction de BTN3A1 avec le TCR est directe ou indirecte. D'après Harly et al, 2015 [263].

Il reste cependant de nombreuses zones d'ombres dans les mécanismes d'action de la protéine BTN3A1. On ne sait pas encore comment cette protéine peut détecter les PAg. Est-elle capable d'interagir directement avec eux ou fait-elle appel à des protéines partenaires intracellulaires ? Il conviendrait aussi de définir précisément le rôle du domaine B30.2 dans cette détection car celui-ci semble indispensable à l'activation des LT Vγ9Vδ2 par les PAg. Nos résultats ont montré que la protéine BTN3A1 est nécessaire à l'activation des LT Vγ9Vδ2 mais aussi qu'elle n'est pas suffisante. En effet le transfert de cette protéine dans des cellules murines en présence de PAg solubles ne suffit pas à activer les LT Vγ9Vδ2. L'activation des LT Vγ9Vδ2 via la protéine BTN3A1 nécessite donc probablement le

recrutement d'autres protéines qui ne sont pas non plus exprimées chez la souris. Des travaux récents réalisés par l'équipe de T. Hermann ont montré que l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 nécessite la présence de la protéine BTN3A1 mais aussi d'autres gènes présents sur le chromosome 6. Ils ont transfecté des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) provenant du hamster avec soit la protéine BTN3A1 seule, soit le chromosome 6 (codant pour BTN3A1 et pleins d'autres protéines). En présence d'ABP, seules les cellules transfectées avec le chromosome 6 ont été capables d'activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 [363]. Ces travaux confirment bien l'existence d'autres protéines conservées chez les primates nécessaires à l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, et suggèrent qu'elles puissent se trouver parmi les gènes du chromosome 6, comme la protéine BTN3A1. Pour finir, les travaux de cristallographie ont mis en évidence l'existence de dimères de BTN3A, avec deux conformations possibles : l'une active et l'autre inactive. Il conviendrait de confirmer la présence réelle de ces dimères à la surface des cellules, et d'étudier le rôle de ces conformations dans l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Ces changements de conformation participent peut-être à la reconnaissance de la protéine BTN3A1 par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. On ne sait toujours pas si cette reconnaissance est directe ou indirecte (via une des protéines recrutées par BTN3A1).

Il apparaît important de mieux définir les modalités d'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par les PAgS et le rôle de la protéine BTN3A1. Cela va permettre à long terme une utilisation plus ciblée des molécules activatrices des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 lors des essais immunothérapeutiques et éviter ainsi l'anergie des LT ou l'échappement tumoral.

Les travaux de ma thèse se sont donc concentrés à répondre à trois grandes questions :

- Comment la protéine BTN3A1 détecte les PAgS ?
- Quelles sont les protéines partenaires de la molécule BTN3A1 lors de l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ?
- Quels sont les rôles joués par chacun des domaines de la protéine BTN3A1 en lien avec l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 induite par les PAgS?

## **IV. Résultats**

## **A. Question 1 : les PAgS interagissent-ils directement avec la protéine BTN3A1 ?**

### **1. Introduction**

Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont capables de reconnaître une grande variété de cellules infectées ou tumorales [289]. Ils sont activés via des métabolites de la voie de synthèse des isoprénoïdes appelés PAgS, accumulés à l'intérieur de la cellule cible [115]. L'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par les PAgS est TCR-dépendante et nécessite un contact avec la cellule cible, suggérant l'implication de partenaires moléculaires à la surface de la cellule cible [286, 297, 298]. Notre équipe a mis en évidence un rôle essentiel joué par la sous-famille de protéines BTN3A (ou CD277) dans l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par les PAgS [117]. Cette sous-famille contient trois membres. BTN3A1, BTN3A2 et BTN3A3. Ces trois isoformes possèdent un domaine extracellulaire très homologue composé d'un domaine IgC et d'un domaine IgV. Elles diffèrent essentiellement par leur partie intracellulaire. Seules les isoformes BTN3A1 et BTN3A3 possèdent un domaine intracellulaire nommé B30.2. Ces trois isoformes sont capables d'activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 quand elles sont traitées avec un anticorps anti-BTN3A agoniste appelé 20.1. Cependant, seule l'isoforme BTN3A1 est capable de médier l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 induite par les PAgS, et la présence de son domaine B30.2 est indispensable à ce phénomène. La protéine BTN3A1 est donc capable de détecter l'accumulation de PAgS à l'intérieur de la cellule. Cependant on ne sait pas si cette interaction est directe ou indirecte. Est-ce que les PAgS sont capable d'interagir ou de se fixer sur la protéine BTN3A1 et en particulier son domaine B30.2.

### **2. Résultats**

Pour répondre à cette question, nous avons démarré ce projet de recherche, réalisé en collaboration avec l'équipe d'E. Adams (Université de Chicago, USA). Nous avons cherché, via des approches structurales, biophysiques et fonctionnelles, à définir précisément le rôle du domaine B30.2 de la protéine BTN3A1 dans la détection des PAgS. Les approches biophysiques et cristallographiques ont été réalisées par l'équipe d'E. Adams, et nous nous sommes chargés des approches

fonctionnelles. Ces travaux ont permis la mise en évidence de la présence d'une poche chargée positivement dans le domaine B30.2 capable de fixer les PAg. La mutation de résidus de cette poche abroge la fixation des PAg, et donc la capacité de BTN3A1 à induire l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Nous avons aussi identifié une différence d'un acide aminé entre les domaines B30.2 des isoformes BTN3A1 et BTN3A3 qui est essentielle pour la fixation des PAg (histidine versus arginine en position 351). Lorsqu'on mute ce résidu dans l'isoforme BTN3A3, afin de le faire correspondre à celui de l'isoforme BTN3A1, cela rend l'isoforme BTN3A3 capable de fixer les PAg et d'activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Nous avons donc proposé un modèle dans lequel le domaine B30.2 de la protéine BTN3A1 serait capable de détecter les changements de concentration de PAg à l'intérieur de la cellule. La fixation des PAg sur ce domaine déclencherait une cascade d'évènements dont des réarrangements et/ou des changements conformationnels de la protéine BTN3A1 à la surface de la cellule, déclenchant ainsi l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal Immunity dont je suis 2<sup>ème</sup> auteur.

# The Intracellular B30.2 Domain of Butyrophilin 3A1 Binds Phosphoantigens to Mediate Activation of Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cells

Andrew Sandstrom,<sup>1</sup> Cassie-Marie Peigné,<sup>2,3,4</sup> Alexandra Léger,<sup>2,3,4</sup> James E. Crooks,<sup>5</sup> Fabienne Konczak,<sup>2,3,4</sup> Marie-Claude Gesnel,<sup>2,3,4</sup> Richard Breathnach,<sup>2,3,4</sup> Marc Bonneville,<sup>2,3,4</sup> Emmanuel Scotet,<sup>2,3,4,\*</sup> and Erin J. Adams<sup>1,6,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Chicago, Chicago, IL 60637, USA

<sup>2</sup>INSERM, Unité Mixte de Recherche 892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes Angers, 44000 Nantes, France

<sup>3</sup>University of Nantes, 44000 Nantes, France

<sup>4</sup>Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche 6299, 44000 Nantes, France

<sup>5</sup>Program in Biophysical Sciences, University of Chicago, Chicago, IL 60637, USA

<sup>6</sup>Committee on Immunology, University of Chicago, Chicago, IL 60637, USA

\*Correspondence: [emmanuel.scotet@univ-nantes.fr](mailto:emmanuel.scotet@univ-nantes.fr) (E.S.), [ejadams@uchicago.edu](mailto:ejadams@uchicago.edu) (E.J.A.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.03.003>

## SUMMARY

In humans, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells detect tumor cells and microbial infections, including *Mycobacterium tuberculosis*, through recognition of small pyrophosphate containing organic molecules known as phosphoantigens (pAgs). Key to pAg-mediated activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells is the butyrophilin 3A1 (BTN3A1) protein that contains an intracellular B30.2 domain critical to pAg reactivity. Here, we have demonstrated through structural, biophysical, and functional approaches that the intracellular B30.2 domain of BTN3A1 directly binds pAg through a positively charged surface pocket. Charge reversal of pocket residues abrogates binding and V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation. We have also identified a gain-of-function mutation within this pocket that, when introduced into the B30.2 domain of the nonstimulatory BTN3A3 isoform, transfers pAg binding ability and V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation. These studies demonstrate that internal sensing of changes in pAg metabolite concentrations by BTN3A1 molecules is a critical step in V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell detection of infection and tumorigenesis.

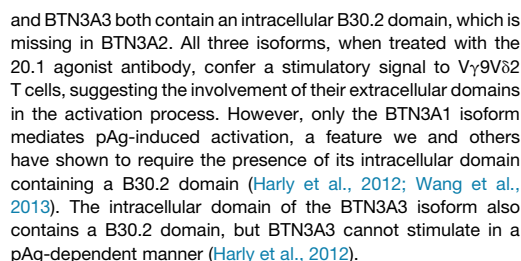
## INTRODUCTION

In humans, 2%–5% of T cells in the blood belong to a unique population of  $\gamma\delta$  T cells that express a T cell receptor (TCR) composed of V $\gamma$ 9 and V $\delta$ 2 chains (Bonneville and Scotet, 2006; Morita et al., 2007). Known as V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (or V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 by a different nomenclature system), these cells can expand to approximately 20% of circulating T cells in individuals during infections by a range of microbial pathogens such as *Plasmodium falciparum* and *Mycobacterium tuberculosis* (Chen, 2013) and in some individuals can reach upward of 90% of circulating T cells (Morita et al., 2007). Expansion of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells has also been observed in patients with lymphoid malignancies (McClanahan

et al., 1999). In vitro, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells target certain cancer cell lines or cells treated with microbial extracts (Tanaka et al., 1994).

V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell reactivity has been traced to accumulation of organic pyrophosphate molecules commonly known as phosphoantigens (pAgs) (Constant et al., 1994; Hintz et al., 2001; Puan et al., 2007; Tanaka et al., 1995). These molecules are produced either endogenously, such as isopentenyl pyrophosphate (IPP), an intermediate of the mevalonate pathway in human cells that can accumulate intracellularly during tumorigenesis, or by microbes, such as hydroxy-methyl-butyl-pyrophosphate (HDMAPP, also known as HMBPP), a microbial intermediate of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway. Along this line, treatment with pharmacological inhibitors of the mevalonate pathway (e.g., aminobisphosphonates [NBPI]), which lead to intracellular accumulation of IPP, sensitizes cells to V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell recognition (Gober et al., 2003; Kunzmann et al., 1999, 2000). Synthetic pAgs such as ethyl pyrophosphate (EtPP) or bromohydrin pyrophosphate (BrHPP) also show potent stimulatory ability when added exogenously (Boëdec et al., 2008; Eberl et al., 2003; Espinosa et al., 2001; Zhang et al., 2006). The relative potency of these pAgs varies more than 1,000-fold between the more potent exogenous HDMAPP and the endogenous ligand IPP.

The V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR is necessary and sufficient for pAg recognition (Bukowski et al., 1995) yet cell-to-cell contact between the T cell and pAg-treated cell is required for stimulation, suggesting the presence of a target-cell-associated ligand (Lang et al., 1995; Morita et al., 1995). Cells of a nonprimate origin treated with pAg do not stimulate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (Wang et al., 2003; Wei et al., 2008), which suggests that a primate-specific protein or proteins is required on the target cell for pAg-induced activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. Previous work by our groups and others has established the required role for the butyrophilin-3A (BTN3A, also known as CD277) subfamily of proteins in mediating pAg signaling (Harly et al., 2012; Palakodeti et al., 2012; Vavassori et al., 2013; Wang et al., 2013). The BTN3A subfamily contains three members in humans: BTN3A1, BTN3A2, and BTN3A3 (Rhodes et al., 2001). Each subfamily member contains an extracellular, N-terminal IgV and a membrane-proximal IgC domain connected to a single-pass transmembrane domain. BTN3A1



## RESULTS

### Phosphoantigen-Mediated Stimulatory Activity of BTN3A1 Maps to the N-Terminal Region of the B30.2 Domain

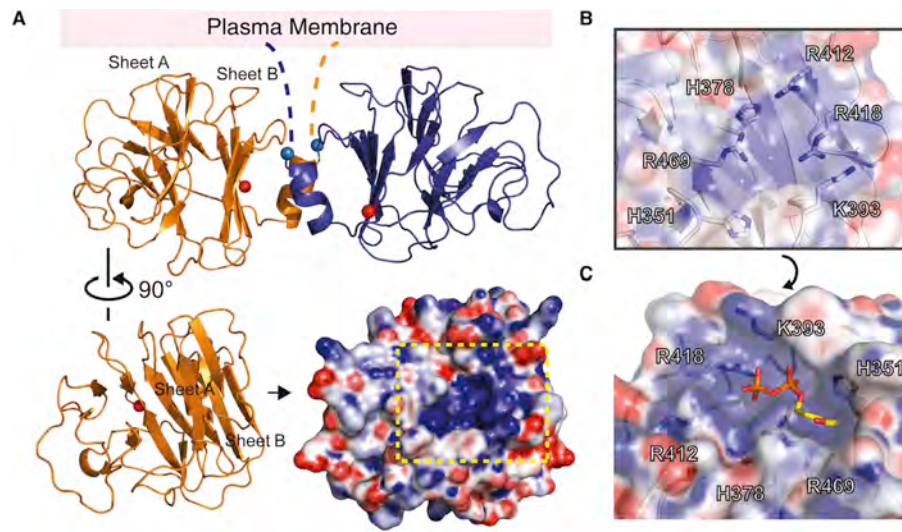
Previous results from our groups and others have demonstrated that the intracellular portion of BTN3A1, which contains a B30.2 domain, is necessary to mediate pAg stimulation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (Harly et al., 2012; Wang et al., 2013). The closely related BTN3A3 isoform, also containing a B30.2 domain in its intracellular domain followed by a 70 amino acid C-terminal tail, is incapable of stimulating V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells in the presence of pAg. To determine whether pAg-related activity was contained within the B30.2 domain, we swapped the B30.2 domain of BTN3A3 for that of BTN3A1 and tested whether this hybrid construct could activate in a pAg-dependent manner. Nonreactive BTN3A3 shRNA-silenced cells transfected with this hybrid construct potently stimulated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells after treatment with the bisphosphonate zoledronate (NBP) (Figure 1A). Removal of the 70 amino acid C-terminal cytoplasmic tail of BTN3A3 from this hybrid did not substantially affect the stimulatory ability, suggesting that pAg-mediated activation is restricted to the core B30.2 sequence. To further dissect which regions of the B30.2 domain of BTN3A1 are involved in pAg activity, we swapped three regions of sequence of BTN3A1, indicated as Boxes 1, 2, and 3 in Figure 1B, either individually or in combination into BTN3A3. The resulting full-length hybrid constructs were tested for their ability to mediate pAg-induced V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell stimulation. In each case, the sequence in Box 1 produced

### Figure 1. Phosphoantigen Reactivity Is Mapped to the BTN3A1 Intracellular B30.2 Domain

(A) Percentage of human V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T cells expressing CD107a after coculture with HEK 2834 cells mock-transfected (Mock) or re-expressing, after transient transfection, either wild-type (WT) BTN3A1 or BTN3A3 isoforms or chimeric BTN3A3 proteins assembled with the BTN3A1 B30.2 domain with (BTN3A3 B30.2 A1) or without (BTN3A3 B30.2 A1 short) the extra C-terminal tail of BTN3A3. Target cells were pretreated for 2 h with the  $\alpha$ -CD277 mAb 20.1 (10  $\mu$ g/ml) or the NBP zoledronate (100  $\mu$ M). Data are representative of three independent experiments.

(B) Amino acid sequence alignment of the B30.2 domains of BTN3A1 (top) and BTN3A3 (bottom). Positions identical to BTN3A1 are shown as dashes and differences are shown in capital letters. Dots indicate the region missing in BTN3A1. The swapped regions are indicated and labeled accordingly (Box 1, Box 2, and Box 3, abbreviated as b1, b2, and b3, respectively). Numbering corresponds to the full-length sequence of BTN3A proteins.

(C) Percentage of human Vγ9Vδ2 T cells expressing CD107a after coculture with NBP-treated mutant-BTN3A HEK293 transfectants. Full-length BTN3A3, which does not mediate pAg activation of Vγ9Vδ2 T cells, had the corresponding BTN3A1 regions (b1, b2, b3, or a combination thereof) swapped into the intracellular B30.2 region. These mutants were used as targets for treatment with NBP (NBP) or vehicle (-) and the Vγ9Vδ2 response was measured as CD107a upregulation. Data are presented as mean of specific values  $\pm$  SD of the percentage of CD107a-positive  $\gamma\delta$  T cells ( $n > 3$ ).



**Figure 2. Crystal Structure of the BTN3A1 Intracellular B30.2 Domain at 1.4 Å Resolution**

(A) Ribbon diagram of the BTN3A1 B30.2 domain dimer observed in the crystal lattice. Monomers of B30.2 are shown in orange and blue with the N and C termini of each shown as blue and red spheres, respectively. The two  $\beta$  sheets that compose the core of the B30.2 domain, sheet A and sheet B, are indicated. The putative position of the N-terminal linker regions in relation to the transmembrane domain are shown as dashed lines and the plasma membrane is modeled in pink. A monomer is oriented below the dimer to indicate the orientation shown as electrostatic surface, to the right. The electrostatic potential is shown rendered on the B30.2 domain surface. The surface is colored from red (–20 kT) to blue (20 kT) with the basic pocket indicated by a dashed yellow box.

(B) Close-up of the putative pAg binding pocket showing the six basic residues contributing to the highly positive charge of the pocket. These residues are shown as sticks under a transparent surface colored according to the electrostatic potential.

(C) Rotated view of (B) showing the results of molecular docking performed by Autodock Vina. A best-fit docking position of the pAg, HDMAPP, is shown by a stick model; it is well positioned in the binding pocket with a free energy ( $\Delta G$ ) calculated to be –5.6 kcal/mol, with the  $\beta$ -phosphate coordinated by the three arginines R12, R418, and R469.

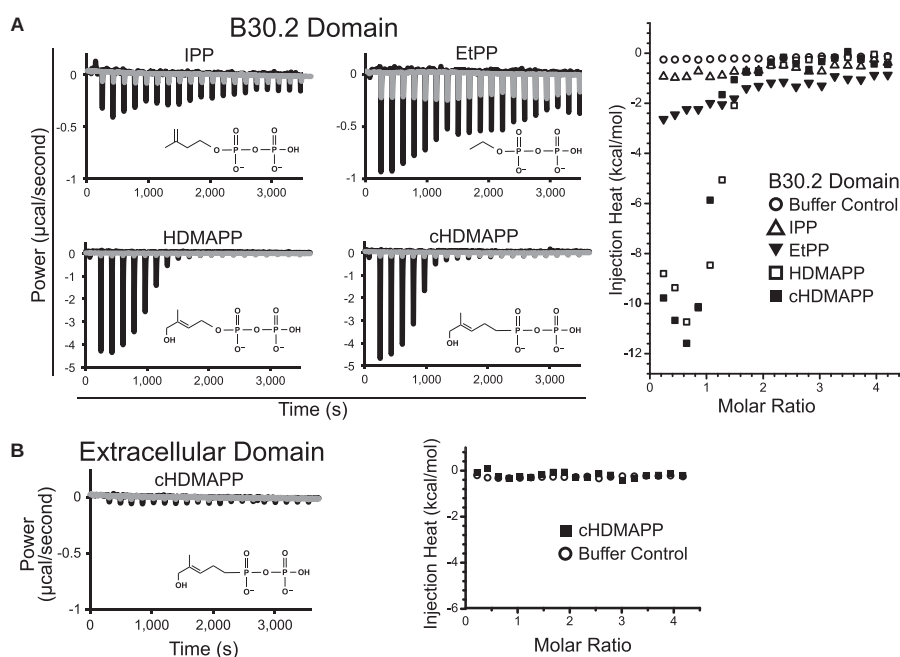
a gain-of-function phenotype for BTN3A3 in NBP-treated cells, either alone or in combination with other sequence ranges (Figure 1C). Therefore, we concluded that the difference in response to pAg mapped to one or more of the eight sequence differences between the B30.2 domains of BTN3A1 and BTN3A3 located in the Box 1 region.

#### The 1.4 Å Structure of BTN3A1 B30.2 Domain Reveals a Basic Pocket Suitable for Phosphoantigen Binding

To better understand the role the B30.2 domain plays in pAg-mediated activation, we determined the structure of the BTN3A1 B30.2 domain to 1.4 Å resolution (Figure 2A). The domain crystallized with one molecule in the asymmetric unit and the structure was refined to an  $R_{\text{cryst}}/R_{\text{free}}$  of 13.5%/16.6% (Table S1 available online). The BTN3A1 B30.2 domain adopted a general B30.2 architecture (Woo et al., 2006): a  $\beta$  sandwich formed by two sets of antiparallel  $\beta$  sheets (sheets A and B) that form the SPRY domain and are extended by the N-terminal PRY  $\beta$  strands. This B30.2 domain had high structural similarity to the B30.2 domain contained within the intracellular IgG receptor, Trim21 (Keeble et al., 2008), with a root-mean-square deviation (rmsd) of only 0.75 Å between the C $\alpha$  backbone structures. In our structure, one crystal contact formed a symmetrical dimerization interface around the N-terminal  $\alpha$  helix that connects to the transmembrane domain in the full-length protein (Figure 2A).

This dimer interface buried approximately 560 Å<sup>2</sup> (PDBePISA server: [http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/cgi-bin/piserver](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver)), suggesting a possible physiologically relevant dimer consistent with the dimer architecture identified in our structures of the BTN3A extracellular domains verified via fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis (Palakodeti et al., 2012). Some but not all B30.2 domain crystal structures show dimer interfaces similar to that observed in our structure (PDB ID: 2WL1 and 4B8E). Examination of the B30.2 oligomeric state via multiangle light scattering (MALS), however, showed that the B30.2 domain was predominately monomeric in solution at moderate to high (2–10 mg/ml) protein concentrations (Figure S1).

Because all known pAgs contain a negatively charged pyrophosphate group, we next calculated the electrostatic surface of the B30.2 domain to identify any obvious positively charged pockets that might indicate potential pAg binding sites. A highly positively charged surface formed by the close proximity of three arginines (R412, R418, and R469), two histidines (H351 and H378), and a single lysine (K393) was immediately identified on the surface of sheet A (Figure 2B). Density for these side chains was well resolved at 1 $\sigma$ , although multiple rotomers were observed for K393, R412, and H351. Of note, H351 is one of the candidate positions identified in our sequence swapping analysis shown in Figure 1, further implicating this region of the B30.2 domain in pAg binding.



**Figure 3. Binding of Phosphoantigen to the BTN3A1 Intracellular B30.2 Domain**

(A) Raw ITC traces showing injection of pAg into solution containing either the BTN3A1 B30.2 domain (black) or buffer (gray). Binding measurements were performed with 100  $\mu\text{M}$  B30.2 in the cell and 2.0 mM pAg in the syringe. The binding isotherms showing binding of the different pAg agonists to the BTN3A1 intracellular B30.2 domain are shown to the right, plotted on the same axis for comparison. Buffer control is shown as open circles, IPP as open triangles, EtPP as filled triangles, HDMAPP as open squares, and cHDMAPP as filled squares. The chemical structure of each pAg is shown under the binding isotherm traces.

(B) Binding measurements of the highly potent cHDMAPP to the extracellular domain of BTN3A1 (black) or buffer control (gray). Measurements were performed with 100  $\mu\text{M}$  BTN3A1 extracellular domain in the cell and 2 mM cHDMAPP in the syringe. The binding isotherms are shown with buffer control (open circle) or cHDMAPP (filled square) to the right.

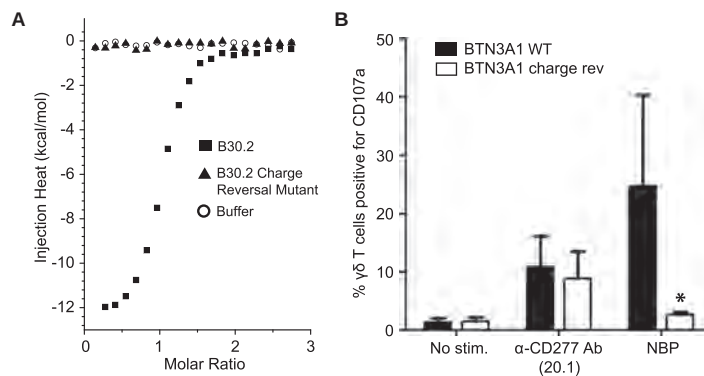
We then used Autodock Vina, a computational modeling program using Monte Carlo calculations, to identify potential pAg binding sites. Using a  $\sim 10,000 \text{ \AA}^3$  search box with the identified basic pocket at the center, multiple searches were performed to find the best-fit docking of the pAg. These calculations repeatedly docked the pAg in the positively charged pocket (Figure 2C) with an estimated binding energy ( $\Delta G$ ) of  $-5.6 \text{ kcal/mol}$ . The two negatively charged phosphates were positioned such that they were coordinated by the three arginines whereas the organic chain of the pAg was located at the edge of the pocket, in a more neutral region.

#### The BTN3A1 B30.2 Domain Directly Binds Phosphoantigen

Our structural and sequence swapping studies strongly implicated the B30.2 domain of BTN3A1 as the binding partner of pAg. To directly test this, we used isothermal titration calorimetry (ITC) to measure the interaction of pAg with the B30.2 domain. We tested four pAg agonists of varying stimulatory potency: IPP, EtPP, HDMAPP, and hydroxy-methyl-butyl-pyrophosphate (cHDMAPP), a synthetic analog to HDMAPP containing a phosphonate linkage in place of the phosphate linkage of HDMAPP.

cHDMAPP is reported to have similar potency but greater stability than HDMAPP (Boëdec et al., 2008). Clear binding to B30.2 was observed with each of the pAg agonists (Figure 3A). Fitting of the ITC data revealed that the high-potency agonists HDMAPP and cHDMAPP bound with a similar affinity of approximately 0.5  $\mu\text{M}$ , whereas IPP and EtPP bound with 0.5 mM, correlating with their 1,000-fold difference in potency as  $\gamma\gamma 9V\delta 2$  T cell agonists (Figure S2A and Table S2). Vavassori et al. (2013) have proposed that pAg associates with the extracellular domain of BTN3A1. However, we were unable to detect binding of the highest-potency pAg (cHDMAPP) to the complete extracellular domain of BTN3A1 via ITC at different temperatures (Figures 3B and S2B). These results demonstrate that the B30.2 intracellular domain of BTN3A1 is the direct receptor for pAg binding.

To determine whether the positively charged pocket identified in our structural studies was the site of pAg binding, we made charge-reversal mutations to five of the basic residues in the pocket: H378D, K393D, R412E, R418E, and R469E. This mutant expressed and purified similarly to the wild-type B30.2 domain (data not shown). When ITC was used to measure binding of the high-potency pAg cHDMAPP for this mutant, no detectable binding was observed (Figure 4A). Therefore, changing the



**Figure 4. Charge Reversal of Putative pAg Binding Pocket Residues Prevents pAg Binding and V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 Activation**

The residues of the B30.2 basic pocket were mutated as follows: H378D, K393D, R412E, R418E, and R469E.

(A) Shown are the binding isotherms of cHDMAPP with the B30.2 domain (filled squares), the B30.2 charge-reversal mutant (filled triangle), and a buffer control (open circles).

(B) V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell stimulation as assessed by CD107a upregulation is shown in response to no stimulation (No stim.), addition of the  $\alpha$ -CD277 agonist antibody 20.1, or in the presence of the bisphosphonate zoledronate (NBP). Data are presented as mean of specific values  $\pm$  SD of the percentage of CD107a-positive  $\gamma\delta$  T cells ( $n \geq 3$ ). \* $p < 0.05$  (Student's  $t$  test).

charge of the basic pocket from positive to negative ablates pAg binding, supporting this as the site of pAg binding. We also tested the effect the charge reversal had on the ability of BTN3A1 to stimulate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells in a pAg-dependent fashion. Consistent with the inability to bind pAg, charge reversal of this pocket in the B30.2 domain of the full-length BTN3A1 protein failed to support pAg-dependent stimulation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (Figure 4B).

#### Phosphoantigen Reactivity Is Transferred to BTN3A3 through a Single Amino Acid Change in the Binding Pocket

Although only BTN3A1 is able to mediate pAg stimulation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, the closely related BTN3A3 isoform also contains a B30.2 domain that shares 87% sequence identity with that of BTN3A1. Our sequence swapping results shown in Figure 1 indicated that sequence differences in Box 1 were linked to pAg reactivity and that one of these residues, position 351, was located within the pAg binding pocket; BTN3A1 has a histidine and BTN3A3 an arginine at this position (Figure 1B). To characterize the role of position 351 on pAg binding, we constructed sequence-swapped BTN3A1 and BTN3A3 mutants and tested them via ITC. As a control, we included constructs with a sequence swap mutation distal to the pAg binding site (position 426) or with the C-terminal tail of BTN3A3 removed. Neither the distal mutation K426E nor removal of the C-terminal tail (amino acids 485–555) affected pAg binding via ITC (Figure 5A), but the binding pocket mutants BTN3A1\_H351R and BTN3A3\_R351H demonstrated a dramatic reversal of binding: loss of pAg binding for BTN3A1\_H351R and gain of pAg binding for BTN3A3\_R351H.

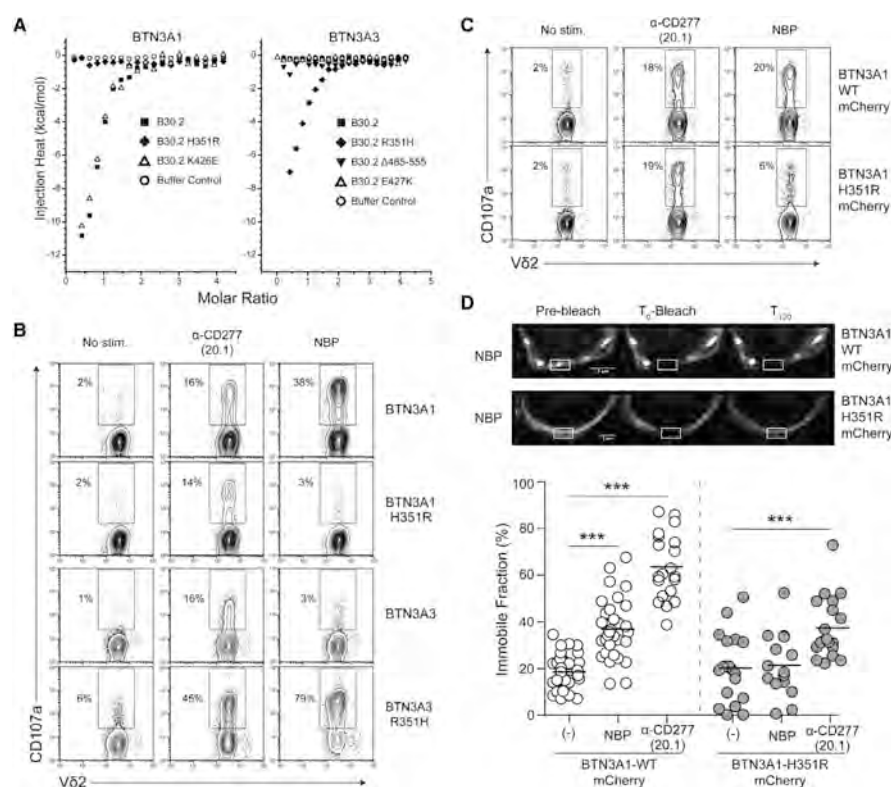
We next determined whether this single amino acid difference was responsible for the observed differences in V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell-stimulatory capability between BTN3A1 and BTN3A3. As described previously (Harly et al., 2012), we used shRNA to silence endogenous BTN3A and then reintroduced into cells the individual BTN3A isoforms and the corresponding position 351 mutants. We measured the ability of the cells to stimulate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells either after treatment with the agonist 20.1 antibody or after NBP treatment (Figure 5B). Consistent with what we observed for pAg binding, BTN3A1\_H351R was unable to mediate NBP-induced stimulation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, even

though it was able to stimulate after treatment with the agonist antibody 20.1. Unlike the WT BTN3A3 protein, the BTN3A3\_R351H mutant was able to mediate NBP-induced stimulation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells and did so even more potently than did the WT BTN3A1 protein. Similar results were obtained with treatment of these mutants with the soluble pAg BrHPP (Figure S3), supporting that the NBP-induced effect is due to an elevation in pAg concentration.

Previously we demonstrated that addition of the agonist 20.1 antibody or NBP to target cells resulted in immobilization of BTN3A1 on the cell surface (Harly et al., 2012), suggesting that BTN3A1 immobilization is an important step in the induction of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell stimulation. To determine whether pAg binding to the B30.2 domain was required for this immobilization to occur, we repeated this experiment with our BTN3A1\_H351R mutant. Wild-type and mutant BTN3A were engineered with a C-terminal mCherry tag for visualization and reintroduced into BTN3A-silenced cells. These constructs behaved similarly to untagged BTN3A constructs in their ability to stimulate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells after 20.1 or NBP addition (Figure 5C), indicating that addition of the C-terminal tag was not disruptive. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) measurements of these transfected cells after incubation with NBP revealed clear immobilization of BTN3A1 containing a wild-type, pAg-binding-proficient, B30.2 domain. In marked contrast, cells transfected with a BTN3A1 construct containing the non-pAg binding, B30.2 domain mutant H351R showed no FRAP difference compared to untreated cells (Figure 5D). These results again support our model in which binding of pAg by the B30.2 domain of the BTN3A proteins induces cell-surface immobilization of BTN3A1 molecules, leading to stimulation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells.

#### Complex Crystal Structure Locates Phosphoantigen in the Positively Charged Pocket of the B30.2 Domain

To further characterize the mode of pAg binding to the BTN3A1 B30.2 domain, we next pursued structural studies of cHDMAPP in complex with B30.2. Initial attempts to soak cHDMAPP into existing B30.2 crystals failed because addition of cHDMAPP to pregrown crystals caused the crystals to dissolve. Attempts at cocrystallizing pAg with the B30.2 domain generated no crystals of diffraction quality. We therefore used glutaraldehyde cross-linking to stabilize our apo crystals followed by soaking with



**Figure 5. A Single Amino Acid Difference Mediates pAg Reactivity between the BTN3A1 and BTN3A3 B30.2 Domains**

(A) ITC binding isotherms comparing the binding of cHDMAPP to the wild-type BTN3A1 (pAg-responsive) B30.2 domain or mutants containing the respective BTN3A3 (pAg-inactive) residue are shown at left. Binding of cHDMAPP is shown to B30.2 (filled squares), H351R (filled diamonds), K426E (open triangle), or the buffer control (open circle). At right are the ITC binding isotherms comparing the binding of cHDMAPP to the wild-type BTN3A3 B30.2 domain or mutants in which the relevant BTN3A1 residues are introduced. A BTN3A3 B30.2 domain mutant lacking the additional 70 C-terminal residues ( $\Delta 485-555$ ) was also assessed for pAg binding. Binding of cHDMAPP is shown to B30.2 (filled squares), R351H (filled diamonds), the C-terminal truncation  $\Delta 485-555$  (filled triangles), E427K (open triangle), or the buffer control (open circle).

(B) FACS plots showing CD107a upregulation of  $V\gamma 9V\delta 2$  T cells in response to treatment of wild-type and sequence-swapped B30.2 domain full-length BTN3A constructs with  $\alpha$ -CD277 agonist antibody 20.1 or in the presence of the bisphosphonate zoledronate (NBP).

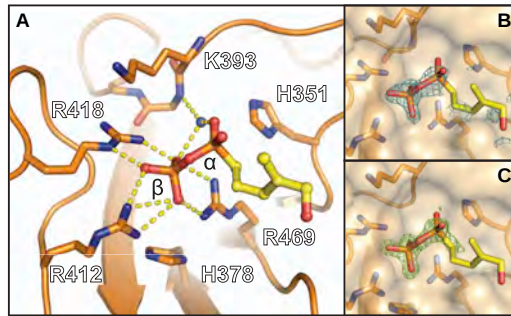
(C) Functionality of fluorescent wild-type and mutated BTN3A1 chimeras are shown via FACS plots showing CD107a upregulation on  $V\gamma 9V\delta 2$  T cells (polyclonal line) after coculture with CD277shRNA#284 transduced-HEK293FT cells transiently transfected for the expression of either wild-type (WT) or H351R B30.2 domain mCherry full-length BTN3A1 constructs. Cells were treated with  $\alpha$ -CD277 agonist antibody (clone #20.1) or the aminobisphosphonate zoledronate (NBP) before coculture. Numbers adjacent to outlined areas indicate the percentage of CD107a<sup>+</sup> T cells.

(D) Top: Representative confocal images of HEK293 cells expressing mCherry-WT or -H351R BTN3A1 molecules after overnight incubation with NBP, shown before (Pre-bleach), immediately after ( $T_0$ -bleach), and 120 s after ( $T_{120}$ ) photobleaching of regions of interest (indicated rectangular areas). Scale bars represent 3  $\mu$ m. Bottom: FRAP analysis of HEK293 cells expressing either wild-type or H351R B30.2 domain mCherry full-length BTN3A1 molecules, without treatment (-) or after incubation with NBP or  $\alpha$ -CD277 agonist mAb (20.1). Data are presented as the value for the percentage of immobile fraction. FRAP was collected every 5 s. Control: no treatment, (-). BTN3A1 WT: (-), n = 48; NBP, n = 34;  $\alpha$ -CD277, n = 20. BTN3A1 H351R: (-), n = 19; NBP, n = 15;  $\alpha$ -CD277, n = 19. Bars indicate mean values. Student's t test: \*\*\*p < 0.005.

cHDMAPP. These crosslinked and soaked crystals diffracted well and the data set was refined to an  $R_{\text{cryst}}/R_{\text{free}}$  of 15.3%/19.0% (Table S1) and showed clear tetrahedral electron density consistent with the  $\beta$ - and  $\alpha$ -phosphates of the pAg, placing it directly in the binding pocket in a conformation similar to what was proposed by our docking results (Figure 6). The  $\beta$ -phosphate establishes seven hydrogen bonds with the three argi-

nines it contacts: R412, R418, and R469 (Figure 6A). Two additional water-mediated hydrogen bonds are established with both phosphates with the main-chain nitrogen of M394. The organic chain is poorly resolved in the electron density, suggesting that it is highly mobile in the crystal structure.

It must be noted that identification of small molecules via crystallography is exceptionally difficult because there is no de novo



**Figure 6. Structure of cHDMAPP in Complex with B30.2 Domain of BTN3A1**

(A) B30.2 is shown in ribbon format in orange, with pAg binding pocket residues shown as sticks. cHDMAPP is shown as sticks with spheres, and specific atoms are shown with standard coloring (carbon, yellow; red, oxygen; blue, nitrogen; and orange, phosphate). Hydrogen bonds  $\leq 3.3\text{\AA}$  are shown as yellow dashes. Water molecules are shown as blue spheres.

(B) Omit map density of cHDMAPP is shown in teal scaled at  $1\sigma$ .

(C) Positive density observed in the complex structure but missing in the apo structure as identified from the isomorphous difference map is shown in green scaled at  $4\sigma$ .

way to determine whether or not the density observed comes from the modeled molecule. Omit map density of our pAg in the binding pocket was unambiguous (Figure 6B), but because our apo- and pAg-soaked crystals were isomorphous, we verified our pAg density through an isomorphous difference map between our apo B30.2 and cHDMAPP and B30.2 complex data sets. We clearly observed, even at  $4\sigma$ , tetrahedral density that corresponds to the position of the  $\beta$ -phosphate phosphorus (Figure 6C). This density is inconsistent with the structure of glutaraldehyde, the only additional additive in the complex crystals, verifying that the observed density must belong to cHDMAPP.

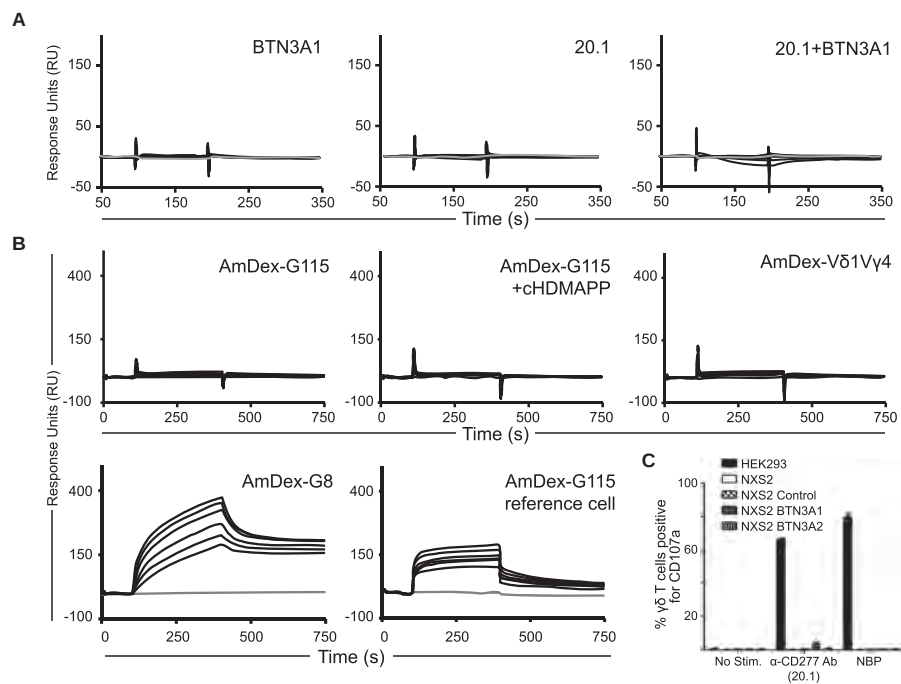
This high-resolution complex structure also allows closer examination of the effect that a histidine-to-arginine change at position 351 would have upon pAg binding. Our complex structure showed both electrostatic and hydrogen-bonding contacts making important contributions to pAg binding. Position 351, a histidine in the BTN3A1 B30.2 domain that is competent to bind pAg, was essentially buried, contributing only a small percentage to the exposed surface that comprises the pAg binding pocket and not establishing any direct contacts with the pAg. Introduction of an arginine side chain at this position would require considerable rearrangement of the surrounding residues, probably resulting, at a minimum, in a structural change to the binding pocket and more likely causing broader structural changes to the B30.2 domain. Anecdotal, we have observed lower protein stability and solubility at high concentrations with recombinantly produced BTN3A3 B30.2 domain (R351) as well as the BTN3A1 B30.2 domain containing the H351R mutant, suggesting that this side chain difference has consequences to protein structure beyond the pAg binding pocket.

The apparent contradiction of our biophysical, structural, and functional results establishing the B30.2 domain as the pAg sensor with those previously published by Vavassori et al.

(2013) led us to re-examine the electron density presented in their complex structure. We downloaded the structure factors and coordinate files (PDB IDs: 4JKW and 4K55) from the RCSB and calculated omit maps (whereby the ligand is omitted from the model during map calculation to generate unbiased electron density). In the electron density calculated by these means, a clear circular density was apparent surrounding the central lysine (K39) in both their BTN3A1V structures (Figure S4). This density is inconsistent with the structure of a pAg, where the phosphate moieties would have much stronger scattering ability (and thus greater electron density) than the organic portion. Instead, a polyethylene glycol (PEG) molecule, a major component of the crystallization solution used to obtain the BTN3A1V crystals, modeled into this site fits this electron density well. PEGs can interact with lysines similar to crown ethers (Julian and Beauchamp, 2001; Kotlyar et al., 2005) whereby the protonated amino group of the lysine hydrogen bonds with the oxygen atoms of the PEG. We therefore believe that the electron-density maps of this region have been inadvertently misinterpreted. This proposed binding site was also inconsistent with previously published data demonstrating that BTN3A2 does not mediate pAg-induced activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, because the pAg binding site proposed in their crystal structure is completely conserved between BTN3A1 and BTN3A2.

#### No Association Detected between the BTN3A1 Extracellular Domain and the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR

To determine whether the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR was binding directly to the BTN3A1 extracellular domain, we performed surface plasmon resonance (SPR) with BTN3A1 alone and in combination with the agonist antibody (20.1) single chain, which forms a complex competent to induce V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation (Harly et al., 2012; Palakodeti et al., 2012). Despite our use of the high immobilization density of the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 G115 TCR (Davodeau et al., 1993) and high concentrations of 20.1-complexed BTN3A1 analyte, no binding was detected (Figure 7A). At these protein concentrations, detectable binding should be observed at affinities of  $\sim 500\text{ }\mu\text{M}$  or stronger, suggesting that if these proteins do interact, it is with an exceedingly weak affinity. Furthermore, binding was not detected via SPR with a reversed immobilization strategy and AmDex multimerized G115 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR ( $\sim 60$ mers) as analyte and full-length BTN3A1 extracellular domains site specifically immobilized on the SPR chip surface (Figure 7B), a strategy similar to that used by Vavassori et al. (2013). We observed high, nonspecific background binding of the AmDex-conjugated TCRs to the sensor-chip surface (Figure 7B); therefore, all G115 and TCR negative-control measurements were subtracted from a surface immobilized with the murine nonclassical class I molecule T22. The G8 TCR, specific to T22, was used as a positive control for our AmDex multimerization; we see a substantially slower dissociation rate with the AmDex-multimerized G8 TCR when flowed over a T22-immobilized surface (Figure 7B), reference subtracted from a BTN3A1 immobilized flowcell. Finally, transfection of full-length BTN3A1 into the murine neuroblastoma cell line NXS2 failed to support V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell stimulation either in the presence of pAg or through the addition of the 20.1 agonist antibody, supporting the hypothesis that BTN3A1 was necessary but not sufficient for V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation and that another, primate-specific molecule or



**Figure 7. BTN3A1 Is Necessary but Not Sufficient to Stimulate  $V\gamma 9V\delta 2$  T Cells**

(A) SPR analysis of injections of the BTN3A1 extracellular domain, 20.1 single chain antibody, and the BTN3A1 extracellular domain in complex with the 20.1 single chain antibody from 0.03125  $\mu$ M to 4  $\mu$ M (black) flown over immobilized G115  $V\gamma 9V\delta 2$  TCR. Control injections of buffer alone for each experiment are shown in gray.

(B) Multimerized G115  $\gamma\delta$  TCRs do not bind recombinant, full-length BTN3A1. AmDex multimerized TCRs were made by conjugating C-terminally biotinylated TCRs at a 60:1 ratio with streptavidin-conjugated AmDex polymers. Serial dilutions from 1  $\mu$ g/ml to 0.03125  $\mu$ g/ml of AmDex TCRs were injected over immobilized full-length BTN3A1 and the murine T22 protein. Because nonspecific interactions were observed between the TCR conjugates and the biotin-coated reference flow cell (AmDex-G115 reference cell), specific binding was measured by subtracting nonspecific interactions with T22 from the signal from BTN3A1 channel. This analysis was reversed for the G8 murine TCR. Coinjection of 1 mM cHDMAPP with the G115 AmDex conjugate did not alter observed interactions.

(C) Rodent cells expressing full-length human BTN3A1 do not activate human  $V\gamma 9V\delta 2$  T cells after agonist 20.1  $\alpha$ -CD277 mAb or NBP pretreatment. Expression of CD107a on  $V\gamma 9V\delta 2$  T cells after coculture with NXS2 murine neuroblastoma tumor cells expressing full-length human BTN3A1 or BTN3A2 after transient transfection. 36 hr after transfection, surface expression of BTN3A was confirmed by flow cytometry. Target cells were pretreated for 2 hr with agonist 20.1  $\alpha$ -CD277 mAb (10  $\mu$ g/ml) or the NBP Zoledronate (100  $\mu$ M). Data are presented as the mean of specific values  $\pm$  SD of the percentage of CD107a-positive  $\gamma\delta$  T cells. Positive control: human HEK293 cells. Similar results were obtained with the following rodent cell lines also transfected for the expression of human ICAM-1: AB1, mouse; MC38, mouse; M5T1, rat.

molecule(s) participate in directly activating through the  $V\gamma 9V\delta 2$  TCR (Figure 7B).

## DISCUSSION

The molecular mechanisms by which  $V\gamma 9V\delta 2$  T cells respond to changes in endogenous (tumor-derived) or exogenous (microbial-derived) pyrophosphate-based metabolites have been challenging to define. Our previous work showing that all three human BTN3A molecules can mediate pAg-independent  $V\gamma 9V\delta 2$  T cell stimulation in the presence of the 20.1 agonist antibody demonstrated the importance of the BTN3A extracellular domain in this process (Harly et al., 2012). Addition of this antibody induced a marked immobilization of BTN3A on the cell

surface, providing insight into the molecular steps that occur on the extracellular surface of target cells in order to engage  $V\gamma 9V\delta 2$  T cells. The role of pAg, however, remained unclear. Although previous work by others (Vavassori et al., 2013; Wang et al., 2010) postulated that pAg is presented to  $V\gamma 9V\delta 2$  T cells in a manner homologous to antigen presentation by MHC molecules, our data instead support an unexpected mechanism for intracellular pAg detection.

Our structural, biophysical, and mutagenic approaches showed that pAg binds with functionally relevant affinities to a positively charged pocket formed by sheet A of the B30.2 domain (Woo et al., 2006). This pocket, lined by the basic residues H351, H378, K393, R412, R418, and R469, is a specialized feature of the BTN3A B30.2 domains. These residues are strictly

conserved in the BTN3A1 orthologs in the ape and monkey species that maintain the  $V\gamma 9V\delta 2$  T cell population (Wang et al., 2003) but are not conserved in B30.2 domains found in other proteins. The finding that one pocket residue difference between the B30.2 domains of BTN3A1 and BTN3A3 determines pAg binding (H351R) suggests yet another level of specialization of the BTN3A1 isoform for this activity. It is unclear what function, if any, the BTN3A2 or BTN3A3 isoforms perform in this system.

Although pAg binding to the extracellular surface of target cells for activation of  $V\gamma 9V\delta 2$  T cells is a simple and attractive model (Vavassori et al., 2013), our data do not support this mechanism of action. We observed no binding of pAg to the extracellular domain of BTN3A1 despite using high concentrations of protein and pAg in our ITC experiments. We have also been unable to detect interactions between the extracellular domain of BTN3A1 with that of the  $V\gamma 9V\delta 2$  TCR G115, either in the presence or absence of the agonist mAb 20.1 or soluble pAg. Furthermore, mAb 20.1 or pAg treatment of BTN3A1-transfected murine cells does not support  $V\gamma 9V\delta 2$  T cell activation, which is inconsistent with a direct  $V\gamma 9V\delta 2$  TCR-BTN3A1 interaction mediating stimulation and instead raises the possibility that additional, primate-specific proteins are involved in this process. Furthermore, the model proposed by Vavassori and colleagues does not explain the specificity for BTN3A1 for  $V\gamma 9V\delta 2$  T cell stimulation, because their proposed pAg binding pocket is conserved between the BTN3A1 and inactive BTN3A2 isoforms.

It is also important to note that most of the physiologically relevant pAg are generated intracellularly. Endogenous or “self-made” pAg, such as IPP or DMAPP, are products of the intracellular mevalonate pathway and can accumulate within the cell during metabolic changes, for example during tumorigenesis. These metabolites also accumulate intracellularly after addition of aminobisphosphates (NBP) that inhibit enzymes downstream of IPP synthesis, such as farnesyl pyrophosphate synthase. Additionally, many pathogens, such as *Mycobacterium tuberculosis*, to which  $V\gamma 9V\delta 2$  T cells respond, are intracellular pathogens, further demonstrating that rising concentrations of intracellular pAg are the key factor in disease surveillance. Thus, an intracellular domain that can “sense” these changes in intracellular pAg concentrations would provide a more sensitive detector than an extracellular domain that would require pAg to exit the cell and be detected by low affinity ( $K_D \approx 1 \mu\text{M}$ ; Vavassori et al., 2013) and at low concentrations resulting from diffusion in the extracellular milieu.

Intracellular detection of pAg must of course be translated into extracellular signals that can be detected by the  $V\gamma 9V\delta 2$  TCR. There are several ways in which this “inside-out” signaling may occur. Our accumulated data suggest a model where pAg binding to the BTN3A1 intracellular domain results in recruitment of additional primate-specific factors and/or rearrangement of the BTN3A1 extracellular domain that generates a stimulatory signal directly detected by the  $V\gamma 9V\delta 2$  TCR. This is similar to “Model 2” proposed by Morita and colleagues (Wang et al., 2013) based on their modeling of the B30.2 domain. Our evidence that pAg binding to the B30.1 domain results in immobilization of BTN3A1 molecules on the cell-surface provides an important insight into what may be the next steps in the signaling process for  $V\gamma 9V\delta 2$  T cell activation.

B30.2 domains are present in a large number of proteins that perform diverse functions, a subset of which are involved in immune defense (Gober et al., 2003). These domains are generally thought to be protein-interacting modules, but their binding partners are diverse and there is no clearly conserved binding interface. Understanding how pAg binding to the B30.2 domain causes BTN3A1 immobilization and leads to  $V\gamma 9V\delta 2$  TCR engagement is an important next step. Identification of B30.2 domain binding partners, particularly those that might link these molecules to the cytoskeleton during pAg-mediated immobilization, would reveal the molecular steps involved in changing a healthy, nonstimulatory cell into one that is a target for  $V\gamma 9V\delta 2$  T cell recognition. Identification of these factors will also provide additional therapeutic targets for immunotherapy, both in cancer and infectious disease treatments.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Reagents

Monoclonal antibodies were from either Beckman Coulter (fluorescein isothiocyanate-anti- $V\delta 2$  [IMMU389]) or BD Biosciences (fluorescein isothiocyanate- or phycoerythrin-cyanin 5.1-CD107a [H4A3]). Mouse  $\alpha$ -CD277 mAb (clone #20.1) was kindly provided by D. Olive (INSERM U891, Marseille, France). Synthetic bromohydrin pyrophosphate (BrHPP) was kindly provided by Innate Pharma. Zoledronic acid monohydrate (zoledronate, NBP) and monensin were obtained from Sigma Aldrich. Recombinant human IL-2 (rhIL-2) was from Chiron Therapeutics.

### Cells and Functional Assays

Polyclonal human  $V\gamma 9V\delta 2$  T cells were cultured in complete RPMI 1640 medium (10% FCS, 2 mM L-glutamine, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin, 100 IU/ml penicillin) supplemented with 300 IU/ml rhIL-2. HEK sh 284 cells, which do not express BTN3A isoforms after shRNA-mediated silencing, were generated from HEK293FT target cells as previously described (Harly et al., 2012) and cultured in complete RPMI 1640 medium. For CD107a expression assays, target cells were pretreated for 2 hr at 37°C with either CD277-specific mAb or NBP (zoledronate) at the indicated concentrations. Treated cells were next extensively washed and cocultured together with  $V\gamma 9V\delta 2$  T cells at 37°C in complete RPMI 1640 medium in the presence of 10  $\mu\text{M}$  monensin and fluorochrome-labeled CD107a-specific mAb. After 4 hr, cells were harvested, stained with fluorochrome-labeled  $V\delta 2$  TCR-specific mAb, and analyzed by flow cytometry. Data were collected on FACSCantoII and FACS Calibur cytometers (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Tree Star). TNF- $\alpha$  concentration was assessed by a biological assay based on WEHI164 clone 13 cell viability as described (Espinosa et al., 2001).

### Crystallization

Large hexagonal crystals of apo B30.2 were obtained by using sitting drops consisting of 1  $\mu\text{l}$  of 10 mg/ml protein as purified with an additional 4 mM  $\beta$ -mercaptoethanol in the protein solution and 1  $\mu\text{l}$  of mother liquor containing 0.2 M  $\text{MgCl}_2$ , 22% PEG3350. Crystals were cryo-protected by sequentially transferring crystals to drops containing the mother liquor with an additional 5%, then 10%, and finally 20% glycerol before freezing. cHDMAPP-soaked crystals were generated as follows: crystals were grown via hanging drops with buffer conditions above except without  $\beta$ -mercaptoethanol. Slides with hanging drop were crosslinked by transferring the slide over a sitting drop containing 2  $\mu\text{l}$  of 25% glytaraldehyde (pH 3.0) (Sigma grade I) (Andersen et al., 2009; Lusty, 1999). Crystals were crosslinked for between 10 min and 3 hr without observable damage. After crosslinking, crystals were transferred into a drop containing mother liquor with an additional 100 mM cHDMAPP. Crystals were soaked for up to 2 hr and unlike apo crystals did not show signs of damage. Crystals were then cryo-protected as above but with an additional 75, then 50, then 0 mM cHDMAPP in the cryo-protectant drops.

### Data Collection and Processing

X-ray data sets for the B30.2 apo crystals were collected at the Advanced Photon Source (APS) beamline 23-ID-B on a MAR<sub>300</sub> CCD at 100°K. A complete data set was collected over 150 images using a 1° oscillation at a wavelength of  $1.033 \times 10^{-10}$  m. HKL2000 was used to index, integrate, and scale the data (Otwinowski and Minor, 1997). An initial molecular replacement solution was obtained with PHASER with PDB entry 2WL1 as a search model (McCoy et al., 2007; Weinert et al., 2009). The initial model was improved by multiple rounds of manual building via Coot followed by automated individual site and B-factor refinement by Phenix (Adams et al., 2010).

The cHDMAPP complexed B30.2 data set was collected at APS beamline 24-ID-E on an ADSC Quantum 315 CCD at 100°K. A complete data set was collected over 150 images using a 0.5° oscillation at a wavelength of  $0.97915 \times 10^{-10}$  m. XDS and Scala were used to index, integrate, and scale the data. An initial molecular replacement solution was determined with the apo B30.2 structure as a search model and  $R_{free}$  flags from the apo B30.2 structure were copied to the complex data set to prevent model bias. The structure was refined as above. Isomorphous difference maps and omit maps were calculated with Phenix and CCP4, respectively (Winn et al., 2011). The electrostatic surface potential of B30.2 was calculated with the APBS electrostatic package for Pymol (Baker et al., 2001). All structural figures were generated by Pymol (DeLano Scientific).

### Molecular Docking Simulation

Autodock Vina v.1.1.2 was used to perform docking calculations on the ligand HDMAPP to the B30.2 structure (Trott and Olson, 2010). Because of the stochastic nature of Autodock Vina, we ran the docking calculation five times, yielding the same top-scoring structure for each ligand in four of the five runs. Vina was run with an x, y, z box size of 22, 16, 28 centered at x, y, z coordinates -0.7, 20.4, 20.4 with all nonflexible side chains in the B30.2 structure. All other Vina parameters were set to the default.

### Isothermal Titration Calorimetry

Protein samples for ITC were concentrated to 10 mg/ml and purified over a Superdex 200 column into 20 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl. Concentration of peak fractions was determined from A280 using the theoretical extinction coefficient, pooled, and diluted to 100  $\mu$ M. IPP and HDMAPP were obtained from Echelon Biosciences, and cHDMAPP and EtPP were kindly provided by Innate Pharma. ITC data were collected with 100  $\mu$ M B30.2 in the cell and 2 mM pAg in the syringe on a MicroCal ITC200 (GE Healthcare Life Sciences) at 25°C using an initial injection of 0.4  $\mu$ l followed by 19.2  $\mu$ l injections. A second measurement of the interaction between the BTN3A1 extracellular domain and cHDMAPP was performed at 15°C. B30.2 mutant experiments were performed with 25  $\mu$ M protein in the cell with 500  $\mu$ M pAg in the syringe, as were the BTN3A1 and BTN3A3 B30.2 domain comparisons. ITC binding fits were determined after reference subtraction of injections of the ligand into a cell containing only buffer from the experimental results. Fits were determined with the Microcal Origin software. Because of the weak affinity of IPP for the B30.2 domain of BTN3A1, the stoichiometry (N) of the interaction was set to 1 during fitting.

Additional protocols are described in detail in the [Supplemental Experimental Procedures](#), including expression of full-length and chimeric BTN3 proteins into rodent cells, expression of full-length chimeric BTN3A1 proteins for FRAP analysis, FRAP experiments and data analysis, protein expression and purification, and surface plasmon resonance and  $K_D$  estimation.

### ACCESSION NUMBERS

The coordinates and structure factors for the B30.2 and cHDMAPP complexed B30.2 structures have been deposited in the Protein Data Bank under the accession codes 4N7I and 4N7U, respectively.

### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, four figures, and two tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.03.003>.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff of the Advanced Proton Source at GM/CA-CAT (23-ID) and NE-CAT (24-ID) for their use and assistance with X-ray beamlines and R. Sanishvili, C. Ogata, and K. Perry in particular for help and advice during data collection. We thank M.S. Gu, A. Luoma, and C. Palka for advice and helpful discussions. A.S. designed and performed ITC experiments, mutagenesis, and protein crystallization and structure determination and handled manuscript preparation. We thank the staff of the Cytometry Facility (Cytocell) and Cellular and Tissue Imaging Core Facility (MicroPICell) of Nantes University for technical assistance, and Q. Amossé and S. Nedelec in particular for microscopy data collection and expert advice. We also thank C. Belmant (Innate Pharma) for kindly providing reagents. R.B., M.-C.G., F.K., C.-M.P., and A.L. designed and performed experiments involving mutagenesis and functional assays. E.J.A., M.B., and E.S. led the investigation and contributed to experiment design, data interpretation, and manuscript preparation. This work was supported by NIH grants R56\_AI097386 and R01\_AI073922 to E.J.A.; INSERM, Université de Nantes, Association pour la Recherche contre le Cancer (#R10139NN), Institut National du Cancer (#V9V2THER), Agence Nationale de la Recherche (#GDSTRESS), and Ligue Nationale contre le Cancer and Investissements d'Avenir (Agence Nationale de la Recherche-Programme Laboratoires d'Excellence Immunotherapy Graft Oncology). M.B. is a founding scientist of the company Innate Pharma SA and was a consultant for this company until October 2013. He is currently vice president of the Institut Merieux in charge of scientific and medical affairs.

Received: October 23, 2013

Accepted: March 12, 2014

Published: April 3, 2014

### REFERENCES

- Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., et al. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 213–221.
- Andersen, O.A., Schönfeld, D.L., Toogood-Johnson, I., Felicetti, B., Albrecht, C., Fryatt, T., Whittaker, M., Hallett, D., and Barker, J. (2009). Cross-linking of protein crystals as an aid in the generation of binary protein-ligand crystal complexes, exemplified by the human PDE10a-papaverine structure. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 65, 872–874.
- Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J., and McCammon, J.A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10037–10041.
- Boëdec, A., Sicard, H., Dessolin, J., Herbette, G., Ingoure, S., Raymond, C., Belmant, C., and Kraus, J.L. (2008). Synthesis and biological activity of phosphonate analogues and geometric isomers of the highly potent phosphoantigen (E)-1-hydroxy-2-methylbut-2-enyl 4-diphosphate. *J. Med. Chem.* 51, 1747–1754.
- Bonneville, M., and Scotet, E. (2006). Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 539–546.
- Bukowski, J.F., Morita, C.T., Tanaka, Y., Bloom, B.R., Brenner, M.B., and Band, H. (1995). V gamma 2V delta 2 TCR-dependent recognition of non-peptide antigens and Daudi cells analyzed by TCR gene transfer. *J. Immunol.* 154, 998–1006.
- Chen, Z.W. (2013). Multifunctional immune responses of HMBPP-specific V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T cells in M. tuberculosis and other infections. *Cell. Mol. Immunol.* 10, 58–64.
- Constant, P., Davodeau, F., Peyrat, M.A., Poquet, Y., Puzo, G., Bonneville, M., and Fournié, J.J. (1994). Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 264, 267–270.
- Davodeau, F., Peyrat, M.A., Hallet, M.M., Gaschet, J., Houde, I., Vivien, R., Vie, H., and Bonneville, M. (1993). Close correlation between Daudi and mycobacterial antigen recognition by human gamma delta T cells and expression of

- V9JPC1 gamma/V2DJC delta-encoded T cell receptors. *J. Immunol.* **151**, 1214–1223.
- Eberl, M., Hintz, M., Reichenberg, A., Kollas, A.K., Wiesner, J., and Jomaa, H. (2003). Microbial isoprenoid biosynthesis and human gammadelta T cell activation. *FEBS Lett.* **544**, 4–10.
- Espinosa, E., Belmant, C., Pont, F., Luciani, B., Poupot, R., Romagné, F., Brailly, H., Bonneville, M., and Fournié, J.J. (2001). Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human gamma delta T cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 18337–18344.
- Gober, H.J., Kistowska, M., Angman, L., Jenö, P., Mori, L., and De Libero, G. (2003). Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J. Exp. Med.* **197**, 163–168.
- Harly, C., Guillaume, Y., Nedellec, S., Peigné, C.M., Mönkkönen, H., Mönkkönen, J., Li, J., Kuball, J., Adams, E.J., Netzer, S., et al. (2012). Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human  $\gamma\delta$  T-cell subset. *Blood* **120**, 2269–2279.
- Hintz, M., Reichenberg, A., Altincicek, B., Bahr, U., Gschwind, R.M., Kollas, A.K., Beck, E., Wiesner, J., Eberl, M., and Jomaa, H. (2001). Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gammadelta T cells in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **509**, 317–322.
- Julian, R.R., and Beauchamp, J.L. (2001). Site specific sequestering and stabilization of charge in peptides by supramolecular adduct formation with 18-crown-6 ether by way of electrospray ionization. *Int. J. Mass Spectrom.* **210–211**, 613–623.
- Keeble, A.H., Khan, Z., Forster, A., and James, L.C. (2008). TRIM21 is an IgG receptor that is structurally, thermodynamically, and kinetically conserved. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 6045–6050.
- Kotlyar, S.A., Zubatyuk, R.I., Shishkin, O.V., Chuprin, G.N., Kiriya, A.V., and Kamalov, G.L. (2005). (18-Crown-6)potassium chlorochromate. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online* **61**, m293–m295.
- Kunzmann, V., Bauer, E., and Wilhelm, M. (1999). Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *N. Engl. J. Med.* **340**, 737–738.
- Kunzmann, V., Bauer, E., Feurle, J., Weissinger, F., Tony, H.P., and Wilhelm, M. (2000). Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* **96**, 384–392.
- Lang, F., Peyrat, M.A., Constant, P., Davodeau, F., David-Ameline, J., Poquet, Y., Vié, H., Fournié, J.J., and Bonneville, M. (1995). Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *J. Immunol.* **154**, 5986–5994.
- Lusty, C.J. (1999). A gentle vapor-diffusion technique for cross-linking of protein crystals for cryocrystallography. *J. Appl. Cryst.* **32**, 106–112.
- McClanahan, J., Fukushima, P.I., and Stetler-Stevenson, M. (1999). Increased peripheral blood gamma delta T-cells in patients with lymphoid neoplasia: A diagnostic dilemma in flow cytometry. *Cytometry* **38**, 280–285.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.* **40**, 658–674.
- Morita, C.T., Beckman, E.M., Bukowski, J.F., Tanaka, Y., Band, H., Bloom, B.R., Golan, D.E., and Brenner, M.B. (1995). Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigen to human gamma delta T cells. *Immunity* **3**, 495–507.
- Morita, C.T., Jin, C., Sarikonda, G., and Wang, H. (2007). Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol. Rev.* **215**, 59–76.
- Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Palakodeti, A., Sandstrom, A., Sundaresan, L., Harly, C., Nedellec, S., Olive, D., Scotet, E., Bonneville, M., and Adams, E.J. (2012). The molecular basis for modulation of human  $V\gamma 9V\delta 2$  T cell responses by CD277/butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* **287**, 32780–32790.
- Puan, K.J., Jin, C., Wang, H., Sarikonda, G., Raker, A.M., Lee, H.K., Samuelson, M.I., Märker-Hermann, E., Pasa-Tolic, L., Nieves, E., et al. (2007). Preferential recognition of a microbial metabolite by human Vgamma2Vdelta2 T cells. *Int. Immunol.* **19**, 657–673.
- Rhodes, D.A., Stammers, M., Malcherek, G., Beck, S., and Trowsdale, J. (2001). The cluster of BTN genes in the extended major histocompatibility complex. *Genomics* **71**, 351–362.
- Tanaka, Y., Sano, S., Nieves, E., De Libero, G., Rosa, D., Modlin, R.L., Brenner, M.B., Bloom, B.R., and Morita, C.T. (1994). Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8175–8179.
- Tanaka, Y., Morita, C.T., Tanaka, Y., Nieves, E., Brenner, M.B., and Bloom, B.R. (1995). Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* **375**, 155–158.
- Trott, O., and Olson, A.J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455–461.
- Vavassori, S., Kumar, A., Wan, G.S., Ramanjaneyulu, G.S., Cavallari, M., El Daker, S., Beddoe, T., Theodossis, A., Williams, N.K., Gostick, E., et al. (2013). Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human  $\gamma\delta$  T cells. *Nat. Immunol.* **14**, 908–916.
- Wang, H., Lee, H.K., Bukowski, J.F., Li, H., Mariuzza, R.A., Chen, Z.W., Nam, K.H., and Morita, C.T. (2003). Conservation of nonpeptide antigen recognition by rhesus monkey V gamma 2V delta 2 T cells. *J. Immunol.* **170**, 3696–3706.
- Wang, H., Fang, Z., and Morita, C.T. (2010). Vgamma2Vdelta2 T Cell Receptor recognition of prenyl pyrophosphates is dependent on all CDRs. *J. Immunol.* **184**, 6209–6222.
- Wang, H., Henry, O., Distefano, M.D., Wang, Y.C., Räikkönen, J., Mönkkönen, J., Tanaka, Y., and Morita, C.T. (2013). Butyrophilin 3A1 plays an essential role in prenyl pyrophosphate stimulation of human  $V\gamma 2V\delta 2$  T cells. *J. Immunol.* **191**, 1029–1042.
- Wei, H., Huang, D., Lai, X., Chen, M., Zhong, W., Wang, R., and Chen, Z.W. (2008). Definition of APC presentation of phosphoantigen (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate to Vgamma2Vdelta 2 TCR. *J. Immunol.* **181**, 4798–4806.
- Weinert, C., Grütter, C., Roschitzki-Voser, H., Mittl, P.R., and Grütter, M.G. (2009). The crystal structure of human pyrin b30.2 domain: implications for mutations associated with familial Mediterranean fever. *J. Mol. Biol.* **394**, 226–236.
- Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G., McCoy, A., et al. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **67**, 235–242.
- Woo, J.S., Imm, J.H., Min, C.K., Kim, K.J., Cha, S.S., and Oh, B.H. (2006). Structural and functional insights into the B30.2/SPRY domain. *EMBO J.* **25**, 1353–1363.
- Zhang, Y., Song, Y., Yin, F., Broderick, E., Siegel, K., Goddard, A., Nieves, E., Pasa-Tolic, L., Tanaka, Y., Wang, H., et al. (2006). Structural studies of Vgamma2Vdelta2 T cell phosphoantigens. *Chem. Biol.* **13**, 985–992.

## **The Intracellular B30.2 Domain of Butyrophilin 3A1 Binds Phosphoantigens to Mediate Activation of Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cells**

Andrew Sandstrom, Cassie-Marie Peigné, Alexandra Léger, James E. Crooks, Fabienne Konczak, Marie-Claude Gesnel, Richard Breathnach, Marc Bonneville, Emmanuel Scotet, and Erin J. Adams

Table S1: Crystallographic Data and Refinement Statistics

Related to Figure 2 and Figure 6

Figure S1: MALS analysis of BTN3A1 B30.2 Domain

Related to Figure 2

Figure S2: Fits of pAg binding to B30.2 and extracellular domain of BTN3A1

Related to Figure 3

Table S2: B30.2/pAg ITC Binding Measurements

Related to Figure 3

Figure S3: BrHPP treatment of BTN3A1 and BTN3A3 B30.2 domain mutants

Related to Figure 5

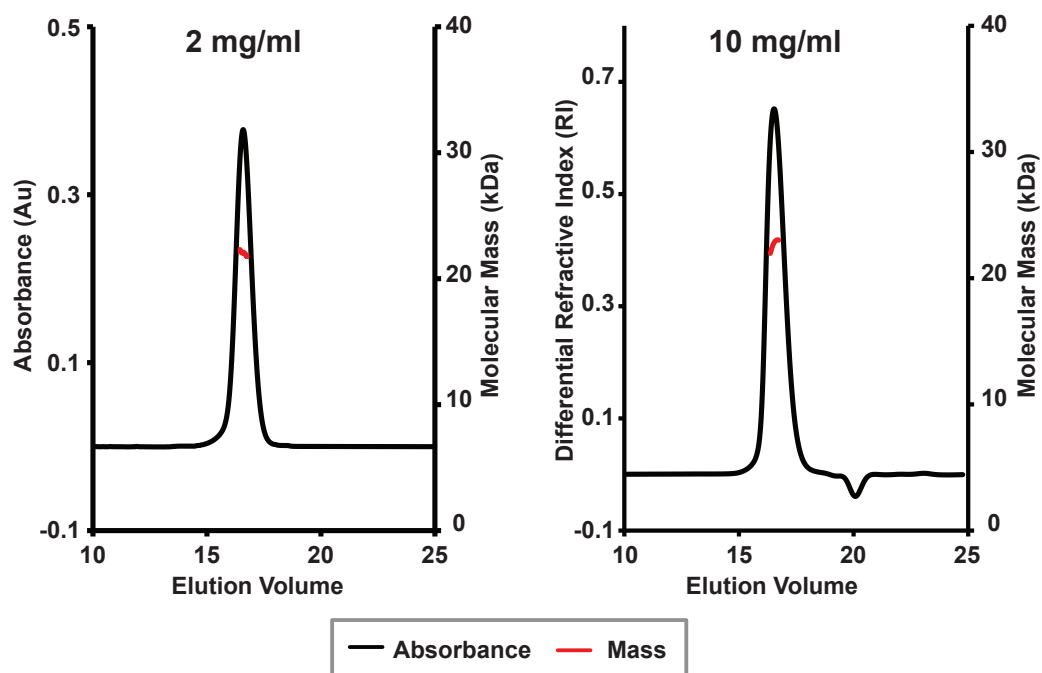
Figure S4: Omit map electron density of BTN3A\_1/phosphoantigen complexes.

Related to Figure 6

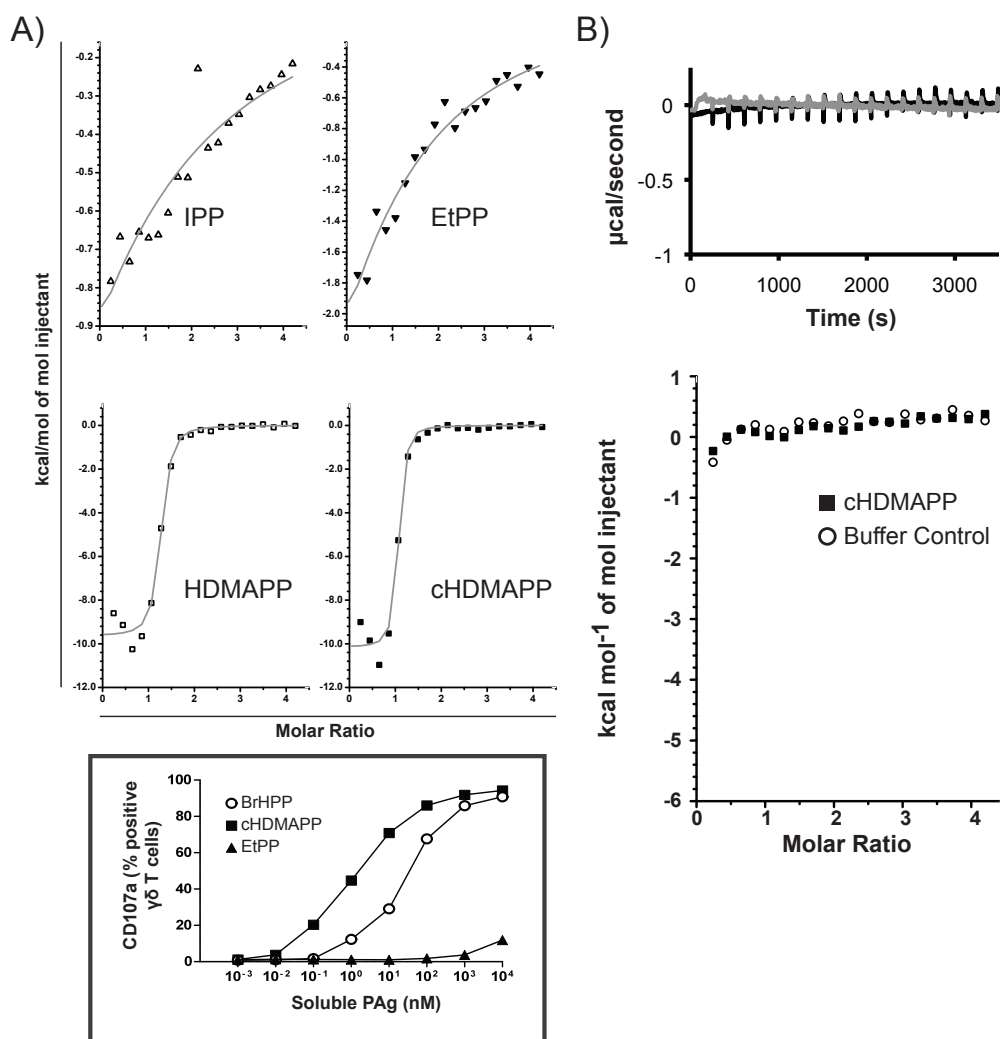
### **Supplemental Experimental Procedures**

**Table S1: Crystallographic Data and Refinement Statistics (Related to Figure 2 and Figure 6)**

| <b>Data Collection</b>                              | <b>B30.2</b>                    | <b>B30.2/cHDMAPP Complex</b>    |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Space group                                         | P22 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> | P22 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> |
| Cell dimensions                                     |                                 |                                 |
| <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)                  | 39.03, 44.95, 124.81            | 38.98, 44.95, 125.26            |
| $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)                   | 90, 90, 90                      | 90, 90, 90                      |
| Resolution (Å)                                      | 21.0-1.40 (1.45-1.40)           | 37.2-1.46 (1.51-1.46)           |
| <i>R</i> <sub>merge</sub>                           | 0.069 (0.320)                   | 0.037 (0.482)                   |
| <i>I</i> / $\sigma$ <i>I</i>                        | 27.1 (6.5)                      | 16.7 (2.0)                      |
| Completeness (%)                                    | 96.2 (90.2)                     | 95.8 (85.1)                     |
| Redundancy                                          | 5.3 (5.4)                       | 2.9 (2.8)                       |
| <b>Refinement</b>                                   |                                 |                                 |
| Resolution (Å)                                      | 21.0-1.4                        | 37.2-1.46                       |
| No. reflections                                     | 42350                           | 37505                           |
| <i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> | 13.51/16.64                     | 15.33/18.96                     |
| No. atoms                                           |                                 |                                 |
| Protein                                             | 1563                            | 1535                            |
| Ligands                                             | 22                              | 21                              |
| Water                                               | 203                             | 211                             |
| <i>B</i> -factors                                   |                                 |                                 |
| Macromolecules                                      | 11.7                            | 18.0                            |
| Water                                               | 28.6                            | 34.3                            |
| Rmsds                                               |                                 |                                 |
| Bond lengths (Å)                                    | 0.011                           | 0.011                           |
| Bond angles (°)                                     | 1.06                            | 1.09                            |
| <b>Ramachandran</b>                                 |                                 |                                 |
| Most Favored (%)                                    | 91.2                            | 87.5                            |
| Additionally Allowed                                | 8.8                             | 12.5                            |
| Generously Allowed                                  | 0.0                             | 0.0                             |
| Disallowed                                          | 0.0                             | 0.0                             |



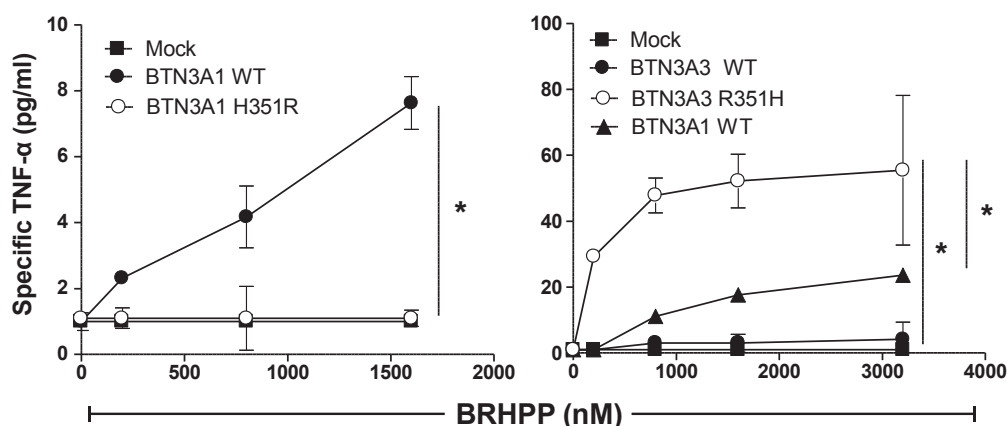
**Figure S1. MALS analysis of BTN3A1 B30.2 Domain (Related to Figure 2):** MALS analysis of BTN3A1 B30.2 domain. 500 $\mu$ l of B30.2 at 2mg/ml (left) or 250 $\mu$ l at 10mg/ml (right) was injected over a Superdex 200 column and analyzed by MALS. B30.2 elutes as a single peak as measured by UV280 absorbance or differential refractive index (black). MALS calculation of the molecular weight (red) corresponds to that of the monomer:  $22.020 \pm 0.09$  kD at 2 mg/ml and  $22.700 \pm 0.11$  kD at 10mg/ml.



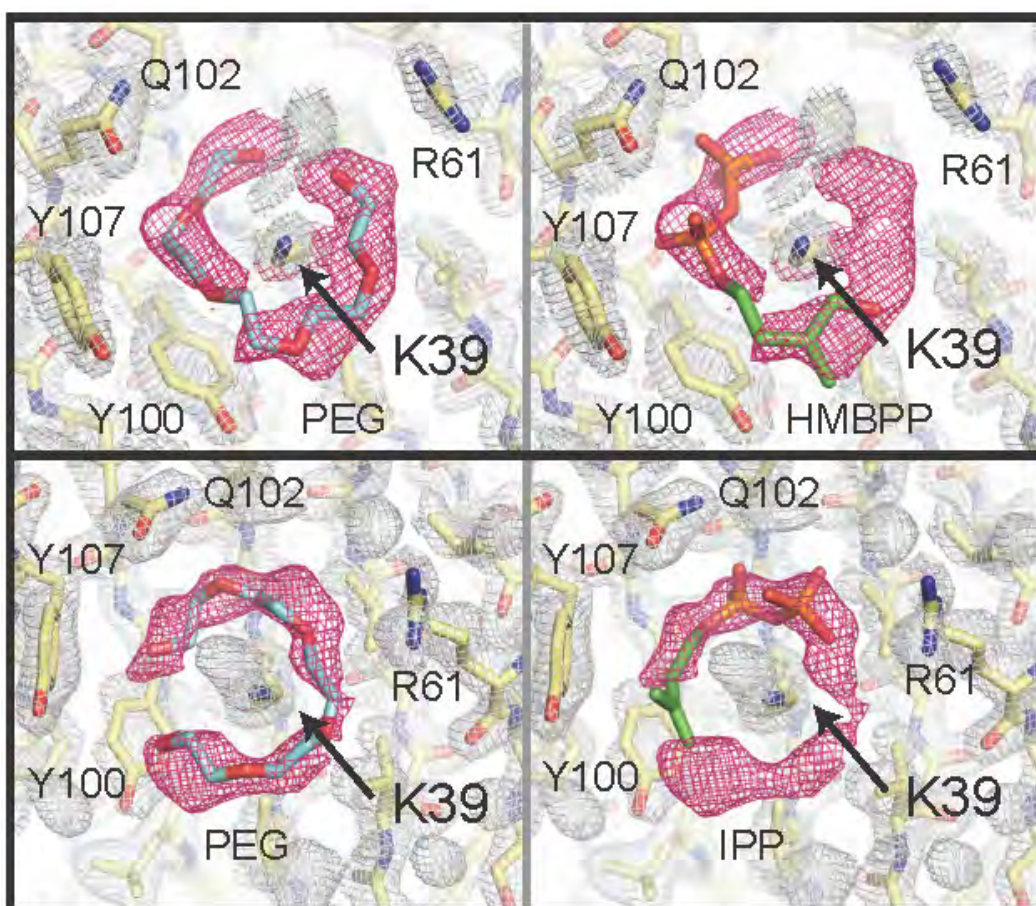
**Figure S2 Fits of pAg binding to B30.2 and extracellular domain of BTN3A1 (Related to Figure 3):** **A)** Top: Fitting of pAg binding to BTN3A1 B30.2 domain using ITC. ITC data for each of the phosphoantigens is shown as follows: IPP as open triangles, EtPP as filled triangles, HDMAPP as open squares, and cHDMAPP as filled squares. Fits for each binding isotherm are shown in gray. Bottom: Comparison of the functional potencies of soluble PAgs. CD107a expression on human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells induced by grading doses of soluble pAg (BrHPP, cHDMAPP and etPP) after a 5 hour incubation (autopresentation). The values for the percentage of CD107a+  $\gamma\delta$  T cells are indicated on the graph. Similar results were obtained for IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  release. **B)** Binding measurements of cHDMAPP to the extracellular domain of BTN3A1 (black) or buffer control (gray) at 15°C (top panel). Measurements were performed with 100 $\mu$ M BTN3A1 extracellular domain in the cell and 2mM cHDMAPP in the syringe. The binding isotherms are shown with buffer control (open circle) or cHDMAPP (filled square) (bottom panel).

**Table S2: Thermodynamic binding parameters determined by ITC of various PAgS for the BTN3A1 B30.2 domain (Related to Figure 3).**

|         | Stoichiometry (N) | $K_D$                   | $\Delta H$ (kcal/mol) | $\Delta S$ (cal/mol/deg) |
|---------|-------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------|
| IPP     | 1                 | $0.49 \pm 0.10$ mM      | $-5.0 \pm 0.7$        | -1.69                    |
| EtPP    | $0.90 \pm 0.94$   | $0.28 \pm 0.15$ mM      | $-8.1 \pm 1.0$        | -10.8                    |
| HDMAPP  | $1.19 \pm 0.017$  | $0.92 \pm 0.30$ $\mu$ M | $-9.7 \pm 0.2$        | -4.74                    |
| cHDMAPP | $0.98 \pm 0.015$  | $0.51 \pm 0.23$ $\mu$ M | $-10.2 \pm 0.3$       | -5.3                     |



**Figure S3. BrHPP treatment of BTN3A1 and BTN3A3 B30.2 domain mutants (Related to Figure 5):** TNF- $\alpha$  release from V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells induced by grading doses of soluble PAg (BrHPP) after a 6 hour co-culture with HEK sh 284 cells either mock-transfected (Mock) or expressing, 36 h after transient transfection, BTN3A1 WT or BTN3A1 H351R mutant (left panel), or expressing BTN3A3 WT or BTN3A3 R351H (right panel). Data are mean of duplicates  $\pm$  SD and are representative of three independent experiments. \*  $P < 0.05$  (paired Student  $t$ -test). TNF- $\alpha$  concentration was assessed by a biologic assay based on WEHI164 clone 13 cell viability. Effector to Target ratio: 1/10. The supernatants collected after co-coculture were diluted (1/10) prior addition on WEHI cells.



**Figure S4. Omit map electron density of BTN3A\_1-phosphoantigen complexes.** (Related to Figure 6): Omit map electron density of BTN3A\_1/phosphoantigen complexes. Omit maps with ligand removed were calculated using the models and structure factors from PDB IDs: 4K55 (HMBPP/BTN3A\_1) on top and 4JKW (IPP/BTN3A\_1) at bottom. Electron density is contoured at  $1\sigma$  and shown in hot pink for ligand and white for BTN3A. PEG molecules are modeled into the maps at left and are shown in cyan (carbon) and red (oxygen). Right panels show the positioning of the respective phosphoantigens in the respective PDB coordinate files.

## **Supplemental Experimental Procedures (Related to Experimental Procedures):**

### **Expression of full-length and chimeric BTN3 proteins into rodent cells.**

Full-length cDNAs for human BTN3A1 (LIFESEQ3294566), and BTN3A3 (BC015815) were obtained from Open Biosystems. cDNAs silently mutated in the sh284 target sequence were subcloned in a modified pIRES1hyg vector (Clontech) as already described (Harly et al., 2012). Plasmids were used for transient or stable transfections in either BTN3A silenced HEK293FT cells (sh#284; clone#30) or wild-type HEK293 cells. Plasmids encoding for chimeric BTN3A1 and BTN3A3 carrying swapped, truncated or mutated B30.2 domains were generated by cloning or PCR according to standard procedures. Transient transfections of human (HEK293; HEK sh284) and rodent cells were done using Lipofectamine 2000 (Invitrogen/LifeTechnologies) according to the supplier's instruction. Human ICAM-1 cDNA was cloned into the pCIneo vector (Promega) and was kindly provided by Dr A. Moreau-Aubry (INSERM UMR892, Nantes, France). ICAM-1 plasmid was co-transfected (ratio 1/1) with human BNT3A1 or A2 plasmids for transfection into rodent cells. Following transient transfection, HEK transfectants were checked for the selective re-expression of mutated BTN3A1 or BTN3A3 by flow cytometry and expression of human BTN3A and ICAM-1 was checked by flow cytometry after transfection into rodent cell lines.

### **Expression of full-length chimeric BTN3A1 proteins for FRAP analysis.**

Carboxy-terminus mCherry-fused BTN3A1 molecules were obtained by subcloning full-length wildtype or H351R mutated cDNAs in frame with the sequence encoding for the fluorescent tag from pmCherry-N1 vector (Clontech). Helix-forming peptide linker A(EAAAK)4A was introduced in frame to separate BTN3A1 and fluorescent domains. Plasmids were transiently or stably transfected in BTN3A silenced HEK293FT cells (sh#284; clone#30) or HEK293 cells, for functional or FRAP assays, respectively. The expression of fluorescent BNT3A1 on HEK transfected cells was checked by flow cytometry and stable transfectants were sorted after selection using a FACS AriaIII cell sorter (BD Bioscience).

### **FRAP experiments and data analysis.**

HEK293 cells stably expressing either wildtype or mutated B30.2 carboxy-terminus mCherry-fused BTN3A1 were laid on m-slides (Ibidi) and analyzed using a Nikon A1RS confocal microscope (60xNA 1.40 oil immersion objective). Selected rectangular areas were photobleached for 500 ms by using full power of laser intensity (> 90% of loss of fluorescence). Images were collected every 5 s, before (30 s) and after (120 s) bleaching using low laser intensity. The resulting curves were fitted using one-phase exponential equations.

## Protein Expression and Purification

The BTN3A1 B30.2 domain and associated mutants were cloned into pET28a with a six-HIS tag and expressed in BL21 strain *Escherichia coli*. Cells were grown to  $OD_{600}=0.6$  and then induced for four hours at room temperature. Protein was harvested and purified using Ni-NTA (Qiagen) IMAC chromatography in 20mM Tris pH8.0, 400mM NaCl, 20mM Imidazole, eluted with 20mM Tris pH8.0, 400mM NaCl, 250mM Imidazole, and desalted into 10mM Hepes pH7.2, 150mM NaCl, 0.02% azide using an Econo-Pac 10DG column (Biorad). Protein was cleaved overnight with carboxypeptidase A (Sigma) at room temperature. Protein was further purified by gel filtration over a Superdex 200 column (GE healthcare) in 10mM Hepes pH7.2, 150mM NaCl, 0.02% azide). Protein concentration was initially determined by BCA and matched  $A_{280}$  measurements using the theoretical extinction coefficient. BTN3A1 extracellular domain and the 20.1 single chain antibody were expressed and purified as previously described (Palakodeti et al., 2012). The G115 Vy9V $\delta$ 2 TCR  $\gamma$  and  $\delta$  chains were separately cloned into different versions of the pAcGP67A vector each containing a 3C protease site followed by either acidic or basic zippers and a 6xHis tag. Additionally, a BirA biotinylation sequence was engineered following the  $\delta$  chain but preceding the 3C site. Proteins were co-expressed in Hi-5 cells using baculovirus transduction. Proteins were initially purified using Ni-NTA IMAC chromatography and cleaved using 3C protease. Cleaved samples were then biotinylated using the BirA enzyme and purified using size exclusion chromatography over a Superdex200 column as above. The Vy4V $\delta$ 1 and G8 TCRs and T22 were cloned and expressed as previously described (Adams et al., 2005; Luoma et al., 2013).

## MALS Analysis of BTN3A1 B30.2 domain

500 $\mu$ l of BTN3A1 B30.2 domain at 2mg/ml or 250 $\mu$ l at 10mg/ml protein concentration was injected over a Superdex 200 column with an in line Dawn Heleos MALS detector (Wyatt) and Optilab Trex refractive index detector (Wyatt) in 10mM Hepes pH7.2, 150mM NaCl, 0.02% azide at 25°C. Protein elution was measure using the UV280 absorbance for the 2mg/ml peak and through the differential refractive index for the 10mg/ml peak, as the sample concentration was too high to analyze by UV280. Average particle size was determined using Astra software (Wyatt) fit over the major peak.

## Surface Plasmon Resonance

Purified and biotinylated G115 TCR was immobilized on a streptavidin coated chip (Sensor Chip SA, GE Healthcare) to a total signal of 6500RU. BTN3A1 extracellular domain, 20.1 single chain antibody, and BTN3A1 20.1 complex were purified in SPR running buffer (10mM Hepes pH7.4, 150mM NaCl, and 0.05% Tween20) using gel filtration on a Superdex 200 column. Peak fractions were diluted to 4 $\mu$ M and serially diluted to the following concentrations: 2 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M, 0.25 $\mu$ M, 0.125 $\mu$ M, 0.0625 $\mu$ M, and 0.03125 $\mu$ M. SPR measurements were collected on a Biacore2000 at 25°C. Streptavidin conjugated AmDex polymers were obtained from Fina Biosolutions. 60ug of

biotinylated TCRs were mixed with 1µg AmDex to create multimerized TCRs. Biotinylated BTN3A1 or T22 were immobilized as above saturating at 3000RU. AmDex conjugates were injected at the following AmDex concentrations: 0.03125µg/ml, 0.0625µg/ml, 0.125µg/ml, 0.25µg/ml, 0.5µg/ml, and 1µg/ml. Due to non-specific interactions with the biotin blocked reference flowcell binding was measure as the difference between the observed binding to BTN3A1 and T22 for G115 and the Vγ4Vδ1 TCR. The binding of the G8 TCR was determined by subtracting the BTN3A1 signal from the T22 signal.

### **SPR K<sub>D</sub> estimation**

The maximal detectable K<sub>D</sub> estimation was roughly approximated using basic equilibrium binding: %bound = [ligand]/(K<sub>D</sub> + [ligand]). Assuming a K<sub>D</sub> of 500mM and using the maximum ligand (BTN3A1) concentration of 4mM, ~0.8% of the ligand should be bound to the surface during flow. ~6500RU of protein was immobilized on the surface of the chip in a functionally relevant orientation (site-specific biotinylated the C terminus of the TCR immobilized on a streptavidin sensor chip) an estimated binding affinity of 500mM should give rise to a signal of approximately 50RU.

### **Supplemental References:**

Adams, E.J., Chien, Y.H., and Garcia, K.C. (2005). Structure of a gammadelta T cell receptor in complex with the nonclassical MHC T22. *Science* 308, 227-231.

Harly, C., Guillaume, Y., Nedellec, S., Peigne, C.M., Monkkonen, H., Monkkonen, J., Li, J., Kuball, J., Adams, E.J., Netzer, S., *et al.* (2012). Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T-cell subset. *Blood* 120, 2269-2279.

Luoma, A.M., Castro, C.D., Mayassi, T., Bembinster, L.A., Bai, L., Picard, D., Anderson, B., Scharf, L., Kung, J.E., Sibener, L.V., *et al.* (2013). Crystal Structure of Vdelta1 T Cell Receptor in Complex with CD1d-Sulfatide Shows MHC-like Recognition of a Self-Lipid by Human gammadelta T Cells. *Immunity* 39, 1032-1042.

Palakodeti, A., Sandstrom, A., Sundaresan, L., Harly, C., Nedellec, S., Olive, D., Scotet, E., Bonneville, M., and Adams, E.J. (2012). The molecular basis for modulation of human Vgamma9Vdelta2 T cell responses by CD277/butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies. *J Biol Chem* 287, 32780-32790.

### 3. Discussion

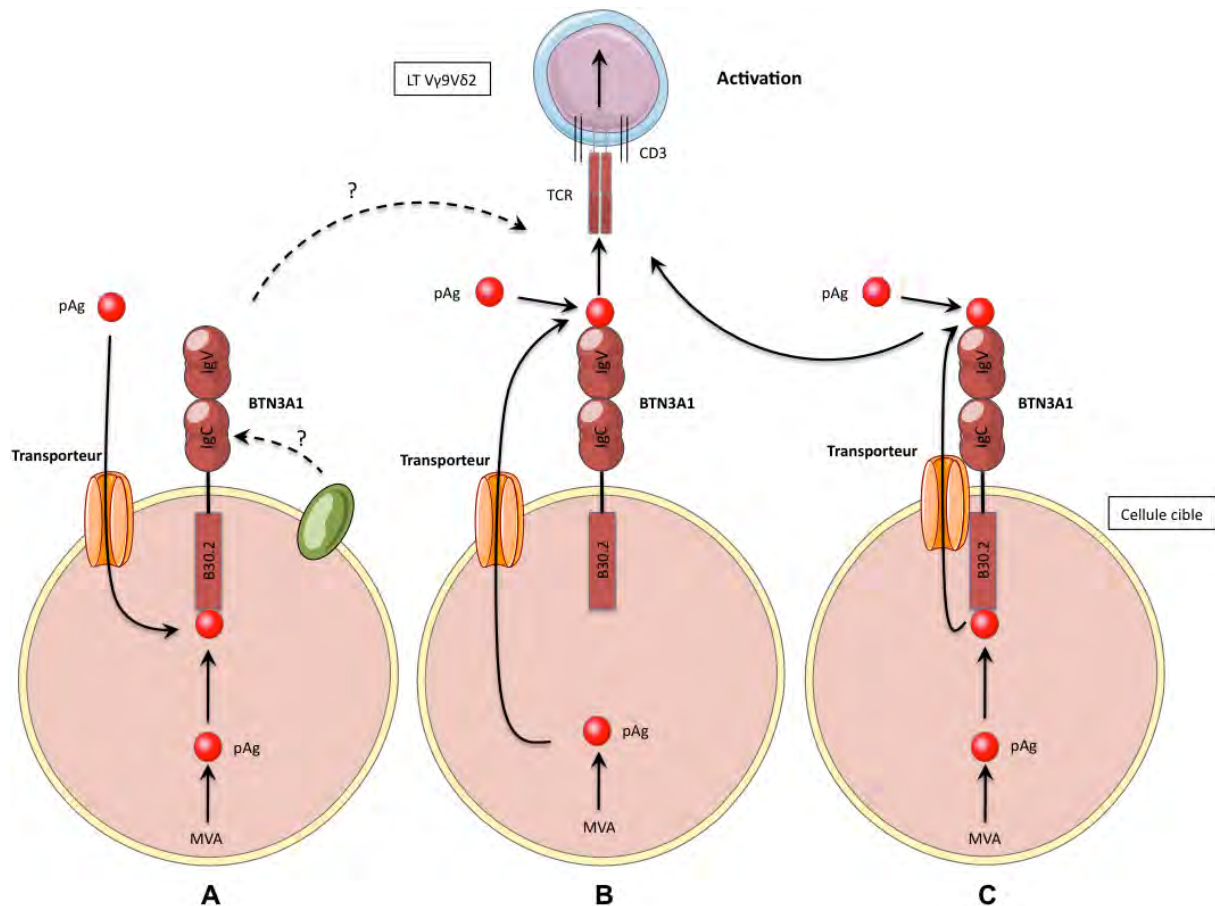
Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'interaction directe entre les PAgS et le domaine intracellulaire B30.2 de la protéine BTN3A1. Les PAgS sont capables de se fixer dans une poche chargée positivement située en partie N-terminale de ce domaine. Les PAgS les plus connus ont été testés, et ils sont tous capables de se fixer sur le domaine B30.2. De manière intéressante, leur intensité de liaison est corrélée avec leur capacité agoniste. Les PAgS ne peuvent se fixer que sur le domaine B30.2 de l'isoforme BTN3A1 et pas sur celui de l'isoforme BTN3A3. Ceci explique probablement l'incapacité de l'isoforme BTN3A3 à activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. En comparant les séquences de ces deux domaines à l'endroit de la fixation des PAgS, nous avons pu identifier un résidu spécifique de l'isoforme BTN3A1, une histidine placée en position 351 (remplacée par une arginine dans l'isoforme BTN3A3). Lorsque l'on mute l'isoforme BTN3A3 en remplaçant son arginine 351 par une histidine, elle devient capable de fixer les PAgS et d'activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Ce résidu est donc essentiel pour la fixation des PAgS sur le domaine B30.2 et l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Dans de précédents travaux, nous avons montré que la présence de PAgS ralentissait la mobilité de la protéine BTN3A1 à la surface de la cellule. Dans cet article, nous avons pu relier la diminution de mobilité de BTN3A1 à la fixation des PAgS. La protéine BTN3A1 mutée pour l'histidine 351, et donc incapable de fixer des PAgS, ne montre plus aucun signe de ralentissement à la surface de la cellule en présence de PAgS (traitement ABP). La fixation des PAgS sur le domaine B30.2 a été décrite une nouvelle fois peu de temps après par l'équipe de J. Wiemer [261].

Ces résultats nous ont permis de proposer un modèle d'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par la protéine BTN3A1 induit par les PAgS que l'on appellera modèle allostérique. Il est présenté dans la **figure 23 A**. Les PAgS vont être produits en intracellulaire ou bien internalisés (ex : transporteurs membranaires non identifiés). L'accumulation de PAgS intracellulaires va être détectée par le domaine B30.2 de la protéine BTN3A1. La fixation des PAgS sur ce domaine va induire des modifications clés non exclusives à la surface de la cellule comme des changements dans la conformation de la protéine BTN3A1, des modifications dans sa topologie

membranaire et le recrutement de partenaires moléculaires. Ce sont ces modifications qui vont induire l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

Dans un article publié quelques mois avant le notre, l'équipe de G. De Libero propose un autre modèle dans lequel les PAgS seraient présentés directement comme des antigènes aux LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par la protéine BTN3A1 (**Figure 23 B**). Ils ont montré l'existence d'une poche dans le domaine extracellulaire IgV de BTN3A1 capable de fixer les PAgS [116]. La protéine BTN3A1 serait ensuite capable de présenter directement les PAgS au TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Grâce à des techniques de résonance plasmonique de surface (SPR) et de co-cristallographie, ils ont pu mettre en évidence une interaction directe entre les PAgS, le domaine IgV extracellulaire de BTN3A1 et le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Leur modèle fonctionnerait donc de la manière suivante : les PAgS intracellulaires seraient exportés en dehors de la cellule (ex : transporteurs membranaires). Ces PAgS viendraient ensuite se fixer sur le domaine IgV extracellulaire de la protéine BTN3A1. La protéine BTN3A1 agirait ensuite comme une molécule de présentation classique, en présentant le PAg au TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, induisant ainsi l'activation du LT.

Afin de réconcilier ces deux modèles, un troisième a été proposé. Celui-ci possède les caractéristiques majeures des deux précédents (**Figure 23 B**). Les PAgS seraient détectés en intracellulaire via la fixation sur le domaine B30.2 de BTN3A1. Ils seraient ensuite exportés en extracellulaire soit par la protéine BTN3A1, soit par des transporteurs associés. Les PAgS seraient ensuite présentés au TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par la protéine BTN3A1 à la manière de complexes antigéniques, permettant ainsi l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.



**Figure 23 : Trois modes d'action hypothétiques de l'induction de l'activation des LT Vγ9Vδ2 par les PAg.**

**(A)** Modèle allostérique : Les PAg sont produits en intracellulaire ou bien internalisés par des transporteurs membranaires non identifiés. Ils interagissent avec le domaine intracellulaire B30.2 de la molécule BTN3A1, induisant des modifications clés non exclusives telles que des changements conformationnels de la protéine, la modification de sa topologie membranaire et le recrutement de partenaires moléculaires. Ces modifications sont détectées par les LT Vγ9Vδ2, menant ainsi à leur activation fonctionnelle. **(B)** Modèle de présentation directe : Les PAg intracellulaires sont exportés de la cellule par des transporteurs membranaires non identifiés. Les PAg intra- et extracellulaires interagissent avec le domaine extracellulaire de la protéine BTN3A1. Les PAg sont présentés comme des complexes antigéniques au TCR Vγ9Vδ2 par le domaine IgV de BTN3A1, induisant l'activation des LT γδ. **(C)** Modèle commun : ce modèle partage les mécanismes des deux premiers modèles. Les PAg interagissent avec le domaine intracellulaire B30.2 de la protéine BTN3A1. Ils sont ensuite exportés hors de la cellule, soit par la protéine BTN3A1, soit par des transporteurs membranaires associés à BTN3A1. Les PAg intra- et extracellulaire vont interagir avec le domaine extracellulaire IgV de BTN3A1 et déclencher l'activation des LT Vγ9Vδ2. D'après Harly et al, 2015 [263].

Le modèle proposé par l'équipe de G. De Libero est séduisant car il est très simple et similaire aux modes d'activation des autres LT. Cependant ce modèle est en contradiction avec de nombreuses observations. Premièrement, la fixation des PAg sur le domaine IgV est située dans une zone extrêmement conservée entre les trois isoformes. Dans ce modèle, les PAg seraient donc capables de se fixer sur les trois isoformes de BTN3A. Comment expliquer alors que seule l'isoforme BTN3A1 permet l'activation des LT Vγ9Vδ2. De plus, ce modèle semble occulter totalement le

rôle joué par le domaine B30.2 alors qu'il a été montré qu'il était indispensable à l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. En outre, ce modèle laisse entendre que la protéine BTN3A1 induit à elle seule, sans l'aide d'autres protéines, l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Cette idée est contradictoire avec de nombreuses observations montrant que la protéine BTN3A1 est nécessaire mais pas suffisante pour activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Nos travaux, ainsi que d'autres articles suggèrent l'existence de protéines partenaires de BTN3A1 spécifiques des primates, et nécessaire dans l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Pour finir, concernant leurs données de co-cristallisation de PAg avec le domaine IgV de BTN3A1, l'équipe d'E. Adams a remis en doute ces observations en estimant que le composé présent dans la poche du domaine IgV était probablement du polyéthylène glycol (PEG), un composé présent dans la solution de cristallisation.

Une étude publiée très récemment par l'équipe de C. Morita a tenté de départager ces deux modèles [364]. Ils ont mutés les résidus essentiels présents dans les poches de fixation des PAg défendues dans les deux modèles. La mutation de résidus situés dans la poche de fixation des PAg du domaine B30.2 (défendue par le modèle allostérique) a pour conséquence, pour plus de la moitié des mutations, d'abolir complètement l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. À l'inverse, toutes les mutations effectuées dans la poche de fixation des PAg située sur le domaine IgV (défendue par le modèle de présentation directe) n'ont eu aucun effet sur l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Ces résultats semblent donc enterrer définitivement le modèle de présentation directe des PAg par la protéine BTN3A1 suggéré par G. De Libero.

Le modèle allostérique proposé par notre équipe semble donc le plus probable à ce jour. Il reste cependant de nombreuses questions en suspend concernant les modalités fines de ce mécanisme d'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Comment la fixation des PAg sur BTN3A1 va induire la modification de cette protéine et le recrutement de partenaires moléculaires ? Quels sont les mécanismes mis en jeu ? Comment les PAg exogènes parviennent à activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 alors que leur charge négative les rend incapable de traverser de manière passive la membrane plasmique des cellules cibles. Il semble important de définir précisément les modifications subies par la protéine BTN3A1. Comment une protéine ubiquitaire, non reconnue dans des conditions physiologiques, va être capable d'activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en présence de

PAGs. On ne sait toujours pas si le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 va reconnaître directement la molécule BTN3A1 ou bien une autre protéine recrutée dans le complexe. L'étude des protéines partenaires de la molécule BTN3A1 permettrait donc peut-être de mettre en évidence la protéine interagissant réellement avec le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. La caractérisation des protéines partenaires du domaine B30.2 en particulier pourrait nous aider à comprendre le phénomène de ralentissement de la protéine BTN3A1 à la surface de la cellule en présence de PAGs. La fixation des PAGs sur le domaine B30.2 pourrait induire le recrutement de protéines capables d'interagir avec le cytosquelette. Ces protéines immobiliseraient ainsi la protéine BTN3A1 à la surface, en s'aidant par exemple du maillage d'actine, afin de stabiliser l'interaction avec le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

## **B. Question II : quelles sont les protéines partenaires recrutées par BTN3A1 lors de l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ?**

### **1. Introduction**

Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont capables de s'activer en présence de composés non peptidiques phosphorylés appelés PAgS. Cette activation nécessite un contact cellulaire du LT avec sa cible [297, 298]. Diverses observations ont suggéré l'implication de molécules membranaires spécifiques des primates exprimées sur la cellule cible [365, 366]. Notre équipe a mis en évidence une de ces protéines : la molécule BTN3A1. Cette protéine et en particulier son domaine B30.2 sont nécessaires à l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par les PAgS [117]. Cependant cette protéine n'est pas suffisante. Son transfert dans des cellules murines ne suffit pas pour induire l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en présence de PAgS. De plus nous n'avons pas pu observer d'interaction de BTN3A1 avec le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 [118]. Ces données ont donc suggéré l'existence d'autres protéines impliquées dans ce mécanisme d'activation, probablement elles aussi spécifiques des primates.

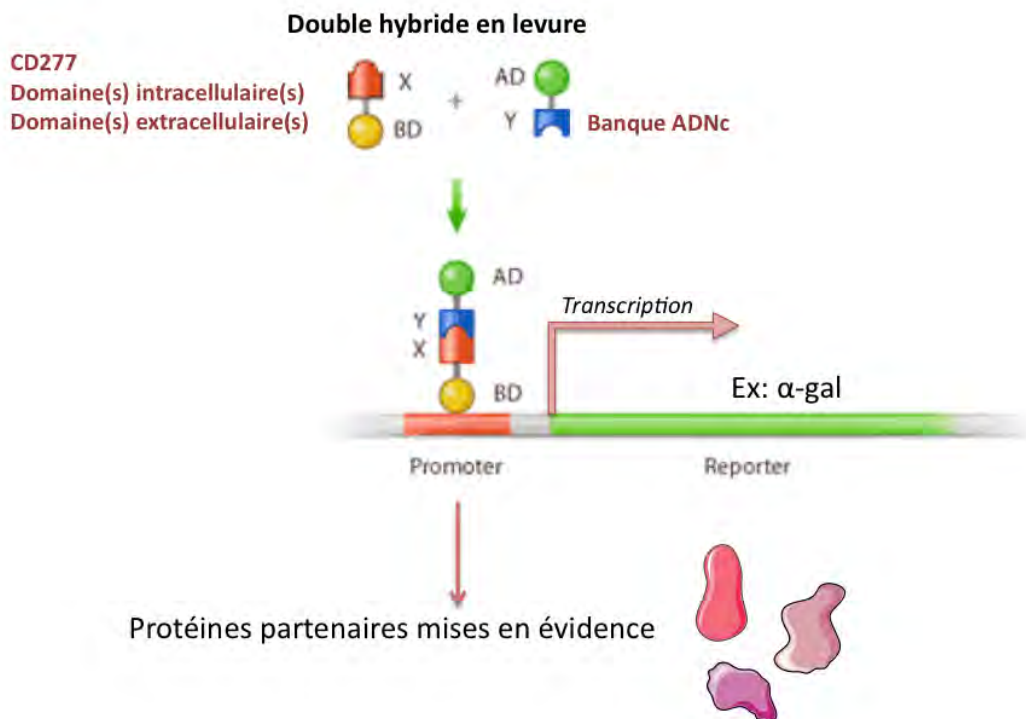
On sait désormais que les PAgS sont capables de se fixer sur le domaine intracellulaire B30.2 de la protéine BTN3A1. On pense que cette fixation va induire des changements conformationnels de la protéine, un ralentissement de sa mobilité et le recrutement de partenaires moléculaires. Ce sont ces modifications qui seraient reconnues par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Cependant de nombreux points semblent encore peu clairs. On ne connaît pas l'ordre séquentiel de ces événements. Est-ce les changements conformationnels de BTN3A1 qui permettent le recrutement de protéines partenaires ou l'inverse ? Est-ce la fixation de protéines partenaires qui permet le ralentissement de la mobilité de BTN3A1 ? De plus, on ne sait toujours pas ce qui est reconnu directement par le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Est-ce la protéine BTN3A1 dont la conformation est modifiée ou bien est-ce une des protéines recrutées dans le complexe ? Il nous paraissait donc important d'étudier les protéines capables d'interagir avec la molécule BTN3A1 et en particulier avec son domaine intracellulaire B30.2.

Nous avons utilisé la technique du double-hybride chez la levure afin de identifier des protéines candidates capables d'interagir avec BTN3A1. Cette technique est utile pour mettre en évidence des interactions protéine/protéine. Cela nous a permis d'obtenir une liste de six protéines candidates (que l'on citera par la suite) capables d'interagir avec le domaine intracellulaire de BTN3A1. Nous avons ensuite cherché à confirmer la capacité de ces protéines à se fixer à la molécule BTN3A1 *in cellulo* dans des cellules humaines par des techniques de co-immunoprécipitation. En parallèle nous avons essayé de définir le rôle de ces protéines dans le mécanisme d'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. En effet, la molécule BTN3A1 étant ubiquitaire, son interaction avec les protéines candidates n'a peut-être pas de lien avec l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Par différentes techniques, nous avons modifié l'expression de ces protéines dans les cellules cibles, et étudié l'impact sur l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Les résultats qui sont présentés ci-dessous sont encore très préliminaires.

## 2. Résultats

### ***a) Identification de protéines partenaires de BTN3A1 par la technique du double hybride chez la levure***

La technique du double-hybride chez la levure permet de mettre en évidence des interactions protéiques dans un modèle eucaryote. Son principe est résumé dans la **figure 24**. Cette technique a été mise en œuvre par Richard Breathnach dans notre équipe.



**Figure 24 : Mise en évidence de protéines partenaires de BTN3A1 par la technique du double-hybride chez la levure.**

Deux protéines de fusion sont créées. La première regroupe un domaine de liaison à l'ADN (BD) avec soit le domaine intracellulaire, soit le domaine extracellulaire de la protéine BTN3A1. La deuxième protéine de fusion comprend un domaine d'activation du promoteur (AD) couplé avec diverses protéines provenant d'une banque d'ADNc. Si la protéine BTN3A1 interagit avec une des protéines de la banque d'ADNc, il se forme un complexe, possédant à la fois le domaine de liaison à l'ADN et le domaine d'activation. Ce complexe va se fixer sur un promoteur et induire la transcription d'un gène rapporteur comme par exemple l' $\alpha$ -gal.

Nous avons utilisé deux protéines de fusion. La première contient soit le domaine extracellulaire, soit le domaine intracellulaire de la protéine BTN3A1 fusionné avec un domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription de la levure. La deuxième protéine de fusion contient le domaine d'activation de ce facteur de transcription de levure, couplé à des protéines exprimées à partir d'une banque d'ADNc commerciale. Elle contient des ADNc humains provenant d'origines tissulaires très variées. Si la protéine BTN3A1 s'avère capable d'interagir avec une protéine de la banque d'ADNc, cela va former un complexe comprenant un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'activation et donc donner un facteur de transcription actif. Ce complexe va se fixer sur un promoteur de la levure et induire la transcription d'un gène rapporteur. Dans le cas présent, nous avons utilisé le gène  $\alpha$ -galactosidase. En ajoutant du X- $\alpha$ -Gal, le substrat chromogénique de l' $\alpha$ -galactosidase, sur les colonies de levures, on va pouvoir identifier celles ayant exprimé le gène rapporteur. Les colonies présentant une coloration bleue auront

donc une protéine de la banque d'ADNc capable d'interagir avec la protéine BTN3A1. L'isolement de ces colonies permet ensuite de déterminer précisément quelle est la protéine candidate.

Nous avons réalisé deux criblages en double-hybride chez la levure, le premier visant à déterminer des partenaires du domaine intracellulaire de BTN3A1, et le second, ceux du domaine extracellulaire de BTN3A1. Ce dernier ne nous a pas permis de mettre en évidence des protéines capables d'interagir avec le domaine extracellulaire de BTN3A1. Cependant le criblage du domaine intracellulaire de BTN3A1 a révélé six protéines candidates capables d'interagir soit avec le domaine B30.2, soit avec le domaine juxtamembranaire reliant celui-ci au domaine transmembranaire.

La première candidate est la protéine Trio. Il s'agit d'une protéine facteur d'échange de guanine pour les GTPases de type Rho (RhoGEF) [367]. La protéine Trio semble avoir une fonction régulatrice dans la croissance des neurones et dans la cytokinèse [368]. La protéine Trio est capable d'activer la protéine Rac1, une Rho GTPase participant au contrôle du cytosquelette d'actomyosine [369]. Elle peut aussi interagir directement avec la superviline, une molécule membranaire régulatrice de la myosine [370]. Elle possède un orthologue chez la souris.

La deuxième candidate est la protéine Nucling, autrement appelée UACA (Uveal Autoantigen with Coiled-coil domains and Ankyrin repeats). Elle est capable d'interagir avec le facteur de transcription NF- $\kappa$ B [371]. Elle va avoir un rôle dans la réponse inflammatoire et dans la régulation du processus apoptotique [372, 373]. Il existe un orthologue chez la souris.

La troisième molécule identifiée est PRPF40A pour Pré mRNA Processing Factor 40 homologue A. Elle a un rôle dans l'épissage de l'ARNm et est conservée chez la souris [374].

La protéine BRMS1L est notre quatrième candidate (BREast cancer Metastasis Suppressor 1-Like). Cette protéine semble jouer un rôle dans la régulation de la transcription [375]. Elle est aussi conservée chez la souris.

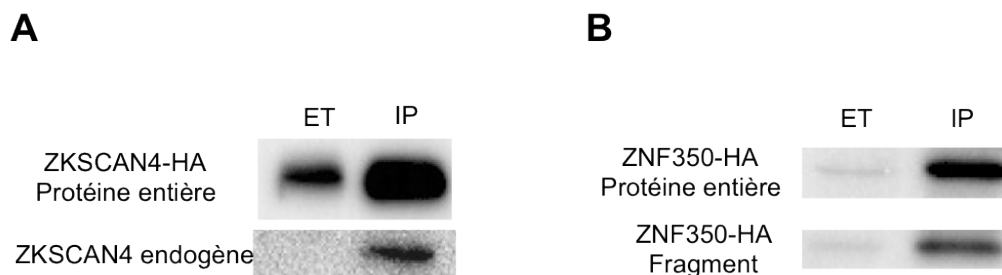
Les deux dernières protéines identifiées sont des protéines Zinc Finger possédant un domaine KRAB (Krüppel Associated Box). Ces deux protéines ont un rôle dans la régulation de la transcription. La première protéine s'appelle ZNF350 (Zinc Finger Protein 350) ou ZBRK1 (Zinc finger and BRCA1-interacting protein with a KRAB domain 1). Elle interagit directement avec la protéine TRIM28 (ou KAP1) qui fait partie de la famille des protéines à domaine B30.2 [376, 377]. Cette protéine est conservée seulement chez certains primates et chez la vache. La deuxième protéine s'appelle ZKSCAN4 (Zinc finger protein with KRAB and SCAN domain 4) ou ZNF307. Le domaine SCAN est capable d'interaction protéine/protéine. Cette protéine interagit avec le récepteur aux glucocorticoïdes [378]. Elle est conservée chez certains primates, le chien et la vache.

Tous les contrôles nécessaires au système du double-hybride dans la levure ont été réalisés. Il a fallu ensuite confirmer l'interaction de ces protéines avec par partie intracellulaire de BTN3A1 dans des cellules humaines et étudier le rôle de cette interaction dans l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par les PAGs.

#### ***b) Confirmation in cellulo de l'interaction de ces protéines avec la molécule BTN3A1***

Nous avons utilisé la technique d'immunoprécipitation afin de confirmer l'interaction de ces protéines candidates avec la protéine BTN3A1. Cette technique consiste à récupérer notre protéine dans un extrait protéique à l'aide d'un anticorps spécifique. Si cette protéine forme des complexes avec d'autres protéines, celles-ci seront aussi immunoprécipitées par l'anticorps. On vérifie ensuite la présence de ces autres protéines par western blot (WB) en utilisant des anticorps spécifiques de ces protéines. Cependant les protéines que nous avons identifiées par la technique du double-hybride sont des molécules encore peu connues. Il n'existe donc pas d'anticorps commerciaux compétents contre ces protéines à part pour ZKSCAN4. Nous ne pouvions donc pas travailler sur les protéines endogènes. Des formes taggées de ces protéines ont donc été créées avec un tag HA (hémagglutinine du virus de la grippe humain). De même, les anticorps anti-BTN3A étant incapables de différencier les trois isoformes, nous avons travaillé avec la protéine BTN3A1 couplée

à un tag c-myc. Les protéines candidates taggées HA ont été produites sous deux formes : soit en taille entière, soit en fragment (correspondant à celui identifié en double-hybride). Des cellules HEK293 ont été transfectées avec les protéines candidates taggées HA et la protéine BTN3A1 taggée myc. La protéine BTN3A1-myc est ensuite immunoprécipitée dans les extraits protéiques à l'aide d'un anticorps anti-myc. La présence de nos protéines partenaires dans cette immunoprécipitation est ensuite révélée par WB à l'aide d'un anticorps anti-HA.



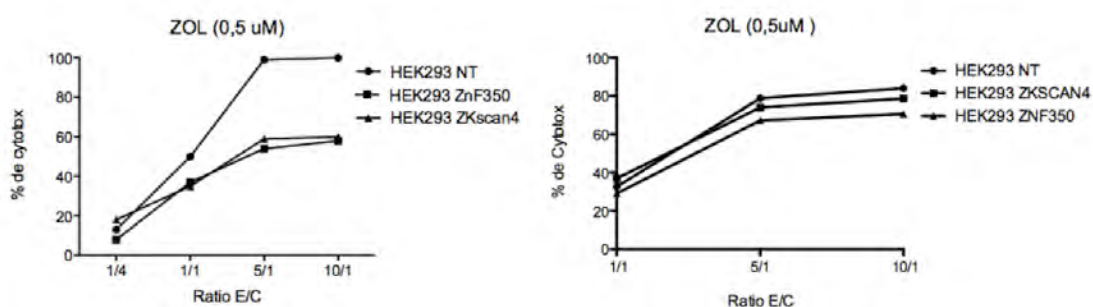
**Figure 25 : Immunoprécipitation des protéines ZKSCAN4 et ZNF350 avec la protéine BTN3A1.**

**(A)** Co-immunoprécipitation de la protéine ZKSCAN4 taggée HA ou de la protéine ZKSCAN4 endogène avec la protéine BTN3A1 taggée c-myc. La lignée HEK293 a été transfectée afin d'exprimer les molécules ZKSCAN4-HA et BTN3A1-myc. L'immunoprécipitation a été réalisée avec un anticorps anti-c-myc, et le western blot a été révélé avec un anticorps anti-HA. Dans le cas de la protéine ZKSCAN4 endogène, les cellules HEK293 ont été transfectées seulement avec BTN3A1-myc et le western blot a été révélé avec un anticorps anti-ZKSCAN4. **(B)** Co-immunoprécipitation de la protéine ZNF350 taggée HA (en forme entière ou en fragment) avec la protéine BTN3A1 taggée c-myc. Le fragment de ZNF350 correspond au fragment détecté en double hybride. L'immunoprécipitation a été réalisée avec un anticorps anti-c-myc, et le western blot a été révélé avec un anticorps anti-HA. (ET : extrait total ; IP : ImmunoPrécipitation).

Toutes les protéines candidates ont été co-immunoprécipitées (en fragment et en taille entière) avec la protéine BTN3A1. Les résultats pour les protéines ZNF350 et ZKSCAN4 ont été les plus probants et sont présentés dans la **Figure 25**. La protéine ZKSCAN4 étant la seule qui possède un anticorps commercial efficace, nous avons même pu co-immunoprécipiter sa forme endogène avec la molécule BTN3A1 taggée. Ces résultats sont encore très préliminaires et ils doivent être reconfirmés.

### c) *Évaluation fonctionnelle du rôle de ces protéines dans l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2*

En parallèle, nous avons cherché à déterminer si l'interaction de ces protéines candidates avec la molécule BTN3A1 jouait un rôle dans l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. En effet, la protéine BTN3A1 étant exprimée de manière ubiquitaire dans les cellules humaines, elle possède peut-être plusieurs fonctions, et son interaction avec les protéines candidates n'est peut-être pas liée à l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Pour étudier cela, nous avons utilisé diverses stratégies de diminution de l'expression de ces protéines dans les cellules cibles et nous avons ensuite étudié la capacité de ces cellules à activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en présence de PAg. Nous avons utilisé des cellules HEK293 que nous avons transfectées avec des siRNA ou des shRNA ciblant nos protéines partenaires. La diminution d'expression (Knock Down ou KD) de ces protéines a été analysée au niveau transcriptionnel par qPCR (l'analyse au niveau protéique étant impossible à cause de l'absence d'anticorps fonctionnels). Ces cellules ayant subi un KD ont été pré-traitées avec des ABP et l'activité cytolytique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 vis-à-vis de ces cellules a été étudiée par des tests de cytotoxicité de relargage de  $^{51}\text{Cr}$ .



**Figure 26 : Non reproductivité des résultats pour les protéines ZNF350 et ZKSCAN4.**

Les cellules HEK293 NT, ZKSCAN4 et ZNF350 ont été transfectées avec respectivement un siRNA contrôle Non Targeting (NT), un siRNA ciblant ZKSCAN4 et un siRNA ciblant ZNF350. Ces cellules ont ensuite été pré-traitées avec des ABP (zolétronate 0,5  $\mu\text{M}$ ) et la capacité des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 à les reconnaître a été mesurée par un test de cytotoxicité par relargage de  $^{51}\text{Cr}$ . Cette figure représente deux expériences distinctes dans lesquelles les mêmes lots de siRNA ont été utilisés.

Nous avons cependant été confrontés à des problèmes de reproductivité des résultats (**Figure 26**). Les KD de ces protéines semblaient parfois affecter la capacité

cytotoxique des LT Vy9Vδ2 et parfois non, alors que les mêmes conditions expérimentales étaient réunies (lots identiques de siRNA). En nous intéressant à ce phénomène de plus près, nous nous sommes rendus compte qu'il suffisait de très peu de cellules stimulatrices pour activer les LT Vy9Vδ2. En mélangeant des cellules capables d'activer les LT Vy9Vδ2 avec des cellules contrôles, nous avons découvert qu'il suffisait de la présence de seulement 10% de cellules activatrices pour déclencher une forte réponse. Une diminution insuffisante de l'expression de nos protéines candidates ne permet donc pas d'observer un effet sur les LT Vy9Vδ2. Afin de diminuer au maximum l'expression de nos protéines dans les cellules cibles HEK293, nous avons essayé différentes techniques (ex : KD inductibles, KO (Knock Out) via la technique piggyback) mais aucune n'a semblé suffisamment efficace.

Nous avons donc décidé de changer de technique et de cellules cibles. Nous avons réalisé des KO de nos protéines à l'aide de la technique CRISPR/Cas9. Cette technique fonctionne comme des ciseaux moléculaires permettant d'inactiver un gène de manière très spécifique. Nous avons utilisé cette technique sur la lignée HAP1. C'est une lignée humaine de type fibroblastique qui a pour particularité d'être haploïde. Contrairement aux cellules HEK293, il n'y aura donc qu'un seul allèle à cibler lors du KO. La combinaison de cette technique avec cette lignée devrait donc permettre d'obtenir des KO plus efficace. Ces différentes lignées KO pour nos protéines candidates sont en cours de génération et devraient être prochainement testées.

### **3. Discussion**

Ces travaux ont permis de mettre en évidence par la technique du double hybride dans la levure six protéines candidates capables d'interagir avec le domaine intracellulaire de BTN3A1. La capacité de ces protéines à se fixer sur la molécule BTN3A1 n'a pu être vérifiée dans les cellules humaines que par un système de surexpression de protéines taggées. En effet, au moment où ce projet a commencé, il n'existait quasiment aucun anticorps commercial efficace contre ces protéines. Cependant dernièrement de nouveaux anticorps sont sortis sur le marché. Si ces anticorps sont efficaces, il faudrait répéter ces expériences de co-immunoprécipitation de BTN3A1 mais cette fois-ci avec les protéines endogènes.

Cela permettrait de s'assurer que les co-immunoprécipitations (et donc les interactions protéiques) observées n'étaient pas dues à la surexpression de ces protéines.

En parallèle, nous avons cherché à étudier le rôle de ces protéines dans l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par les PAgS en jouant sur leur taux d'expression dans les cellules cibles. Nous nous sommes cependant retrouvés confrontés à des problèmes de variabilité des résultats en raison de KD plus ou moins efficace de ces protéines. Nous avons donc décidé d'utiliser un nouveau modèle dans lequel nous allons réaliser un KO de nos protéines partenaires à l'aide de la technique CRISPR/Cas9 sur la lignée HAP1, haploïde et donc avec un seul allèle à cibler. Ces lignées sont en cours de génération et vont bientôt pouvoir être testées. Un article paru récemment a mis en évidence une protéine capable d'interagir avec la protéine BTN3A1. Il s'agit de la periplakin, un adaptateur du cytosquelette [379]. C'est une protéine intéressante car elle pourrait jouer un rôle dans le remodelage membranaire de la protéine BTN3A1 quand elle est en présence de PAgS. Dans cet article, les auteurs ont eux aussi observé une certaine variation dans la réponse des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 aux cellules traitées par les shRNA visant la periplakin, de manière semblable à ce que nous avons pu observer. Cet article manque cependant de contrôle quand à l'effet off-target de leur shRNA. Ils ont cependant confirmé le rôle de cette protéine dans l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 d'une autre manière, en supprimant la zone de fixation de cette protéine sur la molécule BTN3A1, ceci ayant pour effet d'inhiber l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Si nous n'arrivons toujours pas à obtenir de résultats satisfaisants avec notre nouveau système de KO, nous pourrions envisager de définir précisément les zones d'interactions de ces protéines sur le domaine intracellulaire de BTN3A1. Nous pourrions ensuite muter spécifiquement ces zones sur la protéine BTN3A1 et observer l'impact de cette absence d'interaction sur l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

De nombreuses observations ont mis en évidence l'implication de partenaires membranaires spécifiques des primates dans la reconnaissance des cellules cibles par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Les résultats de l'équipe ont montré que le transfert de la protéine BTN3A1 (spécifiquement exprimée par des primates) dans des cellules de souris n'est pas suffisant pour induire la reconnaissance de ces cellules par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Parmi les partenaires moléculaires de BTN3A1, certaines doivent donc

elles-aussi être spécifique des primates. Parmi la liste de 6 protéines que nous avons identifiées, seules deux protéines sont conservées chez les primates et n'ont pas d'homologues chez la souris. Il s'agit des protéines ZKSCAN4 et ZNF350. Cela ne veut pour autant pas dire que les 4 protéines restantes ne sont pas impliquées dans l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Une étude avait suggéré que les partenaires de BTN3A1 spécifiques des primates étaient elles-aussi localisées sur le chromosome 6 [363]. De manière intéressante la protéine ZKSCAN4 est elle aussi présente sur le chromosome 6. Cette protéine est donc une candidate parfaite car elle remplit les deux critères. Malheureusement, la co-transfection de BTN3A1 et de ZKSCAN4 dans des cellules CHO de hamster n'est pas suffisante pour permettre la reconnaissance de ces cellules par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en présence de PAGs. Cette protéine est donc peut-être nécessaire mais pas suffisante. De plus, pour le cas des protéines ZKSCAN4 et ZNF350, il reste encore à définir comme ces protéines qui ont une localisation normalement nucléaire, pourraient passer dans le cytoplasme pour pouvoir interagir avec la protéine BTN3A1. La protéine Trio quand à elle est une candidate très intéressante car elle est plutôt localisée à la membrane de la cellule et semble capable d'interagir avec le cytosquelette. Ces résultats sont encore très préliminaires et laissent de nombreuses questions en suspens. Il faut continuer donc à travailler sur ces protéines partenaires car leur identification est une étape clé à la compréhension des mécanismes d'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

## **C. Question III : quels sont les rôles joués par chacun des domaines de la protéine BTN3A1 en lien avec l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 induite par les PAgS ?**

### **1. Introduction**

Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont capables de reconnaître des cellules infectées ou tumorales en lien avec la présence de PAgS. La présence de la protéine BTN3A1 à la surface des cellules cibles est nécessaire pour qu'elles soient reconnues par les LT. Le domaine B30.2 de la protéine BTN3A1 est essentiel pour cette activation car il va fixer les PAgS. Il agit comme un senseur intracellulaire de l'augmentation des niveaux de ces PAgS. Cette fixation va induire de nombreux changements (de conformation, de topologie) pour la protéine BTN3A1 et induire le recrutement de partenaires moléculaire afin de déclencher l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Cependant nous n'avons pas encore d'idées précises de la manière dont se déroulent ces mécanismes. Si on a maintenant un rôle défini pour le domaine B30.2, celui des autres domaines de la protéine BTN3A1 reste encore très flou.

Au cours de ces travaux, nous avons voulu étudier le rôle des différents domaines de BTN3A1 (IgV, IgC, transmembranaire et juxtamembranaire) dans l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Nous avons pour cela utilisé des approches de délétions, échanges de domaines et protéines chimériques. Dans un premier temps, nous avons montré que les domaines IgV et IgC contribuent à l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Si on supprime ou si on remplace ces domaines par ceux de la protéine B7.1 homologue structurellement, la protéine BTN3A1 n'est plus capable d'induire l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par les PAgS. Ces résultats ont aussi montré que le domaine transmembranaire n'est pas essentiel dans cette activation. Pour finir, le domaine juxtamembranaire qui relie le domaine B30.2 au domaine transmembranaire semble jouer un rôle régulateur dans la détection des PAgS par la protéine BTN3A1. Lorsque l'on transfère le domaine B30.2 de la protéine BTN3A1 dans l'isoforme BTN3A3 cela lui confère la capacité de fixer les PAgS et d'activer les

LT. Hors dans ces conditions l'isoforme BTN3A3 induit une activation beaucoup plus efficace des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 que l'isoforme BTN3A1. De plus, lorsque l'on transfère le domaine juxtamembranaire de la protéine BTN3A3 dans l'isoforme BTN3A1, celle-ci devient capable de suractiver les LT. Le domaine juxtamembranaire de l'isoforme BTN3A3 présenterait donc un effet activateur. Dans une seconde partie de ces résultats, nous avons cherché à étudier la capacité de dimérisation de la protéine BTN3A1 ainsi que son interaction avec le cytosquelette, en présence ou en absence de PAg.

## **2. Résultats**

### ***a) Cartographie fonctionnelle de BTN3A en lien avec l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 induite par les PAg***

Ces résultats font l'objet d'un article en cours de soumission dont je suis 1<sup>er</sup> auteur. Cet article a été rédigé en format court cutting edge du Journal of Immunology.

# **Contribution of domains of butyrophilin BTN3A1 to mediate antigenic activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells induced by phosphoantigens**

**Running title:** Contribution of BTN3A1 domains to V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation

Cassie-Marie Peigné<sup>\*†</sup>, Alexandra Léger<sup>\*</sup>, Marie-Claude Gesnel<sup>\*</sup>, Fabienne Konzack<sup>\*</sup>, Marc Bonneville<sup>\*</sup>, Richard Breathnach<sup>\*</sup> and Emmanuel Scotet<sup>\*†</sup>

<sup>\*</sup>Inserm, UMR892, Nantes, F-44000, France; Univ Nantes, Nantes, F-44000, France; CNRS, UMR 6299, Nantes, F-44000, France

<sup>†</sup>Labex IGO “Immunotherapy, Graft, Oncology”, Nantes, F-44000, France

## **Address correspondence**

Emmanuel Scotet, INSERM UMR892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, IRS UN, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes cedex 1, France. [Emmanuel.Scotet@inserm.fr](mailto:Emmanuel.Scotet@inserm.fr)

## **Keywords**

Human,  $\gamma\delta$  T cells, butyrophilin, antigenic activation

Abstract : 110 words

Figures : 4; Supplemental Figures : 1

References: 20

## Abstract

V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes represent the major peripheral  $\gamma\delta$  T cell subset in humans, and most other primates, with broad reactivity against transformed or infected target cells. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells are specifically activated by small phosphorylated isoprenoid pathway metabolites, called phosphoantigens (PAg). Previous reports have shown that key to PAg-mediated activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells is the butyrophilin 3A1 (BTN3A1) protein which contains an intracellular B30.2 domain critical to PAg reactivity. More recent studies indicated that subtle internal sensing of changes in PAg metabolite concentrations by BTN3A1 molecules, rather than direct extracellular presentation of PAg to  $\gamma\delta$  TCR, represents a critical step in V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell detection of cellular distress. However, the precise contribution of the different domains of BTN3A1 during this process has not yet been addressed. We used domain-shuffling and deletions approaches to show that both V- and C *Ig-like* extracellular domains of BNT3A1 contribute to antigenic activation of  $\gamma\delta$  T cells. The results of similar molecular biology approaches, also supported by fluorescence recovery after photobleaching assays, next point out the contribution of the intracellular juxtamembrane region of BTN3A molecules, which locates upstream of the B30.2 domain. Finally, BTN3A1-BTN3A3 juxtamembrane chimeras identified key sequences that regulate the antigenic activation process of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. Collectively, these results provide novel insights on the contribution of both extracellular and intracellular regions of BTN3A1 molecules in the activation of  $\gamma\delta$  T cells induced by PAg.

## Introduction

In human adults, as well as in most non-human primates, the major peripheral  $\gamma\delta$  T cell subset carries a T cell receptor (TCR) composed of V $\delta$ 2 chain which is systematically paired to V $\gamma$ 9 chain. The human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell subset accounts for about 1/20 of PBL in healthy individuals [1-4]. Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells recognize *in vitro* a wide array of infected or transformed cells and are activated *in vivo* in various infectious and tumor contexts [5]. Following antigenic activation, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells display rapid and broad functional responses, such as IL-2-dependent proliferation, cytotoxicity and pro-inflammatory cytokines release.

The broad V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell reactivity integrates both contact- and TCR-dependent events. Most human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes are strongly and specifically activated by small non-peptidic phosphorylated compounds, referred to as phosphoantigens (PAg), which are metabolites of the mammalian mevalonate or the microbial desoxyxylulose-phosphate pathways [6-8]. Enhanced tumor cell recognition by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells correlates with upregulation of intracellular PAg levels resulting from increased cell metabolism and cholesterol biosynthesis [9]. Accordingly, mevalonate pathway pharmacological inhibitors such as GMP-grade aminobisphosphonates (NBPs), acting downstream PAg biosynthesis, increase V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation. Despite the characterization of several PAg with variable potencies and bioactivities, the mechanism(s) underlying this unique and specific antigenic activation process induced by both exogenous and endogenous PAg remained unclear. In line with previous reports suggesting the key implication of membrane-associated molecules of primate origin, a set of recent studies has identified ubiquitous B7-related butyrophilin (BTN) molecules CD277/BTN3A, and more precisely their BTN3A1 isoforms, as mandatory molecules in the PAg-induced activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells [10, 11]. BTN genes constitute a subgroup of at least 10 genes in most species and 13 of them have been identified in human, where they are located in the MHC class I region of chromosome 6p [12]. The BTN family belongs to the immunoglobulin (Ig) superfamily and shares structural homology with B7 family members at extracellular portion level which is composed of two Ig-like domains, referred to as IgV and IgC domains. The BTN3A subfamily contains three type I transmembrane glycoprotein members in humans: BTN3A1, BTN3A2, and BTN3A3. Both BTN3A1 and BTN3A3 isoforms contain an intracellular B30.2 domain which is missing in BTN3A2.

A first proposed mechanism implies the direct loading of PAg on IgV ectodomain of cell surface-expressed BTN3A molecules, this complex on target cells would next bind V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR to trigger antigenic activation [13]. Hence, this study has provided some molecular and cellular evidences for direct interactions between PAg, the extracellular IgV domain and the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR, therefore supporting the appealing assignment of BTN3A as a classic Ag presenting molecule. However, more recent publications have shown that PAg, irrespective of their endogenous or exogenous origin, rather act intracellularly through a selective binding to the internal B30.2 domain of BTN3A1 which indicates that they would not behave as genuine Ag and that internal sensing of subtle changes in PAg metabolite levels by BTN3A1 molecules could represent an important step in V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell-mediated detection of tumorigenesis and infections [14-17]. Despite these recent advances, the molecular pathways, the identity of the partners engaged following intracellular interactions between PAg and BTN3A1 as well as the functions of the various intra-/extracellular domains of BTN3A remain unclear [18]. In this study, we reveal, through several deletions, domain-shuffling and chimera approaches, the contributions of various extracellular IgV and IgC domains, the transmembrane and intracellular juxtamembrane regions of BTN3A1 and BTN3A3 isoforms to the antigenic activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. This analysis evidences for the first time the mandatory role played by the ectodomain, and more precisely, by both IgV and IgC extracellular domains from BTN3A1 and the unexpected strong activator effect of the juxtamembrane region of BTN3A3. Taken together, our data provide novel and unexpected highlights on the roles played by the different portions of BTN3A molecules in the antigenic activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells triggered by PAg.

## Materials and Methods

### *Antibodies and flow cytometry*

The following monoclonal antibodies were either from Beckman Coulter: fluorescein isothiocyanate-anti-V $\delta$ 2 (#IMMU389) or BD Biosciences: fluorescein isothiocyanate-or phycoerythrin-cyanin 5.1-CD107a (#H4A3). Mouse  $\alpha$ -CD277 mAbs (clones #20.1 and #103.2 ) were kindly provided by D. Olive (INSERM UMR891, Marseille, France). Flow cytometry data were collected on a FACSCalibur cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo (Tree Star, Ashland, OR) software.

### *Reagents*

L-glutamine, leucoagglutinin, streptomycin, penicillin, monensin, DMEM and RPMI 1640 media were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Recombinant human IL-2 (ProLeukin) was from Chiron (Emeryville, CA). Zoledronic acid monohydrate (zoledronate, Zometa 4 mg/100mL, NBP) was obtained from Novartis Pharma SAS. BrHPP (bromohydrin pyrophosphate) was kindly provided by Innate Pharma (Marseille, France).

### *Expansion of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells and HEK cells*

PBMCs of human healthy donors were isolated from blood samples obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS Nantes, France). For specific expansion of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, fresh PBLs ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were stimulated with zoledronate (25  $\mu$ M) in complete RPMI 1640 medium (2 mM L-glutamine, 10 mg/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin) supplemented with 10% FCS and rhIL-2 (20 ng/ml). After 4 days, cultures were supplemented with rhIL-2 (60 ng/ml). Specific expansion of V $\delta$ 2<sup>+</sup> T cells within PBLs was checked by calculating frequency and absolute number 2 weeks following activation. Resting V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell lines (V $\delta$ 2<sup>+</sup> T cells > 70 %) expanded under these conditions were next used in functional assays. HEK293FT (human embryonic kidney) cell line was cultured in complete DMEM medium (2 mM L-glutamine, 10  $\mu$ g/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin) with 10% FCS. HEK sh284 cells, which do not express BTN3A isoforms following shRNA mediated-knock-down, were generated from HEK293FT target cells as previously described [10] and cultured in complete RPMI 1640 medium. Human  $\gamma\delta$  T and HEK cell cultures were tested for *Mycoplasma* contamination.

#### *in vitro functional assays*

Transfected or wild-type (WT) HEK cells were treated for 2 hours with either CD277-specific mAb (clone #20.1) or NBP (zoledronate) at the indicated concentrations, extensively washed and next cocultured together with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells at 37°C in complete RPMI 1640 medium. As positive controls, specific activations of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells were induced by BrHPP (3  $\mu$ M) in the absence of target cells. HEK cells were next extensively washed and cocultured together with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells at 37°C in complete RPMI 1640 medium in the presence of 10  $\mu$ M monensin and fluorochrome-labeled CD107a-specific mAb. After 4 h, cells were harvested, stained with fluorochrome-labeled V $\delta$ 2 TCR-specific mAb and analyzed by flow cytometry.

#### *BTN3A domains shuffling and generation of chimeras*

Full-length cDNAs for human BTN3A1 (LIFESEQ3294566), and BTN3A3 (BC015815) isoforms were obtained from Open Biosystems. cDNAs silently mutated in the sh284 target sequence were subcloned in a modified pIRES1hyg vector (Clontech) as already described [10]. Plasmids were used for transient or stable transfections in either BTN3A silenced HEK293FT cells (sh284; clone#30) or WT HEK293 cells. Plasmids encoding for chimeric BTN3A1 and BTN3A3 carrying swapped, truncated or mutated domains were generated by cloning or PCR according to standard procedures. Transient transfections of HEK cells (HEK293 and HEK sh284) cells were achieved using jetPEI (Polyplus transfection Ozyme), according to the supplier's instruction. 2 days following transient transfection, HEK cells were checked for the selective expression of mutated BTN3A1 or BTN3A3 isoforms by flow cytometry.

#### *Statistical analysis*

All data were analyzed using GraphPad Prism software (version 6; GraphPad Software). The statistical significance of differences between populations was assessed with two-tailed Student *t*-tests. For all experiments, a *P* value of <0.05 was considered significant.

## Results and Discussion

### *The ectodomain of BTN3A1 contributes to the antigenic activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells*

We initially focused our investigations on the contribution of the extracellular domain of BTN3A1 to the antigenic activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. To this end, BTN3A1 molecules deleted for either IgV ( $\Delta$ IgV) or IgC ( $\Delta$ IgC) domains have been engineered (**Fig. 1A**), expressed in CD277-knockout HEK sh284 cells [10] and compared for their ability to activate co-cultured V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, following sensitization induced by anti-CD277 mAb (agonist clone #20.1) or NBP (zoledronate). Both  $\Delta$ IgV and  $\Delta$ IgC BTN3A1 molecules failed to induce significant activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, following either mAb or NBP sensitizations, as compared to wild-type BTN3A1<sup>+</sup> transfectants (**Fig. 1B**). To exclude any structural bias that could be linked to the expression of molecules truncated for their extracellular region, we next tested the activity of hybrid BTN3A1 molecules fused to extracellular portions of the structurally-related B7.1 costimulator (**Fig. 1A**). HEK sh284 cells which expressed BTN3A1 proteins containing either the full-length ectodomain (B7IgV-IgC) or a *Ig-like* portions (B7IgV; B7IgC) of the B7 protein failed to induce any V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell reactivity. In line with their previously defined binding properties [19], CD277-specific mAbs did not bind, nor sensitize, HEK cell transfectants expressing truncated and chimeric molecules which were devoid of <sub>BTN3A1</sub>IgV parts. Both cytometric and microscopic analysis indicate that the lack of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell reactivity against HEK cells expressing these various Ig-truncated or Ig-swapped molecules could not be merely explained by expression failures (**Supplemental Fig. S1**). Altogether, these results provide evidence for the role played by the ectodomain of BTN3A1 molecule which mediates the reactivity of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells against mAb or NBP-sensitized target cells. However, they also did not reveal the mandatory contribution of any of the two extracellular *Ig-like* domains of this butyrophilin to this mechanism.

### *The transmembrane region of BTN3A1 does not specifically contribute to the antigenic activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells*

Regarding the dynamics of BTN3A1 proteins within the cell membrane, our previous results have shown that: (i) these type I membrane anchored glycoproteins can rapidly relocalize towards contact interface establishing between  $\gamma\delta$  T and target cells upon yet undefined signals which are linked to PAg accumulation (E.S., *unpublished observations*) and (ii) the

reactivity of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells correlates with the decreased mobility of BTN3A1 molecules in the cell membrane, these events being specifically induced, in a B30.2 domain-dependent manner, by intracellular PAg accumulation [10, 14]. Based on this, we therefore aimed at analyzing the contribution of the transmembrane region of BTN3A1 glycoproteins in the antigenic activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. Hence, we tested whether single membrane-anchoring amino acid differences or whole transmembrane (TM) region swaps could influence the stimulatory activity of BTN3A1 molecules. Both point-mutated and chimeric BTN3A1 molecules, which comprised various transmembrane sequences from other related, or not, human type I glycoproteins such as BTN3A3, BTN1A1 and FGFR3, have been generated and expressed at the cell surface of HEK sh284 cells (**Fig. 2A**, *data not shown*). All these various engineered molecules mediated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation following mAb- or NBP-sensitization of target cells, as efficiently than did wild-type BTN3A1<sup>+</sup> transfectants (**Fig. 2B**). From these results, we conclude that the transmembrane region of BTN3A1 glycoproteins does specifically contribute to their functions associated to intracellular PAg accumulation and V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell reactivity.

*Mapping of the juxtamembrane region of BTN3A identifies two regions involved in the regulation of the antigenic activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells*

We next focused our functional investigations towards yet unanalyzed intracellular regions of the BTN3A1 molecule, which includes the definition of their possible specific character. In this set of experiments, cDNAs encoding for either chimeric full-length BTN3A1 or BTN3A3 molecules carrying swapped regions were assembled (**Fig. 3A**) and next expressed in HEK sh284 cells before mAb or NBP-sensitization followed by coculture with human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. In line with our previously published observations [10], V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells significantly reacted against NBP-sensitized target cells expressing wild-type BTN3A1 molecules (22,6 % of CD107a<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells) and, to a much lesser extent, against BTN3A3<sup>+</sup> cells (8,4 % of CD107a<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells), this lower reactivity being strongly enhanced (63 % of CD107a<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells) when HEK target cells expressed hybrid BTN3A3 molecules containing the B30.2 domain of BTN3A1 (**Fig. 3B**). In line with our first results (**Fig. 1B**), hybrid BTN3A3 molecules which both contained Ig-like ectodomains of BTN3A1 and B30.2 intracellular domains did not induce greater V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell reactivities, as compared to the conditions with target cells expressing BTN3A3 containing wild-type ectodomains. To further map the intracellular region of BTN3A molecules, we analyzed the contribution of the intracellular

sequence (72 residues) which is adjacent to the cellular membrane and upstream of the mandatory  $_{\text{BTN3A1}}\text{B30.2}$  (see **Fig. 4A**), hereafter referred to as the juxtamembrane (JTM) region. Strikingly, chimeric full-length BTN3A1 molecules swapped for the  $_{\text{BTN3A3}}\text{JTM}$  sequence induced huge V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell reactivities against target cells (62,7 % of CD107a<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells), as compared to their wild-type counterparts, both mAb- and NBP-sensitized target cells triggering these stronger reactivities. Interestingly, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells weakly reacted against HEK sh284 cells which expressed hybrid BTN3A3 or BTN3A1 molecules with the  $_{\text{BTN3A3}}\text{JTM}$ , in the absence of any mAb or NBP sensitization (~5 % of CD107a<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells). This ‘autoreactivity’, which was linked to the joint expression of both  $_{\text{BTN3A3}}\text{JTM}$  and  $_{\text{BTN3A1}}\text{B30.2}$  regions, was efficiently inhibited by statins which are upstream pharmacologic inhibitors of the mevalonate pathway, thus suggesting the contribution of endogenously produced PAg to this antigenic activation process (*data not shown*). To further dissect which portions of the  $_{\text{BTN3A3}}\text{JTM}$  region mediate this strong reactivity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, three regions of sequence of BTN3A3, indicated as Box 1 (b1), b2 and b3 in **Fig. 4A**, were swapped either individually or in combination into BTN3A1. The resulting full-length hybrid BTN3A1 constructs were next tested for their ability to mediate PAg induced V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell stimulation. As expected from our previous experiments, BTN3A1 isoforms expressing  $_{\text{BTN3A3}}\text{JTM}$  region induce stronger antigenic activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, as compared to wild-type BTN3A1 molecule (**Fig. 4B**). The swapping of the  $_{\text{BTN3A3}}\text{b2}$  sequence of in BTN3A1 isoforms is not sufficient to induce any increased antigenic response of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. Conversely, the expression of  $_{\text{BTN3A3}}\text{b1}$  and  $_{\text{BTN3A3}}\text{b3}$  sequences in BTN3A1, alone or in combination, induces a strong antigenic reactivity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, as detected with the whole  $_{\text{BTN3A3}}\text{JTM}$  portion. Therefore, both  $_{\text{BTN3A3}}\text{b1}$  and  $_{\text{BTN3A3}}\text{b3}$  sequences are the main portions implicated in the enhanced antigenic activation triggered by the  $_{\text{BTN3A3}}\text{JTM}$  sequence. Finally, these observations were confirmed by a set of additional reverse experiments in which chimeric BTN3A3 isoforms already expressing intracellular  $_{\text{BTN3A1}}\text{B30.2}$  domain induce enhanced reactivity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell that is reduced upon swapping their JTM sequence with the one expressed by BTN3A1 isoforms (**Fig. 4C**).

This study aimed at providing a first functional cartography of BTN3A1 molecules that play a unique mandatory role during activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells induced by PAg. Our work first evidences an unexpected contribution of both extracellular IgV and IgC domains of the ectodomain of BTN3A1 molecules and the absence of any specific impact of  $_{\text{BTN3A1}}\text{TM}$

sequences in this reactivity process. While comparing the role played by intracellular JTM sequences constituting either BTN3A1 or BTN3A3 isoforms, our experiments revealed that the <sub>BTN3A3</sub>JTM sequence can massively enhance the antigenic activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells that is triggered by PAg. Hence, the results provide novel and unexpected highlights on the roles played by the extra- and intracellular portions of human BTN3A/CD277 molecules for the antigenic activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells that is triggered by PAg, as recently suggested by a recent study [20]. This suggest that B30.2 and JTM intracellular portions could, in an opposite manner, tightly regulate this antigenic activation process. On one side, the intracellular <sub>BTN3A1</sub>B30.2 domain specifically efficiently senses subtle changes of levels PAg metabolites, while its JTM portion located upstream would tightly regulate this process to prevent any V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell-mediated autoreactivity.

## Acknowledgments

*We thank the staff of the Cytometry Facility (Cytocell) and Cellular and Tissular Imaging Core Facility (MicroPICell) of Nantes University for technical assistance.*

## Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

## Footnotes

This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université de Nantes. This work has been carried out thanks to the support of the Labex IGO project (n° ANR-11-LABX-0016-01) funded by the «Investissements d'Avenir» French Government program, managed by the French National Research Agency (ANR)"

Abbreviations used in this article : NBP, aminobisphosphonates; PAg, phosphoagonist; TCR, T Cell Receptor ; PBL, Peripheral Blood Lymphocyte ; BTN, Butyrophilin ; JTM, juxtamembranar.

## References

1. Hayday, A.C., *[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 975-1026.
2. Hayday, A.C., *Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 184-96.
3. Bonneville, M., R.L. O'Brien, and W.K. Born, *Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(7): p. 467-78.
4. Chien, Y.H., C. Meyer, and M. Bonneville, *gammadelta T cells: first line of defense and beyond*. Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 121-55.
5. Bonneville, M. and E. Scotet, *Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(5): p. 539-46.
6. Constant, P., et al., *Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands*. Science, 1994. **264**(5156): p. 267-70.
7. Tanaka, Y., et al., *Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells*. Nature, 1995. **375**(6527): p. 155-8.
8. Hintz, M., et al., *Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gammadelta T cells in Escherichia coli*. FEBS Lett, 2001. **509**(2): p. 317-22.
9. Gober, H.J., et al., *Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells*. J Exp Med, 2003. **197**(2): p. 163-8.
10. Harly, C., et al., *Key implication of CD277/Butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T cell subset*. Blood, 2012. **120**(11): p. 2269-2279.
11. Wang, H., et al., *Butyrophilin 3A1 plays an essential role in prenyl pyrophosphate stimulation of human Vgamma2Vdelta2 T cells*. J Immunol, 2013. **191**(3): p. 1029-42.
12. Rhodes, D.A., et al., *The cluster of BTN genes in the extended major histocompatibility complex*. Genomics, 2001. **71**(3): p. 351-62.
13. Vavassori, S., et al., *Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human gammadelta T cells*. Nat Immunol, 2013. **14**(9): p. 908-16.
14. Sandstrom, A., et al., *The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human Vgamma9Vdelta2 T cells*. Immunity, 2014. **40**(4): p. 490-500.
15. Riano, F., et al., *Vgamma9Vdelta2 TCR-activation by phosphorylated antigens requires butyrophilin 3 A1 (BTN3A1) and additional genes on human chromosome 6*. Eur J Immunol, 2014. **44**(9): p. 2571-6.
16. Rhodes, D.A., et al., *Activation of Human gammadelta T Cells by Cytosolic Interactions of BTN3A1 with Soluble Phosphoantigens and the Cytoskeletal Adaptor Periplakin*. J Immunol, 2015. **194**(5): p. 2390-8.
17. Wang, H. and C.T. Morita, *Sensor Function for Butyrophilin 3A1 in Prenyl Pyrophosphate Stimulation of Human Vgamma2Vdelta2 T Cells*. J Immunol, 2015. **195**(10): p. 4583-94.
18. Harly, C., C.M. Peigne, and E. Scotet, *Molecules and Mechanisms Implicated in the Peculiar Antigenic Activation Process of Human Vgamma9Vdelta2 T Cells*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 657.

19. Palakodeti, A., et al., *The molecular basis for modulation of human Vgamma9Vdelta2 T cell responses by CD277/butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies*. J Biol Chem, 2012. **287**(39): p. 32780-90.
20. Hsiao, C.H., et al., *Synthesis of a phosphoantigen prodrug that potently activates Vgamma9Vdelta2 T-lymphocytes*. Chem Biol, 2014. **21**(8): p. 945-54.

## Legends to figures

**Figure 1. The extracellular IgV and IgC domain of BTN3A1 contributes to the antigenic activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells.** (A) Shown are the various chimeric BTN3A molecules used to assess contribution of the extracellular domain of BTN3A1 in antigenic activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. IgV and IgC domain of BTN3A1 are either deleted or replaced by the equivalent domain of the B7.1 molecule. (B) Percentage of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells expressing CD107a after coculture with HEK sh284 re-expressing, after transient transfection, the chimeric molecules described in A part. Target cells were pretreated for 2 hr with the  $\alpha$ -CD277 mAb 20.1b (10  $\mu$ g/mL) or the NBP zoledronate (100  $\mu$ M) ( $n \geq 3$ ). \*\*  $p < 0.005$  (Student's t test), ns : non-significant.

**Figure 2. Modification of the transmembrane region of BTN3A1 does not impact the antigenic activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells.** (A) Shown are the various chimeric molecules used to assess contribution of the transmembrane region of BTN3A1 in antigenic activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. The transmembrane region of BTN3A1 is replaced by the equivalent region of BTN3A3, BTN1A1 and FGFR3. (B) Percentage of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells expressing CD107a after coculture with HEK sh284 re-expressing, after transient transfection, the chimeric molecules described in A part. Target cells were pretreated for 2 hr with the  $\alpha$ -CD277 mAb 20.1b (10  $\mu$ g/mL) or the NBP zoledronate (100  $\mu$ M) ( $n \geq 3$ ). \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$  (Student's t test), ns : non-significant.

**Figure 3. The juxtamembrane region of BTN3A regulates the antigenic activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells.** (A) Shown are the various chimeric molecules used to assess contribution of the juxtamembrane region of BTN3A1 in antigenic activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. Swapping of the domains B30.2, IgV and IgC, and juxtamembrane region between BTN3A1 and BTN3A3. (B) Percentage of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells expressing CD107a after coculture with HEK sh284 re-expressing, after transient transfection, the chimeric molecules described in A part. Target cells were pretreated for 2 hr with the  $\alpha$ -CD277 mAb 20.1b (10  $\mu$ g/mL) or the NBP zoledronate (100  $\mu$ M) ( $n \geq 3$ ). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$  (Student's t test), ns : non-significant.

**Figure 4. The juxtamembrane region of BTN3A identifies two regions involved in the regulation of the antigenic activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells.** (A) Amino acid sequence alignment of the juxtamembrane region of BTN3A1 (top) and the BTN3A3 (bottom). Positions identical to BTN3A1 are shown as dashes and differences are shown in capital letters. The swapped regions are indicated and labelled accordingly (Box 1, Box 2, and Box 3, abbreviated as b1, b2, and b3, respectively). (B) Percentage of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells expressing CD107a after coculture with HEK sh284 re-expressing, after transient transfection, full-length BTN3A1 with the corresponding BTN3A3 regions (b1, b2, b3, or a combination thereof) swapped into the juxtamembrane region. Target cells were pretreated for 2 hr with the  $\alpha$ -CD277 mAb 20.1b (10  $\mu$ g/mL) or the NBP zoledronate (100  $\mu$ M) ( $n \geq 3$ ). (C) FACS plot showing CD107a upregulation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells response to treatment of wild-type and sequence-swapped B30.2 and juxtamembrane region full-length BTN3A1 and BTN3A3 constructs in the presence of NBP zoledronate (100  $\mu$ M). Data are representative of three independent experiments. ). \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$  (Student's t test), ns : non-significant.

#### **Supplementary Figure 1. Expression of chimeric form of BTN3A1.**

Expression of BTN3A1 chimeric form on cell surface analyzed by FACS and microscopy. The  $\alpha$ -CD277 mAb doesn't recognize BTN3A1 when the IgV domain is missing.

Figure 1

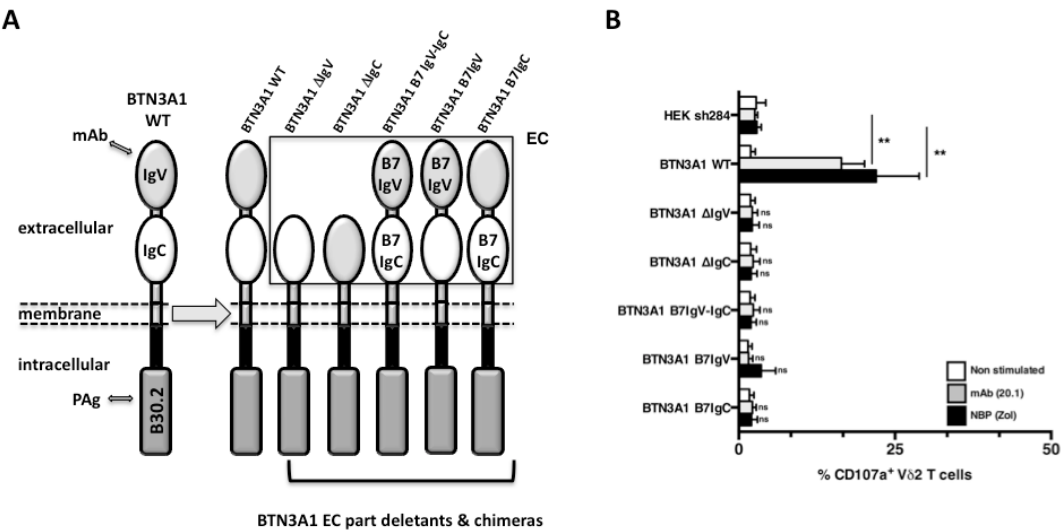


Figure 2

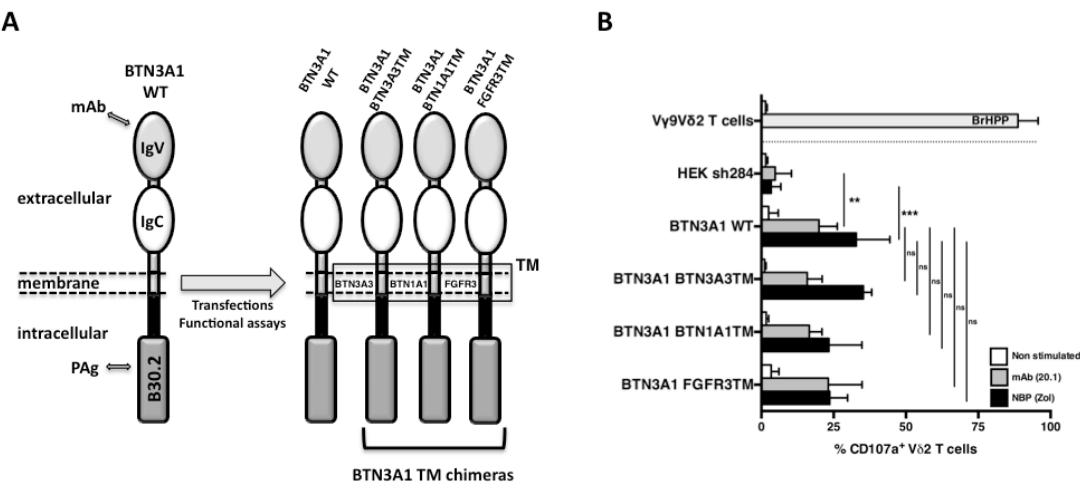


Figure 3

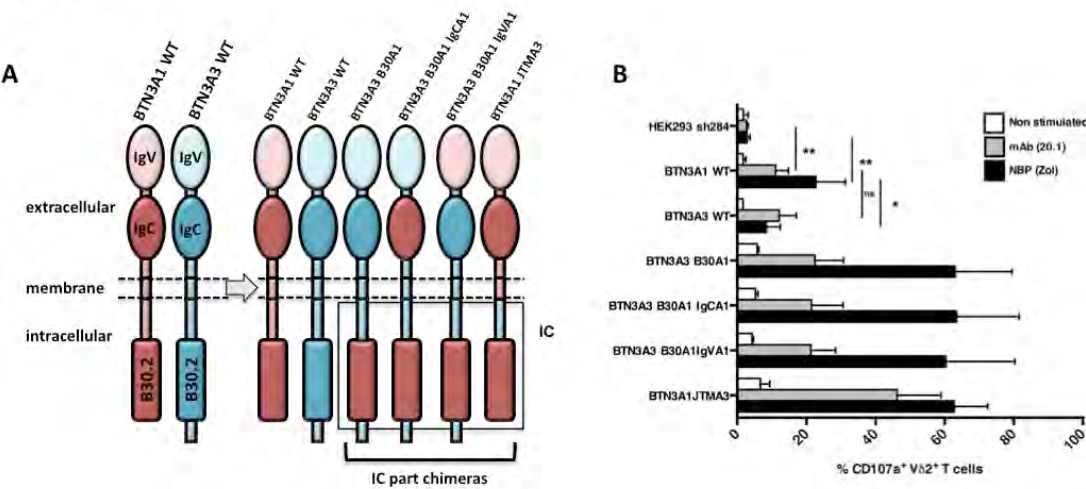
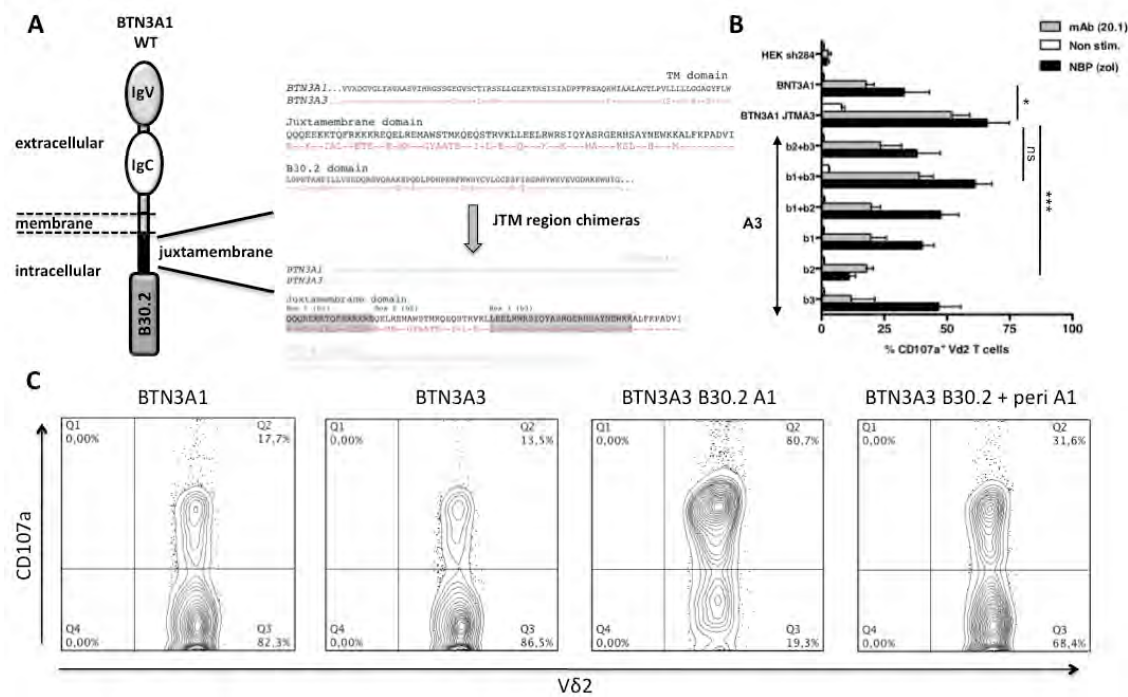
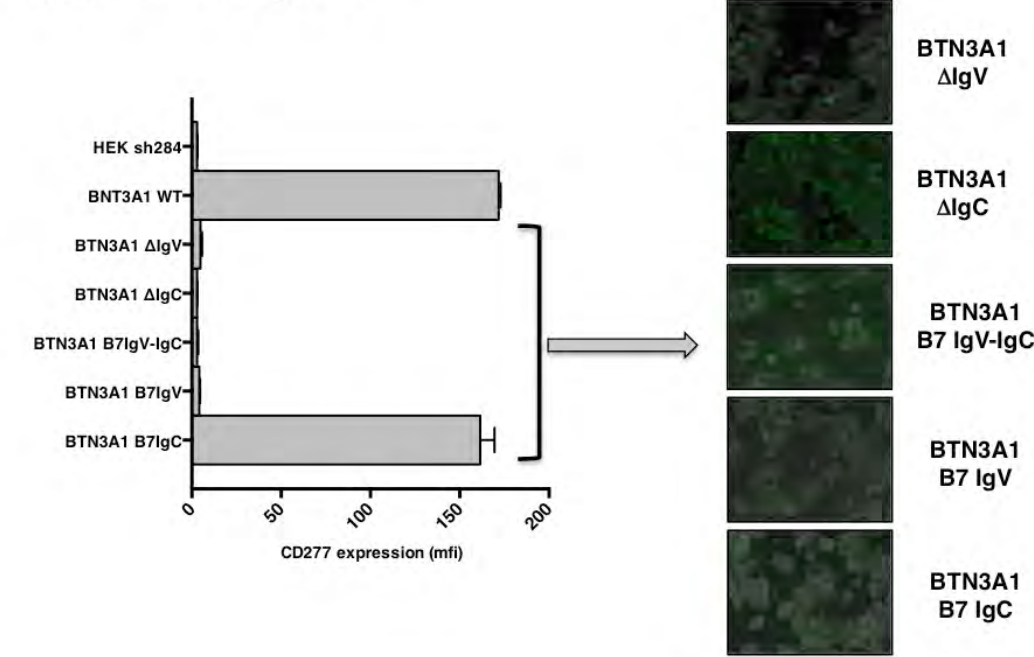


Figure 4



Supplemental Figure 1



## **b)     *Analyse de la dimérisation de BTN3A en surface***

Certaines protéines de la famille B7, et en particulier la molécule B7.1, sont capables de se dimériser. La protéine BTN3A1 a une structure très homologue à ces protéines B7. De nombreux travaux ont montré que les protéines possédant un domaine B30.2 sont souvent capables de se dimériser et cela joue un rôle dans leur fonction biologique (cf Intro partie C.2.3). Il semblerait donc probable que la protéine BTN3A1 soit elle aussi capable de se dimériser à la membrane. Ces dimères ont été observés en solution à l'aide de protéines recombinantes [340]. Cependant l'existence de ces dimères à la surface des cellules n'a toujours pas été documentée.

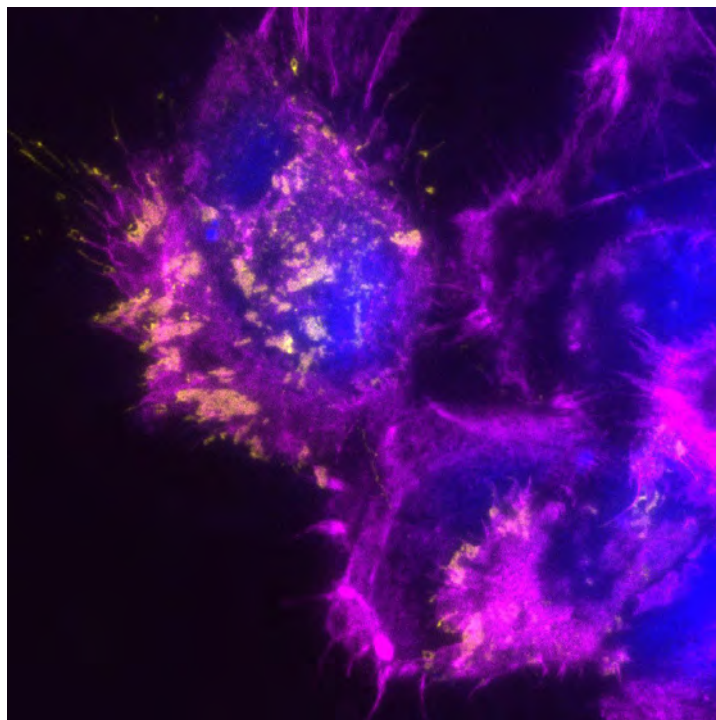
Nous avons cherché à étudier ces dimères à l'aide de différentes techniques. Dans un premier temps la technique de co-immunoprécipitation en utilisant deux formes de BTN3A1, exprimant chacune un tag différent (tag=étiquette) n'a pas permis de mettre en évidence ces dimères dans les cellules. Suspectant des dimères peu stables, nous avons utilisé des molécules induisant des cross-link. Ce sont des petites molécules qui fonctionnent comme des petits ponts permettant de lier de manière covalente des protéines suffisamment proches. Nous avons testé différentes tailles de molécules mais aucune n'a permis de mettre en évidence des dimères de BTN3A1. Nous nous sommes ensuite dirigé vers des approches de microscopie afin de travailler sur la membrane de la cellule directement. Nous avons utilisé la technique de FLIM-FRET (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy – Förster Resonance Energy Transfert) qui permet d'étudier les interactions moléculaires au microscope confocal. On couple les deux protéines que l'on souhaite étudier (ici BTN3A1 dans les deux cas) à deux protéines fluorescentes, l'une donneuse et l'autre accepteuse (GFP et mCherry). On excite le fluorophore donneur. Si les protéines se trouvent suffisamment proches (distance inférieure à 10 nm) la lumière émise par le fluorophore donneur va pouvoir exciter le fluorophore accepteur. Ces expériences ont donné des résultats mitigés ne permettant ni d'infirmer, ni de confirmer la présence de dimères de BTN3A1 à la surface de la cellule. Nous avons aussi tenté l'approche microscopique de PLA (Proximity Ligation Assay) qui consiste marquer nos deux protéines avec des Ac spécifiques puis de venir marquer ces Ac avec des Ac secondaires auxquels sont rattachés des brins d'ADN. Si les protéines sont suffisamment proches (distance inférieure à 40 nm), les brins d'ADN vont interagir entre eux et pouvoir ensuite être amplifiés. La présence de cet ADN amplifié est

ensuite révélé avec un colorant spécifique. Il s'est avéré cependant que cette technique produisait de nombreux faux positifs et un important bruit de fond. Nous essayons donc de mettre au point la technique (changement d'Ac primaire, variation des concentrations utilisées) afin d'obtenir un résultat sans bruit de fond. Toutes ces expériences décrites ci-dessus ont été réalisées en présence et en absence de PAgS.

### **c) *Interactions BTN3A et constituants du cytosquelette***

La protéine BTN3A1 est une protéine très mobile à la surface des cellules. Cependant dans une cellule traitée avec des ABP, elle va très fortement ralentir jusqu'à devenir presque immobile à la surface de la cellule. Le ralentissement de la protéine est très probablement lié à des interactions avec le cytosquelette. On ne sait pas encore si c'est la protéine BTN3A1 qui va interagir directement ou bien si c'est un des partenaires moléculaires qu'elle recrute qui interagira avec le cytosquelette. Lors de diverses expériences réalisées en microscopie confocale, nous avons remarqué que la protéine BTN3A1 avait tendance à se localiser préférentiellement dans les points focaux d'adhésion de la cellule. Ces points focaux d'adhésion sont des zones de la membrane riches en protéines de type intégrine interagissant avec le cytosquelette [380].

Nous avons voulu étudier plus précisément l'interaction de la protéine BTN3A1 avec les molécules du cytosquelette présentes dans les points focaux d'adhésion. Pour cela nous avons utilisé des approches de TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) en microscopie confocale. C'est une technique de microscopie haute résolution qui permet d'étudier une tranche très fine d'un échantillon avec une très grande résolution. Nous nous sommes donc intéressé à la membrane de la cellule au contact de la lamelle car cette zone présente de nombreux points focaux. Voici un exemple de résultat obtenu.



**Figure 27 : La protéine BTN3A1 est très présente dans les zones d'adhésion de la membrane cellulaire.**

La protéine BTN3A1 est représentée en jaune, l'actine en rose et le noyau en bleu. Dans les zones d'adhésion de la cellule avec la lamelle, la protéine BTN3A1 semble être colocalisée avec l'actine.

Nous allons utiliser cette technique afin d'étudier la topologie de la molécule BTN3A1 à la surface de la cellule, et son interaction avec le cytosquelette quand elle est en présence ou en absence de PAgS. Nous allons aussi étudier l'effet des anticorps agoniste 20.1 et antagoniste 103.2 sur sa topologie à la surface de la cellule. Ces travaux sont réalisés en collaboration avec L. Dubreuil de la plateforme APEX de l'école ONIRIS (Nantes).

En parallèle à ces travaux, nous avons commencé une collaboration avec Kaushik Choudhuri (Université du Michigan, USA). C'est un spécialiste de la microscopie et en particulier de l'étude de la synapse immunologique. Il utilise un système de bicouche lipidique synthétique permettant de récréer une membrane cellulaire dans lequel on va pouvoir étudier notre protéine d'intérêt. Cela va nous permettre d'étudier le comportement de la protéine BTN3A1 et son interaction avec des partenaires dans la membrane.

### 3. Discussion

La protéine BTN3A1 joue un rôle essentiel dans l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, en particulier via son domaine B30.2 qui va être capable de fixer les PAgS. Au cours de ces travaux, nous avons pu étudier la contribution des autres domaines de BTN3A1 dans cette activation. Par des approches de délétion et d'échange de domaines, l'importance des domaines extracellulaires IgV et IgC, et des régions transmembranaire et juxtamembranaire a pu être définie. Les domaines IgV et IgC semblent jouer un rôle essentiel dans l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. En effet, si ils sont supprimés ou remplacés par le domaine équivalent de la protéine B7.1 (de structure homologue), la cellule n'est plus reconnue par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en présence de PAgS. À l'inverse, l'induction de changements dans la région transmembranaire de la protéine BTN3A1 n'a aucun effet sur l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. De manière surprenante, nous avons pu observer un effet activateur de la région juxtamembranaire de BTN3A3. Lorsque l'on transfère le domaine B30.2 de BTN3A1 dans l'isoforme BTN3A3, cela lui confère la capacité de fixer les PAgS et d'activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Cependant la réponse induite chez les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 est largement supérieure à celle due à l'isoforme BTN3A1. Cette augmentation de la réponse des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 est liée à la présence de cette région juxtamembranaire (JTM) A3. Si on transfère cette région dans l'isoforme A1, celle-ci devient elle aussi capable d'activer plus fortement les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. En étudiant plus précisément cette région, nous avons observé que cette fonction activatrice était portée par les box b1 et b3 de ce domaine. Ces deux formes BTN3A3-B30.2A1 et BTN3A1-JTMA3 sont capables d'activer légèrement les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 même en absence de PAgS, laissant supposer une légère autoréactivité de ces formes. Cette autoréactivité peut être inhibée par ajout de statines, indiquant qu'elle est donc liée à la présence de PAgS. Nous avons donc supposé que la région juxtamembranaire de BTN3A1 avait une activité régulatrice. En effet les PAgS endogènes comme l'IPP sont des composés naturels toujours présents dans les cellules, tout comme la molécule BTN3A1. Il existe donc probablement un seuil minimum de concentration de PAgS à atteindre pour déclencher une activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. La région juxtamembranaire de BTN3A1 pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par les PAgS en permettant la mise en place de ce seuil. La région juxtamembranaire de BTN3A3 n'étant pas capable d'effectuer cette régulation, elle déclenche donc une légère activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 même à des taux physiologiques de PAgS. Nous savons

désormais que les domaines IgV et IgC, ainsi que la région juxtamembranaire de BTN3A1 ont un impact dans l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par les PAgS. Mais leurs rôles précis restent encore à définir. Il paraîtrait intéressant de définir plus précisément les zones des domaines IgV et IgC liées à l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, via des échanges de zones beaucoup plus petites avec les protéines B7. Il conviendrait aussi d'étudier comment la région juxtamembranaire de BTN3A1 parvient à réguler le seuil de détection des PAgS dans les cellules.

Concernant les travaux sur l'étude de la dimérisation de BTN3A1, ils n'ont pas abouti à la preuve formelle de l'existence de ces dimères à la surface des cellules. Cependant, étant donné les conformations de dimère proposées par E. Adams, il est possible que certaines techniques ne fonctionnent pas (comme le FRET ou le PLA) car les parties intracellulaires se retrouvent trop proches (encombrement stérique) ou trop éloignées. De plus quasiment toutes ces expériences ont visé à étudier l'existence d'homodimère de BTN3A1. Hors les zones d'interface permettant la formation de ces dimères sont très conservées dans les trois isoformes de BTN3A [340]. Il est donc fort probable que ces dimères puissent exister sous forme hétérodimérique dans les cellules. Il conviendrait donc de répéter ces différentes expériences en s'intéressant cette fois ci aux formes hétérodimériques. Les expériences visant à étudier l'interaction de la protéine BTN3A1 avec le cytosquelette sont encore à un stade très préliminaire de mise au point et aucune information concrète n'a pu être obtenue pour l'instant. Ces résultats permettront par la suite de définir plus précisément la mobilité de la protéine BTN3A1 à la surface de la cellule, en présence ou en absence de PAgS.

## **V. Discussion**

Au commencement de cette thèse, seuls deux points étaient avérés quand à l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 : ils peuvent s'activer en présence de PAg, de façon TCR-dépendante, et cette activation nécessite l'expression de la protéine BTN3A1 à la surface de la cellule cible. De nombreuses questions restaient donc en suspend. L'action des PAg sur la protéine BTN3A1 était-elle directe ou indirecte ? Quels effets avaient-ils sur la molécule BTN3A1, certains travaux suggérant de possibles changements conformationnels de cette molécule ? La molécule BTN3A1 était-elle capable d'agir seule ou impliquait-elle d'autres partenaires moléculaires ? Qu'est-ce qui est reconnu par le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 à la surface de la cellule ? Mes travaux de thèse ont permis de répondre, de manière complète ou partielle, à certaines de ces questions.

Dans un premier temps, notre collaboration avec l'équipe de E. Adams (Université de Chicago, USA) nous a permis de mettre en évidence une fixation directe des PAg dans une poche chargée positivement du domaine B30.2 de la protéine BTN3A1. Cette fixation est dépendante de la présence d'une histidine en position 351 dans ce domaine. Celle-ci, absente dans l'isoforme BTN3A3 la rend incapable de fixer les PAg et explique donc son incapacité à activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Nous n'avons cependant pas réussi à montrer par résonance plasmonique de surface l'interaction du TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 avec la protéine BTN3A1. Ces travaux suggèrent un mode d'activation de type allostérique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, allant à l'encontre du modèle proposé par G. De Libero [116]. Notre modèle a été récemment confirmé par les travaux de C. Morita [364]. Nous n'avons pour l'instant pas de connaissances solides sur l'effet de la fixation de ces PAg sur la protéine BTN3A1. Seuls les récents travaux de A. Wiemer ont montré que cela induisait des changements conformationnels sur le domaine B30.2 et la région juxtamembranaire [261]. D'anciens travaux avaient montré que la fixation de certains anticorps anti-BTN3A pouvaient induire la phosphorylation du domaine B30.2 de la protéine BTN3A1 [326]. Il pourrait donc être intéressant d'étudier l'état de phosphorylation de ce domaine, en présence ou en absence de PAg, par des techniques d'immunoprécipitation et de western blot. Nous pourrions aussi utiliser des inhibiteurs de la phosphorylation pour étudier l'impact de celle-ci sur la reconnaissance des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Cependant ces molécules inhibitrices ayant un effet sur de nombreuses

voies de signalisation, cela peut rendre l'analyse de ces expériences difficile. La phosphorylation de ce domaine B30.2 pourrait être un signal menant aux changements de conformation et au recrutement de partenaires moléculaires.

La deuxième étape de ces travaux visait à étudier l'existence de protéines partenaires de BTN3A1. Divers travaux, dont les nôtres, ont suggéré l'existence de protéines partenaires de BTN3A1 (dont certaines spécifiques des primates) dans l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, la molécule BTN3A1 n'étant pas capable de déclencher seule cette activation dans des cellules murines. Des travaux récents de T. Herrmann ont même suggéré que certaines de ces protéines pouvaient être localisées sur le chromosome 6 [363]. Grâce à la technique du double-hybride chez la levure, nous avons pu mettre en évidence 6 protéines capables d'interagir avec le domaine intracellulaire de BTN3A1. Certaines s'avèrent être des candidates intéressantes comme la protéine Trio capable d'interagir avec le cytosquelette ou la protéine ZKSCAN4, présente sur le chromosome 6 et qui n'est pas conservée chez la souris. Leur interaction avec la protéine BTN3A1 a été confirmée en partie dans des cellules humaines par des expériences de co-immunoprécipitation avec des systèmes de surexpression de protéines taggées. La sortie récente de nouveaux anticorps efficaces contre ces protéines devrait permettre de reconfirmer ces données cette fois-ci directement sur les protéines endogènes. Nous pourrions aussi étudier l'interaction de ces protéines avec la molécule BTN3A1 *in cellulo* à la membrane par différentes techniques de microscopie. La technique de PLA serait un moyen de confirmer l'interaction de ces protéines à la surface des cellules. La technique du FLIM-FRET pourrait être envisagée afin d'étudier de manière dynamique dans des cellules vivantes l'interaction de ces protéines, en présence ou en absence de PAGs.

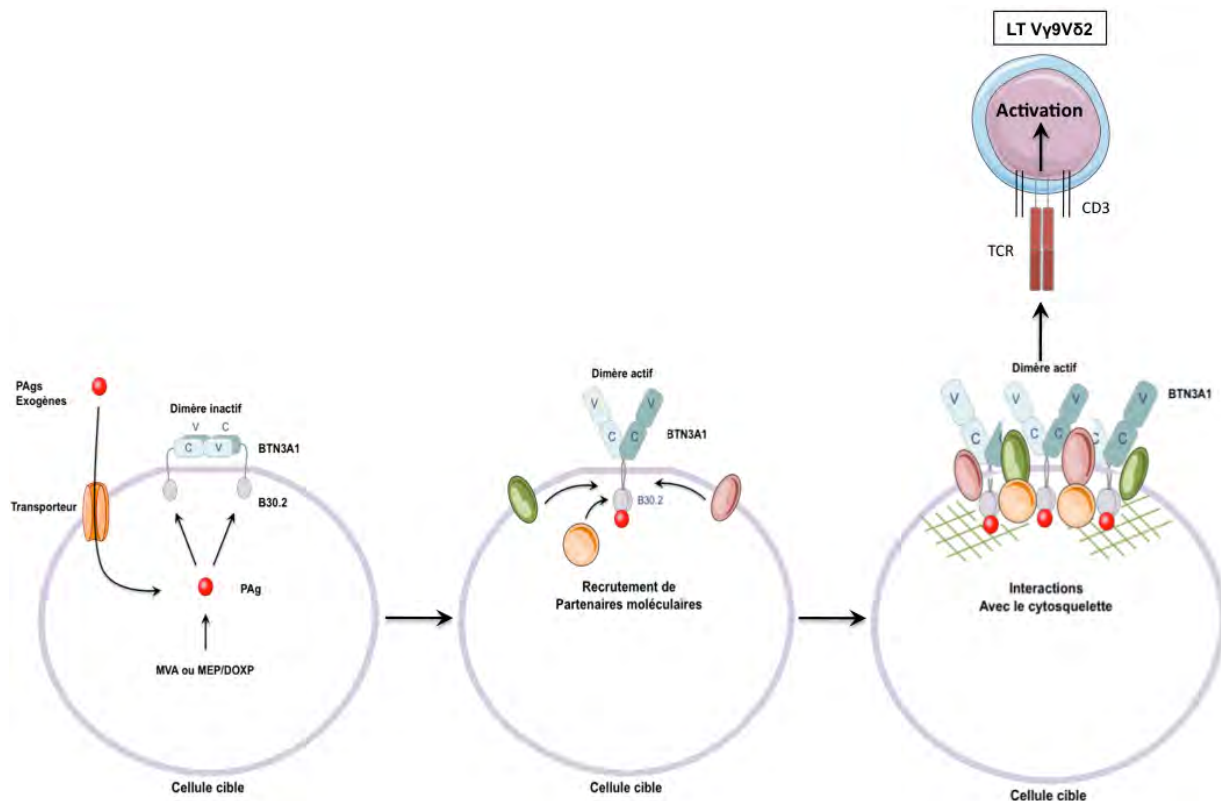
En parallèle, nous avons voulu étudier le rôle de ces protéines dans l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, via des systèmes de diminution de l'expression de ces protéines (siRNA, shRNA, KD inductible). Cependant ces diminutions d'expression n'étaient pas toujours optimales et cela a induit une grande variabilité dans l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Nous avons récemment opté pour un nouveau modèle de KO via la technique CRISPR/Cas9 dans la lignée HAP1, lignée

haploïde ou il n'y aura qu'un seul allèle à cibler. Si cette technique ne permet toujours pas d'obtenir des résultats reproductibles, nous pourrions envisager une nouvelle approche. Nous pourrions essayer de définir précisément les zones d'interaction de ces protéines avec le domaine B30.2 de BTN3A1. Nous pourrions ensuite muter cette zone sur la protéine BTN3A1 afin d'empêcher toute interaction, et regarder ensuite l'impact sur la réponse des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Des expériences réalisées dans l'équipe avaient montré qu'une forme BTN3A1 taggée GFP en partie C-terminale pouvait activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en présence d'Ac 20.1, mais n'était pas fonctionnelle en présence de PAgS. Lorsqu'un linker était rajouté entre le domaine B30.1 et la molécule de GFP, cette forme devenait alors capable d'activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en présence de PAgS. Deux hypothèses ont été émises pour expliquer l'absence d'effet de la forme BTN3A1-GFP : soit elle n'est plus capable de fixer les PAgS, soit elle ne peut plus interagir avec ses partenaires moléculaires, dans les deux cas à cause d'un encombrement stérique dû à la protéine GFP. Nous pourrions étudier par microcalorimétrie la capacité des PAgS à se fixer sur cette forme. Si cette fixation est toujours possible, cela serait un argument de plus en faveur de l'intervention de partenaires moléculaires de BTN3A1 dans l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Dans le même but, nous pourrions utiliser une forme de BTN3A1 mutée pour l'histidine 351 (et donc incapable de fixer les PAgS) pour voir si elle est toujours capable d'interagir avec les protéines partenaires. Cela pourrait donner une indication pour savoir si l'interaction de ces protéines avec BTN3A1 est liée à l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ou non.

La dernière partie de ces travaux visait à étudier la contribution des autres domaines de BTN3A1 dans l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Ils ont mis en évidence la présence nécessaire des domaines IgV et IgC dans cette activation. Ces deux domaines pourraient avoir deux rôles : soit l'interaction avec des partenaires moléculaires essentiels, soit l'interaction avec le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 via des épitopes démasqués par un changement de conformation. De plus, nous avons pu observer un très fort effet activateur induit par la région juxtamembranaire de l'isoforme BTN3A3. À l'inverse la région juxtamembranaire de BTN3A1 semble avoir un rôle dans la régulation du seuil de détection des PAgS au sein de la cellule. Il serait utile de définir précisément le mécanisme d'action utilisé par cette région pour réguler ce seuil. Il pourrait être intéressant par exemple de regarder si certaines protéines sont

capable de se fixer sur cette région dans l'isoforme A1 et pas dans l'isoforme A3 (ou inversement), de la même manière que les PAgS se fixent sur le B30.2 du A1 et pas du A3. Cela permettrait de mieux comprendre où se fixe ce seuil de détection. En parallèle à ces travaux, nous avons cherché à étudier l'état de dimérisation de la protéine BTN3A1 à la surface des cellules, ainsi que son interaction avec le cytosquelette. Concernant l'état de dimérisation, les différentes approches utilisées n'ont pour l'instant pas abouti à des résultats concluants mais il paraît nécessaire de reproduire ces expériences dans des modèles d'hétérodimères, mais aussi d'envisager des nouvelles approches. L'étude de l'interaction de BTN3A1 avec le cytosquelette a démarré récemment et n'a donc pour l'instant pas fourni de résultats probants. En parallèle de la technique de TIRF, nous pourrions utiliser la technique de FCS (Fluorescence Correlation Microscopy) en microscopie confocale. Cette technique peut nous permettre de suivre la dynamique d'une seule molécule de BTN3A1 à la surface de la cellule, et de déterminer si elle suit un mouvement de diffusion brownien ou non. L'analyse de ces données permet par extrapolation de déterminer si une molécule se diffuse dans une membrane via les radeaux lipidiques, ou le réseau de fibres du cytosquelette. Cela nous permettrait donc de définir plus précisément le comportement de la molécule BTN3A1 au sein de la membrane quand elle est en présence ou en absence de PAgS.

À la vue de ces différents résultats, je propose un modèle d'action hypothétique de la protéine BTN3A1 dans l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 induite par les PAgS, présenté dans la **Figure 28**. Certaines étapes de ce modèle ont déjà été prouvées. D'autres sont des hypothèses formulées à l'aide de différentes observations et restant donc à démontrer.



**Figure 28 : modèle hypothétique du mode d'action de la protéine BTN3A1 lors de l'activation antigénique des LT Vγ9Vδ2 induite par les PAg.**

Dans un premier temps les PAg vont s'accumuler en intracellulaire. Ils proviennent soit de la voie MVA endogène (cellules tumorales), soit de la voie MEP/DOXP des microorganismes (cellules infectées). Les PAg exogènes vont être importés dans la cellule par un transporteur membranaire non identifié. La protéine BTN3A1 est sous forme de dimère inactif. Les PAg vont se fixer sur les domaines intracellulaires B30.2 du dimère. Cela va induire un changement de conformation du dimère qui va passer en forme active. Ce dimère actif va recruter des partenaires moléculaires. Ce complexe va interagir avec le cytosquelette afin de s'immobiliser à la surface de la cellule pour stabiliser l'interaction avec le TCR Vγ9Vδ2. La reconnaissance d'une des protéines de ce complexe par le TCR va induire l'activation antigénique du LT Vγ9Vδ2.

Dans ce modèle, dans des conditions physiologiques les protéines BTN3A1 seraient présentes sous forme de dimère inactif à la surface des cellules. L'existence de cette conformation de dimère a été observée par cristallographie [340]. Ils n'ont par contre pas été retrouvés en solution avec les domaines extracellulaires recombinants de la protéine BTN3A1. Cela peut sans doute être expliqué par l'absence de partie intracellulaire. Ce dimère nécessite peut-être l'aide de la membrane, des domaines juxtamembranaires et B30.2 ou bien l'interaction avec des partenaires moléculaires afin d'être stabilisé à la surface de la cellule. Lorsque le taux de PAg est suffisamment bas (conditions physiologiques), la protéine BTN3A1 reste sous cette conformation inactive à la surface des cellules. Quand la cellule subit un stress infectieux ou tumoral, les PAg vont s'accumuler à l'intérieur de la cellule. Ils vont provenir soit de la voie endogène des mévalonates (pour le stress tumoral), soit de la voie des microorganismes MEP/DOXP (pour le stress infectieux).

Le mécanisme d'action des PAgS exogènes n'est pas encore élucidé. Il y a deux hypothèses possibles du mécanisme d'action des PAgS exogènes : ils vont soit être importés dans la cellule via des transporteurs membranaires non identifiés, soit agir sur les PAgS intracellulaires ou leurs voies métaboliques de manière extracellulaire. Ces PAgS vont ensuite se fixer dans la poche chargée positivement située sur le domaine B30.2 de la protéine BTN3A1. Cette fixation des PAgS va induire deux événements : le changement de conformation de la protéine BTN3A1 et le recrutement de partenaires moléculaires. Ces deux événements hypothétiques sont basés sur diverses observations mais restent encore à démontrer clairement. On ne connaît pas encore leur séquentialité mais d'après les récents travaux de A. Wiemer où ils ont observé que la fixation des PAgS sur BTN3A1 induit de profonds changements conformationnels des régions B30.2 et juxtamembranaire, on peut supposer que les changements conformationnels arrivent en premier car leurs expériences ont été réalisées en absence d'autres protéines [261]. Dans ce modèle hypothétique, les changements conformationnels pourraient induire la formation d'un dimère actif semblable à celui décrit par E. Adams en cristallographie [340]. Le recrutement de partenaires moléculaires impliquerait des molécules membranaires ou intracellulaires, protéiques ou non, et dont certaines seraient spécifiques des primates. L'interaction de ces molécules avec BTN3A1 formerait un complexe dont certains partenaires seraient capables d'interagir avec le cytosquelette. Cette interaction permettrait de ralentir la mobilité du complexe à la surface de la cellule pour aider à la reconnaissance par le LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 et stabiliser l'interaction avec le TCR. Le ralentissement membranaire de la protéine BTN3A1 induit par les PAgS à la surface des cellules a déjà été démontré plusieurs fois par des expériences de FRAP mais on ne sait pas encore si ce mécanisme est effectivement lié au cytosquelette [117, 118]. C'est la reconnaissance d'une ou plusieurs des protéines de ce complexe par le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 qui va induire l'activation antigénique du LT. Ce modèle hypothétique se base sur la présence de dimère de BTN3A1 à la surface de la cellule cible, mais le même modèle pourrait être envisagé avec des monomères de BTN3A1, l'équipe de E. Adams ayant observé des changements de conformations sur des monomères de BTN3A1 après fixation de l'anticorps 20.1 [340]. Concernant le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, on ne sait pas encore ce qu'il reconnaît. Cela pourrait être une de partenaires moléculaires de BTN3A1, ou bien directement un dimère ou un monomère de BTN3A1 dont le site de reconnaissance serait démasqué par le

changement de conformation. On peut même envisager qu'il reconnaisse l'association de deux molécules.

D'autres modèles hypothétiques d'action de la protéine BTN3A1 peuvent être envisagés. La protéine BTN3A1 pourrait par exemple exécuter un mouvement de flip-flop comme le font certains phospholipides de la membrane afin d'inverser son sens. Cela lui permettrait d'avoir sa partie N-terminale en intracellulaire et sa partie C-terminale en extracellulaire. Le domaine B30.2 serait alors capable de présenter le PAg fixé dans sa poche au TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Dans ce système, la protéine BTN3A1 fonctionnerait donc comme une vraie molécule de présentation et les PAGs seraient considérés comme de réels antigènes du TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Un autre modèle est aussi envisagé et il se base sur des hétérodimères des protéines BTN3A. En effet la protéine BTN3A1 a deux autres isoformes dont on ne connaît pas encore l'utilité. A2 et A3 pourraient elles aussi former des dimères car les zones d'interface sont conservées entre ces trois protéines [340]. Les trois isoformes pourraient alors former divers hétérodimères dont certains seraient activateurs et d'autres neutres ou inhibiteurs. La présence de PAGs favoriserait la formation des hétérodimères activateurs par rapport aux autres. Cette hypothèse est soutenue par les données de certaines équipes comme celles de D. Rhodes qui ont montré que les isoformes A2 et A3 étaient elles aussi nécessaires pour l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 [379]. Ces données sont cependant contradictoires avec celles que nous avons obtenus dans nos lignées KD pour BTN3A, où la réintroduction seule de BTN3A1 était suffisante pour déclencher une réponse efficace du LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 [117]. Les différentes expériences suggérées au long de cette discussion pourraient permettre de pencher vers un modèle plutôt qu'un autre. À long terme, la réponse à ces questions et l'élucidation du mécanisme d'action de BTN3A1 permettra de mieux comprendre le fonctionnement des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Une meilleure connaissance de leurs conditions activatrices permettra d'améliorer leur utilisation en clinique lors d'essais immunothérapeutiques et de lutter plus efficacement contre les phénomènes d'anergie.

## **VI. Annexes**

## Article 1

# Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human $\gamma\delta$ T-cell subset

\*Christelle Harly,<sup>1-3</sup> \*Yves Guillaume,<sup>4</sup> Steven Nedellec,<sup>1-3</sup> Cassie-Marie Peigné,<sup>1-3</sup> Hannu Mönkkönen,<sup>5</sup> Jukka Mönkkönen,<sup>5</sup> Jianqiang Li,<sup>6</sup> Jürgen Kuball,<sup>7</sup> Erin J. Adams,<sup>8</sup> Sonia Netzer,<sup>9</sup> Julie Déchanet-Merville,<sup>9</sup> Alexandra Léger,<sup>1-3</sup> Thomas Herrmann,<sup>6</sup> Richard Breathnach,<sup>1-3</sup> †Daniel Olive,<sup>4</sup> †Marc Bonneville,<sup>1-3</sup> and †Emmanuel Scotet<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Inserm, U892, F-44000, Nantes, France; <sup>2</sup>Université Nantes, F-44000, Nantes, France; <sup>3</sup>Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche (UMR) 6299, F-44000, Nantes, France; <sup>4</sup>Inserm UMR 891, Centre de Recherche en Cancérologie Marseille, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France; <sup>5</sup>School of Pharmacy, University of Eastern Finland, Kuopio, Finland; <sup>6</sup>Institute for Virology and Immunobiology, Julius Maximilians University, Würzburg, Germany; <sup>7</sup>Department of Hematology and Department of Immunology, University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands; <sup>8</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Chicago, Chicago, IL; and <sup>9</sup>UMR CNRS 5164, Université Bordeaux 2, Bordeaux, France

Human peripheral V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells are activated by phosphorylated metabolites (phosphoagonists [PAG]) of the mammalian mevalonate or the microbial desoxyxylulose-phosphate pathways accumulated by infected or metabolically distressed cells. The underlying mechanisms are unknown. We show that treatment of nonsusceptible target cells with antibody 20.1 against CD277, a member of the extended B7 superfamily related to butyrophilin, mimics PAG-induced V $\gamma$ 9V $\delta$ 2

T-cell activation and that the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell receptor is implicated in this effect. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell activation can be abrogated by exposing susceptible cells (tumor and mycobacteria-infected cells, or aminobisphosphonate-treated cells with up-regulated PAG levels) to antibody 103.2 against CD277. CD277 knockdown and domain-shuffling approaches confirm the key implication of the CD277 isoform BTN3A1 in PAG sensing by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. Fluorescence recovery after photobleach-

ing (FRAP) experiments support a causal link between intracellular PAG accumulation, decreased BTN3A1 membrane mobility, and ensuing V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell activation. This study demonstrates a novel role played by B7-like molecules in human  $\gamma\delta$  T-cell antigenic activation and paves the way for new strategies to improve the efficiency of immunotherapies using V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. (*Blood*. 2012;120(11):2269-2279)

## Introduction

$\gamma\delta$  T cells are key players in the immune surveillance of cellular distress, thanks to their ability to recognize conserved determinants up-regulated after inflammation, infection, or cell transformation.<sup>1,2</sup> Although  $\gamma\delta$  T-cell receptors (TCRs) contribute to detection of danger-associated determinants, ligands for these receptors have been identified in a few cases only.<sup>3</sup> Thus, the antigenic specificity of  $\gamma\delta$  T cells and their fine activation modalities in response to cell stress remain largely unknown.

One of the best studied  $\gamma\delta$  T-cell subsets in humans expresses V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR and predominates in blood, composing several percent of the whole peripheral lymphoid pool in most adults. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells are activated by nonpeptidic phosphorylated isoprenoid pathway metabolites,<sup>4,6</sup> hereafter referred to as phosphoagonists (PAG). Natural V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-stimulating PAG include isopentenyl pyrophosphate (IPP),<sup>7</sup> a metabolite of the mevalonate pathway found in mammalian cells and the desoxyxylulose phosphate pathway shared by many microorganisms, and hydroxy-methyl-butyl-pyrophosphate,<sup>8</sup> an intermediate of the latter pathway. PAG detection by  $\gamma\delta$  T cells underlies their broad reactivity toward infected and transformed cells. Indeed, tumor cell recognition by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells is linked to enhanced production of the weak agonist IPP, resulting from increased cell metabolism and cholesterol biosynthesis. Accordingly, pharmacologic inhibitors of the mevalonate pathway that up-regulate (eg, aminobisphosphonates, NBP) or

down-regulate (eg, statins) IPP production, respectively, increase or decrease antitumor V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell responses.<sup>9,10</sup> Moreover, because of the high V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell-stimulating activity of the microbial agonist hydroxy-methyl-butyl-pyrophosphate, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell responses are elicited by infected cells producing even traces of this PAG.<sup>8</sup>

Although PAG-induced activation is restricted to V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells and can be conferred by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR gene transfer,<sup>11,12</sup> attempts to detect cognate interactions between PAG and V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR have failed so far.<sup>13</sup> So how V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells sense PAG remains an enigma. PAG rapidly induce Ca<sup>2+</sup> signaling and activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell clones, but this requires cell-to-cell contact, suggesting the implication of additional target cell surface receptors in this phenomenon.<sup>11,14</sup> PAG elicit V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell responses against basically all human cells, irrespective of their tissue origin, but do not induce recognition of any murine target cells. Therefore, the putative target cell receptors involved in PAG-mediated T-cell activation are expected to be broadly expressed by human, but not murine, cells.

Activation of antigen-stimulated T cells is tuned by interactions involving T cell-derived CD28-related receptors and target cell-derived B7-related counter-receptors,<sup>15</sup> which family includes members, such as Skint and butyrophilin (BTN) receptors. The mandatory role played by Skint-1 in the intrathymic positive

Submitted May 15, 2012; accepted June 27, 2012. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, July 5, 2012; DOI 10.1182/blood-2012-05-430470.

\*C.H. and Y.G. contributed equally to this study.

†D.O., M.B., and E.S. are co-senior authors.

There is an Inside *Blood* commentary on this article in this issue.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2012 by The American Society of Hematology

selection and functional maturation of the murine intraepidermal V $\gamma$ 5V $\delta$ 1 T-cell subset raises questions about the general role played by Skint1-related receptors in the selection and activation of  $\gamma\delta$  T cells in mice and other species.<sup>16-19</sup> Although there are 10 intact *skint1* paralogs in the mouse, the only human *skint1* ortholog is a pseudogene. The human proteins with the greatest similarity to the extracellular domain of murine Skint-1 are the BTNs. BTNs are type I membrane proteins with 2 extracellular Ig domains frequently linked to an intracellular B30.2 (PRY/SPRY) domain, and encompass 3 gene subfamilies in humans: *btn1*, *btn2*, and *btn3*. Some BTN receptors exert nonimmunologic functions (eg, milk fat globule formation for BTN1A1). Others, in line with their homology with several B7-related coinhibitory receptors, can up- or down-modulate TCR-induced T-cell activation and contribute to dampening of inflammatory responses.<sup>17,20,21</sup> This can result from either direct engagement of BTN receptors expressed on responding T cells by target cell ligands, or interactions involving target cell BTN molecules and responding T cell-derived ligands.<sup>22-25</sup>

In this study, we provide evidence that ubiquitous human CD277/BTN3A plays a key role in PAg-induced activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells in both tumor and infectious contexts and that CD277-dependent activation is conferred by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR. Our results suggest that intracellular PAg accumulation is associated with membrane reorganization of CD277 molecules, which in turn leads to V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell activation, and bring new insights into the mechanisms linking metabolic and infectious distress and human  $\gamma\delta$  T-cell activation. We also describe agonist and blocking CD277-specific antibodies that could be used for the immunotherapeutic modulation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell responses toward tumor or infected cells.

## Methods

### Monoclonal antibodies and reagents

The following monoclonal antibodies were from Beckman Coulter: phycoerythrin–cyanin 5.1–anti-TCR $\gamma\delta$  (#IMMU510) and anti-CD69 (#TP1.55.3), FITC–anti-V $\delta$ 2 (#IMMU389), phycoerythrin–cyanin 7– and purified anti-CD3 $\epsilon$  (#UCHT1). The following monoclonal antibodies were from BD Biosciences: mouse IgG1, allophycocyanin–TCR $\gamma\delta$  (#B1), allophycocyanin–H7 (analog of cyanin 7)–anti-CD3 (#SK7), FITC- or phycoerythrin–cyanin 5.1–CD107a (#H4A3), anti-CD107b (#H4B4). Fluorescein isothiocyanate- or phycoerythrin–anti-IFN- $\gamma$  (#B27) and phycoerythrin- or allophycocyanin–anti-TNF- $\alpha$  (MAB11) were used for intracellular stainings. Purified anti-CD3 (#OKT3) was kindly provided by H. Vié (Inserm U892, Nantes, France). Alexa-647–labeled goat anti-mouse IgG and anti-IgG1 were from Invitrogen. Mouse anti-CD277 mAbs (clones 7.2, 20.1, and 103.2) were generated, produced, and purified as described.<sup>26</sup> Synthetic bromohydrin pyrophosphate (BrHPP) was kindly provided by Innate Pharma. Pamidronate was obtained from Mayne Pharma. Monensin A, phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), ionomycin, leucoagglutinin, mevastatin, and sec-butylamine were purchased from Sigma-Aldrich. Guinea pig myelin basic protein was kindly provided by R. Dörries (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Mannheim, Germany). Live/Dead, Lipofectamine, and hygromycin were from Invitrogen. Recombinant human IL-2 (rhIL-2) was from Chiron Therapeutics. Green fluorescent protein strain of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (GFP-BCG) was provided by F. Altare (Inserm U892, Nantes, France).

### Cells

PBMCs of human healthy donors were isolated from blood samples obtained from the Etablissement Français du Sang. Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 (clone GR4, polyclonal lines GUI and AL), V $\gamma$ 8V $\delta$ 3 (clone 73R9), iNKT

(polyclonal line MAD11), and  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> (HCV-1/A2–restricted clone 13) T cells were cultured in complete RPMI 1640 medium (10% FCS, 2mM L-glutamine, 10  $\mu$ g/mL streptomycin, 100 IU/mL penicillin, and 300 IU/mL rhIL-2) as described.<sup>35</sup> Human polyclonal  $\alpha\beta$  T cells expressing the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 G115 TCR after retroviral transduction were generated as described.<sup>27</sup> Human Jurkat T cells (J.RT3-T3.5,  $\beta$ -chain-deficient variant) expressing either V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 (from clone G115) or V $\gamma$ 8V $\delta$ 3 (from clone 73R9) TCR were generated as described.<sup>28</sup> 58C-CD28<sup>+</sup> are  $\alpha\beta$  TCR<sup>+</sup> 58C mouse T hybridoma cells transduced for rat/mouse CD28 expression.<sup>29,30</sup> 53/4-CD28 cells are 53/4 cells (a sister clone of the rat/mouse T-cell hybridoma 35/2), which express a rat  $\alpha\beta$  TCR recognizing a guinea pig MBP<sub>68-88</sub> peptide restricted to RT1B<sup>1</sup> (rat MHC class II) and are also transduced for rat/mouse CD28 expression.<sup>29</sup> The 2A $\gamma\delta$  TCR MOP is a 2A peptide-linked V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR cloned into either pczCFG5IEGN- or pczCFG5IH MuLV-based retroviral expression vectors<sup>31</sup> and transduced into either 58C-CD28<sup>+</sup> or in 53/4-CD28<sup>+</sup> T-cell hybridomas. RajiRT1B<sup>1</sup> are Raji cells transduced with RT1B<sup>1</sup>.<sup>30</sup> The following human cell lines were kept in complete RPMI 1640 or DMEM: Epstein-Barr virus<sup>+</sup> and 721.221 B-lymphoblastoid cell lines; C91 T2.2 (T-cell leukemia); Daudi and Raji (Burkitt lymphoma); RPMI 8226 (myeloma); THP-1 (acute monocytic leukemia); HeLa (cervix adenocarcinoma); SVK14 (simian virus-40-transformed keratinocytes); HEK293FT (embryonic kidney); Med (breast cancer); MG63, HOS, and U2OS (osteosarcoma), provided by D. Heymann (Inserm U957, Nantes, France); PC3 (prostate cancer); HMEC-1 (endothelial cells), provided by F. Paris (Inserm U892, Nantes, France); M88 and M6 (melanoma) provided by N. Labarrière (Inserm U892, Nantes, France); and meso 45, meso 152 and meso 134 (mesothelioma), provided by M. Grégoire (Inserm U892, Nantes, France).

### Functional assays

Target cells were pretreated for the indicated time periods with either CD277-specific mAbs or NBP (pamidronate) at the indicated concentrations. Treated target cells were extensively washed and cocultured together with effector T cells at 37°C in complete RPMI 1640 medium. T cells were also activated by either soluble PAg (BrHPP), at the indicated concentrations, or PMA and ionomycin (used, respectively, at 1  $\mu$ M and 0.5  $\mu$ g/mL). T cells were activated at 37°C in the presence of 10  $\mu$ M monensin and fluorochrome-labeled CD107a- and CD107b-specific mAbs, used alone or in combination. After 4 hours, T cells were harvested and stained with fluorochrome-labeled TCR-specific mAbs and a viability marker (Live/Dead cell marker, 0.3  $\mu$ M). When indicated, intracellular stainings of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  were performed within the same samples. Surface expression of CD69 was measured by flow cytometry after activation for either 4 hours (Jurkat) or 7 hours (PBMCs) at 37°C in complete RPMI 1640 medium. Data were collected on FACSCantoII, LSR or FACS Calibur cytometers (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software Version 7 (TreeStar). TNF- $\alpha$  concentration was assessed by a biologic assay based on WEHI164 clone 13 cell viability as described.<sup>32</sup> ELISpot for IFN- $\gamma$  was performed as described.<sup>27</sup> When indicated, the cytolytic activity of human  $\gamma\delta$  T cells was also measured in standard 4-hour <sup>51</sup>Cr release assays. Stimulation of 2A $\gamma\delta$  TCR MOP<sup>+</sup> 58C-CD28 or 2A $\gamma\delta$  TCR MOP<sup>+</sup> 53/4-CD28 murine hybridoma cells was performed similarly as previously described.<sup>30,31</sup>

### Expression and knockdown of BTN3 isoforms in HEK293FT cells

See supplemental Methods (available on the Blood Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article).

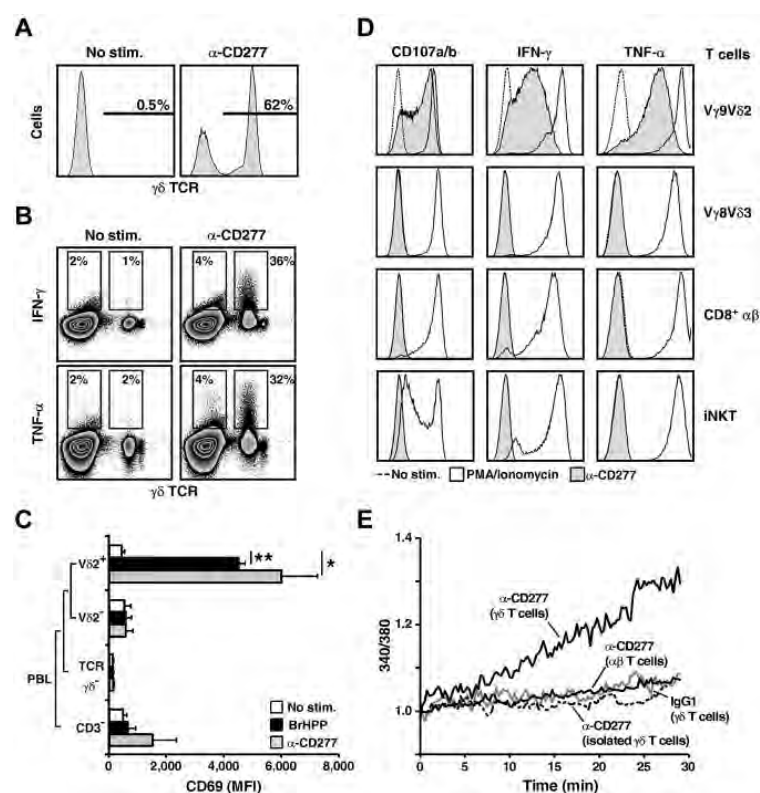
### Microscopy

See supplemental Methods.

### Statistical analysis

The statistical significance of differences between populations was assessed with 2-tailed Student *t*, 2-way ANOVA, or Mann-Whitney tests. *P* values less than .05 were considered significant.

**Figure 1. Broad activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells by anti-CD277 mAbs.** (A) Frequency of human  $\gamma\delta$  T cells in IL-2-supplemented ex vivo PBMCs after a 2 week-incubation in the presence of anti-CD277 mAb (#20.1; 10  $\mu$ g/mL). The values for the percentage of  $\gamma\delta$  T cells within PBLs are indicated. No stim. indicates no stimulation. (B) Intracellular stainings of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in ex vivo human PBL- $\gamma\delta$  T cells after incubation for 5 hours with anti-CD277 mAb (#20.1; 10  $\mu$ g/mL). Numbers inside or adjacent to outlined areas indicate the values for the percentage of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (top row) or TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> (bottom row) cells within  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> and  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> PBL subsets. (C) Expression of CD69 on ex vivo human PBL subsets after incubation for 7 hours with either anti-CD277 mAb (#20.1; 10  $\mu$ g/mL) or soluble PAg (BrHPP; 3  $\mu$ M). MFI indicates geometric mean of fluorescence intensity. Data in graph are mean  $\pm$  SD (n = 3 healthy donors). \**P* < .05 (Student *t* test). \*\**P* < .005 (Student *t* test). (D) Stainings of CD107a/b (left), IFN- $\gamma$  (middle), and TNF- $\alpha$  (right) of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 (clone GR4), V $\gamma$ 8V $\delta$ 3 (clone 73R9), CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  (clone 13), and invariant NK (iNKT, line MAD11) human T cells after treatment with anti-CD277 mAb (#20.1; 10  $\mu$ g/mL, 5 hours). PMA/Iono. indicates nonspecific activation induced by PMA and ionomycin. (A–D) Data are representative of at least 3 experiments. (E) Intracellular Ca<sup>2+</sup> levels were measured by videomicroscopy within clusters of Fura-2 AM-loaded polyclonal human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ( $\gamma\delta$ ) T-cell lines after addition (t = 0 minutes) of anti-CD277 mAb (#20.1; 10  $\mu$ g/mL) and compared with CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  (αβ) or isolated  $\gamma\delta$  T cells. IgG1 indicates isotype control. Values correspond to the mean of emissions (340/380 nm ratio) measured among all T cells present in the field.  $\gamma\delta$ , n = 70; αβ, n = 30; isolated  $\gamma\delta$ , n = 30; and IgG1, n = 30.



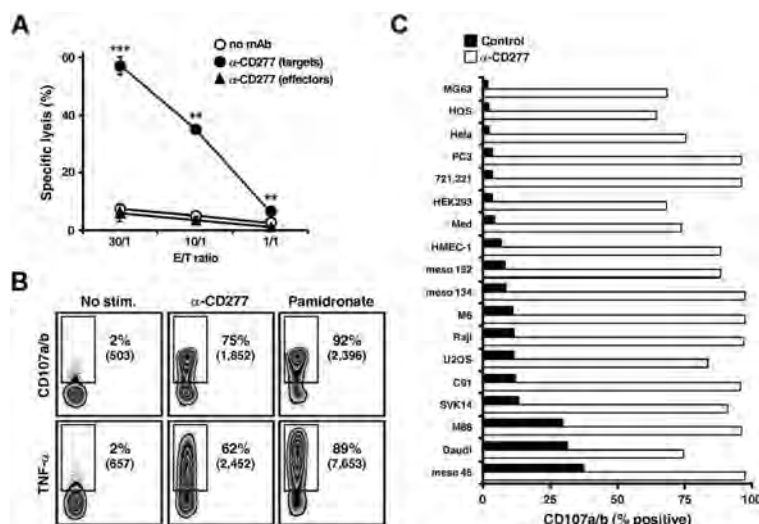
## Results

### Broad activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells by anti-CD277 antibodies

While screening mouse mAbs raised against isoforms of the human BTN3 (CD277) subfamily,<sup>26</sup> we noticed that 1 mAb (clone 20.1) elicited dramatic expansion and proliferation of  $\gamma\delta$  T cells in IL-2-supplemented PBMC cultures (Figure 1A; supplemental Figure 1A). Accordingly, soluble 20.1 mAb induced: ex vivo production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  by  $\gamma\delta$  T cells (Figure 1B), rapid CD69 up-regulation and IFN- $\gamma$  production by most V $\delta$ 2<sup>+</sup>- $\gamma\delta$  PBL ex vivo (Figure 1C; supplemental Figure 1B), and degranulation and cytokine responses of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell clones specifically (Figure 1D; data not shown). In agreement with recent studies,<sup>23,25</sup> soluble 20.1 mAb had no stimulatory effect on  $\alpha\beta$  T cells. Moreover, it had no effect on V $\delta$ 2<sup>+</sup>- $\gamma\delta$  PBL (Figure 1C) or T-cell clones (Figure 1D). Early activation events induced in V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells by 20.1 mAb were studied by videomicroscopy. Although 20.1 mAb had no effect on the intracellular Ca<sup>2+</sup> levels of  $\alpha\beta$  T cells, it induced a progressive increase of Ca<sup>2+</sup> signaling in V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell clones, which became significant as of 10 minutes after mAb addition (Figure 1E). This unusual Ca<sup>2+</sup> signaling pattern, in stark contrast with the sharp increase of Ca<sup>2+</sup> signals induced after  $\gamma\delta$  or  $\alpha\beta$  TCR crosslinking by anti-CD3 mAb, or after antigenic stimulation of  $\alpha\beta$  T cells, is similar to the delayed and progressive increase of Ca<sup>2+</sup> signals previously described for V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells stimulated by PAg.<sup>33</sup>

### Agonist anti-CD277 antibodies sensitize CD277<sup>+</sup> target cells to V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell recognition

When immobilized onto plastic, anti-CD277 mAbs can induce costimulatory signals in TCR-stimulated  $\alpha\beta$  T cells, through direct engagement of CD277 molecules.<sup>23,25</sup> They can also modulate T-cell costimulatory or coinhibitory signals through interactions with target cell-expressed CD277.<sup>24,34</sup> Thus, although anti-CD277 mAb readily induced V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell activation in the absence of third-party cells, this could be the result of either a "direct" or "cis" effect of the Ab (CD277-induced signaling in responder V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells) or an "indirect" or "trans" effect (enhanced reactivity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells toward anti-CD277-coated T cells). Two observations argue against a direct effect of the 20.1 mAb: mAb immobilized on FcRI<sup>+</sup> murine P815 cells fails to activate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (supplemental Figure 2) and mAb-treated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells maintained in the absence of cell-to-cell contacts do not become activated (Figure 1E). Evidence for an indirect effect was obtained by comparing the effect of 20.1 mAb pretreatment of either effector or target cells in cytotoxicity assays. Pretreatment of the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-resistant Raji lymphoma target cells with the 20.1 mAb (and other anti-CD277 mAbs, such as the clone 7.2) enhanced tumor cell killing by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, whereas pretreatment of effector V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell lines had no such effect (Figure 2A; supplemental Figure 3A). Importantly, the lack of effect of effector cell pretreatment with 20.1 mAb on target lysis remained compatible with the ability of this mAb to readily activate effector cells alone (Figure 1). Indeed, because target, but not effector, cells were <sup>51</sup>Cr-labeled, this did not allow assessment of effector cell fratricide, degranulation,



**Figure 2. Anti-CD277 mAb induces strong Vγ9Vδ2 T cell cytolytic and cytokine responses.** (A) Cytolytic activity of human Vγ9Vδ2 T cells (clone GR4) against Raji Burkitt lymphoma cells. Raji (targets) or Vγ9Vδ2 T (effectors) cells were treated for 2 hours with anti-CD277 mAb (#20.1; 10 μg/mL), washed, and cocultured at the indicated γδ T cell-to-target (E:T) ratios. Data are mean ± SD of triplicate measurements. \*\**P* < .005. \*\*\**P* < .0005. (B) Stainings of CD107a/b (top row; surface) and IFN-γ (bottom row; intracellular) of Vγ9Vδ2 T cells (clone GR4) after coculture with Raji cells, pretreated for 2 hours with either anti-CD277 mAb (#20.1; 10 μg/mL) or NBP (pamidronate; 250 μM). Numbers adjacent to outlined areas indicate percent and geometric mean of fluorescence intensity (numbers in brackets) of CD107a/b<sup>+</sup> and TNF-α<sup>+</sup> T cells. (C) Expression of CD107a/b on Vγ9Vδ2 T cells (clone GR4) after coculture with human tumor/transformed cell lines (*n* = 18), pretreated for 2 hours with anti-CD277 mAb (#20.1; 10 μg/mL). The values for the percentage of CD107a/b<sup>+</sup> Vγ9Vδ2 T cells are represented in the graph. Control indicates no antibody. Data are representative of at least 3 independent experiments.

or cytokines responses, which are presumably induced on effector cell preincubation. Raji target cell preincubation with 20.1 mAb also induced Vγ9Vδ2 T-cell degranulation and TNF-α cytokine response to levels reached after target cell pretreatment with NBP (Figure 2B). In line with the lack of effect of 20.1 mAb on αβ T-cell proliferation or cytokine responses, this mAb did not enhance the cytolytic response of human CD8<sup>+</sup> αβ cytotoxic T-cell clones toward Ag-loaded target cells pretreated with anti-CD277 mAb (data not shown). Taken together, these results indicate that anti-CD277 mAbs act indirectly (ie, through sensitization of human CD277<sup>+</sup> target cells to Vγ9Vδ2 T-cell recognition). Importantly, enhancement of Vγ9Vδ2 T-cell responses by 20.1 mAb also occurs for a wide array of CD277<sup>+</sup> human cell lines, irrespective of their tissue origin and basal susceptibility to Vγ9Vδ2 T-cell recognition (Figure 2C; supplemental Figure 3B). This effect was not the result of mAb-redirection killing or mAb-dependent cell cytotoxicity, as it did not depend on CD16, CD32, or CD64 Fc-receptors expression on target or effector cells (supplemental Figure 3C).

#### Implication of the Vγ9Vδ2 TCR in anti-CD277 mAb-induced activation

The broad stimulatory effects of anti-CD277 mAbs are limited to Vγ9Vδ2 T cells, which suggests involvement of the Vγ9Vδ2 TCR. 20.1 mAb-treatment induced co-recruitment of target cell-derived CD277 and effector cell-derived CD3 molecules at the target/γδ T cell interface, as shown by a confocal microscopy study (Figure 3A). To assess the Vγ9Vδ2 TCR dependency of this activation more directly, we studied the responses of human and mouse T-cell lines transduced with human γδ TCRs. Unlike their nontransduced or Vγ8Vδ3<sup>+</sup> counterparts,<sup>28</sup> Vγ9Vδ2<sup>+</sup> human Jurkat T lymphoma cells were readily activated by 20.1 mAb (Figure 3B). Similarly, Vγ9Vδ2 TCR gene transfer into nontransformed human CD4<sup>+</sup> αβ T cells<sup>27</sup> conferred T-cell responsiveness to 20.1 mAb- and NBP-pretreated human target cells (Figure 3C). We also tested the reactivity of murine T-cell hybridomas transduced with a human Vγ9Vδ2 TCR derived from a PAg-reactive γδ T-cell clone. Human Raji cells treated with 20.1 mAb, but not cells treated with control IgG, triggered IL-2 responses of both Vγ9Vδ2 TCR murine transductants (Figure 3D-E). Control αβ TCR-

expressing cells did not respond to Raji cells, whether mAb treated or not (not shown). We conclude that Vγ9Vδ2 TCR expression is necessary for recognition of anti-CD277 mAb-treated target cells. Moreover, recognition of 20.1 mAb-treated cells by murine Vγ9Vδ2 transductants, which are CD277<sup>-</sup>, formally rules out a direct effect of 20.1 mAb on Vγ9Vδ2 T-cell activation.

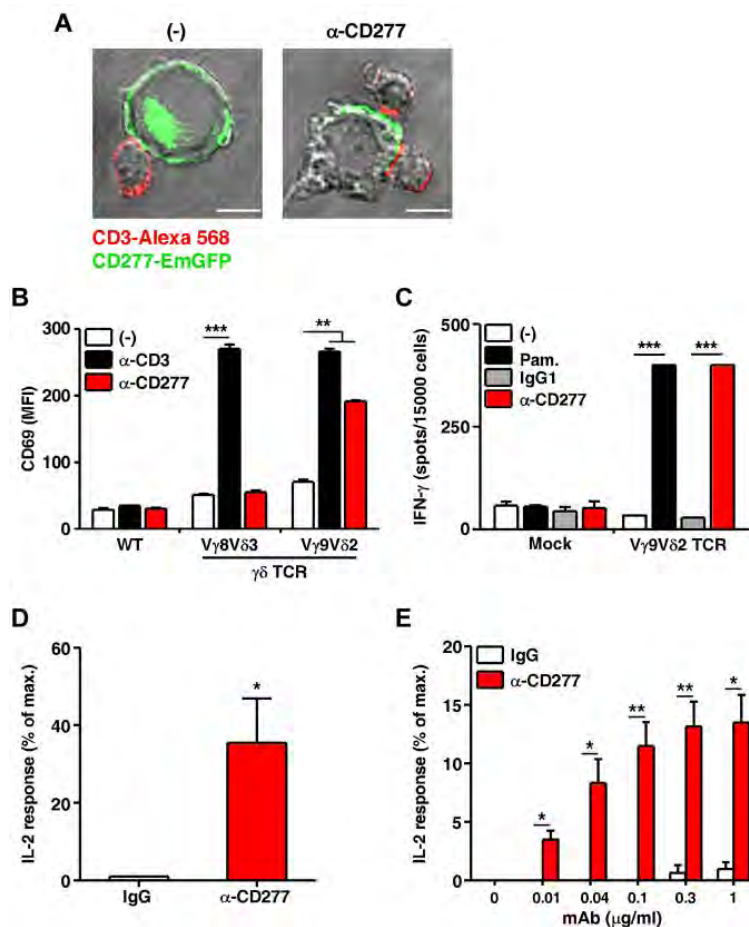
Although PAg-reactive Vγ9Vδ2 T cells express TCR with extensive junctional diversity, they share several highly conserved junctional motifs, such as small hydrophobic residues at position 897,<sup>35</sup> which are key for PAg responsiveness.<sup>36</sup> Mutation of these residues affected responses of Jurkat Vγ9Vδ2 TCR transfectants to both NBP- and anti-CD277-treated cells, which suggests close similarities between both activation processes (supplemental Figure 4A; data not shown). This observation led us to assess by mass spectrometric analysis the levels of 2 major Vγ9Vδ2-stimulating PAg (IPP and its adenosine triphosphate isopentenol [ApppI] derivative)<sup>37</sup> in cells treated with NBP or 20.1 mAb. High levels of both IPP and ApppI were detected in Raji and B-lymphoblastoid cell lines target cells treated with NBP, but not in cells treated with 20.1 mAb, although both treatments led to strong Vγ9Vδ2 T-cell activation (supplemental Figure 4B-D). Therefore, although anti-CD277 mAbs and PAg stimulate Vγ9Vδ2 T cells, up-regulation of production and/or accumulation of PAg in target cells by anti-CD277 mAb seems unlikely. This assumption is also supported by the lack of any inhibitory effect of statins, which block endogenous PAg production, on Vγ9Vδ2 T-cell recognition of anti-CD277-treated target cells (not shown).

#### Abrogation of Vγ9Vδ2 T-cell responses by blocking anti-CD277 mAbs and CD277 expression knockdown

Further insight into the mechanisms underlying CD277-dependent activation of γδ T cells was gained from analysis of additional anti-CD277 mAbs. Among the various clones that were tested, 1 clone (103.2) efficiently stained CD277<sup>+</sup> cells, such as Raji cells (Figure 4A), but did not sensitize them to Vγ9Vδ2 T-cell recognition (Figure 4B middle right panels). Indeed, this mAb strongly inhibited Vγ9Vδ2 T-cell degranulation (Figure 4C), cytokine (Figure 4D left panel) and Ca<sup>2+</sup> responses (data not shown) induced by NBP- and PAg-treated cells. Importantly, 103.2 mAb did not modulate anti-CD3-induced activation of Vγ9Vδ2 T cells

**Figure 3. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR implication in anti-CD277**

**mAb-induced activation.** (A) Confocal microscopy. CD3 $\alpha$  (red) and CD277 (green) distribution in conjugates of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (line AL) and HEK293 cells expressing EmGFP tagged-CD277 molecules. HEK293 cells were pretreated for 2 hours with anti-CD277 mAb (20.1; 10  $\mu$ g/mL) and washed before coculture with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. Composite pictures showing overlays of both colors and bright-field pictures. Confocal images of representative  $\gamma\delta$  T-cell-HEK293 conjugates are shown. Bars represent 10  $\mu$ m. (–) indicates untreated cells. One experiment representative of 3 is shown. (B) Surface expression of CD69 on human Jurkat T-cell  $\gamma\delta$  TCR transductants (human V $\gamma$ 8V $\delta$ 3 or V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs) after incubation for 4 hours with either anti-CD3 (OKT3; 10  $\mu$ g/mL) or anti-CD277 (20.1; 10  $\mu$ g/mL) mAbs. WT indicates wild-type Jurkat cells with no TCR expression. The values for the MFI of stained cells are represented in the graph. \*\* $P$  < .005 (Student  $t$  test), \*\*\* $P$  < .0005 (Student  $t$  test). Data are representative of 3 independent experiments. (C) IFN- $\gamma$  response in PBL-derived human  $\alpha\beta$  T cells expressing a human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR after incubation with NBP (pamidronate)- or anti-CD277 (20.1; 10  $\mu$ g/mL) mAb-treated Daudi cells. Production of IFN- $\gamma$  was determined via ELISpot analysis. Data are mean  $\pm$  SEM. \*\* $P$  < .005 (2-way ANOVA), \*\*\* $P$  < .0005 (2-way ANOVA). Comparable results were obtained in 3 independent experiments. (D-E) IL-2 release by murine T-cell hybridomas, transduced for the expression of a human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR, after coculture with human Raji cells in the presence of anti-CD277 mAb (20.1). (D) IL-2 release by mouse  $\gamma\delta$ TCR58C-CD28 $^{+}$  hybridoma cells. IgG indicates isotype control. Data are representative of 4 independent experiments. \* $P$  < .05 (paired Student  $t$  test and Mann-Whitney test). (E) IL-2 release by  $\gamma\delta$ TCR53/4-CD28 $^{+}$  ( $\alpha\beta$  TCR $^{-}$  variant) rat/mouse T-cell hybridoma in the presence of Raji cells pretreated with grading doses of anti-CD277 mAb (20.1). Data are mean  $\pm$  SEM and are representative of 3 independent experiments. \* $P$  < .05 (paired Student  $t$  test), \*\* $P$  < .005 (paired Student  $t$  test). IL-2 production in both panels is presented relative to those of cells cocultured with Raji cells in the absence of antibody with (100%) or without 3mM sec-butylamine (0%).



(Figure 4D inset). Moreover, unlike a recently described inhibitory anti-CD277 mAb,<sup>23</sup> 103.2 mAb did not affect antigenic activation of CD8 $^{+}$   $\alpha\beta$  T-cell clones (supplemental Figure 5A). Preincubation studies indicated that, like their stimulating counterparts, blocking CD277-specific mAb acted on target rather than on effector cells (supplemental Figure 5B). The indirect and specific effect of 103.2 mAb on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell responses was more formally documented using CD277 $^{-}$  mouse T-cell hybridomas coexpressing both V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 and MBP-specific  $\alpha\beta$  TCRs. The 103.2 mAb inhibited responses of this transductant to human target cells with PAG accumulation, but not to cells treated with the MBP peptide (Figure 4E). Screening of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell reactivity against a large array of human tumor cells previously identified several tumor cell lines readily recognized by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (like Daudi or RPMI 8226 tumor cells). Recognition of these V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-susceptible cell lines was strongly inhibited by the blocking mAb 103.2 mAb (supplemental Figure 6). V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells have been reported to be activated by mycobacteria-infected dendritic cells or macrophagic cell lines in vitro.<sup>38</sup> In this regard, 103.2 mAb abrogated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell responses induced by THP-1 cells infected by *Mycobacterium bovis* BCG (Figure 4F).

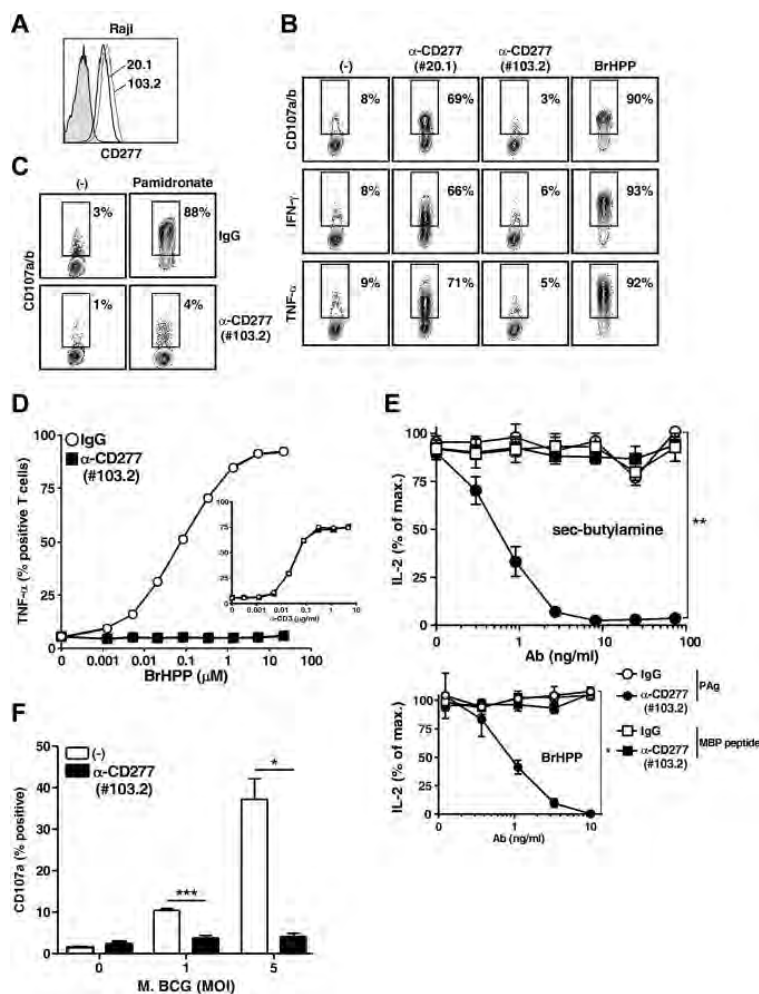
The CD277 requirement for V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell activation was directly addressed by a knockdown approach. The CD277 subfamily is composed of 3 isoforms (BTN3A1, -A2, and -A3) with highly (> 95%) homologous extracellular domains but less conserved

intracellular sequences. Two short hairpin RNAs (shRNA) mediating knockdown of all 3 CD277 isoforms (Figure 5A left panel) in HEK293 cells significantly reduced V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell cytolytic and cytokine responses to target cells treated with agonist 20.1 mAb, NBP, or soluble PAG (Figure 5A-B; data not shown). The shRNA most effective for CD277 knockdown (sh#284) provoked the greatest reduction in  $\gamma\delta$  T-cell responses. In contrast, CD277 knockdown had no effect on antigenic activation of  $\alpha\beta$  T cells (not shown).

Taken together, these results indicate a unique mandatory role played by CD277 in tumor or infectious contexts associated with spontaneous V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell activation and in V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell responses elicited by PAG.

#### Key contribution of BTN3A1 to PAG-induced activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells

Because CD277-specific mAbs cross-react with all 3 isoforms of CD277,<sup>26</sup> they did not allow their role played in V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell activation to be assessed. To address this, we generated cells expressing only one of each of the isoforms, by transfecting CD277-knockdown (sh#284) HEK293 cells with mutated cDNAs designed to confer resistance to knockdown without changing the protein sequence coded (Figure 6A). Selective re-expression of



**Figure 4. Abrogation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell responses by a blocking anti-CD277 mAb.** (A) Surface stainings of Raji cells with either 20.1 and 103.2 anti-CD277 mAbs. Filled histogram represents IgG isotype control. (B) Stainings of CD107a/b (top), IFN- $\gamma$  (middle), and TNF- $\alpha$  (bottom) of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (clone GR4) after coculture with Raji cells pretreated for 2 hours with either 20.1 or 103.2 anti-CD277 mAbs (10  $\mu$ g/mL). Numbers adjacent to outlined areas indicate the percentage of CD107a/b $^{+}$ , IFN- $\gamma$  $^{+}$ , and TNF- $\alpha$  $^{+}$   $\gamma$  $\delta$  T cells. Positive control indicates PAG (BrHPP, 3  $\mu$ M); and (-), no activation. (C) Staining of CD107a/b on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (line GUI) after coculture with 721.221 B cells, pretreated, or not, for 2 hours with NBP (pamidronate; 250  $\mu$ M). Cocultures were performed in the presence of either control IgG or 103.2 anti-CD277 Abs (10  $\mu$ g/mL). Numbers adjacent to outlined areas indicate the percentage of CD107a/b $^{+}$   $\gamma$  $\delta$  T cells. (D) TNF- $\alpha$  production by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (clone GR4) after activation induced by grading doses of soluble PAG (BrHPP) or anti-CD3 mAb (UCHL1, inset) in the presence of control IgG or anti-CD277 (103.2) Abs (10  $\mu$ g/mL). (E) Top: Effects of grading doses of 103.2 anti-CD277 mAb on IL-2 release by  $\gamma$  $\delta$ TCR53/4-CD28 $^{+}$  hybridoma cells coexpressing both an MBP-specific  $\alpha\beta$  TCR (RT1B/MHC II) and a human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR. Human Raji cells transduced for RT1B $^{+}$  expression were cocultured with hybridoma T cells in the presence of Guinea pig myelin basic protein peptide (0.1  $\mu$ g/mL) or sec-butylamine (1 mM). Bottom: Activation induced by soluble PAG (BrHPP, 3  $\mu$ M). IgG indicates isotype control. IL-2 production (ELISA) is presented relative to those of cells activated in the absence of antibody. \* $P$  < .05 (paired Student  $t$  test). \*\* $P$  < .005 (paired Student  $t$  test). (F) Expression of CD107a on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (polyclonal line AL) after coculture with *Mycobacterium bovis* BCG-infected THP-1 cells, in the presence or in the absence of 103.2 anti-CD277 mAb (10  $\mu$ g/mL). The values for the percentage of CD107a $^{+}$   $\gamma$  $\delta$  T cells are indicated on the y-axis. MOI indicates multiplicity of infection; and (-), no antibody. Data are mean  $\pm$  SD ( $n$  = 3 experiments). \* $P$  < .05 (Student  $t$  test). \*\*\* $P$  < .0005 (Student  $t$  test).

each isoform restored V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell responses induced by the agonist 20.1 mAb (Figure 6B). In contrast, only re-expression of BTN3A1, and to a much lesser extent BTN3A3, restored the ability to activate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells to NBP-treated knockdown cells. Similarly, soluble PAG-induced  $\gamma$  $\delta$  T-cell responses were restored after BTN3A1, but not BTN3A2 or BTN3A3, re-expression in CD277-knockdown cells (Figure 6C).

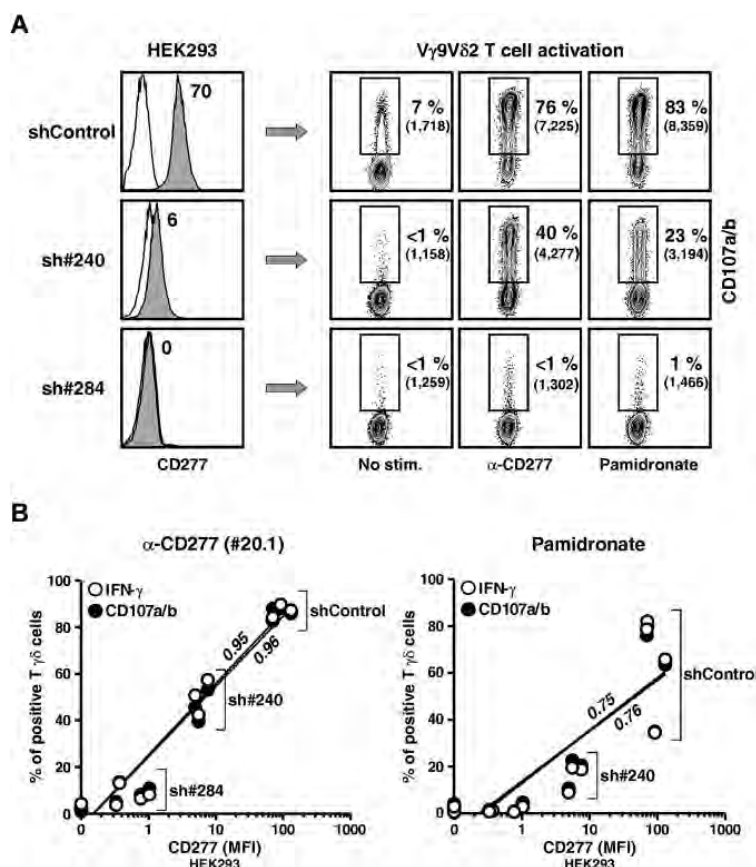
BTN3A2 is devoid of an intracellular B30.2 domain,<sup>21</sup> which could be involved in translating intracellular PAG accumulation into a V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 activation signal. In agreement with this hypothesis, truncated BTN3A1 molecules lacking a B30.2 intracellular domain failed to restore NBP-induced  $\gamma$  $\delta$  T-cell responses, although they were still able to activate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells after incubation with agonist 20.1 mAb. Furthermore, we detected strong V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell responses against NBP-treated target cells expressing chimeric CD277 molecules (extracellular domain of BTN3A3 fused to the intracellular B30.2 domain of BTN3A1; Figure 6D). This indicates that expression of the B30.2 intracellular domain of BTN3A1 is required for sensing both endogenous and exogenous PAG by human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. Weakness of PAG-induced  $\gamma$  $\delta$  T-cell responses toward transductants expressing BTN3A3, which carries a B30.2 domain highly homologous to that of BTN3A1, may

possibly be linked to the presence of a 70-amino acid tail following the B30.2 domain, which could interfere with proper B30.2-dependent CD277 recruitment.

#### V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell activation correlates with decreased membrane mobility of BTN3A1 induced by anti-CD277 mAb and NBP

All BTN3A isoforms restored V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell responses induced by agonist anti-CD277 mAb, whereas only those carrying the B30.2 domain of BTN3A1 could restore responses toward NBP- or PAG-treated cells. This suggests that NBP and PAG could act upstream of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell activation by inducing B30.2-dependent changes in the conformation or membrane topology of CD277. These changes might be mimicked by agonist anti-CD277 mAbs. To test this, we generated transfectants expressing BTN3A1 or BTN3A2 fused to either EmGFP or mCherry at their carboxytermini, and studied membrane mobility of the tagged chimeras by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis. Functionality of chimeras was first tested and EmGFP or mCherry BTN3A1 and BTN3A2 chimeras restored V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell responses to transductants pretreated with agonist 20.1 mAb (supplemental Figure 7). In line with results obtained with wild-type

**Figure 5. Abrogation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell responses by CD277 expression knockdown.** (A) Left: Surface expression of CD277 molecules on human HEK293FT clones after transduction with lentivirus delivering irrelevant (shControl) or CD277-specific (sh#240 and sh#284) shRNAs. Open histograms represent control IgG. The value for the intensity of specific CD277 staining (mAb 103.2) is indicated. Right: CD107a/b expression on human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (line GUI) after coculture with shRNA-transduced HEK293FT clones, pretreated for 2 hours with either anti-CD277 mAb (20.1; 10  $\mu$ g/mL) or NBP (pamidronate, 100  $\mu$ M). Numbers adjacent to outlined areas indicate the percentage and mean of fluorescence intensity (MFI) of CD107a/b $^{+}$  T cells. (B) CD107a/b expression and IFN- $\gamma$  production by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (line GUI) after incubation with shRNA-transduced HEK293FT clones pretreated for 2 hours with either anti-CD277 mAb (left, 20.1; 10  $\mu$ g/mL) or NBP (right, pamidronate, 100  $\mu$ M). Data are percentage of CD107a $^{+}$  (black circles) or IFN- $\gamma$  $^{+}$  (white circles) T cells versus the value for the intensity (MFI) of specific CD277 staining (mAb 103.2). sh#284, n = 6; sh#240, n = 3; and shControl, n = 3. Regression lines and calculated  $r^2$  values (0.95 and 0.75, for IFN- $\gamma$ ; 0.96 and 0.76 for CD107a/b) are indicated on the graphs.



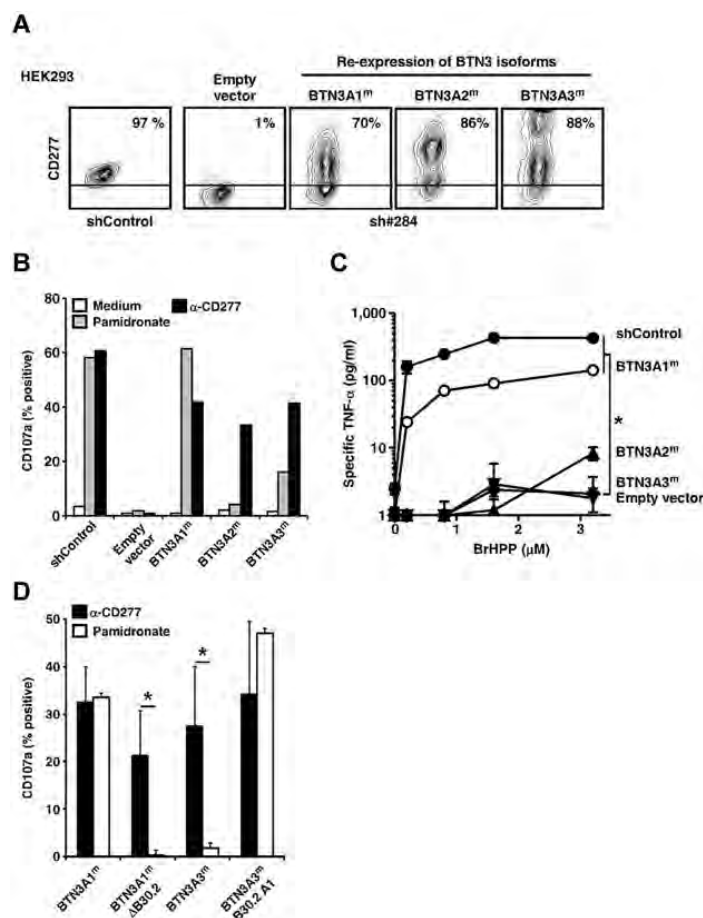
BTN3A2 molecules, fluorescent BTN3A2 chimeras failed to restore V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell responses to NBP-treated cells. mCherry-BTN3A1 chimeras triggered more efficient V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell responses after NBP treatment compared with EmGFP-BTN3A1 chimeras. Because EmGFP, unlike mCherry, was fused directly to the carboxy-terminus end of the B30.2 domain without any spacer sequence, the weak functionality of EmGFP-BTN3A1 may be the result of interference with proper B30.2-dependent recruitment of BTN3A1 by PAg.

We next investigated by FRAP analysis whether V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell responses correlated with alterations of CD277 membrane mobility. Approximately 80%-90% fluorescence prebleach levels were recovered within 80 seconds (Tp) after photobleaching of untreated transfectants expressing either BTN3A1 or BTN3A2 fused to EmGFP or mCherry. The 103.2 mAb induced a dramatic aggregation of membrane CD277 molecules within a few minutes after treatment and subsequent CD277 down-modulation (C.H., S. Nedellec, E.S., M.B., unpublished data, January 2012). This was not the case for the agonist 20. mAb. A 20- to 30-minute treatment with this mAb strongly decreased FRAP of BTN3A1 and BTN3A2 chimeras (average recovery reduced to 30%-40% of prebleach levels), indicating decreased membrane mobility (Figure 7A-B). Importantly, NBP treatment decreased mobility of mCherry-BTN3A1 chimeras but had no effect on mCherry-BTN3A2 chimeras (Figure 7C). Furthermore, treatment with mevalonate pathway inhibitors, such as mevastatin, that act upstream of PAg production did not change the mobility of mCherry-BTN3A1 chimeras and

actually inhibited the effects of NBPs on this phenomenon. This suggests that NBP-induced changes of BTN3A1 mobility are primarily the result of PAg accumulation, rather than downstream effects linked to the overall blockade of the mevalonate pathway. Therefore, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell activation tightly correlates with decreased CD277 membrane mobility provoked in a B30.2-dependent way by intracellular PAg accumulation.

## Discussion

Sensing of microbial and mammalian PAg is an elegant strategy for immune detection of infectious and metabolic distress exploited by a major  $\gamma\delta$  T-cell subset shared by primates but absent in other species.<sup>2,4-5</sup> Although expression of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR has been known for years to be a prerequisite for PAg-induced activation,<sup>12,39</sup> how such small nonpeptidic metabolites promote  $\gamma\delta$  TCR engagement has remained a mystery. Our results identifying a key role for CD277, a recently identified member of the extended B7 receptor family, yield new insights into this mechanism. The key implication of the ubiquitous CD277 molecule in  $\gamma\delta$  T-cell activation is consistent with the lack of tissue restriction of NBP- and PAg-induced  $\gamma\delta$  T-cell responses.<sup>11</sup> Moreover, the lack of functional CD277 orthologs in rodents goes hand in hand with the absence of PAg-responding  $\gamma\delta$  T-cell subsets in these species,<sup>2</sup> and the lack of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell reactivity toward NBP- or PAg-treated murine cell lines.<sup>5,11</sup>

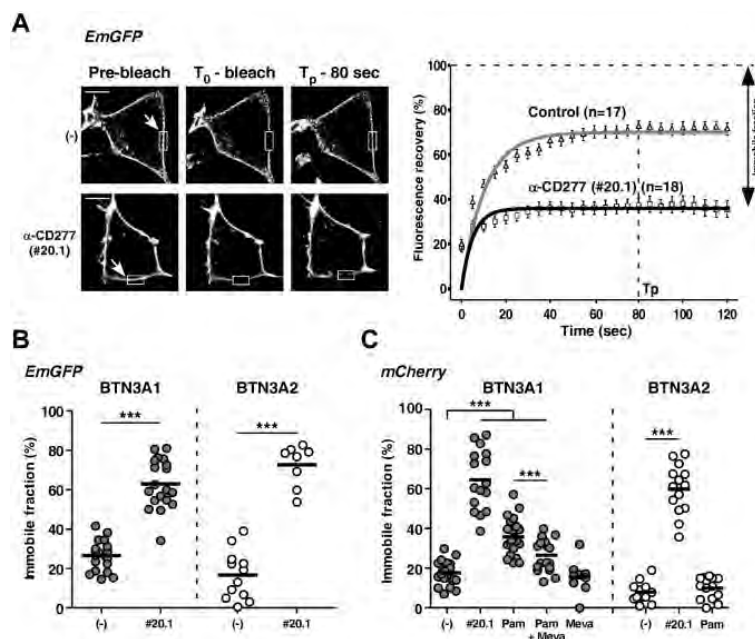


**Figure 6. Key role played by BTN3A1 in PAG-induced activation of Vγ9Vδ2 T cells.** (A) Surface expression of CD277 molecules on shRNA 284 transduced-HEK293FT cells, knocked down for the expression of endogenous CD277 molecules and selectively re-expressing, after transfection, silently mutated CD277 isoforms (BTN3A1<sup>int</sup>, BTN3A2<sup>int</sup>, or BTN3A3<sup>int</sup>). shControl indicates clone 3, random shRNA sequence; sh#284, shRNA-specific for CD277, clone 30; and empty vector, transfection of an empty plasmid. The values for the percentage of CD277<sup>+</sup> cells are indicated. Data are representative of more than 3 independent experiments. (B) Expression of CD107a on Vγ9Vδ2 T cells (line GUI) after coculture with HEK293FT cells re-expressing BTN3A1<sup>int</sup>, BTN3A2<sup>int</sup>, or BTN3A3<sup>int</sup> isoforms and pretreated for 2 hours with NBP (pamidronate, 250 μM) or anti-CD277 mAb (20.1, 10 μg/mL). (C) TNF-α release from Vγ9Vδ2 T cells (line GUI) induced by grading doses of soluble PAG (BrHPP) in coculture with HEK293FT cells re-expressing BTN3A1, BTN3A2, or BTN3A3 isoforms. Data are mean ± SD and are representative of 3 independent experiments. \**P* < .05 (paired Student *t* test). (D) Expression of CD107a on Vγ9Vδ2 T cells (line AL) after coculture with HEK293FT cells expressing full-length BTN3A1, BTN3A3, truncated BTN3A1 proteins lacking the intracellular B30.2 domain (BTN3A1<sup>int</sup>ΔB30.2), or chimeric BTN3A3 proteins assembled with the BTN3A1 intracellular B30.2 domain (BTN3A3<sup>int</sup>B30.2A1). Target cells were pretreated for 2 hours with anti-CD277 mAb (20.1, 10 μg/mL) or NBP (pamidronate, 250 μM). Data are mean ± SD of the percentage of CD107a<sup>+</sup> γδ T cells (*n* = 3). \**P* < .05 (Student *t* test).

How do the effects of anti-CD277 mAb on Vγ9Vδ2 T-cell activation fit in with the recently reported modulation of αβ T-cell responses by several CD277-specific mAbs? In agreement with previous studies,<sup>23,25</sup> soluble 20.1 mAb had neither stimulatory nor costimulatory activity on αβ T cells. Costimulatory activity of mAb 20.1 on TCR-stimulated αβ T cells has been reported with plate-bound mAb only and is the consequence of direct engagement of CD277 expressed by responder T cells.<sup>25</sup> In marked contrast, soluble, but not immobilized, mAb 20.1 induced full activation of Vγ9Vδ2 T cells in the absence of any other stimuli (eg, anti-CD3 mAb) and acted primarily, if not exclusively, in an indirect manner (ie, through sensitization of CD277<sup>+</sup> target cells to Vγ9Vδ2 T-cell recognition. Yamashiro et al also described inhibition of anti-CD3-stimulated αβ T cells by a high-affinity anti-CD277 mAb able to induce CD277 phosphorylation in T cells.<sup>23</sup> This again suggests a direct coinhibitory effect of the mAb. Although we could not assess activity of this particular mAb on Vγ9Vδ2 T-cell responses, its mode of action clearly differs from that of the blocking mAb 103.2 we used. In particular, mAb 103.2 inhibited PAG-induced Vγ9Vδ2 T-cell responses, but not anti-CD3-stimulated Vγ9Vδ2 or αβ T cells, and acted indirectly, by interfering with Vγ9Vδ2 T-cell recognition of NBP-treated or BCG-infected target cells (as indicated by mAb preincubation experiments and analysis of the responses of murine Vγ9Vδ2 TCR transductants).

Results of anti-CD277 mAb treatments and CD277-knockdown approaches both point to a unique role played by CD277 in PAG-induced Vγ9Vδ2 T-cell responses. Moreover, the effects of both agonist and blocking anti-CD277 mAbs on Vγ9Vδ2 TCR transductant responses indicate that the TCR is necessary for this CD277-dependent activation process. How CD277, PAG, and the Vγ9Vδ2 TCR are linked together remains nevertheless unclear. The CD277-dependent recognition of PAG-treated human cells by murine Vγ9Vδ2 TCR transductants argues against engagement of CD277 by a counter-receptor expressed by responder T cells. Indeed, because CD277 is not conserved in the mouse,<sup>21</sup> existence of a murine counter-receptor seems unlikely.

Interestingly, whereas Vγ9Vδ2 T-cell activation by agonist anti-CD277 mAbs was restored after re-expression of any of the 3 CD277 isoforms, responses to PAG or NBP were obtained after re-expression of BTN3A1 only. This suggests that PAG are not bona fide γδ T-cell antigens, consistent with previous failures to demonstrate interactions between PAG and Vγ9Vδ2 TCR.<sup>13</sup> We propose that PAG act through the intracytoplasmic domain of the BTN3A1 isoform to induce membrane reorganization of CD277 complexes sensed directly or indirectly by Vγ9Vδ2 T cells. Because of the high conservation of the extracellular domain of all 3 CD277 isoforms, such Vγ9Vδ2-stimulatory CD277 complexes could be mimicked by agonist anti-CD277 mAbs, irrespective of the isoform expressed. This model (supplemental Figure 8) is



**Figure 7. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell activation correlates with decreased mobility of BTN3A1 induced by agonist anti-CD277 mAb and NBP.** (A) Left: Confocal images of HEK293 cells expressing EmGFP-BTN3A1 molecules after incubation for 30 minutes with anti-CD277 mAb (#20.1; 10  $\mu$ g/mL), shown before (Pre-bleach), immediately after (T<sub>0</sub>-bleach), and 80 seconds (T<sub>p</sub>-80 seconds) after photobleaching of regions of interest (indicated rectangular areas). Scale bars represent 6  $\mu$ m. (–) indicates no treatment. Right: Mean FRAP and fit curves in EmGFP-BTN3A1-expressing HEK293 cells (n = 18), after treatment with anti-CD277 mAb (#20.1; 10  $\mu$ g/mL). Control indicates no treatment (n = 17). The symbols correspond to the mean  $\pm$  SEM of FRAP collected every 5 seconds. The curves were fitted by 1-phase exponential equations. The average fluorescence before photobleaching was counted as 100% (dashed line). Immobile fractions are indicated for each condition. (B) FRAP analysis of HEK293 cells expressing EmGFP-BTN3A1 or EmGFP-BTN3A2 molecules after incubation for 30 minutes with anti-CD277 mAbs (#20.1; 10  $\mu$ g/mL). Data are presented as the value for the percentage of immobile fraction, measured as described under "Microscopy." Control indicates no treatment. BTN3A1: (–), n = 21; 20.1, n = 13; BTN3A2: (–), n = 12; 20.1, n = 8. Bars represent mean values. (C) FRAP analysis of HEK293 cells expressing mCherry-BTN3A1 or mCherry-BTN3A2 molecules after either incubation for 30 minutes with anti-CD277 mAb (#20.1; 10  $\mu$ g/mL), incubation overnight with NBP (Pam; pamidronate; 250  $\mu$ M) or statin (mevastatin, 50  $\mu$ M) only, or treatment with statin for 6 hours before incubation overnight with both statin and NBP (Pam + Meva). Data are presented as the value for the percentage of immobile fraction. Control indicates no treatment. BTN3A1: (–), n = 21; 20.1, n = 16; Pam, n = 28; Pam + Meva, n = 18; Meva, n = 8. BTN3A2: (–), n = 12; 20.1, n = 14; Pam, n = 14. Bars represent mean values. (B–C) \*\*\*P < .005 (Student t test).

supported by the similar Ca<sup>2+</sup> signaling kinetics of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells stimulated by agonist anti-CD277 mAb and PAG as well as by the results of FRAP experiments. Both agonist mAb and NBP induce changes of CD277 membrane mobility that correlate with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell activation. Here again, NBP induced topologic rearrangement of only BTN3A1, whereas agonist mAb affected the mobility of both BTN3A1 and BTN3A2 isoforms. This establishes a specific and presumably causal link between intracellular PAG accumulation and CD277 reorganization, which occurs independently of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell activation. PAG-dependent recruitment of CD277 molecules could be achieved through direct interactions between PAG and the intracellular domain of BTN3A1. Alternatively, in line with the role played by some B30.2 domains in protein/protein interactions,<sup>40,41</sup> BTN3A1 recruitment could involve additional intracellular or membrane-bound partners. Although PAG are likely to act intracellularly, we cannot rule out an extracellular mode of action (eg, after interaction with the extracellular part of a transmembrane receptor that would in turn induce BTN3A1 reorganization in a B30.2-dependent fashion). This hypothesis would be in line with evidence for the existence of surface receptors able to interact with PAG.<sup>42,43</sup>

How V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells detect PAG-induced changes of CD277 remains to be determined. These changes could be sensed by the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR directly, although we failed to demonstrate cognate interactions between recombinant V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR and CD277 (E.J.A., unpublished results, January 2012), or to restore V $\gamma$ 9V $\delta$ 2

T-cell responses toward NBP-treated murine target cells after BTN3A1 transduction (C.H., R.B., M.B., and E.S., unpublished results, January 2011). Alternatively, CD277 might promote recruitment of other receptors recognized by the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR, such as ecto-F1-ATPase, which is a known ligand for V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR.<sup>44,45</sup>

The restricted but mandatory implication of CD277 in the activation of particular human  $\gamma\delta$  T-cell subsets brings to mind the mandatory role played by Skint-1, another member of the extended B7 receptor family, in the selection of murine intraepidermal  $\gamma\delta$  T cells.<sup>16–18</sup> Although Skint-1 deficiency prevents differentiation of T cells expressing invariant V $\gamma$ 5V $\delta$ 1 TCR, it has no effect on other  $\gamma\delta$  or  $\alpha\beta$  T-cell compartments. Whether Skint-1 directly interacts with V $\gamma$ 5V $\delta$ 1 TCR or modulates TCR engagement by yet undefined antigens remains unclear. It is striking that the human B7-related molecules, which are most homologous to SKINT1 in their extracellular regions, are the mouse and human BTNs, including CD277.<sup>21</sup> Therefore, the implication of BTN/Skint-related members of the extended B7 receptor family in cell selection and/or peripheral activation could represent a unifying feature shared by seemingly unrelated  $\gamma\delta$  T-cell subsets from distinct species.

From an applied standpoint, trials using clinical grade 5 $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell agonists (like NBP or synthetic PAG) have yielded promising preclinical and clinical responses in viral infections and several cancers.<sup>2,5,46</sup> Such protocols are nevertheless suboptimal because of the progressive exhaustion of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell responses after

repeated treatment with specific agonists and because of the rather weak reactivity of in vitro or in vivo expanded V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells toward fresh autologous tumor cells.<sup>5</sup> Enhancing antitumor responses of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells with agonist anti-CD277 mAbs may prove a good way to improve their antitumor efficacy. On the other hand, antagonist anti-CD277 mAbs might be exploited to dampen deleterious V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell responses,<sup>47</sup> for instance, during *Mycobacterium tuberculosis*-induced immune restoration syndrome in AIDS patients under therapy.<sup>48</sup>

## Acknowledgments

The authors thank T. Santolaria and A. Giraud for assistance and discussion; M. C. Devilder for assistance with cytometry; M. C. Gesnel, S. Heijhuurs, Ingrid Müller, and Lisa Starick for technical assistance; J. Desfrancois-Noel and P. Hulin at the Flow Cytometry and Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell) and IFR26 (Nantes) for expert technical assistance; and N. Minato, X. Saulquin, B. Clémenceau, H. Vié, N. Labarrière, F. Paris, M. Grégoire, F. Altare, D. Heymann, and Innate Pharma (Marseille, France) for sharing cells and reagents.

## References

- Hayday AC. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity*. 2009;31(2):184-196.
- Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):467-478.
- Chien YH, Königshofer Y. Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunol Rev*. 2007;215:46-58.
- Fournie JJ, Bonneville M. Stimulation of gamma delta T cells by phosphoantigens. *Res Immunol*. 1996;147(5):338-347.
- Bonneville M, Scotet E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(5):539-546.
- Morita CT, Jin C, Sarikonda G, Wang H. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol Rev*. 2007;215:59-76.
- Tanaka Y, Morita CT, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature*. 1995;375(6527):155-158.
- Hintz M, Reichenberg A, Altincicek B, et al. Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gammadelta T cells in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*. 2001;509(2):317-322.
- Kunzmann V, Bauer E, Wilhelm M. Gamma/delta T-cell stimulation by pamidonate. *N Engl J Med*. 1999;340(9):737-738.
- Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jeno P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med*. 2003;197(2):163-168.
- Lang F, Peyrat MA, Constant P, et al. Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *J Immunol*. 1995;154(11):5986-5994.
- Bukowski JF, Morita CT, Band H, Brenner MB. Crucial role of TCR gamma chain junctional region in prenyl pyrophosphate antigen recognition by gamma delta T cells. *J Immunol*. 1998;161(1):286-293.
- Allison TJ, Winter CC, Fournie JJ, Bonneville M, Garboczi DN. Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature*. 2001;411(6839):820-824.
- Morita CT, Beckman EM, Bukowski JF, et al. Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunol*. 1995;3(4):495-507.
- Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:233-258.
- Lewis JM, Girardi M, Roberts SJ, Barbee SD, Hayday AC, Tigelaar RE. Selection of the cutaneous intraepithelial gammadelta+ T cell repertoire by a thymic stromal determinant. *Nat Immunol*. 2006;7(8):843-850.
- Boyden LM, Lewis JM, Barbee SD, et al. Skint1, the prototype of a newly identified immunoglobulin superfamily gene cluster, positively selects epidermal gammadelta T cells. *Nat Genet*. 2008;40(5):656-662.
- Barbee SD, Woodward MJ, Turchinovich G, et al. Skint-1 is a highly specific, unique selecting component for epidermal T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(8):3330-3335.
- Turchinovich G, Hayday AC. Skint-1 identifies a common molecular mechanism for the development of interferon-gamma-secreting versus interleukin-17-secreting gammadelta T cells. *Immunity*. 2011;35(1):59-68.
- Henry J, Miller MM, Pontarotti P. Structure and evolution of the extended B7 family. *Immunol Today*. 1999;20(6):285-288.
- Rhodes DA, Stammers M, Malcherek G, Beck S, Trowsdale J. The cluster of BTN genes in the extended major histocompatibility complex. *Genomics*. 2001;71(3):351-362.
- Smith IA, Knezevic BR, Ammann JU, et al. BTN1A1, the mammary gland butyrophilin, and BTN2A2 are both inhibitors of T-cell activation. *J Immunol*. 2010;184(7):3514-3525.
- Yamashiro H, Yoshizaki S, Tadaki T, Egawa K, Seo N. Stimulation of human butyrophilin 3 molecules results in negative regulation of cellular immunity. *J Leukoc Biol*. 2010;88(4):757-767.
- Cubillos-Ruiz JR, Martinez D, Scarlett UK, et al. CD277 is a negative co-stimulatory molecule universally expressed by ovarian cancer microenvironmental cells. *Oncotarget*. 2010;1(5):329-338.
- Messal N, Mamessier E, Sylvain A, et al. Differential role for CD277 as a co-regulator of the immune signal in T and NK cells. *Eur J Immunol*. 2011;41(12):3443-3454.
- Compte E, Pontarotti P, Collette Y, Lopez M, Olive D. Frontline: Characterization of BT3 molecules belonging to the B7 family expressed on immune cells. *Eur J Immunol*. 2004;34(8):2089-2099.
- Marcu-Malina V, Heijhuurs S, van Buuren M, et al. Redirecting alphabeta T cells against cancer cells by transfer of a broadly tumor-reactive gammadelta T-cell receptor. *Blood*. 2011;118(1):50-59.
- Harly C, Peyrat MA, Netzer S, Dechanet-Merville J, Bonneville M, Scotet E. Up-regulation of cytolytic functions of human Vdelta2-gamma T lymphocytes through engagement of ILT2 expressed by tumor target cells. *Blood*. 2011;117(10):2864-2873.
- Luhder F, Huang Y, Dennehy KM, et al. Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. *J Exp Med*. 2003;197(8):955-966.
- Kreiss M, Asmuss A, Krejci K, et al. Contrasting contributions of complementarity-determining region 2 and hypervariable region 4 of rat BV8S2+ (Vbeta8.2) TCR to the recognition of myelin basic protein and different types of bacterial superantigens. *Int Immunol*. 2004;16(5):655-663.
- Pyz E, Naidenko O, Miyake S, et al. The complementarity determining region 2 of BV8S2 (V beta 8.2) contributes to antigen recognition by rat invariant NKT cell TCR. *J Immunol*. 2006;176(12):7447-7455.
- Espevik T, Nissen-Meyer J. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods*. 1986;95(1):99-105.
- Nedellec S, Sabourin C, Bonneville M, Scotet E. NKG2D costimulates human Vgamma9Vdelta2

This work was supported by Inserm, Université de Nantes, Association pour la Recherche contre le Cancer (R10139NN), Institut National du Cancer (V9V2THER), AICR (10-0736), UU (2010-4669), and IZKF Würzburg (01KS9603).

## Authorship

Contribution: C.H., Y.G., S. Nedellec, C.-M.P., H.M., J.M., J.L., J.K., S. Netzer, A.L., and R.B. performed experiments; C.H., Y.G., S. Nedellec, J.M., H.M., J.K., E.J.A., J.D.-M., T.H., R.B., D.O., and E.S. analyzed results and made the figures; M.B., R.B., and E.S. designed the research and wrote the manuscript; and all authors read and edited the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Emmanuel Scotet, Inserm UMR 892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, IRT UN, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes cedex, France; e-mail: emmanuel.scotet@inserm.fr; and Marc Bonneville, Inserm UMR892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, IRT UN, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes cedex, France; e-mail: bonnevil@inserm.fr.

- T cell antitumor cytotoxicity through protein kinase C $\theta$ -dependent modulation of early TCR-induced calcium and transduction signals. *J Immunol.* 2010;185(1):55-63.
34. Simone R, Barbarat B, Rabellino A, et al. Ligation of the BT3 molecules, members of the B7 family, enhance the proinflammatory responses of human monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *Mol Immunol.* 2010;48(1):109-118.
  35. Davodeau F, Peyrat MA, Hallet MM, Houde I, Vie H, Bonneville M. Peripheral selection of antigen receptor junctional features in a major human gamma delta subset. *Eur J Immunol.* 1993;23(4):804-808.
  36. Yamashita S, Tanaka Y, Harazaki M, Mikami B, Minato N. Recognition mechanism of non-peptide antigens by human gammadelta T cells. *Int Immunol.* 2003;15(11):1301-1307.
  37. Monkkonen H, Auriola S, Lehenkari P, et al. A new endogenous ATP analog (Apppl) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *Br J Pharmacol.* 2006;147(4):437-445.
  38. Devilder MC, Maillet S, Bouyge-Moreau I, Donnadieu E, Bonneville M, Scotet E. Potential of antigen-stimulated Vgamma9Vdelta2 T cell cytokine production by immature dendritic cells (DC) and reciprocal effect on DC maturation. *J Immunol.* 2006;176(3):1386-1393.
  39. Wang H, Fang Z, Morita CT. Vgamma2Vdelta2 T cell receptor recognition of prenyl pyrophosphates is dependent on all CDRs. *J Immunol.* 2010;184(11):6209-6222.
  40. Jeong J, Rao AU, Xu J, et al. The PRY/SPRY/B30.2 domain of butyrophilin 1A1 (BTN1A1) binds to xanthine oxidoreductase: implications for the function of BTN1A1 in the mammary gland and other tissues. *J Biol Chem.* 2009;284(33):22444-22456.
  41. James LC, Keeble AH, Khan Z, Rhodes DA, Trowsdale J. Structural basis for PRYSPRY-mediated tripartite motif (TRIM) protein function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(15):6200-6205.
  42. Wei H, Huang D, Lai X, et al. Definition of APC presentation of phosphoantigen (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl pyrophosphate to Vgamma2Vdelta2 TCR. *J Immunol.* 2008;181(7):4798-4806.
  43. Sarikonda G, Wang H, Puan KJ, et al. Photoaffinity antigens for human gammadelta T cells. *J Immunol.* 2008;181(11):7738-7750.
  44. Scotet E, Martinez LO, Grant E, et al. Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity.* 2005;22(1):71-80.
  45. Mookerjee-Basu J, Vantourout P, Martinez LO, et al. F1-adenosine triphosphatase displays properties characteristic of an antigen presentation molecule for Vgamma9Vdelta2 T cells. *J Immunol.* 2010;184(12):6920-6928.
  46. Chiplunkar S, Dhar S, Wesch D, Kabelitz D. Gammadelta T cells in cancer immunotherapy: current status and future prospects. *Immunotherapy.* 2009;1(4):663-678.
  47. Davey MS, Lin CY, Roberts GW, et al. Human neutrophil clearance of bacterial pathogens triggers anti-microbial gammadelta T-cell responses in early infection. *PLoS Pathog.* 2011;7(5):e1002040.
  48. Bourgarit A, Carcelain G, Samri A, et al. Tuberculosis-associated immune restoration syndrome in HIV-1-infected patients involves tuberculin-specific CD4 Th1 cells and KIR-negative gammadelta T cells. *J Immunol.* 2009;183(6):3915-3923.

Harly et al.

## Supplemental data

## Supplemental Materials and Methods

**Expression of full-length, truncated and chimeric BTN3 proteins.** Full-length cDNAs for human BTN3A1 (LIFESEQ3294566), BTN3A2 (LIFESEQ6701037), and BTN3A3 (BC015815) were from Open Biosystems and subcloned in pEGFP-1 (Clontech), or pSP72 (Promega). 5'-phosphorylated oligonucleotides 5'-TCTGCTACTTTCAAGATGGTGACTTCTATGA-3' and 5'-GATATTTGCCACTGTGACAGGCTGTGACGT-3' were used for PCR mutagenesis of the cDNAs to mutate the whole sequence targeted by shRNA#284 (mutation of 5'-GGAAAGTACTTGTGTTATTTTC-3' to 5'-GGCAAATATCTCTGCTACTTTT-3'). Mutated cDNAs were subcloned in a modified pIRES1hyg (Clontech). Following hygromycin selection, stable transfectants were checked for the selective re-expression of mutated BTN3A1, BTN3A2 or BTN3A3 by flow cytometry. Carboxy-terminus EmGFP- or mCherry-tagged BTN3A1 and BTN3A2 molecules were obtained by subcloning full-length cDNAs in frame with the sequences encoding for the fluorescent tag from, respectively, the pcDNA6.2/C-EmGFP-GW/TOPO (Invitrogen) or the pmCherry-N1 (Clontech) vectors. When specified, helix-forming peptide linkers A(EAAAK)4A were introduced in frame to separate BTN3 and fluorescent domains.<sup>33</sup> Plasmids were used for transient or stable transfections in either CD277 kd HEK293FT cells (sh#284; clone#30) or wild-type HEK293 cells. For truncated BTN3A1 proteins lacking the B30.2 intracellular domain, the following oligonucleotides: 5'-ACCATGAAAATGGCAAGTTTCCTGGCC-3' and 5'-GATGGGGTTTGCTGTTTTTG-3' were used for PCR. Chimeric BTN3A3-BTN3A1 B30.2 proteins were generated by using the oligonucleotides 5'-CGCAGGCTTGAAGAGGGCCATTTTCCAT-3' and 5'-TGAAGAGGGCCATTTTCCATTCATGATAGGCCA-3'.

**Knockdown of BTN3 isoforms in HEK293FT cells.** Short hairpin RNA (shRNA) sequences (sh#240, sh#284) were designed for targeting fully conserved RNA sequences encoding for the extracellular region of BTN3A1, BTN3A2 and BTN3A3 isoforms. Oligonucleotides 5'-ACCGGAAGGCTGCTCTCCGAATACCGAAGTATTCGGAGAGCAGCCTTCCTTTTTG-3', 5'-TCGACAAAAAGGAAGGCTGCTCTCCAA TACTTCGGTATTCGGAGAGCA

GCCTTC-3' (sh#240); 5'-ACCGGAAGTACTTGTGTT ATTTCCGAAGAAATAACAC

AAGTACTTTCCTTTTTG-3, 5'-TCGACAAAAAGGAAA GTACTTGTGTTATTTCTT

CGGAAATAACACAAGTACTTTC-3' (sh#284); and irrelevant sequence (shControl) were annealed and cloned downstream from the human U6 snRNA gene promoter before introduction of the sequence-verified U6-shRNA cassette into the lentiviral vector FG12.34. Lentiviral particles were produced by transient transfection of HEK293FT cells. Virus particles contained in cell supernatants were next concentrated by ultracentrifugation, titrated, and used to infect HEK293FT target cells at a multiplicity of infection of 10. The expression of CD277 in transduced cells was checked by flow cytometry and cells were sorted using a FACSAriaIII cell sorter (BD Biosciences), then cloned by limiting dilution.

**Cell division.** Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) was from Invitrogen. Freshly isolated PBMCs ( $2 \times 10^6$  cells) were labeled with CFSE ( $1.5 \mu\text{M}$  in PBS) for 10 min at  $37^\circ\text{C}$ , washed and maintained for 15 min at  $37^\circ\text{C}$  in complete medium to allow the release of dye excess. Labeled cells were activated, in the presence of IL-2 ( $300 \text{ IU/ml}$ ). After 4 days, cells were harvested, stained for  $\gamma\delta$  TCR surface expression and analyzed by flow cytometry. Peaks of cell division and frequencies were calculated by using the FlowJo analysis software.

**Antibody-dependent cell cytotoxicity.** Anti-human CD20 mAb (Rituximab) and human  $\alpha\beta$  CD8<sup>pos</sup> T cells (CMVpp65/A2) expressing or not CD16 Fc $\gamma$ RIII lentiviral transduction, were kindly provided by B. Cl  menceau and H. Vi   (INSERM UMR892).

**Quantification of endogenous PAg.** The detection and quantification of endogenous IPP and Apppl was performed as described (Monkkonen et al., 2007).

### Microscopy

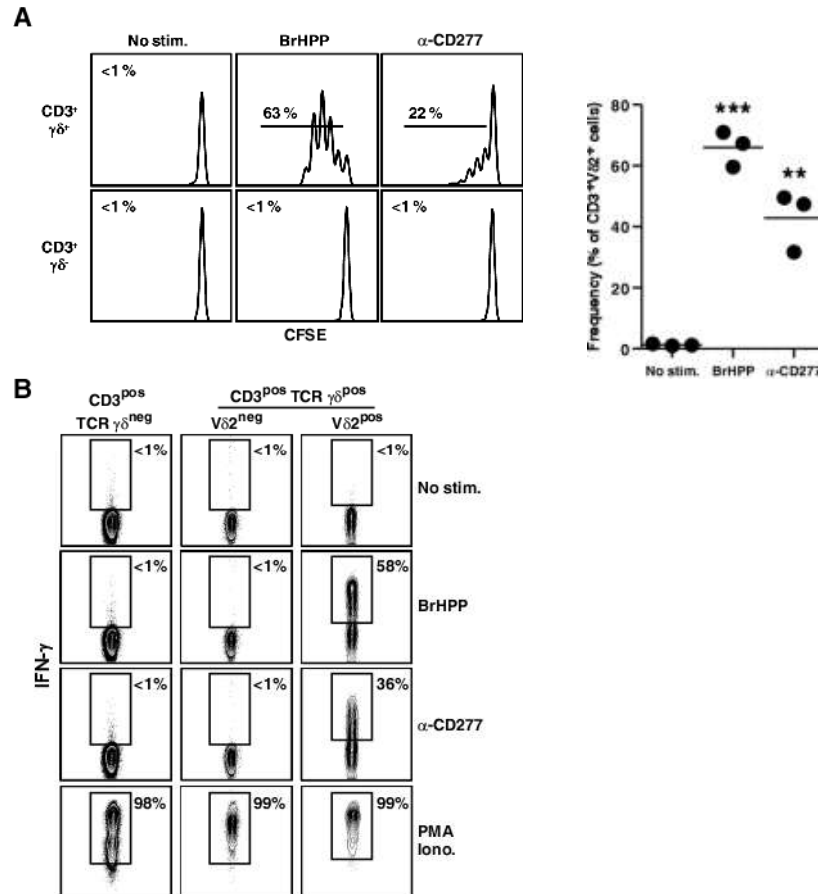
HEK293FT cells ( $1 \times 10^5$ ) expressing carboxy-terminus Emerald GFP (EmGFP)-tagged CD277 molecules were laid on BD Cell-Tak pre-coated slides (BD Biosciences). V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells ( $1 \times 10^5$ ) were added and left to conjugate to HEK293FT cells for 30 min at  $37^\circ\text{C}$ , pretreated or not with anti-CD277 mAb. After addition of primary anti-CD3 mAb (#OKT3,  $10 \mu\text{g/ml}$ ) and incubation for 10 min at  $37^\circ\text{C}$ , paraformaldehyde-fixed samples were stained with Alexa 568-labeled anti-mouse IgG2a ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) for 10 min at  $37^\circ\text{C}$  and washed. The slides were mounted by using Fluoromount reagent (Southern Biotechnology) and analyzed using a Nikon A1 RS confocal microscope (60xNA 1.40 oil immersion objective). Images were analyzed with Metamorph 7.5 (Molecular Devices, Universal Imaging) and NIS (Nikon) imaging softwares. Measurement of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels were performed within T cells loaded with  $1 \mu\text{M}$  Fura-2 AM (Molecular Probes) as described (Nedellec et al., 2010). For FRAP analysis, HEK293 cells expressing either EmGFP or mCherry-fused CD277 were laid on  $\mu$ -slides (Ibidi) and analyzed using a Nikon A1 RS confocal microscope (60xNA 1.40 oil immersion objective). Selected rectangular areas were photobleached for 500 ms by using full power of laser intensity ( $> 90\%$  of loss of fluorescence). Images were collected every 5 s, before (30 s) and after (120 s) bleaching using low laser intensity. The resulting curves were fitted using one-phase exponential equations.

### Supplemental reference

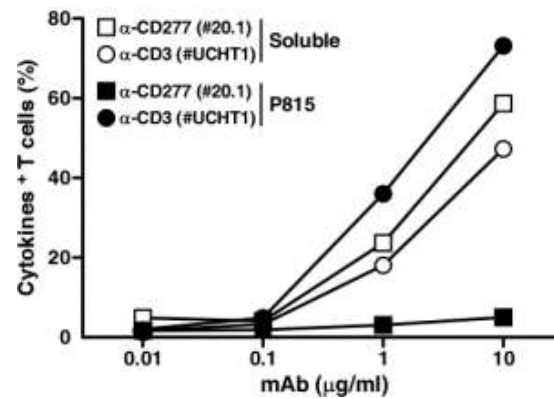
Monkkonen H., Ottewill P.D., Kuokkanen J., Monkkonen J., Auriola S., Holen I. Zoledronic acid-induced IPP/Apppl production in vivo. *Life Sci.* 2007; 81(13):1066-1070.

Nedellec S, Sabourin C, Bonneville M, Scotet E. NKG2D costimulates human Vgamma9Vdelta2 T cell antitumor cytotoxicity through protein kinase Ctheta-dependent modulation of early TCR-induced calcium and transduction signals. *J Immunol.* 2010;185(1):55-63.

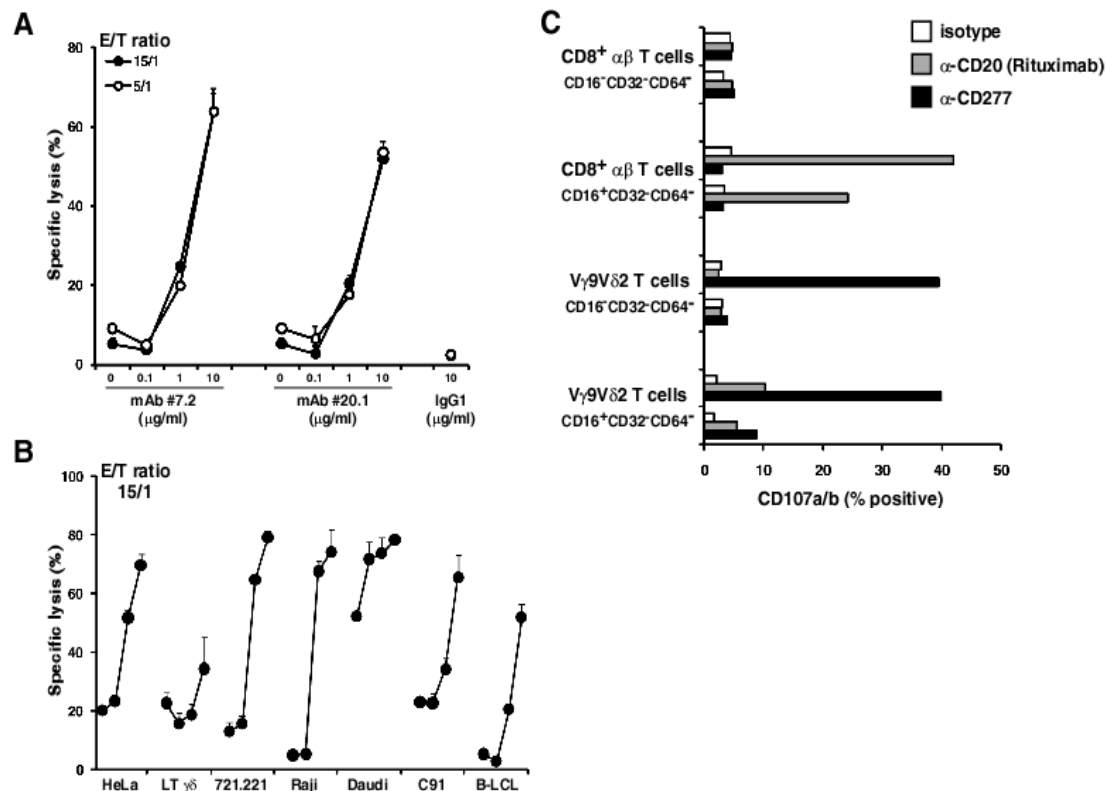
## SUPPLEMENTAL FIGURES



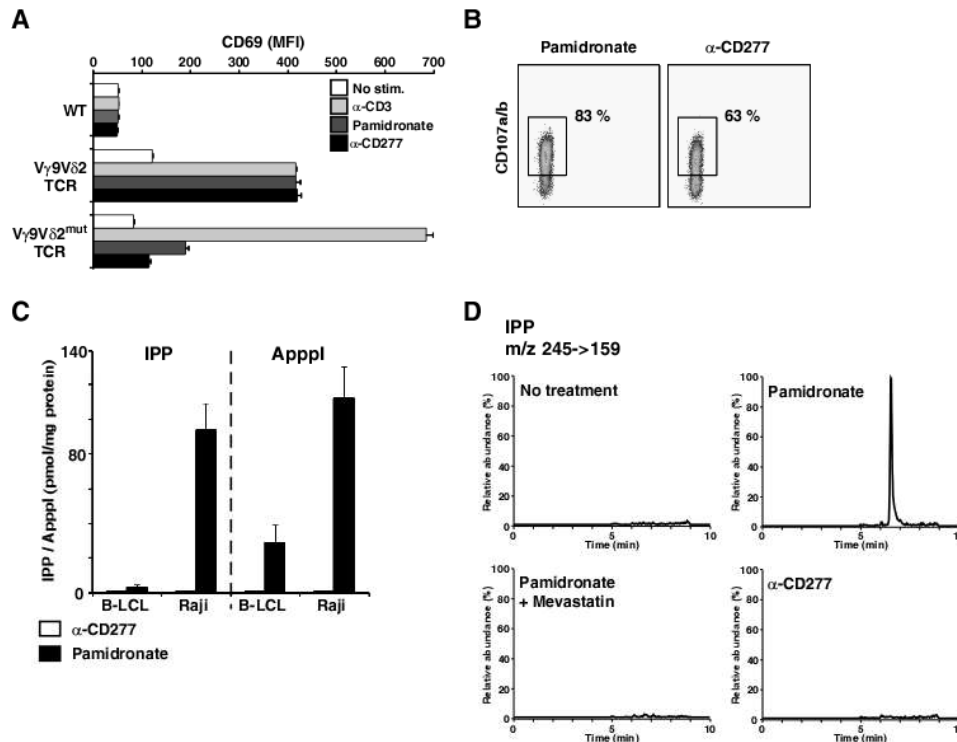
**Figure S1. Anti-CD277 mAbs induce activation of ex vivo human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells.** (A) *Left*, CFSE dilution measured within fresh ex vivo human PBMC-CD3<sup>pos</sup> TCR  $\gamma\delta^{pos}$  or TCR  $\gamma\delta^{neg}$  T cell subsets at day 4 following an initial stimulation with either PAg (BrHPP; 3  $\mu$ M) or anti-CD277 mAb (#20.1; 10  $\mu$ g/ml) in the presence of recombinant human IL-2. The values for the percentage of divided T cells are indicated. *Right*, frequencies of CD3<sup>pos</sup>V $\delta$ 2<sup>pos</sup> cells within fresh human PBMCs (n=3 healthy donors) at day 10 following an initial stimulation with either PAg (BrHPP; 3  $\mu$ M) or anti-CD277 mAb (#20.1; 10  $\mu$ g/ml) in the presence of recombinant human IL-2. Bar, mean value; \*\* p < 0.005, \*\*\* p < 0.0005. (B) Intracellular staining of IFN- $\gamma$  in freshly isolated CD3<sup>pos</sup> PBL subsets after treatment for 5 h with anti-CD277 mAb (#20.1; 10  $\mu$ g/ml), soluble PAg (BrHPP; 3  $\mu$ M) or PMA and ionomycin (PMA/Iono.). Numbers adjacent to outlined areas indicate the percentage of IFN- $\gamma^{pos}$  T cells. The data presented in this panel are representative of independent experiments performed with PBL from distinct healthy donors (n>3).



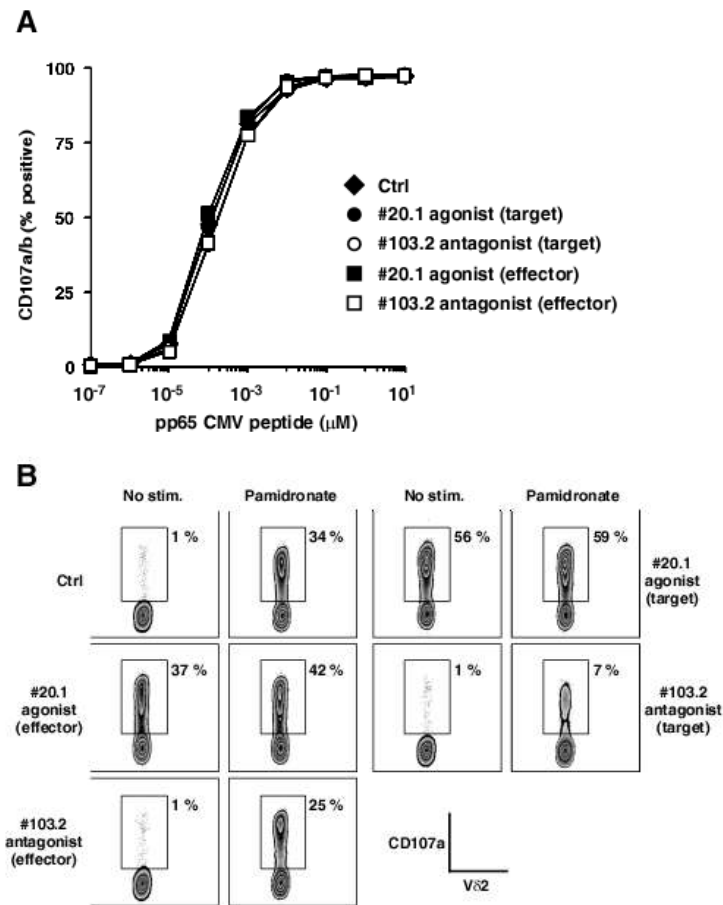
**Figure S2. Lack of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation by anti-CD277 mAbs, when immobilized on FcR1<sup>pos</sup> murine P815 cells.** Cytokine response of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (clone GR4) was measured following coculture with murine P815 cells, loaded with grading doses of either anti-CD277 (#20.1, mouse IgG1) or anti-CD3 (#UCHT1, mouse IgG1) mAbs (filled symbols). Controls: no preloading of P815 cells, cocultures performed in the presence of soluble mAbs (open symbols). Intracellular stainings of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  were performed and analyzed by flow cytometry. Data are presented in the graph as the percentage of IFN- $\gamma$ <sup>pos</sup> and TNF- $\alpha$ <sup>pos</sup>  $\gamma\delta$  T cells and are representative of at least 3 independent experiments.



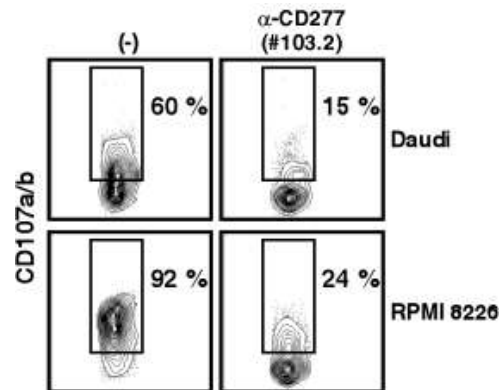
**Figure S3. Anti-CD277 mAbs trigger cytolytic activity of Vγ9Vδ2 T cells against various human target cells.** (A) Cytolytic responses of human Vγ9Vδ2 T cells (clone GR4) against Raji target cells (effector to target ratios: 15/1 and 5/1), pretreated for 2 h with grading doses of two clones of anti-CD277 mAbs (#7.2 and #20.1). IgG1, isotype control. (B) Cytolytic responses of Vγ9Vδ2 T cells (clone GR4) against various human target cells (effector to target ratios: 15/1), pretreated for 2 h by grading doses (0, 0.1, 1 and 10 μg/ml) of anti-CD277 mAb (#7.2). Data are presented as the mean value ± s.d. of triplicate samples. (C) Expression of CD107a/b on human αβ CD8<sup>pos</sup> and Vγ9Vδ2 T cells, expressing or not FcγR molecules following coculture with human B-LCL (CD20<sup>pos</sup>CD277<sup>pos</sup>) pretreated for 2 h with either anti-CD20 (Rituximab) or anti-CD277 (#20.1) mAbs. The surface expression of CD16 (FcγRIII), CD32 (FcγRII) and CD64 (FcγRI) molecules on effector αβ (pp65 CMV/HLA-A2-specific line αβ CD8<sup>pos</sup> T cell transduced, or not, for CD16 expression) and γδ (CD16<sup>neg</sup>, clone GR4; CD16<sup>pos</sup>, line GUI) T cells was checked by flow cytometry. The values for the percentage of CD107a/b<sup>pos</sup> T cells are indicated and each antibody was used at 0.3 μg/ml and 10 μg/ml.



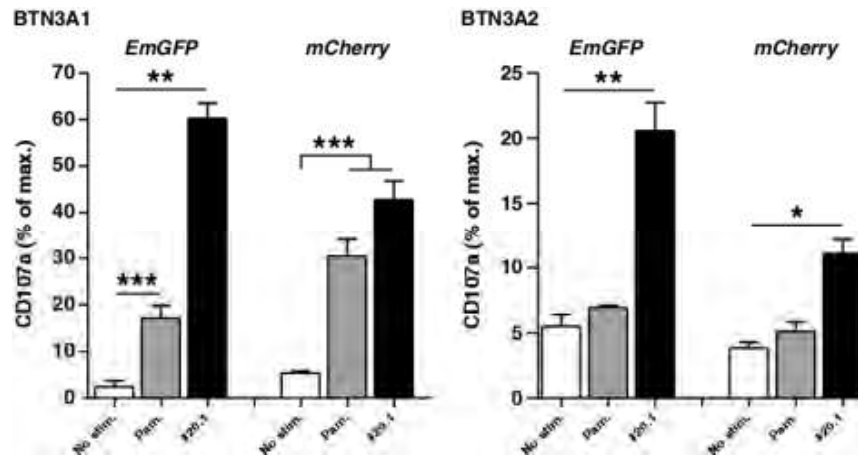
**Figure S4. Anti-CD277 mAbs trigger a TCR-mediated activation process similar to PAG but do not induce upregulation of PAG production and/or accumulation in target cells.** (A) Expression of CD69 on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR Jurkat T cell transductants following coculture with B-LCL target cells (line 721.221), pretreated for 2 h with anti-CD277 mAb (#20.1; 10  $\mu$ g/ml) or NBP (Pamidronate, 250  $\mu$ M). WT, control Jurkat T cells without TCR; V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR, Jurkat T cells expressing a wild-type V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>mut</sup> TCR, Jurkat cells expressing a V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR carrying a mutation for the V $\delta$ 2 chain L97 residue. Anti-CD3 (#OKT3; 10  $\mu$ g/ml). Data are presented as the mean value of geometric mean of fluorescence intensity (MFI)  $\pm$  s.d. of triplicate samples and are representative of at least three independent experiments. (B) CD107a/b surface expression on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells following coculture with Raji target cells pretreated for 2 h with either NBP (Pamidronate, 250  $\mu$ M) or anti-CD277 mAb (#20.1; 10  $\mu$ g/ml). The values for the percentage of CD107a/b<sup>pos</sup> T cells are indicated. (C) IPP and Apppl formation in human B-LCL or Raji cells treated overnight with NBP (Pamidronate, 250  $\mu$ M) or for 5 h with anti-CD277 mAb (#20.1; 10  $\mu$ g/ml). The molar amounts of IPP and Apppl were determined in cell extracts by using high performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry (detection limit: 30 fmole). The molar amounts of IPP and Apppl in extracts prepared from untreated B-LCL or Raji cells were below the detection limit. Data are presented as the mean value  $\pm$  s.d. (n>3). (D) Selective reaction monitoring chromatograms of extracts from Raji cells: untreated (-), treated overnight with NBP (Pamidronate, 250  $\mu$ M), pretreated first with mevastatin (25  $\mu$ M) for 6 h and next incubated overnight with NBP (Pamidronate, 250  $\mu$ M), and treated for 5 h with anti-CD277 mAb (#20.1; 10  $\mu$ g/ml). The chromatograms are drawn on the same scale.



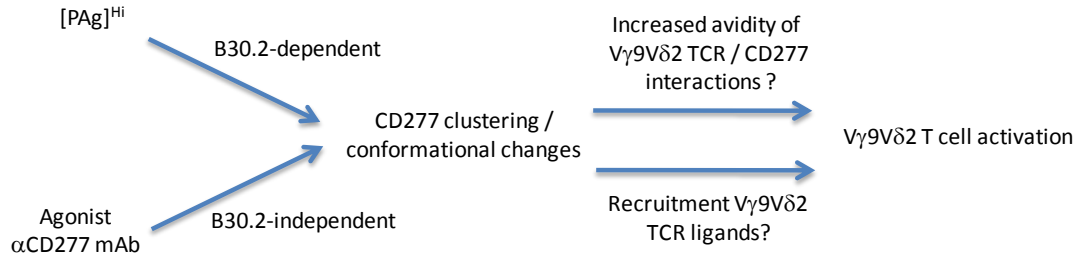
**Figure S5. Anti-CD277 mAbs do not affect activation of CD8<sup>pos</sup> αβ T cell clones by anti-CD3 mAb or a specific antigenic peptide.** (A) CD107a expression on human αβ CD8<sup>pos</sup> T cells (polyclonal line) following coculture with HLA-A2<sup>pos</sup> human B-LCL (line HEN) cells loaded with increasing concentrations of relevant peptide (CMVpp65/HLA-A2). (B) CD107a expression on human Vγ9Vδ2 T cells (line GUI) following coculture with Raji target cells, pretreated with NBP (Pamidronate, 100 μM). In both (A) and (B) experiments, effector T or target cells were treated, or not (Ctrl), with either agonist (#20.1; 10 μg/ml) or antagonist (#103.2; 10 μg/ml) anti-CD277 mAbs. The values for the percentage of CD107a<sup>pos</sup> Vδ2<sup>pos</sup> T cells are indicated. The data presented in this figure are representative of 3 independent experiments.



**Figure S6. CD277 plays a key role in V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell responses against susceptible tumor and infected human cells.** Expression of CD107a/b on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (clone GR4) following coculture with Daudi or RPMI 8226 tumor cells, in the presence or in the absence of #103.2 anti-CD277 mAb (10  $\mu$ g/ml). Numbers adjacent to outlined areas indicate the percentage of CD107a/b<sup>pos</sup>  $\gamma\delta$  T cells. The data presented in this figure are representative of >3 independent experiments performed with different human tumor cell lines.



**Figure S7. Functionality of fluorescent BTN3A1 and BTN3A2 chimeras.** CD107a expression on human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (polyclonal line) following coculture with shRNA#284 transduced-HEK293FT cells and transiently transfected for the expression of carboxyterminal EmGFP or mCherry-BTN3A1 (*left*) and -BTN3A2 (*right*) molecules. Cells were pretreated for 2 h with either anti-CD277 mAb (#20.1; 10  $\mu$ g/ml) or NBP (Pam., Pamidronate, 250  $\mu$ M). The values for the relative percentage of CD107a<sup>pos</sup> V $\delta$ 2<sup>pos</sup> T cells calculated by using the maximal response obtained, within each experimental test, by transfecting wild-type BTN3A1 molecules are indicated. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$  and \*\*\*\*  $p < 0.0005$  (Student's *t*-test).



**Figure S8. An hypothetical model for CD277-dependent activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells.** Activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells requires prior conformational modification and/or clustering of CD277 molecules, that can be induced either by intracellular accumulation of PAg or by agonist anti-CD277 mAb. Generation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell-stimulating CD277 complexes by PAg requires the B30.2 domain of BTN3A1, whereas generation of such complexes by agonist anti-CD277 mAb is B30.2 domain-independent. The topological changes of CD277 could either increase the affinity or avidity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR/CD277 interactions, or recruit additional receptors (eg F1-ATPase) recognized by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs, resulting in both cases to V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation.

## Article 2



# Molecules and mechanisms implicated in the peculiar antigenic activation process of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells

Christelle Harly<sup>1,2</sup>, Cassie-Marie Peigné<sup>3,4,5</sup> and Emmanuel Scotet<sup>3,4,5</sup>\*

<sup>1</sup> Laboratory of Genome Integrity, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA

<sup>2</sup> Department of Pathology and Laboratory Medicine, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

<sup>3</sup> Unité Mixte de Recherche 892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes Angers, INSERM, Nantes, France

<sup>4</sup> University of Nantes, Nantes, France

<sup>5</sup> Unité Mixte de Recherche 6299, Centre National de la Recherche Scientifique, Nantes, France

## Edited by:

Julie Dechanet-Merville, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), France

## Reviewed by:

David L. Wiest, Fox Chase Cancer Center, USA

Nadia Caccamo, University of Palermo, Italy

Matthias Eberl, Cardiff University, UK

## \*Correspondence:

Emmanuel Scotet, INSERM UMR 892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, IRS\_UN, 8 quai Moncousu, Nantes 44007, France  
e-mail: emmanuel.scotet@inserm.fr

In human beings, as well as in most non-human primates, the major peripheral  $\gamma\delta$  T cell subset, which accounts several percent of the whole lymphoid cells pool in adults, carries an heterodimeric TCR composed of V $\gamma$ 9 and V $\delta$ 2 chains. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells are specifically and strongly activated by small organic pyrophosphate molecules termed phosphoantigens (phosphoAg). These low molecular weight compounds are metabolites that are produced by either microbes or endogenously, as intermediates of the mammalian mevalonate pathway, and can accumulate intracellularly during cell stress like transformation or infection. Despite the characterization of numerous natural and synthetic phosphoAg, the mechanism(s) underlying the unique and specific antigenic activation process induced by these compounds remains poorly understood. Activation is both TCR- and cell-to-cell contact-dependent, and results of previous studies have also strongly suggested a key contribution of membrane-associated molecules of primate origin expressed on target cells. The recent identification of B7-related butyrophilin (BTN) molecules CD277/BTN3A, and more precisely their BTN3A1 isoforms, as mandatory molecules in the phosphoAg-induced recognition of target cells by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells opens important opportunities for research and applications in this field. Here, we review the unusual and complex antigenic reactivity of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. We highlight the recent advances in our understanding of this process, and propose a model that integrates the type I glycoprotein BTN3A1 and its intracellular B30.2 domain as a physical intermediate implicated in the detection of dys-regulated intracellular levels of phosphoAg and the sensing of cell stress by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T cells. A better understanding of this mechanism will help optimize novel immunotherapeutical approaches that utilize the unique functional potential of this major  $\gamma\delta$  T cell subset.

**Keywords: human  $\gamma\delta$  T lymphocytes, functions, antigenic activation, phosphoantigens, butyrophilin**

## $\gamma\delta$ T CELLS AS MANDATORY T CELL SUBSETS OR EVOLUTIONARY RELICS?

T cells are critical component of the adaptive immune system and are essential for defense against foreign organisms and self-dysregulation. T cells can be divided into two lineages, according to the composition of their T cell receptor (TCR). While most  $\alpha\beta$  T cells recognize peptidic antigens (Ag) bound to highly polymorphic major histocompatibility complex (MHC) molecules and are qualified as conventional T cells, several T cell subsets react against conserved non-peptidic Ag. Like other adaptive immune effectors, these latter non-conventional or innate-like T cells express clonally distributed Ag recognition receptors, made of either  $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$  TCR subunits, which are associated to subunits of the CD3 signal transduction complex at the cell membrane. The ontogenic and developmental features of  $\gamma\delta$  T cells, which have been extensively reviewed elsewhere (1–4), will be summarized here. During thymic ontogeny,  $\gamma\delta$  T cells emerge before  $\alpha\beta$  T cells and are predominant at early stages of fetal development (embryonic days from 14 to 18 in mice). One of the striking hallmarks

that distinguish  $\gamma\delta$  from  $\alpha\beta$  T cell subsets is their potential for TCR structural diversity, which is considerable despite a highly restricted V gene repertoire. However, this very limited combinatorial diversity of  $\gamma\delta$  TCR is efficiently counterbalanced by extensive junctional diversity, due to removal or addition of non-germline-encoded nucleotides at V-(D)-J junctions and alternate D segments reading frames, which allows the generation of a  $\gamma\delta$  TCR diversity greater than that of conventional  $\alpha\beta$  T cells (theoretically  $\sim 10^{16}$  in rodents and human). The extent of TCR junctional diversity can greatly vary from one  $\gamma\delta$  T cell subset to another, with several populations expressing highly conserved so-called “invariant” TCRs in some tissue locations, as it is the case for murine V $\gamma$ 5V $\delta$ 1 or V $\gamma$ 6V $\delta$ 1 T cell subsets. An important feature of  $\gamma\delta$  T cells is the preferential expression of TCR V regions in distinct tissue locations. In human beings, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells are preferentially found in the peripheral blood where they represent more than 80% of  $\gamma\delta$  T cell pool, and about 5% of the CD3<sup>+</sup> cells in healthy adults. By contrast, V $\delta$ 2<sup>−</sup> subsets, such as V $\delta$ 1<sup>+</sup> and V $\delta$ 3<sup>+</sup> subsets, are mainly detected in epithelial tissues (e.g., epidermis and

mucosa), spleen, thymus, and liver. The preferential localization of  $\gamma\delta$  T cell subsets might be explained by their capacity to be activated and to expand upon recognition of specific ligands whose expression would be restricted to particular tissues, or to specific homing capacities acquired during intrathymic development (5). In agreement with a peripheral tissue expansion process, absolute numbers of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells steadily increase in blood during the first years of life as the diversity of their TCR repertoire decreases.

Strikingly and in contrast to mice and humans,  $\gamma\delta$  T cells often represent the major circulating lymphocytes in cattle, sheep, pigs, and birds (6), which strengthen the idea that  $\gamma\delta$  T cells play a critical role in immune responses to cell stress and infections. However, since the initial characterization of  $\gamma\delta$  T cells in the late 1980s, the *raison d'être* of this mysteriously distinct subset of CD3<sup>+</sup> T cells within evolved vertebrate species (such as primates and rodents), which already carry innate and adaptive immunity cell subsets, remains unclear. A recent study has revealed that the genetic programs for two primordial T cell-like lineages, oddly similar to  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells, and one B cell-like lineage are found in several species of jawless vertebrates devoid of RAG recombinase and MHC molecules (7). It is not known whether a tripartite adaptive immune system was already present in a common vertebrate ancestor 500 millions years ago, and diverged since then along two distinct phylogenetic lineages, or it appeared two times independently by convergent evolution. Yet this finding strongly argues for a unique role of  $\gamma\delta$  T cells, as effectors of the transitional immunity endowed of unique functional properties and/or antigenic specificities.

#### FUNCTIONAL FEATURES AND ANTIGENIC SPECIFICITIES OF $\gamma\delta$ T CELLS

$\gamma\delta$  T cells have been characterized for their ability to deliver a broad array of effector functions upon activation *in vitro* and *in vivo*. Numerous studies mostly performed in mice, human beings, and non-human primates, indicate that  $\gamma\delta$  T cells are implicated in the control of infectious (e.g., bacteria, virus, parasite) diseases, tumor development, homeostasis, wound healing, and tissue repair. The functional features of  $\gamma\delta$  T cells have been recently and extensively reviewed elsewhere (3, 4, 8) and will not be detailed in this review.

$\gamma\delta$  T cells, including human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, can directly kill and eliminate infected, activated, or transformed cells and contribute to pathogen clearance. In these physiopathological contexts, activated  $\gamma\delta$  T cells engage pathways associated to the release of cytotoxic and bacteriostatic molecules such as perforin, granzymes, granulysin, and defensins, death-inducing receptors and TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors.  $\gamma\delta$  T cells are also able to produce modulatory cytokines that play a key role against intracellular pathogens and the promotion of inflammation (e.g., TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), extracellular bacteria, fungi (e.g., IL-17), and parasites (e.g., IL-4, IL-5, IL-13).  $\gamma\delta$  T cell-released cytokines and factors might have beneficial or deleterious effects according to the physiopathological context. As an example, activated  $\gamma\delta$  T cells are able to downmodulate immune responses (e.g., TGF- $\beta$ , IL-10), to promote tissue healing, epithelia repair, and cell survival. Interestingly, studies have shown that activated  $\gamma\delta$  T cells can promote dendritic cells (DC) maturation through the release

of type I and type II IFNs, which underlies their adjuvant role played for the control of infections (9–12). Unexpectedly, some  $\gamma\delta$  T cell subsets, like human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, could also constitute a novel type of professional APC that would elicit CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T cell responses through the acquisition of a DC-like phenotype upon antigenic activation (13). Whether or not such function is found in other human and murine  $\gamma\delta$  T cell subsets remains to be assessed. To date, none of the broad functional features described for  $\gamma\delta$  T cells is specific to this T cell subset. Conjugated attempts of many laboratories failed to clearly establish and define common functional features of  $\gamma\delta$  T cells that would basically distinguish them from conventional and innate-like  $\alpha\beta$  T cells. Taken together, these observations suggest that most of the key contribution of the functional responses displayed by activated  $\gamma\delta$  T cells might rather rely on the tight regulation of their kinetics of activation as well as the ability of these innate-like T cell subsets to be present “at the right time, in the right place.” The unique Ag specificities of  $\gamma\delta$  T cells could also significantly account for their “programed” distribution within organs and tissues and their striking evolutionary conservation aside from T and B cell subsets which also assemble their Ag-receptor genes through recombinatorial rearrangement.

One particularly attractive hypothesis to account for the remarkable species and inter-individual conservation of  $\gamma\delta$  T cells, as well as the lack of functional redundancy with  $\alpha\beta$  T and B cells, is that this former subset, like an intermediate “T–B hybrid” cell type, might be rather designed for an efficient and unique mode of recognition of a broad set of conserved native Ag (e.g., proteins, lipids, carbohydrates) or complexes. In such contexts, this set of Ag either directly interact with  $\gamma\delta$  TCR or are presented by non-polymorphic MHC-related or yet unknown presenting molecules. In line with this hypothesis, the structure of  $\gamma\delta$  TCR heterodimers suggests that these molecules display immunoglobulin (Ig)-like recognition features, which strengthen the idea for alternative modes of Ag recognition by  $\gamma\delta$  TCRs (14). This view is supported by both the diversity and the nature of  $\gamma\delta$  TCR agonist molecules already identified, as well as by the direct reactivity of  $\gamma\delta$  T cells and B cells against similar native molecules (e.g., F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATP synthase, phycoerythrin) (15, 16).

$\gamma\delta$  T cells are key players in the immune surveillance of cellular distress, owing to their general ability to recognize Self determinants that are frequently upregulated in contexts of inflammation, infection, or cancer. While  $\gamma\delta$  TCR contribute to detection of danger-associated molecular patterns, cognate interactions between  $\gamma\delta$  TCR and defined Ag have been reported in a few cases only. As for some other innate-like cell subsets,  $\gamma\delta$  T cells can be activated, in a cell-to-cell contact but classical MHC-independent manner, by small molecules or intact proteins without requirement for a processing similar to the conventional  $\alpha\beta$  T cells Ag. Strikingly, while  $\gamma\delta$  T cells can respond to different stimuli in various physiopathological contexts, a substantial fraction of the physiological murine and human  $\gamma\delta$  TCR ligands characterized so far fall into the large MHC class I-related molecules family (e.g., T10-T22, MICA/B, CD1c, CD1d, EPCR) (17–21). Moreover the activation of  $\gamma\delta$  T cells subsets by some of these molecules might be dependent on their ability to present specific ligands such as lipids (e.g., EPCR, CD1d).

### THE HISTORY OF PHOSPHOANTIGENS AND THE FIRST IDENTIFICATION OF NATURAL HUMAN Vγ9Vδ2 T CELL AGONIST MOLECULES

In humans, as well as in most non-human primates, the major peripheral γδ T cell subset in adults carries a TCR composed of a Vδ2 chain systematically paired to a Vγ9 chain (using the nomenclature of Lefranc and Rabbitts (22), also referred to as Vγ2 by using the Seidman and colleagues nomenclature). This γδ T cell subset represents about 5% of CD3<sup>+</sup> cells within human peripheral blood and more than 80% of the peripheral γδ T cell population in healthy adults. After the fortuitous discovery of γδ T cells and the subsequent generation of monoclonal antibodies (mAbs) specific for human γ or δ TCR chains, high frequencies of Vγ9Vδ2 T cells were reported within peripheral blood or lesions from patients infected by a variety of bacteria (e.g., *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*) and protozoans. Accordingly, Vγ9Vδ2 T cells efficiently responded to mycobacterial extracts *in vitro*, which contained small non-peptidic compounds (protease-resistant) that also bind to lectins. The isolation and characterization of the stimulatory fractions within these extracts led to the identification of various agonist low molecular weight carbohydrate compounds that were structurally related to phosphoesters and depend on the presence of phosphate moieties for their bioactivity (23–26). IPP (isopentenyl pyrophosphate) from *M. smegmatis* was identified as the first natural agonist for Vγ9Vδ2 T cells. This compound, and its isomer DMAPP (dimethylallyl pyrophosphate), were called phosphoAg, a family of compounds including the *E. coli* and *mycobacteria*-derived (2E)-1-hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphate (HDMAPP), also known as (E)-4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl pyrophosphate (HMBPP), and additional natural molecules produced by many microorganisms and plants (27–30) (Figure 1). Reports also indicated that Vγ9Vδ2 T cells are efficiently activated by a broad array of human tumor cells, such as lymphoma and carcinoma. The Vγ9Vδ2 T cells antigenic molecules from tumor cells were identified as IPP and DMAPP phosphorylated metabolites of the isoprenoid mevalonate (MVA) biosynthesis pathway, which is implicated in cholesterol synthesis (31). Accordingly, pharmacological MVA pathway inhibitors acting upstream (e.g., statins) or downstream (e.g., alkylamines; aminobisphosphonates, NBP) of phosphoAg biosynthesis, respectively, decrease or increase Vγ9Vδ2 T cell activation (32). Whereas most eukaryotic cells, fungi and archaeobacteria produce isoprenoids through the MVA pathway, most of eubacteria, cyanobacteria, and algae protozoa synthesize isoprenoids through a related biosynthesis pathway referred to as the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DOXP) or 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway (33). HDMAPP produced through the DOXP pathway remains the most potent natural Vγ9Vδ2 activator so far identified (bioactivity of 0.1 nM, which is 30,000 times more potent than IPP). This suggests that this highly potent microbial phosphoAg, rather than endogenous phosphoAg such as IPP, would account for the highly sensitive sensing by Vγ9Vδ2 T cells of infected cells or pathogens using the DOXP/MEP pathway. The efficiency of the microorganisms recognition process by γδ T cells was linked to their DOXP/MEP isoprenoid synthesis pathway (34). Accordingly, the genetic manipulation of the DOXP/MEP pathway in bacteria, similarly to the pharmacologic

| Phosphoantigens                                                                                                     | EC50      | Molecule | Type                                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|----------|-------------------------------------------|
| IPP<br>Isopentenyl pyrophosphate                                                                                    | 50–500 μM |          | Natural<br>(Vertebrate and microorganism) |
| DMAPP<br>Dimethylallyl pyrophosphate                                                                                | 0.23 μM   |          | Natural<br>(Vertebrate and microorganism) |
| HDMAPP / HMBPP<br>(2E)-1-hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphate / (E)-4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl pyrophosphate | 39–70 pM  |          | Natural<br>(Microorganism)                |
| C-HDMAPP<br>(2E)-1-hydroxy-2-methylpent-2-enyl-pyrophosphate<br>Picostim                                            | 91 pM     |          | Synthetic                                 |
| BrHPP<br>Bromohydrin of isopentenyl pyrophosphate<br>Phosphostim                                                    | 20–50 nM  |          | Synthetic                                 |

**FIGURE 1 | Examples of characterized phosphoantigens that induce Vγ9Vδ2 T cell activation.** These listed phosphoAg are either from natural or synthetic origin. They induce different range of activation with EC<sub>50</sub> value for Vγ9Vδ2 T cell activation that can vary between different human donors. From Ref. (36, 39, 64, 97).

manipulation of the MVA pathway in human cell lines, regulates the production of these microbial phosphoAg which resulted in the modulation of the antigenic activation of Vγ9Vδ2 T cells (34, 35).

Research groups have next attempted to define the chemical basis and structure-to-functions relationships for the antigenicity of phosphoAg. These studies first reported that the substitution of phosphate for the pyrophosphate moiety or the elimination of the double bond reduced antigenic bioactivity of these compounds (24). As synthetic phosphoAg have been further produced and tested (e.g., BrHPP for bromohydrin pyrophosphate), these various molecules were compared to the natural ones (Figure 1) and next classified from an antagonist or weak, medium to a strong agonist bioactivity on Vγ9Vδ2 T cell activation (27, 36). These studies indicate that agonist or antagonist bioactivity of these compounds correlates with the extent and kinetics of pyrophosphate dephosphorylation (also referred to as β-phosphate cleavage) and alteration of their organic segment. Interestingly, a fast extracellular acidification measured after cell exposure to soluble agonist phosphoAg was reported (37, 38). As the phosphonate moieties are less susceptible to chemical or enzymatic hydrolysis than their corresponding phosphate counterparts, some groups have also synthesized phosphonate and pyrophosphonate analogs that could have improved pharmacological properties linked to an increased stability in biological media (39).

The specific and efficient activation of primate Vγ9Vδ2 T cells induced by isoprenoid phosphorylated compounds provides an attractive unified explanation for the unique and broad reactivity of this T cell subset in infectious and tumor contexts. However, the mechanism(s) of this highly conserved and uncommon specific antigenic recognition process by Vγ9Vδ2 T cells has remained puzzling and ill defined.

### A PECULIAR MODE OF V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T CELL ACTIVATION INDUCED BY PHOSPHOANTIGENS?

The unique ability of primate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells to specifically sense very subtle variations of phosphoAg levels in various physiopathological contexts such as infections and cancer highlighted the importance of the role played by the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR molecules in this process. Indeed, correlative studies have initially reported the specific activation of human T lymphocytes expressing a V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR by Daudi Burkitt's lymphoma cells and mycobacteria (40, 41) and a direct contribution of germline residues specific to V $\gamma$ 9, V $\delta$ 2, and J $\gamma$ P elements to this recognition process (42). Altogether, these studies suggested that the antigenic activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells induced by phosphoAg is mediated by germline-encoded segments of the  $\gamma\delta$  TCR. The  $\gamma\delta$  TCR dependence of phosphoAg-induced T cell reactivity, also supported by the effects of  $\gamma\delta$  TCR blocking mAbs (23, 24, 26), has been finally demonstrated by the results of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR transfer experiments (43). Indeed, the transfection of a V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR in human Jurkat T cells enabled these cells to produce IL-2 in response to Daudi human tumor cells, mycobacterial extract, and soluble phosphoAg. Taken together with additional observations (44–46), this indicated that expression of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR is necessary and sufficient for the efficient sensing of identical, or structurally related, Ag from mycobacterial extracts, tumor cells, NBP-sensitized cells and synthetic soluble phosphoAg. Accordingly, events and signaling pathways classically triggered in T lymphocytes upon TCR-dependent activation (e.g., Erk and p38 MAPK pathways) were also reported for phosphoAg-induced activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (47–50).

Various mechanisms have been proposed to account for the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-dependent sensing of phosphoAg that triggers strong activation of  $\gamma\delta$  T lymphocytes. In a first hypothesis, soluble phosphoAg, as fully conserved native molecules, which are released by microbes or mammalian target cells (e.g., from tumor or NBP-treated cells) could directly, and specifically, interact with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR heterodimers to trigger  $\gamma\delta$  T lymphocyte activation. This process would rely on both the bioactivity and the concentration of the released compounds. This direct interaction model is supported by: (i) the 3D structural features of a V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR together with the results of  $\gamma\delta$  TCR transfer/mutagenesis experiments that revealed the existence of a putative “binding” groove that could accommodate small (1–3 kDa) negatively charged phosphoAg (14) and, (ii) a mandatory role of the junctional region of the TCR  $\gamma$  chain (51) and the contribution of key conserved residues such as: lysine residue in the  $\gamma$  chain CDR3 loop, an arginine residue in CDR2 $\delta$ , and an aliphatic amino acid residue in CDR3 $\delta$  (52, 53). However, all attempts to biophysically or biochemically demonstrate any direct phosphoAg/V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR interactions have failed so far (14, 54) and additional key observations, such as the cell-to-cell contact requirement for the activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells by soluble phosphoAg (55, 56) do not favor a direct recognition process.

### THE HUNT FOR UNKNOWN PHOSPHOANTIGEN-PRESENTING MOLECULE(S)

On the basis of these last observations, non-exclusive molecular events were proposed to account for the necessity of cell-to-cell contacts for phosphoAg-induced V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation, such

as: (i) a “stabilization” of native or modified membrane-bound phosphoAg on target cells surface that would be required for protection against degradation by extracellular phosphatases, (ii) a topological clustering/aggregation of phosphoAg and/or their co-localization with key membrane-associated molecules (e.g., adhesion, NKR) for an efficient cross-link of the  $\gamma\delta$  TCR.

The critical contribution of species-specific Ag-presenting cells has been evidenced, meaning that only cell-to-cell contact with human, and some non-human primate cells, are able to trigger a phosphoAg reactivity of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (57, 58). This restriction indirectly suggested the requirement for species-specific determinants and, as primate phosphoAg-sensitized cell lines lose their ability to efficiently activate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells upon protease treatments, these key surface determinants were characterized as membrane-associated proteins (59). Several adhesion and costimulation molecules (e.g., ICAM-1, CD166) have been proposed to account, at least partially, for these requirements (57, 58). However, human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR transfer into murine T cell lines was shown to be sufficient to trigger phosphoAg reactivity against human, but not rodent target cells (60, 61) (C. Harly & E. Scotet, *unpublished observations*). Additionally, macaque V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR tetramers were shown to bind to human, but not mouse cell surface upon phosphoAg treatment. In agreement with the contribution and the protein nature of key cell surface determinants, this binding was abrogated by protease pre-treatments of the target cells (59). Altogether, these results underlined the critical requirements of primate cell membrane-expressed determinants of protein nature, specifically recognized by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. The contribution of these unknown molecule(s) was further supported by a study uncovering the role of all the CDRs of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR in the recognition of phosphoAg-sensitized cells, thus suggesting a large contact surface with a putative antigenic complexes/molecules, and not only small phosphorylated compounds (62). Additionally, the existence of “phosphoAg-presenting molecules” was supported by the characterization of photoaffinity prenyl pyrophosphate Ag (analogs of HMBPP), designed to form covalent bounds with close proximity molecules after UV-treatment. This study suggests that such molecules stably associate to broadly distributed, functionally non-polymorphic, and not known Ag-presenting molecule(s) on human target cells and activate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (63). At last, the generation and the functional characterization of various synthetic compounds analogous to phosphoAg has revealed that some of them were not only unable to efficiently activate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, but could specifically interfere with the stimulating activity of phosphoAg (37, 63, 64). Similarly, IPP could efficiently inhibit the stable association of photoaffinity prenyl pyrophosphate Ag to primate target cells (63). These observations could reflect the existence of competition mechanisms established between phosphoAg (e.g., IPP) and analogs for a limited number of binding sites on the same unidentified molecule(s) expressed by target cells.

PhosphoAg recognition has been described to be an extremely rapid process ( $\sim 10$  s) and is not abrogated by glutaraldehyde fixation of the target cells (36, 55). In contrast, the antigenic activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells by NBPs or alkylamines is indirect and mediated by the intracellular accumulation of IPP (31, 65, 66). It remains unclear how intracellular IPP is detected at the cell surface.

Whether phosphoAg are transported, exported (e.g., intracellular IPP) outside or internalized inside (e.g., extracellular HMBPP) the target cells, specifically or not, anchored or adsorbed on target cell surface, whether they interact with yet unknown ubiquitous surface molecule or whether they rapidly regulate the expression/conformational changes of determinants that are detected by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR remains open.

Taken together, the previous findings would tend to rule out a “simple” direct recognition process of phosphoAg by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, and lead to hypothesize the existence of a “phosphoAg-presenting molecule(s)” of protein nature, ubiquitously expressed on the surface of primate cells. However, such molecule(s) was never identified, and, as we will see in the second part of this review, more recent works strongly suggest an alternative model for phosphoAg sensing by human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells.

### **BTN3A1, AN UBIQUITOUS CELL SURFACE-EXPRESSED HUMAN BUTYROPHILIN MOLECULE, PLAYS A MANDATORY ROLE FOR THE ACTIVATION OF HUMAN V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T CELLS INDUCED BY PHOSPHOANTIGENS**

Recently, our group has clearly demonstrated for the first time the specific and mandatory role played by BTN3A1, a type I glycoprotein expressed on target cells, in the phosphoAg-induced reactivity of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (60). BTN3A1, -A2, and -A3 constitute the BTN3A (also known as CD277) subfamily of butyrophilins (BTN) molecules. These three isoforms are encoded by three distinct genes, found in human and some non-human primates. *Btn* genes constitute a subgroup of at least 10 genes in most species. Eleven of them have been identified in mouse, and 13 in human, where they are located in the MHC class I region of chromosome 6p. Notably, BTN family is member of the Ig superfamily and shares structural homology with B7 family members at extracellular domain level (mostly composed of Ig-like domains referred to as IgV and IgC domains) (67). Phylogenetically, BTN molecules share a common ancestor with the B7 family, initially suggesting that they could have immunological functions (68).

The functions of BTN molecules as well as their molecular partners remain ill defined. The eponymous BTN gene, *BTN1A1*, is highly expressed in the lactating mammary glands (secretory epithelium) and represents the major protein associated with fat droplets in milk. BTN1A1 has been reported to mainly play a role in the regulation of the amount of lipids and size of droplets expressed in milk of mammals (69). This function is linked to its intracellular B30.2 domain, which has been shown to bind xanthine oxydoreductase and stabilize its association with the milk fat globule membrane (70). A few studies have reported immunological functions for some human BTN members such as BTN1A1, BTN2A2 and BTN3A molecules that can regulate cellular immunity and T/NK cells activation (67, 71–75). As compared to BNT1A1, human BTN2A and BTN3A are widely expressed in many tissues (76). The ectodomains of the three isoforms of BTN3A consist of two domains, so-called IgV and IgC that have a very high homology (>95%). On the other hand, the intracellular domain B30.2 (PRY/SPRY) is only present in BTN3A1 and BTN3A3 and poorly conserved. BTN3A1 is ubiquitously expressed in human beings (75, 77) and homologs are found in all primates carrying V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (78). Strikingly, BTN3A orthologs are

not found in the rodent lineage, which also lacks V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell counterparts specific for phosphoAg. The emergence of TCR V $\gamma$ 9, V $\delta$ 2, and BTN3 genes with eutherian placental mammals has been recently reported (79). This recent study suggests a strong evolutionary functional link between the expression of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR and BTN3 proteins.

Our study shows a mandatory role for the BTN3A1 isoform in the specific detection of human distressed cells (e.g., tumor and mycobacteria infected cells) by human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, which strongly suggested that BTN3A1 molecule represent a major species-specific determinant regulating the antigenic reactivity of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (60). This work demonstrates that BTN3A1 does not act as a key costimulatory or adhesion molecule but as a mandatory protein for the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-dependent phosphoAg-mediated recognition of target cells. Furthermore, our data indicate that BTN3A1 expression is necessary for the recognition of human target cells by baboon V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, and that antigenic activation of baboon V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, induced by either human or baboon cells is abrogated by a blocking anti-BTN3 mAb (C. Harly & E. Scotet, *unpublished observations*), which is fully in line with the evolutionary functional link between the expression of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR and BTN3 proteins. It will be interesting to extend these observations to other V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 expressing species, including the non-primate ones, such as alpaca (79) to either strengthen or challenge this functional link. Importantly, several groups (61) (C. Harly & E. Scotet, *unpublished observations*) have reported that the expression of BTN3A1 is probably not sufficient to induce the recognition of rodent target cells by human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, even when co-expressed with key human adhesion molecules (e.g., ICAM-1). In contrast, transferring a 27.4 megabases region of the human chromosome 6p including BTN3A1 could confer to a mouse cell line the ability to activate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells in the presence of phosphoAg (61, 80). This suggests that additional species-specific partner molecules encoded on the human chromosome 6p, together with BTN3A1, are required for ensuring its functional activity.

### **THE INTRACELLULAR B30.2 DOMAIN OF BTN3A1 BINDS PHOSPHOANTIGENS AND MEDIATES THEIR SENSING BY V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T CELLS**

While other molecules involved in the phosphoAg-mediated recognition of target cells by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes remain to be identified, the physical and chemical features of BTN3A1 already shed light on possible mechanism(s) taking part to this process. BTN molecules comprise two extracellular Ig-like domains, a single pass transmembrane domain, and, for some members including BTN3A1 and BTN3A3, a B30.2 (SPRY/PRY)-related intracellular domain (67). The mandatory role played by BNT3A1 isoform during antigenic activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, but not BTN3A2 or BTN3A3, first suggested that the highly conserved extracellular region (>95%) of BTN3A1 unlikely accounts for its functional specificity in phosphoAg-mediated activation. In line with this assumption, we next showed, by swapping the domains between BTN3A isoforms, that the intracellular portion of BTN3A1 is necessary for BTN3A1 to mediate phosphoAg stimulation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, and is sufficient to confer this properties to the inactive isoform BTN3A3 (60). Therefore this finding highlights a crucial

and specific contribution for the intracellular B30.2 domain of BTN3A1.

These results have been very recently confirmed and extended by a joined study from the group of E. J. Adams and ours. In this work, a set of structural, molecular and cellular approaches has been performed to unambiguously demonstrate the direct interaction between phosphoAg and the N-terminal part of the intracellular domain B30.2 of BTN3A1, through a positively charged pocket (81). Each of the pyrophosphate compound that activate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells bind the B30.2 domain of BTN3A1, but not the B30.2 domain of BTN3A3, and their agonist potency is directly correlated with their binding intensity. Strikingly, comparative sequence analysis between the B30.2 domains of BTN3A1 and BTN3A3 isoforms identified a putative Histidine residue specific to BTN3A1 (replaced by an Arginine at this position in BTN3A3). Structural, biochemical, and functional assays show that this residue is required for the binding of phosphoAg to BTN3A1 B30.2, and their V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-stimulating activity. These observations, which have been confirmed by other groups (64, 82), indicate that internal sensing of changes in phosphoAg metabolite concentrations by BTN3A1 molecules represent a critical step in V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell detection of infection and tumorigenesis.

#### PHOSPHOANTIGENS ACT INTRACELLULARLY AND THEREFORE ARE NOT *BONA FIDE* V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T CELL ANTIGENS

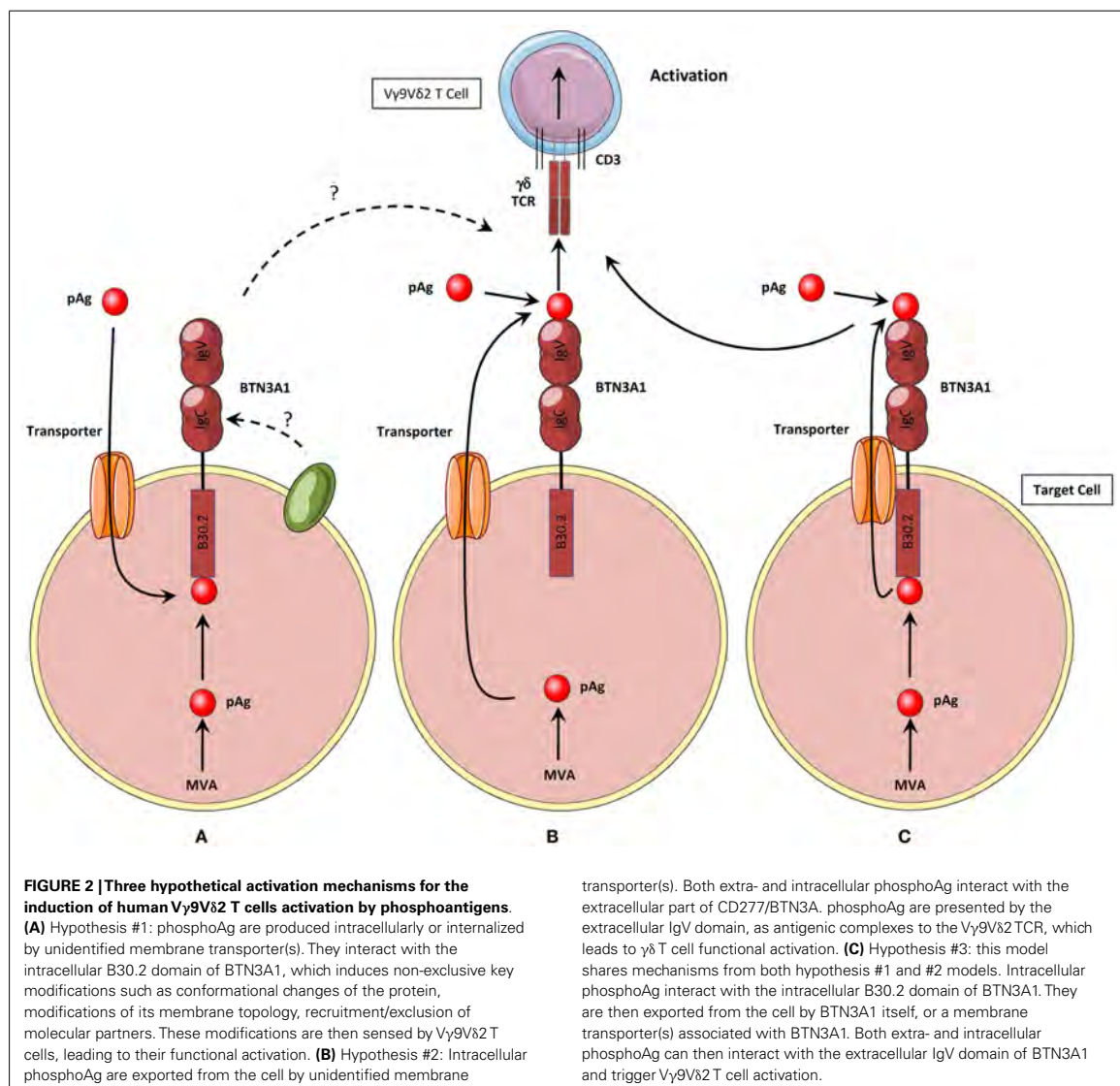
The direct physical and functional link established between the intracellular phosphoAg and the transmembrane protein BTN3A1 represents a tremendous advance in deciphering how primate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells can exquisitely sense the dysregulation of intracellular phosphoAg levels by scanning the surface of distressed target cells. However, many key issues remain to be solved to fully understand the fine modalities of this process, summarized in **Figure 2A**. How is the intracellular interaction between pyrophosphate compounds and intracellular B30.2 domain translated to the cell surface? Which cell surface determinants are finally detected by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells? How exogenous phosphoAg efficiently “sensitize” target cells through BTN3A1, while the negative charge of their phosphorylated moieties unlikely allows them to passively cross the plasma membrane, and their mode of action was proposed to be independent of any active processing machinery (55, 63)?

A recent study from the group of G. De Libero has proposed an attractive model for BTN3A1 function, which would resolve some of these issues. Endogenous and exogenous phosphoAg would be directly first loaded on the extracellular portion of BTN3A1 and this complex would next directly interact with the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR (80) (**Figure 2B**). This study provide molecular and cellular evidences for a direct interaction between phosphoAg, the extracellular IgV domain of BTN3A1, and the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR therefore supporting the appealing assignment of BTN3A1 as a classic Ag-presenting molecule for pyrophosphate compounds. However, this model appears to be insufficient to explain several key experimental observations, such as the specific requirement for BTN3A1 isoform, but not for the BTN3A2 and BTN3A3, whereas the extracellular domain of the three proteins is highly homologous, especially within the area composed of the candidate binding residues for phosphoAg, which are shared between BTN3A1 and BTN3A2. More importantly, this model also does not take in

account the mandatory role of the intracellular B30.2 domain of BTN3A1 in this process. A hypothesis that could reconcile some of the features seemingly contradictory between these two models would be that BTN3A1 itself is a transporter molecule, or closely associated with one. In this model, BTN3A1 would interact with both intracellular and extracellular phosphoAg through, respectively, its B30.2 domain and its extracellular IgV domain. This latter one would next serve for the presentation of both type of phosphoAg to V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (**Figure 2C**). However, the ability of the extracellular part of BTN3A1 to bind phosphoAg and interact with the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR has not been confirmed by either biochemical or functional analysis (61, 64, 81, 82) (C. Harly & E. Scotet, *unpublished observations*). Taken together, the studies performed so far indicate that phosphoAg-induced sensing of target cells is mediated by the BTN3A1 intracellular B30.2 domain for both endogenous and exogenous phosphoAg (**Figure 2A**). As these results failed to demonstrate any direct contribution (e.g., interactions) of the extracellular region of BTN3A1 in this process, they would rather support a model in which phosphoAg are not directly recognized by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, and therefore are not *bona fide* V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 Ag.

An important issue raised from this assumption concerns the requirements for the internalization of exogenous phosphoAg within the cells, through the plasma membrane. Early evidence did not support the existence of such a process: (i) the negative charge of phosphoAg does not allow them to passively cross the plasma membrane, (ii) phosphoAg do not seem to require any active internalization or processing for triggering V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation (55, 63), (iii) the very fast kinetics of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation induced by phosphoAg suggest they are readily active at the extracellular level (37, 38, 47, 49). The mode of intracellular action of negatively charged exogenous phosphoAg has been recently addressed in a cellular approach (64). In this elegant study, synthetic pro-phosphoAg was designed to allow their passive diffusion through the plasma membrane, in an inactive protected state. After cleavage of the protective groups by intracellular esterases, active phosphoAg were released and were unable to leave the cytoplasm. The results clearly show that these highly bioactive compounds bind the intracellular domain of BTN3A1. Additionally, the intracellular uptake of pro-phosphoAg was confirmed by a long-term effect of the pro-drug on target cell sensitization after washes. Therefore, these results strongly support a unified mode of action of phosphoAg to trigger V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation, regardless of their endogenous, exogenous, intracellular, and extracellular origin.

Thus, phosphoAg would act intracellularly in target cells and their direct interaction with the B30.2 domain of BTN3A1 would be next sensed by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. This model, as well as the alternative ones, relies on the existence and the contribution of additional molecular player(s), involved in either the uptake of extracellular phosphoAg, or the release of intracellular phosphoAg (**Figure 2**). Whether this process is active or not, phosphoAg-specific or not, and can impact the quality and the magnitude of the functional activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells remains to be determined. The identification of yet unknown membrane-associated transporter molecule(s) should greatly help understanding of the mode of phosphoAg action.



### RE-ORGANIZATION OF CELL SURFACE MOLECULES INDUCED BY INTERACTIONS BETWEEN PHOSPHOANTIGENS AND THE BNT3A1 INTRACELLULAR B30.2 DOMAIN?

This model of intracellular detection of phosphoAg raises the key question of the nature of molecular events implicated in the sensing of this process by Vγ9Vδ2 T cells. This binding of phosphoAg to the B30.2 domain of BTN3A1 should be somehow “translated” to the cell surface of target cells, in order to be detected by Vγ9Vδ2 T cells. An interesting clue for deciphering this mechanism comes from the observation that some mAbs specific of the extracellular region of BTN3A can precisely mimic the phosphoAg-induced recognition of target cells by Vγ9Vδ2 T cells (60, 83). Additionally,

some anti-BTN3 mAbs abrogate both phosphoAg- and agonist anti-BTN3 mAbs-induced recognition of target cells by Vγ9Vδ2 T cells. This suggests similar mechanisms of sensitization of target cells induced by both phosphoAg and agonist anti-BTN3 mAbs. Interestingly, the sensitization of target cells induced by agonist anti-BTN3 mAbs requires neither the presence of phosphoAg nor the expression of intracellular B30.2 domain. Accordingly, each BTN3 isoform, comprising or not a B30.2 domain, was equally able to trigger the functional activation of Vγ9Vδ2 T cells (60, 82). The structural analysis of extracellular region of BTN3A1 with agonist ScFv mAb revealed a ~20 Å displacement as measured between V domains, induced upon binding of the agonist mAb

(78). Altogether these observations strongly suggest that agonist anti-BTN3 mAbs can probably induce some key BTN3A structural modifications, similar to the effects triggered by phosphoAg. However, agonist anti-BTN3 mAbs in complex with the extracellular part of BTN3, are neither sufficient to activate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells when plastic-coated or expressed on the cell surface of rodent cells, nor able to interact with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR in solution (60, 78, 81). Though still conflicting (61, 80), these results suggest that the direct recognition of either anti-BTN3 mAbs in complex with extracellular BTN3 or conformational changes/crosslinking of the extracellular domain of BTN3 induced after binding of these agonist anti-BTN3 mAbs might not be sufficient to fully account for the antigenic activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells.

Thus, the topological remodeling of some cell surface key determinants, involving the aggregation or the exclusion of specific membrane proteins likely represents an important step for this stress-sensing process by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. This is supported by recent FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) experiments showing that anti-BTN3 mAbs significantly decreases the mobility of BTN3A isoforms on the cell surface, regardless of the composition of their intracellular domain (60, 81). Importantly, similar effects were observed on human target cells with NBP-induced intracellular accumulations of phosphoAg, in correlation with the expression of a functional B30.2 domain. Hence, these results provide a strong link between the reduced surface mobility of BTN3A on human target cells and their detection by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. The mechanism(s) implicated in such membrane diffusion alterations and the physiological relevance of these events still need to be experimentally further addressed. It would be interesting to determine whether human BTN3A molecules, when expressed on the cells surface of rodent cells, are also immobilized after phosphoAg or anti-BTN3 mAbs treatments, despite the inability of such cells to trigger functional activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. Such experiments should help further understand the link between BTN3A1 reduced mobility induced by phosphoAg and V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation, as well as determine whether some key primate-specific molecules are required for: (i) translating the phosphoAg/B30.2 interactions into this reduced BTN3A mobility process, (ii) BTN3A immobilization itself, or, (iii) V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation induced following sensing of this alteration of BTN3A mobility.

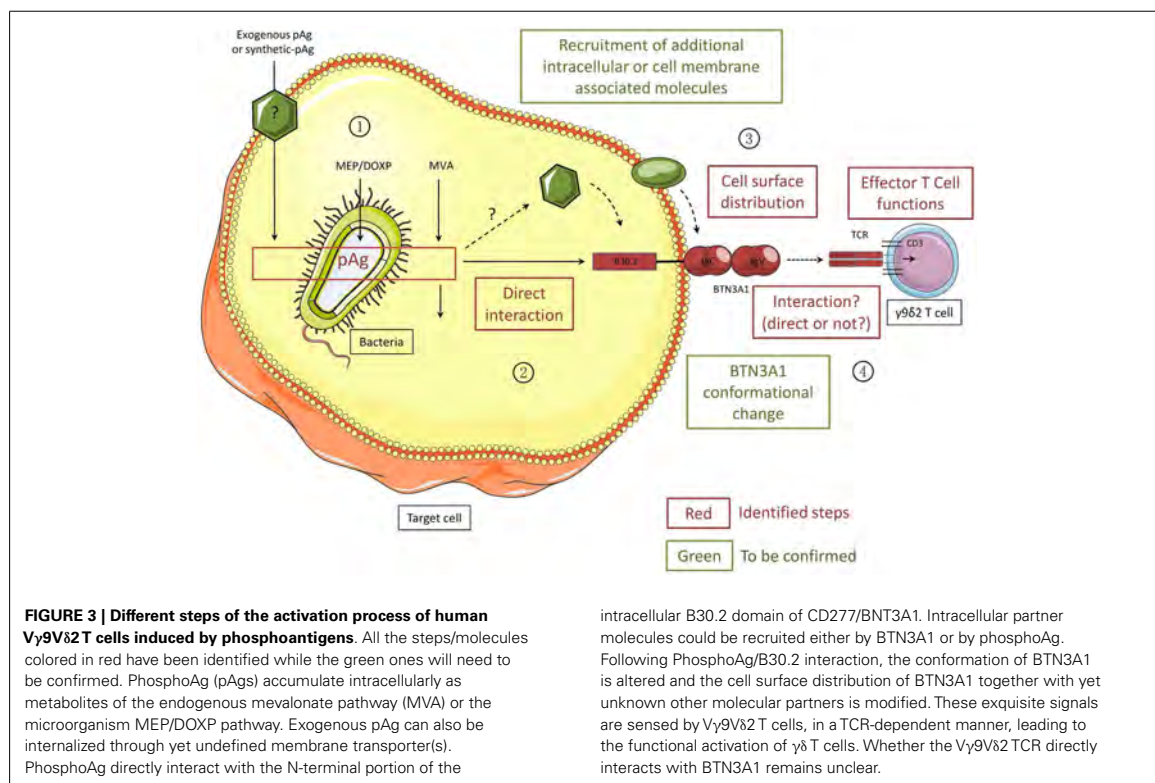
These FRAP experiments present essential evidence that the simple interaction(s) of small intracellular metabolites, like phosphoAg, with the ubiquitously expressed intracellular BTN3A1 B30.2 domain can substantially affect the global topological organization of this cell surface-expressed type I glycoproteins. The observation that BTN3A1 B30.2 crystals dissolve upon phosphoAg soaking (81) raises the possibility that the interaction(s) between phosphoAg and this B30.2 domain could result in conformational rearrangements leading to this membrane mobility alterations. This hypothesis is supported by nuclear magnetic resonance spectroscopy experiments revealing some major chemical shift perturbations upon phosphoAg binding in the B30.2 domain, not only within the B30.2 domain, but also in the upstream membrane proximal region (64). Therefore, these recent results open the possibility that such induced conformational changes could be translated from the intracellular domain of BTN3A1

to its extracellular domain, similarly to the “inside-out” signaling process already observed with integrins (84), and result in a global cell surface remodeling (Figure 3).

### WHICH ARE “REAL” TCR LIGANDS FOR HUMAN V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T CELLS ?

While a lot of attention has recently been brought onto the mechanism(s) linking phosphoAg and BTN3A1, the molecule(s) that could finally interact with the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR and trigger T cell activation remain(s) unidentified. It is particularly unclear whether BTN3A1 is directly recognized, alone or in molecular complexes, or if this molecule indirectly plays a key role for the recognition of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR ligand(s) at the target cell surface. Several candidate molecules have been previously proposed as V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells Ag accounting for the specific recognition of tumor or infected cells, in various pathological contexts. These candidate molecules were from bacterial [e.g., GroEL HSPs (85)], SEA (86), viral [e.g., HSV-1 glycoprotein I (87), or Self origin [e.g.,  $F_0$ - $F_1$  ATP synthase (15)], ULBP4 (88), MSH2 (89), HSP60 (90)]. Mitochondrial  $F_0$ - $F_1$  ATP synthase was a particularly interesting candidate as the ectopic cell surface expression of this mitochondrial complex was reported on tumor cells.  $F_0$ - $F_1$  ATP synthase also binds a delipidated form of apolipoprotein A-I, which is required for optimal V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation. Further studies showed the direct recognition of these molecules by the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR (15), a process that can be modulated by MHC class I molecules (91). Because  $F_0$ - $F_1$  ATP synthase was shown to interact with some phosphoAg, this molecule was proposed as a presenting molecule for phosphoAg (92) but this property has not been yet confirmed. Interestingly, the recent characterization of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell subsets amplified *in vitro* following contact with *M. BCG*-infected DCs has shown that only a subset of phosphoAg-responsive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells were actually responsive to *M. BCG* (93). TCR repertoire analysis of this T cell subset revealed a restricted diversity in V $\delta$ 2 CDR3 sequences, as compared to IPP-reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. This study suggested that the reactivity of these V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell subsets toward *M. BCG* could be mediated by non-phosphoAg molecules. Similar observations were made in pulmonary tuberculosis patients (94). The specificity of these subsets was next characterized which led to the identification of new protein/peptides of mycobacterial origin (e.g., OXYS, DXS2, Rv2272) (94, 95) that can interact with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs and activate a large fraction of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells isolated from peripheral blood of tuberculosis infected patients but not  $\gamma\delta$  T cells of healthy donors.

Therefore, these recent studies provide attractive evidences that some V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs might not be designed for the unique detection of phosphoAg/BTN3A1-linked stress signals. However, antagonist anti-BTN3 mAbs have been shown to abrogate the recognition of *M. BCG*-infected cells (60). Even if this result does not directly address the essential requirement for BTN3A1 expression, and its intracellular B30.2 domain, in the reactivity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells against *M. BCG*, it strongly underlines an important function for this BTN in this process. As the “polyreactivity” of various V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell clones toward various antigenic molecules has not been determined so far, it is therefore difficult to exclude or include them in a general model of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation by phosphoAg. An interesting hypothesis is that each of these V $\gamma$ 9V $\delta$ 2



TCR ligands expressed on the surface of stressed target cells is not individually detected by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, but become activator as part of a complex involving several V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR ligands, as suggested by the results from the study reporting the recognition of the  $F_0-F_1$  ATP synthase/ApoA1 complex (15). In agreement with this idea, BTN3A1 could regulate the formation or the topology of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 antigenic complexes on the cell surface.

#### PHYSIOLOGICAL IMPLICATIONS FOR THE DETECTION OF BOTH MODIFIED-SELF AND NON-SELF BY V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T CELLS

V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells have the ability to discriminate between self and modified-self, by detecting subtle changes of phosphoAg levels, due to increased MVA pathway activity and/or uptake of exogenous phosphoAg, within stressed, transformed, or infected target cells. How V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells can make this subtle distinction is not well understood, but a fine control of such capacities is essential to avoid any deleterious effect linked to the strong effector functions of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (e.g., cytotoxicity) in case of an inappropriate activation. Importantly, as also suggested for other T cell subsets, the recognition of altered determinants, from either self or non-self origin, by the TCR complex does not fully reflect the “true” reactivity of these T lymphocytes and the ability of these ligands/TCR interactions to trigger functional responses. Indeed, the TCR-mediated reactivity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells against target cells not solely depends on the expression levels of Ag but also relies on the fine tuning of their activation threshold by

costimulatory/adhesion molecules and activating/inhibitory NK receptors (47, 57, 58, 96).

The interaction of phosphoAg with the intracellular B30.2 domain of the ubiquitous BTN3A1 molecule, at a 1:1 molar ratio (64, 81), which would be subsequently translated to the cell surface, offers a simple option for the quantitative sensing of endogenous phosphoAg within target cells by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. However, the MVA pathway, which produces the endogenous phosphoAg metabolites (e.g., IPP), is constitutively engaged at different levels of activity in healthy cells, according to their physiological functions. For example, highly proliferating cells such as activated proliferating T cells display some metabolic characteristics that are very similar to those of stress-altered cells, including an upregulated MVA pathway. As several additional molecular players remain to be identified to fully decipher the mechanisms of phosphoAg sensing by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (Figure 3), the complexity of the currently proposed model already offers many levels of regulation, such as the expression levels of molecules regulating phosphoAg/B30.2 interactions and/or BTN3A1 conformational/topological changes, as well as the availability of BTN3A1 or V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR ligands themselves. Therefore, following their identification, it will be critical to study the expression of each of these molecules in both physiological and pathological contexts. As an hypothesis, BTN3A isoforms that are devoid of any phosphoAg-binding B30.2 domain could exert inhibitory functions by competing with BTN3A1 for the interaction with

molecular partners (e.g., ectopic  $F_0$ – $F_1$  ATP synthase, ApoA1 or other TCR ligands). To first test this, the expression levels of the different isoforms of BTN3A will need to be further measured and compared, not only in different healthy cell subsets (75) but also in various altered contexts.

Besides their ability to quantitatively sense variations of endogenous phosphoAg levels in target cells, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells also efficiently discriminate between weak agonist phosphoAg that are produced by the endogenous MVA pathway (e.g., IPP) and strong agonist ones which are produced by the microorganism DOXP/MEP pathway (e.g., HMBPP). Isothermal titration calorimetry has shown that the potency of phosphoAg correlates with their binding affinity for the intracellular B30.2 domain of BTN3A1 (64, 81). According to biochemical and biophysical studies, the binding of phosphoAg on the B30.2 domain would rely on their mandatory phosphate moiety, which interacts with a unique binding site in the B30.2 domain, and could be modulated by the nature of their organic solvent (64, 81). It remains unclear how such binding affinities are in turn quantitatively translated to the target cell surface and next detected by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. One possibility is that the stability of these interactions could directly impact on the stability of the induced BTN3A1 conformational/topological changes. Another hypothesis is that phosphoAg directly or indirectly recruit partner molecules, according to their biochemical properties. As the chemical reactivity of phosphoAg has been reported as a key requirement for V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells activation and the kinetics of the dephosphorylation step correlates with their bioactivity, the importance of the contribution of this  $\beta$ -phosphate cleavage step will also need to be further analyzed. Interestingly, some phosphoAg analogs that are resistant to  $\beta$ -phosphate cleavage are not only unable to activate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells but also abrogate their activation induced by phosphoAg (37). These observations suggest that phosphoAg and their analogs compete for binding/interacting sites (e.g., B30.2 domain) and that  $\beta$ -phosphate cleavage is required for an additional step still to be identified.

## CONCLUDING REMARKS

Primate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells are endowed with unique reactivity patterns against a broad range of stressed cell targets, including infected and tumor cells. This property has been mainly attributed to a specific recognition of dysregulated phosphoAg in various pathological contexts, as well as an apparently diversified set of proteins and peptides of Self and non-Self origins that could directly interact with the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR. Despite the lack of obvious common feature between all these antigenic determinants, several V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR ligands of Self origin have been linked to the cell metabolism, and their expression or localization could be regulated by transformation or infection. Because metabolic dysregulation represents a general feature of various cell distress events, including transformation, infection and injury, the activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells induced by this type of antigenic determinants would represent a unique and efficient strategy allowing the early detection of many pathological contexts. It will be crucial in future studies to understand by which mechanisms such molecules of diverse nature and origin can trigger and regulate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell antigenic activation, and whether all these molecules are

recognized individually, or as part of a general mechanism of detection of distressed-self and non-self, involving phosphoAg, BTN3A1, and various other molecules yet to be identified. Our attempts to integrate the results of previous experimental data on the modalities of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation induced by phosphoAg, highlighted by the recent identification of BTN3A1 as mandatory player in this process, led to an incomplete, yet already complex model of phosphoAg sensing by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. Against all expectations, phosphoAg sensing by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells is an indirect process (Figure 3), involving several intermediate players that remain to be identified.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Ulrich Jarry for help preparing this manuscript. This work was supported by INSERM, Université de Nantes, Association pour la Recherche contre le Cancer, Institut National du Cancer, Agence Nationale de la Recherche (#GDSTRESS), Ligue Nationale contre le Cancer and Investissements d'Avenir (Agence Nationale de la Recherche-Programme Laboratoires d'Excellence Immunotherapy Graft Oncology), and the US National Institute of Health (AI059621).

## REFERENCES

- Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol* (1993) 11:637–85. doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.003225
- Hayday AC. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* (2000) 18:975–1026. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.975
- Hayday AC. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity* (2009) 31(2):184–96. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.006
- Chien YH, Meyer C, Bonneville M. Gammadelta T cells: first line of defense and beyond. *Annu Rev Immunol* (2014) 32:121–55. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120216
- Narayan K, Sylvia KE, Malhotra N, Yin CC, Martens G, Vallerskog T, et al. Intrathymic programming of effector fates in three molecularly distinct gammadelta T cell subtypes. *Nat Immunol* (2012) 13(5):511–8. doi:10.1038/ni.2247
- Davis WC, Brown WC, Hamilton MJ, Wyatt CR, Orden JA, Khalid AM, et al. Analysis of monoclonal antibodies specific for the gamma delta TcR. *Vet Immunol Immunopathol* (1996) 52(4):275–83. doi:10.1016/0165-2427(96)05578-X
- Hirano M, Guo P, McCurley N, Schorpp M, Das S, Boehm T, et al. Evolutionary implications of a third lymphocyte lineage in lampreys. *Nature* (2013) 501(7467):435–8. doi:10.1038/nature12467
- Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* (2010) 10(7):467–78. doi:10.1038/nri2781
- Devilder MC, Maillat S, Bouyge-Moreau I, Donnadieu E, Bonneville M, Scotet E. Potentiation of antigen-stimulated V[gamma]9V[delta]2 T cell cytokine production by immature dendritic cells (DC) and reciprocal effect on DC maturation. *J Immunol* (2006) 176(3):1386–93. doi:10.4049/jimmunol.176.3.1386
- Devilder MC, Allain S, Dousset C, Bonneville M, Scotet E. Early triggering of exclusive IFN-gamma responses of human Vgamma9Vdelta2 T cells by TLR-activated myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* (2009) 183(6):3625–33. doi:10.4049/jimmunol.0901571
- Conti L, Casetti R, Cardone M, Varano B, Martino A, Belardelli F, et al. Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidonate-stimulated gammadelta T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines. *J Immunol* (2005) 174(1):252–60. doi:10.4049/jimmunol.174.1.252
- Ni M, Martire D, Scotet E, Bonneville M, Sanchez F, Lafont V. Full restoration of *Brucella*-infected dendritic cell functionality through Vgamma9Vdelta2 T helper type 1 crosstalk. *PLoS One* (2012) 7(8):e43613. doi:10.1371/journal.pone.0043613
- Brandes M, Willmann K, Moser B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science* (2005) 309(5732):264–8. doi:10.1126/science.1110267

14. Allison TJ, Winter CC, Fournie JJ, Bonneville M, Garboczi DN. Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* (2001) **411**(6839):820–4. doi:10.1038/35081115
15. Scotet E, Martinez LO, Grant E, Barbaras R, Jeno P, Guiraud M, et al. Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity* (2005) **22**(1):71–80. doi:10.1016/j.immuni.2004.11.012
16. Zeng X, Wei YL, Huang J, Newell EW, Yu H, Kidd BA, et al. gammadelta T cells recognize a microbial encoded B cell antigen to initiate a rapid antigen-specific interleukin-17 response. *Immunity* (2012) **37**(3):524–34. doi:10.1016/j.immuni.2012.06.011
17. Willcox CR, Pitard V, Netzer S, Couzi L, Salim M, Silberzahn T, et al. Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nat Immunol* (2012) **13**(9):872–9. doi:10.1038/ni.2394
18. Spada FM, Grant EP, Peters PJ, Sugita M, Melian A, Leslie DS, et al. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med* (2000) **191**(6):937–48. doi:10.1084/jem.191.6.937
19. Luoma AM, Castro CD, Mayassi T, Bembinsten LA, Bai L, Picard D, et al. Crystal structure of Vdelta1 T cell receptor in complex with CD1d-sulfatide shows MHC-like recognition of a self-lipid by human gammadelta T cells. *Immunity* (2013) **39**(6):1032–42. doi:10.1016/j.immuni.2013.11.001
20. Garcia KC, Adams EJ. How the T cell receptor sees antigen – a structural view. *Cell* (2005) **122**(3):333–6. doi:10.1016/j.cell.2005.07.015
21. Adams EJ, Chien YH, Garcia KC. Structure of a gammadelta T cell receptor in complex with the nonclassical MHC T22. *Science* (2005) **308**(5719):227–31. doi:10.1126/science.1106885
22. Lefranc MP, Rabbitts TH. A nomenclature to fit the organization of the human T-cell receptor gamma and delta genes. *Res Immunol* (1990) **141**(7):615–8. doi:10.1016/0923-2494(90)90068-A
23. Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, Poquet Y, Puzo G, Bonneville M, et al. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* (1994) **264**(5156):267–70. doi:10.1126/science.8146660
24. Tanaka Y, Morita CT, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* (1995) **375**(6527):155–8. doi:10.1038/375155a0
25. Pfeffer K, Schoel B, Plesnila N, Lipford GB, Kromer S, Deusch K, et al. A lectin-binding, protease-resistant mycobacterial ligand specifically activates V gamma 9+ human gamma delta T cells. *J Immunol* (1992) **148**(2):575–83.
26. Tanaka Y, Sano S, Nieves E, De Libero G, Rosa D, Modlin RL, et al. Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994) **91**(17):8175–9. doi:10.1073/pnas.91.17.8175
27. Espinosa E, Belmont C, Sicard H, Poupot R, Bonneville M, Fournie JJ. Y2K+1 state-of-the-art on non-peptide phosphoantigens, a novel category of immunostimulatory molecules. *Microbes Infect* (2001) **3**(8):645–54. doi:10.1016/S1286-4579(01)01420-4
28. Belmont C, Espinosa E, Poupot R, Peyrat MA, Guiraud M, Poquet Y, et al. 3-Formyl-1-butyl pyrophosphate A novel mycobacterial metabolite-activating human gammadelta T cells. *J Biol Chem* (1999) **274**(45):32079–84. doi:10.1074/jbc.274.45.32079
29. Jomaa H, Feurle J, Luhs K, Kunzmann V, Tony HP, Herderich M, et al. Vgamma9/Vdelta2 T cell activation induced by bacterial low molecular mass compounds depends on the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* (1999) **25**(4):371–8. doi:10.1111/j.1574-695X.1999.tb01362.x
30. Zhang Y, Song Y, Yin F, Broderick E, Siegel K, Goddard A, et al. Structural studies of Vgamma2Vdelta2 T cell phosphoantigens. *Chem Biol* (2006) **13**(9):985–92. doi:10.1016/j.chembiol.2006.08.007
31. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jeno P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med* (2003) **197**(2):163–8. doi:10.1084/jem.20021500
32. Kunzmann V, Bauer E, Wilhelm M. Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *N Engl J Med* (1999) **340**(9):737–8. doi:10.1056/NEJM199903043400914
33. Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J* (1993) **295**(Pt 2):517–24.
34. Eberl M, Altincicek B, Kollas AK, Sanderbrand S, Bahr U, Reichenberg A, et al. Accumulation of a potent gammadelta T-cell stimulator after deletion of the lytB gene in *Escherichia coli*. *Immunology* (2002) **106**(2):200–11. doi:10.1046/j.1365-2567.2002.01414.x
35. Altincicek B, Moll J, Campos N, Foerster G, Beck E, Hoeffler JF, et al. Cutting edge: human gamma delta T cells are activated by intermediates of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J Immunol* (2001) **166**(6):3655–8. doi:10.4049/jimmunol.166.6.3655
36. Espinosa E, Belmont C, Pont F, Luciani B, Poupot R, Romagne F, et al. Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human gamma delta T cells. *J Biol Chem* (2001) **276**(21):18337–44. doi:10.1074/jbc.M100495200
37. Belmont C, Espinosa E, Halary F, Tang Y, Peyrat MA, Sicard H, et al. A chemical basis for selective recognition of nonpeptide antigens by human delta T cells. *FASEB J* (2000) **14**(12):1669–70. doi:10.1096/fj.99-0909fje
38. Sireci G, Espinosa E, Di Sano C, Dieli F, Fournie JJ, Salerno A. Differential activation of human gammadelta cells by nonpeptide phosphoantigens. *Eur J Immunol* (2001) **31**(5):1628–35. doi:10.1002/1521-4141(200105)31:5<1628::AID-IMMU1628>3.0.CO;2-T
39. Boedec A, Sicard H, Dessolin J, Herbette G, Ingoure S, Raymond C, et al. Synthesis and biological activity of phosphonate analogues and geometric isomers of the highly potent phosphoantigen (E)-1-hydroxy-2-methylbut-2-enyl 4-diphosphate. *J Med Chem* (2008) **51**(6):1747–54. doi:10.1021/jm701101g
40. Sturm E, Braakman E, Fisch P, Vreugdenhil RJ, Sondel P, Bolhuis RL. Human V gamma 9-V delta 2 T cell receptor-gamma delta lymphocytes show specificity to Daudi Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol* (1990) **145**(10):3202–8.
41. Panchamoorthy G, McLean J, Modlin RL, Morita CT, Ishikawa S, Brenner MB, et al. A predominance of the T cell receptor V gamma 2/V delta 2 subset in human mycobacteria-responsive T cells suggests germline gene encoded recognition. *J Immunol* (1991) **147**(10):3360–9.
42. Davodeau F, Peyrat MA, Hallet MM, Gaschet J, Houde I, Vivien R, et al. Close correlation between Daudi and mycobacterial antigen recognition by human gamma delta T cells and expression of V9JPC1 gamma/V2DJC delta-encoded T cell receptors. *J Immunol* (1993) **151**(3):1214–23.
43. Bukowski JF, Morita CT, Tanaka Y, Bloom BR, Brenner MB, Band H. V gamma 2V delta 2 TCR-dependent recognition of non-peptide antigens and Daudi cells analyzed by TCR gene transfer. *J Immunol* (1995) **154**(3):998–1006.
44. Das H, Wang L, Kamath A, Bukowski JF. Vgamma2Vdelta2 T-cell receptor-mediated recognition of aminobisphosphonates. *Blood* (2001) **98**(5):1616–8. doi:10.1182/blood.V98.5.1616
45. Morita CT, Lee HK, Wang H, Li H, Mariuzza RA, Tanaka Y. Structural features of nonpeptide prenyl pyrophosphates that determine their antigenicity for human gamma delta T cells. *J Immunol* (2001) **167**(1):36–41. doi:10.4049/jimmunol.167.1.36
46. Marcu-Malina V, Heijhuys S, van Buuren M, Hartkamp L, Strand S, Sebestyen Z, et al. Redirecting {alpha}{beta}T cells against cancer cells by transfer of a broadly tumor-reactive {gamma}{delta}T-cell receptor. *Blood* (2011) **118**(1):50–9. doi:10.1182/blood-2010-12-325993
47. Nedellec S, Sabourin C, Bonneville M, Scotet E. NKG2D costimulates human Vgamma9Vdelta2 T cell antitumor cytotoxicity through protein kinase C theta-dependent modulation of early TCR-induced calcium and transduction signals. *J Immunol* (2010) **185**(1):55–63. doi:10.4049/jimmunol.1000373
48. Lafont V, Liautaud J, Sable-Teychene M, Sainte-Marie Y, Favero J. Isopen-tenyl pyrophosphate, a mycobacterial non-peptidic antigen, triggers delayed and highly sustained signaling in human gamma delta T lymphocytes without inducing down-modulation of T cell antigen receptor. *J Biol Chem* (2001) **276**(19):15961–7. doi:10.1074/jbc.M008684200
49. Correia DV, d'Orey F, Cardoso BA, Lanca T, Grosso AR, deBarros A, et al. Highly active microbial phosphoantigen induces rapid yet sustained MEK/Erk- and PI-3K/Akt-mediated signal transduction in anti-tumor human gammadelta T-cells. *PLoS One* (2009) **4**(5):e5657. doi:10.1371/journal.pone.0005657
50. Cipriani B, Knowles H, Chen L, Battistini L, Brosnan CF. Involvement of classical and novel protein kinase C isoforms in the response of human V gamma 9V delta 2 T cells to phosphate antigens. *J Immunol* (2002) **169**(10):5761–70. doi:10.4049/jimmunol.169.10.5761
51. Bukowski JF, Morita CT, Band H, Brenner MB. Crucial role of TCR gamma chain junctional region in prenyl pyrophosphate antigen recognition by gamma delta T cells. *J Immunol* (1998) **161**(1):286–93.
52. Miyagawa F, Tanaka Y, Yamashita S, Mikami B, Danno K, Uehara M, et al. Essential contribution of germline-encoded lysine residues in Jgamma1.2 segment to

- the recognition of nonpeptide antigens by human gammadelta T cells. *J Immunol* (2001) **167**(12):6773–9. doi:10.4049/jimmunol.167.12.6773
53. Yamashita S, Tanaka Y, Harazaki M, Mikami B, Minato N. Recognition mechanism of non-peptide antigens by human gammadelta T cells. *Int Immunol* (2003) **15**(11):1301–7. doi:10.1093/intimm/dxg129
  54. Morita CT, Jin C, Sarikonda G, Wang H. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol Rev* (2007) **215**:59–76. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00479.x
  55. Morita CT, Beckman EM, Bukowski JF, Tanaka Y, Band H, Bloom BR, et al. Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity* (1995) **3**(4):495–507. doi:10.1016/1074-7613(95)90178-7
  56. Lang F, Peyrat MA, Constant P, Davodeau F, David-Ameline J, Poquet Y, et al. Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *J Immunol* (1995) **154**(11):5986–94.
  57. Kato Y, Tanaka Y, Tanaka H, Yamashita S, Minato N. Requirement of species-specific interactions for the activation of human gamma delta T cells by pamidronate. *J Immunol* (2003) **170**(7):3608–13. doi:10.4049/jimmunol.170.7.3608
  58. Kato Y, Tanaka Y, Hayashi M, Okawa K, Minato N. Involvement of CD166 in the activation of human [gamma][delta]T Cells by tumor cells sensitized with nonpeptide antigens. *J Immunol* (2006) **177**(2):877–84. doi:10.4049/jimmunol.177.2.877
  59. Wei H, Huang D, Lai X, Chen M, Zhong W, Wang R, et al. Definition of APC presentation of phosphoantigen (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate to Vgamma2Vdelta2 TCR. *J Immunol* (2008) **181**(7):4798–806. doi:10.4049/jimmunol.181.7.4798
  60. Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, Peigne CM, Monkkonen H, Monkkonen J, et al. Key implication of CD277/Butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T cell subset. *Blood* (2012) **120**(11):2269–79. doi:10.1182/blood-2012-05-430470
  61. Riano F, Karunakaran MM, Starick L, Li J, Scholz CJ, Kunzmann V, et al. Vgamma9Vdelta2 TCR-activation by phosphorylated antigens requires butyrophilin 3 A1 (BTN3A1) and additional genes on human chromosome 6. *Eur J Immunol* (2014) **44**(9):2571–6. doi:10.1002/eji.201444712
  62. Wang H, Fang Z, Morita CT. Vgamma2Vdelta2 T cell receptor recognition of prenyl pyrophosphates is dependent on all CDRs. *J Immunol* (2010) **184**(11):6209–22. doi:10.4049/jimmunol.1000231
  63. Sarikonda G, Wang H, Puan KJ, Liu XH, Lee HK, Song Y, et al. Photoaffinity antigens for human gammadelta T cells. *J Immunol* (2008) **181**(11):7738–50. doi:10.4049/jimmunol.181.11.7738
  64. Hsiao CH, Lin X, Barney RJ, Shippy RR, Li J, Vinogradova O, et al. Synthesis of a phosphoantigen prodrug that potently activates Vgamma9Vdelta2 T-lymphocytes. *Chem Biol* (2014) **21**(8):945–54. doi:10.1016/j.chembiol.2014.06.006
  65. Bukowski JF, Morita CT, Brenner MB. Human gamma delta T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implications for innate immunity. *Immunity* (1999) **11**(1):57–65. doi:10.1016/S1074-7613(00)80081-3
  66. Thompson K, Rojas-Navea J, Rogers MJ. Alkylamines cause Vgamma9Vdelta2 T-cell activation and proliferation by inhibiting the mevalonate pathway. *Blood* (2006) **107**(2):651–4. doi:10.1182/blood-2005-03-1025
  67. Arnett HA, Viney JL. Immune modulation by butyrophilins. *Nat Rev Immunol* (2014) **14**(8):559–69. doi:10.1038/nri3715
  68. Arnett HA, Escobar SS, Viney JL. Regulation of costimulation in the era of butyrophilins. *Cytokine* (2009) **46**(3):370–5. doi:10.1016/j.cyt.2009.03.009
  69. Ogg SL, Weldon AK, Dobbie L, Smith AJ, Mather IH. Expression of butyrophilin (Btn1a1) in lactating mammary gland is essential for the regulated secretion of milk-lipid droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) **101**(27):10084–9. doi:10.1073/pnas.0402930101
  70. Jeong J, Rao AU, Xu J, Ogg SL, Hathout Y, Fenselau C, et al. The PRY/SPRY/B30.2 domain of butyrophilin 1A1 (BTN1A1) binds to xanthine oxidoreductase: implications for the function of BTN1A1 in the mammary gland and other tissues. *J Biol Chem* (2009) **284**(33):22444–56. doi:10.1074/jbc.M109.020446
  71. Smith IA, Knezevic BR, Ammann JU, Rhodes DA, Aw D, Palmer DB, et al. BTN1A1, the mammary gland butyrophilin, and BTN2A2 are both inhibitors of T cell activation. *J Immunol* (2010) **184**(7):3514–25. doi:10.4049/jimmunol.0900416
  72. Yamashiro H, Yoshizaki S, Tadaki T, Egawa K, Seo N. Stimulation of human butyrophilin 3 molecules results in negative regulation of cellular immunity. *J Leukoc Biol* (2010) **88**(4):757–67. doi:10.1189/jlb.0309156
  73. Cubillos-Ruiz JR, Martinez D, Scarlett UK, Rutkowski MR, Nesbeth YC, Camposeco-Jacobs AL, et al. cd277 is a negative co-stimulatory molecule universally expressed by ovarian cancer microenvironmental cells. *Oncotarget* (2010) **1**(5):329–38.
  74. Simone R, Barbarat B, Rabellino A, Icardi G, Bagnasco M, Pesce G, et al. Ligation of the BT3 molecules, members of the B7 family, enhance the proinflammatory responses of human monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *Mol Immunol* (2010) **48**(1–3):109–18. doi:10.1016/j.molimm.2010.09.005
  75. Messal N, Mamessier E, Sylvain A, Celis-Gutierrez J, Thibault ML, Chetaille B, et al. Differential role for CD277 as a co-regulator of the immune signal in T and NK cells. *Eur J Immunol* (2011) **41**(12):3443–54. doi:10.1002/eji.201141404
  76. Rhodes DA, Stammers M, Malcherek G, Beck S, Trowsdale J. The cluster of BTN genes in the extended major histocompatibility complex. *Genomics* (2001) **71**(3):351–62. doi:10.1006/geno.2000.6406
  77. Compte E, Pontarotti P, Collette Y, Lopez M, Olive D. Frontline: characterization of BT3 molecules belonging to the B7 family expressed on immune cells. *Eur J Immunol* (2004) **34**(8):2089–99. doi:10.1002/eji.200425227
  78. Palakodeti A, Sandstrom A, Sundaresan L, Harly C, Nedellec S, Olive D, et al. The molecular basis for modulation of human Vgamma9Vdelta2 T cell responses by CD277/butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies. *J Biol Chem* (2012) **287**(39):32780–90. doi:10.1074/jbc.M112.384354
  79. Karunakaran MM, Gobel TW, Starick L, Walter L, Herrmann T. Vgamma9 and Vdelta2 T cell antigen receptor genes and butyrophilin 3 (BTN3) emerged with placental mammals and are concomitantly preserved in selected species like alpaca (*Vicugna pacos*). *Immunogenetics* (2014) **66**(4):243–54. doi:10.1007/s00251-014-0763-8
  80. Vavassori S, Kumar A, Wan GS, Ramanjaneyulu GS, Cavallari M, El Daker S, et al. Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human gammadelta T cells. *Nat Immunol* (2013) **14**(9):908–16. doi:10.1038/ni.2665
  81. Sandstrom A, Peigne CM, Leger A, Crooks JE, Konczak F, Gesnel MC, et al. The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Immunity* (2014) **40**(4):490–500. doi:10.1016/j.immuni.2014.03.003
  82. Wang H, Henry O, Distefano MD, Wang YC, Raikonen J, Monkkonen J, et al. Butyrophilin 3A1 plays an essential role in prenyl pyrophosphate stimulation of human Vgamma2Vdelta2 T cells. *J Immunol* (2013) **191**(3):1029–42. doi:10.4049/jimmunol.1300658
  83. Decaup E, Duault C, Bezombes C, Pouput M, Savina A, Olive D, et al. Phospho-antigens and butyrophilin 3A1 induce similar intracellular activation signaling in human TCRVgamma9+ gammadelta T lymphocytes. *Immunol Lett* (2014) **161**(1):133–7. doi:10.1016/j.imlet.2014.05.011
  84. Ginsberg MH, Du X, Plow EF. Inside-out integrin signalling. *Curr Opin Cell Biol* (1992) **4**(5):766–71. doi:10.1016/0955-0674(92)90099-X
  85. Fisch P, Malkovsky M, Kovats S, Sturm E, Braakman E, Klein BS, et al. Recognition by human V gamma 9/V delta 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science* (1990) **250**(4985):1269–73. doi:10.1126/science.1978758
  86. Rust CJ, Koning F. Gamma delta T cell reactivity towards bacterial superantigens. *Semin Immunol* (1993) **5**(1):41–6. doi:10.1006/smim.1993.1006
  87. Sciammas R, Bluestone JA. HSV-1 glycoprotein I-reactive TCR gamma delta cells directly recognize the peptide backbone in a conformationally dependent manner. *J Immunol* (1998) **161**(10):5187–92.
  88. Kong Y, Cao W, Xi X, Ma C, Cui L, He W. The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCRgamma9/delta2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCRgammadelta and NKG2D. *Blood* (2009) **114**(2):310–7. doi:10.1182/blood-2008-12-196287
  89. Chen H, He X, Wang Z, Wu D, Zhang H, Xu C, et al. Identification of human T cell receptor gammadelta-recognized epitopes/proteins via CDR3delta peptide-based immunobiochemical strategy. *J Biol Chem* (2008) **283**(18):12528–37. doi:10.1074/jbc.M708067200

90. Kaur I, Voss SD, Gupta RS, Schell K, Fisch P, Sondel PM. Human peripheral gamma delta T cells recognize hsp60 molecules on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol* (1993) **150**(5):2046–55.
91. Vantourout P, Martinez LO, Fabre A, Collet X, Champagne E. Ecto-F1-ATPase and MHC-class I close association on cell membranes. *Mol Immunol* (2008) **45**(2):485–92. doi:10.1016/j.molimm.2007.05.026
92. Mookerjee-Basu J, Vantourout P, Martinez LO, Perret B, Collet X, Perigaud C, et al. F1-adenosine triphosphatase displays properties characteristic of an antigen presentation molecule for Vgamma9Vdelta2 T cells. *J Immunol* (2010) **184**(12):6920–8. doi:10.4049/jimmunol.0904024
93. Spencer CT, Abate G, Blazevec A, Hoft DF. Only a subset of phosphoantigen-responsive gamma9delta2 T cells mediate protective tuberculosis immunity. *J Immunol* (2008) **181**(7):4471–84. doi:10.4049/jimmunol.181.7.4471
94. Xi X, Zhang X, Wang B, Wang J, Huang H, Cui L, et al. A novel strategy to screen bacillus Calmette-Guerin protein antigen recognized by gammadelta TCR. *PLoS One* (2011) **6**(4):e18809. doi:10.1371/journal.pone.0018809
95. Xi X, Han X, Li L, Zhao Z. Identification of a new tuberculosis antigen recognized by gammadelta T cell receptor. *Clin Vaccine Immunol* (2013) **20**(4):530–9. doi:10.1128/CVI.00584-12
96. Thedrez A, Sabourin C, Gertner J, Devilder MC, Allain-Maillet S, Fournie JJ, et al. Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunol Rev* (2007) **215**:123–35. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00468.x
97. Amslinger S, Hecht S, Rohdich F, Eisenreich W, Adam P, Bacher A, et al. Stimulation of Vgamma9/Vdelta2 T-lymphocyte proliferation by the isoprenoid precursor, (E)-1-hydroxy-2-methyl-but-2-enyl 4-diphosphate. *Immunobiology* (2007) **212**(1):47–55. doi:10.1016/j.imbio.2006.08.003

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 15 October 2014; paper pending published: 30 October 2014; accepted: 08 December 2014; published online: 05 January 2015.

Citation: Harly C, Peigné C-M and Scotet E (2015) Molecules and mechanisms implicated in the peculiar antigenic activation process of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. *Front. Immunol.* **5**:657. doi: 10.3389/fimmu.2014.00657

This article was submitted to T Cell Biology, a section of the journal *Frontiers in Immunology*.

Copyright © 2015 Harly, Peigné and Scotet. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Article 3

Cet article en cours de soumission est issu d'une collaboration avec l'équipe de J. Kuball (Université d'Utrecht, Pays-Bas).

## **A RhoB dependent two-component mechanism in tumour cells to activate a V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell receptor**

Zsolt Sebestyen<sup>1</sup>, Wouter Scheper<sup>1</sup>, Anna Vyborova<sup>1</sup>, Siyi Gu<sup>7</sup>, Zuzana Rychnavska<sup>1</sup>, Marleen Schiffler<sup>1</sup>, Coraline Chéneau<sup>1</sup>, Martje van Noorden<sup>1</sup>, Cassie-Marie Peigné<sup>2</sup>, Daniel Olive<sup>3</sup>, Robbert Jan Lebbink<sup>4</sup>, Rimke Oostvogels<sup>5</sup>, Tuna Mutis<sup>5</sup>, Gerrit-Jan Schuurhuis<sup>6</sup>, Erin J Adams<sup>7</sup>, Emmanuel Scotet<sup>2</sup>, Jürgen Kuball<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Hematology and Laboratory of Translational Immunology, University Medical Center Utrecht, the Netherlands; <sup>2</sup>INSERM, Unité Mixte de Recherche 892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes Angers, 44000 Nantes, France; <sup>3</sup>INSERM, Centre de Recherche en Cancérologie Marseille, Institut Paoli-Calmettes, 13009 Marseille, France; <sup>4</sup>Department of Medical Microbiology, University Medical Center Utrecht, the Netherlands; <sup>5</sup>Department of Clinical Chemistry and Hematology, University Medical Center Utrecht, the Netherlands; <sup>6</sup>Department of Hematology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; <sup>7</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Chicago, 929 E. 57<sup>th</sup> St. Chicago, IL 60615, USA

## **Abstract**

Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells respond to tumour cells by sensing elevated levels of phosphorylated intermediates of the dysregulated mevalonate pathway, which is translated into activating signals by the ubiquitously expressed butyrophilin A1 (BTN3A1) through yet unknown mechanisms. Here, we developed an unbiased, genome-wide screening method and identified RhoB in tumor cells as a critical mediator of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR activation and propose a two-component activation mechanism. Firstly, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR activation depends on the enzymatic activity of RhoB in the tumour cells and requires its subcellular re-localization to directly stabilize BTN3A1. Secondly, RhoB-independent conformational changes in BTN3A1 occur in the plasma membrane. These data provide novel insights into the molecular requirements of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells to tackle cancer.

## Introduction

$\gamma\delta$ T cells are unconventional T cells with strong reactivity towards a broad spectrum of tumours of diverse tissue origin.  $\gamma\delta$ T cells combine potent anti-tumour effector functions with the recognition of broadly expressed tumour-associated molecules, and these features have put  $\gamma\delta$ T cells into the spotlight for clinical application in cancer immunotherapy. Activation of  $\gamma\delta$ T cells does not depend on the recognition of processed antigens presented by MHC molecules, but instead involves the sensing of metabolic changes in cancer cells that result in the expression of generic stress molecules that are upregulated upon transformation or distress<sup>1, 2</sup>. However, the clinical success of  $\gamma\delta$ T cells in cancer treatment is challenged by a poor accurate understanding of the molecular requirements for  $\gamma\delta$ T cell activation<sup>3, 4</sup> as well as by a lack of prognostic markers to assess, which patients may benefit from such therapy.

V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, the major  $\gamma\delta$ T cell subset in human peripheral blood, express  $\gamma\delta$ T cell receptors (TCR) composed of V $\gamma$ 9 and V $\delta$ 2 chains and are specifically activated by intermediates of the mammalian mevalonate pathway<sup>5, 6</sup>, such as isopentenyl pyrophosphate (IPP), or by the microbial 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway, such as (*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate (HMBPP)<sup>7</sup>. Intracellular phosphoantigen levels accumulate in tumour cells due to dysregulation of the mevalonate pathway or upon microbial infection, allowing the targeting of transformed or infected cells by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. Similarly, intracellular phosphoantigen levels can be pharmaceutically increased by treating cells with mevalonate pathway inhibitors such as aminobisphosphonates (ABP), thus sensitizing cells towards recognition by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. Even though the involvement of the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR in detecting elevated phosphoantigen levels was demonstrated as early as the 1990's<sup>8, 9, 10</sup>, the molecular determinants on target cells required for activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs have long remained elusive.

Recent breakthrough studies have identified the membrane-expressed butyrophilin BTN3A1 (CD277) as a key molecule in phosphoantigen-induced activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells <sup>11, 12, 13</sup>. Binding of phosphoantigens to the intracellular domain of BTN3A1 as well as an immobilization of BTN3A1 at the cell surface <sup>11, 12</sup> has been suggested to contribute to an extracellular cue for recognition by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs. Since BTN3A1 is expressed on transformed as well as healthy human cells <sup>14</sup> the involvement of additional molecules in mediating selective recognition of tumour targets by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells is most likely, and involves e.g. the cytoskeletal adaptor protein Periplakin <sup>15</sup>. However, it is so far unclear how these different proposed molecules and mechanisms are linked to each other. Here, we developed an unbiased, genome-wide screening method, SNP-Associated comPutational Pathway Hunt Including RNAi Evaluation (**SAPPHIRE**), and identified the key molecular requirements for a V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell mediated recognition of cancer (stem) cells. We propose a two-component mechanism occurring in a tumor cell, which allows a V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell to sense cellular transformation.

## Results

### *Identification of genetic loci associated with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR associated target cell recognition by a SNP-Associated computational Pathway Hunt Including RNAi Evaluation (SAPPHIRE)*

We hypothesized that differences in genetic backgrounds affect recognition of tumor cells by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR and exploited therefore the Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) library of cell lines, which contains a large collection of EBV-transformed B cell lines (EBV-LCLs) obtained from several family pedigrees<sup>16</sup> and genotyped for millions of SNPs<sup>17</sup>. CD4+  $\alpha\beta$ T cells engineered to express one defined V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR were utilized for the functional screening in order to eliminate fluctuations in recognition by a diverse  $\gamma\delta$ TCR repertoire<sup>18</sup> and variations in NK receptors<sup>3,19</sup>. The resulting recognition phenotypes by means of IFN $\gamma$  production (Supplementary Fig. 1) combined with information on family pedigrees of the used CEPH cell lines overcame the need of extensive LCL screens<sup>20</sup> and allowed the prediction of zygosity of candidate loci for 12 CEPH individuals (Fig. 1A) resulting in the identification of 17 SNPs which genotypes correlated perfectly (100%) with predicted zygosity (Fig. 1B). Since none of the original 17 SNPs nor their proxies within high linkage disequilibrium ( $r^2 > 0.8$ ) directly affected genes by causing changes in protein coding sequences, we speculated that here-identified SNPs could represent surrogate markers for genetic regions associated with susceptibility to V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR recognition rather than playing direct roles, and queried the genomic vicinity of the 17 SNPs for neighboring candidate genes (Fig. 1C).

To test the relevance of these genes for V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-mediated target recognition, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR+ T cell-activating EBV-LCL line 48 was transduced with vectors encoding shRNAs against all 17 SNP-adjacent genes, and the effect of knockdown on activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR+ T cells was assessed by measuring IFN $\gamma$  and resulted in the identification of 3 genes, which reduced recognition (Fig. 1B). To ensure that potential knockdown effects pointed to genes that selectively depend on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-dependent activation, the genetically modified variants of EBV-LCL line 48 knocked down for either of the 3 genes were furthermore pulsed with Wilm's tumour 1 [WT1] peptide 126-134 and tested for recognition with T cells engineered to express a WT1-specific  $\alpha\beta$ TCR.<sup>21</sup> Selectively the knockdown of the small GTPase RhoB affected significantly the activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR but not  $\alpha\beta$ TCR engineered T cells (Fig.

1B). Similar data were observed for knocked down of RhoB in the prototypic V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell target cell line Daudi (Supplementary Fig. 2A) as well as for knock out by utilizing the CRISPR/Cas system in the renal carcinoma cell line MZ1851RC (Fig. 2A). Knock out of either RhoA or RhoC genes in 293 HEK cells did not significantly influence their ability to activate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (Fig. 2B), emphasizing that the non-redundant role of RhoB in affecting recognition of tumor cells by a defined V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR.

#### *Target cell recognition by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs depends on Rho GTPase activity*

Genomic sequencing of RhoB and associated promoter regions did not identify genetic variations associated with our marker SNP (data not shown), suggesting that RhoB is indirectly regulated by other gene loci influencing expression or activity<sup>22</sup>. Our primary observations however confirmed that neither RhoB RNA nor protein levels in various recognized and two non-recognized tumor cell lines correlated with their ability to activate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (Fig. 2C, Supplementary Fig. 2B and C). We therefore assessed the impact of Rho GTPase activity by pretreating different tumor cell lines with either the Rho GTPase activator calpeptin or inhibitor C3 transferase<sup>23, 24</sup>. Pretreatment with calpeptin markedly sensitized EBV-LCL 93 cells for recognition by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR+ T cells (Fig. 2D) while, conversely, inhibition of Rho GTPase with C3 transferase resulted in substantially reduced activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. Importantly, modulation of Rho GTPase activity did not affect the recognition of WT1 peptide-pulsed EBV-LCL 48 cells by WT1  $\alpha\beta$ TCR-transduced T cells. To specify that enzymatic activity of RhoB dictates tumor cell recognition by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, HEK 293 cells were transfected with either the dominant negative (RhoB-DN), constitutively active (RhoB-CA) or wild type (RhoB) form of RhoB<sup>25</sup> and used as target cells against V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR+ T cells (Fig. 2E). In particular HEK cells overexpressing RhoB-CA mutants were able to trigger significantly stronger V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-specific anti-tumor response than cells expressing wild type RhoB while RhoB-DN-transfected HEK cells were weaker activators of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR+ T cells. Thus, these data suggest that the biochemical activity of RhoB GTPases is a critical factor defining the recognition of cancer cells by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells.

#### *The intracellular distribution of RhoB in cancer (stem) cells marks susceptibility for V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-mediated recognition*

Differential prenylation with subsequent different subcellular location of defined GTPases<sup>26, 27</sup> could provide a link between a dysregulation of the mevalonate pathway in tumour cells and the differential Rho GTPase activity<sup>7, 28</sup>. This hypothesis was supported by confocal imaging revealing that distribution of RhoB patches that were primarily reported to locate to membranes of intracellular vesicles such as endosomes<sup>29, 30</sup>, segregated strongly with the susceptibility of different target tumour cell lines to Vγ9Vδ2 TCR-mediated recognition as RhoB was selectively excluded from nuclear areas in cells that are able to activate Vγ9Vδ2 TCR T cells (Fig. 3A and B). Crucially, re-localization of RhoB from the nucleus to extranuclear sites was induced by ABP as well as by soluble phosphoantigen IPP in cell lines becoming susceptible to recognition after treatment with ABP/IPP (Fig. 3C and D), emphasizing that RhoB localization is dependent accumulation of intracellular phosphoantigen through the dysregulated mevalonate pathway. Expressing transgenic RhoB-GFP in either recognized or not-recognized tumor cell lines followed intracellular distribution of the endogenous RhoB (Supplementary Fig. 4C) suggesting post-translational regulation of RhoB. The homogenous intracellular distribution of other GTPases such as RhoA did not change upon pamidronate treatment (Supplementary Fig. 4D), supporting the observation that RhoA knock down did not impact Vγ9Vδ2 TCR-mediated recognition (Fig. 2B). In line with our previous observations showing that human but not mouse monocyte derived dendritic cells being able to activate Vγ9Vδ2 TCR T cells<sup>31</sup>, we found RhoB exclusion from the nucleus selectively in human but not mouse dendritic cells treated with ABP although they are 100% identical in sequence (Fig. 3F and Supplementary Fig. 4B). In order to finally test whether redistribution of RhoB upon ABP treatment occurs also in leukemic cancer stem cells and supports our previous observation that Vγ9Vδ2 TCR-mediated recognition selectivity targets the leukemic but not healthy stem cell pool<sup>31</sup>, leukemic blasts, cancer stem cells and healthy stem cells were sorted from the very same donor based on flow markers<sup>32</sup> and distribution of RhoB was quantified. Indeed, also in primary blasts from acute myeloid leukemia RhoB localization correlated with the recognition by Vγ9Vδ2 TCRs (Fig. 3B and Supplementary Fig. 4A) including leukemic stem cells but not healthy stem cells from the very same donor (Fig. 3E). Taken together, the intracellular distribution of the small GTPase RhoB strongly correlates with recognition of diverse tumour targets, including cancer stem cells, and exclusion of RhoB from the nucleus is a signature of tumour cells susceptible for targeting by Vγ9Vδ2 TCR+ T cells.

### *RhoB regulates membrane mobility of BTN3A1 on cancer cells*

Decreased mobility of the transmembrane protein BTN3A1 has recently been identified as a critical determinant of Vγ9Vδ2 T cell activation<sup>11, 12, 13</sup>. However, the mechanisms linking intracellular accumulation of phosphoantigens to changes in BTN3A1 membrane mobility are unclear. Therefore, the impact of ABP and RhoB, an important player in the cytoskeletal reorganization and formation of actin stress fibers<sup>33</sup>, on mobility of BTN3A1 was tested. In line with previous reports<sup>11, 12</sup>, treating 293 HEK cells with the ABP zoledronate resulted in decreased BTN3A1 membrane mobility. Strikingly, treatment with the Rho GTPase activator calpeptine (CN03) even in the absence of ABP induced immobilization of BTN3A1 to similar levels as those of ABP treatment alone, while C3-transferase counteracted this ABP-effect, which points to the possibility that Rho GTPase activity acts on BTNA1 membrane immobilization more upstream than mevalonate pathway. Selective depletion of RhoB by CRISPR/Cas inhibited the ABP-induced immobilization of BTN3A1 to levels comparable to those of medium controls, suggesting that ABP-mediated changes in BTN3A1 mobility depend on RhoB (Fig. 4A).

To next assess a role for RhoB-induced cytoskeletal rearrangements in mediating the observed changes in BTN3A1 mobility, the relation between BTN3 molecules and F-actin was investigated by colocalization experiments. 293-HEK cells were stained with fluorescently labeled anti-BTN3 and phalloidin and colocalization coefficients were determined in response to treatment with ABP and the Rho activator calpeptine. In cells in culture medium, a variable but considerable colocalization between BTN3 and F-actin was observed which was markedly reduced by ABP treatment (Fig. 4B). Strikingly, and similar to its effect on BTN3A1 membrane mobility, the Rho activator calpeptine reduced colocalization between BTN3 and F-actin to comparable levels observed with ABP treatment, suggesting that both phosphoantigen accumulation and Rho activation may induce the formation of membrane domains surrounded by cytoskeleton where BTN3 molecules could be trapped and immobilized as recently described for FcεRI<sup>34</sup>. Importantly, Rho inhibitor C3-transferase prevented ABP-induced BTN3-actin segregation strongly indicating again the crucial involvement of active Rho in this process. Together, these

data suggest that RhoB activity contributes to target recognition by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs by modulating BTN3A1 membrane mobility through cytoskeletal rearrangements.

*RhoB interacts with BTN3A1 homodimers in cancer cells recognized by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs*

Given the strong requirement for RhoB activity in the membrane immobilization of BTN3A1, we questioned whether regulation of BTN3A1 involved direct interactions with RhoB. A potential interaction between the two proteins was therefore investigated using an *in situ* proximity ligation assay (PLA), which allows the detection of proteins in <40nm proximity. Using PLA, RhoB and BTN3 were observed to be in close proximity in recognized EBV-LCL 48 cells only when pretreated with ABP pamidronate (Fig. 5A). Interestingly, PLA signals were typically excluded from the nuclear area and distributed close to the plasma membrane, in line with our data that RhoB is involved in V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-mediated recognition by regulating membrane-expressed BTN3A1.

To determine whether BTN3A1 exists indeed as homodimer when expressed in a cellular context as suggested from crystallization studies <sup>35</sup>, and to study RhoB-BTN3A1 interactions at even higher resolution, interactions were examined by utilizing fluorescence resonance energy transfer (FRET), which allows detection of proximity distances of less than 10nm. Flow cytometry FRET measurements were performed on HEK-293 cells, which are only recognized by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells after ABP treatment <sup>11</sup>, by either overexpressing FRET compatible fusion proteins or labeling endogenous proteins with antibodies coupled to FRET-compatible fluorochromes. In line with the crystallographic data using soluble BTN3A1, these experiments confirmed that BTN3A1 molecules are expressed as homodimers on the cell surface of cancer cells (Fig. 5B), however the pairing of BTN3A1 molecules was insensitive to ABP-induced phosphoantigen accumulation. Close association between RhoB and BTN3A1 was undetectable in ABP-untreated HEK cells, and increased markedly after treating cells with the ABP pamidronate (Fig. 5C), Biolayer Interferometry (BLI) was used to formally define a possible docking site for RhoB on the intracellular domain of BTN3A1. RhoB binding was detected to the full length BTN3A1 intracellular domain (BFI) (Fig. 5D left panel and Table I) which was significantly reduced when using a recombinant BTN3A B30.2 domain, lacking the N terminal region connector to the transmembrane domain (Fig. E left panel)

indicating an important role for the membrane proximal region of the BTN3A1 intracellular domain in binding to RhoB GTPase. Interestingly, RhoB binding to BFI was almost completely abolished in the presence of soluble phosphoantigen cHDMAPP (Fig. 5D right panel). In summary, our data indicate that RhoB and BTN3 molecules closely interact at the surface membrane selectively in a V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-stimulatory context and that the physical interaction is regulated by phosphoantigens.

*Phosphoantigen accumulation associates with conformational changes of BTN3A1 dimers*

Conformational changes of BTN3A1 in response to elevated levels of phosphoantigens have been proposed to serve as a stimulatory signature for V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs<sup>11, 12, 35</sup>, however no experimental data have so far been reported to substantiate this hypothesis. The crystal structures of the extracellular domain of BTN3A1 in complex with the functionally well-characterized BTN3-specific antibodies 20.1 and 103.2<sup>11</sup> have recently been resolved, and revealed that both antibodies bind to different epitopes on the membrane-distal Ig-V domains of BTN3A1 dimers<sup>35</sup>. To study BTN3A1 conformational changes in response to increased phosphoantigen levels, surface membranes of either unstimulated or ABP-stimulated HEK-293 cells were labeled with the fluorescent lipid conjugate BODIPY FL (donor) and following extensive washing steps subsequently stained with acceptor dye labeled BTN3 specific antibodies on ice in order to prevent conformational changes that could be driven by these antibodies under physiological circumstances<sup>36</sup>. Without ABP stimulation, potent FRET efficiencies between stained membrane and both antibodies were observed (Fig. 6B), suggesting that the BTN3 Ig-V domain is in close proximity to the cell membrane. Strikingly however, treatment of cells with ABP resulted in a marked reduction in FRET signals (Fig. 6B), demonstrating that intracellular phosphoantigen accumulation associates with a conformational change of BTN3 molecules that involves a pronounced distancing of the Ig-V domain from the cell membrane. Importantly, Rho-inhibitor C3-transferase treatment of cells did not prevent ABP-driven conformational changes of the BTN3A1 homodimer (Fig. 6B) indicating that this conformational change is independent of the enzymatic activity of RhoB. These data provide support for the hypothesis that increases in intracellular phosphoantigen levels can induce extracellular changes in BTN3A1 dimers that may act as or contribute to a molecular signature recognized by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs.

## Discussion

The translation of tumour-reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells to clinical application has proven challenging due to a poor understanding of the molecular mechanisms by which V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells recognize their target cells. Important progress has been made in this respect by recent elegant reports identifying BTN3A1 as a phosphoantigen sensor that plays a key role in the activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells<sup>11, 12, 13</sup>. Nevertheless, it is still unclear how intracellular phosphoantigen accumulation translates into extracellular signatures that can be recognized by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs. In this study, we provide novel insights supporting a two-component mechanism necessary to fully activate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, which includes the critical role of the small GTPase RhoB in spatial redistribution of BTN3A1 as well as conformational changes in BTN3A1 at the tumor cell surface. We propose that ABP stimulation induces activation of RhoB and its compartmentalization to membrane proximal areas where it can directly interact with BTN3A1. While biochemical activity of RhoB induces a close vicinity of RhoB with BTN3A1 and membrane rearrangements of BTN3A1 dimers, phosphoantigens allow again a dissociation of RhoB from BTN3A1 and conformational changes in BTN3A1 at the cell membrane, which are then independent of RhoB activity. Together, these data put RhoB forward as a key actor in the cellular mechanisms that couple phosphoantigen accumulation to BTN3A1-mediated triggering of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell responses.

Like other GTPases, RhoB has intrinsic GTPase activity that allows it to cycle between biologically active GTP-bound and inactive GDP-bound conformations, which in turn enables the differential association with components of downstream signaling pathways. As such, RhoB functions as a molecular switch in diverse cellular processes, ranging from gene transcription to the regulation of cytoskeletal changes and vesicle transport<sup>33</sup>. Importantly, RhoB function is intimately coupled to the mevalonate pathway by posttranslational prenylation, which involves the addition of the mevalonate end products farnesyl pyrophosphate or geranyl-geranyl pyrophosphate to the C-terminus of RhoB<sup>27</sup>. Moreover, dysregulation of RhoB prenylation has been associated with changes in cellular proliferation and transformation<sup>37, 38</sup>, suggesting the relevance of these modifications of RhoB for tumorigenesis. Our data provide now several lines of evidence that support a direct link between the mevalonate pathway-dependent changes in RhoB activity, cytoskeletal reorganization, and recognition of tumour cells by

V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs. However, the biological activity of RhoB seems to be partially genetically predetermined as suggested by our initial screening strategy, although we could not identify a direct genetic link of the surrogate marker SNP with RhoB activity. It is possible though that differential SNPs found in recognized tumour cells are responsible as enhancer of a distant genomic region through chromatin looping<sup>22</sup>, and affecting expression of a particular GTPase activating protein (GAPs) or guanine nucleotide exchange factor (GEFs), indirectly influencing RhoB activity. Regardless of the underlying genetic block in a small subset of patients being largely non-responsive to Vg9d2TCR T cell mediated tumor control our results identified with RhoB a crucial link connecting intracellular changes induced by the accumulation of phosphoantigens occurring in the majority of cancer cells to the recognition of target cells by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs<sup>5</sup>.

Our data support a two-component model in which RhoB is activated through elevated levels of phospho-intermediates and dis-localized within the tumour cell to be able to directly bind to the membrane proximal region of the cytoplasmic tail (Fig. 7) nearby the B30.2 domain of BTN3A1. B30.2 domains have been reported to function as scaffold modules by spatiotemporally sequestering signaling proteins to distinct subcellular locations<sup>39</sup>. This interaction favors an enhanced submembranous cytoskeleton arrangement, which are leading to the observed immobilization of BTN3A1 at the cell surface, similar to its reported role in modulating membrane structures such as focal adhesions<sup>38, 40</sup>. Moreover, our data demonstrate that a second cascade of events is necessary for recognition by a V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR: a slight but distinct dissociation of RhoB from BTN3A1 and the conformational change in the extracellular domain of BTN3A1, which is then independent of RhoB activity. This observation corroborates data from crystallographic experiments using soluble BTN3A1 domains, which revealed a pronounced flexibility of BTN3A1 dimers that correlated with treatment with the agonist 20.1 antibody that is able to mimic phosphoantigen-induced stimulation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs<sup>35</sup>. Our proposed two-component model supports a “inside-out” mechanism of phosphoantigen signaling to V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs as suggested by others<sup>12, 35</sup>, whereby intracellular phosphoantigen accumulation is translated into surface changes of BTN3A1 by RhoB.

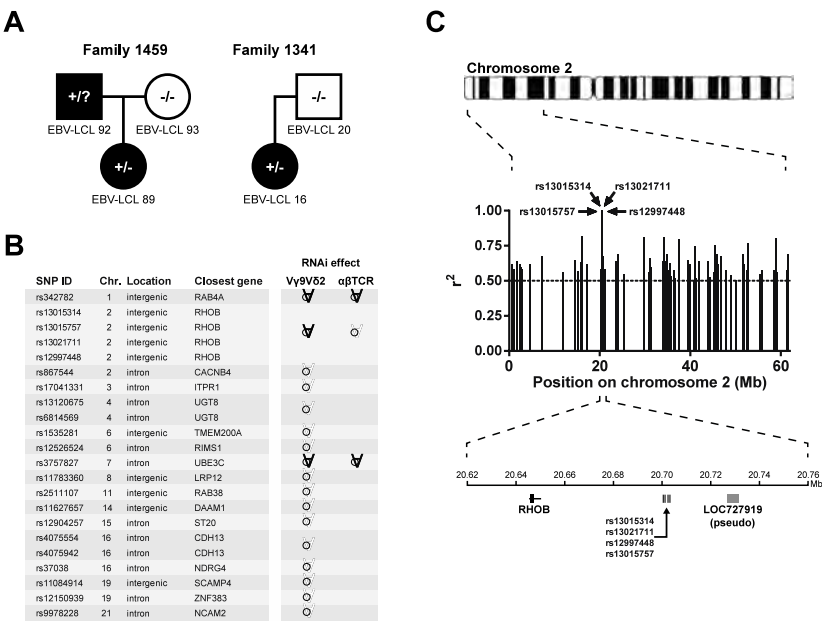
Next to our own observation, recent data by others also suggest that additional factors are likely to be involved in the recognition of tumour cells by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs. In particular, transfer of human BTN3A1

alone to rodent cells, which are not recognized by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells <sup>7</sup>, was not sufficient to sensitize cells towards recognition by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs <sup>12</sup>. Instead, this required co-transfer of a substantial proportion of the human chromosome 6 <sup>13,41</sup>, suggesting that the combined presence of BTN3A1 and additional human genes located on this chromosome is essential for facilitating target cell recognition by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs. The human RhoB gene locates to chromosome 2, and moreover, protein sequences of RhoB are fully conserved between human and rodents. Thus, other human-specific genes that mediate activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells are yet to be identified. This might include GTPase activating proteins (GAPs) and guanine nucleotide exchange factors (GEFs), that concert actions, which regulate the balance between the active, GTP-bound state and inactive, GDP-bound state of Rho GTPases <sup>42, 43</sup>. However, none of the known regulators of Rho GTPase signaling locate to the region on chromosome 6 required to transfer V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR susceptibility to rodent cells. Identification of these missing factors linking RhoB and BTN3A1 to target cell recognition by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCRs is therefore an important challenge for further elucidating the molecular activation mechanisms of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells.

The identification of RhoB as a mechanistic link between transformation-associated dysregulation of the mevalonate pathway and BTN3A1-dependent activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells has important implications for cancer immunotherapeutic concepts using V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells or their TCRs. Our observations imply the potential of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-mediated immune interventions to target selectively the leukemic but not healthy stem cell fraction. Thereby, the divergent intracellular distribution of RhoB among recognized and non-recognized tumour cells may be used as a biological surrogate marker for the identification of patients susceptible to V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-mediated attack. Secondly, although we have not been able to provide a direct genetic link between the marker SNP and the function of RhoB, our data strongly argue for a genetic predisposition, which most likely acts via post-translational regulation of RhoB and partially explain as to why some patients do not benefit from V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-mediated tumor control. Thirdly, our data put RhoB forward as a novel therapeutic target for improving immunotherapy using V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. In contrast to BTN3A1, which is ubiquitously expressed on healthy as well as malignant cells, the data presented here and elsewhere <sup>33</sup> demonstrate that RhoB possesses transformation-selective characteristics such as spatial distribution and could therefore represent a more selective therapeutic target compared to BNT3A1. Moreover, the mobilization of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells in cancer patients using *in vivo*

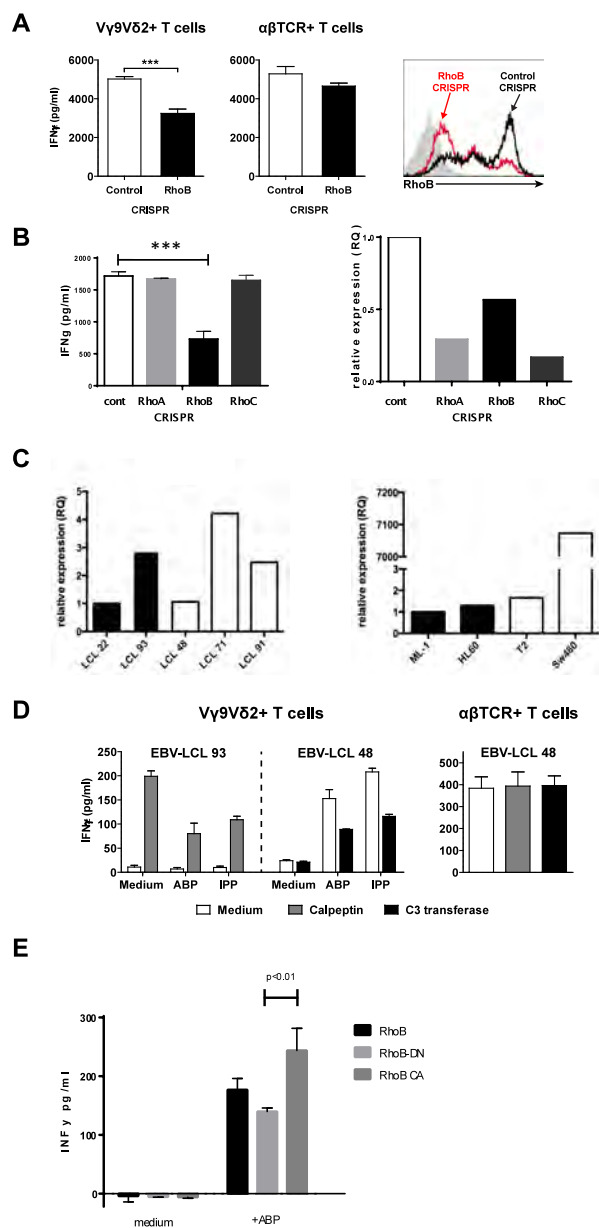
or *ex vivo* stimulation protocols with ABPs such as zoledronate <sup>3, 4, 44</sup> is likely limited by the poor pharmacokinetic profile of ABPs <sup>45</sup> and their toxicity to T cells upon prolonged exposure <sup>46</sup>. Agents modulating RhoB GTPase activity could raise attractive opportunities to complement currently pursued Vγ9Vδ2 T cell-based therapies. In summary, we provide with RhoB a novel key molecule that by orchestrating BTN3A1 in the plasma membrane of cancer cells, regulates their ability to activate Vγ9Vδ2 T cells. This knowledge will not only allow selecting for patients susceptible to but also enhancing efficacy of Vγ9Vδ2 T cell based therapies.

Figure 1



**Figure 1. SNP-Associated computational Pathway Hunt Including RNAi Evaluation (SAPPHIRE) to identify genetic loci associated with Vy9Vδ2 TCR stimulation.** (A) The recognition of CEPH EBV-LCL lines by Vy9Vδ2 TCR+ T cells provided the basis for deducing hypothetical zygosity of candidate loci in each cell line (black: recognized; white: not recognized; square: male; circle: female; +/-: heterozygous; -/-: homozygous negative; +/-?: undetermined). Members of two CEPH families are shown as examples. For CEPH ID numbers of cell lines, see Supplementary Fig. 1. (B) Genetic association analysis revealed 17 SNPs of which genotypes correlated 100% ( $r^2 = 1$ ) with between predicted zygosity of cell lines. Locations and nearest neighboring genes of SNPs are indicated. The effect of knocking down candidate genes on recognition of EBV-LCL 48 by T cells transduced with either Vy9Vδ2 TCR clone G115 or an HLA-A\*0201-restricted WT1<sub>126-134</sub>-specific αβTCR are indicated by black circles (significant effect on T cell activation) and white circles (no effect). For testing recognition by WT1 αβTCR+ T cells the EBV-LCL 48 line was pulsed with WT1<sub>126-134</sub> peptide. (C) Associating SNPs resulting from association analysis with candidate genes. The genetic region of the SNPs neighboring RhoB is shown as an example. Each bar represents one SNP and  $r^2$  values represent correlation between predicted zygosity and SNP genotypes.

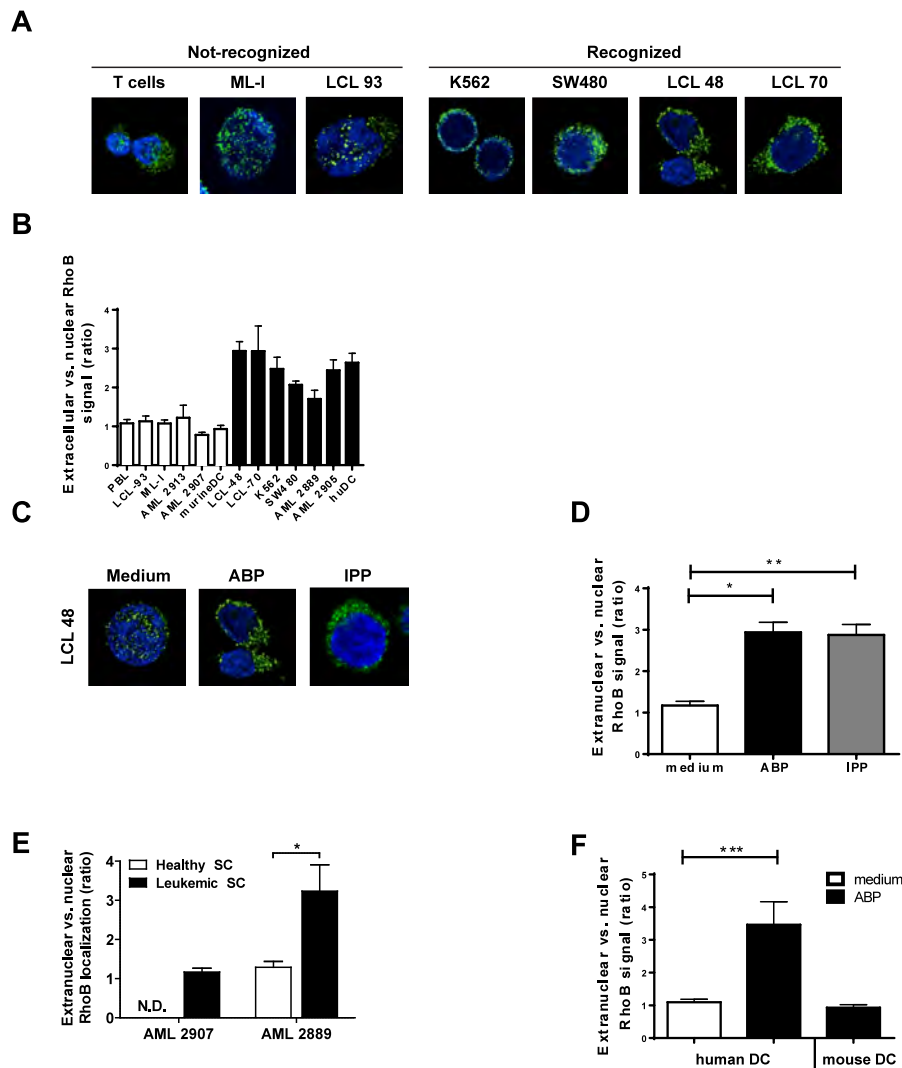
Figure 2



**Figure 2. RhoB activity correlates with target cell recognition by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR+ T cells. (A)** RhoB was knocked out in the renal cancer cell line MZ1851RC using the CRISPR/Cas system.

MZ1851RC cells were subsequently pretreated with either pamidronate or HLA-A\*0201-restricted WT1<sub>126-134</sub> peptide and the effect on target cell recognition by Vγ9Vδ2+ and WT1 αβTCR+ T cells, respectively, was determined by measuring IFNγ. A guide RNA targeting an irrelevant sequence was used as control. (B) RhoA, B and C were knocked out using CRISPR/Cas system in 293 HEK cells and the effect of knock-out on recognition by Vγ9Vδ2 TCR+ T cells was assessed by measuring IFNγ. A guide RNA targeting an irrelevant sequence was used as control. Level of knock out was determined using qPCR (C) RNA expression of RhoB was measured by qPCR in either not-recognized (black bars) or recognized (white bars) EBV-LCLs and tumor cell lines. (D) The non-recognized EBV-LCL line 93 was pretreated with the Rho GTPase activator calpeptin in combination with the ABP pamidronate, with soluble IPP or with medium and the effect on stimulation of Vγ9Vδ2+ T cells was assessed by measuring IFNγ. The recognized EBV-LCL line 48 was treated as EBV-LCL 93 cells, only here the Rho GTPase inhibitor C3 transferase was used instead of calpeptin. The effect of Rho-modulating compounds on recognition of WT1<sub>126-134</sub> peptide-pulsed EBV-LCL 48 cells by WT1 αβTCR+ T cells was measured in parallel. (E) HEK 293 cells were transfected with dominant-negative (RhoB-DN), constitutively active (RhoB-CA) or wild type RhoB (RhoB) and the effect of activity variants on target cell recognition by Vγ9Vδ2+ T cells was determined by measuring IFNγ. Error bars represent S.E.M. (\*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001).

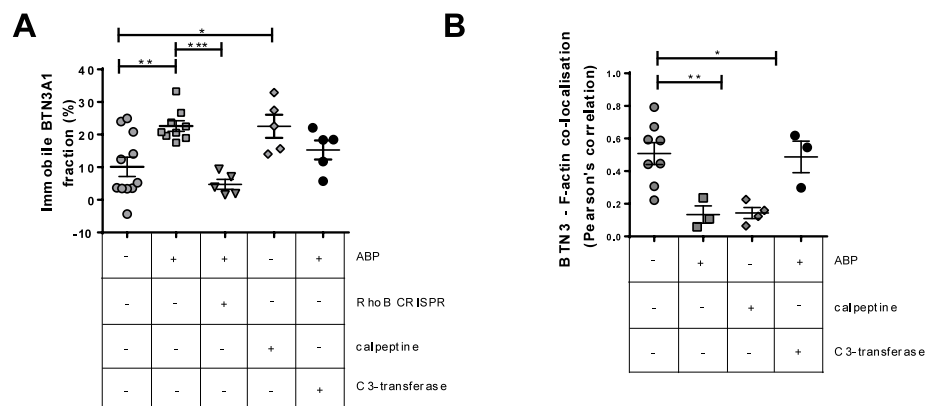
Figure 3



**Figure 3. Intracellular distribution of RhoB correlates with the recognition of target cells by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR+ T cells.** (A) Not-recognized healthy T cells, leukemic cell line ML-I and EBV-LCL 93 cells, and recognized leukemia cell line K562, colon carcinoma cell line SW480, EBV-LCL 48 and EBV-LCL 70 cells were treated pamidronate and loaded onto poly-L-lysine-coated coverslips. Attached cells were fixed and permeabilized, and stained using RhoB-specific antibody followed by an AlexaFluor488-conjugated secondary antibody. RhoB distribution was subsequently analyzed by confocal microscopy and representative images are shown (green: RhoB; blue: nucleus [DAPI]). (B) PBLs from healthy donors, EBV LCL line 93, 48 and 70, tumor cell lines ML-I, K562, SW480, primary AML blasts AML2913, AML2907, AML2889, AML2905,

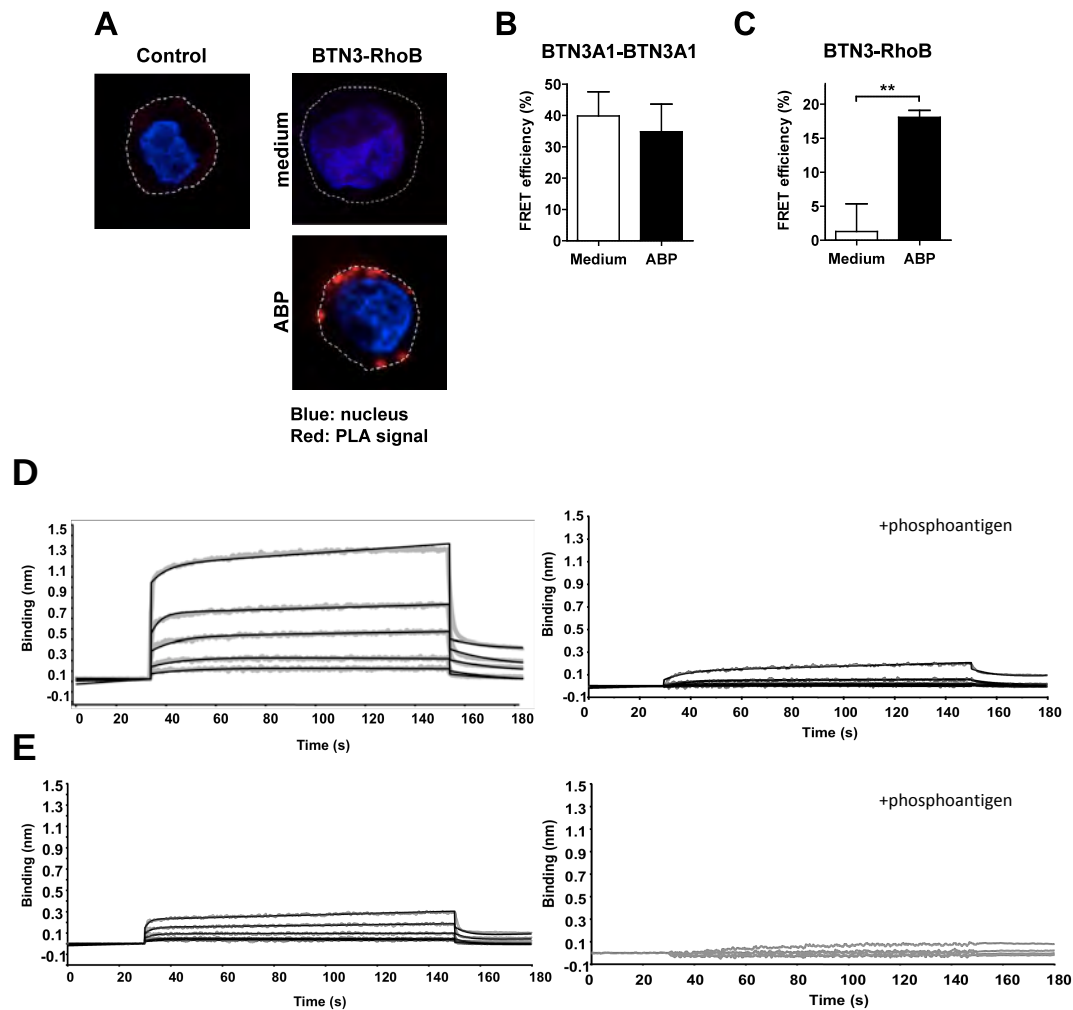
and murine and human DCs were treated with ABP pamidronate and analysed for the intracellular distribution of RhoB in confocal microscopy. The RhoB signal ratio between nuclear and extranuclear cellular compartments was measured using ImageJ image analysis software. Graphs show average ratios of at least 10 different cells. Statistically significant differences were determined relative to EBV-LCL 93 cells. (C) The intracellular RhoB distribution and (D) extranuclear/nuclear RhoB signal ratios with ABP pamidronate and soluble IPP sensitization for recognized, ABP/IPP-sensitive EBV-LCL 48 were analyzed as in (A and B). Statistically significant differences were determined relative to medium treated EBV-LCL 48. (E) CD34+CD38- leukemic stem cells were sorted from two patients of which leukemic blasts were recognized (AML 2889) and not recognized (AML 2907), respectively, and the ratios between extranuclear and nuclear RhoB signal was measured. CD34+CD38+ healthy progenitor cells from patient 2889 were sorted as negative control. (F) The intracellular RhoB distribution in the presence or absence of ABP pamidronate was determined in monocyte derived human dendritic cells from two different donors. Bone marrow derived dendritic cells (>95% CD11c+) were treated with ABP pamidronate and used for intracellular labeling of RhoB. Error bars represent S.E.M. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

Figure 4



**Figure 4. RhoB activity modulates BTN3A1 membrane mobility and its association with the actin cytoskeleton.** (A) HEK-293 cells were transfected with BTN3A1-emGFP fusion constructs and treated with medium, ABP zoledronate, or the Rho activator calpeptine (CN03). Zoledronate treatment was also applied to HEK-293 BTN3A1-emGFP<sup>+</sup> cells in which RhoB was knocked out by CRISPR/Cas or in cells that were also treated with C3-transferase. Selected membrane regions of interest were subsequently photobleached and FRAP was measured as described in the Materials & Methods section. (B) HEK-293 cells were pretreated with pamidronate or with calpeptine and BTN3 molecules and filamentous actin (F-actin) were stained using a fluorescently labeled anti-BTN3 antibody and fluorescent phalloidin, respectively. The colocalization of BTN3 and F-actin was subsequently assessed by determining the localization correlation of both signals, as described in the Materials & Methods section. The center line and error bars represent average and S.E.M., respectively (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ).

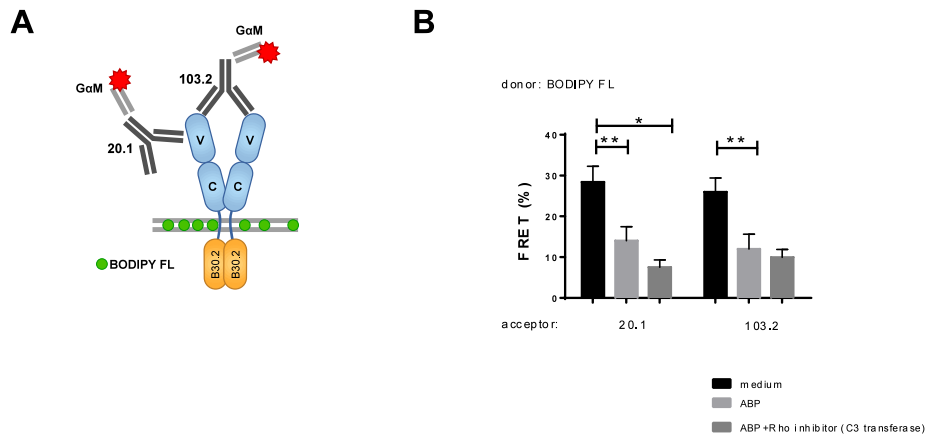
**Figure 5**



**Figure 5. RhoB interacts with BTN3 molecules and dissociates after phosphoantigen treatment.** (A) EBV-LCL 48 cells were treated either with medium or ABP pamidronate, loaded onto poly-L-lysine-coated coverslips and permeabilized. The interaction between RhoB and BTN3 was subsequently assessed by Duolink PLA using anti-RhoB and anti-CD277 antibodies. Duolink PLA without antibodies against RhoB and BTN3 served as negative control (red: PLA signal; blue: nucleus [DAPI]). (B) HEK-293 cells were treated with either medium or pamidronate and co-stained with equal amount of anti-CD277-PE (donor) as well as anti-CD277-DyLight 680 (acceptor) antibodies and FRET efficiency in cells was measured as described in Materials and Methods. (C) HEK-293 cells were pretreated either with medium or pamidronate, trypsinized, permeabilized and stained with anti-RhoB-Alexa488 (FRET donor) and anti-CD277-DyLight 680 (FRET acceptor) antibodies. FRET efficiency was subsequently measured by flow cytometry as described in Materials and Methods. Error bars represent S.E.M. (\*\* $P < 0.01$ ). (D) Concentration

dependent binding of the full-length BTN3A1 intracellular domain (BFI) with RhoGTPase in the presence or absence of the phosphoantigen cHDMAPP. Binding of BFI to RhoGTPase was measured using Biolayer Interferometry (BLI) either in the absence of cHDMAPP (left panel) or presence of cHDMAPP (1:1) (right panel). Concentrations of BTN3A1 BFI shown in the upper panel are 6.25, 12.5, 25, 50 and 100uM shown in grey. The kinetics fitting curves are shown as black. In the lower panel, concentrations of BTN3A1 BFI shown are 3.75, 7.5, 15, 30 and 60uM shown in grey. The kinetics fitting curves are shown as black. (E) Same experimental setup but with recombinant BTN3A1 B30.2 domain, lacking the N terminal region connector to the transmembrane domain. In the left panel, the interaction was measured without cHDMAPP. Concentrations of BTN3A1 B30.2 shown were 12.5, 25, 50, 100 and 200uM shown in grey. The kinetics fitting curves are shown as black. In the lower panel, the interaction was measured with cHDMAPP (1:1). Concentrations of B30.2 domain shown are 3.75, 7.5, 15, 30 and 60uM shown in grey.

**Figure 6**



**Figure 6. Intracellular phosphoantigen accumulation induces extracellular conformational changes in BTN3.** HEK-293 cells were pretreated with medium C3 transferase and/or pamidronate and trypsinized. The surface membrane of HEK-293 cells was subsequently stained with the fluorescent lipid conjugate BODIPY FL (FRET donor) and BTN3 molecules were labeled with mouse anti-CD277 mAbs originating either from clone 20.1 or from the clone 103.2 followed by staining with secondary Alexa594-conjugated Fab fragment (GaM) (FRET acceptor). FRET efficiency was measured by flow cytometry where error bars represent S.E.M. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )<sup>31</sup>.

Figure 7

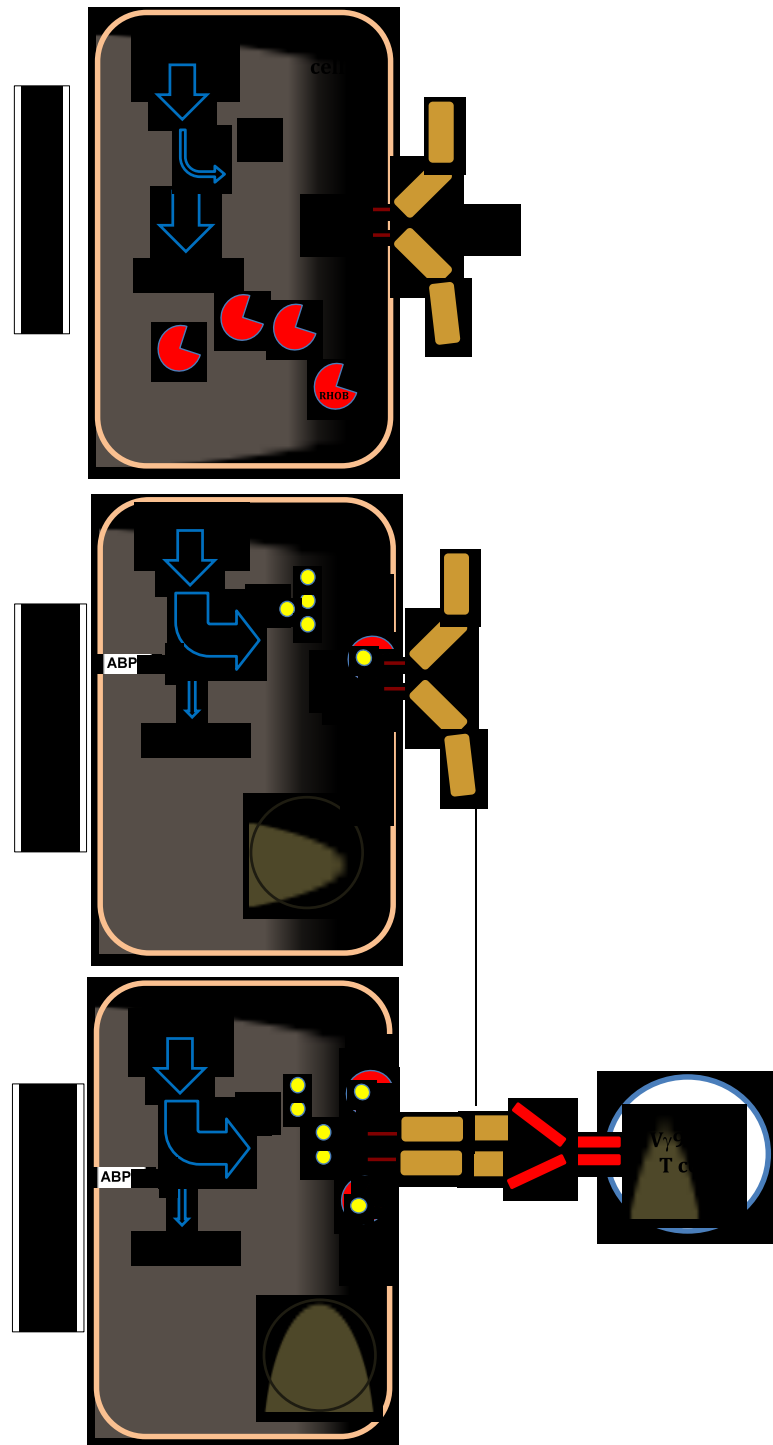


Figure 7: Two-component mechanism in tumor cells that leads to activation of Vγ9Vδ2TCR T cells. *Non-activating phase:* no accumulation of phosphoantigens via the

mevalonate pathway, which retains inactive RhoB at membrane-distant areas. *Activating phase component I*: Subcellular re-compartmentalization and activation of RhoB as the result of phosphoantigens accumulation facilitates spatial redistribution of BTN3A1 by cytoskeletal trapping in the plasma membrane. *Activating phase component II*: Phosphoantigen dependent dislocation of RhoB from BTN3A1 and conformational change of the extracellular domain of BTN3A1 triggers Vg9Vd2TCR activation.

## Materials & Methods

### *Cells and reagents*

CEPH EBV-LCL lines (CEU population panel) were a kind gift from Tuna Mutis (UMC Utrecht, The Netherlands). Daudi, K562, SW480, HEK-293, HEK-293FT and Phoenix-Ampho cell lines were obtained from ATCC. LCL-TM (an EBV-LCL line separate from the CEPH panel) was kindly provided by Phil Greenberg (Seattle, U.S.A.). MZ1851RC was kindly provided by Barbara Seliger (University of Halle, Germany). Phoenix-Ampho cells were cultured in DMEM supplemented with 1% Pen/Strep (Invitrogen) and 10% FCS (Bodinco), all other cell lines in RPMI with 1% Pen/Strep and 10% FCS. Primary fresh PBMCs were isolated by Ficoll-Paque (GE Healthcare) from buffy coats supplied by Sanquin Blood Bank (Amsterdam, The Netherlands). Frozen primary acute myeloid leukemia (AML) samples were kindly provided by Matthias Theobald (Mainz, Germany) and were collected in compliance with GCP and Helsinki regulations.

The following reagents were used: pamidronate (Calbiochem), zoledronic acid monohydrate (zoledronate, Sigma-Aldrich), isopentenyl pyrophosphate (IPP) (Sigma-Aldrich), calpeptin (Rho activator II CN03, Cytoskeleton Inc), C3 transferase (Rho Inhibitor I CT04, Cytoskeleton Inc), the farnesyl transferase inhibitor (FTI) (Sigma-Aldrich), and the geranylgeranyltransferase inhibitor (GGTI) (Sigma-Aldrich).

### *Flow cytometry*

Antibodies used for flow cytometry included: pan- $\gamma\delta$ TCR-PE (clone IMMU510, Beckman Coulter), CD4-FITC (eBioscience), CD8-APC (BD), unconjugated rabbit polyclonal RhoB (AbCam), goat-anti-rabbit AlexaFluor488 (Jackson ImmunoResearch). Mouse  $\alpha$ -CD277 mAb (clone #20.1 and 103.2) were kindly

provided by D. Oliver (INSERM U891, Marseille, France). Samples were processed with FACSCalibur and FACSCanto-II flow cytometers (BD) and analyzed with FACSDiva software (BD). Primary leukemic stem cells and healthy progenitor cells were sorted according to phenotypic markers as previously described<sup>32</sup>.

#### *Retroviral transduction of TCRs*

The V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-TCR clone G115<sup>47</sup> and a HLA-A\*0201-restricted WT1<sub>126-134</sub>-specific  $\alpha\beta$ TCR<sup>48</sup> were transduced into  $\alpha\beta$ T cells as described<sup>31, 49</sup>. In brief, Phoenix-Ampho packaging cells were transfected with gag-pol (pHIT60), env (pCOLT-GALV) and pBullet retroviral constructs containing TCR $\gamma$ / $\beta$ -chain-IRES-neomycine or TCR $\delta$ / $\alpha$ -chain-IRES-puromycin, using Fugene6 (Promega). PBMCs preactivated with  $\alpha$ CD3 (30ng/ml) (clone OKT3, Janssen-Cilag) and IL-2 (50U/ml) were transduced twice with viral supernatant within 48 hours in the presence of 50U/ml IL-2 and 4 $\mu$ g/ml polybrene (Sigma-Aldrich). Transduced T cells were expanded by stimulation with  $\alpha$ CD3/CD28 Dynabeads (0.5x10<sup>6</sup> beads/10<sup>6</sup> cells) (Invitrogen) and IL-2 (50U/ml) and selected with 800 $\mu$ g/ml geneticin (Gibco) and 5 $\mu$ g/ml puromycin (Sigma-Aldrich) for one week. CD4<sup>+</sup> TCR-transduced T cells were isolated by MACS-sorting using CD4-microbeads (Miltenyi Biotec).

Following transduction, transduced T cells were stimulated biweekly with 1 $\mu$ g/ml PHA-L (Sigma-Aldrich), 50U/ml IL-2 (Novartis Pharma), 5ng/ml IL-15 (R&D Systems), and irradiated allogeneic PBMCs, Daudi and LCL-TM cells. Fresh IL-2 was added twice a week. Transgenic TCR expression and purity of CD4<sup>+</sup> populations was routinely assessed by flow cytometry.

#### *Functional T cell assays*

IFN $\gamma$  ELISPOT was performed as previously described<sup>31, 50</sup>. Briefly, 15,000 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-transduced or mock-transduced T cells and 50,000 target cells (ratio 0.3:1) were cocultured for 24 hrs in nitrocellulose-bottomed 96-well plates (Millipore) precoated with anti-IFN $\gamma$  antibody (clone 1-D1K) (Mabtech). Plates were washed and incubated with a second biotinylated anti-IFN $\gamma$  antibody (clone 7-B6-1) (Mabtech) followed by streptavidin-HRP (Mabtech). IFN $\gamma$  spots were visualized with TMB substrate (Sanquin) and the number of spots was quantified using ELISPOT Analysis Software (Aelvis).

Alternatively, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-transduced T cells and target cells were cocultured as above in round-bottom 96-well plates, and IFN $\gamma$  levels in supernatants were measured by ELISA. Where indicated, target cells were pretreated with pamidronate (100  $\mu$ M), IPP (15  $\mu$ M), FTI (10  $\mu$ M), GGTI (50  $\mu$ M), calpeptin (2  $\mu$ g/ml) or C3 transferase (20  $\mu$ g/ml) prior to cocubation. For testing stimulation of WT1  $\alpha$  $\beta$ TCR-transduced T cells, the HLA-A2+ cell lines EBV-LCL 48 and MZ1851RC were pulsed with 10  $\mu$ M WT1<sub>126-134</sub> peptide.

#### *Zygosity/SNP correlation analysis*

Recognition of CEPH EBV-LCL lines (pretreated with either medium, pamidronate (100  $\mu$ M) or IPP (15  $\mu$ M) by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-transduced CD4+ T cells was determined by ELISPOT. Mock-transduced T cells were included as effector controls, and any EBV-LCL line that elicited IFN $\gamma$  production by mock-transduced cells were excluded from the analysis. Recognition of EBV-LCL lines by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR+ T cells in a single assay was defined as an at least two-fold increase in IFN $\gamma$  spots compared to those produced in response healthy control target cells, irrespective of EBV-LCL pretreatment (i.e. medium, pamidronate or IPP). Assays were repeated five times, and a EBV-LCL line was defined as recognized only when recognized in at least three out of the five repeated assays. Hypothetical zygosity for candidate genetic loci were deduced using classical Mendelian inheritance patterns within CEPH family pedigrees, where the influence of candidate alleles on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-mediated recognition was assumed to be dominant. Correlations of predicted zygosity with Hapmap SNP genotypes of CEPH individuals were subsequently calculated with the software tool ssSNPer, as previously described<sup>20</sup>. Proxy SNPs within 500 kb of SNPs produced by ssSNPer were collected by querying the SNP Annotation and Proxy Search (SNAP) tool<sup>51</sup>, using  $r^2 = 0.8$  as a threshold for linkage disequilibrium. eQTL analysis of ssSNPer SNP and their proxies was performed using the Genevar (GENe Expression VARiation) tool<sup>52</sup>.

#### *RNAi and CRISPR/Cas genome editing*

HEK-293FT cells were transfected using Fugene 6 (Promega) with lentiviral constructs containing shRNAs (Sigma-Aldrich) (for TRC numbers see supplementary table I) together with lentiviral helper constructs VSVG and pspax2, against candidate genes of interest. EBV-LCL 48 cells were transduced

with viral supernatants four days prior to functional T cell assays. Knockdown of targeted genes was confirmed using real-time Q-PCR, or in the case of RhoB, by flow cytometry.

RhoB knockout in MZ1851RC cells was achieved with the CRISPR/Cas system using a guide RNA that specifically targeted RhoB (GTGGTGGGCGACGGCGCGTG). A guide RNA with no homology to any human genome sequence was used as control. The efficiency of RhoB knockout was assessed using flow cytometry.

#### *Western blot analysis*

EBV-LCL lines 22, 48, 91 and 93 were treated with pamidronate overnight, and were lysed by lysis buffer containing NP-40. Lysates were centrifuged to remove cell debris and supernatants were separated by SDS-PAGE. Protein content was transferred to PVDF membranes (Millipore), blocked for 1 hr in blocking buffer (5% milk) and incubated overnight with rabbit polyclonal antibodies directed against RhoB (LifeSpan Biosciences) or  $\beta$ -tubulin (clone DM1A) (Sigma). Blots were subsequently incubated with HRP-conjugated secondary antibodies, and bands were visualized using Pierce ECL substrate (Thermo Scientific).

#### *Confocal microscopy and data analysis*

For intracellular immunofluorescence staining of RhoB, cells were treated with pamidronate overnight (where indicated) and were allowed to attach onto coverslips precoated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich). Cells were subsequently permeabilized with Permeabilizing solution 2 (BD), blocked with blocking serum (50% pooled normal human serum in PBS), and stained with a rabbit polyclonal anti-RhoB antibody (AbCam) followed by a secondary Goat anti-Rabbit IgG AlexaFluor488-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch). Cells were washed with blocking serum, fixed with 4% paraformaldehyde, stained with DAPI (where indicated), and mounted onto microscopy slides using Mowiol. Images were acquired using a Zeiss confocal laser scanning microscope LSM 700. Ratios between nuclear and extranuclear signal of RhoB was determined using Volocity software (PerkinElmer), where DAPI staining was used, when available, to mark nuclei.

To determine colocalization between BTN3 molecules and the actin cytoskeleton, HEK-293 cells were grown onto poly-L-lysine-coated coverslips on pretreated with pamidronate or Rho Activator II (CN03) overnight, and loaded onto poly-L-lysine-coated coverslips. Cells were blocked, permeabilized and BTN3 and F-actin were stained with DyLight 680-conjugated BTN3 antibody (clone BT3.1, Novus Biologicals) and Fluorescein-coupled phalloidin (Sigma), respectively. The correlation coefficient between BTN3 and F-actin signal was determined as a measure of colocalization using Volocity software (XXXX).

#### *FRAP microscopy*

FRAP analysis was performed as previously described<sup>11, 12</sup>. In brief, HEK293FT cells expressing either EmGFP-fused CD277 were laid on m-slides (Ibidi) and analyzed using a Nikon A1 RS confocal microscope (60xNA 1.40 oil immersion objective). Selected rectangular areas were photobleached for 500 ms by using full power of laser intensity (> 90% of loss of fluorescence). Images were collected every 5 s, before (30 s) and after (120 s) bleaching using low laser intensity. Images were analyzed with Metamorph 7.5 (Molecular Devices, Universal Imaging) and NIS (Nikon) imaging softwares. The resulting curves were fitted using one-phase exponential equations.

#### *Flow cytometry FRET*

To study association of RhoB and BTN3 molecules cells were permeabilized by using Permeabilization solution 2 (BD), then blocked with PBS containing 50% Human serum and labeled with rabbit polyclonal anti-RhoB antibody (AbCam). After washing with PBS, samples were labeled with either Alexa594-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (acceptor) (Jackson ImmunoResearch) and CD277-PE (donor) (BT3.1, Biollegend), respectively. The donor fluorescence was measured using a FACS Canto-II flowcytometer (BD) where donor fluorescence of the double-labeled samples was compared with that of samples labeled only with donor antibody. FRET efficiency was calculated from the fractional decrease of the donor fluorescence in the presence of the acceptor.

In order to determine homodimerization of CD277 molecules, cells were co-stained with equal amount of PE-conjugated anti-CD277 (donor) and DyLight680-conjugated anti-CD277 (acceptor) and samples were measured using a FACS Canto-II flowcytometer (BD). FRET efficiency was calculated with equations that

are based on <sup>53</sup> where donor fluorescence was excited at 488 nm and detected at 576 ± 26 nm, acceptor fluorescence was excited at 635 nm and detected at 780 ± 60 nm, whereas FRET intensity was excited at 488 nm and detected at 780 ± 60 nm. Correction factors for the spectral overlap between the different fluorescence channels were obtained from data measured on unlabeled and single-labeled cells.

Conformational change of BTN3 molecule was determined similarly as described in<sup>36</sup>, in short cells were labeled with 5ug/ml BODIPY-FL DPHE (donor) (Life Technologies) for 10 minutes on ice and then 10 minutes at 37°C, then washed extensively with ice-cold PBS. Cells were subsequently labeled with mouse anti-CD277 mAbs (either clone #20.1 or #103.2) and Alexa594-conjugated Goat anti-Mouse Fab fragments (Jackson ImmunoResearch). After washing cells were resuspended in ice cold PBS and measured immediately using a FACS Canto-II flowcytometer (BD). FRET efficiency was calculated from the fractional decrease of the donor fluorescence in the presence of the acceptor.

#### *Proximity ligation assay*

HEK 293FT cells were grown onto poly-L-lysine coated coverslips and pre-treated with 100uM pamidronate overnight prior to being fixed and permeabilized with Permeabilization buffer 2 (BD) for 15 minutes. Subsequently, cells were washed three times with PBS and blocked for 30 minutes at 22°C in PBS containing 50% human serum. After blocking, cells were incubated for 60 min at 22°C with rabbit anti-RhoB (AbCam) and mouse anti-CD277 (Novus Biologicals) in PBS containing 50% human serum. Cells were washed three times with PBST (0.05% Tween) and incubated with the secondary mouse PLUS and rabbit MINUS antibodies for 1.5 hours at 37°C in the dark. Cells were washed three times in PBST before detection of the probe with the in situ PLA detection kit (Abnova). Cells were analyzed with a 63× objective on a Zeiss LSM 710 fluorescence microscope.

#### *In vitro protein expression and purification*

The full length RhoB protein was cloned into the pET 28a vector with an C-terminal six-HIS tag followed by a thrombin cleavage site using restriction enzyme sites *NdeI* and *XhoI* ( 5' primer: CGCCATATGATGGCCGCGCATCCG; 3' primer: CGCCTCGAGTTAGCAGCAGTTGATGCAGC). The C-

terminal CKVL motif of RhoB was deleted to prevent improper prenylation in *Escherichia coli*. The construct was expressed in BL21 strain *Escherichia coli*. Cells were grown in Terrific Broth (TB) at 37 °C to OD600=0.6 and then transfer to room temperature (25°C). After 15min of recovery the cells were induced with 1ml 1M Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) per liter of culture for 12-16 hours. Protein was harvested and purified using Ni-NTA (Qiagen) IMAC chromatography in 20mM Tris pH8.0, 400mM NaCl, 20mM Imidazole, 5mM MgCl<sub>2</sub> and 4mM 2-mercaptoethanol (BME), washed first with 1mM ATP supplemented in the buffer mentioned above to dissociate potential chaperones from RhoB and then the buffer without ATP, and finally eluted with 20mM Tris pH8.0, 400mM NaCl, 250mM Imidazole, 5mM MgCl<sub>2</sub> and 4mM BME. The eluted fractions was desalted into 10mM Hepes 7.2, 150mM NaCl, 0.02% azide, 5mM MgCl<sub>2</sub> and 4mM BME using an Econo-Pac 10DG column (Biorad). Protein was further purified by gel filtration over a Superdex 200 column (GE healthcare) in 10mM Hepes pH7.2, 150mM NaCl, 0.02% azide, 5mM MgCl<sub>2</sub> and 4mM BME. Protein concentration was measured by both BCA test and measuring A280 signal using ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc.) using the theoretical extinction coefficient. The BTN3A1 B30.2 domain was expressed and purified as previously described [1]. The BTN3A1 full-length intracellular domain was cloned into pET28a with a 3C protease site followed by a carboxyl-terminus six-HIS tag using restriction enzyme sites *NcoI* and *XhoI* (5' primer: GCGCCATGGGGCAACAGCAGGAGGAAAAA; 3' primer:

CGCTCGAGGGGCCCCTGGAACAGAACTTCCAGACCACCAGACGCTGGACAAATAGTC).

The construct was expressed in BL21 strain *Escherichia coli*. Cells were grown to OD600=0.6 in Lysogeny Broth (LB) at 37 °C and induced with 1ml 1M IPTG per liter of culture for four hours at room temperature. Protein was harvested and purified using Ni-NTA (Qiagen) IMAC chromatography in 20mM Tris pH8.0, 400mM NaCl, 20mM Imidazole, 4mM BME, and eluted with 20mM Tris pH8.0, 400mM NaCl, 250mM Imidazole, 4mM BME and desalted into 10mM Hepes pH7.2, 150mM NaCl, 0.02% azide, 4mM BME using an Econo-Pac 10DG column

(Biorad). Protein was cleaved overnight using 3C protease at 4 °C. Protein concentration was measured as mentioned above.

#### *Biolayer Interferometry (BLI)*

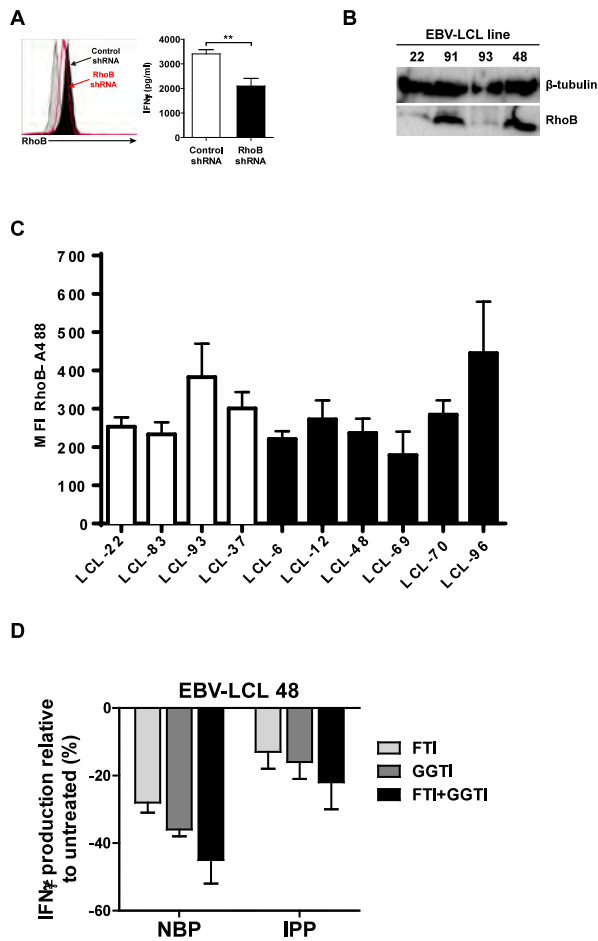
The interactions between RhoB and BTN3A1 full-length intracellular domain (BFI) or BTN3A1 B30.2 domain were measured using Biolayer interferometry (BLItz, FortéBio). The BLI buffer used in baseline equilibration and dissociation step was prepared with 10mM Hepes pH7.2, 150mM NaCl, 0.02% azide, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 4mM BME. RhoB, at a concentration of 2 mg/ml, was immobilized on the Ni-NTA biosensor hydrated with the BLI buffer using the basic kinetics method with the following parameters: 30s for baseline, 300s for association and 300s for dissociation. The RhoB-mounted biosensor was then blocked by 1mg/ml BSA and equilibrated with the BLI buffer using a similar method with the following parameters: 30s for baseline, 120s for association and 120s for dissociation. The buffer run was served as a reference for the subsequent experiments. The interaction between RhoB and different concentrations of BFI (6.25, 12.5, 25, 50 and 100uM) or B30.2 domain (12.5, 25, 50, 100 and 200uM) were measured using the same method as mentioned above. The interaction between RhoB and different concentrations of BFI (3.75, 7.5, 15, 30 and 60uM) or B30.2 domain (3.75, 7.5, 15, 30 and 60uM) in the presence of (2E)-1-hydroxy-2-methylpent-2-enyl-pyrophosphonate (cHDMAPP) were also measured using the same method as mentioned above. The ratio between cHDMAPP and BFI or B30.2 domain was kept at 1:1 for these measurements. The rate and affinity constants for binding interactions were analyzed by Biaevaluation (Biacore Life Sciences). The data was truncated to 180s and the  $k_a$  and  $k_d$  were fitted simultaneously using 1:1 binding with drift baseline model.

Supplementary Fig. 1

| CEPH line Coriell nr.             | 10846 | 12445 | 12146 | 12239 | 7029 | 7119 | 6994 | 7022 | 6991 | 7034 | 6992 | 10851 | 71829 | 11640 | 10850 | 10861 | 11893 | 11994 | 11996 | 12125 | 12156 | 10848 | 12003 | 12004 | 12005 | 12006 | 12123 | 12162 | 12163 | 12601 | 12602 | 12612 | 12614 | 12664 | 12665 | 12672 | 12673 | 12675 | 12676 | 12692 |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Numbering used in this manuscript | 1     | 4     | 5     | 6     | 7    | 8    | 9    | 12   | 16   | 18   | 20   | 22    | 36    | 37    | 46    | 49    | 51    | 52    | 53    | 61    | 62    | 66    | 68    | 69    | 70    | 71    | 76    | 79    | 80    | 81    | 82    | 83    | 86    | 88    | 89    | 90    | 91    | 93    | 94    | 96    |
| Recognition phenotype             | +     | +     | +     | +     | +    | +    | -    | +    | +    | -    | -    | -     | +     | -     | +     | +     | -     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | -     | +     | +     | +     | +     | +     | -     | +     | +     |

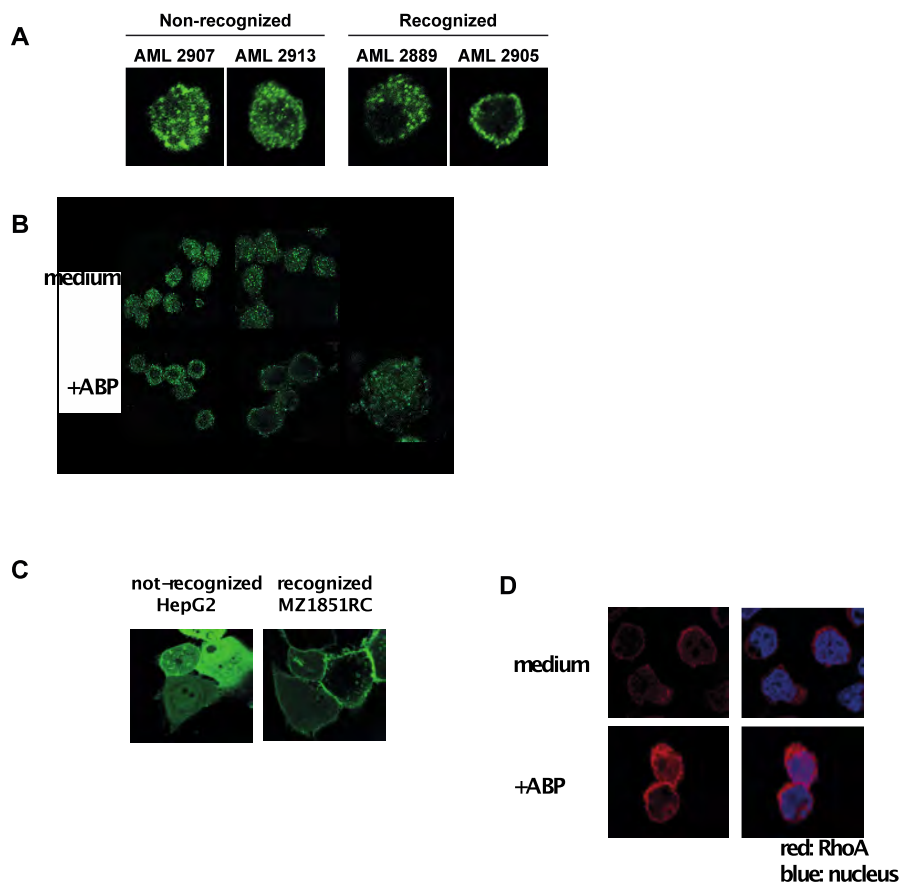
**Supplementary Fig. 1.** CEPH EBV-LCL lines used for identifying genetic loci associated with Vγ9Vδ2 TCR-mediated recognition. Recognition phenotype indicates whether EBV-LCL lines are recognized (+) or not (-) by Vγ9Vδ2 TCR+ T cells.

## Supplementary Fig. 2



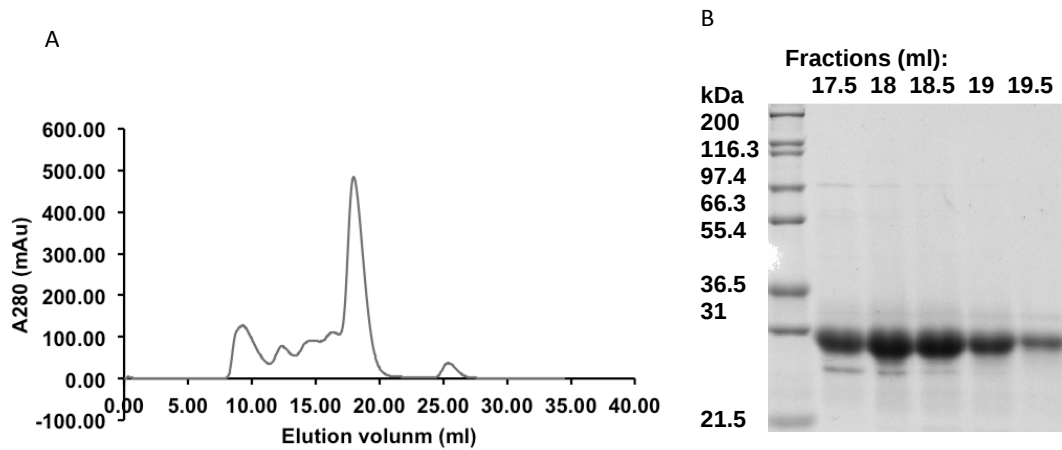
**Supplementary Fig. 2.** (A) Daudi cells were lentivirally transduced with shRNA targeting RhoB, and the effect of RhoB knockdown on recognition by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR+ T cells was assessed by measuring IFN $\gamma$ . A vector encoding an irrelevant shRNA served as negative control. (B) RhoB protein levels were measured in the recognized EBV-LCL lines 48 and 91 and the non-recognized line 22 and 93 by western blot analysis.  $\beta$ -tubulin served as loading control. (C) RhoB protein levels were measured in the recognized EBV-LCL lines 6, 12, 48, 69, 70 and 99 and the non-recognized line 22, 83, 93 and 37 by intracellular flow cytometry analysis. EBV-LCL line 48 was pretreated with FTI and/or GGTI prenylation inhibitors and the recognition of cells by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR+ T cells in the presence of pamidronate or IPP was assessed by measuring IFN $\gamma$ . Data are represented as the relative decrease in IFN $\gamma$  production compared to IFN $\gamma$  levels produced by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR+ T cells in response to pamidronate-treated EBV-LCL 48 cells.

### Supplementary Fig. 3



**Supplementary Fig. 3.** (A) Representative images for the intracellular distribution of RhoB in recognized and not-recognized primary AML samples. (B) The intracellular RhoB distribution in the presence or absence of ABP pamidronate was determined in monocyte derived human dendritic cells from two different donors. Mouse bone marrow derived dendritic cells (>95% CD11c+) were treated with ABP pamidronate and used for intracellular labeling of RhoB. (C) Vγ9Vδ2 TCR+ T cell-activating MZ1851RC and not-activating HepG2 tumor cell lines were transfected with RhoB-GFP constructs and intracellular distribution of RhoB was investigated via confocal microscopy. (D) The intracellular RhoA distribution in the presence or absence of ABP pamidronate was measured via confocal microscopy in EBV-LCL 48.

## Supplemental Figure 4



(A) Gel filtration profile of RhoB GTPase expressed in E coli. The peak from 17.8 ml to 19.2 ml contained purified RhoB GTPase monomer. (B) SDS-PAGE showing the fractions (17.5-19.5 ml, 0.5ml/fraction) containing RhoB GTPase collected from the gel filtration experiment.

**Table I. Rate and affinity constants for binding interactions between RhoB GTPase and BFI or B30.2 domains, in the presence or absence of pAg.**

| Interaction        | KD ( $\mu$ M) | $k_a$ (1/ Ms)      | $k_d$ (1/s) | Chi <sup>2</sup>      |
|--------------------|---------------|--------------------|-------------|-----------------------|
| RhoB-BFI           | 19.7          | $2.2 \times 10^3$  | 0.04351     | $2.58 \times 10^{-4}$ |
| RhoB-B30.2         | 102           | $2.02 \times 10^3$ | 0.206       | $4.81 \times 10^{-5}$ |
| RhoB-BFI-cHDMAPP   | 666           | 172                | 0.115       | $5.66 \times 10^{-5}$ |
| RhoB-B30.2-cHDMAPP | N.A.          | N.A.               | N.A.        | N.A.                  |

## References

1. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 2010, **10**(7): 467-478.
2. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nature reviews Immunology* 2013, **13**(2): 88-100.
3. Scheper W, Grunder C, Straetemans T, Sebestyen Z, Kuball J. Hunting for clinical translation with innate-like immune cells and their receptors. *Leukemia* 2014, **28**(6): 1181-1190.
4. Fournie JJ, Sicard H, Poupot M, Bezombes C, Blanc A, Romagne F, *et al.* What lessons can be learned from gammadelta T cell-based cancer immunotherapy trials? *Cellular & molecular immunology* 2013, **10**(1): 35-41.
5. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *The Journal of experimental medicine* 2003, **197**(2): 163-168.
6. Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, Poquet Y, Puzo G, Bonneville M, *et al.* Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 1994, **264**(5156): 267-270.
7. Morita CT, Jin C, Sarikonda G, Wang H. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunological reviews* 2007, **215**: 59-76.
8. Bukowski JF, Morita CT, Band H, Brenner MB. Crucial role of TCR gamma chain junctional region in prenyl pyrophosphate antigen recognition by gamma delta T cells. *Journal of immunology* 1998, **161**(1): 286-293.
9. Davodeau F, Peyrat MA, Hallet MM, Gaschet J, Houde I, Vivien R, *et al.* Close correlation between Daudi and mycobacterial antigen recognition by human gamma delta T cells and expression of V9JPC1 gamma/V2DJC delta-encoded T cell receptors. *Journal of immunology* 1993, **151**(3): 1214-1223.
10. Wang H, Fang Z, Morita CT. Vgamma2Vdelta2 T Cell Receptor recognition of prenyl pyrophosphates is dependent on all CDRs. *Journal of immunology* 2010, **184**(11): 6209-6222.
11. Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, Peigne CM, Monkkinen H, Monkkinen J, *et al.* Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T-cell subset. *Blood* 2012, **120**(11): 2269-2279.
12. Sandstrom A, Peigne CM, Leger A, Crooks JE, Konczak F, Gesnel MC, *et al.* The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Immunity* 2014, **40**(4): 490-500.
13. Vavassori S, Kumar A, Wan GS, Ramanjaneyulu GS, Cavallari M, El DS, *et al.* Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human gammadelta T cells. *Nature immunology* 2013.
14. Compté E, Pontarotti P, Collette Y, Lopez M, Olive D. Frontline: Characterization of BT3 molecules belonging to the B7 family expressed on immune cells. *Eur J Immunol* 2004, **34**(8): 2089-2099.

15. Rhodes DA, Chen HC, Price AJ, Keeble AH, Davey MS, James LC, *et al.* Activation of Human gammadelta T Cells by Cytosolic Interactions of BTN3A1 with Soluble Phosphoantigens and the Cytoskeletal Adaptor Periplakin. *Journal of immunology* 2015, **194**(5): 2390-2398.
16. Dausset J, Cann H, Cohen D, Lathrop M, Lalouel JM, White R. Centre d'etude du polymorphisme humain (CEPH): collaborative genetic mapping of the human genome. *Genomics* 1990, **6**(3): 575-577.
17. International HapMap C. The International HapMap Project. *Nature* 2003, **426**(6968): 789-796.
18. Grunder C, van Dorp S, Hol S, Drent E, Straetemans T, Heijhuurs S, *et al.* gamma9 and delta2CDR3 domains regulate functional avidity of T cells harboring gamma9delta2TCRs. *Blood* 2012, **120**(26): 5153-5162.
19. Correia DV, Lopes A, Silva-Santos B. Tumor cell recognition by gammadelta T lymphocytes: T-cell receptor vs. NK-cell receptors. *Oncoimmunology* 2013, **2**(1): e22892.
20. Spaapen RM, Lokhorst HM, van den Oudenalder K, Otterud BE, Dolstra H, Leppert MF, *et al.* Toward targeting B cell cancers with CD4+ CTLs: identification of a CD19-encoded minor histocompatibility antigen using a novel genome-wide analysis. *The Journal of experimental medicine* 2008, **205**(12): 2863-2872.
21. Kuball J, Dossett ML, Wolfl M, Ho WY, Voss RH, Fowler C, *et al.* Facilitating matched pairing and expression of TCR chains introduced into human T cells. *Blood* 2007, **109**(6): 2331-2338.
22. Pombo A, Dillon N. Three-dimensional genome architecture: players and mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology* 2015, **16**(4): 245-257.
23. Aktories K, Mohr C, Koch G. Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyltransferase. *Current topics in microbiology and immunology* 1992, **175**: 115-131.
24. Schoenwaelder SM, Burrridge K. Evidence for a calpeptin-sensitive protein-tyrosine phosphatase upstream of the small GTPase Rho. A novel role for the calpain inhibitor calpeptin in the inhibition of protein-tyrosine phosphatases. *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(20): 14359-14367.
25. Kamon H, Kawabe T, Kitamura H, Lee J, Kamimura D, Kaisho T, *et al.* TRIF-GEFH1-RhoB pathway is involved in MHCII expression on dendritic cells that is critical for CD4 T-cell activation. *The EMBO journal* 2006, **25**(17): 4108-4119.
26. Winter-Vann AM, Casey PJ. Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nature reviews Cancer* 2005, **5**(5): 405-412.
27. Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nature reviews Drug discovery* 2007, **6**(7): 541-555.
28. Maltese WA. Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1990, **4**(15): 3319-3328.
29. Adamson P, Paterson HF, Hall A. Intracellular localization of the P21rho proteins. *The Journal of cell biology* 1992, **119**(3): 617-627.

30. Michaelson D, Silletti J, Murphy G, D'Eustachio P, Rush M, Philips MR. Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *The Journal of cell biology* 2001, **152**(1): 111-126.
31. Marcu-Malina V, Heijhuurs S, van Buuren M, Hartkamp L, Strand S, Sebestyen Z, *et al.* Redirecting alphabeta T cells against cancer cells by transfer of a broadly tumor-reactive gammadeltaT-cell receptor. *Blood* 2011, **118**(1): 50-59.
32. Terwijn M, Zeijlemaker W, Kelder A, Rutten AP, Snel AN, Scholten WJ, *et al.* Leukemic stem cell frequency: a strong biomarker for clinical outcome in acute myeloid leukemia. *PloS one* 2014, **9**(9): e107587.
33. Prendergast GC. Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. *Nature reviews Cancer* 2001, **1**(2): 162-168.
34. Andrews NL, Lidke KA, Pfeiffer JR, Burns AR, Wilson BS, Oliver JM, *et al.* Actin restricts FcepsilonRI diffusion and facilitates antigen-induced receptor immobilization. *Nature cell biology* 2008, **10**(8): 955-963.
35. Palakodeti A, Sandstrom A, Sundaresan L, Harly C, Nedellec S, Olive D, *et al.* The molecular basis for modulation of human Vgamma9Vdelta2 T cell responses by CD277/butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies. *The Journal of biological chemistry* 2012, **287**(39): 32780-32790.
36. Gaspar R, Jr., Bagossi P, Bene L, Matko J, Szollosi J, Tozser J, *et al.* Clustering of class I HLA oligomers with CD8 and TCR: three-dimensional models based on fluorescence resonance energy transfer and crystallographic data. *Journal of immunology* 2001, **166**(8): 5078-5086.
37. Lebowitz PF, Casey PJ, Prendergast GC, Thissen JA. Farnesyltransferase inhibitors alter the prenylation and growth-stimulating function of RhoB. *The Journal of biological chemistry* 1997, **272**(25): 15591-15594.
38. Allal C, Pradines A, Hamilton AD, Sebt SM, Favre G. Farnesylated RhoB prevents cell cycle arrest and actin cytoskeleton disruption caused by the geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-298. *Cell cycle* 2002, **1**(6): 430-437.
39. Perfetto L, Gherardini PF, Davey NE, Diella F, Helmer-Citterich M, Cesareni G. Exploring the diversity of SPRY/B30.2-mediated interactions. *Trends in biochemical sciences* 2013, **38**(1): 38-46.
40. Vega FM, Colomba A, Reymond N, Thomas M, Ridley AJ. RhoB regulates cell migration through altered focal adhesion dynamics. *Open biology* 2012, **2**(5): 120076.
41. Riano F, Karunakaran MM, Starick L, Li J, Scholz CJ, Kunzmann V, *et al.* Vgamma9Vdelta2 TCR-activation by phosphorylated antigens requires butyrophilin 3 A1 (BTN3A1) and additional genes on human chromosome 6. *Eur J Immunol* 2014, **44**(9): 2571-2576.
42. Rossman KL, Der CJ, Sondek J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nature reviews Molecular cell biology* 2005, **6**(2): 167-180.
43. Moon SY, Zheng Y. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends in cell biology* 2003, **13**(1): 13-22.
44. Fisher JP, Heuwerker J, Yan M, Gustafsson K, Anderson J. gammadelta T cells for cancer immunotherapy: A systematic review of clinical trials. *Oncoimmunology* 2014, **3**(1): e27572.
45. Lin JH. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone* 1996, **18**(2): 75-85.

46. Wang H, Sarikonda G, Puan KJ, Tanaka Y, Feng J, Giner JL, *et al.* Indirect stimulation of human Vgamma2Vdelta2 T cells through alterations in isoprenoid metabolism. *Journal of immunology* 2011, **187**(10): 5099-5113.
47. Allison TJ, Winter CC, Fournie JJ, Bonneville M, Garboczi DN. Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* 2001, **411**(6839): 820-824.
48. Kuball J, Dossett ML, Wolfl M, Ho WY, Voss RH, Fowler C, *et al.* Facilitating matched pairing and expression of TCR chains introduced into human T cells. *Blood* 2007, **109**(6): 2331-2338.
49. Stanislawski T, Voss RH, Lotz C, Sadovnikova E, Willemsen RA, Kuball J, *et al.* Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer. *Nature immunology* 2001, **2**(10): 962-970.
50. Scheper W, van Dorp S, Kersting S, Pietersma F, Lindemans C, Hol S, *et al.* gammadeltaT cells elicited by CMV reactivation after allo-SCT cross-recognize CMV and leukemia. *Leukemia* 2013, **27**(6): 1328-1338.
51. Johnson AD, Handsaker RE, Pulit SL, Nizzari MM, O'Donnell CJ, de Bakker PI. SNAP: a web-based tool for identification and annotation of proxy SNPs using HapMap. *Bioinformatics* 2008, **24**(24): 2938-2939.
52. Yang TP, Beazley C, Montgomery SB, Dimas AS, Gutierrez-Arcelus M, Stranger BE, *et al.* Genevar: a database and Java application for the analysis and visualization of SNP-gene associations in eQTL studies. *Bioinformatics* 2010, **26**(19): 2474-2476.
53. Sebestyen Z, Nagy P, Horvath G, Vamosi G, Debets R, Gratama JW, *et al.* Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer. *Cytometry* 2002, **48**(3): 124-135.

## **VII. Bibliographie**

1. Saito, H., et al., *A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes*. Nature, 1984. **312**: p. 36-40.
2. Hayday, A., et al., *Structure, organization, and somatic rearrangement of T cell gamma genes*. Cell, 1985.
3. Brenner, M.B., et al., *Identification of a putative second T-cell receptor*. Nature, 1986.
4. Dranoff, G., *Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(1): p. 11-22.
5. Heilig, J.S. and S. Tonegawa, *Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes*. Nature, 1986.
6. Lefranc, M.P. and T.H. Rabbitts, *A nomenclature to fit the organization of the human T-cell receptor gamma and delta genes*. Res Immunol, 1990. **141**(7): p. 615-18.
7. Allison, T.J., et al., *Structure of a human gammadelta T-Cell antigen receptor*. Nature, 2001. **411**: p. 820-824.
8. Pereira, P. and L. Boucontet, *Rates of recombination and chain pair biases greatly influence the primary gammadelta TCR repertoire in the thymus of adult mice*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 3261-70.
9. Rock, E.P., et al., *CDR3 length in antigen-specific immune receptors*. J Exp Med, 1994. **179**(1): p. 323-8.
10. Xu, J.L. and M.M. Davis, *Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities*. Immunity, 2000. **13**(1): p. 37-45.
11. Sturm, E., et al., *T-cell receptor gamma/delta: comparison of gene configurations and function between humans and chimpanzees*. Immunogenetics, 1992. **36**(5): p. 294-301.
12. Kazen, A.R. and E.J. Adams, *Evolution of the V, D, and J gene segments used in the primate gammadelta T-cell receptor reveals a dichotomy of conservation and diversity*. PNAS, 2011.
13. Clark, S.P., et al., *Comparison of human and mouse T-cell receptor variable gene segment subfamilies*. Immunogenetics, 1995. **42**(6): p. 531-40.
14. Huck, S., P. Dariavach, and M.P. Lefranc, *Variable region genes in the human T-cell rearranging gamma (TRG) locus : V-J junction and homology with the mouse genes*. Embo J, 1988.
15. Petrie, H.T., R. Scollay, and K. Shortman, *Commitment to the T cell receptor-alpha beta or -gamma delta lineages can occur just prior to the onset of CD4 and CD8 expression among immature thymocytes*. Eur J Immunol, 1992. **22**(8): p. 2185-8.
16. Dudley, E.C., et al., *Alpha beta and gamma delta T cells can share a late common precursor*. Curr Biol, 1995. **5**(6): p. 659-69.
17. Shortman, K., et al., *The beginning and the end of the development of TCR gamma delta cells in the thymus*. Curr Top Microbiol Immunol, 1991. **173**: p. 71-80.
18. Ciofani, M., et al., *Stage-specific and differential notch dependency at the alphabeta and gammadelta T lineage bifurcation*. Immunity, 2006. **25**(1): p. 105-16.
19. Ciofani, M. and J.C. Zuniga-Pflucker, *Determining gammadelta versus alphabeta T cell development*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(9): p. 657-63.
20. Bonneville, M. and E. Scotet, *Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(5): p. 539-46.
21. Jin, Y., et al., *Cutting edge: Intrinsic programming of thymic gammadelta T cells for specific peripheral tissue localization*. J Immunol, 2010. **185**(12): p. 7156-60.

22. Prinz, I., B. Silva-Santos, and D.J. Pennington, *Functional development of gammadelta T cells*. Eur J Immunol, 2013.
23. Carding, S.R. and P.J. Egan, *Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 336-45.
24. Hayes, S.M., R.M. Laird, and P.E. Love, *Beyond alphabeta/gammadelta lineage commitment: TCR signal strength regulates gammadelta T cell maturation and effector fate*. Semin Immunol, 2010. **22**(4): p. 247-51.
25. Kreslavsky, T., et al., *T cell receptor-instructed alphabeta versus gammadelta lineage commitment revealed by single-cell analysis*. J Exp Med, 2008. **205**(5): p. 1173-86.
26. Pardoll, D.M., et al., *Differential expression of two distinct T-cell receptors during thymocyte development*. Nature, 1987. **326**(6108): p. 79-81.
27. Zarin, P., et al., *Gamma delta T-cell differentiation and effector function programming, TCR signal strength, when and how much?* Cell Immunol, 2015. **296**(1): p. 70-5.
28. Hayes, S.M., E.W. Shores, and P.E. Love, *An architectural perspective on signaling by the pre-, alphabeta and gammadelta T cell receptors*. Immunol Rev, 2003. **191**: p. 28-37.
29. Hayes, S.M., L. Li, and P.E. Love, *TCR signal strength influences alphabeta/gammadelta lineage fate*. Immunity, 2005. **22**(5): p. 583-93.
30. Haks, M.C., et al., *Attenuation of gammadeltaTCR signaling efficiently diverts thymocytes to the alphabeta lineage*. Immunity, 2005. **22**(5): p. 595-606.
31. Zarin, P., et al., *Enforcement of  $\gamma\delta$ -lineage commitment by the pre-T-cell receptor in precursors with weak  $\gamma\delta$ -TCR signals*. PNAS, 2014.
32. Fahl, S.P., F. Coffey, and D.L. Wiest, *Origins of gammadelta T cell effector subsets: a riddle wrapped in an enigma*. J Immunol, 2014. **193**(9): p. 4289-94.
33. Shibata, K., et al., *Notch-Hes1 pathway is required for the development of IL-17-producing gammadelta T cells*. Blood, 2011. **118**(3): p. 586-93.
34. Turchinovich, G. and A.C. Hayday, *Skint-1 identifies a common molecular mechanism for the development of interferon-gamma-secreting versus interleukin-17-secreting gammadelta T cells*. Immunity, 2011. **35**(1): p. 59-68.
35. Korn, T. and F. Petermann, *Development and function of interleukin 17-producing gammadelta T cells*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1247**: p. 34-45.
36. Krangel, M.S., et al., *A distinct wave of human T cell Receptor gamma/delta Lymphocytes in the early fetal thymus : evidence for controlled gene rearrangement and cytokine production*. J Exp Med, 1990.
37. Catros, V., et al., *[Tgammadelta lymphocytes in oncology: unconventional killer lymphocytes]*. Med Sci (Paris), 2010. **26**(2): p. 185-91.
38. Vantourout, P. and A. Hayday, *Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(2): p. 88-100.
39. Boyden, L.M., et al., *Skint1, the prototype of a newly identified immunoglobulin superfamily gene cluster, positively selects epidermal gammadelta T cells*. Nat Genet, 2008. **40**(5): p. 656-62.
40. Barbee, S.D., et al., *Skint-1 is a highly specific, unique selecting component for epidermal T cells*. PNAS, 2011.
41. Bonneville, M., R.L. O'Brien, and W.K. Born, *Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(7): p. 467-78.
42. Dieli, F., et al., *Granulysin-Dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vgamm9Vdelta2 T lymphocytes*. J Infect Dis, 2001.

43. Spencer, C.T., et al., *Granzyme A produced by gamma(9)delta(2) T cells induces human macrophages to inhibit growth of an intracellular pathogen*. PLoS Pathog, 2013. **9**(1): p. e1003119.
44. Dudal, S., et al., *Release of LL-37 by Activated Human V 9V 2 T Cells: A Microbicidal Weapon against Brucella suis*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(8): p. 5533-5539.
45. Stenger, S., et al., *An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin*. Science, 1998. **282**(5386): p. 121-5.
46. Hamada, S., et al., *IL-17A Produced by T Cells Plays a Critical Role in Innate Immunity against Listeria monocytogenes Infection in the Liver*. The Journal of Immunology, 2008. **181**(5): p. 3456-3463.
47. Walczak, H. and P.H. Krammer, *The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems*. Exp Cell Res, 2000. **256**(1): p. 58-66.
48. Martin, B., et al., *Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 321-30.
49. Sutton, C.E., et al., *Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 331-41.
50. Sutton, C.E., L.A. Mielke, and K.H. Mills, *IL-17-producing gammadelta T cells and innate lymphoid cells*. Eur J Immunol, 2012.
51. Paul, S., Shilpi, and G. Lal, *Role of gamma-delta (gammadelta) T cells in autoimmunity*. J Leukoc Biol, 2015. **97**(2): p. 259-71.
52. Ashour, H.M. and J.Y. Niederkorn, *Gammadelta T cells promote anterior chamber-associated immune deviation and immune privilege through their production of IL-10*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8331-7.
53. Rhodes, K.A., et al., *A subset of IL-10-producing gammadelta T cells protect the liver from Listeria-elicited, CD8(+) T cell-mediated injury*. Eur J Immunol, 2008. **38**(8): p. 2274-83.
54. Cipriani, B., et al., *Activation of C-C beta-chemokines in human peripheral blood gammadelta T cells by isopentenyl pyrophosphate and regulation by cytokines*. Blood, 2000. **95**(1): p. 39-47.
55. Jameson, J., et al., *A role for skin gammadelta T cells in wound repair*. Science, 2002. **296**(5568): p. 747-9.
56. Jameson, J. and W.L. Havran, *Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing*. Immunol Rev, 2007.
57. O'Brien, R.L., et al., *Gammadelta T-cell receptors : functional correlations*. Immunol Rev, 2007.
58. Zheng, J., et al., *gammadelta-T cells: an unpolished sword in human anti-infection immunity*. Cell Mol Immunol, 2013. **10**(1): p. 50-7.
59. Paul, S., et al., *Phenotypic and Functional Plasticity of Gamma-Delta (gammadelta) T Cells in Inflammation and Tolerance*. Int Rev Immunol, 2013.
60. Brandes, M., et al., *Flexible migration program regulates gamma delta T-cell involvement in humoral immunity*. Blood, 2003. **102**(10): p. 3693-701.
61. Brandes, M., K. Willimann, and B. Moser, *Professional Antigen Presentation Function by Human gd T Cells*. Science, 2005.
62. Brandes, M., et al., *Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(7): p. 2307-12.
63. Meuter, S., M. Eberl, and B. Moser, *Prolonged antigen survival and cytosolic export in cross-presenting human  $\gamma\delta$  T cells*. Proc Natl Acad Sci USA, 2010.

64. Rezende, R.M., et al., *Identification and characterization of latency-associated peptide-expressing gammadelta T cells*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8726.
65. van Beek, J.J., et al., *Dendritic cell cross talk with innate and innate-like effector cells in antitumor immunity: implications for DC vaccination*. Crit Rev Immunol, 2014. **34**(6): p. 517-36.
66. Petrasca, A. and D.G. Doherty, *Human Vdelta2(+) gammadelta T Cells Differentially Induce Maturation, Cytokine Production, and Alloreactive T Cell Stimulation by Dendritic Cells and B Cells*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 650.
67. Hayday, A.C., *Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 184-96.
68. Witherden, D.A., K. Ramirez, and W.L. Havran, *Multiple Receptor-Ligand Interactions Direct Tissue-Resident gammadelta T Cell Activation*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 602.
69. Dalton, J.E., et al., *Intraepithelial gammadelta+ lymphocytes maintain the integrity of intestinal epithelial tight junctions in response to infection*. Gastroenterology, 2006. **131**(3): p. 818-29.
70. Edelblum, K.L., et al., *Dynamic migration of gammadelta intraepithelial lymphocytes requires occludin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(18): p. 7097-102.
71. Vaishnava, S., et al., *The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine*. Science, 2011. **334**(6053): p. 255-8.
72. Park, S.G., et al., *T regulatory cells maintain intestinal homeostasis by suppressing gammadelta T cells*. Immunity, 2010. **33**(5): p. 791-803.
73. Poccia, F., et al., *Antiviral reactivities of gammadelta T cells*. Microbes Infect, 2005. **7**(3): p. 518-28.
74. Déchanet, J., et al., *Major expansion of gammadelta T lymphocytes following Cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients*. J Infect Dis, 1999.
75. Halary, F., et al., *Shared reactivity of V{delta}2(neg) {gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells*. J Exp Med, 2005. **201**(10): p. 1567-78.
76. Ehl, S., et al., *A variant of SCID with specific immune responses and predominance of gamma delta T cells*. J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3140-8.
77. Couzi, L., et al., *Direct and Indirect Effects of Cytomegalovirus-Induced gammadelta T Cells after Kidney Transplantation*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 3.
78. Khairallah, C., et al., *gammadelta T cells confer protection against murine cytomegalovirus (MCMV)*. PLoS Pathog, 2015. **11**(3): p. e1004702.
79. Sell, S., et al., *Control of murine cytomegalovirus infection by gammadelta T cells*. PLoS Pathog, 2015. **11**(2): p. e1004481.
80. Couzi, L., et al., *Cytomegalovirus-induced gammadelta T cells associate with reduced cancer risk after kidney transplantation*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(1): p. 181-8.
81. Willcox, C.R., et al., *Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor*. Nat Immunol, 2012. **13**(9): p. 872-9.
82. Kabelitz, D., et al., *Human Vdelta2 versus non-Vdelta2 gammadelta T cells in antitumor immunity*. Oncoimmunology, 2013. **2**(3): p. e23304.
83. Fisher, J., et al., *Non-V delta 2 gamma delta T lymphocytes as effectors of cancer immunotherapy*. Oncoimmunology, 2015. **4**(3): p. e973808.
84. Scheper, W., Z. Sebestyen, and J. Kuball, *Cancer Immunotherapy Using gammadelta T Cells: Dealing with Diversity*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 601.

85. Konigshofer, Y. and Y.H. Chien, *Gammadelta T cells - innate immune lymphocytes?* Curr Opin Immunol, 2006. **18**(5): p. 527-33.
86. Chien, Y.H. and Y. Konigshofer, *Antigen recognition by gammadelta T cells.* Immunol Rev, 2007.
87. Chien, Y.H., C. Meyer, and M. Bonneville, *gammadelta T cells: first line of defense and beyond.* Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 121-55.
88. Wesch, D., et al., *Modulation of gammadelta T cell responses by TLR ligands.* Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(14): p. 2357-70.
89. Eagle, R.A. and J. Trowsdale, *Promiscuity and the single receptor: NKG2D.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 737-44.
90. Das, H., et al., *MICA Engagement by Human Vγ2Vδ2 T Cells Enhances Their Antigen-Dependent Effector Function.* Immunity, 2001.
91. Nedellec, S., et al., *NKG2D costimulates human V gamma 9V delta 2 T cell antitumor cytotoxicity through protein kinase C theta-dependent modulation of early TCR-induced calcium and transduction signals.* J Immunol, 2010. **185**(1): p. 55-63.
92. Nitahara, A., et al., *NKG2D ligation without T cell receptor engagement triggers both cytotoxicity and cytokine production in dendritic epidermal T cells.* J Invest Dermatol, 2006. **126**(5): p. 1052-8.
93. Rincon-Orozco, B., et al., *Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D.* J Immunol, 2005. **175**(4): p. 2144-51.
94. Adams, E.J., Y.H. Chien, and K.C. Garcia, *Structure of a gammadelta T Cell Receptor in complex with the nonclassical MHC T22.* Science, 2005.
95. Bluestone, J.A., et al., *Structure and specificity of T cell receptor gammadelta on major histocompatibility complex antigen-specific CD3+, CD4-, CD8- T lymphocytes.* J Exp Med, 1988.
96. Crowley, M.P., et al., *The recognition of the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule, T10, by the gammadelta T cell, G8.* J Exp Med, 1997. **185**(7): p. 1223-30.
97. Bonneville, M., et al., *Recognition of a self major histocompatibility complex TL region product by gamma delta T-cell receptors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(15): p. 5928-32.
98. Matis, L.A., et al., *Structure and specificity of a class II MHC alloreactive gammadelta T cell receptor heterodimer.* Science, 1989.
99. Schild, H., et al., *The nature of Major Histocompatibility Complex recognition by gammadelta T cells.* Cell, 1994.
100. Sciammas, R. and J.A. Bluestone, *HSV-1 glycoprotein I-reactive TCR gamma delta cells directly recognize the peptide backbone in a conformationally dependent manner.* J Immunol, 1998. **161**(10): p. 5187-92.
101. Johnson, R.M., et al., *A murine CD4-, CD8- T cell receptor gammadelta T lymphocyte clone specific for herper simplex virus glycoprotein.* J Immunol, 1992.
102. Born, W.K., et al., *Hybridomas expressing gammadelta T-Cell Receptor respond to cardiolipin and Beta2-glycoprotein 1 (Apolipoprotein H).* Scand J Immunol, 2003.
103. Happ, M.P., et al., *Limited receptor repertoire in a mycobacteria-reactive subset of gamma delta T lymphocytes.* Nature, 1989. **342**(6250): p. 696-8.
104. Zeng, X., et al., *gammadelta T cells recognize a microbial encoded B cell antigen to initiate a rapid antigen-specific interleukin-17 response.* Immunity, 2012. **37**(3): p. 524-34.
105. Zhang, L., et al., *Gamma delta T cell receptors confer autonomous responsiveness to the insulin-peptide B:9-23.* J Autoimmun, 2010. **34**(4): p. 478-84.

106. Wu, J., V. Groh, and T. Spies, *T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells*. J Immunol, 2002. **169**(3): p. 1236-40.
107. Groh, V., et al., *Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells*. Science, 1998.
108. Kong, Y., et al., *The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCR gamma9/delta2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCR gammadelta and NKG2D*. Blood, 2009.
109. Spada, F.M., et al., *Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells : implications for innate immunity*. J Exp Med, 2000.
110. Bai, L., et al., *The majority of CD1d-sulfatide-specific T cells in human blood use a semiinvariant Vdelta1 TCR*. Eur J Immunol, 2012. **42**(9): p. 2505-10.
111. Luoma, A.M., et al., *Crystal structure of Vdelta1 T cell receptor in complex with CD1d-sulfatide shows MHC-like recognition of a self-lipid by human gammadelta T cells*. Immunity, 2013. **39**(6): p. 1032-42.
112. Uldrich, A.P., et al., *CD1d-lipid antigen recognition by the gammadelta TCR*. Nat Immunol, 2013. **14**(11): p. 1137-45.
113. Bruder, J., et al., *Target specificity of an autoreactive pathogenic human gammadelta-T cell receptor in myositis*. J Biol Chem, 2012. **287**(25): p. 20986-95.
114. Scotet, E., et al., *Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I*. Immunity, 2005. **22**(1): p. 71-80.
115. Constant, P., et al., *Stimulation of human gammadelta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands*. Science, 1994.
116. Vavassori, S., et al., *Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human gammadelta T cells*. Nat Immunol, 2013. **14**(9): p. 908-16.
117. Harly, C., et al., *Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T-cell subset*. Blood, 2012. **120**(11): p. 2269-79.
118. Sandstrom, A., et al., *The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human Vgamma9Vdelta2 T cells*. Immunity, 2014. **40**(4): p. 490-500.
119. Rudolph, M.G., et al., *Combined pseudo-merohedral twinning, non-crystallographic symmetry and pseudo-translation in a monoclinic crystal form of the gammadelta T-cell ligand T10*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 4): p. 656-64.
120. Wingren, C., et al., *Crystal structure of a gammadelta T cell Receptor ligand T22 : a truncated MHC-like fold*. Science, 2000.
121. Crowley, M.P., et al., *A population of murine gammdelta T cells that recognize an inducible MHC class Ib molecule*. Science, 2000.
122. Shin, S., et al., *Antigen recognition determinants of gammadelta T cell receptors*. Science, 2005.
123. Li, P., et al., *Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA*. Nat Immunol, 2001. **2**(5): p. 443-51.
124. Xu, B., et al., *Crystal structure of a gammadelta T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA*. PNAS, 2011.
125. Dieude, M., et al., *Cardiolipin binds to CD1d and stimulates CD1d-restricted gammadelta T cells in the normal murine repertoire*. J Immunol, 2011. **186**(8): p. 4771-81.
126. Crowley, M.P., et al., *A population of murine gammadelta T cells that recognize an inducible MHC class Ib molecule*. Science, 2000. **287**(5451): p. 314-6.

127. Chang, W.L., et al., *Influenza virus infection causes global respiratory tract B cell response modulation via innate immune signals*. J Immunol, 2007. **178**(3): p. 1457-67.
128. Quertermous, T., et al., *Human T-cell gamma genes contain N segments and have marked junctional variability*. Nature, 1986. **322**(6075): p. 184-7.
129. Pauza, C.D. and C. Cairo, *Evolution and function of the TCR Vgamma9 chain repertoire: It's good to be public*. Cell Immunol, 2015. **296**(1): p. 22-30.
130. Borst, J., et al., *Non-random expression of T cell receptor gamma and delta variable gene segments in functional T lymphocyte clones from human peripheral blood*. Eur J Immunol, 1989. **19**(9): p. 1559-68.
131. Casorati, G., et al., *Molecular analysis of human gamma/delta+ clones from thymus and peripheral blood*. J Exp Med, 1989. **170**(5): p. 1521-35.
132. Tribel, F., M.P. Lefranc, and T. Hercend, *Further evidence for a sequentially ordered activation of T cell rearranging gamma genes during T lymphocyte differentiation*. Eur J Immunol, 1988. **18**(5): p. 789-94.
133. Huck, S. and M.P. Lefranc, *Rearrangements to the JP1, JP and JP2 segments in the human T-cell rearranging gamma gene (TCRGgamma) locus*. FeBS Lett, 1987. **224**: p. 291-296.
134. Band, H., et al., *Expression of human T cell receptor-gamma delta structural forms*. J Immunol, 1989. **142**(10): p. 3627-33.
135. Hebbeler, A.M., et al., *Individual Vgamma2-Jgamma1.2+ T cells respond to both isopentenyl pyrophosphate and Daudi cell stimulation: generating tumor effectors with low molecular weight phosphoantigens*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(6): p. 819-29.
136. McVay, L.D., et al., *Regulated expression and structure of T cell receptor gamma/delta transcripts in human thymic ontogeny*. EMBO J, 1991. **10**(1): p. 83-91.
137. Morita, C.T., et al., *TCR usage and functional capabilities of human gamma delta T cells at birth*. J Immunol, 1994. **153**(9): p. 3979-88.
138. Parker, C.M., et al., *Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gammadelta repertoire*. J Exp Med, 1990.
139. Braakman, E., et al., *Expression of CD45 isoforms by fresh and activated human gamma delta T lymphocytes and natural killer cells*. Int Immunol, 1991. **3**(7): p. 691-7.
140. Giachino, C., et al., *Clonal expansions of V delta 1+ and V delta 2+ cells increase with age and limit the repertoire of human gamma delta T cells*. Eur J Immunol, 1994. **24**(8): p. 1914-8.
141. Villers, D., et al., *Alteration of the T cell repertoire after bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant, 1994. **13**(1): p. 19-26.
142. Gorski, J., et al., *Analysis of reconstituting T cell receptor repertoires in bone marrow transplant recipients*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 1995. **43**(2): p. 93-7.
143. Davey, M.S., et al., *Human neutrophil clearance of bacterial pathogens triggers anti-microbial gammadelta T cell responses in early infection*. PLoS Pathog, 2011. **7**(5): p. e1002040.
144. Morita, C.T., et al., *Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells : discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens*. Immunol Rev, 2007.

145. Holoshitz, J., et al., *Isolation of CD4- CD8- mycobacteria-reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid*. *Nature*, 1989. **339**(6221): p. 226-9.
146. Li, B., et al., *Disease-specific changes in gammadelta T cell repertoire and function in patients with pulmonary tuberculosis*. *J Immunol*, 1996. **157**(9): p. 4222-9.
147. Jouen-Beades, F., et al., *In vivo and in vitro activation and expansion of gammadelta T cells during Listeria monocytogenes infection in humans*. *Infect Immun*, 1997. **65**(10): p. 4267-72.
148. Bertotto, A., et al., *Lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in acute Brucella melitensis infection*. *Eur J Immunol*, 1993. **23**(5): p. 1177-80.
149. Feurle, J., et al., *Escherichia coli produces phosphoantigens activating human gamma delta T cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(1): p. 148-54.
150. Poquet, Y., et al., *Expansion of Vgamma9 Vdelta2 T cells is triggered by Francisella tularensis-derived phosphoantigens in tularemia but not after tularemia vaccination*. *Infect Immun*, 1998. **66**(5): p. 2107-14.
151. Hara, T., et al., *Predominant activation and expansion of V gamma 9-bearing gamma delta T cells in vivo as well as in vitro in Salmonella infection*. *J Clin Invest*, 1992. **90**(1): p. 204-10.
152. Young, J.L., et al., *Human gamma delta T-cell recognition of Yersinia enterocolitica*. *Immunology*, 1997. **91**(4): p. 503-10.
153. Langhorne, J., *gammadelta T cells in malaria infections*. *Parasitol Today*, 1996. **12**(5): p. 200-3.
154. Russo, D.M., et al., *Antigen-reactive gamma delta T cells in human leishmaniasis*. *J Immunol*, 1993. **151**(7): p. 3712-8.
155. Scalise, F., et al., *Lymphocytes bearing the gamma delta T-cell receptor in acute toxoplasmosis*. *Immunology*, 1992. **76**(4): p. 668-70.
156. Poccia, F., et al., *Anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus immune responses: the role played by V gamma 9V delta 2 T cells*. *J Infect Dis*, 2006. **193**(9): p. 1244-9.
157. De Paoli, P., et al., *A subset of gamma delta lymphocytes is increased during HIV-1 infection*. *Clin Exp Immunol*, 1991. **83**(2): p. 187-91.
158. Gan, Y.H., C.D. Pauza, and M. Malkovsky, *Gamma delta T cells in rhesus monkeys and their response to simian immunodeficiency virus (SIV) infection*. *Clin Exp Immunol*, 1995. **102**(2): p. 251-5.
159. Par, G., et al., *Decrease in CD3-negative-CD8dim(+) and Vdelta2/Vgamma9 TcR+ peripheral blood lymphocyte counts, low perforin expression and the impairment of natural killer cell activity is associated with chronic hepatitis C virus infection*. *J Hepatol*, 2002. **37**(4): p. 514-22.
160. Agrati, C., et al., *Activation of Vgamma9Vdelta2 T cells by non-peptidic antigens induces the inhibition of subgenomic HCV replication*. *Int Immunol*, 2006. **18**(1): p. 11-8.
161. Li, H., et al., *Human Vgamma9Vdelta2-T cells efficiently kill influenza virus-infected lung alveolar epithelial cells*. *Cell Mol Immunol*, 2013. **10**(2): p. 159-64.
162. Qin, G., et al., *Phosphoantigen-expanded human gammadelta T cells display potent cytotoxicity against monocyte-derived macrophages infected with human and avian influenza viruses*. *J Infect Dis*, 2009. **200**(6): p. 858-65.
163. Qin, G., et al., *Type 1 responses of human Vgamma9Vdelta2 T cells to influenza A viruses*. *J Virol*, 2011. **85**(19): p. 10109-16.
164. Xiang, Z., et al., *Targeted activation of human Vgamma9Vdelta2-T cells controls epstein-barr virus-induced B cell lymphoproliferative disease*. *Cancer Cell*, 2014. **26**(4): p. 565-76.

165. Poccia, F., et al., *Peripheral Vgamma9/Vdelta2 T cell deletion and anergy to nonpeptidic mycobacterial antigens in asymptomatic HIV-1-infected persons.* J Immunol, 1996.
166. Fisch, P., et al., *Recognition by human Vgamma9/Vdelta2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells.* Science, 1990.
167. Kunzmann, V., et al., *Stimulation of gd T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma.* Blood, 2000.
168. Selin, L.K., et al., *Reactivity of gamma delta T cells induced by the tumour cell line RPMI 8226: functional heterogeneity of clonal populations and role of GroEL heat shock proteins.* Scand J Immunol, 1992. **36**(1): p. 107-17.
169. Bank, I., et al., *V delta 2+ gamma delta T lymphocytes are cytotoxic to the MCF 7 breast carcinoma cell line and can be detected among the T cells that infiltrate breast tumors.* Clin Immunol Immunopathol, 1993. **67**(1): p. 17-24.
170. Kato, Y., et al., *Targeting of Tumor Cells for Human T Cells by Nonpeptide Antigens.* The Journal of Immunology, 2001. **167**(9): p. 5092-5098.
171. Kobayashi, H., et al., *Gamma/delta T cells provide innate immunity against renal cell carcinoma.* Cancer Immunol Immunother, 2001. **50**(3): p. 115-24.
172. Choudhary, A., et al., *Selective lysis of autologous tumor cells by recurrent gammadelta Tumor-Infiltrating Lymphocytes from renal carcinoma.* J Immunol, 1995.
173. Corvaisier, M., et al., *V9V2 T Cell Response to Colon Carcinoma Cells.* The Journal of Immunology, 2005. **175**(8): p. 5481-5488.
174. Bonneville, M., et al., *Chicago 2014--30 years of gammadelta T cells.* Cell Immunol, 2015. **296**(1): p. 3-9.
175. Liu, Z., et al., *Ex vivo expanded human Vgamma9Vdelta2+ gammadelta-T cells mediate innate antitumor activity against human prostate cancer cells in vitro.* J Urol, 2005. **173**(5): p. 1552-6.
176. Ferrarini, M., et al., *Killing of laminin receptor-positive human lung cancers by tumor infiltrating lymphocytes bearing gammadelta(+) t-cell receptors.* J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(7): p. 436-41.
177. Zheng, B.J., et al., *Anti-tumor effects of human peripheral gammadelta T cells in a mouse tumor model.* Int J Cancer, 2001. **92**(3): p. 421-5.
178. Kabelitz, D., et al., *Characterization of tumor reactivity of human V gamma 9V delta 2 gamma delta T cells in vitro and in SCID mice in vivo.* J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6767-76.
179. Yuasa, T., et al., *Intravesical administration of gammadelta T cells successfully prevents the growth of bladder cancer in the murine model.* Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(4): p. 493-502.
180. Capietto, A.H., L. Martinet, and J.J. Fournie, *Stimulated gammadelta T cells increase the in vivo efficacy of trastuzumab in HER-2+ breast cancer.* J Immunol, 2011. **187**(2): p. 1031-8.
181. Fournie, J.J., et al., *What lessons can be learned from gammadelta T cell-based cancer immunotherapy trials?* Cell Mol Immunol, 2013. **10**(1): p. 35-41.
182. Dunne, M.R., et al., *Preferential Th1 cytokine profile of phosphoantigen-stimulated human Vgamma9Vdelta2 T cells.* Mediators Inflamm, 2010. **2010**: p. 704941.
183. Garcia, V.E., et al., *Single-cell cytokine analysis of gamma delta T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens.* J Immunol, 1997. **159**(3): p. 1328-35.
184. Tsukaguchi, K., B. de Lange, and W.H. Boom, *Differential regulation of IFN-gamma, TNF-alpha, and IL-10 production by CD4(+) alphabetaTCR+ T cells and vdelta2(+) gammadelta T cells in response to monocytes infected with Mycobacterium tuberculosis-H37Ra.* Cell Immunol, 1999. **194**(1): p. 12-20.

185. Thedrez, A., et al., *Self/non-self discrimination by human gd T cells: simple solutions for a complex issue?* Immunol Rev, 2007.
186. Morita, C.T., et al., *Functionally distinct subsets of human gamma/delta T cells.* Eur J Immunol, 1991. **21**(12): p. 2999-3007.
187. Wesch, D., A. Glatzel, and D. Kabelitz, *Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype.* Cell Immunol, 2001. **212**(2): p. 110-7.
188. Vermijlen, D., et al., *Distinct cytokine-driven responses of activated blood gammadelta T cells: insights into unconventional T cell pleiotropy.* J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4304-14.
189. Bansal, R.R., et al., *IL-21 enhances the potential of human gammadelta T cells to provide B-cell help.* Eur J Immunol, 2012. **42**(1): p. 110-9.
190. Caccamo, N., et al., *IL-21 regulates the differentiation of a human gammadelta T cell subset equipped with B cell helper activity.* PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41940.
191. Casetti, R., et al., *Cutting edge: TGF-beta1 and IL-15 Induce FOXP3+ gammadelta regulatory T cells in the presence of antigen stimulation.* J Immunol, 2009. **183**(6): p. 3574-7.
192. Caccamo, N., et al., *Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human Vgamma9Vdelta2 T cells.* Blood, 2011. **118**(1): p. 129-38.
193. Ness-Schwickerath, K.J., C. Jin, and C.T. Morita, *Cytokine requirements for the differentiation and expansion of IL-17A- and IL-22-producing human Vgamma2Vdelta2 T cells.* J Immunol, 2010. **184**(12): p. 7268-80.
194. Ness-Schwickerath, K.J. and C.T. Morita, *Regulation and function of IL-17A- and IL-22-producing gammadelta T cells.* Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(14): p. 2371-90.
195. Wu, P., et al., *gammadeltaT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer.* Immunity, 2014. **40**(5): p. 785-800.
196. Devilder, M.C., et al., *Early triggering of exclusive IFN-gamma responses of human Vgamma9Vdelta2 T cells by TLR-activated myeloid and plasmacytoid dendritic cells.* J Immunol, 2009. **183**(6): p. 3625-33.
197. Lafont, V., et al., *Plasticity of gammadelta T Cells: Impact on the Anti-Tumor Response.* Front Immunol, 2014. **5**: p. 622.
198. Kaiko, G.E., et al., *Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response?* Immunology, 2008. **123**(3): p. 326-38.
199. Deauvieau, F., et al., *Human natural killer cells promote cross-presentation of tumor cell-derived antigens by dendritic cells.* Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. 1085-94.
200. Ismaili, J., et al., *Human gamma delta T cells induce dendritic cell maturation.* Clin Immunol, 2002. **103**(3 Pt 1): p. 296-302.
201. Devilder, M.C., et al., *Potentiation of Antigen-Stimulated V9V2 T Cell Cytokine Production by Immature Dendritic Cells (DC) and Reciprocal Effect on DC Maturation.* The Journal of Immunology, 2006. **176**(3): p. 1386-1393.
202. Shrestha, N., et al., *Regulation of acquired immunity by gamma delta T-cell/dendritic-cell interactions.* Ann N Y Acad Sci, 2005. **1062**: p. 79-94.
203. Martino, A., et al., *Complementary function of gamma delta T-lymphocytes and dendritic cells in the response to isopentenyl-pyrophosphate and lipopolysaccharide antigens.* J Clin Immunol, 2005. **25**(3): p. 230-7.
204. Dunne, M.R., et al., *(E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2 enyl pyrophosphate-stimulated Vgamma9Vdelta2 T cells possess T helper type 1-promoting adjuvant activity for human monocyte-derived dendritic cells.* Cancer Immunol Immunother, 2010. **59**(7): p. 1109-20.

205. Rothenfusser, S., et al., *Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha/-beta*. Eur J Immunol, 2001. **31**(12): p. 3525-34.
206. Kunzmann, V., et al., *Polyinosinic-polycytidylic acid-mediated stimulation of human gammadelta T cells via CD11c dendritic cell-derived type I interferons*. Immunology, 2004. **112**(3): p. 369-77.
207. Fiore, F., et al., *Enhanced ability of dendritic cells to stimulate innate and adaptive immunity on short-term incubation with zoledronic acid*. Blood, 2007. **110**(3): p. 921-7.
208. von Lilienfeld-Toal, M., et al., *Coculture with dendritic cells promotes proliferation but not cytotoxic activity of gamma/delta T cells*. Immunol Lett, 2005. **99**(1): p. 103-8.
209. Meraviglia, S., et al., *Partial and ineffective activation of V gamma 9V delta 2 T cells by Mycobacterium tuberculosis-infected dendritic cells*. J Immunol, 2010. **185**(3): p. 1770-6.
210. Ni, M., et al., *Full restoration of Brucella-infected dendritic cell functionality through Vgamma9Vdelta2 T helper type 1 crosstalk*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43613.
211. Martino, A., R. Casetti, and F. Poccia, *Enhancement of BCG-induced Th1 immune response through Vgamma9Vdelta2 T cell activation with non-peptidic drugs*. Vaccine, 2007. **25**(6): p. 1023-9.
212. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
213. Sireci, G., et al., *Patterns of phosphoantigen stimulation of human Vgamma9/Vdelta2 T cell clones include Th0 cytokines*. Hum Immunol, 1997. **58**(2): p. 70-82.
214. Ottonnes, F., et al., *V gamma 9V delta 2 T cells impair intracellular multiplication of Brucella suis in autologous monocytes through soluble factor release and contact-dependent cytotoxic effect*. J Immunol, 2000. **165**(12): p. 7133-9.
215. Eberl, M., et al., *A rapid crosstalk of human gammadelta T cells and monocytes drives the acute inflammation in bacterial infections*. PLoS Pathog, 2009. **5**(2): p. e1000308.
216. Welton, J.L., et al., *Monocytes and gammadelta T cells control the acute-phase response to intravenous zoledronate: insights from a phase IV safety trial*. J Bone Miner Res, 2013. **28**(3): p. 464-71.
217. Mantovani, A., et al., *Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(8): p. 519-31.
218. Mocsai, A., *Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond*. J Exp Med, 2013. **210**(7): p. 1283-99.
219. Scapini, P. and M.A. Cassatella, *Social networking of human neutrophils within the immune system*. Blood, 2014. **124**(5): p. 710-9.
220. Ashtekar, A.R. and B. Saha, *Poly's plea: membership to the club of APCs*. Trends Immunol, 2003. **24**(9): p. 485-90.
221. Muller, I., et al., *Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms?* Trends Immunol, 2009. **30**(11): p. 522-30.
222. Agrati, C., et al., *Activated V gamma 9V delta 2 T cells trigger granulocyte functions via MCP-2 release*. J Immunol, 2009. **182**(1): p. 522-9.

223. Davey, M.S., et al., *Microbe-specific unconventional T cells induce human neutrophil differentiation into antigen cross-presenting cells*. J Immunol, 2014. **193**(7): p. 3704-16.
224. Vinuesa, C.G., et al., *Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(11): p. 853-65.
225. Tangye, S.G., et al., *The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(6): p. 412-26.
226. Morgan, N.V., et al., *Mutation in the TCRalpha subunit constant gene (TRAC) leads to a human immunodeficiency disorder characterized by a lack of TCRalphabeta+ T cells*. J Clin Invest, 2011. **121**(2): p. 695-702.
227. Gil, J., et al., *A leaky mutation in CD3D differentially affects alphabeta and gammadelta T cells and leads to a Talphabeta-Tgammadelta+B+NK+ human SCID*. J Clin Invest, 2011. **121**(10): p. 3872-6.
228. Caccamo, N., et al., *CXCR5 identifies a subset of Vgamma9Vdelta2 T cells which secrete IL-4 and IL-10 and help B cells for antibody production*. J Immunol, 2006. **177**(8): p. 5290-5.
229. Wu, Y., et al., *Human gamma delta T cells: a lymphoid lineage cell capable of professional phagocytosis*. J Immunol, 2009. **183**(9): p. 5622-9.
230. Poupot, M., F. Pont, and J.J. Fournie, *Profiling blood lymphocyte interactions with cancer cells uncovers the innate reactivity of human gamma delta T cells to anaplastic large cell lymphoma*. J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1717-22.
231. Schneiders, F.L., et al., *CD1d-restricted antigen presentation by Vgamma9Vdelta2-T cells requires trogocytosis*. Cancer Immunol Res, 2014. **2**(8): p. 732-40.
232. Khan, M.W., et al., *Expanded Human Blood-Derived gammadeltaT Cells Display Potent Antigen-Presentation Functions*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 344.
233. Werter, I.M., et al., *Vgamma9Vdelta2-T cells as antigen presenting cells for iNKT cell based cancer immunotherapy*. Oncoimmunology, 2014. **3**(9): p. e955343.
234. Khan, M.W., M. Eberl, and B. Moser, *Potential Use of gammadelta T Cell-Based Vaccines in Cancer Immunotherapy*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 512.
235. Ichikawa, Y., et al., *T cells bearing gamma/delta T cell receptor and their expression of activation antigen in peripheral blood from patients with Sjogren's syndrome*. Clin Exp Rheumatol, 1991. **9**(6): p. 603-9.
236. Matsushima, A., et al., *Early activation of gammadelta T lymphocytes in patients with severe systemic inflammatory response syndrome*. Shock, 2004. **22**(1): p. 11-5.
237. Wiemer, D.F. and A.J. Wiemer, *Opportunities and challenges in development of phosphoantigens as Vgamma9Vdelta2 T cell agonists*. Biochem Pharmacol, 2014. **89**(3): p. 301-12.
238. Ma, A., R. Koka, and P. Burkett, *Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 657-79.
239. Ribot, J.C., et al., *B7-CD28 costimulatory signals control the survival and proliferation of murine and human gammadelta T cells via IL-2 production*. J Immunol, 2012. **189**(3): p. 1202-8.
240. Wrobel, P., et al., *Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells: involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor- versus NKG2D-dependent recognition*. Scand J Immunol, 2007. **66**(2-3): p. 320-8.
241. Lafont, V., et al., *Production of TNF-alpha by human V gamma 9V delta 2 T cells via engagement of Fc gamma RIIIA, the low affinity type 3 receptor for the Fc portion of IgG, expressed upon TCR activation by nonpeptidic antigen*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7190-9.

242. Tokuyama, H., et al., *V gamma 9 V delta 2 T cell cytotoxicity against tumor cells is enhanced by monoclonal antibody drugs--rituximab and trastuzumab*. Int J Cancer, 2008. **122**(11): p. 2526-34.
243. Fisher, J.P., et al., *Neuroblastoma killing properties of Vdelta2 and Vdelta2-negative gammadeltaT cells following expansion by artificial antigen-presenting cells*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(22): p. 5720-32.
244. Nedellec, S., M. Bonneville, and E. Scotet, *Human Vgamma9Vdelta2 T cells: from signals to functions*. Semin Immunol, 2010. **22**(4): p. 199-206.
245. Kato, Y., et al., *Requirement of Species-Specific Interactions for the Activation of Human T Cells by Pamidronate*. The Journal of Immunology, 2003. **170**(7): p. 3608-3613.
246. Wang, P. and M. Malkovsky, *Different Roles of the CD2 and LFA-1 T-Cell Co-receptors for Regulating Cytotoxic, Proliferative, and Cytokine Responses of Human Vg9/Vd2 T Cells* Mol Med, 2000.
247. Benzaid, I., et al., *In vivo phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors trigger Vgamma9Vdelta2 T-cell antitumor cytotoxicity through ICAM-1 engagement*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(22): p. 6249-59.
248. Kato, Y., et al., *Involvement of CD166 in the Activation of Human T Cells by Tumor Cells Sensitized with Nonpeptide Antigens*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(2): p. 877-884.
249. Pfeffer, K., et al., *A lectin-binding, protease-resistant mycobacterial ligand specifically activates Vgamma9+ human gammadelta T cells*. J Immunol, 1992.
250. Tanaka, Y., et al., *Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gammadelta T cells*. Nature, 1995.
251. Kuzuyama, T., *Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units*. Biosci Biotechnol Biochem, 2002. **66**(8): p. 1619-27.
252. Morita, C.T., et al., *Recognition of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens by human gammadelta T cells*. Microbes and Infection, 1999.
253. Belmant, C., et al., *3-Formyl-1-butyl Pyrophosphate a novel mycobacterial metabolite-activating human gammadelta T cells*. J Biol Chem, 1999.
254. Jomaa, H., et al., *Vgamma9/Vdelta2 T cell activation induced by bacterial low molecular mass compounds depends on the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1999.
255. Altincicek, B., et al., *Cutting Edge: Human T Cells Are Activated by Intermediates of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis*. The Journal of Immunology, 2001. **166**(6): p. 3655-3658.
256. Hintz, M., et al., *Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gammadelta T cells in Escherichia coli*. FEBS Lett, 2001.
257. Harwood, H.J., Jr., et al., *In vivo regulation of human leukocyte 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: increased enzyme protein concentration and catalytic efficiency in human leukemia and lymphoma*. J Lipid Res, 1991. **32**(8): p. 1237-52.
258. Gober, H.J., et al., *Human T Cell Receptor gammadelta Cells Recognize Endogenous Mevalonate Metabolites in Tumor Cells*. Journal of Experimental Medicine, 2003. **197**(2): p. 163-168.
259. Espinosa, E., et al., *Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human gamma delta T cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 18337-44.

260. Boëdec , A., et al., *Synthesis and Biological Activity of Phosphonate Analogues and Geometric Isomers of the Highly Potent Phosphoantigen (E)-1-Hydroxy-2-methylbut-2-enyl 4-Diphosphate*. J. Med. Chem, 2008.
261. Hsiao, C.H., et al., *Synthesis of a Phosphoantigen Prodrug that Potently Activates Vgamma9Vdelta2 T-Lymphocytes*. Chem Biol, 2014. **21**(8): p. 945-54.
262. Amslinger, S., et al., *Stimulation of Vgamma9/Vdelta2 T-lymphocyte proliferation by the isoprenoid precursor, (E)-1-hydroxy-2-methyl-but-2-enyl 4-diphosphate*. Immunobiology, 2007. **212**(1): p. 47-55.
263. Harly, C., C.-M. Peigné, and E. Scotet, *Molecules and Mechanisms Implicated in the Peculiar Antigenic Activation Process of Human VÎ<sup>3</sup>9VÎ<sup>2</sup> T Cells*. Frontiers in Immunology, 2015. **5**.
264. Belmant, C., et al., *A chemical basis for recognition of nonpeptide antigens by human γδ T cells*. FASEB J, 2000.
265. Song, Y., et al., *Synthesis of chiral phosphoantigens and their activity in gamma delta T cell stimulation*. Bioorg Med Chem Lett, 2004. **14**(17): p. 4471-7.
266. Tanaka, Y., et al., *Synthesis of pyrophosphate-containing compounds that stimulate Vgamma9Vdelta2 T cells : application to cancer immunotherapy*. Med Chem, 2007.
267. Espinosa, E., et al., *Y2K+1 state-of-the-art on non-peptide phosphoantigens, a novel category of immunostimulatory molecules*. Microbes and Infection, 2001.
268. Sireci, G., et al., *Differential activation of human gammadelta cells by nonpeptide phosphoantigens*. Eur J Immunol, 2001. **31**(5): p. 1628-35.
269. Morita, C.T., et al., *Structural Features of Nonpeptide Prenyl Pyrophosphates That Determine Their Antigenicity for Human T Cells*. The Journal of Immunology, 2001. **167**(1): p. 36-41.
270. Hosking, D., *Pharmacological therapy of Paget's and other metabolic bone diseases*. Bone, 2006. **38**(2 Suppl 2): p. S3-7.
271. Sauty, A., et al., *Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels after bisphosphonates treatment in vitro and in patients with malignancy*. Bone, 1996. **18**(2): p. 133-9.
272. Berenson, J.R., et al., *A phase I dose-ranging trial of monthly infusions of zoledronic acid for the treatment of osteolytic bone metastases*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(3): p. 478-85.
273. Tripathy, D., J.J. Body, and B. Bergstrom, *Review of ibandronate in the treatment of metastatic bone disease: experience from phase III trials*. Clin Ther, 2004. **26**(12): p. 1947-59.
274. Perry, C.M. and D.P. Figgitt, *Zoledronic acid: a review of its use in patients with advanced cancer*. Drugs, 2004. **64**(11): p. 1197-211.
275. Boonen, S., et al., *Effect of osteoporosis treatments on risk of non-vertebral fractures: review and meta-analysis of intention-to-treat studies*. Osteoporos Int, 2005. **16**(10): p. 1291-8.
276. Russell, R.G., *Bisphosphonates: from bench to bedside*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1068**: p. 367-401.
277. Riebeling, C., et al., *The bisphosphonate pamidronate induces apoptosis in human melanoma cells in vitro*. Br J Cancer, 2002. **87**(3): p. 366-71.
278. Rogers, M.J., et al., *Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates*. Cancer, 2000. **88**(12 Suppl): p. 2961-78.
279. Kunzmann, V., E. Bauer, and M. Wilhelm, *Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate*. N Engl J Med, 1999.
280. Sanders, J.M., et al., *Quantitative structure-activity relationships for gammadelta T cell activation by bisphosphonates*. J Med Chem, 2004. **47**(2): p. 375-84.

281. Thompson, K. and M.J. Rogers, *Statins Prevent Bisphosphonate-Induced  $\gamma\delta$ -T-Cell Proliferation and Activation In Vitro*. Journal of Bone and Mineral Research, 2003. **19**(2): p. 278-288.
282. Riganti, C., et al., *Human gammadelta T-cell responses in infection and immunotherapy: common mechanisms, common mediators?* Eur J Immunol, 2012. **42**(7): p. 1668-76.
283. Kamath, A.B., et al., *Antigens in tea-beverage prime human Vgamma 2Vdelta 2 T cells in vitro and in vivo for memory and nonmemory antibacterial cytokine responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 6009-14.
284. Bukowski, J.F., C.T. Morita, and M.B. Brenner, *Human  $\gamma\delta$  T Cells Recognize Alkylamines Derived from Microbes, Edible Plants, and Tea: Implications for Innate Immunity*. Immunity, 1999.
285. Thompson, K., J. Rojas-Navea, and M.J. Rogers, *Alkylamines cause Vgamma9Vdelta2 T-cell activation and proliferation by inhibiting the mevalonate pathway*. Blood, 2006.
286. Bukowski, J.F., et al., *V gamma 2V delta 2 TCR-dependent recognition of non-peptide antigens and Daudi cells analyzed by TCR gene transfer*. J Immunol, 1995. **154**(3): p. 998-1006.
287. Das, H., et al., *Vgamma9Vdelta2 T-Cell Receptor-mediated recognition of aminobisphosphonates*. Blood, 2001.
288. Marcu-Malina, V., et al., *Redirecting alphabeta T cells against cancer cells by transfer of a broadly tumor-reactive gammadeltaT-cell receptor*. Blood, 2011. **118**(1): p. 50-9.
289. Tanaka, Y., et al., *Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(17): p. 8175-9.
290. Laird, R.M., K. Laky, and S.M. Hayes, *Unexpected role for the B cell-specific Src family kinase B lymphoid kinase in the development of IL-17-producing gammadelta T cells*. J Immunol, 2010. **185**(11): p. 6518-27.
291. Laird, R.M. and S.M. Hayes, *Roles of the Src tyrosine kinases Lck and Fyn in regulating gammadeltaTCR signal strength*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8899.
292. Lafont, V., et al., *Isopentenyl pyrophosphate, a mycobacterial non-peptidic antigen, triggers delayed and highly sustained signaling in human gamma delta T lymphocytes without inducing down-modulation of T cell antigen receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 15961-7.
293. Bukowski, J.F., et al., *Crucial role of TCR gamma chain junctional region in prenylpyrophosphate antigen recognition by gammadelta T cells*. J Immunol, 1998.
294. Miyagawa, F., et al., *Essential Requirement of Antigen Presentation by Monocyte Lineage Cells for the Activation of Primary Human T Cells by Aminobisphosphonate Antigen*. The Journal of Immunology, 2001. **166**(9): p. 5508-5514.
295. Davodeau, F., et al., *Close correlation between Daudi and mycobacterial antigen recognition by human gamma delta T cells and expression of V9JPC1 gamma/V2DJC delta-encoded T cell receptors*. J Immunol, 1993. **151**(3): p. 1214-23.
296. Yamashita, S., *Recognition mechanism of non-peptide antigens by human T cells*. International Immunology, 2003. **15**(11): p. 1301-1307.
297. Morita, C.T., et al., *Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells*. Immunity, 1995.
298. Lang, F., et al., *Early Activation of Human Vy9V62 T Cell Broad Cytotoxicity and TNF Production by Nonpeptidic Mycobacterial Ligands*. J Immunol, 1995.

299. Wei, H., et al., *Definition of APC presentation of phosphoantigen (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate to Vgamma2Vdelta 2 TCR*. J Immunol, 2008. **181**(7): p. 4798-806.
300. Wang, H., Z. Fang, and C.T. Morita, *Vgamma2Vdelta2 T Cell Receptor recognition of prenyl pyrophosphates is dependent on all CDRs*. J Immunol, 2010. **184**(11): p. 6209-22.
301. Sarikonda, G., et al., *Photoaffinity Antigens for Human T Cells*. The Journal of Immunology, 2008. **181**(11): p. 7738-7750.
302. Champagne, E., *gammadelta T cell receptor ligands and modes of antigen recognition*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2011. **59**(2): p. 117-37.
303. Vantourout, P., et al., *Specific requirements for Vgamma9Vdelta2 T cell stimulation by a natural adenylated phosphoantigen*. J Immunol, 2009. **183**(6): p. 3848-57.
304. Mookerjee-Basu, J., et al., *F1-adenosine triphosphatase displays properties characteristic of an antigen presentation molecule for Vgamma9Vdelta2 T cells*. J Immunol, 2010. **184**(12): p. 6920-8.
305. Campbell, D.G., et al., *Structural similarities between Thy-1 antigen from rat brain and immunoglobulin*. Nature, 1979. **282**(5736): p. 341-2.
306. Garapati, V.P. and M.P. Lefranc, *IMGT Colliers de Perles and IgSF domain standardization for T cell costimulatory activatory (CD28, ICOS) and inhibitory (CTLA4, PDCD1 and BTLA) receptors*. Dev Comp Immunol, 2007. **31**(10): p. 1050-72.
307. Bernard, D., et al., *Costimulatory receptors in jawed vertebrates: conserved CD28, odd CTLA4 and multiple BTLAs*. Dev Comp Immunol, 2007. **31**(3): p. 255-71.
308. Williams, A.F. and A.N. Barclay, *The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition*. Annu Rev Immunol, 1988. **6**: p. 381-405.
309. Hunkapiller, T. and L. Hood, *Diversity of the immunoglobulin gene superfamily*. Adv Immunol, 1989. **44**: p. 1-63.
310. Bertrand, G., et al., *Characterization of human FCGR3B\*02 (HNA-1b, NA2) cDNAs and IMGT standardized description of FCGR3B alleles*. Tissue Antigens, 2004. **64**(2): p. 119-31.
311. Arnett, H.A. and J.L. Viney, *Immune modulation by butyrophilins*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(8): p. 559-69.
312. Azuma, M., et al., *B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28*. Nature, 1993.
313. Koulova, L., et al., *The CD28 ligand B7/BB1 provides costimulatory signal for alloactivation of CD4+ T cells*. J Exp Med, 1991.
314. Linsley, P.S., et al., *CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7*. J Exp Med, 1991. **174**(3): p. 561-9.
315. Linsley, P.S., et al., *Extending the B7 (CD80) gene family*. Protein Sci, 1994. **3**(8): p. 1341-3.
316. Arnett, H.A., S.S. Escobar, and J.L. Viney, *Regulation of costimulation in the era of butyrophilins*. Cytokine, 2009. **46**(3): p. 370-5.
317. Jack, L.J.W. and I.H. Mather, *Cloning and analysis of cDNA encoding bovine butyrophilin, an apical glycoprotein expressed in mammary tissue and secreted in association with the milk-fat globule membrane during lactation*. J Biol Chem, 1990.
318. Henry, J., et al., *B30.2-like domain proteins : update and new insights into a rapidly expanding family of proteins*. Mol Biol Evol, 1998.
319. Taylor, M.R., et al., *Cloning and sequence analysis of human butyrophilin reveals a potential receptor function*. Biochem Biophys Acta, 1996.

320. Ogg, S.L., et al., *Expression of butyrophilin (Btn1a1) in lactating mammary gland is essential for the regulated secretion of milk-lipid droplets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(27): p. 10084-9.
321. Jeong, J., et al., *The PRY/SPRY/B30.2 domain of butyrophilin 1A1 (BTN1A1) binds to xanthine oxidoreductase: implications for the function of BTN1A1 in the mammary gland and other tissues*. J Biol Chem, 2009. **284**(33): p. 22444-56.
322. Murakata, Y., T. Fujimaki, and Y. Yamada, *Association of a butyrophilin, subfamily 2, member A1 gene polymorphism with hypertension*. Biomed Rep, 2014. **2**(6): p. 818-822.
323. Abeler-Dorner, L., et al., *Butyrophilins: an emerging family of immune regulators*. Trends Immunol, 2012. **33**(1): p. 34-41.
324. Messal, N., et al., *Differential role for CD277 as a co-regulator of the immune signal in T and NK cells*. Eur J Immunol, 2011. **41**(12): p. 3443-54.
325. Smith, I.A., et al., *BTN1A1, the mammary gland butyrophilin, and BTN2A2 are both inhibitors of T cell activation*. J Immunol, 2010. **184**(7): p. 3514-25.
326. Yamashiro, H., et al., *Stimulation of human butyrophilin 3 molecules results in negative regulation of cellular immunity*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(4): p. 757-67.
327. Cubillos-Ruiz, J.R., et al., *CD277 is a negative co-stimulatory molecule universally expressed by ovarian cancer microenvironmental cells*. Oncotarget, 2010.
328. Simone, R., et al., *Ligation of the BT3 molecules, members of the B7 family, enhance the proinflammatory responses of human monocytes and monocyte-derived dendritic cells*. Mol Immunol, 2010. **48**(1-3): p. 109-18.
329. Ammann, J.U., A. Cooke, and J. Trowsdale, *Butyrophilin Btn2a2 inhibits TCR activation and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway signaling and induces Foxp3 expression in T lymphocytes*. J Immunol, 2013. **190**(10): p. 5030-6.
330. Guggenmos, J., et al., *Antibody Cross-Reactivity between Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein and the Milk Protein Butyrophilin in Multiple Sclerosis*. The Journal of Immunology, 2003. **172**(1): p. 661-668.
331. Stefferl, A., et al., *Butyrophilin, a Milk Protein, Modulates the Encephalitogenic T Cell Response to Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*. The Journal of Immunology, 2000. **165**(5): p. 2859-2865.
332. Chapoval, A.I., et al., *BTNL8, a butyrophilin-like molecule that costimulates the primary immune response*. Mol Immunol, 2013. **56**(4): p. 819-28.
333. Bas, A., et al., *Butyrophilin-like 1 encodes an enterocyte protein that selectively regulates functional interactions with T lymphocytes*. PNAS, 2011.
334. Swanson, R.M., et al., *Butyrophilin-like 2 modulates B7 costimulation to induce Foxp3 expression and regulatory T cell development in mature T cells*. J Immunol, 2013. **190**(5): p. 2027-35.
335. Arnett, H.A., et al., *BTNL2, a Butyrophilin/B7-Like molecule, is a negative costimulatory molecule modulated in intestinal inflammation*. J Immunol, 2007.
336. Nguyen, T., et al., *BTNL2, a Butyrophilin-Like Molecule That Functions to Inhibit T Cell Activation*. The Journal of Immunology, 2006. **176**(12): p. 7354-7360.
337. Valentonyte, R., et al., *Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2*. Nat Genet, 2005. **37**(4): p. 357-64.
338. Afrache, H., et al., *The butyrophilin (BTN) gene family: from milk fat to the regulation of the immune response*. Immunogenetics, 2012. **64**(11): p. 781-94.
339. Compte, E., et al., *Characterization of BT3 molecules belonging to the B7 family expressed on immune cells*. Eur J Immunol, 2004. **34**(8): p. 2084-8.
340. Palakodeti, A., et al., *The molecular basis for modulation of human Vgamma9Vdelta2 T cell responses by CD277/butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies*. J Biol Chem, 2012. **287**(39): p. 32780-90.

341. Karunakaran, M.M., et al., *Vgamma9 and Vdelta2 T cell antigen receptor genes and butyrophilin 3 (BTN3) emerged with placental mammals and are concomitantly preserved in selected species like alpaca (Vicugna pacos)*. Immunogenetics, 2014. **66**(4): p. 243-54.
342. Rhodes, D.A., et al., *The cluster of BTN genes in the extended major histocompatibility complex*. Genomics, 2001. **71**(3): p. 351-62.
343. Gu, Y., et al., *Rapamycin together with TGF-beta1, IL-2 and IL-15 induces the generation of functional regulatory gammadeltaT cells from human peripheral blood mononuclear cells*. J Immunol Methods, 2014. **402**(1-2): p. 82-7.
344. Gu, S., W. Nawrocka, and E.J. Adams, *Sensing of Pyrophosphate Metabolites by Vgamma9Vdelta2 T Cells*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 688.
345. Malcherek, G., et al., *The B7 Homolog Butyrophilin BTN2A1 Is a Novel Ligand for DC-SIGN*. The Journal of Immunology, 2007. **179**(6): p. 3804-3811.
346. D'Cruz, A.A., et al., *Crystal structure of the TRIM25 B30.2 (PRYSPRY) domain : a key component of antiviral signalling*. Biochem J, 2013.
347. D'Cruz, A.A., et al., *Structure and function of the SPRY/B30.2 domain proteins involved in innate immunity*. Protein Sci, 2013. **22**(1): p. 1-10.
348. Rhodes, D.A. and J. Trowsdale, *TRIM21 is a trimeric protein that binds IgG Fc via the B30.2 domain*. Mol Immunol, 2007. **44**(9): p. 2406-14.
349. Stremlau, M., et al., *Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(14): p. 5514-9.
350. Grutter, C., et al., *Structure of the PRYSPRY-domain: implications for autoinflammatory diseases*. FEBS Lett, 2006. **580**(1): p. 99-106.
351. Song, B., et al., *The B30.2(SPRY) domain of the retroviral restriction factor TRIM5alpha exhibits lineage-specific length and sequence variation in primates*. J Virol, 2005. **79**(10): p. 6111-21.
352. Weinert, C., et al., *The crystal structure of human pyrin b30.2 domain: implications for mutations associated with familial Mediterranean fever*. J Mol Biol, 2009. **394**(2): p. 226-36.
353. Javanbakht, H., et al., *Characterization of TRIM5alpha trimerization and its contribution to human immunodeficiency virus capsid binding*. Virology, 2006. **353**(1): p. 234-46.
354. Kar, A.K., et al., *Characterization of a core fragment of the rhesus monkey TRIM5alpha protein*. BMC Biochem, 2011. **12**: p. 1.
355. Nepveu-Traversy, M.E., J. Berube, and L. Berthou, *TRIM5alpha and TRIMCyp form apparent hexamers and their multimeric state is not affected by exposure to restriction-sensitive viruses or by treatment with pharmacological inhibitors*. Retrovirology, 2009. **6**: p. 100.
356. Perfetto, L., et al., *Exploring the diversity of SPRY/B30.2-mediated interactions*. Trends Biochem Sci, 2013. **38**(1): p. 38-46.
357. James, L.C., et al., *Structural basis for PRYSPRY-mediated tripartite motif (TRIM) protein function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(15): p. 6200-5.
358. Woo, J.S., et al., *Structural basis for protein recognition by B30.2/SPRY domains*. Mol Cell, 2006. **24**(6): p. 967-76.
359. Woo, J.S., et al., *Structural and functional insights into the B30.2/SPRY domain*. Embo J, 2006.
360. Masters, S.L., et al., *The SPRY domain of SSB-2 adopts a novel fold that presents conserved Par-4-binding residues*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(1): p. 77-84.

361. Wang, H., et al., *Butyrophilin 3A1 plays an essential role in prenyl pyrophosphate stimulation of human Vgamma2Vdelta2 T cells*. J Immunol, 2013. **191**(3): p. 1029-42.
362. Decaup, E., et al., *Phosphoantigens and butyrophilin 3A1 induce similar intracellular activation signaling in human TCRVgamma9+ gammadelta T lymphocytes*. Immunol Lett, 2014. **161**(1): p. 133-7.
363. Riano, F., et al., *Vgamma9Vdelta2 TCR-activation by phosphorylated antigens requires butyrophilin 3 A1 (BTN3A1) and additional genes on human chromosome 6*. Eur J Immunol, 2014.
364. Wang, H. and C.T. Morita, *Sensor Function for Butyrophilin 3A1 in Prenyl Pyrophosphate Stimulation of Human Vgamma2Vdelta2 T Cells*. J Immunol, 2015. **195**(10): p. 4583-94.
365. Wang, H., et al., *Conservation of Nonpeptide Antigen Recognition by Rhesus Monkey V2V2 T Cells*. The Journal of Immunology, 2003. **170**(7): p. 3696-3706.
366. Wei, H., et al., *Definition of APC Presentation of Phosphoantigen (E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl Pyrophosphate to V2V2 TCR*. The Journal of Immunology, 2008. **181**(7): p. 4798-4806.
367. Schmidt, S. and A. Debant, *Function and regulation of the Rho guanine nucleotide exchange factor Trio*. Small GTPases, 2014. **5**: p. e29769.
368. DeGeer, J., et al., *Tyrosine phosphorylation of the Rho guanine nucleotide exchange factor Trio regulates netrin-1/DCC-mediated cortical axon outgrowth*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(4): p. 739-51.
369. Cannet, A., et al., *Identification of a mitotic Rac-GEF, Trio, that counteracts MgcRacGAP function during cytokinesis*. Mol Biol Cell, 2014. **25**(25): p. 4063-71.
370. Son, K., T.C. Smith, and E.J. Luna, *Supervillin binds the Rac/Rho-GEF Trio and increases Trio-mediated Rac1 activation*. Cytoskeleton (Hoboken), 2015. **72**(1): p. 47-64.
371. Liu, L., et al., *Nucling interacts with nuclear factor-kappaB, regulating its cellular distribution*. FEBS J, 2009. **276**(5): p. 1459-70.
372. Kim, S.M., et al., *Nucling, a novel protein associated with NF-kappaB, regulates endotoxin-induced apoptosis in vivo*. J Biochem, 2013. **153**(1): p. 93-101.
373. Dang, H.V., et al., *Nucling, a novel apoptosis-associated protein, controls mammary gland involution by regulating NF-kappaB and STAT3*. J Biol Chem, 2015. **290**(40): p. 24626-35.
374. Wiesner, S., et al., *Solution Structure and Ligand Recognition of the WW Domain Pair of the Yeast Splicing Factor Prp40*. Journal of Molecular Biology, 2002. **324**(4): p. 807-822.
375. Nikolaev, A.Y., et al., *Identification of a novel BRMS1-homologue protein p40 as a component of the mSin3A/p33(ING1b)/HDAC1 deacetylase complex*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **323**(4): p. 1216-22.
376. Addison, J.B., et al., *KAP1 promotes proliferation and metastatic progression of breast cancer cells*. Cancer Res, 2015. **75**(2): p. 344-55.
377. Plourde, K.V., et al., *Analysis of ZNF350/ZBRK1 promoter variants and breast cancer susceptibility in non-BRCA1/2 French Canadian breast cancer families*. J Hum Genet, 2013. **58**(2): p. 59-66.
378. Ecker, K., et al., *A RAS recruitment screen identifies ZKSCAN4 as a glucocorticoid receptor-interacting protein*. J Mol Endocrinol, 2009. **42**(2): p. 105-17.
379. Rhodes, D.A., et al., *Activation of human gammadelta T cells by cytosolic interactions of BTN3A1 with soluble phosphoantigens and the cytoskeletal adaptor periplakin*. J Immunol, 2015. **194**(5): p. 2390-8.

380. Wolfenson, H., et al., *Actomyosin-generated tension controls the molecular kinetics of focal adhesions*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 9): p. 1425-32.

# Thèse de Doctorat

Cassie-Marie PEIGNÉ

## Modalités fines d'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 humains : mécanismes de détection du stress cellulaire et implication de la butyrophiline BTN3A/CD277

Antigenic activation modalities of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells : BTN3A/CD277 butyrophilin implication in cellular stress detection mechanisms

### Résumé

Chez la plupart des primates adultes, les lymphocytes T (LT)  $\gamma\delta$ 2, représentant la majorité des LT $\gamma\delta$  périphériques, jouent un rôle important dans la protection de l'organisme (ex. agents infectieux, tumeurs). Des molécules activant spécifiquement les LT $\gamma\delta$ 2 ont été caractérisées et sont majoritairement des composés non-peptidiques phosphorylés appelés phosphoantigènes (PAG). Les PAG naturels correspondent à des métabolites de voies de synthèse des isoprénoides proches aux cellules procaryotes et eucaryotes. Les modalités d'activation des LT $\gamma\delta$ 2 induite par les PAG demeurent mal connues. Des données obtenues dans l'équipe ont révélé le rôle clé joué par la glycoprotéine BTN3A (butyrophiline, CD277), et en particulier de l'isoforme BTN3A1, dans l'activation antigénique des LT $\gamma\delta$ 2 induite par les PAG. Mes travaux ont visé à étudier les mécanismes impliquant BTN3A lors de l'activation des LT $\gamma\delta$ 2. J'ai ainsi pu montrer que le domaine intracellulaire B30.2 de BTN3A1 peut interagir avec les PAG, notamment grâce à l'histidine 351, constituant majeur et exclusif d'une poche chargée de ce domaine. En parallèle, j'ai mis en évidence l'implication d'autres protéines pouvant interagir avec ce domaine intracellulaire, par utilisation de la technique du double-hybride. Ces travaux ont révélé l'existence de six protéines candidates partenaires de BTN3A. Enfin, mes résultats ont permis de proposer une cartographie fonctionnelle de l'intégralité des isoformes de BTN3A. L'ensemble de mes travaux a permis d'apporter un éclairage nouveau sur les modalités fines d'activation antigénique des LT $\gamma\delta$ 2 induite par les PAG et de préciser le rôle clé joué par les molécules BTN3A dans ce processus.

### Mots clés

Homme, immunité, lymphocyte T  $\gamma\delta$ , activation, antigène, phosphoantigène, butyrophiline, CD277

### Abstract

V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells are the major sub-population of  $\gamma\delta$  T cells in human blood. They play a leading part in protection of the organism against infectious agents and tumor cells. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells are specifically and strongly activated by small organic pyrophosphate molecules termed phosphoantigens (PAG) in a TCR dependant way. PAG are metabolites from the isoprenoid pathway shared by both procaryotes and eucaryotes. The activation modalities of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells by PAG remain to be defined in detail. Results from our team revealed an important role played by the BTN3 (CD277) molecule during V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell antigenic activation. BTN3, and especially the BTN3A1 isoform, is involved in activating V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells.

The work described in this thesis, aimed at investigating the underlying mechanisms allowing BTN3 molecule to activate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. We showed that the B30.2 intracellular domain of BTN3A1 was able to fix PAG with a histidine residue in position 351 playing a vital role. Furthermore, we identified other proteins that could interact with this intracellular domain. We used the yeast double-hybrid technique, and identified six putative partner proteins. Finally, we carried out a function mapping of the intracellular part of the various BTN3 isoforms. These results brought new insights into the antigenic activation modalities of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells by PAG and clarify the key role played by the BTN3 molecule in this process.

### Key Words

Human, immunity,  $\gamma\delta$  T cell, activation, antigen, phosphoantigen, butyrophilin, CD277