

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

Année 2011

Modalités d'activation et fonctions des lymphocytes T $\gamma\delta$ humains

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Christelle HARLY

Le 16 décembre 2011, devant le jury ci-dessous

Président : Marc Bonneville, Nantes

Rapporteurs : Jean-Jacques Fournié, Toulouse
Benôit Favier, Paris

Examineurs : Daniel Olive, Marseille
Marc Bonneville, Nantes

Directeurs de thèse

*Emmanuel Scotet, Nantes
Julie Dechanet-Merville, Bordeaux*

Sommaire

Sommaire.....	5
Table des illustrations.....	7
Liste des abréviations.....	9

INTRODUCTION.....11

ChapI Les lymphocytes T $\gamma\delta$13

Introduction	13
I. Place des LT $\gamma\delta$ au sein de l'immunité transitionnelle.....	14
1) L'immunité innée et adaptative	14
2) L'immunité transitionnelle.....	15
II. Evolution, diversité et développement des LT $\gamma\delta$	16
1) Conservation/diversité inter-espèce des LT $\gamma\delta$	16
2) Conservation/diversité intra-espèce des LT $\gamma\delta$	18
3) Développement et sélection des LT $\gamma\delta$	20
III. Modalité d'activation des LT $\gamma\delta$ et Ag de TCR $\gamma\delta$	26
1) Quelques ligands de TCR $\gamma\delta$	26
2) Interaction TCR/ligand.....	28
3) Modulation de l'activation TCR et activations TCR-indépendantes	34
IV. Rôle des LT $\gamma\delta$ au sein du système immunitaire	36
1) Localisation stratégique des LT $\gamma\delta$	36
2) Cinétique d'activation	36
3) Fonctions effectrices des LT $\gamma\delta$	37
4) Rôle des LT $\gamma\delta$ in vivo	39

ChapII Modalités d'activation des LT V δ 2 humains.....45

I. Généralités sur les LTV δ 2+ et le TCRV γ 9V δ 2	45
II. Fonction des LT γ 9 δ 2 et lien avec les PAg	47
1) Multitude de contextes activateurs de LT γ 9 δ 2.....	47
2) Unification des contextes d'activation des γ 9 δ 2 : le modèle des PAg.....	47
3) Les PAg, discrimination Soi vs Non Soi et Soi Altéré	53
III. Modalités d'activation des LT γ 9 δ 2 par les PAg.....	59
1) Rôle du TCR γ 9 δ 2 dans la réactivité aux PAg	59
2) Bases moléculaires de l'interaction directe entre TCR γ 9 δ 2 et PAg.....	62
3) Présentation des PAg aux LT γ 9 δ 2 ?.....	65
4) Modèle hypothétique de présentation des PAg aux LT γ 9 δ 2	70

ChapIII Les protéines de la IgSF au sein du système immunitaire adaptatif et les fonctions potentielles des membres de la famille BTN.....75

I. Les familles Ig, CMH, B7 et BTN de la IgSF	75
1) La superfamille des Immunoglobulines	75
2) Les molécules présentatrices de la superfamille du CMH.....	78
3) Les Familles B7 et BTN de molécules de costimulation T	83
II. La famille BTN3 chez l'homme.....	87
1) Généralités sur les BTN3	87
2) Rôles potentiels des domaines extracellulaires des BTN3	89
3) Rôles potentiels du domaine intracellulaire des BTN3	92
4) Fonction des BTN3 chez l'homme.....	97
III. Les fonctions des protéines Skint chez la souris.....	99
1) Généralité sur la famille Skint	99
2) Rôle de Skint-1 au cours du développement des DETC.....	100
3) Rôles hypothétiques des protéines Skint et de leurs homologues	101

RESULTATS.....103

ChapI Modalités d'activation et fonctions de sous-populations de LT γ δ humains V δ 2-105

I.	Introduction	105
II.	Modulation de l'activation de populations V δ 2- humaines par engagement des molécules de CMH de classe I.	107
	1) Article 1 : Up-regulation of cytolytic functions of human V δ 2- γ δ T lymphocytes through engagement of ITL2 expressed by tumor target cells.	107
	2) Résultats complémentaires et discussion : implication des molécules de CMH de classe I, costimulation ou coinhibition ?	118
III.	EphA2 et stimulation de sous-populations V δ 1 chez l'homme	120
	1) Introduction	120
	2) Matériels et méthodes	122
	3) Résultats	123
	4) Discussion	133

ChapII Rôle de la famille BTN3 dans l'activation des LT γ 9 δ 2 par les PAg138

I.	Rôle clé de BTN3 dans l'activation des LT γ 9 δ 2 humains par les PAg	138
	1) Article 2 : Key implication of CD277/Butyrophilin-3 (BTN3A) in phosphoisoprenoid sensing by a major human γ δ T cell subset.	138
	2) Résultats complémentaires et discussion : lien entre structure et fonction des isoformes BTN3.	185
II.	Mode d'action des anti-BTN3 sur la modulation de l'activation des LT γ 9 δ 2 humains.	191
	1) Article 3 : The molecular basis for modulation of human V γ 9V δ 2 T cell responses by CD277/Butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies.	191
	2) Résultats complémentaires: lien entre propriétés intrinsèques et effets biologiques des anti-BTN3	241
	3) Discussion : mode d'action agoniste/antagoniste des anti-BTN3	248
III.	Définition d'un complexe protéique membranaire impliquant BTN3, le CMH-I, et l'ATPs	253
	1) Introduction	253
	2) Matériels et méthodes	254
	4) Interaction entre BT3 et CMH-I par l'intermédiaire de l'ATP synthase ectopique?	260
	5) Interaction directe entre BTN3 et CMH de classe I ?	262
IV.	Discussion : Modèle (s) d'activation des LT γ 9 δ 2 par les anti-BTN3 et les PAg	270
	1) Lien entre les interactions dynamiques modulant la composition du complexe BTN3/CMH-I/ATPase et l'activation des LT γ 9 δ 2.	270
	2) Rôle de BTN3, CMHI, et ATPase dans l'activation des LT γ 9 δ 2 par les PAg et les anti-BTN3.	273
	3) Pertinence physiologique par rapport au cancer et utilisation thérapeutique des anti-btn3	276

BIBLIOGRAPHIE.....279

ANNEXES.....297

I.	Article 4 : IL-21-Mediated Potentiation of Antitumor Cytolytic and Proinflammatory Responses of Human V γ 9V δ 2 T Cells for Adoptive Immunotherapy.	299
II.	Brevet : Anti-CD277 antibodies and uses thereof	309

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Arbres phylogénétiques des gènes codant pour les régions variables des TCR $\gamma\delta$.	17
Figure 2 : Organisation des loci et diversité des gènes TCR γ et δ .	18
Figure 3 : Composition et diversité des chaînes TCR γ et δ après réarrangement somatique.	19
Figure 4 : Développement programmé des LT $\gamma\delta$ chez la souris.	21
Figure 5 : Développement programmé des LT $\gamma\delta$ chez l'homme.	22
Figure 6 : Diversité des modes de reconnaissance antigénique des TCR $\gamma\delta$.	29
Figure 7 : Comparaison de l'origine des déterminants antigéniques des régions CDR3 de chaînes TCR δ et TCR β .	33
Figure 8 : Modes d'activation des LT $\gamma\delta$ impliquant ou non le TCR.	34
Figure 9 : Implication centrale des LT $\gamma\delta$ au cours de la réponse immunitaire.	40
Figure 10 : Voies de production et de dégradation des molécules agonistes $\gamma\delta 2$ chez les organismes procaryotes et eucaryotes.	49
Figure 11 : Structure et activité des divers agonistes activant les LT $\gamma\delta 2$.	51
Figure 12 : Synergie entre les voies MVA et MEP/DOXP pour la production de PAg lors d'une infection bactérienne intracellulaire.	55
Figure 13 : Surface de reconnaissance antigénique du TCR $\gamma\delta 2$ #G115.	63
Figure 14 : Implication de tous les CDRs du TCR $\gamma\delta 2$ dans l'activation induite par les PAg.	68
Figure 15 : Visualisation de la morphologie de la molécule présentatrice de PAg putative.	70
Figure 16 : Modèle hypothétique de l'activation des LT $\gamma\delta 2$ par des PAg.	72
Figure 17 : Définition structurale du domaines IgV des TCRs et BCRs.	76
Figure 18 : Interaction entre un TCR et son complexe peptide-CMH complémentaire.	77
Figure 19 : Structure 3D schématique des molécules de CMH de classe I et II classiques.	80
Figure 20 : Relations phylogénétiques des gènes du CMH de classe I et potentiel de présentation.	80
Figure 21 : Architecture de quelques molécules du CMH.	81
Figure 22 : Localisation des gènes la famille BTN dans le locus du CMH-I chez l'homme.	84
Figure 23 : Organisation des domaines conservés entre les membres des familles B7, BTN, BTNL humaines.	85
Figure 24 : Structure comparative des trois membres de la famille BTN3.	88
Figure 25 : Modèle de stabilisation d'interaction cellule-cellule par formation d'un treillage impliquant des interactions multiples entre domaines IgSF.	91
Figure 26 : Liens phylogénétiques entre les domaines SPRY et B30.2.	92
Figure 27 : Structure générale des domaines B30.2.	93
Figure 28 : Structure tridimensionnelle d'un dimère de domaines B30.2.	95
Figure 29 : Structure générale de Skint-1.	100
Figure 30 : Modèles d'implication des molécules de CMH-I dans l'activation TCR-dépendante des LT $\gamma\delta 3$.	118
Figure 31 : La reconnaissance de lignées tumorales ou infectées CMV par le clone MAU est spécifique et dépendante du TCR $\gamma\delta 1$.	123
Figure 32 : L'Acm #6G8 reconnaît une molécule participant de manière cruciale et spécifique à l'activation de la lignée Jrt3 $\gamma\delta 1$ MAU.	125
Figure 33 : L'Acm #6G8 reconnaît spécifiquement la protéine EphA2 humaine.	127
Figure 34 : EphA2 est un activateur spécifique de la lignée Jrt3 MAU.	128
Figure 35 : Implication du TCR $\gamma\delta 1$ dans la reconnaissance d'EphA2 par la lignée Jrt3 MAU.	130
Figure 36 : Implication des efna dans la reconnaissance d'EphA2 par les Jrt3 MAU.	132
Figure 37 : Structure et fonction des différentes constructions BTN3.	185
Figure 38 : Modèle hypothétique de perception des PAg par les LT $\gamma\delta 2$.	189
Figure 39 : Effet court-circuit des anti-BTN3 sur l'activation PAg-induite des LT $\gamma\delta 2$.	243
Figure 40 : Effets agonistes/synergiques des ScFv #103.2 et #20.1.	245
Figure 41 : Induction de l'engagement TCR des LT $\gamma\delta 2$ par le ScFv #103.2.	246
Figure 42 : Effet compétitif/inhibiteur de l'anti-BTN3 #103.2 sur l'activation des LT $\gamma\delta 2$.	247
Figure 43 : Mode d'action hypothétique des anti-BTN3 #20.1 et #103.2 basé sur une ségrégation différentielle des ligands de TCR $\gamma\delta 2$ et des molécules accessoires à la surface des cellules cibles.	249
Figure 44 : Analyse de distribution et de mobilité membranaire de BTN3A1 sous l'effet des anti-BTN3.	251
Figure 45 : Expression d'un éventuel ligand du domaine extracellulaire de BTN3A1 à la surface de certaines lignées cellulaires.	255

Figure 46 : Corrélation négative entre le marquage membranaire par BTN3-Fc et l'expression des molécules de CMH de classe I sur certaines lignées cellulaires.	257
Figure 47 : Compétition de marquage membranaire entre un anti-ATPase et le domaine extracellulaire de BTN3A1.	258
Figure 48 : Caractérisation de l'Acm #23F8-6 comme étant un anti-CMH de classe I.	261
Figure 49 : Lien entre les marquages par Acm anti-BTN3 #20.1 et #103.2 à la surface des cellules.	265
Figure 50 : Effet de l'expression membranaire du CMH-I et de la b2m sur le phénomène de masquage/démasquage de l'épitope #20.1 à la surface des cellules.	267
Figure 51 : Association étroite entre BTN3 et CMH-I à la surface des cellules.	268
Figure 52 : Modèle hypothétique reliant l'état de multimérisation des BTN3 au sein d'un complexe membranaire impliquant divers acteurs moléculaires à l'activation des LT γ 9 δ 2.	271
Figure 53 : Modèle hypothétique de la perception par les LT γ 9 δ 2, de PAg exprimés par des cellules humaines.	275

Tables

Table 1 : Caractéristiques des effecteurs de l'immunité transitionnelle.	15
Table 2 : Répertoire, diversité et localisation des LT γ δ chez l'homme et la souris (adulte).	20
Table 3 : Quelques ligands de TCR γ δ humains et murins, suspectés ou avérés.	27
Table 4 : Comparaison des paramètres d'interaction TCR γ δ /ligands et TCR α β /ligands.	31
Table 5 : Résultats des principaux essais cliniques de phase I/II visant les LT γ 9 δ 2.	58
Table 6 : Clusters et supercluster de gènes du locus du CMH au sens large chez l'homme.	78
Table 7 : Gènes du locus du CMH (au sens large) humain reliés au système immunitaire.	79
Table 8 : Spécificité de ligands et de récepteurs des principaux groupes de molécules de CMH de classe I.	82
Table 9 : Interactants directs/indirects connus des domaine B30.2 de quelques protéines.	97
Table 10 : Propriétés agonistes/antagonistes de l'anti-BTN3 #20.1 sur l'activation des LT γ 9 δ 2 dans différents systèmes cellulaires.	242
Table 11 : Propriétés intrinsèques des anti-BTN3 conditionnant leur effet agoniste/antagoniste.	250
Table 12 : Comparaison de l'expression des molécules de CMH-I, du marquage de l'ATPase ectopique, et du binding de BTN3A1-Fc sur diverses lignées.	258
Table 13 : Liste des anti-BTN3, localisation de leurs épitopes et propriété sur l'activation des LT γ 9 δ 2 humains.	262

Liste des abréviations

ABP	Aminobisphosphonate
Ac (m)	Anticorps (monoclonal)
Ag	Antigène
F1-ATPase	sous-unité F1 de l'ATP synthase
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BCR	<i>B Cell Receptor</i>
BTN	Butyrophilines
BrHPP	Bromohydrine Pyrophosphate
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDR	<i>Complementarity Determining Region</i>
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'antigène
CMV	CytoMegaloVirus
DAMP	<i>Danger Associated Molecular Pattern</i>
DC	<i>Dendritic Cell</i>
DETC	<i>Dendritic Epidermal T Cell</i>
DOXP	1-deoxy-D-xylulose-5 phosphate
EBV	Epstein Barr Virus
efna	éphrine A
HDMAPP	(E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
IFN	Interféron
Ig (SF)	<i>Immunoglobulin (SuperFamily)</i>
IL	InterLeukine
IPP	Isopentenyl PyroPhosphate
LB	Lymphocyte B
LT	Lymphocyte T
MVA	Mévalonate
MEP	2-C-methyl-D-erythritol-4 phosphate
MhcSF	<i>Major histocompatibility complex SuperFamily</i>
NK (R)	<i>Natural Killer (Receptor)</i>
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PBL	<i>Peripheral Blood Lymphocyte</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PAg	Phospho-antigène
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
Skint	<i>Selection and upkeep of intraepithelial T cells</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

Introduction

ChapI Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Introduction

Les années 60 sont considérées comme marquant les débuts de l'immunologie moderne, grâce à des progrès incontestables de la recherche au niveau technique. Par exemple, la découverte des propriétés de la PHA permettra la culture in vitro des LT (Nowell, 1960), facilitant considérablement l'étude de ces cellules. Dans les années 80, suite aux premiers balbutiements de la cytométrie de flux (1^{er} appareil breveté en 1971), et au développement de nouvelles méthodes permettant la production d'Ac monoclonaux (Acm) (Schwaber and Cohen, 1973), la recherche en immunologie moderne connaît une véritable explosion. Grâce à ces nouvelles techniques, les chercheurs commencent à diviser et subdiviser les « globules blancs » en sous-populations cellulaires toujours plus homogènes.

Au milieu des années 80, le clonage des gènes TCR (*T Cell Receptor*) α et TCR β est suivi de près par celui d'un gène de TCR γ (Saito et al., 1984) apportant les premières preuves de l'existence d'une lignée T différente de la lignée T $\alpha\beta$. En parallèle, une autre équipe isole des lymphocytes qui, parmi d'autres caractéristiques étranges, expriment un TCR « alternatif » à la place du TCR $\alpha\beta$ « conventionnel » (Bank et al., 1986). Mais l'excitation accompagnant cette découverte retombe rapidement lorsque le rôle des cellules $\gamma\delta$ apparaît comme étant plus ou moins redondant à celui des $\alpha\beta$.

Par la suite, les Lymphocytes T (LT) $\gamma\delta$ se sont révélés être une population profondément hétérogène, possédant des caractéristiques tout à fait distinctes de celles des LT $\alpha\beta$. La recherche sur les LT $\gamma\delta$ a rencontré un regain d'intérêt extrêmement prolifique ces dernières années, générant une pléthore de nouveaux concepts et de controverses... Actuellement, rares sont les aspects de la biologie des LT $\gamma\delta$ qui ne sont pas sujets à débats. Aussi, ce chapitre ne prétend pas regrouper l'ensemble des données accumulées jusqu'à présent sur ces cellules, mais seulement apporter quelques connaissances et rappels aidant à la compréhension globale des éléments présentés dans ma thèse.

I. Place des $LT\gamma\delta$ au sein de l'immunité transitionnelle

Le système immunitaire est généralement séparé en un système immunitaire inné et un système immunitaire adaptatif, caractérisés par des effecteurs cellulaires, des modes d'activations et des fonctions distincts.

1) *L'immunité innée et adaptative*

L'immunité innée (ou naturelle) est caractérisée par une réponse rapide, à large spectre, immédiatement déclenchée lorsque l'intégrité de l'organisme est menacée. Elle constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes, et est de ce fait, souvent associée aux tissus exposés au milieu extérieur. Les défenses de l'immunité innée reposent sur différents éléments incluant des barrières anatomiques et physiologiques (peau, muqueuses, pH, température), des molécules chimiques, et des effecteurs cellulaires tels que les macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les mastocytes, les cellules NK (*Natural Killer*) et les cellules dendritiques (DC).

Suite à une perte d'intégrité de l'organisme, l'immunité innée, initiatrice de la réponse immunitaire, induit très rapidement une inflammation au niveau du site de l'agression. Celle-ci se caractérise par une vasodilatation des capillaires environnants, une augmentation de la perméabilité vasculaire et un recrutement local de cellules immunitaires. Les cellules de l'immunité innée migrent rapidement vers les sites inflammatoires (en quelques heures), et sont capables de contrôler la plupart des agressions extérieures.

L'immunité adaptative, quant à elle, fait intervenir des mécanismes immunologiques spécifiques qui se mettent en place en quelques jours en cas d'échec de la réponse immunitaire innée. Elle consiste en l'amplification et la différenciation de clones de LB et LT capables de cibler spécifiquement un antigène (Ag) donné du pathogène, et d'y associer à une réponse adaptée au type d'agent pathogène à éliminer. L'immunité adaptative dispose d'une mémoire immunitaire, c'est-à-dire qu'une réponse adaptative va aboutir, en plus de l'éradication de l'agent pathogène, à la génération de cellules spécifiques d'Ag de ce pathogène, qui persisteront à long terme, et permettront une réponse plus rapide et efficace en cas de nouvelle rencontre avec cet Ag.

2) L'immunité transitionnelle

Alors que les effecteurs de l'immunité innée et de l'immunité adaptative possèdent des caractéristiques distinctes et des fonctions non redondantes, il existe un 3^e type d'effecteurs qui partagent à la fois des caractéristiques innées et adaptatives, et sont responsables de réponses immunitaires qualifiées de transitionnelles (**table 1**).

Ces lymphocytes particuliers (ex : iNKT, MAIT, LT $\gamma\delta$), qualifiés de non-conventionnels, innate-like, ou transitionnels, jouent un rôle central dans la réponse immunitaire, notamment dans le cas de défauts dans le déclenchement de la réponse innée et/ou adaptative (ex : infection à mycobactéries, transformation tumorale,...). Ces lymphocytes font partie de l'immunité adaptative par l'origine de leur récepteur à l'Ag mais ils sont caractérisés par des modalités d'activation généralement attribuées aux cellules de l'immunité innée (localisation, cinétique, Ag reconnus,...) (**table 1**).

Les cellules de l'immunité transitionnelle partagent des caractéristiques communes qui seront détaillées dans ce chapitre à travers l'exemple des LT $\gamma\delta$.

	Effecteurs de l'immunité innée	Effecteurs de l'immunité transitionnelle	Effecteurs de l'immunité adaptative
Histoire évolutive	Ancienne (plusieurs billions d'années)	Moderne (400 millions d'années)	Moderne (400 millions d'années)
Ag reconnus	PAMPs et DAMPs conservés	PAMPs/DAMPs ? à identifier.	Ag extrêmement divers
Récepteurs aux Ag	PRR, non réarrangés, conservés	TCR/BCR, réarrangés mais conservés/invariants	TCR/BCR, réarrangés et extrêmement variables
Restriction (molécules présentatrices d'Ag)	Non restreint	CMH non classique (NKT, MAIT) ou non restreint	CMH classique (LT) Non restreints (LB)
Temps de réponse	immédiat	immédiat	retardé
Phénotype majoritaire	inné	préactivé/mémoire	naïf
Localisation majoritaire	Tissus muqueuses	Tissus muqueuses	périphérie

Table 1 : Caractéristiques des effecteurs de l'immunité transitionnelle

PAMP, *Pathogen Associated Molecular Pattern* ; DAMP, *Danger Associated Molecular Pattern* ; PRR, *Pattern Recognition Receptor* ; TCR, *T Cell Receptor* ; BCR, *B Cell Receptor* ; CMH, Complexe Majeur d'Histocompatibilité ; LT, Lymphocyte T ; LB, Lymphocyte B.

II. Evolution, diversité et développement des LT $\gamma\delta$

Dans ce chapitre consacré aux LT $\gamma\delta$, de la nomenclature utilisée pour définir les gènes de TCR $\gamma\delta$ sera celle de Heilig et Tonegawa (Heilig and Tonegawa, 1986) pour la souris, et de Lefranc et Rabbitts (Lefranc and Rabbitts, 1990) pour l'homme.

1) Conservation/diversité inter-espèce des LT $\gamma\delta$

a- Définition des LT $\gamma\delta$ par leur TCR

Tous les LT sont caractérisés par un récepteur de cellules T hétérodimérique appelé TCR. À la différence de celui des LT $\alpha\beta$ constitué de chaînes TCR α et TCR β , le TCR des LT $\gamma\delta$ est constitué de chaînes TCR γ et TCR δ . Ces chaînes subissent des mécanismes de recombinaison somatique V(D)J similaires à ceux des chaînes TCR α et TCR β , et sont divisés en sous-populations généralement caractérisées par les régions variables (segments géniques V γ et V δ) utilisées lors de la recombinaison somatique de leurs chaînes TCRs.

b- Conservation des gènes TCR γ et δ entre les primates

L'étude comparative des gènes codant pour le TCR $\gamma\delta$ avait révélé d'importantes similarités et différences entre l'homme et le chimpanzé (Sturm et al., 1992). Plus récemment, l'équipe d'E. Adams a réalisé une étude comparative exhaustive du répertoire de segments géniques V, D, J des locus γ et δ de 5 espèces de primates humains et non-humains (*Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Pongo pygmaeus*, *Macaca mulatta* et *Callithrix jacchus*), représentant 5 points de divergence au travers du règne des primates, au cours d'une évolution de près de 45 millions d'années. Cette étude, dont le but était de comprendre l'origine des pressions évolutives ayant modelé le répertoire $\gamma\delta$ et de mieux appréhender la nature des ligands reconnus par les LT $\gamma\delta$, a montré que des mécanismes évolutifs distincts semblent avoir agi sur les loci γ et δ primates (**figure 1**). En effet, les segments géniques du locus δ ont été globalement conservés, tandis que

les segments du locus γ ont subi une extrême diversification au cours de l'évolution de la lignée primate. Seuls les gènes $V\gamma 9, 10, 11$ ont été relativement bien conservés. Par ailleurs, des analyses génétiques poussées montrent que certains segments géniques portent la signature d'une forte sélection dans les régions codant pour les boucles CDR (*Complementarity Determining Region*)1 et 2, probablement dues à une co-évolution avec un ligand de TCR (Kazen and Adams, 2011).

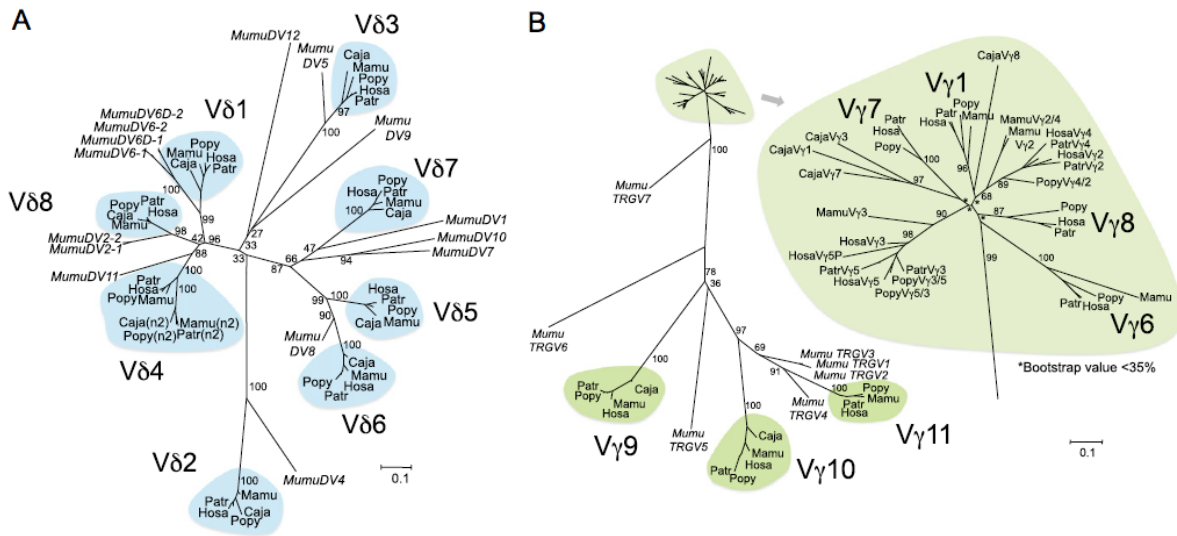


Figure 1 : Arbres phylogénétiques des gènes codant pour les régions variables des TCR $\gamma\delta$.

Liens phylogénétiques existant entre les segments $V\delta$ (A) et $V\gamma$ (B) des primates *Homo sapiens* (Hosa), *Pan troglodytes* (Patr), *Pongo pygmaeus* (Popy), *Macaca mulatta* (Mamu) et *callithrix jacchus* (Cala), et quelques uns de leurs homologues murins (Mumu). Les intervalles de confiance sont indiqués pour la plupart des branches. Les groupes de gènes les plus fiables apparaissent en couleur. Une échelle de distance est indiquée pour chaque arbre. (Kazen and Adams, 2011)

c- Peu/pas de conservation entre primates et rongeurs

Certains gènes $V\delta$ murins apparaissent comme homologues à des gènes de primates (Clark et al., 1995; Kazen and Adams, 2011). Par exemple, les quatre gènes DV6 murins sont homologues au gène $V\delta 1$ primate, le gène DV4 au $V\delta 2$, et le DV5 au $V\delta 3$ (**figure 1**). A l'inverse, les gènes $V\gamma$ murins sont très peu conservés avec les primates, et seul les gènes TRGV1, 2, 3, et 4, sont clairement homologues au gène $V\gamma 11$ primate (Huck et al., 1988; Kazen and Adams, 2011). Ainsi, les LT $\gamma\delta$ humains n'ont pas d'orthologues chez la souris, en accord avec l'absence de corrélations fonctionnelles évidentes entre les LT $\gamma\delta$ de ces deux espèces.

2) Conservation/diversité intra-espèce des LT $\gamma\delta$

a- Répertoire des LT $\gamma\delta$ et diversité combinatoire restreinte

Chez l'homme, le locus δ est inclu dans le locus α , sur le chromosome 13 (**figure 2A**). Il n'existe que trois vrais gènes V δ (V δ 1, V δ 2, V δ 3), mais dans quelques rares cas, certains segments V α peuvent être utilisés dans le réarrangement des chaînes δ , donnant lieu à des dénominations V δ particulières : V δ 4 (V α 14), V δ 5 (V α 29), V δ 6 (V α 23), V δ 7 (V α 36), et V δ 8 (V α 38) (Kazen and Adams, 2011). Le répertoire V γ , situé dans le locus γ sur le chromosome 7, comporte douze gènes V γ , parmi lesquels seuls sept sont décrits comme fonctionnels (V γ 1, V γ 5P, V γ 6, V γ 7 et V γ 10 sont des pseudogènes). Cette faible diversité est également reflétée par le nombre de segments J, à la fois pour le locus γ et le δ (5 et 4 respectivement).

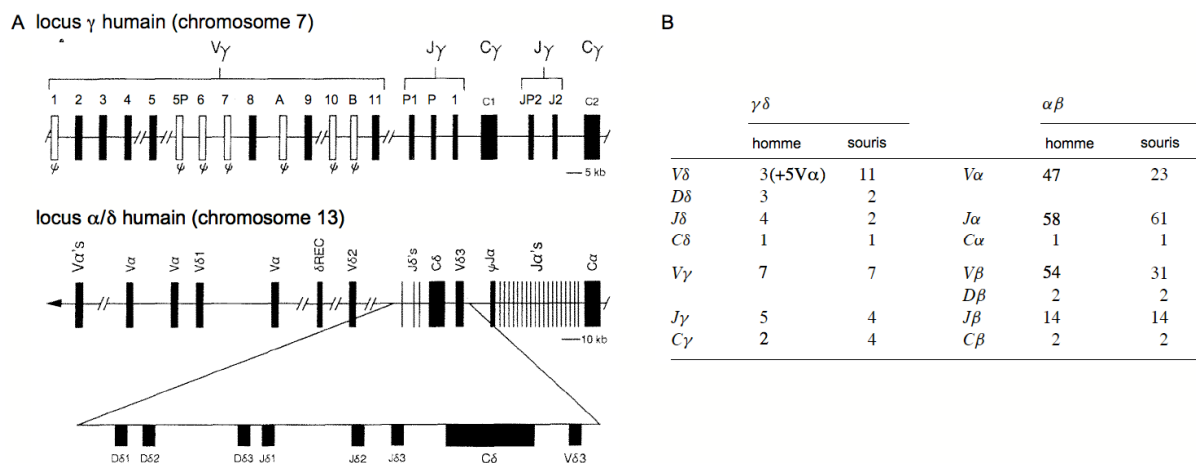


Figure 2 : Organisation des loci et diversité des gènes TCR γ et δ .

(A) Organisation génomique des loci TCR γ et TCR δ , respectivement situés sur les chromosomes 7 et 13 chez l'homme. Les pseudogènes sont représentés en blanc (psi). Le locus δ est inclut dans le locus α . (Hochstenbach and Brenner, 1990). (B) Nombre de gènes disponibles pour le réarrangement somatique V(D)J des TCR $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$, chez l'homme et la souris. Chez l'homme, cinq segments V α peuvent être incorporés à la place de segments V δ (+5V α) durant le réarrangement des gènes δ , augmentant d'autant leur diversité. Adapté de (Allison et al., 2001)

Ainsi, chez l'homme comme chez la souris, les LT $\gamma\delta$ ont un répertoire relativement restreint de segments géniques V D et J utilisés pour le réarrangement TCR $\gamma\delta$, comparé à la diversité significative des loci α et β (Lefranc et al., 1999) (**figure 2B**), et a conduit à l'hypothèse que cette diversité restreinte reflétait la conservation des protéines du Soi reconnues par les TCR $\gamma\delta$ (Janeway and Medzhitov, 1998).

b- Diversité jonctionnelle théorique fabuleuse des TCR $\gamma\delta$

En contraste avec le petit nombre de segments géniques V γ et V δ utilisés, le réarrangement V(D)J des gènes TCR $\gamma\delta$ est caractérisé par l'insertion de segments D multiples (Elliott et al., 1988). Par ailleurs, ces segments peuvent être incorporés dans un sens ou dans l'autre, et chez l'homme, la plupart des cadres de lecture ne contiennent pas de codons stop. La spécificité antigénique des récepteurs de l'immunité adaptative est majoritairement portée par trois boucles d'acides aminées appelées CDRs, formant une surface de contact entre le TCR et son ligand (**figure 3**). L'ensemble des paramètres intervenant lors de la recombinaison V(D)J font de la chaîne CDR3 δ la boucle d'acides aminées la plus longue et la plus diverse de tous les récepteurs de l'immunité adaptative (Rock et al., 1994). La disparité entre la faible variabilité des domaines V codant les boucles CDR1 et 2 et l'incroyable diversité potentielle de la boucle CDR3 δ crée un véritable dilemme pour la prévision des Ag reconnus par ces TCRs. Dans le cas où la reconnaissance est centrée sur le CDR3 δ , certains TCR $\gamma\delta$ pourraient s'avérer capables de reconnaître des Ag hypervariables de la même manière que les TCR $\alpha\beta$ ou les BCRs. Dans le cas contraire, les TCR $\gamma\delta$ reconnaîtraient des ligands très conservés au cours de l'évolution et faiblement polymorphes, à l'instar des récepteurs de l'immunité innée. Pour revue, voir (Chien and Konigshofer, 2007).

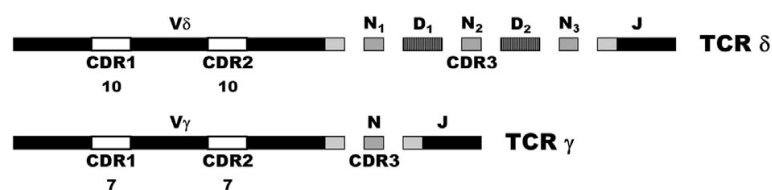


Figure 3: Composition et diversité des chaînes TCR γ et δ après réarrangement somatique.

Les segments géniques constituant les gènes TCR γ et TCR δ recombinés sont indiqués, ainsi que la position des CDRs susceptibles de déterminer la spécificité antigénique des TCR $\gamma\delta$. La diversité combinatoire V(D)J et jonctionnelle (N) des chaînes TCR γ et δ est exclusivement concentrée dans le CDR3 et est particulièrement intense pour la chaîne δ . À l'inverse, les CDR1 et 2 codés par des segments germinaux V γ et V δ ne portent aucune diversité.

c- Diversité réelle très réduite des TCR $\gamma\delta$

En réalité, le potentiel de diversité combinatoire et jonctionnelle des LT $\gamma\delta$ ne semble quasiment pas s'exprimer. En effet, seul un nombre réduit de combinaisons de segments germinaux associé à une diversité jonctionnelle relativement faible voire inexistante (ex : DETC, *Dendritic Epidermal T Cells* caractérisées par un TCRV γ 5V δ 1 invariant chez la souris), sont effectivement retrouvé *in vivo* chez les individus adultes, et seulement à des localisations spécifiques (**table 2**). Cette diversité réduite est due à un ensemble de mécanismes intervenant au cours du développement thymique des LT $\gamma\delta$, et en périphérie durant les stades précoces de la vie.

Localisation	Usage prédominant des segments V	Diversité V(D)J des TCRs
Souris		
thymus adulte	divers	élevée
rate	V γ 1 et V γ 4	élevée
ganglions lymphatiques	divers	élevée
épiderme	V γ 5V δ 1	nulle
foie	V γ 1V δ 6.3, V γ 4 et V γ 6	intermédiaire
épithélium intestinal	V γ 7V δ 4, V γ 7V δ 5 et V γ 7V δ 6	intermédiaire
épithélium urovaginal	V γ 6V δ 1	nulle
épithélium pulmonaire	V γ 4 et V γ 6	intermédiaire
Homme		
thymus	V δ 1	élevée
sang périphérique	V γ 9V δ 2	intermédiaire
rate	V δ 1	élevée
foie	V δ 1 et V δ 3	élevée
épithélium intestinal	V δ 1 et V δ 3	élevée
derme	V δ 1	élevée

Table 2 : Répertoire, diversité et localisation des LT $\gamma\delta$ chez l'homme et la souris (adulte).

Malgré les mécanismes de recombinaison susceptibles d'affecter les gènes TCR γ et TCR δ et de donner lieu à un répertoire théorique de LT $\gamma\delta$ fabuleusement divers, seules quelques combinaisons de chaînes TCR $\gamma\delta$ associées à une diversité jonctionnelle limitée voir inexistante, sont retrouvées dans des localisations spécifiques chez les individus adultes. Adapté de (Bonneville et al., 2010).

3) Développement et sélection des LT $\gamma\delta$

Nos connaissances sur le développement des LT $\gamma\delta$ sont beaucoup plus limitées que celles acquises sur celui des LT $\alpha\beta$. Par ailleurs, ce sujet est actuellement au coeur des débats dans la recherche sur les LT $\gamma\delta$, et voit l'émergence de nombreux modèles opposés et controversés, voir (Wiest, 2010). Globalement, le développement des LT $\gamma\delta$ semble des plus complexes, et les différentes sous-populations de LT $\gamma\delta$ subissent probablement des processus divers

de maturation, sélection, réorientation..., propre à chacune. Cette partie n'a donc pas pour but de passer en revue la littérature existant à ce propos, mais seulement de définir quelques pistes de réflexion utiles à la suite de l'exposé.

a- Ontogénie des LT $\gamma\delta$ et programmation fonctionnelle

Les LT $\gamma\delta$ dérivent des mêmes progéniteurs hématopoïétiques que les LT $\alpha\beta$, et se développent également dans le thymus (sauf cas particuliers). Les LT $\gamma\delta$ sont les premiers LT à se développer durant l'ontogénie thymique, et sont prédominants pendant les stades précoces du développement foetal. Chez la souris, leur développement se déroule par vagues successives correspondant chacune à l'émergence de sous-populations exprimant un TCR particulier (**figure 4**), résidant par la suite dans des tissus déterminés (**table 1**), où elle tiendra des fonctions précises (Intro ChapI IV 3).

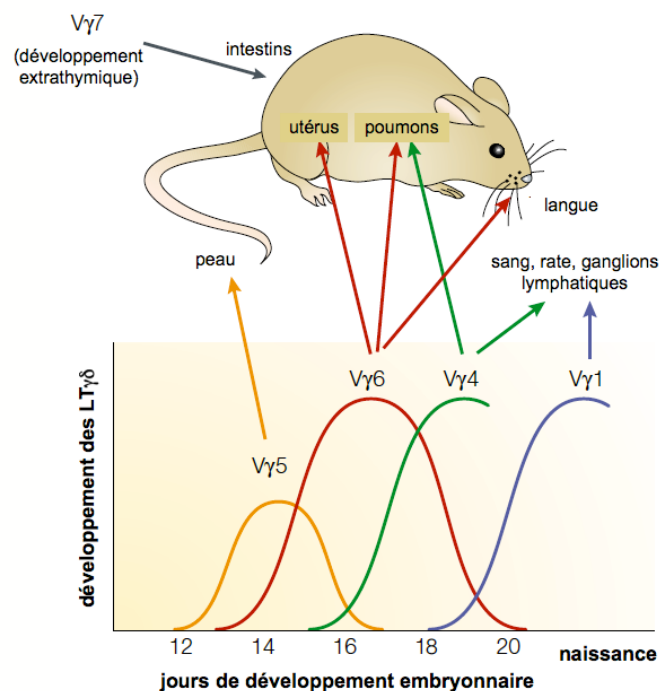


Figure 4: Développement programmé des LT $\gamma\delta$ chez la souris.

Les différentes sous-populations de LT $\gamma\delta$ portant des TCR composées de régions Vy spécifiques sont exportées du thymus par vagues successives, à des périodes définies du développement foetal 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 γ 7 localisés dans les épithélia intestinaux pourrait se dérouler à l'extérieur du thymus. (Carding and Egan, 2002)

Ainsi, un nombre croissant d'études suggère une coordination entre l'acquisition de TCR $\gamma\delta$ particuliers, de caractéristiques de tropisme tissulaire, et de fonctions effectrices, s'apparentant à une « programmation fonctionnelle » innée des différentes sous-populations de LT $\gamma\delta$ au cours du développement. Mais les mécanismes à l'origine de cette coordination restent très mal connus et sujets à débats. Pour revues, voir (Garbe and von Boehmer, 2007; Hayes and Love, 2007; Lauritsen et al., 2006).

Ces données, obtenues chez la souris, sont probablement généralisables aux autres espèces. Chez l'homme, par exemple, les réarrangements des gènes du TCR $\gamma\delta$ sont détectés dès la 8^e semaine de développement foetal et concernent seulement les régions V δ 2, V γ 8, V γ 9, et V γ 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 γ 9V δ 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 δ 1 et plus rarement V δ 3 et V δ 5, dont les localisations anatomiques seront principalement épithéliales (Krangel et al., 1990) (figure 5).

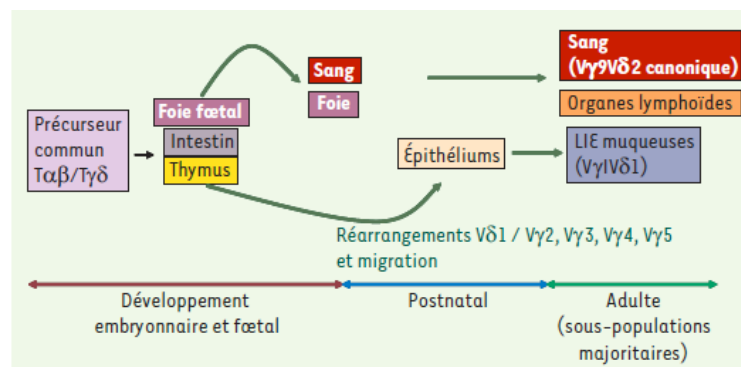


Figure 5 : Développement programmé des LT $\gamma\delta$ chez l'homme.

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 disjoints chez l'adulte, et y tiendront des fonctions spécifiques. (Catros et al., 2010)

Les LT $\gamma\delta$ subissent des processus de maturation distincts de ceux observés lors du développement des LT $\alpha\beta$. En particulier, la programmation des TCR $\gamma\delta$ exprimés et les déterminants innés de leurs spécificités antigéniques en font des

effecteurs fonctionnels innés ne nécessitant généralement pas de sélection positive ou négative par engagement TCR. Par ailleurs les LT $\gamma\delta$ n'expriment que rarement les co-récepteurs CD4/CD8 caractéristiques des LT $\alpha\beta$.

b- Sélection positive de certaines sous-populations.

Sélection positive intra-thymique des DETC murines

Les connaissances concernant les acteurs moléculaires de la sélection des LT $\gamma\delta$ ont récemment progressé grâce à l'identification chez la souris d'une nouvelle famille de gènes reliés à la famille des butyrophilines. Cette famille de gènes *skint* pourrait jouer un rôle essentiel dans le développement des LT $\gamma\delta$. En effet, l'expression thymique de *skint-1* s'est avérée nécessaire au processus de maturation d'une sous-population particulière de LT $\gamma\delta$, les DETC (Boyden et al., 2008). Le produit de ce gène n'étant pas exprimé en surface des cellules, il ne semble pas s'agir d'un acteur direct de la sélection, mais plus probablement d'un acteur indirect intervenant dans l'expression du ligand de TCR des DETC. Ce rôle est notamment suggéré par la restauration du déficit en *skint-1* par des anti-TCR agonistes (Barbee et al., 2011). Nous pouvons supposer que d'autres gènes apparentés à *skint-1* pourraient jouer des rôles similaires dans la sélection d'autres sous-populations $\gamma\delta$. Ainsi, l'étude de cette famille de gènes offre piste de recherche inédite pour la compréhension des mécanismes de sélections des LT $\gamma\delta$ (Intro ChapIII III).

Sélection positive périphérique des LT γ 9 δ 2 humains

Chez l'homme, la majorité des lymphocytes périphériques du sang (*Peripheral Blood Lymphocytes*, PBL) expriment un TCR composé de régions V γ 9 et V δ 2. La fréquence élevée de ces LT V γ 9V δ 2 (ou LT γ 9 δ 2) (jusqu'à 5% des PBL CD3+) est probablement la conséquence d'une expansion périphérique post-natale (Bonneville and Fournie, 2005), comme le suggère l'acquisition précoce de marqueurs mémoires (durant les premières années de la vie). Alors que des stimulations répétées par des Ag environnementaux pourraient expliquer la rapide maturation immunologique des

LT γ 9 δ 2 post-nataux, le fait que 40% des LT γ 9 δ 2 de sang de cordon portent déjà des marqueurs de cellules mémoires suggère plutôt une stimulation chronique par des ligands endogènes surexprimés durant les stades précoces du développement (De Rosa et al., 2004). Par ailleurs, malgré une diversité significative au niveau de leurs jonctions V(D)J, la majorité des LT γ 9 δ 2 présents en périphérie présentent certaines caractéristiques jonctionnelles récurrentes (usage du segment J γ P) qui ne sont pas particulièrement retrouvées chez les thymocytes γ 9 δ 2 (Davodeau et al., 1993). En outre, les motifs TCR invariants partagés par ces LT semblent directement liés à leur spécificité commune pour les phospho-Ag (PAg) (Intro Chap III), qui, de par leur expression endogène, sont probablement responsables de cette sélection positive périphérique précoce.

Sélection positive indépendante de ligands

Chez la souris, la sélection d'une population particulière de LT γ δ spécifique des molécules T10/T22 a été décrite comme pouvant se dérouler en l'absence de ligand de TCR. Cette maturation est rendue possible par un auto-engagement des TCR, par un processus de dimérisation similaire à celui des pré-TCR des LT $\alpha\beta$ conventionnels. Par ailleurs, l'interaction des TCR de ces LT avec leurs ligands T10/T22 engage cette même population dans un processus classique de sélection positive. Ces deux types de sélections mutuellement exclusives aboutissent à une maturation phénotypique et fonctionnelle différentielle, générant en absence de ligand des LT γ δ naïfs producteurs d'IL (Interleukine)-17, et en présence de ligand des cellules mémoires productrices d'IFN (Interferon)- γ (Jensen et al., 2008). Ce type de sélection pourrait être utilisé par d'autres sous-populations γ δ présentant une telle dichotomie fonctionnelle (Ribot et al., 2009).

c- Maintient d'un répertoire $\gamma\delta$ naïf en périphérie

La plupart des LT $\gamma\delta$ ne semblent pas nécessiter de sélection positive pour acquérir leur phénotype effecteur. C'est notamment le cas de la majorité des populations V δ 1 et V δ 3 chez l'homme qui, à l'inverse des V δ 2, sont caractérisés par le maintien d'un phénotype naïf en périphérie chez la plupart des individus.

Par ailleurs, chez la souris, un répertoire naïf serait activement maintenu en périphérie, par l'élimination de certaines sous-populations $\gamma\delta$ ayant rencontré leur Ag (Jensen et al., 2008). Ce mécanisme pourrait permettre de maintenir une meilleure plasticité fonctionnelle de certaines sous-populations $\gamma\delta$, leur permettant d'exercer différentes fonctions effectrices, selon le contexte inflammatoire et les récepteurs engagés (Jensen et al., 2008).

III. Modalité d'activation des LT $\gamma\delta$ et Ag de TCR $\gamma\delta$

L'activation des LT $\gamma\delta$ est déclenchée à la fois par le TCR et d'autres molécules, qui peuvent agir séparément ou en synergie pour activer l'une ou l'autre des fonctions effectrices des LT $\gamma\delta$. La voie majeure d'activation des LT $\gamma\delta$ est celle du TCR, mais, jusqu'à présent, peu de données ont été accumulées quant à la spécificité et aux modalités de reconnaissance antigénique des TCR $\gamma\delta$.

1) Quelques ligands de TCR $\gamma\delta$

a- Comparaison entre ligands de TCR $\alpha\beta$ et ligands de TCR $\gamma\delta$.

Une des différences fondamentales des LT $\gamma\delta$ par rapport aux LT $\alpha\beta$ est qu'ils reconnaissent leur Ag sous sa forme native. Mis à part quelques clones, la reconnaissance antigénique des LT $\gamma\delta$ n'est donc pas restreinte par le CMH, et de ce fait, le TCR $\gamma\delta$ est plus apparenté au BCR qu'au TCR $\alpha\beta$. Par ailleurs, quelques clones particuliers reconnaissent des molécules de CMH, et parmi les nombreux candidats proposés comme ligands de TCR $\gamma\delta$, la plupart sont des protéines du Soi apparentées au CMH (**table 3**).

b- Reconnaissance d'un même ligand par des TCRs extrêmement divers

Les Ag de TCR $\gamma\delta$ les mieux caractérisés sont les molécules murine T10 et T22, apparentées au CMH de classe I, associées à la chaîne b2m, mais incapables de présenter de peptides (Intro ChapIII I 2). Initialement identifiées comme ligands activateurs des clones $\gamma\delta$ murins KN6 et G8 (Ito et al., 1990 ; Schild et al., 1994), leur reconnaissance a pu être étendue à une proportion non négligeable de LT $\gamma\delta$ chez la souris (environ 0,3 à 0,6% des LT $\gamma\delta$ de la rate, et de l'intestin) (Crowley et al., 2000). La reconnaissance de T22 est partagée par des sous-populations exprimant des TCR composés de combinaisons extrêmement diverses de chaînes variables de TCR, mais portant un motif invariant au niveau de la boucle CDR3 de la chaîne δ

Sous-population	antigène	Contexte physiopathologique	Nature/origine	ref
Souris				
Vg1	Hsp60 mycobactérienne	Infection bactérienne	Proteine Soi	(O'Brien et al., 1992)
Vg2/Vd5 (cl. LBK5)	I-E ^k (CMH-II)	Alloréactivité ?	Proteine Soi/Non Soi	(Matis et al., 1989)
Vd2/Vg8 (cl.Tgl4.4)	herpes simplex virus glycoprotein 1	Infections virale	Proteine Non Soi	(Johnson et al., 1992)
Vg1, Vg4, Vg7	T10/T22 (CMH-Ib)	Immuno surveillance ?	Proteine Soi	(Shin et al., 2005)
Vg1(2 hybridomes)	Cardiolipine et apolipoprotéine H		Lipide+proteine Soi	(Born et al., 2003)
Homme				
Vd1 (IEL)	MICA/B (MHC class I polypeptide-related sequence A/B)	Stress et transformation	Proteine du Soi	(Groh et al., 1998)
Vd1 (clones)	lipohexapeptides		lipoproteine	(Vincent et al., 1998)
Vd1 (clones)	HLA-A2, HLA-A24 (CMH-I)	alloréactivité	Proteine du Non Soi	(Ciccione et al., 1989)
Vd1 (clones)	CD1c (+lipide ?) (CMH-Ib)	Infection bactérienne	Proteine Soi	(Porcelli et al., 1989)
Vd9/Vd2	PiP (IPP, HMBPP, TubAg)	Transformation, infection, activation	Phospholipidique Soi/Non Soi	(Constant et al., 1994)
Vg9/Vd2 (clones)	Peptides (Hsp65 myco et toxine tétanique)+HLA-DRw53 (CMH-II)	Infection bactérienne	Proteine Non Soi+ Soi	(Holoshitz et al., 1992)
Vg9/Vd2	Staphylococcal Enterotoxin a (SEA)	Infections bactérienne	Proteine	(Rust et al., 1990)
Vg9/Vd2	Hsp60 mycobactérienne	Stress+ infection	Proteine Non Soi	(Fisch et al., 1990)
Vg9/Vd2	Ecto-F1-ATPase/apoA-I	tumeur	Proteine Soi	(Scotet et al., 2005)
Vg9Vd2	ULBP4	Stress et transformation	Proteine	(Kong et al., 2009)

Table 4 : Quelques ligands de TCRγδ humains et murins, suspectés ou avérés.

Les sous-populations de LTγδ concernées par ces réactivités sont plus ou moins restreintes, et se réduisent parfois à un ou plusieurs clones. HSP, heat-shock protein ; HLA, human leukocyte antigen; ULBP, cytomégalovirus UL16-binding protein. (Carding and Egan 2002) modifié

(Shin et al., 2005). Le TCR du clone G8 avec T22 reste à l'heure actuelle le seul cas de co-cristallisation entre un TCR $\gamma\delta$ et son ligand.

c- Diversité de nature des Ag activant les LT $\gamma\delta$

Si la plupart des Ag de LT $\gamma\delta$ identifiés jusqu'à présent sont de nature protéique (**table 3**), certains clones V δ 1 humains pourraient reconnaître des lipides d'origine endogène ou exogène, associés à la molécule de CMH-I non classique CD1c (Spada et al., 2000). Chez l'homme, les LT $\gamma\delta$ 2 sont capables de reconnaître de petits composés phosphorylés (taille inférieure à 1kDa), d'origine endogène ou exogène, de structure similaire à celle des isoprénoides et regroupés sous le terme de PAg (Intro ChapII I 2). Même si l'interaction directe entre le TCR $\gamma\delta$ et de tels composés n'a pas été formellement montrée, les Ag capables d'activer les LT $\gamma\delta$ semblent être de natures beaucoup plus diverses que ceux reconnus par les LT $\alpha\beta$. En ce sens, les LT $\gamma\delta$ pourraient jouer des rôles tout à fait complémentaires à d'autres sous-populations T, conventionnels ou non, dans la détection de contextes pathologiques.

2) Interaction TCR/ligand

a- Topologie des TCR $\gamma\delta$ et $\alpha\beta$

À ce jour, seules quatre structures tridimensionnelles de TCR $\gamma\delta$ ont été cristallisées: un domaine V δ 3 humain de spécificité antigénique inconnue (#ES204) (Li et al., 1998), un ectodomaine de TCRV γ 9V δ 2 humain (#G115) (Allison et al., 2001), le TCR #G8 murin en interaction avec son ligand T22 (Adams et al., 2005) et un ectodomaine de TCRV γ 1.4V δ 1 humain spécifique de MICA (# δ 1A/B-3) (Xu et al., 2011).

L'architecture globale de tous ces TCR est similaire à celle des TCR $\alpha\beta$ et des BCRs, notamment caractérisées par les deux domaines V Ig-like des récepteurs de l'immunité adaptative (Intro ChapIII I 1)(Allison et al., 2001). En revanche, la topologie des boucles CDR diffère considérablement entre les TCR $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$, mais également d'un TCR $\gamma\delta$ à un autre. En effet, dans le cas des LT $\alpha\beta$, les six boucles CDRs de longueurs équivalentes forment une surface quasiment plane, permettant de multiples points d'ancrages entre les TCR $\alpha\beta$ et les pCMH, le CDR3 constitué du CDR3 α et du CDR3 β portant la majeure partie de la spécificité antigénique (**figure 6A**). Dans le cas des TCR $\gamma\delta$, la boucle CDR3 δ qui porte la majorité de la diversité jonctionnelle est généralement plus longue que la boucle CDR3 γ . De plus, la conformation des boucles CDR3 δ est totalement différente d'un TCR $\gamma\delta$ à l'autre. Alors que les boucles CDR3 δ particulièrement longues des TCR #G8 et #G115 protrudent à plus de 10Å de la surface du CDR, l'ensemble des boucles CDRs génère une surface quasiment plane dans le cas du TCR δ 1A/B-3 et du domaine V δ 3 (Xu et al., 2011) (**figure 6B**).

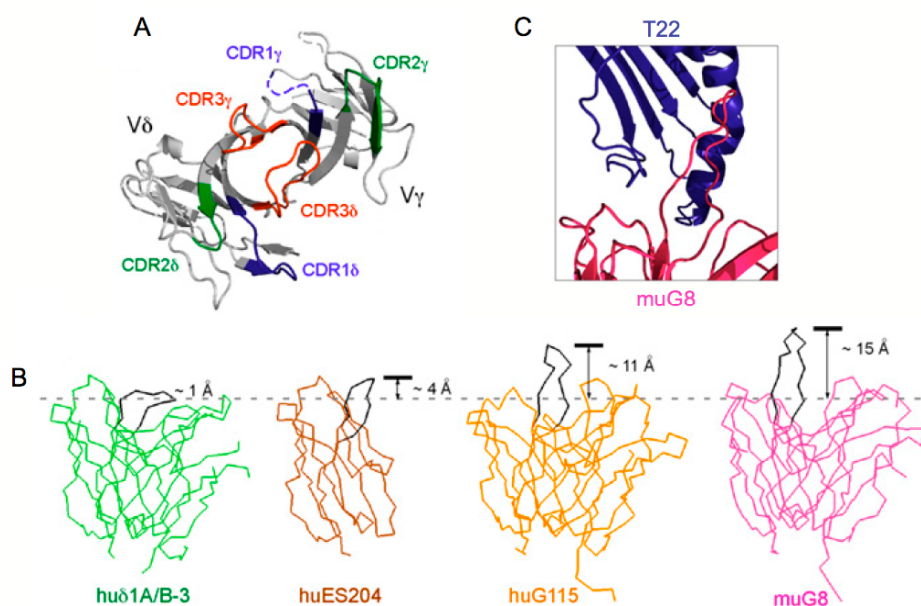


Figure 6: Diversité des modes de reconnaissance antigénique des TCR $\gamma\delta$.

(A) Position des boucles CDRs du TCR $\gamma\delta$ # δ 1A/B-3 vu de dessus. Les différentes boucles CDRs forment une surface de contact avec un Ag spécifique, mais leur participation respective à l'interaction est inégale et peut varier d'un TCR $\gamma\delta$ à un autre. Les boucles CDRs de ce TCR $\gamma\delta$ sont particulièrement similaires à celles d'un TCR $\alpha\beta$ conventionnel. (B) Différents TCR $\gamma\delta$ présentent une protrusion de la boucle CDR3 δ extrêmement variable, suggérant des modes de reconnaissance antigénique distincts. Les TCRs sont représentés de côté, tous dans la même orientation, et la distance de protrusion de la boucle CDR3 δ par rapport à la surface formée par le reste des boucles CDRs est indiquée. (C) Détail de l'interaction entre la boucle CDR3 δ protrudante du TCR #G8 et son ligand T22, soulignant l'importance de cette boucle dans ce singulier mode de reconnaissance. (Xu et al., 2011)

Globalement, la topologie des CDR de TCR $\gamma\delta$ est beaucoup moins plane que celle des TCR $\alpha\beta$, et varie considérablement d'un TCR $\gamma\delta$ à un autre, suggérant des ligands et des modes d'interaction tout à fait distincts.

b- Topologie de l'interaction TCR $\gamma\delta$ /ligand

Une des énigmes $\gamma\delta$ concerne les détails moléculaires de la spécificité de reconnaissance antigénique de leur TCR. Les TCR $\alpha\beta$ présentent une topologie relativement plane, et la reconnaissance des ligands de TCR $\alpha\beta$ implique de multiples points d'ancrages, généralement répartis dans les six CDRs (**figure 6A**). Dans la plupart des cas, les boucles CDR1 et CDR2 fournissent un contact périphérique, autour d'une région centrale où le CDR3, constitué des boucles CDR3 α et CDR3 β de longueurs équivalentes, assure la majeure partie de l'interaction. Pour revue, voir (Rudolph et al., 2006). La surface des TCR $\gamma\delta$ est beaucoup plus accidentée, et les différentes boucles CDRs contribuent probablement de manières très inégales à l'interaction TCR/ligand, et variable d'un TCR $\gamma\delta$ à un autre.

Les études concernant ce processus se sont principalement focalisées sur la molécule de CMH de classe I non-classique T22, reconnue spécifiquement par le TCR murin. En effet, à ce jour, la structure tridimensionnelle de T22 associée au TCR #G8 est le seul exemple de co-cristallisation d'un TCR $\gamma\delta$ avec son ligand. La comparaison entre les interactions TCR $\alpha\beta$ /pCMHI et TCR $\gamma\delta$ /T22 a mis en évidence un mode d'interaction totalement différent entre ces deux TCRs et leurs ligands pourtant apparentés. Alors que les « axes longs » du TCR $\alpha\beta$ et du pCMHI en interaction sont alignés (Garboczi et al., 1996; Garcia et al., 1996), le TCR $\gamma\delta$ #G8 interagit avec T22 sur un angle. En effet, l'exceptionnelle longueur de la boucle CDR3 δ empêche le rapprochement rectiligne des deux molécules (**figure 6B**), et se trouve être responsable de la majeure partie de l'interaction entre le TCR #G8 et T22 (**figure 6C**). Cette boucle protrudente porte un motif spécifique d'acides aminés, nécessaire et suffisant à l'interaction TCR #G8/T22 (Intro Chapl III 2d) tandis que la contribution du CDR3 γ est tout à fait mineure (Adams et al., 2005).

Chez l'homme, l'analyse de la structure tridimensionnelle d'un TCRV δ 1 spécifique de MICA/B exclue une telle stratégie de reconnaissance. En effet, la surface relativement plane formée par l'ensemble des CDRs suggère un mode d'interaction à points d'ancrages multiples, proche de celui des TCR $\alpha\beta$ (Xu et al., 2011). En outre, à l'inverse du TCR #G8, Le CDR3 δ aurait une contribution mineure dans la reconnaissance de MICA, qui serait principalement due aux boucles protrudentes CDR1 δ et CDR2 δ (Xu et al., 2011; Zhao et al., 2006).

c- Quelques paramètres physiques de l'interaction TCR $\gamma\delta$ /ligands

TCR	ligand	K_{on} ($M^{-1}.s^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})	$T_{1/2}$ (s)	k_{Dcalc} (μM)	k_{Deq} (μM)	référence
TCR$\gamma\delta$							
# δ 1A/B-3	MICA*001	53	0,004	170	110	nd	(Xu et al., 2011)
# δ 1A/B-3	MICB*005	5	0,005	140	900	nd	(Xu et al., 2011)
V γ 9V δ 2 #G25	Apo A-1	88	0,007	97	0,81-1,5	nd	(Scotet et al., 2005)
#G8	T22	$2,5 \cdot 10^5$	0,017	41	0,067-0,113	nd	(Adams et al., 2008)
TCR$\alpha\beta$							
paramètres moyens	pCMHI	$6 \cdot 10^2$ - $2 \cdot 10^5$	0,02-0,2	3-35	nd	0,1-90	(Davis et al., 1998)

Table 4 : Comparaison des paramètres d'interaction TCR $\gamma\delta$ /ligands et TCR $\alpha\beta$ /ligands.

La force d'interaction entre le TCR #G8 et son ligand T22 ne semble pas être une caractéristique commune des LT $\gamma\delta$ (**table 4**). En effet, l'analyse des caractéristiques de reconnaissance d'un même ligand par un TCR $\alpha\beta$ et un TCR $\gamma\delta$ révèle une interaction d'affinité bien plus faible du TCR $\gamma\delta$ par rapport au TCR $\alpha\beta$ (Bluestone et al., 1988; Matis et al., 1989), et quasiment indétectable. L'interaction entre l'ectodomaine du TCR # δ 1A/B-3 et ses ligands MICA/B est également caractérisée par une affinité (K_d) très faible. Mais des constantes d'association/dissociation (K_{on}/K_{off}) exceptionnellement lents aboutissent malgré tout à des complexes de demi-vie ($T_{1/2}$) relativement longues (Xu et al., 2011).

L'extrême faiblesse des constantes d'affinité d'interaction TCR $\gamma\delta$ /ligand est probablement la cause de la difficulté à identifier formellement de nouveaux ligands de TCR $\gamma\delta$. De ce fait, très peu d'Ag activateurs de LT $\gamma\delta$ ont réellement été caractérisés comme ligands de TCR $\gamma\delta$ jusqu'à présent. Par ailleurs, la faiblesse des interactions mises en évidences laisse planer un doute sur leur pertinence physiologique.

d- Les déterminants de la reconnaissance antigénique TCR $\gamma\delta$

Initialement, les hypothèses concernant les déterminants de la reconnaissance antigénique des TCR $\gamma\delta$ évoluaient entre deux modèles extrêmes, reliés à la dichotomie séparant le système immunitaire en deux entités distinctes : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ainsi, à la manière des autres récepteurs de l'immunité adaptative (TCR $\alpha\beta$ conventionnels et BCR), l'extrême diversité potentielle des TCR $\gamma\delta$ (diversité jonctionnelle) aurait pu générer des cellules susceptibles de répondre à une infinité de ligands. A l'inverse, la spécificité antigénique des TCR $\gamma\delta$ aurait été déterminée par leur composition en terme de régions variables V γ et V δ , leur permettant de répondre à un nombre très restreint de ligands conservés au cours de l'évolution et faiblement polymorphes, à l'instar des récepteurs de l'immunité innée (diversité combinatoire faible). Actuellement, le modèle de la détermination de la spécificité antigénique des TCR $\gamma\delta$ n'est toujours pas résolu, et crée un véritable dilemme pour la prévision des Ag reconnus par ces TCRs.

L'étude des déterminants de la reconnaissance de T22 par des sous-populations $\gamma\delta$ exprimant des TCRs composés de diverses chaînes variables, a permis de comprendre certaines des bases moléculaires de la reconnaissance antigéniques des LT $\gamma\delta$. En effet, cette reconnaissance s'est révélée être conférée par un motif invariant de six ou sept résidus, nécessaire et suffisant, situé au niveau de la boucle CDR3 de la chaîne δ du TCR, et principalement codé par des segments germinaux (1 résidu codé par V δ /D δ 1, 4-5 résidus codés par D δ 2) (**figure 7**). (Adams et al., 2008; Shin et al., 2005). La grande variabilité de séquence dans les régions CDR3 δ entourant ce motif modulerait quant à elle l'affinité et la cinétique d'interaction avec le ligand T22. En outre, l'analyse de la structure d'un TCRV δ 1 humain spécifique de MICA/B récemment cristallisé suggère que l'interaction avec MICA/B pourrait être principalement due aux boucles CDR1 δ et CDR2 δ . Or, les séquences de ces régions, particulièrement bien conservées entre différents TCRV δ 1 réactifs contre MICA/B, se trouvent être également codées par des segments germinaux (Xu et al., 2011) (**figure 7**).

Les interactions TCR $\gamma\delta$ /ligands dépendant de régions hypervariables, à l'instar des autres récepteurs de l'immunité adaptative, pourraient donc impliquer des motifs germinaux récurrents. En effet, alors que le CDR3 β est presque exclusivement codé par des nucléotides ajoutés aléatoirement, (nucléotides N) (Davis et al., 1998), le CDR3 δ est majoritairement codé par le segment D δ 2, avec une contribution V δ et D δ 1 (**figure 7**).



Figure 7 : Comparaison de l'origine des déterminants antigéniques des régions CDR3 de chaînes TCR δ et TCR β .

La localisation du motif codant pour les acides aminés conférants la réactivité T10/T22 à la chaîne TCR δ (*gauche*), et la réactivité pCMH à la chaîne TCR β (*droite*) sont indiqués en *rouge*. Les déterminants de la reconnaissance antigénique des TCR $\gamma\delta$ seraient codés par des portions des segments germinaux (V D J) tandis celle des TCR $\alpha\beta$ est principalement codée par les nucléotides (N) ajoutés/délétés aléatoirement au niveau des jonctions entre segments germinaux. (Chien and Konigshofer, 2007)

Ainsi, les mécanismes classiques de recombinaison somatique sont à l'origine d'un répertoire plus ou moins divers, mais où les résidus codés par les segments germinaux sont naturellement portés par une large proportion de TCRs. Par conséquent, une fréquence élevée de cellules partagent la spécificité antigénique conférée par ces résidus, sans nécessiter de sélection positive. Les TCR $\gamma\delta$, malgré ce mécanisme de recombinaison somatique à l'origine de l'incroyable diversité des récepteurs de l'immunité adaptative, portent donc des caractéristiques de récepteurs de l'immunité innée, et reconnaissant très probablement un petit nombre de ligands conservés au cours de l'évolution. Par ailleurs, la diversité du CDR3 δ pourrait être à l'origine d'une variabilité d'affinité et de cinétique d'interaction TCR $\gamma\delta$ /ligand. Pour revue, voir (Chien and Konigshofer, 2007).

Ces données découlent d'un nombre restreint d'études, et ne s'appliquent pas nécessairement à l'ensemble des LT $\gamma\delta$. Par ailleurs, les déterminants de la spécificité antigénique semblant varier d'une spécificité à une autre, l'identification de nouveaux ligands de TCR $\gamma\delta$ reste impossible à anticiper sur la base des connaissances déjà accumulées sur ce sujet.

3) Modulation de l'activation TCR et activations TCR-indépendantes

À l'instar des populations T conventionnelles, l'activation TCR des LT $\gamma\delta$ est finement modulée par de nombreux types d'interactions récepteurs/ligands. Alors que la plupart des LT $\gamma\delta$ n'expriment pas de co-récepteurs CD8, ils expriment généralement un grand nombre récepteurs non clonaux tels que des récepteurs de cytokines, des TLRs (*Toll Like Receptor*) ou des NKRs (*Natural Killer Receptor*) comme la plupart des LT mémoires, ainsi que des molécules d'adhésion, pouvant s'avérer cruciales au cours de l'activation (ex : ICAM1) (Kato et al., 2003).

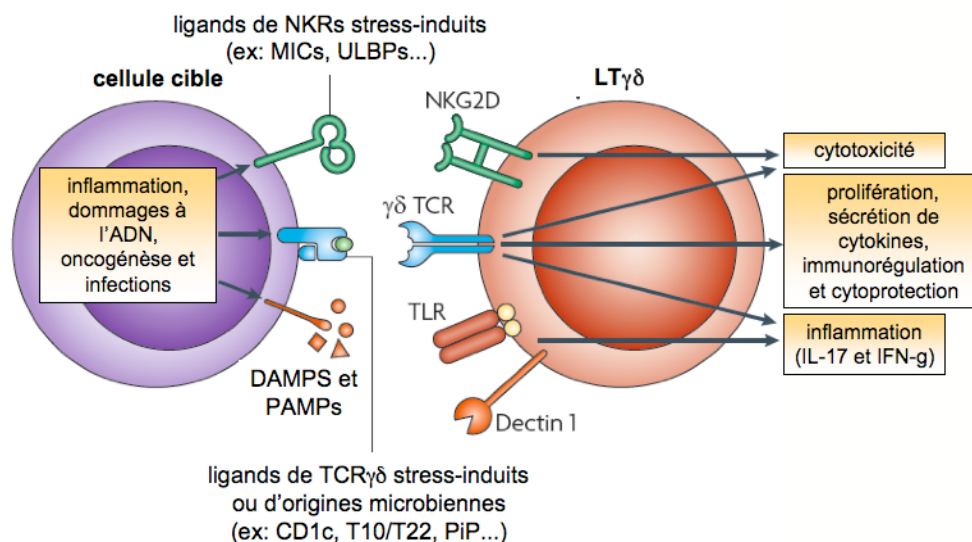


Figure 8 : Modes d'activation des LT $\gamma\delta$ impliquant ou non le TCR.

Les LT $\gamma\delta$ sont capables de percevoir le stress et/ou l'infection de cellules cibles par le biais de leur TCR et/ou de récepteurs non polymorphiques (NKRs, TLRs, NLR,...) dont l'action isolée, additionnelle ou synergique, aboutit au déclenchement de différents types de réponses effectrices. (Bonneville et al., 2010).

En particulier, le NKR activateur NKG2D joue un rôle clé dans la détection de cellules tumorales ou infectées par les LT $\gamma\delta$, grâce à sa large expression par les LT $\gamma\delta$, et sa réactivité envers des ligands conservés reliés au CMH-I et sur-exprimés à la surface de cellules transformées ou infectées. Le NKG2D fonctionne généralement en synergie avec les TCR $\gamma\delta$ comme co-stimulateurs (Viey et al., 2005) (Corvaisier et al., 2005; Nedellec et al., 2011), mais peut également déclencher les réponses cytotoxiques de cellules T murines intra-épidermiques V γ 5V δ 1 contre des

tumeurs épithéliales (Girardi et al., 2001) ou de LT γ δ 2 humains contre des cellules infectées par des virus (Quin et al., 2009) en l'absence d'engagement TCR. Des mécanismes similaires pourraient impliquer d'autres PRRs (TLR ou NLR) (Li and Wu, 2008; Martin et al., 2009; Shibata et al., 2007). Plus communément, l'activation de LT γ δ par les PAMPs et DAMPs se fait de manière indirecte, par relargage de cytokines pro-inflammatoire par des cellules dendritiques (DC) activées par le biais de PRRs. Ce type d'activation indirecte, accompagnée ou non d'un engagement du TCR ou de NKRs exprimés par les LT γ δ , peut aboutir dans certains cas à une production précoce d'IFN- γ par ces cellules (Devilder et al., 2006).

IV. Rôle des LT $\gamma\delta$ au sein du système immunitaire

L'abondance relative des LT portant un TCR $\gamma\delta$ varie beaucoup d'une espèce à une autre, d'une localisation tissulaire à une autre, mais également d'un individu à un autre, en fonction de l'historique immunitaire de chacun.

1) *Localisation stratégique des LT $\gamma\delta$*

Alors que les LT $\gamma\delta$ ne représentent généralement qu'une petite fraction des LT des organes lymphoïdes primaires et secondaires, ils sont largement enrichis dans les tissus et muqueuses, où ils peuvent constituer la majorité des LT.

Chez l'homme adulte, les LT $\gamma\delta$ représentent en moyenne entre 1 et 5 % des PBL CD3+. Globalement, la fraction des LT exprimant un TCR $\gamma\delta$ est largement enrichie dans les sites épithéliaux, directement au contact du milieu extérieur. Cet enrichissement est particulièrement prononcé chez les rongeurs, où les LT $\gamma\delta$ représentent au moins 1/3 des LT intra-épithéliaux des tractus digestif et génital, et constituent la majorité sinon la totalité des LT intra-épidermiques.

Singulièrement, les LT $\gamma\delta$ d'un tissu donné expriment généralement un TCR invariant ou presque, qui diffère d'un tissu à un autre, reflétant probablement un répertoire de reconnaissance antigénique homogène mais distinct d'un tissu à un autre, ou encore des caractéristiques de tropisme tissulaire acquises concomitamment à leur TCR $\gamma\delta$ (**table 2**). Par exemple, Chez l'homme, alors que la plupart des LT $\gamma\delta$ intra-épithéliaux expriment un TCR V δ 1 ou V δ 3, la majorité des PBL expriment un TCR composé de régions V γ 9 et V δ 2. La fréquence élevée de ces LT $\gamma\delta$ 2 peut atteindre 5% des PBL CD3+.

2) *Cinétique d'activation*

Une des caractéristiques majeures des LT $\gamma\delta$, comme d'autres effecteurs de l'immunité transitionnelle, est leur rapidité d'activation. En effet, plusieurs sous-populations $\gamma\delta$ sont caractérisées par un phénotype mémoire pré-activé,

conséquence d'une programmation intra-thymique particulière au cours du développement, ou d'une stimulation chronique par un ligand environnemental ou induit par le stress (ex des L γ 9 δ 2 chez l'homme, Intro ChapI II 3) (Parker et al., 1990). De plus, la fréquence élevée de L γ δ capables de répondre à un type de stimulation donné à une localisation donnée, permet des réponses rapides ne nécessitant pas de sélection ou d'expansion préalable. (Intro ChapI III 2d). Par exemple, chez l'homme, la fréquence des V δ 1 naïfs réactifs contre le cytomégalovirus (CMV) est relativement élevée en périphérie, même chez des individus sains séronégatifs (Ehl et al., 2005). Ainsi, à la manière des effecteurs de l'immunité innée, ces cellules sont généralement parmi les premières à être activées lors d'un stress physiopathologique, et leurs réponses effectrices précèdent celle des L $\alpha\beta$.

3) Fonctions effectrices des L γ δ

Les L γ δ , humains comme murins, possèdent de multiples fonctions effectrices qui pourraient refléter leur potentiel d'action dans de nombreux processus physiopathologiques.

a- Cytotoxicité

Les L γ δ sont capables de détruire des cellules infectées (virus et bactéries), transformées ou activées, par l'intermédiaire de voies impliquant l'engagement de récepteurs de mort (CD95 ou FAS), des récepteurs pro-apoptotiques (*Tumor Necrosis Factor*, TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors ou TRAILR), ou encore le relargage de molécules effectrices cytotoxiques telles que la perforine ou les granzymes (Quin et al., 2009) (Dieli et al., 2001).

Ils peuvent contribuer à la clairance des pathogènes directement par production de molécules bactériostatiques ou lytiques telles que la granulysine ou les défensines (Dieli et al., 2001; Dudal et al., 2006), ou indirectement par induction des fonctions antibactériennes d'autres types cellulaires (Hamada et al., 2008).

b- Production de cytokines

Les LT $\gamma\delta$ peuvent également produire des cytokines immuno-modulatrices impliquées dans l'immunité protectrice contre les virus et les pathogènes intracellulaires (TNF- α et IFN- γ), les bactéries extracellulaires et les champignons (IL-17), ou encore les parasites extracellulaires (IL-4, IL-5 et IL-13). De ces réponses cytokiniques découlent également les rôles bénéfiques ou délétères des LT $\gamma\delta$ lors réponses immunitaires induites par le stress endogène telles que l'inflammation induite par les tumeurs (par la production d'IFN- γ , IL-6, GM-CSF), l'auto-immunité (par la production d'IFN- γ et IL-17), les allergies ou l'asthme (par la production d'IL-4 et IL-13). Finalement, les LT $\gamma\delta$ peuvent inhiber les réponses de cellules effectrices innée ou adaptatives par la production de cytokines immuno-suppressives (TGF- β et IL-10), ou encore 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 (fibronectine 1) de cellules épithéliales. Pour revue, voir (Jameson and Havran, 2007; O'Brien et al., 2007).

c- Présentation des Ag aux LT conventionnels

En plus de ces multiples fonctions effectrices locales, l'équipe de B. Moser a récemment décrit une série de résultats suggérant l'implication directe des LT $\gamma\delta$ dans l'initiation de la réponse adaptative T. En effet, la stimulation *in vitro* de LT $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$ humains) par des agents microbiens peut conduire à la génération de LT $\gamma\delta$ portant des caractéristiques de cellules présentatrices d'Ag (CPA) professionnelles. Ces cellules, par l'acquisition de caractéristiques fonctionnelles (phagocytose) (Wu et al., 2009) et phénotypiques (expression de récepteurs de chimiokines et de molécules d'adhésion et de co-stimulation par les LB et DC activés) normalement réservées aux CPAs, pourraient migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques et présenter des peptides microbiens aux LT naïfs dans les contextes de CMHI et II, conduisant à un priming efficace des LT CD4 $^{+}$ (Brandes et al., 2003; Brandes et al., 2005) et CD8 $^{+}$ (Brandes et al., 2009) (Intro Chapl III 2 b). En revanche, la possibilité que les LT $\gamma\delta$ puissent effectivement agir comme des CPA professionnelles *in vivo* reste

controversée, et certains mécanismes intervenant dans le processus de présentation des Ag par les L $\gamma\delta$ 2 sont peu clairs. Pour revue, voir (Moser and Eberl, 2007).

4) Rôle des L $\gamma\delta$ *in vivo*

a- Rôles physiopathologiques des L $\gamma\delta$

Les rôles physiologiques potentiellement remplis par les L $\gamma\delta$ sont très variés, et incluent l'immunité protectrice contre des pathogènes intra- et extra-cellulaires, la surveillance des tumeurs, la modulation des réponses immunitaires innées et adaptatives, la réparation et le maintien des tissus épithéliaux, et la régulation physiologique de la fonction de certains organes.

En plus de leur participation directe à l'élimination de diverses sources de stress (pathogènes, tumeurs,...) (immunité à médiation cellulaire et humorale) par le biais de leurs multiples fonctions effectrices (cytotoxicité, cytokines,...), les L $\gamma\delta$ peuvent jouer un rôle central dans la modulation de la réponse immunitaire. En effet, les L $\gamma\delta$ sont capables de multiples interactions et dialogues avec divers effecteurs de l'immunité innée comme adaptative, permettant de moduler et d'adapter les fonctions effectrices de ces cellules. Ainsi, les L $\gamma\delta$, au coeur de l'action, participent à l'amplification précoce de la réponse immunitaire innée, à l'activation secondaire de la réponse immunitaire adaptative, au contrôle tardif et à la réparation des dommages collatéraux de la réponse immunitaire (**figure 9**).

b- Rôles des différentes sous-populations de L $\gamma\delta$ chez la souris

La contribution centrale des L $\gamma\delta$ dans ces nombreux processus physiopathologiques a été révélée par l'analyse de souris déficientes pour l'une ou l'autre des sous-populations $\gamma\delta$. Pour revues, voir (Bendelac et al., 2001; Hayday, 2009). Ainsi, chez la souris, les différentes sous-populations de L $\gamma\delta$ semblent jouer des rôles non-redondants dans divers processus physiopathologiques, reliés à leurs spécificités antigéniques, leurs distributions tissulaires, et leurs fonctions effectrices.

Un nombre grandissant d'études suggèrent une coordination entre l'acquisition de TCR $\gamma\delta$ particuliers, de caractéristiques de tropisme tissulaire, et de fonctions effectrices précocement au cours du développement, permettant aux LT $\gamma\delta$ de mettre en place par la suite, des réponses ayant des caractéristiques cinétiques, spatiales et fonctionnelles appropriées. En plus de cette programmation « innée » dont les mécanismes sont encore mal compris, quelques sous-populations spécialisées pourraient garder une certaine plasticité fonctionnelle en périphérie, leurs permettant d'exercer différentes fonctions effectrices, selon le contexte inflammatoire et les récepteurs engagés (**figure 9**). Pour revue, voir (Bonneville et al., 2010).

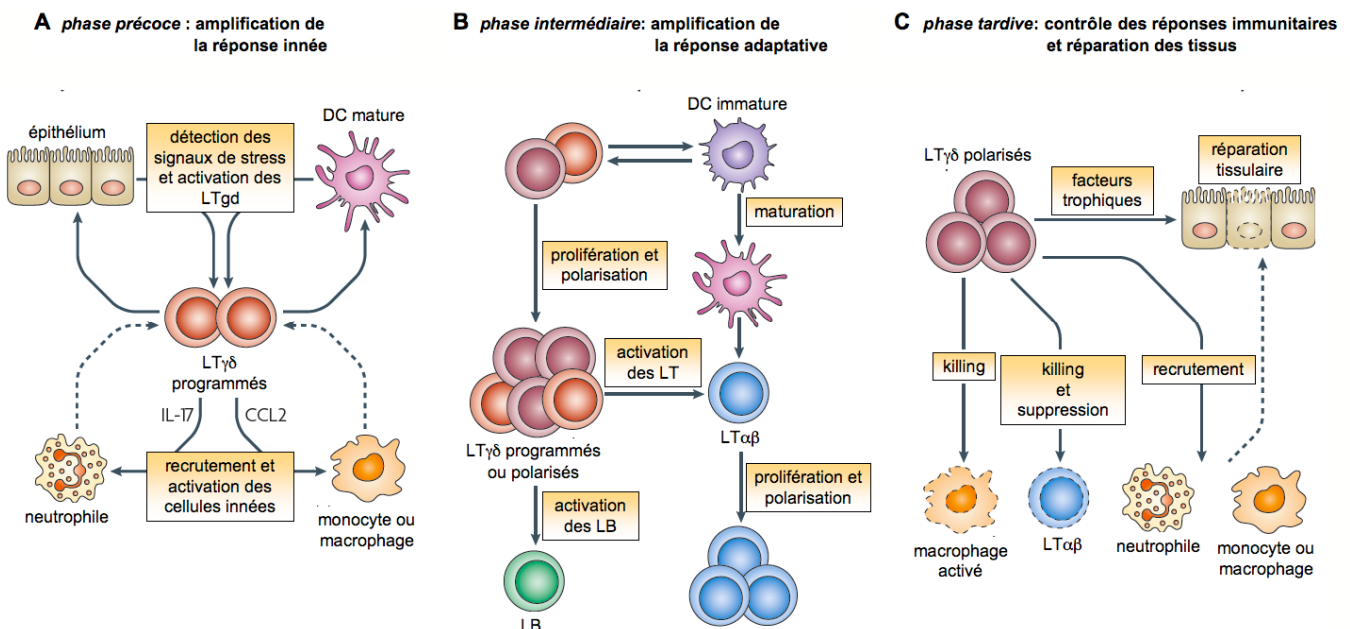


Figure 9 : Implication centrale des LT $\gamma\delta$ au cours de la réponse immunitaire.

La richesse des contextes activateurs des LT $\gamma\delta$, et de leurs fonctions effectrices, programmées au cours de leur développement ou acquises durant la réponse immunitaire, implique ces cellules dans de multiples interactions cellulaires médiées par des facteurs solubles comme membranaires. **(A)** Les LT $\gamma\delta$ sont capables de percevoir très précocement de nombreux signaux de stress à la surface de cellules épithéliales ou dendritiques et, ainsi activés, participent au recrutement et à l'activation des effecteurs responsables de la réponse immunitaire innée. **(B)** Le dialogue entre les LT $\gamma\delta$ et des DCs immatures conduit à la maturation de ces dernières ainsi qu'à la polarisation fonctionnelle et la prolifération des LT $\gamma\delta$. Les LT $\gamma\delta$ peuvent ensuite participer à l'activation des LB, et, en collaboration avec les DCs matures moduler l'activation et la polarisation fonctionnelle des LT $\alpha\beta$ conventionnels. **(C)** Finalement, durant les phases tardives de la réponse immunitaire, les LT $\gamma\delta$ contrôlent l'inflammation ainsi que les effecteurs de l'immunité par le biais de leurs fonctions cytotoxiques et cytokiniques immunosuppressives. Ils participent également à la réparation tissulaire par sécrétion locale de facteurs de croissance et de survie des cellules épithéliales ainsi que par le recrutement de cellules innées participant à ce processus. Adapté de (Bonneville et al., 2010)

c- Rôles des différentes sous-populations de L $\gamma\delta$ chez l'homme

Dichotomie phénotypique et fonctionnelle des L $\gamma\delta$ humains

Chez l'homme, le rôle des L $\gamma\delta$ au cours de divers processus physiopathologiques est très mal connu. Pour des raisons évidentes d'éthique et d'accessibilité aux échantillons, les données concernant les rôles physiopathologiques potentiels des L $\gamma\delta$ ont généralement été obtenues de manière tout à fait indirecte, par l'analyse des fréquences et des caractéristiques de sous-populations de L $\gamma\delta$ *ex vivo* en contextes pathologiques à différentes localisations notamment dans le sang périphérique, ou encore par l'étude de leur réactivité *in vitro* contre divers types de stimulations. Ce type d'analyse a notamment conduit à séparer les L $\gamma\delta$ humains en deux catégories principales, distinguées par l'usage de leur chaîne TCR V δ : (i) les LT V δ 2+, co-exprimant les chaînes de TCR V γ 9 et V δ 2, et par opposition, (ii) les LT V δ 2-, utilisant majoritairement les chaînes TCR V δ 1 et V δ 3 associées à diverses chaînes V γ .

Les sous-populations V δ 2+ et V δ 2- diffèrent par de nombreux aspects, incluant leur ontogénie (Intro ChapI II 3a), localisation (**table 1**), phénotype (Intro ChapI II), fonctions effectrices potentielles (Kress et al., 2006), et leurs contextes d'activation (**table 3**). Par ailleurs, *in vivo*, certaines pathologies sont caractérisées par une inversion du ratio V δ 2+/V δ 2- en périphérie. Ce phénomène, dû à une amplification spécifique des populations V δ 2- (infections CMV) (Dechanet et al., 1999), ou à une deletion spécifique des LT V δ 2+ (infections HIV) (Poccia et al., 1996), révèle des contextes d'activation physiopathologique tout à fait distincts de ces deux populations.

*Absence de redondance fonctionnelle des populations V δ 2+ et V δ 2- *in vivo**

Les contextes d'amplification des LT V δ 2+ seront exposés précisément dans le chapitre suivant. Les LT V δ 2- quant à eux sont amplifiés dans divers contextes infectieux impliquant notamment des bactéries intracellulaires (*Mycobacteria*,

Listeria, *Borrelia*,...), et des virus (HIV, CMV,...). Pour revue, voir (Bonneville and Scotet, 2006; Poccia et al., 2005).

Chez divers individus immuno-déprimés subissant une réactivation CMV, on observe une amplification spectaculaire et durable des sous-populations V δ 1 et V δ 3 en périphérie (Ehl et al., 2005; Halary et al., 2005). *In vitro*, une grande proportion de ces V δ 1 et V δ 3 reconnaissent de manière TCR-dépendante des fibroblastes infectés par le CMV ainsi que des carcinomes coliques (Devaud et al., 2009; Halary et al., 2005). Les Ag de TCR impliqués dans ces types d'activations sont encore inconnus, mais ces résultats suggèrent que les Ag de TCR putatifs reconnus par les sous-populations V δ 2- amplifiés en conditions CMV ne sont pas des Ag codés par le virus, mais correspondent plutôt à des ligands de stress endogènes dont l'expression pourrait être induite/augmentée à la fois dans des cellules infectées par le CMV et dans des cellules tumorales. En outre, *in vivo*, ces populations semblent effectivement jouer un rôle dans la résolution de l'infection CMV (Lafarge et al., 2001), ainsi que dans la surveillance des tumeurs (Couzi et al., 2010).

Par ailleurs, dans la plupart des cas d'infections bactériennes, les stimuli conduisant à l'expansion des LT $\gamma\delta$ V δ 1 ne sont pas dérivés des pathogènes, mais correspondent plutôt à des produits endogènes dont l'expression serait augmentée sous l'effet de l'infection (Das et al., 2004).

Problématiques actuelles des rôles physiopathologiques des LT $\gamma\delta$ humains

Les populations V δ 2-, actuellement méconnues, pourraient donc se rapprocher de leurs équivalents V δ 2+ relativement bien étudiées, et dont la large poly-réactivité est attribuée à la reconnaissance, par le biais de leur TCR, d'une seule famille de molécules du Soi Altéré et Non Soi, surexprimés dans de nombreuses conditions pathologiques (les PAg, Intro Chap III II 2). À l'instar des ligands de TCRs V δ 2+, les ligands putatifs de TCRs V δ 2- seraient des molécules du Soi Altéré, dont l'expression pourrait se trouver augmentée dans divers contextes physiopathologiques incluant l'infection bactérienne et virale, ainsi que la transformation tumorale.

Les populations V δ 2-, tout d'abord définies relativement aux V δ 2+, et considérées comme un ensemble relativement homogène de cellules, se révèlent désormais de plus en plus hétérogènes. Les avancées dans la compréhension de la biologie des LT $\gamma\delta$ chez la souris nous conduisent à présent à envisager les LT V δ 2- comme un ensemble de sous-populations disjointes, jouant probablement des rôles non-redondants dans divers processus physiopathologiques, reliés à des spécificités antigéniques, des distributions tissulaires, et des fonctions effectrices distinctes.

Actuellement, de par la richesse des modes d'activation des LT $\gamma\delta$, dépendant ou non du TCR, et de la diversité de leurs fonctions effectrices, il est très difficile de délimiter des populations de LT $\gamma\delta$ homogènes, susceptibles de reconnaître des ligands de TCR communs. Par ailleurs, les ligands de TCR $\gamma\delta$, identifiés jusqu'à présent de manière ponctuelle, ne semblent répondre à aucun critère général permettant de prévoir leur nature, origine, mode de reconnaissance. Ainsi, malgré l'essor de nouvelles techniques biochimiques, biophysiques, et bioinformatiques de plus en plus pointues permettant des approches prédictives dans de nombreux domaines, les recherches visant à identifier de nouveaux ligands de TCR V δ 2- sont toujours menées par des méthodes traditionnelles. Ces travaux représentent actuellement un véritable enjeu pour la compréhension de la biologie des LT V δ 2- et l'analyse de leur potentiel immuno-thérapeutique dans différentes pathologies humaines.

ChapII Modalités d'activation des LT V δ 2 humains

I. Généralités sur les LTV δ 2+ et le TCRV γ 9V δ 2

Définition de la sous-population V δ 2+ par son TCR LTV γ 9V δ 2.

Chez l'homme, la population V δ 2+ constitue la sous-population $\gamma\delta$ majeure du sang périphérique chez l'adulte (1 à 5% des LT et > 80% des LTV δ), et est également la mieux étudiée. Cette population, généralement qualifiée de V δ 2+ par opposition aux LT V δ 2- qui regroupent l'ensemble des autres sous-populations $\gamma\delta$, est en réalité une population homogène caractérisée par un TCR portant les régions variables V γ 9 et V δ 2. En effet, chez l'adulte sain, la région V δ 2 est retrouvée exclusivement associée à la région V γ 9. Par ailleurs, la région V γ 9 est fréquemment associée à d'autres régions V δ (majoritairement V δ 1 et V δ 3), et dans les stades précoces de la vie ou dans certaines conditions pathologiques, la région V δ 2 peut être associée à d'autres régions V γ . En bref, ce chapitre s'intéresse exclusivement aux LTV δ situés en périphérie chez l'adulte, coexprimant des chaînes TCR portant les régions V γ 9 et V δ 2 (TCRV γ 9 δ 2), et qualifiés de LTV γ 9 δ 2.

Conservation/diversité des TCRV γ 9 δ 2 chez l'homme.

Malgré une diversité significative au niveau de leurs jonctions V(D)J, la majorité des LTV γ 9 δ 2 périphériques présentent certaines caractéristiques jonctionnelles récurrentes, notamment par l'usage du segment J γ P. De nombreuses données suggèrent que l'association prédominante des segments V γ 9 J γ P et V δ 2 au sein des LTV δ humains chez l'adulte serait due à une sélection positive périphérique (Intro ChapI II 3b), et directement liée à la spécificité antigénique partagée par l'ensemble des LTV γ 9 δ 2 périphériques chez l'adulte.

Conservation/diversité des TCR γ 9 δ 2 entre les primates.

Les segments géniques V γ 9 et V δ 2 sont présents seulement chez les primates humains et non humains, et sont parmi les plus conservés par l'évolution de la lignée des primates (Intro Chapl II 1). Par ailleurs, une analyse génétique comparative fine des régions susceptibles d'intervenir dans la spécificité antigénique des TCRs V γ 9V δ 2 chez ces primates, suggère une co-évolution entre le TCR γ 9 δ 2 et son ligand putatif au sein du règne des primates (Kazen and Adams, 2011).

II. Fonction des LT γ 9 δ 2 et lien avec les PAg

1) *Multitude de contextes activateurs de LT γ 9 δ 2*

Le rôle potentiel des LT γ 9 δ 2 au cours de diverses pathologies a historiquement été évalué par criblage des contextes physiopathologiques conduisant à une amplification *in vivo* de ces cellules, ce type de dérégulation étant susceptible d'être causé par une activation spécifique des LT γ 9 δ 2.

En conditions physiologiques, les LT γ 9 δ 2 constituent 1 à 5% des LT périphériques présents dans le sang. Cependant, il a rapidement été mis en évidence que ces cellules étaient largement amplifiées chez les patients souffrant de diverses infections virales, bactériennes et protozoaires, ainsi que dans certains contextes tumoraux, à tel point qu'ils pouvaient devenir majoritaires parmi les LT circulants de certains individus. La plupart du temps, ces données d'amplification ont été complétées par des études *in vitro* mettant en évidence une activation directe des LT γ 9 δ 2 au contact de cellules tumorales ou infectées par ces différents pathogènes, ou encore au contact de parasites tels que plasmodium. Pour revues voir (Morita et al., 2000 ; Morita et al., 2007).

Les contextes activateurs de cette population pourtant très homogène et exprimant des TCR γ 9 δ 2 conservés semblaient donc extrêmement variés, et a historiquement été attribuée à une pléiade d'Ag de toutes sortes...

2) *Unification des contextes d'activation des γ 9 δ 2 : le modèle des PAg*

a- identification d'Ags bactériens activant spécifiquement les γ 9 δ 2

Au cours d'études réalisées *in vitro*, des extraits de bactéries comme *Mycobacterium tuberculosis*, se sont révélés capables de stimuler directement des LT γ 9 δ 2. De ces extraits ont été isolés et décrits des Ag spécifiques de γ 9 δ 2, de faible poids moléculaire, capable de lier les lectines, et de résister aux protéases (Pfeffer et al., 1992). Ces différents Ag (TUBag 1- 4) ont ensuite été structuellement

reliés les uns aux autres, et caractérisés comme de petits composés phosphorylés contenant de la thymidine triphosphate (Constant et al., 1994), regroupés sous le nom de phospho-Ag (PAg). Par la suite, un de ces Ag a été purifié et identifié comme l'isopentényl pyrophosphate (IPP) (Tanaka et al., 1995). Ce prényl-pyrophosphate est un intermédiaire central de voies de biosynthèse des isoprénoïdes, essentielles au métabolisme cellulaire. Il est donc naturellement produit chez tous les êtres vivants, procaryotes comme eucaryotes (**figure 10**).

Chez la plupart des Eubactéries et parasites protozaires, l'IPP est issu de la voie DOXP/MEP qui doit son nom respectivement à son 1^{er} (1-deoxy-D-xylulose-5 phosphate) et 2^d intermédiaire (2-C-methyl-D-erythritol-4 phosphate) (**figure 10A**). En plus de l'IPP, plusieurs métabolites de cette voie ont rapidement été identifiés comme Ag de LT γ 9 δ 2 (Jomaa et al., 1999 ; Morita et al., 1999 ; Belmant et al., 1999). D'autres études ont montré que la délétion de deux enzymes amont de la voie DOXP/MEP abrogeait l'antigénicité d'E.Coli pour les LT γ 9 δ 2 in vitro (Altincicek et al., 2001), tandis que la délétion d'une enzyme terminale (lytB), augmentait considérablement cette antigénicité (Eberl et al., 2002) (**figure 10A**). L'Ag alors accumulé fut identifié comme le HDMAPP ((E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2enyl pyrophosphate) (Hintz et al., 2001), et reste aujourd'hui l'agoniste γ 9 δ 2 le plus puissant.

b- Identification d'Ag similaires chez l'homme

Alors que la plupart des Eubactéries et parasites protozaires utilisent généralement la voie DOXP/MEP pour la biosynthèse des isoprénoïdes, il existe une voie équivalente chez les eucaryotes (animaux et plantes) et les Archaeobactéries : la voie des mévalonates (MVA) (**figure 10B**). Ainsi, les cellules humaines produisent naturellement de l'IPP, qui se trouve être par conséquent un Ag du Soi.

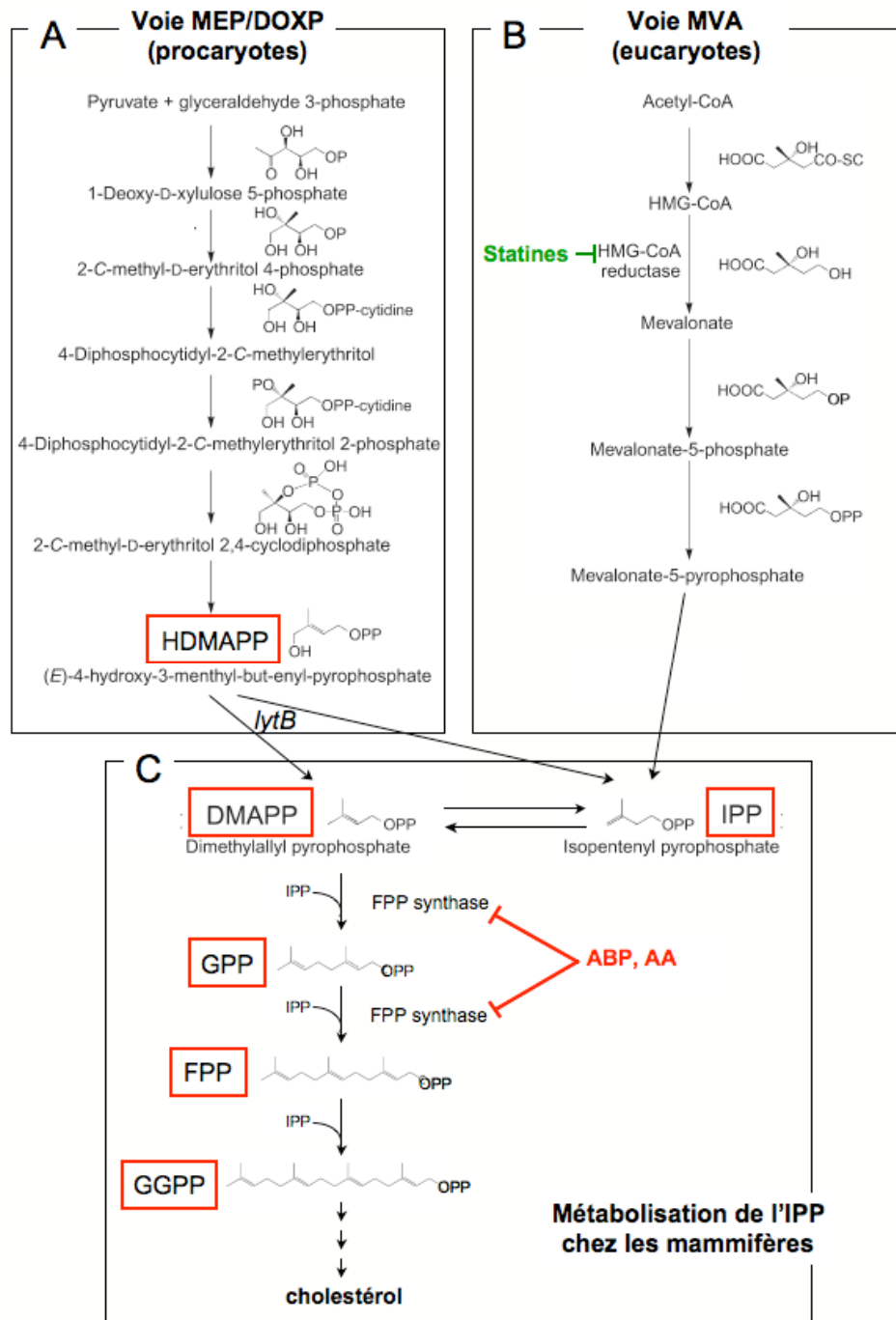


Figure 10 : Voies de production et de dégradation des molécules agonistes $\gamma\delta 2$ chez les organismes procaryotes et eucaryotes.

La plupart des organismes procaryotes utilisent la voie MEP/DOXP (A) pour la biosynthèse des isoprénoides, tandis que les eucaryotes utilisent généralement la voie MVA (B). (A) La voie MEP/DOXP aboutit à la production de puissants agonistes $\gamma\delta 2$: le HDMAPP, le DMAPP et l'IPP. (B) Le DMAPP et l'IPP sont également produits par la voie MVA. (C) Dans les cellules mammaliennes, la métabolisation de l'IPP et du DMAPP passe par une série d'intermédiaires phosphorylés capables d'activer les LT $\gamma\delta 2$ (GPP, FPP, GGPP) et aboutit notamment à la synthèse du cholestérol. La modulation de ces différentes voies peut aboutir à l'augmentation de la production d'agonistes $\gamma\delta 2$ (ex : (A) délétion de l'enzyme terminale *lytB* de la voie MEP/DOXP, ou (C) inhibition de l'enzyme incontournable de dégradation de l'IPP/DMAPP, la FPP synthase, par les aminobisphosphonates (ABP) ou les alkylamines (AA)), ou la diminution de cette production (ex : (B) inhibition par les statines, de le HMG-CoA réductase, enzyme majeure de la voie MVA, située en amont de la production d'IPP et de DMAPP). Les composés activateurs des LT $\gamma\delta 2$ sont indiqués en rouge, et les composés inhibiteurs en vert. Adapté de (Morita et al., 2007).

Les aminobisphosphonates (ABP) sont des molécules pharmacologiques utilisées contre la résorption osseuse, et sont classiquement administrées aux patients souffrant de la maladie de Paget (Hosking, 2006), de tumeurs osseuses (Perry and Figgitt, 2004), et de l'ostéoporose (Boonen et al., 2005). L'effet activateur des ABP a été mis en évidence chez des patients traités pour de telles affections avec du pamidronate. Après leur premier traitement, ces patients présentaient une réaction aigue accompagnée d'une forte amplification des LT γ 9 δ 2 (Kunzmann et al., 1999). Cet inhibiteur pharmacologique a par la suite été décrit comme étant capable d'activer les LT γ 9 δ 2 *in vitro* (Kunzmann et al., 2000).

La structure des ABP, une courte chaîne hydro-carbonée attachée à un résidu bisphosphonate (**figure 11**), suggérait initialement un mode de reconnaissance similaire des ABP et des PAg par les LT γ 9 δ 2. Mais (Miyagawa et al., 2001) ont rapidement mis en évidence une différence fondamentale entre le mode d'action des ABP et celui des PAg, montrant que contrairement à l'activation directe des LT γ 9 δ 2 par les PAg, l'action des ABP est strictement dépendante de la présence de cellules accessoires, dotées d'une certaine capacité de pinocytose, telles que les cellules monocytaires. De plus, l'activation des LT γ 9 δ 2 par les ABP est retardée comparée à celle par des PAg (Miyagawa et al., 2001). Le mode d'action des ABP est alors rapproché de celui d'un peptide antigénique capable d'activer les LT $\alpha\beta$ de manière indirecte après chargement sur des cellules « présentatrices » adéquates.

Par la suite, les ABP (Fleisch, 2002) ainsi que les alkylamines (Thompson et al., 2006), une autre famille de molécules pharmacologiques capables d'activer les LT γ 9 δ 2 (Bukowski et al., 1999) (**figure 11B**), seront décrits comme inhibiteurs de l'activité de la farnesyl pyrophosphate synthase (FPP synthase). L'inhibition de cette enzyme située en aval de la voie MVA, entraîne l'accumulation d'intermédiaires de la voie des MVA tels que la géranylPP et l'IPP dans les cellules, ainsi transformées en CPA de PAg pour les LT γ 9 δ 2 (Gober et al., 2003) (**figure 10C**).

La preuve de l'action exclusivement indirecte des ABP et des alkylamines sur la voie des MVA a été apportée par une famille supplémentaire d'inhibiteurs pharmacologiques, les statines. En effet, ces composés, décrits comme inhibiteurs de l'action de l'HMG-CoA réductase située en amont de la voie MVA (**figure 10B**),

prévenaient l'action des ABP sur les LT γ 9 δ 2 (Gober et al., 2003 ; Thompson and Rogers, 2004), sans avoir d'effet sur celle des PAg.

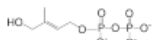
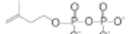
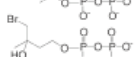
A PAg naturels			B Aminobisphosphonates		
	composé	EC ₅₀ (μ M)		composé	EC ₅₀ (μ M)
	HDMAPP	0,00039		Zolédronate	0,1
	IPP	1		Pamidronate	1-10
	DMAPP	30	Alkylamines		
	GPP	50			
	FPP	300		Ethylamine	1000-10 000
	GGPP	300			
PAg synthétiques					
	MP	~30 000			
	EPP	30			
	BrHPP	0,024			

Figure 11 : Structure et activité des divers agonistes activant les LT γ 9 δ 2.

(A) Les phospho-Ag (PAg) naturels et synthétiques forment une famille molécules non-peptidiques phosphorylées, ayant pour structure générale une chaîne hydrocarbonée reliée à un pyrophosphate. Les PAg naturels sont dérivés des voies MVA ou MEP/DOXP partagées par tous les organismes vivants et, au vue de leurs activités agonistes *in vitro* (EC₅₀), il est probable que seuls le HDMAPP et l'IPP soient capables d'activer les LT γ 9 δ 2 *in vivo*. Les principaux PAg synthétiques sont le méthyl phosphate (MP), le monoethyl pyrophosphate (EPP), le bromohydrine pyrophosphate (BrHPP), et le 2-méthyl-3-butenyl-1-pyrophosphate (cHDMAPP), les deux derniers étant utilisés dans le cadre d'essais cliniques. Les PAg sont des agonistes directs des LT γ 9 δ 2. (B) D'autres molécules sont capables d'activer les LT γ 9 δ 2 de manière indirecte en présence de tierces cellules (ex : monocytes), en inhibant l'enzyme de dégradation des métabolites de la voie MVA (FPP synthase), provoquant ainsi l'accumulation de PAg naturels tels que l'IPP. Ces agonistes indirects sont séparés en deux grandes familles : les aminobisphosphonates et les alkylamines. Les aminobisphosphonates tels que le pamidronate ou le zolédronate sont utilisés dans le cadre d'essais cliniques, ciblant les LT γ 9 δ 2. Les alkylamines sont des composés naturels produits par certaines bactéries. Adapté de (Morita et al., 2007).

Plus directement, la voie des MVA a pu être mise en cause dans des contextes d'activation de LT γ 9 δ 2 par des cellules tumorales telles que les Daudi. En effet, l'activation des LT γ 9 δ 2 par ces cellules était inhibée par les statines (Gober et al., 2003), et inversement, le knock down (par ARNi) de la farnesyl pyrophosphate synthase, transformait des cellules tumorales non-activatrices de LT γ 9 δ 2 en activatrices (Li et al., 2009). Finalement, La fraction stimulant les LT γ 9 δ 2, isolée à partir d'extrait cellulaire Daudi, a été identifiée comme étant l'IPP (Gober et al., 2003).

c- Définition de la structure globale des PAg

La compréhension des modalités de reconnaissance de tels métabolites par les LTy9δ2 a été grandement facilitée par la synthèse de divers composés phosphorylés non naturels, dont l'activité antigénique sur les LTy9δ2 a été évaluée (**figure 11A**). Ce type d'études a permis, d'une part, de mettre en évidence les bases moléculaires de leur reconnaissance par les LTy9δ2 en définissant structuralement les PAg, et d'autre part, d'étudier l'effet de tels Ag sur les fonctions des LTy9δ2 et leur implication éventuelle lors de réponses immunitaires.

Les bases structurales de l'antigénicité des PAg ont pu être définies ainsi:

- (i) La **taille minimale** des PAg agonistes est le mono-méthyl phosphate, le site de reconnaissance de base étant une chaîne alkenyl de 5 carbones avec une portion pyrophosphate (Morita et al., 2001).
- (ii) La perte d'un phosphate du groupement pyrophosphate diminue l'antigénicité du PAg de 40 à 240 fois (Morita et al., 2001). En effet, l'**hydrolyse du pyrophosphate** semble contribuer de manière critique à son action sur les LTy9δ2 (Belmant et al., 2000).
- (iii) La **longueur de la chaîne alkenyl** affecte dramatiquement l'activité des PAg, les plus puissants contenant entre 2 et 5 carbones (Morita et al., 2001).
- (iv) L'**ajout de groupements chimiques** divers (ex : halohydrin, aldéhydes, prényl, époxyde) à distance du groupement pyrophosphate augmente largement son antigénicité (Belmant et al., 2000).
- (v) L'ajout d'un nucléotide triphosphate à la chaîne alkenyl du côté opposé du pyrophosphate ne modifie pas particulièrement l'activité du PAg (Tanaka et al., 1995 ; Morita et al., 2001 ; Tanaka et al., 2007).

Parmi ces composés synthétiques, on peut notamment citer le bromohydrine pyrophosphate (BrHPP ou PhosphostimTM, Innate Pharma) (Belmant et al., 2000 ; Espinosa et al., 2001 ; Song et al., 2004), et le 2-méthyl-3-butenyl-1-pyrophosphate (cHDMAPP ou PicostimTM, Innate Pharma) (Tanaka et al., 2007), utilisés dans le cadre d'essais cliniques (**figure 11A**).

3) Les PAg, discrimination Soi vs Non Soi et Soi Altéré

Alors que l'IPP est le PAg le plus puissant produit par la voie MVA dans les cellules eucaryotes (Gober et al., 2003), les organismes procaryotes produisent également du HDMAPP (Hintz et al., 2001), dont l'activité comme agoniste $\gamma\delta 2$ est largement supérieure à celle de l'IPP (>30 000 fois). Les autres PAg naturels (DMAPP, GPP, FPP, GGPP...) (**figure 10C**), beaucoup moins puissants, n'ont probablement peu ou pas d'activité agoniste *in vivo*. Par ailleurs, les alkylamines, sécrétées par certaines bactéries commensales et pathogènes, sont ubiquitaires dans les fluides corporels humains, et pourraient également jouer un rôle dans l'activation des LT $\gamma\delta 2$ *in vivo* (Bukowski et al., 1999) (**figure 10C**).

a- Détection des métabolites de la voie DOXP/MEP de microorganismes

La nécessité absolue de cellules accessoires humaines jouant le rôle de cellules « présentatrices » de PAg est une des caractéristiques fondamentales de l'activation des LT $\gamma\delta 2$ par les PAg (Intro ChapII III 2c). Ainsi, il est plus que probable que l'activation de LT $\gamma\delta 2$ par des PAg issus de microorganismes soit exclusivement indirecte. Les métabolites de la voie DOXP/MEP pourraient être :

(i) sécrétés dans le milieu par des pathogènes extracellulaires, ou relargués lors de leur lyse. Ces PAg, présentés aux LT $\gamma\delta 2$ par de tierces cellules (mécanisme similaire à la cross présentation), pourraient directement participer à l'élimination des pathogènes extracellulaires par production de molécules bactériostatiques ou lytiques par les LT $\gamma\delta 2$ (Dieli et al., 2001) (immunité à médiation humorale) (Intro Chap II IV 3a).

(ii) sécrétés dans le cytoplasme de cellules hôtes dans le cas de pathogènes intracellulaires, ou de pathogènes extracellulaires phagocytés. La reconnaissance par les LT $\gamma\delta 2$ de PAg présentés par la cellule infectée ou phagocytaire aboutit alors à la lyse de celle-ci (Intro Chap II IV 3a) et participe donc directement à l'élimination du pathogène (Dieli et al., 2001) (immunité à médiation cellulaire) (Intro Chap II IV 3).

b- Dérégulation de la voie MVA au sein des cellules humaines

Alors que le HDMAPP seulement produit par les microorganismes et les parasites est clairement un Ag du Non Soi, l'IPP est produit par l'ensemble des organismes, eucaryotes comme procaryotes. La discrimination entre Soi et Soi Altéré/Non Soi par la reconnaissance de cet « auto-Ag » par les LTy9δ2 se fait donc par la détection d'un « seuil ». En effet, l'IPP est capable d'activer les LTy9δ2, mais seulement à des concentrations très élevées (de l'ordre du nM-uM), qui ne peuvent être atteintes dans les cellules humaines que dans certaines conditions pathologiques. Par ailleurs, la détection de ce « seuil » par les LTy9δ2 peut être modulée par d'autres molécules (ligands costimulateurs, molécules d'adhésions,...) capables d'élever/abaisser le seuil d'activation de ces cellules.

Transformation tumorale et voie MVA

Certaines lignées humaines de lymphomes et de leucémies activant les LTy9δ2 ont été décrites comme possédant un niveau d'activité de l'enzyme HMG-CoA réductase particulièrement élevé (Harwood et al., 1991). Cette enzyme étant un point de contrôle majeur de la production de PAg par la voie MVA, cette observation suggérerait que de telles cellules contiennent un taux élevé d'IPP. C'est effectivement le cas de la lignée Daudi (lymphome de Burkitt) dont la reconnaissance par les LTy9δ2 est directement corrélée avec la production d'IPP (Gober et al., 2003).

Infections et implication de la voie MVA

La reconnaissance par les LTy9δ2 de DC infectées par certaines bactéries est affectée par un traitement statines, suggérant une production de PAg par la cellule hôte. Dans ce cas de figure, il y a donc probablement une synergie entre les voies MVA de la cellule hôte et la voie DOXP/MEP du pathogène intracellulaire (**figure 12**), mais la contribution relative de chacune de ces voies n'a été que peu étudiée (Kistowska et al., 2008). Par ailleurs, le mécanisme d'action du pathogène sur la voie MVA n'a pas été étudié précisément. Il pourrait passer par (i) une interaction directe

entre les 2 voies, par le biais de leurs intermédiaires métaboliques, (ii) un effet de stress de la cellule hôte, non spécifique du pathogène, (iii) une action indirecte sur la voie MVA d'alkylamines sécrétées par certaines bactéries. L'infection de cellules humaines par certains virus (ex : HIV) entraîne également une dérégulation de la voie MVA et une reconnaissance par les LTy9δ2.

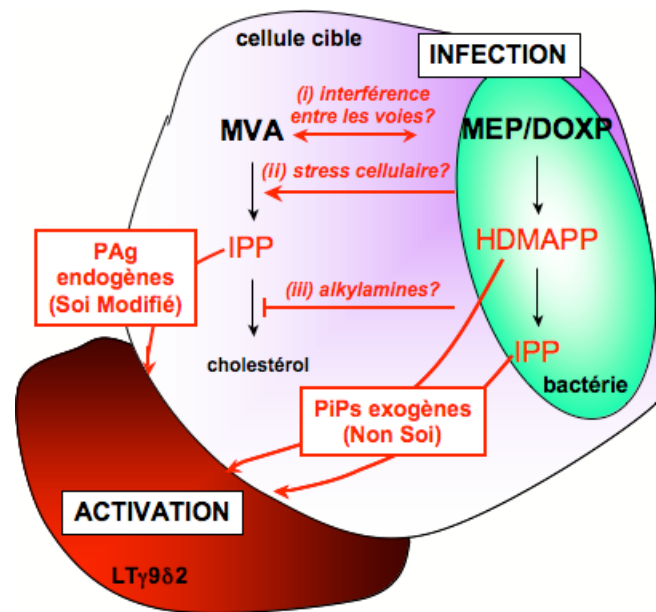


Figure 12 : Synergie entre les voies MVA et MEP/DOXP pour la production de PAg lors d'une infection bactérienne intracellulaire.

La plupart des bactéries produisent naturellement de l'IPP, mais surtout du HDMAPP, un puissant agoniste $\gamma\delta 2$ reconnu comme Ag du Non Soi. L'infection a également pour effet une surexpression de la voie MVA de la cellule infectée donnant lieu à une accumulation de PAg endogènes sous l'effet : (i) d'une éventuelle interaction entre les métabolites des voies MVA et MEP/DOXP, (ii) d'un stress cellulaire non spécifique du pathogène, (iii) d'alkylamines potentiellement sécrétées par la bactérie. Cette surproduction de PAg est perçue par les LT $\gamma\delta 2$ comme du Soi Altéré. L'ensemble de ces PAg, ainsi que des signaux additionnels (ligands de NKRs, TLRs, NRLs,...) vont permettre l'activation des LT $\gamma\delta 2$, aboutissant au déclenchement de fonctions effectrices (lyse de la cellule cible, sécrétion des cytokines, prolifération) et à la mise en place d'une réponse immunitaire.

La nature ubiquitaire des voies de production des PAg fournit une explication à la large réactivité des LT γ 9 δ 2. Actuellement, il n'existe que de très rares contextes d'activation de LT γ 9 δ 2 qui ne soient directement ou indirectement imputables à la reconnaissance de PAg (activations indépendantes du TCR, voir Intro ChapI III 3).

c- Pertinence de l'activation des LT γ 9 δ 2 par les PAg *in vivo*

*Stratégies d'études des LT γ 9 δ 2 et des PAg *in vivo**

Toutes les données portant sur l'effet des PAg sur les LT γ 9 δ 2 sont issues d'études *in vitro*, et leur pertinence physiologique *in vivo* est extrêmement difficile à évaluer du fait de la difficulté de détection des PAg (détection exclusivement par HPLC), et de l'absence de modèle animal adapté à l'étude de ces cellules. En effet, seuls les primates expriment des LT γ 9 δ 2, et toutes les tentatives d'humanisation de souris par transgénèse, ayant pour but l'expression de LT murins exprimant un TCR γ 9 δ 2 humain, ont échoué. Ces échecs, dû à des problèmes de développement des LT γ 9 δ 2, sont très probablement imputables à l'incapacité des cellules murines à activer des LT γ 9 δ 2 même murinisés (non publié). Actuellement, le modèle le plus utilisé est celui de souris nude ou SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) naturellement dépourvues de système immunitaire, et humanisées par transfert adoptif de PBMCs humains ou de LT γ 9 δ 2 amplifiés *in vitro*. Le modèle primate est lui plus pertinent mais beaucoup moins exploité pour des raisons éthiques, financières et de validation en cancérologie.

Implication des LT γ 9 δ 2 dans l'immunité anti-bactérienne, anti-virale, anti-tumorale,...

Le rôle de la voie DOXP/MEP des microorganismes dans l'activation des LT γ 9 δ 2 *in vivo*, au cours d'infections a été évalué dans des souris SCID reconstituées par des PBMCs, humains. Le suivi des LT γ 9 δ 2 dans ces souris après infection par différentes souches d'E. Coli mutées pour certaines enzymes de la voies DOXP/MEP a permis de corréler le niveau d'amplification des LT γ 9 δ 2 avec le niveau de HDMAPP produit par ces bactéries (Morita et al., 2007). D'autre part, il a été observé que le transfert adoptif de LT γ 9 δ 2 humains chez des souris SCID infectées en intra-péritonéal par des bacilles Gram- (*E.coli* ou *Morganelle morgannin*), ou des coques Gram+ (*Staphylococcus aureus*), prévenait la mort de ces souris (Wang et al., 2001). Enfin, l'infection de modèles primates non-humains par *Mycobacterium bovis* BCG induit une expansion des LT γ 9 δ 2, corrélée à la clairance du bacille (Shen et al., 2002).

Le potentiel anti-tumoral des L γ 9 δ 2 humains a été relativement bien étudié *in vivo* à des fins immunothérapeutiques. Par exemple, dans des souris nude ou SCID reconstituées avec des PBMCs humains et injectées au niveau intrapéritonéal ou intraveineux avec des cellules tumorales Daudi, les L γ 9 δ 2 prolifèrent et confèrent une immunité antitumorale aux animaux (Malkovska et al., 1992) (Chen et al., 2001a). Dans des modèles similaires, l'action anti-tumorale des L γ 9 δ 2 *in vivo* a par la suite été mise en évidence sur de nombreux types de tumeurs humaines tels que des carcinomes nasopharyngés, des mélanomes ou adénocarcinomes pancréatiques. Pour une revue, voir (Bonneville and Scotet, 2006). Certaines études mettent en évidence la présence de L γ 9 δ 2 dans l'infiltrat de certaines tumeurs comme celles du sein (Bank et al., 1993), du rein (Choudhary et al., 1995) et du colon (Corvaisier et al., 2005). D'autres travaux suggèrent au contraire que la fréquence des L γ 9 δ 2 sur les sites tumoraux est relativement faible, et que ces cellules pourraient disparaître par mort cellulaire après recrutement et activation sur le site (Braza et al., 2010). L'ensemble de ces résultats suggère donc une implication naturelle des L γ 9 δ 2 dans l'immunité anti-tumorale et l'immunosurveillance des tumeurs *in vivo*.

De nombreuses stratégies immunothérapeutiques anti-bactériennes, anti-virales (ex : influenza) (Tu et al., 2011), anti-parasitaires, ou anti-tumorales basées sur l'expansion de L γ 9 δ 2 *in vivo*, ou le transfert adoptif de L γ 9 δ 2 amplifiés *ex vivo* sont actuellement évaluées dans des modèles murins, ainsi que dans quelques modèles de primates.

Applications immunothérapeutiques anti-tumorales des L γ 9 δ 2

Plusieurs essais cliniques (phase I/II) impliquant des patients à un stade avancé de la maladie, et réfractaires aux traitements conventionnels ont été mis en place afin d'évaluer la sécurité et l'efficacité de l'immunothérapie anti-tumorale basée sur les L γ 9 δ 2 dans différents types de cancers (**table 5**). Pour revue, voir (Gomes et al., 2011).

Au cours de certains de ces essais, des LT γ 9 δ 2 ont été activés et amplifiés *in vitro* à partir de PBMCs autologues, puis réinjectés aux patients. Dans ce cas, l'amplification sélective des LT γ 9 δ 2 était obtenue par coculture en présence de PAg synthétiques de grade GMP, tel que le BrHPP (PhosphostimTM, Innate Pharma, Marseille, France), ou d'ABP comme le zolédronate ou le pamidronate, combiné à de l'IL-2 nécessaire à la prolifération des LT γ 9 δ 2 (Sicard et al., 2005). Dans d'autres essais, les ABP étaient directement co-injectés avec de l'IL-2 pour activer et amplifier les LT γ 9 δ 2 *in vivo*.

Type de cancer	Nb de patients	% MP	% MS	% RP	Référence
Transfert adoptif de LT γ9δ2 autologues amplifiés ex vivo					
Carcinome rénal (métastatique)	10	40	60	0	(Bennouna et al., 2008)
Cancer du poumon à grosses cellules	8	63	37	0	(Nakajima et al., 2010)
Injection d'aminobisphosphonates in vivo					
Lymphome non hodgkinien (en récidive et/ou réfractaire) ou myélome multiple	A = 9	89	11	0	(Wilhelm et al., 2003)
	B = 9	45	22	33	
Cancer métastatique de la prostate (réfractaire aux hormones)	A = 9	78	11	11	(Dieli et al., 2007)
	B = 9	33	45	22	
Cancer du sein (avancé)	10	70	20	10	(Meraviglia et al., 2010)

Table 5 : Résultats des principaux essais cliniques de phase I/II visant les LT γ 9 δ 2.

MP, Maladie progressive ; MS, maladie stable ; RP, rémission partielle. Aucune rémission totale n'a été observée pour le moment. A/B, cohortes distinctes ayant reçu des traitements différents. Adapté de (Gomes et al., 2011)

Les essais cliniques achevés jusqu'à présent, notamment ceux impliquant une stimulation *in vivo*, ont donné des rémissions partielles allant de 10 à 33% (**table 5**). Si dans certains cas, l'absence de réponse à la thérapie pouvait être attribuée à un défaut d'expansion des LT γ 9 δ 2 (Dieli et al., 2007; Meraviglia et al., 2010; Wilhelm et al., 2003), de nombreux patients présentant une activation et prolifération des LT γ 9 δ 2 significative et durable *in vivo* manquaient également de réponse au traitement (Dieli et al., 2007). Ce dernier résultat pourrait être dû à une disparition de ces cellules par mort cellulaire après recrutement et activation sur le site (Braza et al., 2010).

Les essais cliniques impliquant les LT γ 9 δ 2 ayant déjà prouvé la faisabilité et la sécurité de tels traitements, de nouveaux essais prenant en compte les dernières avancées de la recherche concernant la compréhension et la manipulation des LT γ 9 δ 2 sont nécessaires pour en améliorer l'efficacité thérapeutique. Pour revue, voir (Gomes et al., 2011).

III. Modalités d'activation des LT γ 9 δ 2 par les PAg

1) Rôle du TCR γ 9 δ 2 dans la réactivité aux PAg

a- Spécificité de l'activation des LT γ 9 δ 2 par les PAg

La réactivité des LT γ 9 δ 2 induite par les PAg, initialement observée chez l'homme a ensuite été étendue aux primates (Sicard et al., 2005) (Casetti et al., 2005) (Wang et al., 2003), mais n'a jamais été formellement observée chez d'autres espèces. Chez les bovins, une population de LT γ δ détectable seulement chez les animaux infectés par *Mycobacterium bovis* BCG (M. BCG) et potentiellement répondeuse aux PAg, a été décrite. Cependant cette population, activée très faiblement par la fraction non protéique d'extraits de M. BCG ainsi que par des PAg tels que l'IPP et le monomethyl phosphate, n'a pas encore été caractérisée (Welsh et al., 2002).

Ainsi, la réactivité aux PAg semble être restreinte aux seules espèces primates, humaines et non humaines. Or ces espèces sont également les seules à exprimer des LT γ 9 δ 2, et une analyse poussée montre que seuls les LT γ 9 δ 2 de PBMCs de primates sont activés par les PAg. En effet, si l'activation d'autres populations lymphocytaires est parfois observée en réponse aux PAg, ce phénomène est en réalité une conséquence de l'activation première des LT γ 9 δ 2 (activation *bystander*) (Nussbaumer et al., 2011).

Sur la base de ces données montrant la reconnaissance des PAg comme une caractéristique exclusive des LT γ 9 δ 2, une analyse comparative de LT γ 9 δ 2 répondeurs (périphériques, sélectionnés) vs non répondeurs (thymiques, non sélectionnés) a permis d'associer cette réactivité à certains motifs récurrents du TCR γ 9 δ 2 (Davodeau et al., 1993). Ainsi, le rôle assez logique du TCR dans ce phénomène a d'emblée été analysé.

b- Réactivité aux PAg strictement dépendante du TCR γ 9 δ 2

Alors que le blocage de certaines réactivités liées aux PAg pouvait être observé en présence d'Ac dirigés contre le TCR γ 9 δ 2 ou le CD3, ce type d'inhibition n'a pas toujours été décrit comme révélateur d'une implication du TCR dans l'activation de LT (van Seventer et al., 1987). Historiquement, l'implication formelle du TCR dans l'activation de LT γ 9 δ par divers Ag a été mise en évidence par transfert de TCR γ 9 δ dans un variant particulier de la lignée leucémique T α β Jurkat (variant J.RT3-T3.5) (Havran et al., 1991 ; Rust et al., 1990). Ce variant, par ailleurs pourvu de la machinerie transductionnelle nécessaire à l'activation TCR, n'exprimait pas de TCR α β en surface (déficiency en chaîne TCR β). Un simple transfert des gènes codant pour les chaînes TCR d'intérêts dans ces cellules Jurkat en faisait donc une lignée *reporter* de l'activation impliquant ce TCR.

L'implication du TCR a ainsi été formellement mise en évidence dans l'activation des LT γ 9 δ 2 humains par (i) la lignée tumorale humaine Daudi (Bukowski, et al. 1995) décrites par ailleurs comme contenant de grandes quantités d'IPP (Gober et al., 2003), (ii) des extraits mycobactériens contenant notamment du HDMAPP (Bukowski, et al. 1995), (iii) une grande variété de lignées tumorales humaines après traitement par des ABP (Das et al., 2001; Kato et al., 2003), et (iv) une série de PAg synthétiques incluant l'IPP et le cHDMAPP (Morita et al., 2001).

La comparaison entre les séquences en acides aminés des TCRs portés par des LT γ 9 δ 2 spécifiques de PAg issus de PBMCs de singes rhésus et d'humains a révélé une forte conservation de résidus, notamment au niveau des boucles CDRs où seules quelques différences mineures sont notables (Wang et al., 2003). Par ailleurs, des TCR γ 9 δ 2 chimériques constitués d'une chaîne γ 9 de singe rhésus et d'une chaîne δ 2 humaine ou inversement, conférait à la lignée Jurkat une réactivité contre l'ensemble des contextes activateurs de LT γ 9 δ 2 humains (Wang et al., 2003). Ainsi, la réactivité aux PAg est strictement dépendante du TCR γ 9 δ 2, chez l'homme comme chez le singe, et les déterminants antigéniques de cette réactivité semblent extrêmement conservés par l'évolution.

c- Divers TCR $\gamma\delta$ pour divers PAg ?

Comme exposé précédemment (**table 2**), les TCR portés par les LT $\gamma\delta$ périphériques chez l'adulte sont parmi les plus divers des TCR $\gamma\delta$, humains comme murins. Ces LT portent pourtant la marque évidente d'une sélection positive périphérique, probablement due à une confrontation avec d'un ensemble de PAg endogènes et exogènes au cours des premières années de la vie (Intro ChapI II 3b).

Une étude récente a montré un biais significatif des TCRs exprimés par des LT $\gamma\delta$ amplifiés à partir de PBMCs sous différentes conditions de stimulation. En effet, une analyse immunoscope des régions CDR3 a mis en évidence une forte restriction de la variabilité TCR de LT $\gamma\delta$ amplifiés en présence de DCs infectées par le M. BCG comparés à ceux amplifiés en présence de DCs+IPP (Spencer et al., 2008). Ce résultat suggère l'amplification préférentielle d'une certaine population de LT $\gamma\delta$ en réponse au M. BCG, probablement par une activation impliquant la reconnaissance TCR-dépendante de cHDMAPP produit par cette mycobactérie. Ce biais d'amplification pourrait s'expliquer par de subtiles différences dans les modalités d'interactions entre le TCR $\gamma\delta$ et son ligand en fonction du PAg impliqué, et suggère fortement une interaction directe entre TCR $\gamma\delta$ et PAg.

Par ailleurs, cette étude pourrait donner une pertinence physiologique à la diversité des TCR $\gamma\delta$ portés par les LT $\gamma\delta$. En effet, l'IPP, contrairement à certains PAg exogènes comme le HDMAPP, serait capable de d'activer un large répertoire de LT $\gamma\delta$, par des interactions impliquant des déterminants antigéniques relativement peu spécifiques. Ainsi, la sélection périphérique néonatale des LT $\gamma\delta$, probablement due à une stimulation chronique par des PAg endogènes tels que l'IPP pourrait créer un répertoire de LT $\gamma\delta$ diversifié, capable de répondre efficacement et spécifiquement aux divers PAg exogènes susceptibles d'être rencontrés au cours de la vie d'un individu.

2) Bases moléculaires de l'interaction directe entre TCR γ 9 δ 2 et PAg

a- Analyse des déterminants TCR de la reconnaissance des PAg

Les efforts conjugués d'un certain nombre d'équipes ont permis de mettre en évidence certains motifs TCR susceptibles d'intervenir dans la reconnaissance des PAg par les LT γ 9 δ 2. En effet, les clonages d'un nombre incalculable de LT γ 9 δ 2, criblages de réactivités aux PAg, séquençages de cDNA de chaînes TCR, et alignements de séquences, ont permis d'identifier des motifs TCR récurrents chez les LT γ 9 δ 2 répondeurs ainsi que des motifs présents dans les LT γ 9 δ 2 répondeurs et absents des LT γ 9 δ 2 non répondeurs. (Panchamoorthy et al., 1991 ; Davodeau et al., 1993 ; Morita, et al. 1995 ; Bukowski, et al. 1995 ; Daubenberger et al., 2001 ; Evans et al., 2001 ; MacDougall et al., 2001 ; Miyagawa et al., 2001)... Ces études ont abouti à la définition de déterminants potentiels de la spécificité antigénique des LT γ 9 δ 2. En particulier, en plus des segments V γ 9 et V δ 2 et de certains résidus, le segment J γ P (également appelé J γ 1.2) localisé dans le CDR3 γ a été mis en évidence comme étant primordial pour la reconnaissance des PAg.

b- Modélisation de l'interaction PAg/TCR γ 9 δ 2

Récemment, un TCR γ 9 δ 2 (#G115) a été cristallisé (Allison et al., 2001), permettant la modélisation de l'interaction potentielle entre le TCR γ 9 δ 2 et les PAg. En effet, l'ensemble des CDRs des chaînes TCR γ et δ forme une structure en forme de poche chargée positivement, pouvant logiquement servir de site d'interaction putatif avec les PAg, caractérisés comme de petites molécules chargées négativement (**figure 13A**) (Allison et al., 2001 ; Morita et al., 2001).

L'ensemble des données accumulées, incluant : (i) la structure et les propriétés chimiques des PAg (Intro ChapII II 2c), (ii) les déterminants antigéniques potentiels identifiés (Intro ChapII III 2a), (iii) la structure de la poche formée par les CDRs (**figure 13**), a ainsi permis de sélectionner une série de résidus TCR servant potentiellement de site d'ancrage aux PAg. L'ensemble de ces candidats a alors été analysé par l'étude de la réactivité aux PAg de cellules Jurkat exprimant des TCR γ 9 δ 2 mutés pour l'un ou l'autre de ces résidus.

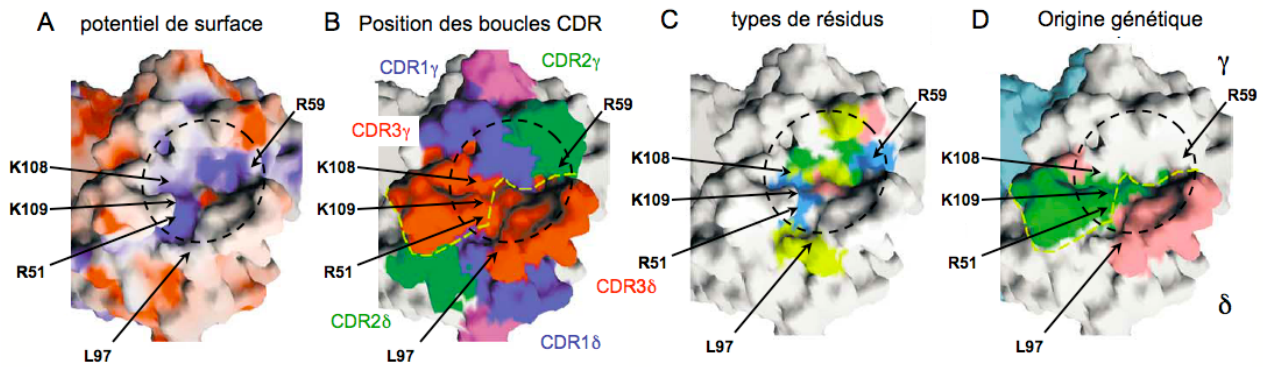


Figure 13: Surface de reconnaissance antigénique du TCR γ 952 #G115.

TCR vu de dessus. **(A)** Le potentiel de surface est indiqué de -10kT (*rouge*) à +10kT (*bleu*), soulignant les zones d'interactions putatives avec les résidus phosphorylés des PAg formant une poche positivement chargée (*bleu, entourée*). **(B)** Position des boucles CDRs. La limite entre les chaînes TCR γ et TCR δ est marquée en *pointillés jaunes*. **(C)** La fente entre les 2 boucles CDR3 contient des résidus chargés (-, *rouges* ; +, *bleus*), hydrophobes (*jaunes*) et polaires (*verts*). **(D)** Les résidus de la surface de reconnaissance antigénique de la chaîne TCR γ sont codés par les gènes V γ 9 (*blancs*), J γ P (*verts*), ainsi que des nucléotides N (*roses*). Ceux de la chaîne TCR δ sont majoritairement codés par le gène D δ et des nucléotides N et sont beaucoup moins conservés que ceux de la chaîne TCR γ . Les trois résidus putatifs d'ancrages des PAg proposés par Allison et al., (2001) sont R59 (CDR2 γ), R51 (CDR2 δ), et K109 (CDR3 γ , J γ P), positivement chargés, et situés au fond de la poche où le PAg serait susceptible de loger. Par la suite, Yamashita propose un autre mode d'ancrage, par lequel les groupes phosphates des PAg interagiraient avec les résidus K108 (CDR3 γ , J γ P) et R51 (CDR2 δ), et la chaîne carbonée interagirait avec une chaîne latérale hydrophobe en position δ 97 (CDR3 δ). Ainsi, les PAg interagiraient avec le bord de la poche, plutôt qu'avec le fond. (Allison et al., 2001).

Tout d'abord, trois résidus positifs : R59, R51 et K109, ont été proposés par Allison et al., comme site d'ancrage des PAg au fond de la poche hydrophobe (**figure 13**) (Allison et al., 2001). Miyagawa, et al. confirme tout d'abord l'importance de la K109, codée par le segment J γ P (Miyagawa et al., 2001). Mais Yamashita, et al propose peu après un modèle différent, dans lequel les PAg se lieraient au TCR via des interactions entre les groupes phosphates négativement chargés des PAg, et 2 résidus cationiques adjacents (K108, J γ P et R51) ainsi qu'entre des chaînes carbonées de PAg et une courte chaîne latérale aliphatique de δ L (V ou I) 97 par interaction hydrophobe. D'après ce modèle, les PAg interagiraient avec les bords de la poche TCR, plutôt qu'en y étant inséré (**figure 13**) (Yamashita et al., 2003).

c- Insuffisance du modèle d'interaction simple TCR γ 9 δ 2/PAg.

Jusqu'à présent, aucun de ces séduisants modèles, ni aucune autre technique n'a permis de documenter l'interaction directe entre le TCR γ 9 δ 2 et les PAg. En effet, toutes les techniques visant à démontrer formellement ces interactions par des méthodes biochimiques ou biophysiques ont échoué (ex : co-cristallisation, dialyse à l'équilibre ou microcalorimétrie) (Allison et al., 2001 ; Morita et al., 2007). Ces résultats pourraient s'expliquer par la faiblesse des interactions déjà observées entre les TCR γ δ et leurs ligands (**table 4**), faiblesse cependant difficilement associable avec la puissance des effets biologiques de ligands solubles comme les PAg sur l'activation des TCR γ 9 δ 2.

Par ailleurs, le contact entre les LT γ 9 δ 2 et des cellules accessoires humaines a été documenté comme étant nécessaire à l'action des PAg solubles, suggérant une forme de « présentation » des PAg aux LT. En effet, une étude fine des modalités d'activation des LT γ 9 δ 2 par les PAg solubles a révélé que les LT γ 9 δ 2 n'étaient activés qu'en cas de contact membranaire avec d'autres cellules, tandis que des cellules individualisées ne s'activaient pas (Morita, et al. 1995 ; Lang et al., 1995). Dans le cas des PAg solubles, la cellule présentatrice peut être un LT γ 9 δ 2. (notion d'auto-présentation).

Dans le cas des ABP, Kato, et al. ont mis en évidence que seules les cellules humaines étaient capables d'activer les LT γ 9 δ 2 sous l'effet d'un traitement pamidronate alors que l'effet pharmacologique de cet inhibiteur n'est pas restreint à cette espèce. Ce résultat suggère que certaines interactions cellulaires espèces-spécifiques sont nécessaires à l'activation des LT γ 9 δ 2 par les PAg, et que les PAg produits sous l'effet du pamidronate ne sont pas simplement relargués dans le milieu extra-cellulaire, ou ils pourraient alors activer les LT γ 9 δ 2 par auto-présentation (Kato et al., 2003). En outre, un certain nombre d'études a également proposé la possibilité d'un « chargement » de PAg sur des cellules cibles, qui seraient ainsi sensibilisées à une reconnaissance par les LT γ 9 δ 2 (Vantourout et al., 2009 ; Kato et al., 2006). Mais ce résultat, relativement controversé, pourrait être expliqué par des lavages insuffisants des cellules cibles, ayant pour conséquence la présence résiduelle de PAg activateurs (Thedrez et al., 2007).

L'ensemble de ces résultats suggère que les PAg n'agissent pas sur les L γ 9 δ 2 par simple interaction avec le TCR γ 9 δ 2, mais que cette interaction probablement trop transitoire est stabilisée par un contact particulier entre L γ 9 δ 2 et cellule cible. Ainsi, les PAg ne sont pas actifs sous forme soluble dans le milieu, mais sont « fixés » à la membrane des cellules de manière plus ou moins spécifique.

3) Présentation des PAg aux L γ 9 δ 2 ?

a - Internalisation/transformation des PAg ?

Contrairement aux L $\alpha\beta$ conventionnels, les L $\gamma\delta$ ont initialement été caractérisés comme étant capables de reconnaître leurs Ag sous une forme native à la manière des LB, sans nécessiter de modification (processing), ou de présentation (sauf quelques cas particuliers, **table 3**).

Dans le cas de l'activation des L γ 9 δ 2 par les PAg, l'hypothèse d'une internalisation active, modification ou présentation par les molécules classiques a été immédiatement exclue (Morita, et al. 1995 ; Lang et al., 1995). En effet, la fixation des cellules cibles avec du glutaraldéhyde, prévenant l'entrée des Ag lipidiques ou peptidiques dans les CPAs, n'empêchait pas leur reconnaissance par les L γ 9 δ 2 en présence de PAg (Morita, et al. 1995 ; Sarikonda et al., 2008). De plus l'utilisation de lignées déficientes pour diverses molécules présentatrices classiques (ex : CMH-I, II, CD1), ou encore d'Ac bloquant dirigées contre ces molécules, n'avait pas d'effet sur leur capacité à présenter des PAg (Morita, et al. 1995).

Par ailleurs, l'hypothèse d'une éventuelle transformation de ces Ag a été fortement mise en doute, au vu de leur rapidité d'action. En effet, suite au contact des L γ 9 δ 2 avec les PAg, on observe très rapidement une acidification métabolique (environ 10 sec pour le BrHPP : Espinosa et al., 2001; Sirecci et al., 2001), ainsi que le déclenchement de flux calciques (<1,5mn en présence d'IPP) (Morita, et al., 1995) ; (<5mn en présence de BrHPP) (Nedellec et al., 2011). Ces phénomènes ne révèlent pas nécessairement le déclenchement d'une signalisation TCR, pourtant ils sont exclusivement observés avec des L γ 9 δ 2.

En outre, l'analyse des voies de transduction TCR a donné des résultats hétérogènes selon le PAg utilisé pour l'activation. La signalisation déclenchée par de l'IPP était extrêmement retardée comparée à une activation par un anti-CD3 agoniste immédiate (2h) (Lafont et al., 2001), relativement retardée dans le cas du BrHPP (jusqu'à 20 mn) (Nedellec et al., 2011; Thedrez et al., 2007), et immédiate et soutenue avec du cHDMAPP (Correia et al., 2009). Les interactions PAg/TCR étant considérées comme très transitoires (Intro ChapI III), la divergence concernant le délai d'activation pourrait être due à une différence d'affinité des PAg pour le TCR $\gamma\delta$ 2, dont la signalisation pourrait nécessiter un engagement en série plus ou moins long. La différence de durée de signalisation pourrait être due à une différence de stabilité des PAg, plus ou moins rapidement dégradés sous l'effet de phosphatases ubiquitaires. L'interprétation correcte de cet ensemble de résultats nécessiterait une étude réellement comparative de l'activation par différents PAg (ex : mêmes populations de LT $\gamma\delta$ 2 en culture ou *ex vivo*, mesure des mêmes paramètres d'activation).

Ainsi, la « présentation » des PAg aux LT $\gamma\delta$ 2 ne semblait nécessiter ni d'internalisation active, ni de transformation, ni de chargement sur des molécules de présentation classiques.

b- Stabilisation membranaire/présentation des PAg ?

Comme énoncé précédemment (Intro ChapII III 2c), alors que les PAg avaient initialement été étudiés comme des ligands solubles du TCR $\gamma\delta$ 2, un certain nombre d'observations suggéraient une interaction, spécifique ou non, entre les PAg et la membrane des cellules cibles, alors considérées comme « cellules présentatrices » d'Ag de PAg.

La mise en évidence d'attributs indispensables à cette fonction de « cellules présentatrices » de PAg a permis de préciser ce mécanisme. En effet, parmi toutes les espèces testées (ex : souris, rat, hamster), seules les cellules humaines sont capables de présenter les PAg aux LT $\gamma\delta$ 2 (Green et al., 2004; Kato et al., 2003; Lang et al., 1995). Par ailleurs, certaines cellules humaines en sont incapables (Kato

et al., 2006; Kato et al., 2003). Ce résultat pouvait s'expliquer par : (i) une interaction non-spécifique des PAg avec la membrane de n'importe quelle cellule, couplée à un déficit de certaines cellules en molécules de costimulation ou d'adhésion nécessaires à l'activation T (disparité inter-espèce ou déficit global de cellules humaines), ou, (ii) une interaction spécifique des PAg avec une molécule membranaire humaine, nécessaire à l'activation des LT γ 9 δ 2 par les PAg, et qualifiée alors de « molécule présentatrice de PAg ».

Récemment, l'équipe de C. Morita a développé une série de PAg photosensibles, capables de former réversiblement des liaisons covalentes à la surface des cellules cibles sous l'effet de rayonnements UV (réaction avec les ponts C-H). La mise en contact de cellules humaines avec de tels composés suivit d'un traitement UV permettait une activation efficace des LT γ 9 δ 2, même après d'importants lavages, suffisants pour éliminer les PAg classiques. L'incubation de cellules humaines avec des PAg classiques en plus de ces PAg photosensibles a révélé une compétition entre ces deux types de composés, mettant en évidence l'existence d'un nombre limité de sites fixation de PAg à la surface des cellules (Sarikonda et al., 2008).

Cet important résultat a permis de poser les bases d'un nouveau mode d'action des PAg. Deux modèles distincts sont actuellement envisagés :

(i) en accord avec le modèle initialement conçu, les PAg pourraient interagir directement avec le TCR γ 9 δ 2 (Intro ChapII III 2b), mais cette interaction faible et transitoire nécessiterait d'être stabilisée par une molécule accessoire spécifiquement humaine, capable d'interagir à la fois avec le PAg et le TCR γ 9 δ 2.

(ii) à l'inverse, un modèle alternatif peut être imaginé au vu de l'importance cruciale de la molécule « présentatrice » hypothétique. Ainsi, les PAg pourraient interagir avec cette molécule, et interférer ensuite avec son interaction avec le TCR γ 9 δ 2 (par démasquage ou modification du site d'interaction avec le TCR γ 9 δ 2 par exemple).

c- Molécules présentatrices de PAg

Modélisation de l'empreinte moléculaire de la molécule présentatrice de PAg

Dans la lignée des travaux déjà réalisés par plusieurs équipes dans le but de poser les bases moléculaires de l'interaction directe entre TCR γ 9 δ 2 et PAg (Intro ChapII III 2b), l'équipe de C. Morita a récemment entrepris l'étude exhaustive de l'effet, sur la reconnaissance des PAg, de mutations largement réparties à la surface des différents CDRs du TCR γ 9 δ 2 (Wang et al., 2010).

En plus des mutations précédemment définies comme étant cruciales pour la reconnaissance des PAg par les LT γ 9 δ 2 (Intro ChapII III 2b) (Yamashita et al., 2003), cette étude a conduit à l'identification d'un ensemble de mutations, également capables d'abolir la reconnaissance TCR-dépendante du HDMAPP. Situés dans les régions CDR1 γ (T29), CDR2 γ (Y54, T57), CDR1 δ (E28), et CDR2 δ (E52) (**figure 14**), les résidus concernés sont localisés dans des zones exposées aux solvants, et très accessibles. De manière inattendue, ces zones se trouvent être extrêmement distantes (16-23Å) de la poche initialement proposée comme zone d'ancrage des PAg, dont les résidus clés sont situés dans le CDR3 γ (K108), le CDR2 δ (R51), et le CDR3 δ (L97) (Yamashita et al., 2003).

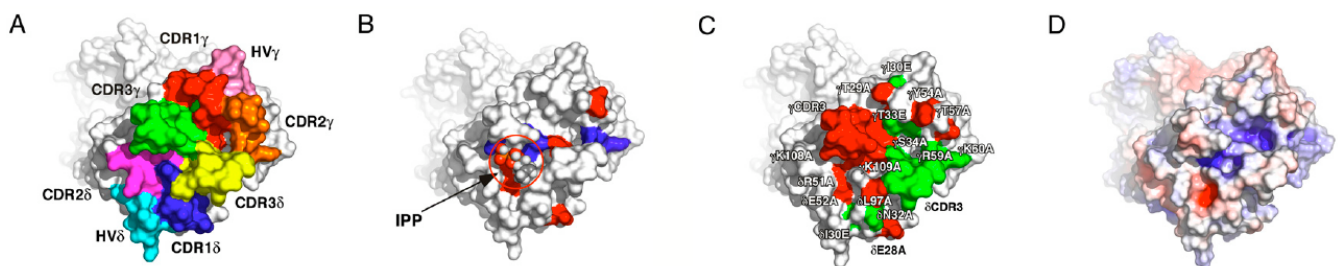


Figure 14 : Implication de tous les CDRs du TCR γ 9 δ 2 dans l'activation induite par les PAg.

La surface du TCR est vue de dessus. (A) localisation des boucles CDR1 δ (bleue) CDR2 δ (rose) CDR3 δ (jaune) CDR1 γ (rouge) CDR2 γ (orange) CDR3 γ (vert) du TCR γ 9 δ 2. (B) modélisation de l'interaction entre le TCR γ 9 δ 2 et l'IPP selon le modèle proposé par Yamashita et al., 2003. Les résidus acides (rouges) et basiques (bleus) sont indiqués. (C) en rouge sont représentés l'ensemble des acides aminés dont la mutation abroge la reconnaissance des PAg. Les acides aminés non critiques sont colorés en vert. (D) potentiel de surface du TCR γ 9 δ 2 (colorée de -8kT en rouge à +8kT en bleu) révélant deux sites d'interaction potentiels positivement chargés. (Wang et al., 2010)

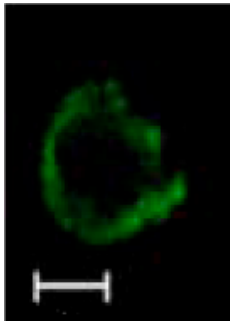
Sans pour autant remettre en question le modèle d'interaction TCR γ 9 δ 2/PAg proposé précédemment par l'équipe de N. Minato (Yamashita et al., 2003) (Intro ChapII III 2b), Wang et al., suggèrent que ces résidus pourraient entrer en contact avec une molécule beaucoup plus large, capable d'interagir à la fois avec les TCR γ 9 δ 2 et les PAg, et propose ainsi une empreinte moléculaire du contact entre le TCR γ 9 δ 2 et l'hypothétique molécule présentatrice de PAg (Wang et al., 2010).

Caractérisation de la molécule présentatrice de PAg

Aucune des molécules présentatrices d'Ag connue n'est requise pour la présentation des PAg au LT γ 9 δ 2 (Morita, et al. 1995) (Intro ChapII III 3a). Par ailleurs, la modélisation de l'empreinte moléculaire laissée par la molécule présentatrice de PAg à la surface du TCR γ 9 δ 2 n'a pas permis d'identifier de candidats convaincants (Wang et al., 2010).

Afin de caractériser plus directement cette molécule, l'équipe de Z. Chen a récemment tiré profit de la technologie des tétramères solubles de TCRs, communément utilisée pour détecter des ligands membranaires de divers TCR $\alpha\beta$ (Chen et al., 2001b) et $\gamma\delta$ (Aydintug et al., 2004). En accord avec la réactivité des LT γ 9 δ 2, des tétramères de TCR γ 9 δ 2 de macaques sont capables d'interagir spécifiquement avec toutes les cellules humaines et macaques traitées avec du cHDMAPP ou infectées par M. BCG, mais aucune cellule d'autres espèces (souris, rat, cochon). Par ailleurs, le marquage par les tétramères de TCR γ 9 δ 2, visible sous forme de clusters, est affecté par la digestion des protéines membranaires (traitement trypsine) (Wei et al., 2008).

En résumé, l'ensemble des travaux réalisés jusqu'à présent et notamment les plus récents ont permis d'établir un profil relativement précis de la molécule présentatrice de PAg putative, sur la base de son interaction hypothétique avec les PAg et le TCR γ 9 δ 2.



Cette molécule est une **protéine membranaire non polymorphique, ubiquitaire et conservée** chez les **primates** (humains et non humains), mais restreinte à ces seules espèces, et distincte de toutes les molécules de présentation décrites jusqu'à présent (CHMI, CHMII, CD1, b2m associées...).

Figure 15 : Marquage de la molécule présentatrice de PAg putative.

Marquage membranaire de DCs infectées par le BCG par des tétramères de TCR γ 9 δ 2 simiens. Les DCs non infectées ne présentent aucun marquage (non montré). Echelle : 10 μ m. (Wei et al., 2008)

Sur la base de la cartographie de l'empreinte moléculaire laissée par la molécule présentatrice de PAg encore inconnue sur le TCR γ 9 δ 2, Wang et al. 2010 prévoient que cette protéine pourrait avoir une structure homologue aux molécules présentatrices classiques et non classiques et leurs ligands (CMHI et II CD1, MR1, MICA/B), ou faire partie d'une nouvelle classe de molécule de présentation, telle qu'une enzyme, une HSP (*Heat Shock Protein*), ou une protéine de la superfamille des Ig, de structure distincte de celle des molécules du CMH de classe I/II (Wang et al., 2010). Cependant, aucune protéine candidate pertinente n'a été proposée à ce jour...

4) Modèle hypothétique de présentation des PAg aux LT γ 9 δ 2

a- Interactions entre la F1-ATPase ectopique, l'Apolipoprotéine A-I et le TCR γ 9 δ 2

Au cours d'une étude récente visant à identifier un ligand membranaire intervenant dans la reconnaissance des cellules tumorales Daudi par les LT γ 9 δ 2 (Scotet et al., 2005), deux protéines purifiées ont été caractérisées comme étant capables d'interagir directement avec le TCR γ 9 δ 2: (i) l'Apolipoprotéine A-I naturellement présente dans le sérum n'était ni nécessaire ni suffisante à l'activation des LT γ 9 δ 2, (ii) la sous-unité F1 de l'ATP synthase (F1-ATPase), par ailleurs exprimée à la membrane des cellules Daudi, semblait suffisante pour l'activation des LT γ 9 δ 2 (ATPase bovine purifiée).

La présence d'Apolipoprotéine A-1 améliorait significativement l'interaction entre l'ATPase purifiée et le TCR γ 9 δ 2, ainsi que la reconnaissance des cellules Daudi par les LT γ 9 δ 2. En effet, cette protéine soluble ubiquitaire et capable d'interagir à la fois avec le TCR γ 9 δ 2 (Scotet et al., 2005) et la F1-ATPase (Martinez et al., 2003) pouvait servir de molécule chaperonne, stabilisant le contact entre le TCR γ 9 δ 2 et son ligand membranaire l'ATPase.

Initialement décrite comme une enzyme mitochondriale capable d'hydrolyser l'ATP, l'ATPase est exprimée de manière ectopique à la membrane de diverses cellules, tumorales ou non (Champagne et al., 2006). Par ailleurs, dans ce contexte membranaire, l'ATPase serait constitutivement associée avec les molécules de CMH de classe I qui pourraient prévenir sa détection (Vantourout et al., 2008). Ainsi, cette enzyme probablement ubiquitaire serait détectée préférentiellement à la surface de cellules sous-exprimant particulièrement les molécules de CMH-I. En particulier, certaines lignées tumorales comme les Daudi, et K562 sous-expriment les molécules de CMH-I, expriment la F1-ATPase ectopique, et sont naturellement reconnues par les LT γ 9 δ 2. Inversement, d'autres lignées également déficientes en CMH-I comme les 721.221 mais n'exprimant pas de F1-ATPase ectopique ne sont pas reconnues.

Ces observations amènent donc l'hypothèse logique d'une reconnaissance, par les LT γ 9 δ 2, des cellules tumorales à la surface desquelles la F1-ATPase ectopique démasquée pourrait directement interagir avec le TCR γ 9 δ 2.

b- Rôle de la F1-ATPase ectopique dans l'activation des LT γ 9 δ 2 par les PAg

Par la suite, ce modèle pourtant séduisant a été remis en question, notamment à cause de la présence probable, dans les extraits d'ATPase purifiés, de contaminants susceptibles de participer à l'interaction avec le TCR γ 9 δ 2. En particulier l'ATPase a été proposée comme étant capable d'interagir avec les PAg, ceux-ci possédant certaines caractéristiques similaires à l'ATP, ligand naturel de l'ATPase.

Ces dernières années, l'équipe d'E Champagne a entrepris de concilier les modèles d'activation des LT γ 9 δ 2 par les PAg et par la F1-ATPase ectopique (Vantourout et al., 2009 ; Mookerjee-Basu et al., 2010). Cet ambitieux projet a abouti

à un modèle hypothétique complexe qui sera exposé sans être discuté. Pour revue, voir (Champagne, 2011).

Récemment, l'Apppl, un PAg nucléotidique analogue de l'ATP, a été décrit comme étant produit en même temps que l'IPP par la voie MVA (Monkkonen et al., 2006 ; Monkkonen et al., 2007). La caractérisation de l'Apppl a révélé que ce composé, incapable d'activer directement les LT $\gamma\delta$ 2, était hydrolysable en IPP. En outre, il pouvait être « chargé » sur des cellules bien plus efficacement que l'IPP, par une association probable avec la F1-ATPase ectopique selon un mode d'interaction similaire à celui de l'ATP.

Ainsi, l'Apppl a été proposé comme étant une forme de stockage de PAg, (i) incapable d'activer les LT $\gamma\delta$ 2 par lui-même, (ii) stablement présenté à la membrane des cellules cibles par association avec la F1-ATPase, (iii) protégé par la F1-ATPase de la dégradation par les phosphatases, (iv) hydrolysable en IPP actif lors du rapprochement entre la cellule présentatrice et un effecteur $\gamma\delta$ 2 (**figure 16**).

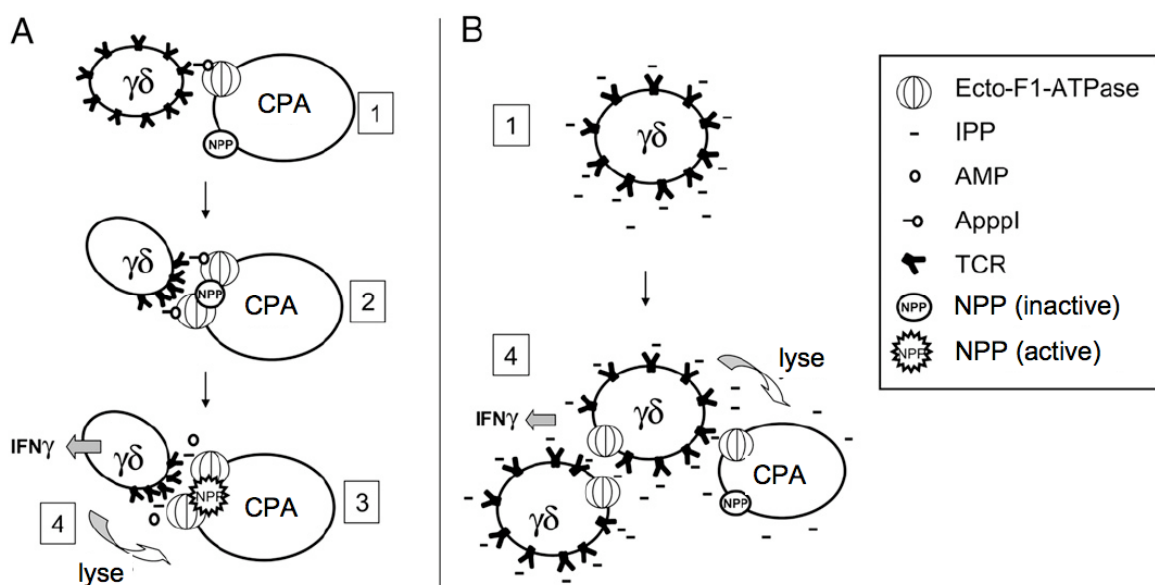


Figure 16: Modèle hypothétique de l'activation des LT $\gamma\delta$ 2 par des PAg.

(A) Les PAg endogènes sont perçus par les LT $\gamma\delta$ 2 à la surface de cellules cibles sous forme de dérivés nucléotidiques inactifs tels que l'Apppl, en interaction avec la F1-ATPase ectopique. Après reconnaissance antigénique (étape 1), l'aggrégation des TCRs (étape 2) pourrait induire le recrutement/activation d'une éventuellement nucléotide pyrophosphatase (NPP) à la surface de la cellule cible entraînant l'hydrolyse du PAg (étape 3). Cette hydrolyse est nécessaire à l'activation complète et au déclenchement des fonctions effectrices des LT $\gamma\delta$ 2 (étape 4). (B) Les PAg solubles actifs ne sont pas capables d'activer les LT $\gamma\delta$ 2 en l'absence d'interaction avec la F1-ATPase ectopique, dont la contribution est fournie par le contact entre le LT $\gamma\delta$ 2 et une cellule voisine. (Mookerjee-Basu et al., 2010)

E Champagne suggère que des PAg tels que l'IPP ou le HDMAPP, naturellement produits sous forme active, pourraient éventuellement être convertis en de tels PAg nucléotidiques et être présentés selon ce schéma, mais de nombreuses questions restent ouvertes, et ce modèle demeure en partie hypothétique.

c- La F1-ATPase ectopique, protéine présentatrice de PAg ?

Lors de la caractérisation de son interaction avec le TCR γ 9 δ 2 (Scotet et al., 2005), la F1-ATPase ectopique a été envisagée comme une molécule présentatrice de PAg que l'ensemble des équipes travaillant sur les LT γ 9 δ 2 traquaient depuis déjà quelques temps.

Cependant, l'étude des modalités fines d'activation des LT γ 9 δ 2 par les PAg, et plus particulièrement le profilage d'une molécule présentatrice hypothétique a connu une avancée phénoménale ces dernières années (Intro ChapII III 3c), détrônant ce candidat pourtant idéal. En effet, la F1-ATPase ectopique ne remplit pas les critères de sélection de la molécule présentatrice de PAg hypothétiques.

Cette molécule est certes protéique, membranaire, non polymorphique et conservée entre les différents primates, mais elle est également conservée à travers tout le règne animal, et l'ATPase murine est aussi proche de l'ATPase humaine que l'ATPase bovine utilisée pour activer les LT γ 9 δ 2 (Intro ChapII III 4a). En outre, la structure de cette protéine ne correspond aucunement à l'empreinte moléculaire laissée par la molécule présentatrice de PAg à la surface du TCR γ 9 δ 2 (Wang et al., 2010) (Intro ChapII III 3c). Finalement, un nouveau ligand de TCR γ 9 δ 2 candidat, immuno-précipité grâce aux outils récemment développés par l'équipe de C. Morita (Intro ChapII III 3b), ne semble pas non plus correspondre à la F1-ATPase ectopique (CT Morita, non publié).

La F1-ATPase ectopique conserve tout de même une place de choix dans le modèle d'activation des LT γ 9 δ 2 par les PAg, puisque c'est jusqu'à présent le seul candidat susceptible de faire le lien entre les PAg et le TCR γ 9 δ 2. Par ailleurs, les travaux de plusieurs équipes indépendantes ont mis en évidence la participation de cette enzyme dans la reconnaissance des PAg par les LT γ 9 δ 2 (Scotet et al., 2005)

(Vantourout et al., 2009 ; Marcu-Malina et al., 2011). Le modèle proposé par E Champagne, dans lequel l'interaction (directe ou indirecte) entre la F1-ATPase et le TCR γ 9 δ 2 joue un rôle central, pourrait probablement être complété d'autres intervenants. En particulier, l'interaction entre TCR γ 9 δ 2 et F1-ATPase pourrait être favorisée ou empêchée par les contributions respectives de l'Apolipoprotéine et du CMH-I (Intro ChapII III 4a). Un certain nombre d'autres protéines pourraient également intervenir. En particulier, la protéine de stress HSP60 pourrait jouer un rôle de chaperonne similaire à celui de l'Apolipoprotéine A-1. En effet, cette protéine a récemment été décrite comme capable d'interagir avec la sous-unité b de l'ATPase ectopique (Alard et al., 2011). Par ailleurs, l'hydrolyse éventuelle des PAg par la F1-ATPase ectopique, dont le rôle potentiel est actuellement obscur, pourrait être modulé. En effet, l'Apolipoprotéine A-1 comme HSP60 sont capables d'augmenter l'activité hydrolytique de l'ATPase ectopique (Radojkovic et al., 2009 ; Alard et al., 2011).

Finalement, malgré des avancées notables ces dernières années, l'acharnement conjugué des équipes spécialisées dans la biologie des LT γ 9 δ 2 à identifier la molécule présentatrice de PAg s'avère infructueux. En outre, tous les modèles envisagés jusqu'à présents pour expliquer le mode d'activation des LT γ 9 δ 2 par les PAg, malgré une escalade en complexité, semblent rudimentaires au vu de la quantité de données nécessitant d'y être intégrées.

Cette constatation peut soulever certaines interrogations quant à la poursuite d'une éventuelle chimère... Cette molécule présentatrice de PAg existe-t-elle réellement ? Est-elle unique ? ou s'agit-il d'un ensemble complexe de molécules dont la reconnaissance par les LT γ 9 δ 2 pourrait être finement régulée par de nombreuses et diverses contributions ?

ChapIII Les protéines de la IgSF au sein du système immunitaire adaptatif et les fonctions potentielles des membres de la famille BTN

I. Les familles Ig, CMH, B7 et BTN de la IgSF

1) La superfamille des Immunoglobulines

a- Les Immunoglobulines

Les Immunoglobulines (Ig) sont des protéines exprimées par les LB, capables de lier spécifiquement des Ags du Non Soi. Au repos, elles sont exprimées sous une forme membranaire appelé BCR et définissent la spécificité d'un LB donné. L'interaction entre le BCR d'un LB et son Ag spécifique va se traduire par une activation et différenciation cellulaire, aboutissant à la sécrétion d'Igs également appelées Acs. Les Acs étant une version soluble du BCR, ils portent la même spécificité antigénique, et vont permettre la neutralisation puis la destruction du pathogène exprimant l'Ag reconnu.

Le séquençage des Ig a révélé la présence de certains domaines structuraux particuliers d'environ 100 acides aminés, pouvant se diviser en deux catégories distinctes par leur fonction et leur taille : des domaines variables ou domaines V et des domaines constants ou domaines C. La détermination de la structure de ces domaines il y a près de 40 ans a montré qu'ils partageaient des caractéristiques de repliement basé sur un sandwich de 2 feuillets β anti-parallèles (Poljak et al., 1973) (**figure 17**).

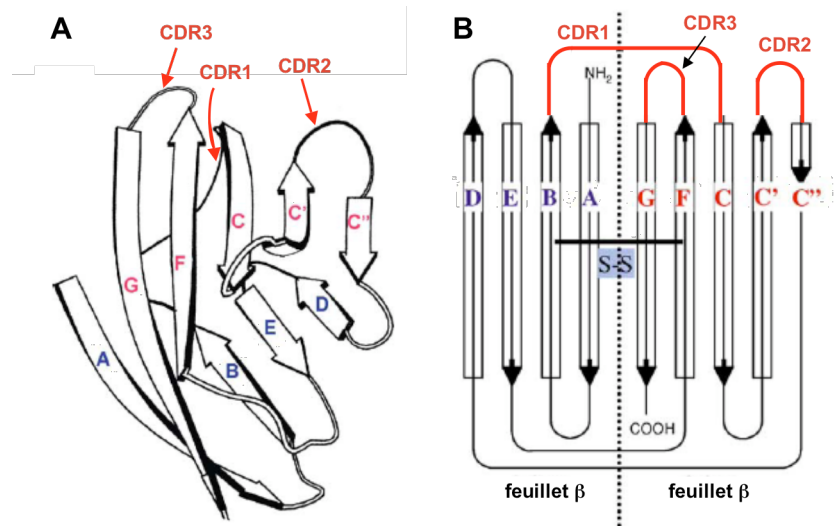


Figure 17 : Définition structurale des domaines IgV des TCRs et BCRs.

(A) Structure tridimensionnelle d'un domaine IgV montrant les brins (*strands*) et les boucles (*loops*) formant les feuillets β (B) Vue schématique de la topologie du même domaine. Les localisations du pli formé par le sandwich de feuillets β (*pointillés*), du pont dissulfure conservé entre les brins B et F (S-S) et des boucles hypervariables CDRs (*rouge*) sont indiquées. Les domaines IgC sont similaires aux domaines V, mais ne contiennent pas de brins C' et C'' ni de CDRs. (Barclay, 2003).

b- Les domaines Ig des récepteurs de l'immunité adaptative BCR et TCR

L'ensemble des récepteurs à l'Ag du système immunitaire adaptatif TCR et BCR est construit sur un modèle structural commun définissant la famille IgSF (un domaine IgV et un domaine IgC). En particulier, leur domaine IgV contient des régions hypervariables portant la diversité issue de la recombinaison V(D)J propre aux récepteurs de l'immunité adaptative. Ces régions, appelées CDRs, forment des boucles complémentaires à un Ag qui leur est propre, avec lequel elles interagissent spécifiquement, et qui va définir la spécificité antigénique propre aux récepteurs à l'Ag de l'immunité adaptative (**figure 17**). Dans le cas du TCR $\alpha\beta$, l'ensemble des 6 boucles CDRs (3 boucles CDR α et 3 boucles CDR β) lui confère la capacité à reconnaître un peptide antigénique particulier présenté sur une molécule donnée du SMI de la famille du CMH (**figure 18**).

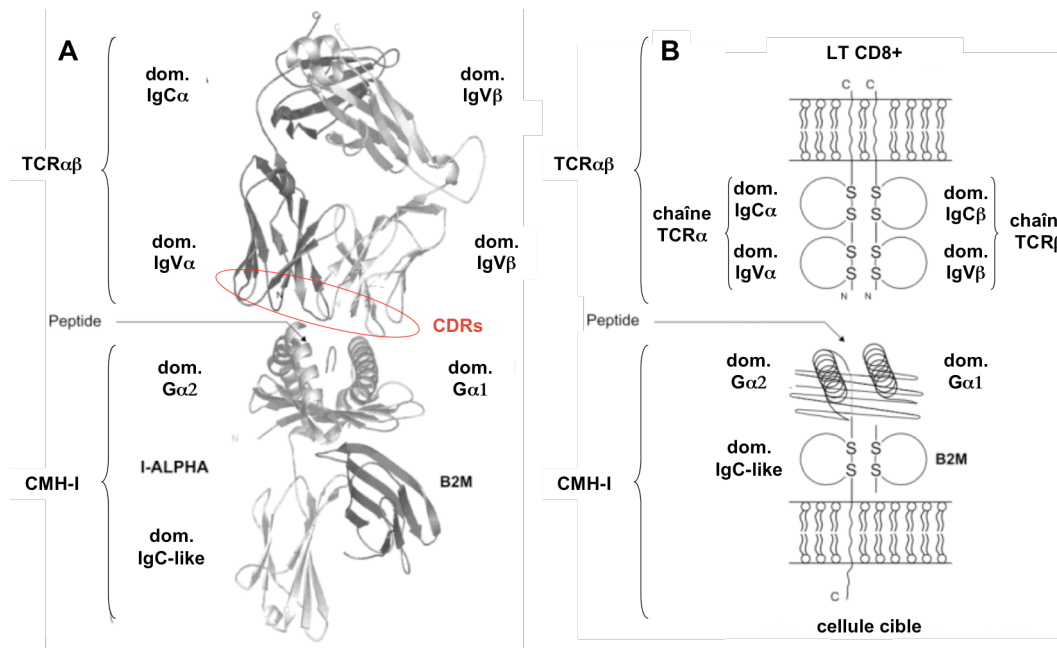


Figure 18 : Interaction entre un TCR et son complexe peptide-CMH complémentaire.

(A) Structure tridimensionnelle de l'interaction TCR/p-CMH-I. Les 6 boucles CDR du TCR (rouge) entrent en contact avec le complexe p-CMH-I. (B) Schémat de l'interaction TCR/p-CMH-I. Les domaines Ig du TCR et Ig-like du CMH-I sont indiqués. Adapté de Kaas and Lefranc, 2005.

c- La superfamille des Ig au coeur du système immunitaire adaptatif.

Par la suite, des domaines Ig similaires (Ig-like) ont été identifiés dans beaucoup d'autres protéines (Campbell et al., 1979), et dès la fin des années 80, il était établi que les domaines IgSF (*Immunoglobulin SuperFamily*) étaient largement présents dans de nombreuses fonctions biologiques (développement, différenciation, activation, adhésion, régulation, etc...) (Williams and Barclay, 1988) (Hunkapiller and Hood, 1989) (Bertrand et al., 2004) (Bernard et al., 2007) (Garapati and Lefranc, 2007). En particulier, l'utilisation de domaines IgSF est particulièrement répandue au sein du système immunitaire adaptatif, où les membres de la IgSF remplissent de nombreux rôles impliquant des interactions récepteur-ligand centrales dans la biologie des LT (TCR, CD3, CD4, CD8, CD80, CD86,...). Seuls le BCR et le TCR possèdent des « vrais » domaines IgV et IgC. Tous les autres membres de la IgSF sont caractérisés par des domaines Ig-like quelque peu différents. En particulier, le domaine IgV-like défini par similarité de structure avec le domaine IgV ne partage absolument pas l'hyper-variabilité de ce dernier, qui est un attribut exclusif des récepteurs de l'immunité adaptative.

2) Les molécules présentatrices de la superfamille du CMH

a- Cartographie du complexe majeur d'histocompatibilité

Depuis sa découverte chez la souris en 1936, le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est devenu l'une des régions les plus étudiées du génome des vertébrés (Gorer 1936) (Klein, 1986). Découvert à la surface de lymphocytes, le premier produit des gènes du CMH fut connu comme un « leucocyte antigen », qui a donné son nom au locus du CMH chez l'homme également appelé le complexe HLA (*Human Leucocyte Antigen*). Alors que les molécules du CMH ont initialement été étudiées pour leur capacité à conférer une tolérance (histocompatibilité) après des greffes de tissus, leur principale fonction est de participer à la réponse immunitaire contre les pathogènes.

Type de cluster	Nb total de loci	Nb de loci codant pour des protéines	Nb de pseudogènes / loci de transcrits non codants
Super clusters de gènes			
histones	66	55	11
HLA de classe I	26	9	17
ARNt	157	151	6
butyrophilines	8	8	0
Récepteurs olfactifs	34	14 (environ)	20
Protéines à doigts de Zinc	36	26	10
Clusters de gènes			
Transporteurs 17A	4	4	0
Récepteurs voméronasaux	5	0	5
TNF (tumour necrosis factor)	3	3	0
Ly6 (Lymphocyte antigen-6)	5	5	0
HSP (Heat shock protein)	3	3	0
HLA de classe II	24 (environ)	15	9

Table 6 : Clusters et supercluster de gènes du locus du CMH au sens large chez l'homme. (Horton et al., 2004).

Au fil des années, le séquençage progressif de portions du locus du CMH a récemment abouti à la cartographie d'une région de 7,6 Mb située sur le chromosome 6, appelée locus du CMH au sens large (Mungall et al., 2003). Les gènes y sont classés en 12 *clusters* et *superclusters*, selon des homologies de séquences/fonctions (**table 6**).

Parmi les gènes exprimés du CMH, 28% sont potentiellement associés à l'immunité. On y trouve des membres de la superfamille des Ig, des protéines participant au développement des LT, au déclenchement et à la régulation de la réponse immunitaire, et plus particulièrement des protéines spécialisées dans la présentation d'Ag (**table 7**). Pour revue, voir (Horton et al., 2004).

Catégorie	Gènes
prise en charge/présentation des Ag	HLA de classe I et II classiques ; PRSS16 ; PSMB8, PSMB9 ; TAP1, TAP2, TAPBP ; UBD
superfamille des immunoglobulines	AGER ; BTN1A1, BTN2A1, BTN2A2, BTN2A3, BTN3A1, BTN3A2, BTN3A3, BTNL2 ; C6orf25 ; MOG
inflammation	ABCF1 ; AIF1 ; DAXX ; IER3 ; LST1 ; LTA, LTB ; NCR3 ; TNF
maturation des leucocytes	DDAH2 ; LY6G5B, LY6G5C, LY6G6D, LY6G6E, LY6G6C
cascade du complément	BF ; C2, C4A, C4B
CMH de classe I non classique	HLA-E, HLA-F, HLAG ; HFE
régulation immunitaire	NFKBIL1, RXRB, FKBPL
réponse au stress	HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L ; MICA, MICB

Table 7 : Gènes du locus du CMH (au sens large) humain reliés au système immunitaire.

La plupart de ces gènes ont des fonctions établies dans l'immunité innée ou adaptative. Certains gènes ont été inclus à cause de leur homologie de séquences avec une famille de gènes fortement reliées à l'immunité (IgSF), mais leur fonction précise reste à être établi. (Horton et al., 2004)

b- Définition des domaines MhcSF de molécules de présentation du CMH.

Les molécules du CMH classique font partie de la IgSF définie précédemment (Intro ChapIII I 1). Elles sont caractérisées par des fonctions de molécules de présentation de peptides, centrales dans l'activation des LT $\alpha\beta$ conventionnels. Ces molécules forment deux classes, distinctes notamment par leur structure. Pour revue voir (Lefranc, 2005). (i) Les molécules de classe I-a, formées par l'association non-covalente entre une chaîne lourde transmembranaire (chaîne α) et la chaîne légère de la β 2 microglobuline, et (ii) les molécules de classe II-a, formés d'un hétérodimère de chaînes transmembranaires (une chaîne α et une β) (**figure 19**).

Ces deux types de structures apparentées portent des domaines particuliers appelés domaines G (*Groove domain*), caractéristique de la MhcSF (*MHC SuperFamily*). L'ensemble formé par les deux domaines G d'une molécule de CMH classique, forment un sillon dans lequel viennent s'insérer des peptides potentiellement antigéniques qui seront présentés aux LT $\alpha\beta$ (**figure 18 et 25**).

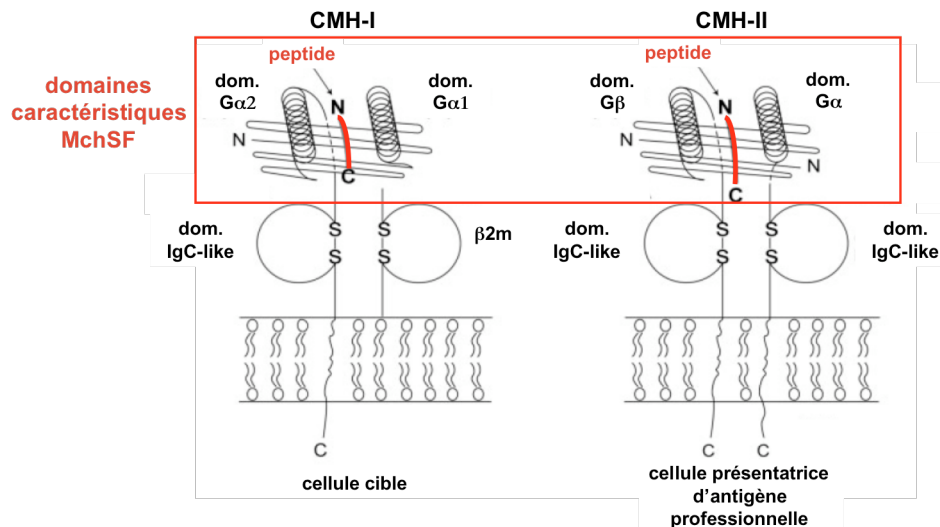


Figure 19 : Structure 3D schématique des molécules de CMH de classe I et II classiques.

Les domaines G caractéristiques de la MchSF sont encadrés. L'ensemble formé par deux domaines G constitue un plancher de feuillet β encadré de deux hélices α , formant une poche dans laquelle vient s'insérer un peptide potentiellement antigénique. Adapté de (Kaas et al., 2007).

c- Diversité et fonctions des molécules présentatrices du CMH

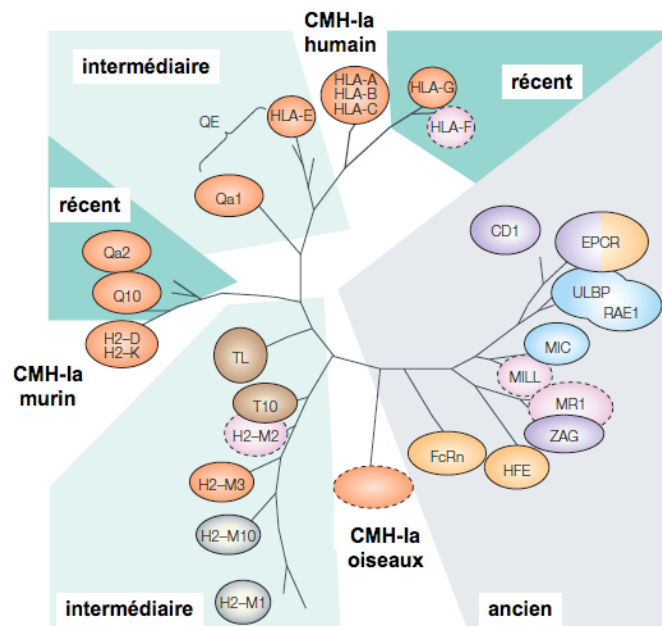


Figure 20 : Relations phylogénétiques et propriétés des molécules du CMH de classe I

Les molécules du CMH-Ia ont évolué séparément dans chaque taxon, et ne sont donc pas orthologues entre l'homme, la souris, et les oiseaux. Les gènes du CMH-Ib sont groupés en *anciens*, *intermédiaires* et *récents* selon leur degré de divergence. En *rouge* sont représentées les molécules liant (*trait continu*) ou susceptibles de lier (*trait pointillé*) des peptides, celles présentant des lipides sont en *violet*. Certaines molécules du CMH-Ib sont reconnues exclusivement par des NKR (*bleu*), ou pourraient également présenter des peptides (*rose pointillé*). Les protéines en *orange* et *gris* lient d'autres molécules. L'EPCR fixe la protéine C aussi bien que des lipides. En *marron*, TL et T10 semblent interagir directement avec le TCR sans nécessiter d'aucun ligand. MIC MHC-class-I-polypeptide-related sequence ; MR1, MHC class I related ; ULBP, UL16-binding protéin du CMV. (Rodgers and Cook, 2005)

Des domaines MhcSF plus ou moins proches structuellement de ceux du CMH-Ia ont par la suite été retrouvés dans un certain nombre de protéines, regroupées sous le terme de molécules du CMH non classiques, ou CMH-Ib. L'ensemble des protéines de CMH classique et non classique serait le fruit de divergences au cours d'un processus évolutif continu (**figure 20**). Les molécules du CMH-Ib sont parfois différenciées en « vraies » molécules du CMH-Ib et molécules du CMH-I-like, ces dernières étant codées par des gènes situés à l'extérieur du locus du CMH (Braud et al., 1999).

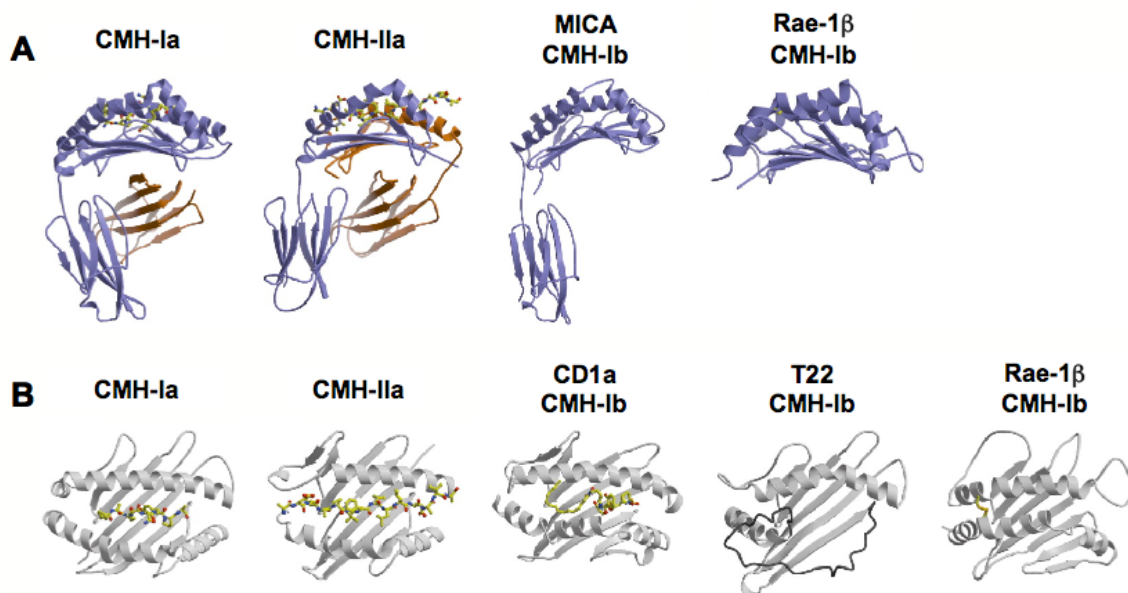


Figure 21 : Architecture de quelques molécules du CMH.

(A) Organisation globale des molécules du CMH. Les molécules du CMH-I sont constituées d'une chaîne lourde CMH (*bleu*) associée (CMH-Ia) ou non (MICA et Rae-1 β) à une chaîne légère β_2m (*orange*), reliée (CMH et MICA) ou non (Rae-1 β) à la membrane. Les molécules du CMH-IIa sont un dimère de chaînes CMH. (B) Organisation des domaines MhcSF qui constituent le site de liaison au ligand et/ou au récepteur des molécules de CMH en représentation tige-ruban. Le ligand éventuel est représenté en batons. (Rudolph et al., 2006)

Les molécules du CMH-Ib peuvent avoir des structures très différentes de celles des molécules classiques du CMH (**figure 21A**). En particulier, à la différence des molécules du CMH-Ia, elles ne sont pas toujours associées à la β_2 -microglobuline et ne sont pas systématiquement liées à la membrane. Par ailleurs, toutes les molécules du CMH-I ne sont pas capables d'interagir avec des ligands. En effet, la structure de la poche formée par les deux domaines MhcSF de chaque molécule du CMH va déterminer sa capacité (ou non) à présenter des molécules, ainsi que le type de ligand présenté (**figure 20 et 27B**).

Globalement, les molécules du CMH classiques sont extrêmement polymorphiques, largement exprimées, et leurs motifs d'ancrage sont peu spécifiques, ce qui confère à l'ensemble des molécules de CMH exprimées par un individu la capacité à lier une très grande variabilité de peptides. A l'inverse, les molécules du CMH-Ib sont beaucoup moins polymorphiques, et leur expression est généralement restreinte à certains tissus (Shawar et al., 1994). L'ensemble des molécules de CMH-I classique et non classiques peuvent interagir avec des ligands de toutes natures, de toutes origines, et des récepteurs très diversifiés impliquant des effecteurs de l'immunité innée, adaptative, et transitionnelle (**table 8**). Alors que les LT $\alpha\beta$ conventionnels interagissent exclusivement avec des Ag peptidiques chargés sur des molécules de CMH classiques, les LT non conventionnels ($\alpha\beta$ comme $\gamma\delta$) sont capables d'interagir spécifiquement avec des Ag beaucoup plus divers, « présentés » par des molécules de CMH classiques et non classiques.

humain	murin	ligands	récepteurs adaptatifs (diversité)	récepteurs innées (diversité)
CMH de classe Ia				
HLA-A,B,C	H2-K,D,L	peptides	TCR $\alpha\beta$ (++++) et TCR $\gamma\delta$ (+)	NKR (++++)
CMH de classe Ib récent				
HLA-F	-	Peptides ?	ND	NKR (++++)
HLA-G	-	peptides	TCR $\alpha\beta$	NKR (+) et peptides Qdm
-	Q10	peptides	TCR $\alpha\beta$	NKR (+)
-	Qa2	peptides	TCR $\alpha\beta$	NKR (-)
-	B1	peptides	ND	peptides Qdm
CMH de classe Ib intermédiaire				
HLA-E	Qa1	peptides	TCR $\alpha\beta$	NKR (-)
-	H2-M3	N-formyl peptides	TCR $\alpha\beta$	ND
-	T10/T22 et TL	aucun	TCR $\gamma\delta$ (++)	ND
-	H2-M2	aucun ?	ND	ND
-	H2-M1 et H2-M10	aromatiques	ND	ND
CMH de classe Ib ancien				
MIC	MILL	aucun	TCR $\gamma\delta$ (+)	NKR (-)/ND
HFE	HFE	Transferin	aucun	ND
CD1	CD1	lipides et peptides	TCR $\alpha\beta$ (++) et TCR $\gamma\delta$ (++)	NKR (?)
EPCR	EPCR	lipides et protéine C	TCR $\gamma\delta$ (-)	ND
MR1	MR1	peptides ?	TCR $\alpha\beta$ (+)	ND
ULBP	Rae1 et H60	aucun	TCR $\gamma\delta$ (-)	NKR (-)
FcRn	FcRn	IgG	ND	ND
ZAG	ZAG	acides gras	ND	ND

Table 8 : Spécificité de ligands et de récepteurs des principaux groupes de molécules de CMH de classe I.

ND non déterminé. Adapté de (Rodgers and Cook, 2005).

Les processus de présentations antigéniques sont extrêmement complexes, et la plupart restent encore mal compris. Alors que les molécules de la superfamille du CMH ont été rapidement identifiées comme des protéines présentatrices grâce à leur domaine caractéristique MhcSF et examinées comme telles, il est plus que probable que d'autres molécules moins étudiées puissent jouer de telles fonctions.

3) Les Familles B7 et BTN de molécules de costimulation T

a- Les molécules de la famille B7 et B7-like

Les molécules de la famille B7 sont inclus dans la IgSF par leurs deux domaines extracellulaires Ig-like (Intro ChapIII I) (Williams and Barclay, 1988). Les protéines B7.1 et B7.2 (CD80 et CD86 respectivement), éponymes de la famille B7, ont historiquement été décrits pour leur rôle nécessaire dans le priming des LT naïfs, par interaction avec le récepteur de signalisation positive CD28 exprimé par les LT (Azuma et al., 1993; Koulova et al., 1991). Par ailleurs, ces mêmes molécules sont capables de se lier au récepteur CTLA-4 à la surface des LT, conduisant à un signal négatif ou inhibiteur (Linsley et al., 1991; Linsley et al., 1994).

D'autres membres de la IgSF reliés phylogénétiquement à la famille B7 ont ensuite été caractérisés par homologies de séquences et identifiés comme « B7-*homologs* » (B7-H). Ces protéines sont caractérisées par une séquence très conservée en acides aminés situé dans le domaine IgV-like, qui définit leur appartenance à la famille B7 (Bojorath, et al. 1994). D'autres molécules partageant cette séquence de 40 acides aminés ont été identifiées dans le locus du CMH, et regroupées sous l'appellation B7-like. Il s'agit de la protéine MOG (*Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*), de l'Ag de poulet B-G, et de la famille des BTN composée de sept membres (Intro ChapIII I 3b).

Cette grande famille de ligands et leurs récepteurs comprend des molécules de costimulation positive et négative, et des protéines de fonctions inconnues ou peu claires (ex : famille BTN). Par liaison à leurs récepteurs et/ou ligands, ces protéines sont capables de moduler finement l'activation dépendante du TCR en co-stimulant ou co-inhibant différentes fonctions effectrices, la différenciation, la prolifération et même la survie des LT. Leur expression est souvent régulée de manière très

complexe, au niveau dynamique et temporel. Pour revue, voir Greenwald et al., 2005.

b- Les molécules de la famille BTN et BTN-like

Le membre fondateur de la famille des butyrophilines, BTN, a été initialement isolé à partir de lait de vache et décrit pour son rôle spécifique dans le contrôle de la lactation des mammifères (Jack and Mather, 1990). Par la suite, l'orthologue de ce gène, BTN1A1 (Taylor et al., 1996) a été identifié dans le locus du CMH chez l'homme, ainsi que 6 gènes homologues partageant dans l'ensemble 40% d'identité de séquence en acides aminés, et formant la famille des BTN (Rhodes et al., 2001; Ruddy et al., 1997; Tazi-Ahnini et al., 1997) (**figure 22**) (Intro ChapIII I 2a).

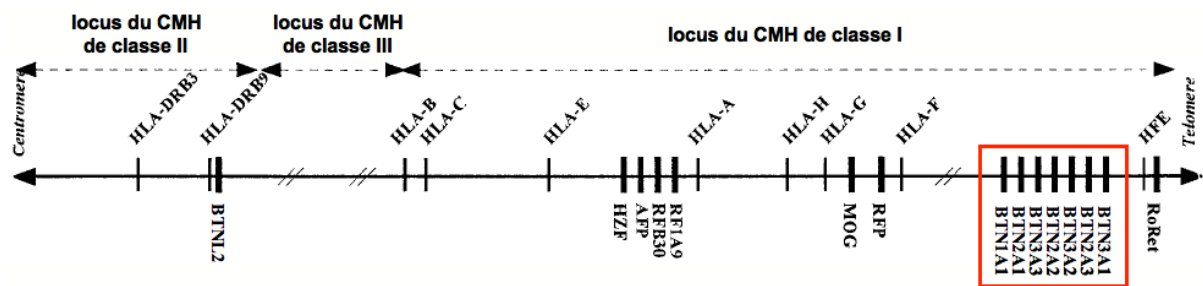


Figure 22 : Localisation des gènes la famille BTN dans le locus du CMH-I chez l'homme.

Cartographie de la région 6p21-6p23 du locus du CMH humain. La position des gènes de la famille restreinte BTN est indiquée en rouge. Les gènes dont les positions sont indiquées par des traits fins sont les gènes du CMH classique et non classique. Les gènes indiqués par des traits gras partagent certains domaines avec les BTN, notamment le domaine B30.2. Adapté de (Henry et al., 1998).

La famille BTN regroupe des molécules présentant une homologie structurale avec les membres de la famille B7 (**figure 23**) mais a significativement divergé entre les espèces par duplications successives. En effet, chez la souris, on ne trouve que deux membres de la famille BTN: BTN1A1, et BTN2A1. Chez l'homme, on trouve trois sous-familles de butyrophilines : (i) la sous-famille BTN1 comprend un seul membre, BTN1A1, orthologue du membre fondateur de la famille (BTN), ainsi que du gène BTN1A1 murin. (ii) la sous-famille BTN2 comprend trois copies d'un même gène, BTN2A1, BTN2A2, et BTN2A3 partageant 88% d'identité de séquence en

acides aminés, BTN2A1 étant l'orthologue du gène du même nom chez la souris. (iii) la sous-famille BTN3 comprend également 3 gènes : BTN3A1, BTN3A2 et BTN3A3 partageant 95% d'identité de séquence en acides aminés. Cette sous-famille est présente spécifiquement chez les primates humains et non humains.

D'autres gènes, tels que les gènes Skint chez la souris (Intro ChapIII III) ou les gènes BTNL, ont été identifiés par homologie de séquences avec la famille BTN et font partie de la famille BTN-like (**figure 23**). Actuellement, les produits de la famille BTNL sont relativement bien étudiés comparés à ceux de la famille BTN, et semblent partager les fonctions de molécules costimulatrices de la réponse T des molécules B7. Les membres de la famille BTN semblent jouer des rôles multifonctionnels dans divers processus physiopathologiques incluant la lactation (Mather and Keenan, 1998; Ogg et al., 2004), la sélection et la régulation des cellules T (Arnett et al., 2007; Boyden et al., 2008; Nguyen et al., 2006; Valentonyte et al., 2005), et la modulation de maladies auto-immunes (Guggenmos et al., 2004; Stefferl et al., 2000). Et de fortes similarités de structures et/ou fonctions entre les familles Ig, CMH, B7, BTN, et BTN-like, nous donnent matière à spéculation sur les mécanismes pouvant impliquer les membres les plus méconnus de ces familles, et en particulier les protéines de la sous-famille BTN3 qui font l'objet d'une majeure partie de ce travail de thèse (Intro ChapV II).

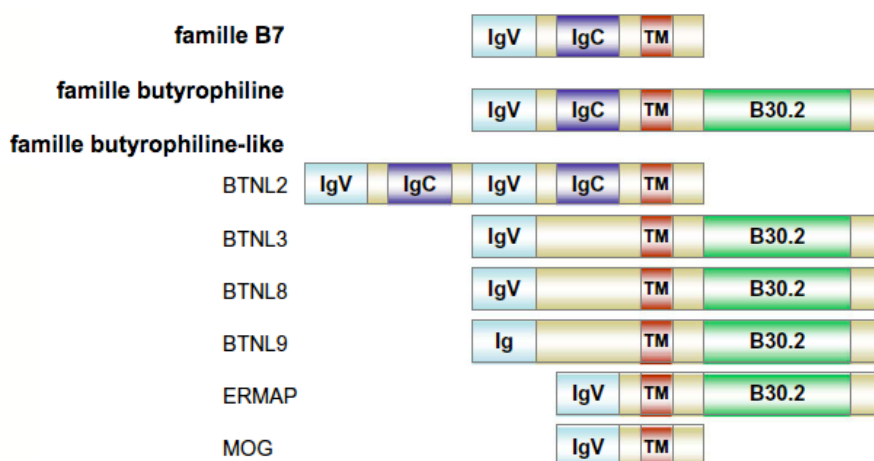


Figure 23 : Organisation des domaines conservés entre les membres des familles B7, BTN, BTNL humaines.

L'organisation des domaines de chaque famille a été simplifiée pour donner une vue globale comparative des différentes familles. Elle ne prend pas en compte certaines exceptions. Par exemple, certains membres de la famille BTN sont dépourvus de domaine B30.2. TM : domaine transmembranaire, B30.2 : domaine intracellulaire B30.2. Adapté de (Arnett et al., 2009).

II. La famille BTN3 chez l'homme

1) Généralités sur les BTN3

a- Expression globale des protéines BTN3

Chez l'homme, les transcrits de la plupart des gènes BTN et BTN-like sont largement exprimés dans divers tissus, notamment dans les cellules hématopoïétiques *ex vivo* (Arnett et al., 2009; Compte et al., 2004). En particulier, les protéines BTN3 ont été montrées comme ubiquitaires au sein de PBMCs *ex vivo* (Compte et al., 2004; Yamashiro et al., 2010), et ont été détectées à la surface de tous les types cellulaires analysés jusqu'à présent, incluant des cellules tumorales ou présentatrices fraîchement isolées (Cubillos-Ruiz et al., 2010), ainsi que diverses lignées tumorales, transformées ou activées *in vitro* (Compte et al., 2004). Ces résultats suggèrent donc une expression membranaire ubiquitaire des protéines de la famille BTN3 chez l'homme. Par ailleurs, l'expression de ces protéines pourrait être régulée dans divers contextes physio-pathologiques. Elle serait notamment augmentée sous l'effet de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IFN- γ , TNF- α , CCL3), anti-inflammatoires (IL-10), de liquides d'ascites de tumeurs ovariennes, ou encore de médiateurs associés à l'hypoxie (VEGF, PLGF-1) (Compte et al., 2004; Cubillos-Ruiz et al., 2010). En outre, une diminution globale de l'expression protéique des BTN3 a été observée sur certaines populations lymphocytaires après stimulation (LT $\alpha\beta$, LT $\gamma\delta$, LB) (Yamashiro et al., 2010).

Malheureusement, ces données d'expression protéiques prennent en compte l'ensemble de la famille BTN3, également référée comme CD277. En effet, les domaines extracellulaires des trois membres de ce groupe sont extrêmement proches les uns des autres et les Acm générés à ce jour contre les protéines BTN3, dirigés contre le domaine IgV-like, ne permettent pas de les différencier.

b- Diversité des protéines BTN3

Structure générale des BTN3

La famille BTN3, seulement présente dans le génome de certains primates dont l'homme, est composée de 3 gènes (BTN3A1, BTN3A2, BTN3A3) identiques entre eux à 95% (**figure 24**). Les gènes BTN3A1 et BTN3A3 possèdent une construction exonique commune au reste de la famille BTN (**figure 23**), tandis que le gène BTN3A2 est dépourvu de l'exon final codant pour le domaine intracellulaire B30.2. La diversité de séquence entre les trois gènes BTN3 est particulièrement concentrée au niveau des domaines transmembranaires et intracellulaires, tandis que le domaine IgV-like est conservé à l'extrême.

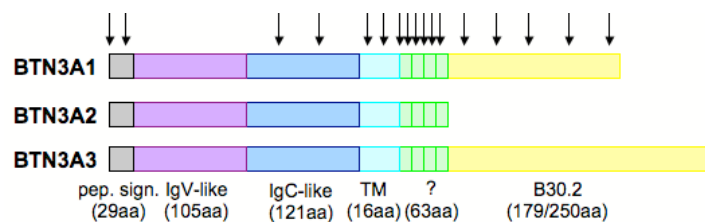


Figure 24 : Structure comparative des trois membres de la famille BTN3.

Les différents exons ainsi que les domaines protéiques correspondant et leur taille en acide aminés sont indiqués. Le niveau de polymorphisme entre les 3 gènes est schématisé par la densité des flèches dans chaque domaine. Ce polymorphisme est quasi-exclusivement concentré au niveau des domaines intracellulaires en C-term (*vert et jaune*).

Epissage alternatif

L'analyse fine des transcrits des BTN3 a mis en évidence un épissage alternatif soutenu de ces différents gènes (Rhodes et al., 2001). Les gènes BTN3 peuvent être découpés en huit (BTN3A2) ou neuf (BTN3A1 et BTN3A3) exons, correspondants aux différents domaines structuraux des protéines, comme c'est souvent le cas des protéines IgSF (**figure 28**). De nombreux produits d'épissage alternatifs différents ont pu être détectés dans plusieurs type cellulaires. En particulier, le domaine B30.2 des BTN3A1 a été décrit comme étant majoritairement épissé, comparé à celui des BTN2. Les courts exons situés entre le domaine

transmembranaire et le domaine B30.2 peuvent également être épissés, et sont retrouvés en nombres variables dans les transcripts (Rhodes et al., 2001).

Modifications post-traductionnelles

La structure des protéines BTN semble également dépendre d'un certain nombre de modifications post-traductionnelles (clivages protéolytiques, glycosylations) pouvant varier selon les contextes physiopathologiques (Malcherek et al., 2007; Yamashiro et al., 2010). A l'échelle cellulaire, les modifications de glycosylation peuvent avoir un fort impact sur le comportement des cellules et l'interaction avec différentes molécules. En effet, les carbohydrates peuvent restreindre la dynamique de mouvement des protéines membranaires, modifier l'accessibilité à de sites d'interactions, ou encore participer à l'acquisition de la structure tridimensionnelle des protéines lors de leur maturation... Pour revue, voir (Rudd et al., 1999).

Globalement, il est très difficile de prévoir quels isoformes protéiques de BTN3 sont réellement présents dans les cellules et en quelles proportions, mais il est plus que probable que le niveau d'expression des différents gènes, leur épissage alternatif et les modifications post-traductionnelles des protéines BTN3 sont finement régulés en fonction des types cellulaires (Messal et al., 2011) et du contexte physiopathologique (Compte et al., 2004; Cubillos-Ruiz et al., 2010). En particulier, la balance entre les produits pourvus ou non du domaine B30.2, ainsi que la présence de certaines glycosylations pourraient moduler significativement la/les fonctions de ces protéines.

2) Rôles potentiels des domaines extracellulaires des BTN3

a- Domaines extracellulaires des protéines BTN3

Les protéines BTN3 et plus généralement les protéines des familles CMH, B7, BTN et BTNL portent les domaines extracellulaires IgV-like et IgC-like caractéristiques de la IgSF du côté N-terminal (Intro ChapIII 1). Les domaines IgSF

ne possèdent pas d'activité enzymatique, mais ont une propension particulière à interagir avec de nombreuses protéines. Généralement, c'est le domaine IgSF situé en N-term (très souvent IgV-like) qui porte la spécificité de la protéine (ex : CD80), mais il arrive que les 2 domaines soient impliquée (ex : CD8), ou encore le domaine N-term des deux chaînes d'un dimère de protéines IgSF (ex : TCR).

Le domaine IgC-like des BTN3 est de type 1, et correspond aux domaines retrouvés dans les molécules du CMH de classe I et II, la b2-microglobuline, les Ig et le TCR, et plus globalement, les gènes prototypes de la réponse immunitaire adaptative (Williams and Barclay, 1988), tandis que les domaines IgC2-like sont plutôt trouvés dans les récepteurs de cytokines ou les molécules d'adhésion.

Le domaine IgV-like des BTN3 est le domaine le plus conservé. Un seul acide aminé diffère en position 66 entre BTN3A3 (Arg) et les 2 autres protéines (Lys). Un second nucléotide diffère entre BTN3A2 et les deux autres BTN, mais cette mutation est silencieuse. Cette extrême conservation suggère un rôle particulièrement important du domaine IgV dans la fonction de cette famille de protéines. Par ailleurs, chez les molécules de la IgSF, le domaine IgV est très souvent responsable des interactions protéiques récepteurs/ligands nécessaires à la fonction de ces protéines. En particulier, les domaines IgV interagissent généralement avec d'autres domaines IgV en trans et/ou en cis et permettent la formation d'homo/hétérodimères.

b- Domaines IgSF et interaction en trans

Il existe une grande proximité d'interaction entre les membres de la famille B7 et leurs ligands/récepteurs, suggérant que le contre-récepteur les protéines BTN3 pourrait être une de ces molécules. Pour le moment, l'ensemble des candidats envisagés comme ligands de BTN3 ont été éliminés. Ces protéines incluaient une grande partie des ligands connus des protéines B7 (CD28, CTLA-4, PD-1, ICOS et BTLA) (Compte et al., 2004) ainsi que la lectine DC-SIGN capable d'interagir avec BTN2A1 (Malcherek et al., 2007). L'expression du ligand de BTN3, et plus particulièrement de son domaine IgV-like, détecté par marquage à l'aide de protéines BTN3 recombinantes IgV-IgC-Fc ou IgV-Fc, a seulement été notifiée sur quelques

lignées tumorales telles que la lignée leucémique C91, le lymphome de Burkitt Daudi, ainsi que des cellules endothéliales (Compte et al., 2004). Par ailleurs, l'interaction entre BTN3 et son ligand pourraient dépendre du statut de glycosylation des BTN3 ou de leur(s) ligand(s), variable selon les contextes physiopathologiques (Malcherek et al., 2007; Yamashiro et al., 2010).

c- Domaines IgSF et interaction en cis

De nombreuses interactions protéiques en cis impliquant des membres de la IgSF ont été décrites. Elles ont généralement lieu entre plusieurs protéines IgSF formant des homo- ou hétérodimères (interactions entre chaînes TCR α et β), principalement par le biais de leur domaine IgV (**figure 25**), mais peuvent également avoir lieu entre des membres de la IgSF et d'autres protéines (ex : association entre CD3z et le reste du complexe CD3/TCR). Ce type d'interaction peut jouer un rôle crucial pour la fonction des protéines IgSF en étant par exemple nécessaire à la stabilisation d'interactions en trans, à la reconnaissance de contre-récepteurs ou à la signalisation.

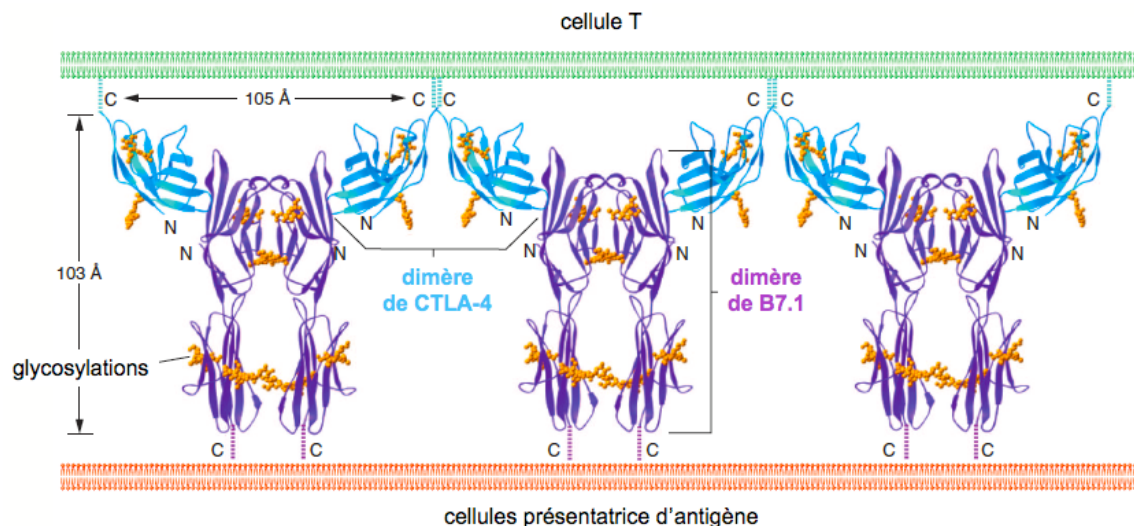


Figure 25: Modèle de stabilisation d'interaction cellule-cellule par formation d'un treillage impliquant des interactions multiples entre domaines IgSF.

La cocristallisation de B7.1 avec CTLA-4 (Stamper et al., 2001) a révélé que des homodimères de B7.1 pouvaient interagir avec des homodimères de CTLA-4, permettant la formation d'un treillage de B7-CTLA-4, augmentant considérablement la stabilité des interactions entre CTLA-4 et B7.1 à l'interface entre un LT et une CPA. C, extrémité carboxyl-terminale; N, extrémité amino-terminale. Adapté de (Collins et al., 2005).

3) Rôles potentiels du domaine intracellulaire des *BTN3*

a- Structure du domaine B30.2

Le domaine B30.2, également appelé domaine PRY/SPRY (car constitué de l'assemblage entre un domaine PRY et un domaine SPRY en C-terminal), est considéré comme homologue au domaine SPRY dont il serait issu (**figure 26**). Les domaines SPRY et B30.2 sont retrouvés dans onze familles de protéines chez l'homme, en combinaison avec divers autres domaines protéiques. C'est le seul type de domaine retrouvé à la fois dans des protéines transmembranaires, intracellulaires et sécrétées.

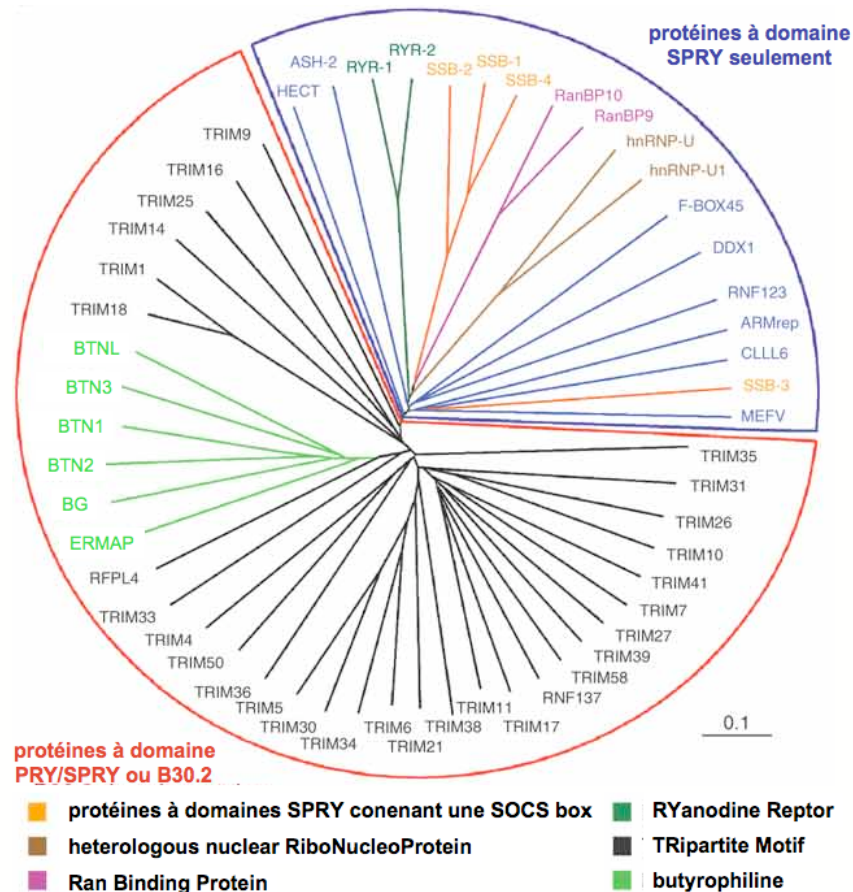


Figure 26 : Liens phylogénétiques entre les domaines SPRY et B30.2

Les protéines à domaines SPRY au sens large se divisent en 2 classes : les protéines à domaine SPRY seulement, et celles à domaine SPRY/PRY, également nommé B30.2. Le domaine SPRY serait un domaine ancestral duquel serait issu le domaine SPRY/PRY apparu seulement au début du règne des vertébrés. Adapté de (Masters et al., 2006).

Le domaine B30.2 est exclusivement présent dans le génome des vertébrés, et semble être apparu récemment au cours de l'évolution, consécutivement aux médiateurs de l'immunité adaptative. Chez l'homme, ce domaine est seulement présent chez deux grandes familles de protéines : la famille TRIM (Tripartite Motif) et la famille BTN (**figure 26**), toujours en position C-terminale des protéines. En particulier, plusieurs copies de ce domaine sont retrouvées dans différents gènes codés dans le locus du CMH chez l'homme (**figure 22**), et la conservation inter-espèce de ce domaine suggère une certaine pression de sélection positive au cours de l'évolution (Song et al., 2005). Ce type d'évolution expansif et rapide est semblable aux processus évolutifs adaptatifs subit par les récepteurs de l'immunité. Pour revue, voir (Rhodes et al., 2005).

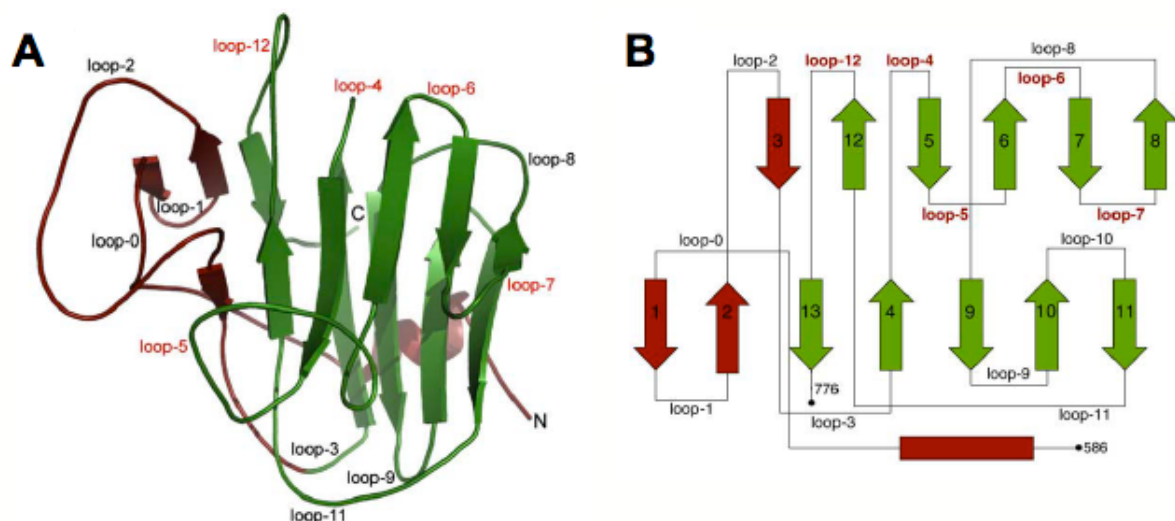


Figure 27 : Structure générale des domaines B30.2.

(A) Structure tridimensionnelle en représentation rubans et (B) représentation topologique du domaine B30.2 de TRIM20. Le domaine B30.2 a une structure en sandwich de feuillet β enroulé, formé d'un feuillet β anti-parallèle convexe à 7 brins, et un feuillet β antiparallèle concave et tordu à 6 brins. Ce sandwich forme un noyau central hydrophobe, plat et allongé. Le domaine forme une structure compacte où les sous-domaines PRY (rouge) et SPRY (vert) sont indissociables l'un de l'autre. La longueur des boucles est variable d'un domaine B30.2 à un autre, et les boucles indiquées en lettres rouges sont très probablement impliquées dans des interactions avec d'autres molécules. N : extrémité amino-terminale, C : carboxy-terminale (Weinert et al., 2009).

Récemment, cinq domaines SPRY et B30.2 ont été cristallisés. Les trois domaines B30.2 des protéines TRIM21 (James et al., 2007), TRIM20 (aussi connue comme la pyrine) (Weinert et al., 2009), et sRFPL1 (Grutter et al., 2006), ainsi que les deux domaines SPRY des protéines SSB-2 (Masters et al., 2006), et

GUSTAVUS, une protéine SSB exprimée par la drosophile (Woo et al., 2006a; Woo et al., 2006b), ont permis de poser des bases communes à l'ensemble des domaines B30.2.

Le domaine B30.2, constitué d'un assemblage de domaines PRY et SPRY, a une structure grossièrement similaire à celle des domaines IgSF (**figure 27**). La longueur et la constitution des boucles reliant les brins des feuillet β est extrêmement variable d'une protéine à une autre à la manière des CDRs des domaines IgV des récepteurs de l'immunité adaptative. Cette variabilité pourrait déterminer les interactions moléculaires impliquant les divers domaines B30.2.

b- Domaine B30.2 et multimérisation

La plupart des protéines portant un domaine B30.2 ont été notifiées comme formant naturellement des homodimères : (Grutter et al., 2006; Jeong et al., 2009; Short et al., 2002; Weinert et al., 2009) ou encore des trimères (Javanbakht et al., 2006), hexamères et même des multimères de niveaux supérieurs (Kar et al., 2011; Nepveu-Traversy et al., 2009) par le biais de leur domaine intracellulaire. En outre, ces phénomènes de multimérisations semblent être importants pour la fonction de ces protéines.

Le domaine B30.2 a été décrit comme étant nécessaire à la plupart de ces phénomènes de multimérisations, sans pour autant être suffisant. Par ailleurs, une étude récente a révélé le potentiel de dimérisation de certains domaines B30.2. L'obtention de la structure tridimensionnelle du domaine B30.2 de sRFLP1 a permis d'observer la formation de dimères au sein des cristaux (**figure 28**) (Grutter et al., 2006). En effet, le boucle carboxy-terminal d'un des domaines B30.2 (donneur), entre en interaction avec un autre domaine B30.2 (accepteur), formant une courte hélice avant de quitter le site d'accrochage.

Ce site de fixation est localisé dans la cavité formée du feuillet anti-parallèle b concave, encadré des boucles flexibles 2, 5, 6, 7 et 12 (**figure 28**). L'interaction implique principalement des ponts hydrogènes entre chaînes principales, ainsi que des interactions hydrophobes entre chaînes latérales au fond de la poche.

L'interaction affecte la structure entière des deux domaines. La plupart des modifications sont situées près du site de fixation, mais certaines différences sont situées à distance. En particulier, le site de fixation du domaine donneur ne peut devenir accepteur pour un autre domaine, et la boucle carboxy-terminale du domaine accepteur est réarrangée de telle manière qu'elle ne peut se lier à un autre domaine donneur. Ce type de dimère est également détecté en solution (Grutter et al., 2006).

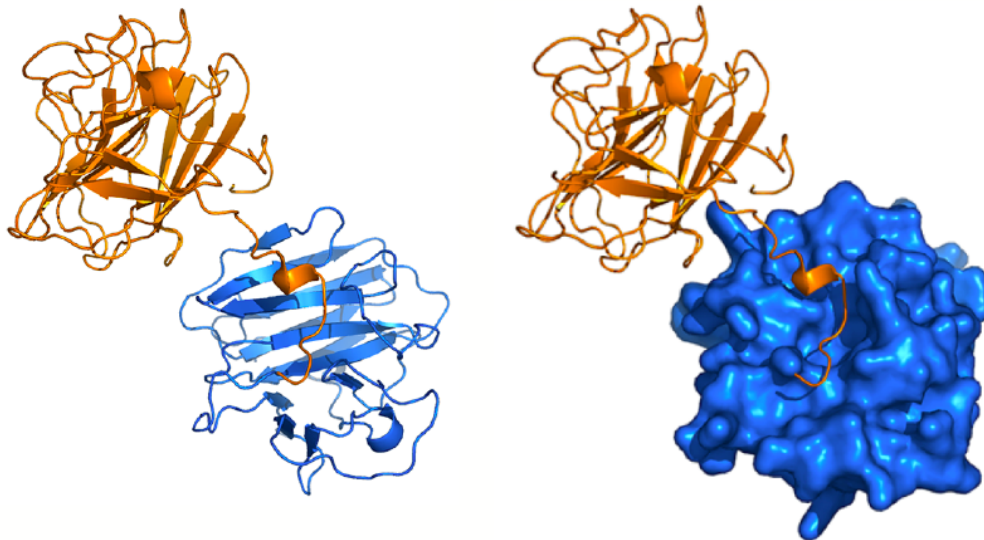


Figure 28 : Structure tridimensionnelle d'un dimère de domaines B30.2.

Le domaine B30.2 donneur est en *orange*, et l'accepteur en *bleu*. La structure en feuillet β concave du domaine accepteur encadré de boucles flexibles (*gauche*), forme une cavité (*droite*) dans laquelle peut s'insérer l'extrémité carboxy-terminale du domaine donneur. (Grutter et al., 2006)

c- Domaine B30.2 et interactions multiples

Les structures tridimensionnelles de domaines B30.2/SPRY récemment obtenues, ainsi que des structures de domaines SPRY ou B30.2 en interaction avec leurs ligands (co-cristallisation des GUSTAVUS+peptide VASA, TRIM5a+fragment Fc des Ig), et l'analyse des mutations du domaine B30.2 affectant les fonctionnalités de différentes protéines (mutations de TRIM20/pyrine responsables du syndrome des fièvres Méditerranéennes ; mutations de TRIM18/MID1 responsables du syndrome Opitz ; mutations de TRIM5a responsables de la restriction virale), ont permis de définir quelques caractéristiques des interactions entre les domaines B30.2 (et SPRY) et leurs ligands (Grutter et al., 2006; James et al., 2007; Masters et al., 2006; Weinert et al., 2009; Woo et al., 2006a; Woo et al., 2006b).

L'ensemble de ces études a révélé que tous ces domaines B30.2 ou SPRY possèdent au moins deux zones disjointes pouvant accueillir différents ligands. La localisation de ces zones est particulièrement conservée entre tous les domaines B30.2 cristallisés. Une première zone serait située dans la cavité formée par les feuillets b concaves, et est responsable de la dimérisation des domaines B30.2 de sRFLP1, tandis que la seconde zone serait sur l'autre face du domaine, au niveau du feuillet convexe. Ces sites de fixation impliqueraient notamment de longues boucles flexibles joignant les brins b entre eux à la manière des boucles CDRs des domaines Ig (**figure 28**). Ces boucles sont particulièrement variables d'une protéine à une autre et détermineraient la spécificité des partenaires moléculaires intracellulaires des protéines à domaines B30.2. Ainsi, il est très difficile de prévoir la nature des interactants des domaines B30.2, qui, d'après la structure et la variabilité des zones d'ancrage, diffèrent totalement d'un domaine B30.2 à un autre, et pourraient inclure des ligands variés tels que de très petites molécules, des carbohydrates, des peptides, des protéines entières...

Les interactants directs de domaines B30.2 identifiés chez quelques protéines (**table 9**), témoignent de la variabilité des modalités d'interaction des domaines B30.2 avec leurs ligands intracellulaires. Actuellement, aucun candidat n'a pu être mis en évidence pour la famille BTN3. En particulier, la xanthine oxydase, capable d'interagir avec le domaine B30.2 de BTN1A1 ne se fixe pas sur les domaines intracellulaires BTN2A1 ou BTN3A1 (Jeong et al., 2009). Un nombre grandissant d'études suggèrent que le domaine B30.2 serait un module de fixation de multiples protéines, et pourrait notamment jouer un rôle de protéine chaperonne, nécessaire à l'interaction d'autres protéines entre elles (Jeong et al., 2009).

Par ailleurs, une étude récente montre que le domaine B30.2 de BTN3A3 est phosphorylé sous l'effet d'un cross-link par Ac, suggérant pour cette famille de protéines une fonction de récepteur doué de propriétés signalisatrices (Yamashiro et al., 2010). Ainsi, la présence ou non du domaine B30.2 pourrait moduler de manière centrale la fonction de ces protéines, qui pourraient jouer des rôles de protéines chaperonnes ou encore récepteurs ou récepteurs leurres en fonction de l'expression des différents gènes BTN3 et de leur épissage alternatif.

protéine à dom B30.2	Interactant (fonction)	Directe ?	ref
BTN3	Voies de signalisation TCR	?	(Yamashiro et al., 2010), (Cubillos-Ruiz et al., 2010), (Messal et al., 2011)
BTN2	Voies de signalisation TCR	?	(Smith et al., 2010b)
BTN1A1	Voies de signalisation TCR	?	(Smith et al., 2010b)
BTN1A1	xanthine oxydase (lipides)	directe	(Ishii et al., 1995), (Jeong et al., 2009)
BTN1A1	Lipides (sécrétion des lipides)	?	(Banghart et al., 1998), (Mather and Keenan, 1998)
TRIM7/GNIP	Glycogénine (synthèse du glycogène)	directe	(Zhai et al., 2004)
TRIM11	peptide Humanin	directe	(Niikura et al., 2003)
TRIM21	Fragment Fc des IgG (régulation de la sécrétion des Ig ?)	directe	(Rhodes and Trowsdale, 2007)
TRIM5a	Capside rétrovirales (immunité innée anti-virale)	directe	(Stremlau et al., 2006)
TRIM18/MID1	Microtubules (syndrome Opitz G/BBB lié à l'X)	?	(Schweiger, et al. 1999)
TRIM20/Pyrene	Casse 1 (inflammation)	directe	(Chae et al., 2006)

Table 9 : Interactants directs/indirects connus des domaine B30.2 de quelques protéines.

4) Fonction des *BTN3* chez l'homme

Ainsi, la structure des molécules BTN3, un domaine extracellulaire homologue à celui des protéines de la famille B7 et un domaine intracellulaire homologue à celui des protéines TRIM, suggère de multiples fonctions telles que celles de récepteur et/ou ligand ou encore un rôle de protéine chaperonne intracellulaire.

Les interactants extracellulaires de ces protéines n'ont pas encore été identifiés, mais les homologies existant avec les autres membres de la IgSF et notamment ceux de la famille B7, suggèrent des interactions homo/hétérotypiques en cis/trans impliquant le domaine IgV extrêmement conservé entre les 3 protéines BTN3. Le domaine B30.2 pourrait également être impliqué dans des phénomènes de dimérisation nécessaires à la fonction de BTN3. Par ailleurs, ce domaine éventuellement doué de propriétés signalisatrices, pourrait interagir avec divers constituants intracellulaires tels que des enzymes, des lipides, des constituants du cytosquelette et pourrait jouer un rôle de protéine chaperonne nécessaire à l'interaction entre différentes molécules. Les domaines B30.2 de BTN3A1 et BTN3A3, sensiblement différents, ne portent pas nécessairement la même spécificité d'interaction, mais pour le moment, aucun interactant direct n'a pu être identifié pour l'un ou l'autre de ces domaines. A l'image d'autres membre de la famille B7 et BTNL, BTN3 pourrait être impliqué dans des mécanismes de signalisation

bidirectionnelle, où la présence ou non de son domaine B30.2 pourrait déterminer de manière cruciale sa fonction de ligand/récepteur/leurre.

Le rôle des protéines BTN3 est très probablement relié à la réponse adaptative chez l'homme, et leur fonction de ligand/récepteur/leurre/chaperonne serait régulée à la fois par une expression différentielle des gènes BTN3 (Messal et al., 2011; Yamashiro et al., 2010), un épissage alternatif (Rhodes et al., 2001), et des modifications post traductionnelles (Yamashiro et al., 2010) dépendant probablement du type cellulaire (Messal et al., 2011) et du contexte physiopathologique (Compte et al., 2004; Cubillos-Ruiz et al., 2010).

Très récemment, la sous-famille BTN3, méconnue jusqu'à présent, a été étudiée à la lueur d'autres travaux portant sur les rôles communs aux sous-familles BTN1 et BTN2 (Smith et al., 2010a), ainsi qu'à la plupart des membres de la famille BTNL dans la régulation de l'activation T. Pour revue, voir (Arnett et al., 2009). Successivement, les équipes de N. Seo, JR. Conejo-Garcia, et D. Olive ont observé des phénomènes de co-stimulation par des protéines de la famille BTN3 dans l'activation des cellules T (Cubillos-Ruiz et al., 2010; Messal et al., 2011; Yamashiro et al., 2010). D'après ces travaux, cette famille de protéine pourrait fonctionner comme récepteur costimulateur positif ou négatif de la réponse T en fonction de paramètres encore mal compris. Par ailleurs, l'expression ubiquitaire de ces protéines suggère des rôles multiples des BTN3, ou encore un rôle général dans la modulation globale des voies d'activation des cellules (Messal et al., 2011).

III. Les fonctions des protéines Skint chez la souris

1) Généralité sur la famille Skint

La famille Skint (*Selection and upkeep of intrapetithelial T cells*) est une famille de gènes récemment identifiée chez la souris, et reliée à la famille des BTN. Ainsi, les protéines Skint font partie des familles IgSF, B7-like, et BTN-like. Le membre fondateur de la famille Skint, Skint-1, est actuellement le seul gène étudié, et sa fonction a été reliée à la sélection d'une famille de L γ δ chez la souris. Un cluster de 10 gènes situé sur le chromosome 4 chez la souris a ensuite été relié à celui-ci, et forme la famille Skint (Skint-1 à -11).

Skint-1 est protéine de 364 acides aminés comportant une séquence signal, les domaines extracellulaires caractéristiques de la IgSF IgV-like et IgC-like, suivit par 3 domaines transmembranaires et une courte queue intra-cytoplasmique sans rapport avec le domaine intracellulaire B30.2 des BTN (**figure 29**). La structure globale de Skint-1 est relativement conservée entre les différents membres de la famille Skint qui diffèrent principalement par le nombre d'exons, codant notamment pour les domaines transmembranaires. Par ailleurs, l'ensemble des produits de cette famille de gènes subit un épissage alternatif aboutissant à de multiples isoformes pouvant être dépourvus de domaine transmembranaire.

Cette famille de protéine est présente dans d'autres espèces mammifères que la souris. En particulier, des orthologues du gène murin de Skint-1 ont été identifiés chez le rat et la vache, et sont présents sous forme de pseudogènes chez les primates (Boyden et al., 2008). La famille Skint semble avoir subi une rapide évolution inter-espèce, et porte les marques d'une forte pression de sélection positive. Chez la souris, le polymorphisme du gène Skint-1 est principalement concentré au niveau des deux premiers domaines transmembranaires et de la boucle intracellulaire les reliant.

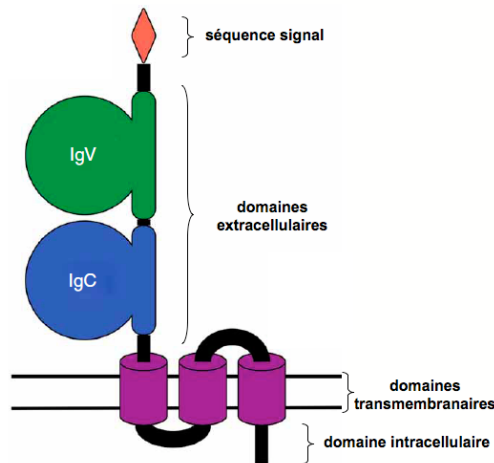


Figure 29 : Structure générale de Skint-1.

La structure générale de Skint-1 est celle de la plupart des protéines de la IgSF, avec les deux domaines extracellulaires caractéristiques IgV-like et IgC-like, suivit de trois domaines transmembranaires et d'une courte queue intra-cytoplasmique à l'extrémité C-terminale. Cette structure est celle d'une protéine transmembranaire, mais les domaines transmembranaires sont largement épaissés, et Skint-1 semble peu ou pas exprimée à la surface des cellules. Contrairement à la plupart des membres des familles IgSF, B7, BTN et BTNL, cette protéine est plutôt retenue au niveau intra-cytoplasmique, et sa fonction est tout à fait obscure pour le moment.

2) Rôle de Skint-1 au cours du développement des DETC

Skint-1 a récemment été identifiée comme un acteur nécessaire de la sélection thymique positive ainsi que de la localisation intra-épidermique et du maintien du répertoire d'une sous-population de LT $\gamma\delta$ chez la souris, appelée DETC (Intro Chapl II 3b) (Boyden et al., 2008; Lewis et al., 2006). En accord avec cette fonction, l'expression de skint-1 est restreinte au thymus et à la peau, et exclusivement aux cellules épithéliales thymiques (médullaires principalement) et aux kératinocytes. Les transcripts sont détectés à partir du 15^e jour de la vie embryonnaire, et tout au long de la vie. Les autres membres de la famille Skint montrent également une expression dans le thymus et la peau, mais certains d'entre eux peuvent également être exprimés dans d'autres tissus (Boyden et al., 2008).

L'expression de Skint-1 par les thymocytes n'est pas nécessaire à leur sélection (Barbee et al., 2011), et cette protéine participe donc à un processus indirect de sélection positive impliquant probablement un engagement du TCR $\gamma\delta$ à la surface de ces cellules. En effet, le déficit en Skint-1 aboutissant à un défaut de maturation des DETC peut être restauré par engagement TCR des DETC thymiques

à l'aide d'anti-TCR agonistes (Lewis et al., 2006). Pourtant, cette protéine n'est peu ou pas exprimée au niveau membranaire, et est majoritairement retenue dans le cytoplasme des cellules (Barbee et al., 2011).

Les domaines Ig de Skint-1, participant probablement à l'interaction avec d'autres protéines comme la plupart des domaines Ig, ne sont pas suffisants pour la sélection des DETC. Chacun des domaines protéiques semble nécessaire à la sélection des DETC, puisque la délétion d'un ou plusieurs domaines transmembranaires, ou encore le remplacement des domaines Ig par des domaines équivalents d'autres membres de la famille Skint, suffit à abroger la fonctionnalité de la protéine (Barbee et al., 2011).

Par ailleurs, Skint-1 semble capable de s'homo-dimériser, mais cette multimérisation n'est pas suffisante à sa fonction. En outre, cette protéine peut également subir certains processus protéolytiques affectants les domaines Ig, nécessaires mais non suffisants à sa fonction (Barbee et al., 2011).

Actuellement, le peu d'informations disponibles concernant Skint-1 ne permet même pas de proposer de modèle hypothétique spécifiant le rôle de cette protéine au processus de développement des DETC. Mais les travaux de l'équipe d'A Hayday, actuellement focalisés sur cet acteur central de la biologie des DETC devraient permettre d'enrichir largement la compréhension du développement de cette sous-population singulière de LT $\gamma\delta$, et pourraient apporter des bases communes aux processus régissant le développement de plusieurs sous-populations de LT $\gamma\delta$, chez la souris mais également chez d'autres espèces mammifères.

3) Rôles hypothétiques des protéines Skint et de leurs homologues

Les différents membres de la famille Skint ne semblent pas jouer de rôles redondants. En effet, aucune des expressions d'autres membres de la famille Skint, ou de diverses protéines chimériques Skint-1 comprenant des régions d'autres protéines Skint par les cellules épithéliales thymiques n'a pas permis de restaurer le

déficit de maturation des DETC résultant de la perte de fonction de Skint-1 (Barbee et al., 2011).

L'identification de Skint-1 comme un acteur indispensable au développement et au maintien des DETC chez la souris (Boyden et al., 2008; Lewis et al., 2006), est une avancée fondamentale dans la compréhension des mécanismes régissant le développement de cette population cellulaire, et plus largement des LT $\gamma\delta$. En particulier, le rôle crucial de Skint-1 au cours du développement d'une population invariante de LT $\gamma\delta$ chez la souris, et l'absence de redondance fonctionnelle apparente au sein de la famille Skint suggèrent que les autres membres de cette famille pourraient jouer des rôles similaires dans les processus de développement d'autres sous-populations de LT $\gamma\delta$. En effet certaines sous-populations de LT $\gamma\delta$ chez l'homme comme chez la souris portent les marques évidentes d'une sélection positive thymique ou périphérique draconnienne (Intro Chapl II 3b), et le développement rapide de familles de multiples protéines conservées comme les familles Skint ou BTN est généralement attribuée à une co-évolution rapide avec un ligand indéterminé. Par ailleurs, au sein du système immunitaire, ce type d'évolution est la marque de fabrique des récepteurs de l'immunité adaptative tels que les TCRs et leurs ligands.

Les processus développementaux auxquels pourraient participer les protéines Skint et leurs homologues sont encore obscurs et semblent impliquer indirectement des ligands de TCR, Skint-1 n'étant peu ou pas exprimée au niveau membranaire, et l'interaction entre des protéines Skint-1 recombinantes et la membrane des DETC étant indétectable (Barbee et al., 2011). En tous cas, l'identification récente de cette nouvelle famille de protéines offre une piste inédite à la compréhension des mécanismes de sélection des LT $\gamma\delta$. Par ailleurs, certaines de ces protéines et leurs homologues peuvent également participer à la costimulation de populations cellulaires innées et adaptatives (ex : homologie entre Skint-1 chez la souris et B7S3L chez l'homme (Nurieva et al., 2009) ; homologie entre Skint-2 chez la souris et B7S3 chez l'homme (Yang et al., 2007)).

Résultats

ChapI Modalités d'activation et fonctions de sous-populations de LT $\gamma\delta$ humains V δ 2-

I. Introduction

Chez l'homme, l'ensemble des LT $\gamma\delta$ a historiquement été divisé en deux populations mutuellement exclusives distinguées par l'usage de leur chaîne TCR V δ : (i) la population V δ 2+ exprimant un TCR composé de chaînes V γ 9 et V δ 2, majoritaire dans le sang périphérique adulte, est de très loin la plus étudiée notamment en raison de la facilité d'accès aux échantillons sanguins. (ii) la population V δ 2- regroupant tous les LT $\gamma\delta$ non V δ 2- exprimant divers TCRs réside principalement dans les épithélia (Intro ChapI II 2 b).

Cette population très peu étudiée est fondamentalement hétérogène et de plus en plus d'études tendent à morceller les LT V δ 2- en multiples sous-populations de LT $\gamma\delta$ dont les caractéristiques sont encore mal définies. À l'extrême inverse de la population V δ 2+ qui, malgré une certaine hétérogénéité, reconnaît une famille homogène de d'Ag, les sous-populations V δ 2- semblent capables de reconnaître un ensemble très divers d'Ag. En effet, les quelques ligands de TCR V δ 2- identifiés jusqu'à présents sont seulement reconnus par des populations très restreinte de LT $\gamma\delta$ V δ 2- (Intro ChapI III 1).

Alors que les LT V δ 2- résident principalement dans les tissus et sont souvent quasiment indétectables dans le sang périphérique des individus adultes sains, ils peuvent représenter une fraction non négligable des LT périphériques dans certaines conditions pathologiques. L'analyse fine des populations V δ 2- retrouvées dans ces conditions révèle une amplification et/ou relocalisation périphérique de populations polyclonales voir clonales, suggérant la rencontre d'un Ag particulier capable d'activer une proportion extrêmement réduite des LT $\gamma\delta$ V δ 2- (Intro ChapI V 4c).

Ainsi, l'identification de nouveaux ligands de TCR V δ 2- semble presque nécessiter d'une analyse clonale de cette population cellulaire hétérogène. A l'instar des ligands de TCR reconnus spécifiquement par la population V δ 2+, les Ag

activateurs de V δ 2- semblent être des molécules du Soi Altéré, dont l'expression par les cellules du Soi pourrait être augmentée dans certains contextes pathologiques tels que l'infection et la transformation tumorale (Das et al., 2004; Halary et al., 2005). Par ailleurs, un nombre grandissant d'études mettent en exergue le rôle crucial de certaines molécules dans la modulation fine des activations dépendantes de TCR $\gamma\delta$ autoréactif ou encore dans l'activation de certaines populations de LT $\gamma\delta$ préactivées, en l'absence de ligands de TCR $\gamma\delta$ (Intro Chapl III 3).

Ainsi, l'identification des Ag activateurs de LT V δ 2-, reconnus par le TCR $\gamma\delta$ ou par d'autres récepteurs, est actuellement un enjeu important pour la compréhension de la biologie de ces cellules et leurs applications éventuelles en thérapie cellulaire.

II. Modulation de l'activation de populations V δ 2- humaines par engagement des molécules de CMH de classe I.

1) Article 1 : *Up-regulation of cytolytic functions of human V δ 2- $\gamma\delta$ T lymphocytes through engagement of ITL2 expressed by tumor target cells.*

Harly C, Peyrat MA, Netzer S, Déchanet-Merville J, Bonneville M, Scotet E.

Blood, 2011, 117(10):2864-73.

Ce projet de recherche, ayant à l'origine pour objectif l'identification d'un nouveau ligand de TCR $\gamma\delta$ V δ 2-, a abouti à la caractérisation d'un acteur crucial, nécessaire mais non suffisant, de l'activation de certaines sous-populations V δ 2-. En effet, la protéine ITL2 exprimée à la surface de nombreuses cellules hématopoïétiques est cruciale lors du processus d'activation de certaines populations V δ 1+ et V δ 3+.

Ce travail décrit un rôle tout à fait atypique d'ITL2, initialement identifié comme un récepteur de cellules NK et également impliqué dans divers processus de costimulation par interaction avec ses ligands (CMH-I) exprimés à la surface des cellules cibles. Dans le cas présent, l'ITL2 joue le rôle d'un ligand pour les molécules de CMH de classe I exprimées par la cellule effectrice, et est donc impliqué dans une voie de signalisation inverse de celle classiquement décrite.

Ce type de signalisation reverse avait préalablement été observé par plusieurs équipes par cross-link des molécules de CMH de classe I à l'aide d'Acm spécifiques, mais n'avait encore jamais été décrit dans des contextes « naturels » impliquant des interactions intercellulaires entre les molécules de CMH-I et leurs ligands. Par ailleurs, il est probable que d'autres ligands de molécules de CMH de classe I pourraient jouer un rôle similaire à celui de l'ITL2.

Up-regulation of cytolytic functions of human V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T lymphocytes through engagement of ILT2 expressed by tumor target cells

Christelle Harly,¹ Marie-Alix Peyrat,¹ Sonia Netzer,² Julie Déchanet-Merville,² Marc Bonneville,¹ and Emmanuel Scotet¹

¹Inserm Unité Mixte de Recherche 892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Institut de Recherche Thérapeutique Université de Nantes, Nantes, France; and ²Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5164, Bordeaux, France

In humans, the majority of peripheral blood $\gamma\delta$ T cells expresses V γ 9V δ 2 T-cell receptors (TCR) and recognize nonpeptidic phosphorylated antigens. In contrast, most tissue-derived $\gamma\delta$ T cells, which are located mainly in spleen and epithelia, preferentially use V δ 1 or V δ 3 chains paired with diverse V γ chains to form their TCR. Our knowledge about the antigenic specificity and costimulation requirements of human V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells remains limited. In an attempt to address

this important issue, we characterized the specificity of a monoclonal antibody (mAb 256), screened for its ability to specifically inhibit cytolytic responses of several human V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-cell clones against transformed B cells. We show that mAb 256 does not target a TCR ligand but blocks key interactions between non-TCR molecules on effector $\gamma\delta$ T cells and ILT2 molecule, expressed by tumor targets. In line with the previously reported specificity of this NK receptor for classic and nonclas-

sic major histocompatibility complex (MHC) class I molecules, blockade of MHC class I/ILT2 interactions using MHC class I- or ILT2-specific mAbs and ILT2-Fc molecules inhibited tumor-induced activation of V γ 8V δ 3 T-cell clones. Therefore, this study describes a new cytotoxic T lymphocyte activation pathway involving MHC class I engagement on $\gamma\delta$ T cells. (*Blood*. 2011; 117(10):2864-2873)

Introduction

One important feature of $\gamma\delta$ T cells is the preferential expression of T-cell receptor (TCR) V regions in distinct tissue locations. In humans, $\gamma\delta$ T cells are distinguished by usage of one of the 3 main TCR V δ 1, V δ 2, or V δ 3 regions. V δ 2⁺ T cells (V γ 9V δ 2) represent the major peripheral $\gamma\delta$ T-cell population in blood (0.5%-5% of the peripheral blood leukocyte [PBL] pool).^{1,2} In a nonpathologic context, V δ 1⁺ subsets are preferentially located in thymus, spleen, liver, gut epithelia, and dermis, and to a lesser extent in blood, whereas V δ 3⁺ subsets are mainly found in liver and gut epithelia. Tissue-localized $\gamma\delta$ T cells are considered as unique self-reactive sensors of cell stress and transformation that may recognize endogenous molecules whose expression is up-regulated in particular physiopathologic conditions. Accordingly, a growing number of studies support a critical role played by $\gamma\delta$ T cells in protective immunity against extracellular and intracellular pathogens, tumor surveillance, modulation of innate and adaptive immune responses, tissue healing or epithelial cell maintenance, and regulation of physiologic organ function.^{3,4}

V δ 2⁺ T cells, the best characterized human $\gamma\delta$ T-cell subset, recognize in vitro a wide array of transformed or infected target cells and, accordingly, are activated in vivo in various tumoral and infectious contexts.⁵⁻⁷ Human V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells express TCR with greater combinatorial and junctional diversity, consistent with recognition of a wide range of antigens. Human V δ 1⁺ T cells reactive against major histocompatibility complex (MHC), MHC-like, or non-MHC molecules, such as MICA/B, CD1c or HLA-DR,⁸⁻¹¹ have been described in tumor and infection contexts, but formal evidence for cognate interactions between V δ 2⁺ $\gamma\delta$ TCRs and their suspected ligands has not been provided so far. As for

their peripheral V δ 2⁺ counterpart, the precise modalities of V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-cell activation remain poorly understood. Importantly, efficient triggering of TCR-mediated human $\gamma\delta$ T-cell activation is induced with the help of nonclonal surface receptors, such as adhesion molecules (eg, ICAM-1/2), TLRs (eg, TLR3), Fc receptors (eg, CD16), and natural killer receptors.¹²⁻¹⁶ Indeed, most human V δ 2⁺ and V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells, which do not express CD4 or CD8 coreceptors, use activating (eg, NKG2D) and inhibitory natural killer receptors (eg, CD94/NKG2A or ILT2) to fine-tune their TCR-mediated activation threshold and ensure discrimination between normal and altered self.¹⁷⁻¹⁹

In an attempt to analyze the activation modalities of V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells, we generated monoclonal antibodies (mAbs) against a transformed B-cell line not recognized by V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells, and screened them for their ability to selectively block tumor cell recognition by reactive V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-cell clones. Characterization of the tumor ligand recognized by one such blocking mAb revealed a key role played by the ILT2 (or LILRB1/CD85j) molecule, a type I transmembrane protein of the immunoglobulin superfamily of receptors that is broadly expressed by hemopoietic cells and that binds for most classic and nonclassic MHC class I molecules,²⁰⁻²⁴ in transformed B-cell recognition by several V δ 2⁺ T-cell clones. We further showed that target cell-derived ILT2 costimulated V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-cell activation through interaction with non-TCR molecules (eg, MHC class I) expressed by $\gamma\delta$ T-cell effectors. Altogether, these results suggest the existence of a new cytotoxic T lymphocyte (CTL) activation pathway involving MHC class I engagement on many subsets of human V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells and provide new insights into mechanisms regulating $\gamma\delta$ T-cell functional responses.

Submitted September 24, 2010; accepted December 28, 2010. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, January 13, 2011; DOI 10.1182/blood-2010-09-309781.

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.

© 2011 by The American Society of Hematology

Methods

Antibodies and reagents

The following antibodies were used: CD107a-fluorescein isothiocyanate (FITC; clone H4A3), CD107b-FITC (H4B4), and mouse isotypes IgG1 and IgG2 purchased from BD Biosciences. CD3 ϵ -phycoerythrin (PE), -PC5, -FITC, and purified (UCHT1), ILT2 (GHI-75), ILT2-PE and purified (HP-F1), CD14-PE (RMO52), CD56-PE (N901), CD69-PC5 (TP1.55.3), and pan TCR $\gamma\delta$ -PC5 (IMMU510) were obtained from Immunotech/Beckman Coulter. MHC class I mAb (W6/32) was obtained from eBioscience. Goat anti-human Fc-FITC and goat anti-mouse-PE secondary mAbs were from Jackson ImmunoResearch Laboratories. Goat anti-mouse-Alexa 647 and -Alexa 488 mAbs, Live/Dead cell marker, and carboxyfluorescein succinimidyl ester were from Invitrogen. Recombinant human ILT2-Fc molecule was purchased from R&D Systems. Mouse serum, monensin A, phorbol myristate acetate, and ionomycin were from Sigma-Aldrich. Full-length human ILT2 cDNA was kindly provided by M. Lopez-Botet (IMIM, Barcelona, Spain).

Cells

Human $\gamma\delta$ T cells were cultivated in complete RPMI 1640 medium (2mM L-glutamine, 10 μ g/mL streptomycin, and 100 IU/mL penicillin) with 10% fetal calf serum and supplemented with 300 IU/mL of recombinant human interleukin-2 (Proleukin; Chiron Therapeutics). $\gamma\delta$ T cells were expanded in vitro in complete RPMI 1640 medium containing 10% human serum and supplemented with 0.5 μ g/mL of purified leucoagglutinin (Sigma-Aldrich) and irradiated (30 Gy) allogeneic feeder cells. These human $\gamma\delta$ T cells, V γ 8V δ 3 (clones 73R9, R3R11, and 73R13), V γ 9V δ 1 (73R14), and V γ 3V δ 3 (84R33), were obtained from standard mixed lymphocyte (10×10^6 fresh human PBL from healthy donors)-tumor (5×10^6 irradiated Raji Burkitt lymphoma cells) cultures performed in the presence of recombinant human interleukin-2. After 2 weeks, $\gamma\delta$ T cells were magnetically sorted using a pan $\gamma\delta$ TCR mAb (IMMU510, Beckman Coulter), cloned by limiting dilution (0.3 cells/well) and amplified. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC)-V γ 9V δ 2 (G12) and -V γ 2-3V δ 3 (94-5-14) and thymic-18S3.1 (V γ 2-3V δ 3), -18S3.5 (V γ 8V δ 3), -21S3.15 (V γ 4V δ 3) $\gamma\delta$ T-cell clones were similarly sorted, cloned, and expanded. B cells were kept in complete RPMI 1640 medium. Daudi, Raji, and its MHC class II deficient mutant RJ225 (Burkitt lymphomas), RPMI8226 (myeloma), and 721.221 (B-lymphoblastoid cell line [B-LCL]) were from ATCC. Epstein-Barr virus⁺ (EBV⁺)-B-LCLs were generated by culturing 2×10^6 PBMCs from healthy human donors (identified as Do#) with EBV-containing supernatant from the virus-producing B95.8 marmoset cell line. Cultures were performed in the presence of 1 μ g/mL cyclosporine A; 00136, BM16, GRC212, IBW9, GRC138, BM9, GO85, 26/27, SP0010, JESTHOM, and KT17 were homozygous typing cell human B-cell lines that were derived from the International Histocompatibility Working Group. The human C91 T2.2 T-cell line was kindly provided by D. Olive (Inserm Unité Mixte de Recherche 891, Marseille, France). U2OS cells (human osteosarcoma) were kindly provided by D. Heymann (Inserm Unité Mixte de Recherche 957, Nantes, France). ILT2⁺ and ILT2⁻ 721.221 B cells were sorted using a FACS Aria cell sorter (BD Biosciences) and next cloned by limiting dilution.

Proliferation

Proliferative activity of responder $\gamma\delta$ T cells was measured after a 48-hour culture with irradiated target cells followed by an overnight pulse with ³H thymidine. Cells were harvested, and ³H thymidine incorporation was detected by liquid scintillation counting.

Cytolytic activity

Cytolytic activity of $\gamma\delta$ T cells was measured by a standard 4-hour ⁵¹Cr release assay. Percentage of tumor target cell lysis was calculated according to the following formula: ((experimental release-spontaneous release)/

(maximum release – spontaneous release)) $\times$ 100. Maximum and spontaneous release was determined by, respectively, adding 1% Triton X-100 or medium to ⁵¹Cr-labeled tumor target cells in the absence of $\gamma\delta$ T cells. When indicated, cytolytic activity of human $\gamma\delta$ T cells was also analyzed by measuring CD107a/b surface mobilization by flow cytometry. $\gamma\delta$ T cells were cocultured for 4 hours together with target cells (1:1 cell ratio) at 37°C in complete RPMI 1640 medium in the presence of monensin (5 μ M) and a combination of FITC-conjugated CD107a/b mAbs. T cells were harvested, stained with CD3-PC5 mAb and Live/Dead cell marker, and analyzed by flow cytometry. Data were collected on a FACSCanto cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software Version 8.7.1 (TreeStar).

Generation and production of mAb 256

Six-week-old BALB/c mice were intraperitoneally immunized in 3 periods with B-LCL (5×10^6 cells, Do#AD) cells. Hybridoma cells were a fusion product between splenic lymphocytes of immunized Balb/c mice and SP2/0 myelomas, according to standard procedures. Supernatant of hybridoma cells were screened for detection of antibody by ELISA. The suitable clones were selected for limiting dilution, and batches of mAb 256 (IgG1) were produced in vitro and in ascitic fluids.

V γ 8V δ 3 TCR Jurkat transductants

The γ and δ chains of the 73R9 (V γ 8V δ 3) T-cell clone were cloned by reverse-transcribed polymerase chain reaction using specific primers that amplify the full-length molecule. The polymerase chain reaction products were subcloned in the pCR2.1 vector (Invitrogen) and sequenced. The γ 8 and δ 3 cDNAs were cloned into the lentiviral vector pTEEW (vectorology facility of Bordeaux 2 University, Bordeaux, France; www.ifr66.u-bordeaux2.fr/pages/vectorologie.html) under the control of the promoter EF1 α . Transduction of human Jurkat T cells (J.RT3-T3.5, TCR β -chain-deficient variant) was performed using lentiviral particles, which were produced by transient transfection of 293T HEK cells as previously described,²⁵ at a multiplicity of infection of 2, 4, and 8 in RPMI 1640 medium with 8% fetal calf serum and 8 mg/mL protamine sulfate (Sigma-Aldrich). After 24 hours of infection, cells were washed twice, amplified for 5 days, and sorted for TCR expression by flow cytometry (BD FACS Aria). Jurkat T cells stably expressing, or not, the V γ 8V δ 3 TCR (supplemental Figure 3, available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article) were activated for 4 hours at 37°C in complete RPMI 1640 medium, harvested, and stained with a CD69-PC5 mAb. Surface expression of CD69 on Jurkat T cells was analyzed by flow cytometry on LSR-I cytometer (BD Biosciences) and FlowJo software Version 8.7.1. Carboxyfluorescein succinimidyl ester staining was used to exclude target cells.

Western blots

Whole cell extracts were obtained by cell pellet lysis in RIPA buffer (50mM Tris HCl, 150mM NaCl, 0.25% deoxycholate (DOC), 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 100 μ M Na₃VO₄, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride/Pefabloc, 1 μ g/mL leupeptin, and 1 μ g/mL aprotinin). Proteins (50 μ g for cell lysates or 0.5 μ g for purified recombinant proteins) were resolved by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). Unbound sites were blocked with Western Blocking Reagent (Roche Applied Science), and blots were probed by overnight incubation at 4°C with purified primary mAbs (1 μ g/mL). After washing with Tris-buffered saline-Tween 0.1%, membranes were further incubated 1 hour at room temperature, with a horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse/anti-rabbit secondary antibodies (Roche Applied Biosystem), and visualized using Chemiluminescence Western Blotting Substrate (Roche Applied Biosystem).

Confocal microscopy

Raji cells were left to adhere for 1 hour at 37°C on poly-L-lysine-coated glass slides (Biocoat, BD Biosciences). Cells were washed and fixed

Table 1. Cytolytic and proliferative activity of human Vδ2^{neg} γδ T-cell clones against B lymphoid target cells

Clones*	TCR†	Daudi		Raji		RPMI 8226		B-LCL (Do#DA)		T αβ§	
		Lysis‡	Proliferation	Lysis	Proliferation	Lysis	Proliferation	Lysis	Proliferation	Lysis	Proliferation
73R5	Vγ8Vδ3	72 ± 1	1669 ± 6	52 ± 3	3453 ± 1325	7 ± 0	0	67 ± 12	29 389 ± 2479¶	14 ± 1	5887 ± 174
73R9	Vγ8Vδ3	74 ± 2	18 889 ± 3156¶	50 ± 3	12 103 ± 824¶	3 ± 0	3317 ± 1081	80 ± 6	35 686 ± 2899¶	4 ± 6	825 ± 274
73R11	Vγ8Vδ3	74 ± 0	12 815 ± 1598¶	50 ± 1	10 906 ± 436¶	7 ± 2	4324 ± 1300	86 ± 1	29 981 ± 902¶	7 ± 2	1894 ± 468
73R13	Vγ8Vδ3	50 ± 8	192 ± 100	27 ± 1	4206 ± 1525	4 ± 2	3276 ± 1528	62 ± 3	2649 ± 768	7 ± 7	8551 ± 1173
73R14	Vγ9Vδ1	73 ± 5	25 711 ± 274¶	35 ± 5	9963 ± 269	63 ± 5	3913 ± 200	12 ± 0	22 108 ± 395¶	12 ± 1	10 019 ± 730¶
84R11	Vγ8Vδ1	1 ± 0	0	6 ± 2	0	15 ± 3	0	13 ± 3	12 102¶	6 ± 10	0
84R33	Vγ3Vδ3	1 ± 0	0	2 ± 0	2905 ± 199	23 ± 5	2501 ± 656	1 ± 1	0	15 ± 6	3919 ± 50
84R45	Vγ2-3Vδx	0	0	3 ± 1	0	29 ± 1	0	4 ± 1	0	9 ± 10	0
84R50	Vγ2-3Vδx	1 ± 0	0	2 ± 0	3604 ± 74	39 ± 4	1312 ± 849	1 ± 3	0	7 ± 2	282 ± 174
84R51	Vγ9Vδ2	64 ± 4	ND	9 ± 2	ND	ND	ND	5 ± 1	ND	ND	ND
84R48	Vγ9Vδ2	63 ± 10	ND	4 ± 8	ND	ND	ND	15 ± 3	ND	ND	ND

ND indicates not determined.

*γδ T-cell clones were derived from MLTC performed with PBL of 2 healthy human donors (Do#73 and Do#84), as described in "Cells."

†Expression of Vγ and Vδ TCR chains was determined by flow cytometry using specific mAbs.

‡Cytolytic activity (% of specific lysis) and γδ T-cell proliferation (cpm) were measured, respectively, in a standard ⁵¹Cr release (30:1 effector-to-target cell ratio) and ³H thymidine incorporation assays, as described in "Proliferation." Data are shown as mean ± SD of triplicate (n = 3).§Control human CD8⁺ αβ T-cell line.

||Cytolysis value > 30%.

¶Proliferation value > 10 000 cpm.

(4% paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature) and preincubated for 15 minutes with human serum. After addition of primary mAbs, mAb 256 (ascites diluted at 1/1000) or purified mouse IgG1 (10 μg/mL) and incubation for 15 minutes at 4°C, samples were washed and stained with goat anti-mouse Ig-Alexa 488. After washing, slides were dried, mounted using Fluoromount G solution (Southern Biotechnology), and analyzed using a Leica SP1 confocal microscope (63 × 1.4 NA objective).

Data analysis

The significance of differences between 2 means was assessed with a paired Student *t* test. Differences were considered statistically significant with *P* less than .05.

Results

Human Vδ2^{neg} γδ T-cell subsets display cytolytic and proliferative responses against transformed B lymphoid target cells

In an attempt to study the activation requirements of human Vδ2^{neg} γδ T cells, we first isolated in vitro tumor-specific polyclonal and clonal γδ T-cell populations derived from mixed lymphocyte-tumor cultures using a Burkitt lymphoma line (Raji) not recognized by Vδ2⁺ γδ T cells. After a 2-week coculture with irradiated Raji cells in IL-2-supplemented medium, γδ T cells were purified by immunomagnetic sorting using a TCR Cδ-specific mAb, and their phenotype was analyzed. The majority (> 75%) of γδ T cells expressed Vδ2^{neg} TCRs, including Vγ8Vδ3, Vγ9Vδ1, or Vγ8Vδ1 T-cell populations (data not shown). γδ T cells were next cloned by limiting dilution, and their reactivity against various target cells was measured. Strikingly, several Vδ2^{neg} γδ T-cell clones (8/16 and 14/30 from, respectively, donor (Do)#73 and Do#84), such as Vγ8Vδ3 T cells, strongly reacted in both cytotoxicity and proliferation assays against several B lymphoid target cells, such as Raji and Daudi Burkitt lymphoma cells and B-LCLs, in contrast to Vγ9Vδ2 T cells, which were stimulated for their cytolytic activity by Daudi cells only (Table 1). As shown in Figure 1A, the activation process of Vδ2^{neg} γδ T-cell clones was independent of MHC molecule expression as Daudi and RJ225 cells, which are, respectively, MHC class I⁺ and II⁺ targets, were

lysed by 2 Vδ2^{neg} T-cell clones (73R9, Vγ8Vδ3 and 73R14, Vγ9Vδ1). Importantly, the ability of Vδ3⁺ clonal and polyclonal

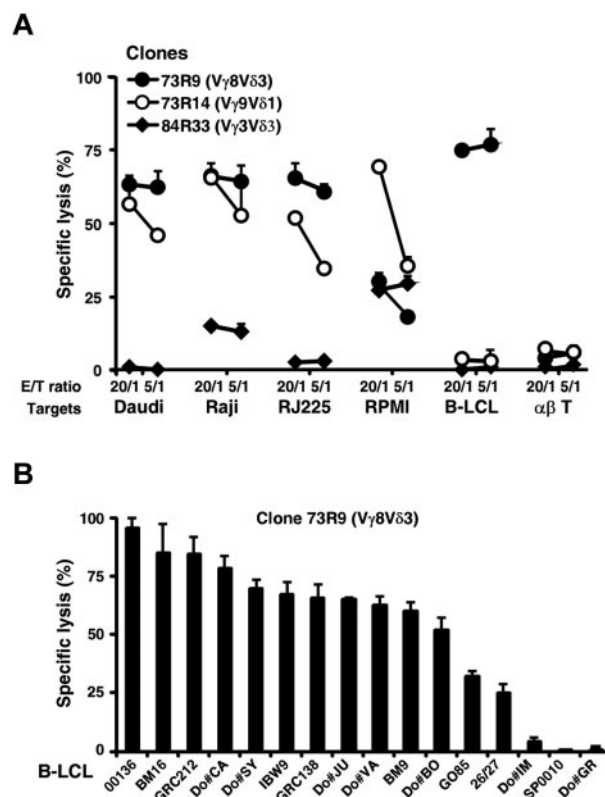
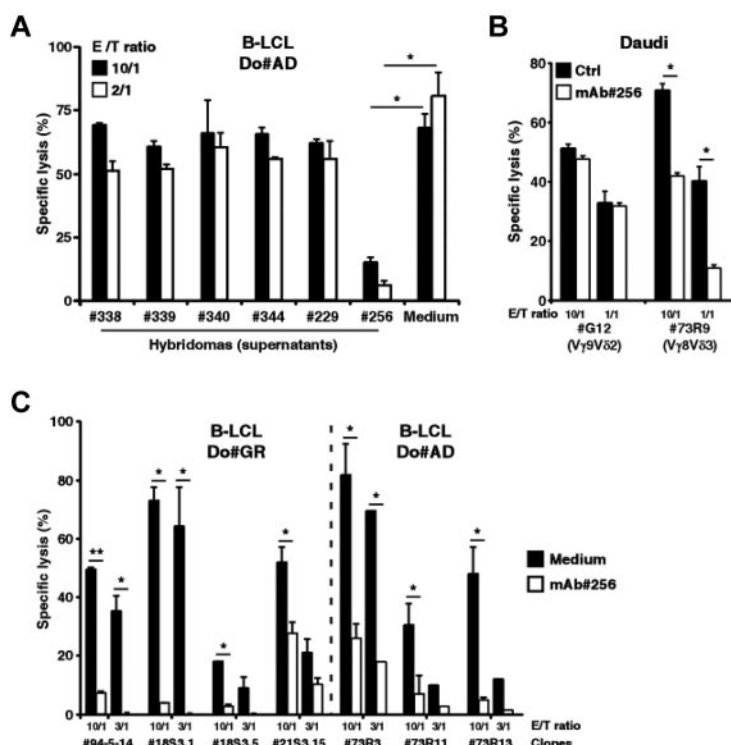


Figure 1. Human Vδ2^{neg} γδ T-cell subsets display strong cytolytic responses against transformed B lymphoid target cells. (A) Cytolytic activity of 3 distinct mixed lymphocyte-tumor culture-derived human Vδ2^{neg} γδ T-cell clones (73R9, 73R14, and 84R33) was measured by ⁵¹Cr release assay after coculture together with Burkitt lymphoma (Daudi, Raji, and RJ225), multiple myeloma (RPMI226), B-LCL (Do#AD), and αβ T cells at both 20:1 and 5:1 γδ T cell-to-target ratios. (B) Cytolytic activity of a Vγ8Vδ3 T-cell clone (73R9) was measured by ⁵¹Cr release assay after coculture together with B cells from a panel of 7 B-LCLs generated from PBMCs of healthy donors (Do#) or 9 homozygous typing cells at a 20:1 γδ T cell-to-target ratio. (A–B) Data are the percentage of specific lysis in triplicate assays (mean ± SD), calculated as described in "Cytolytic activity." Data are representative of at least 3 independent experiments performed with γδ T-cell clones from different healthy donors.

Figure 2. mAb 256 specifically inhibits cytolytic responses of V δ 2⁺ γ δ T cells induced by human B lymphoid target cells. (A) Mice were immunized against human EBV⁺ B-LCLs. Cytolytic activity of the 73R9 γ δ T-cell clone (V γ 8V δ 3) was measured by ⁵¹Cr release assay after a 4-hour coculture together with B cells from human B-LCL (Do#AD) at 10:1 and 2:1 γ δ T cell-to-target ratios, in the presence of supernatants (dilution, 1:5) collected from 6 distinct cloned hybridomas. (B) Cytolytic activity of the G12 (V γ 9V δ 2) and 73R9 (V γ 8V δ 3) γ δ T-cell clones was measured by ⁵¹Cr release assay after a 4-hour coculture together with Burkitt lymphoma cells (Daudi) at 10:1 and 1:1 γ δ T cell-to-target ratios in the absence (Ctrl, filled bars) or in the presence of mAb 256 (ascites 1:1000 dilution, open bars; n > 3). Similar data were obtained using different V γ 9V δ 2 T-cell clones/lines from distinct donors. (C) Cytolytic activity of 7 human V δ 2⁺ γ δ T-cell clones was measured by ⁵¹Cr release assay after a 4-hour coculture together with target cells from 2 different B-LCLs (Do#GR, left and Do#AD, right) at 10:1 and 3:1 γ δ T cell-to-target ratios in the presence of mAb 256 (ascites 1:500, open bars). γ δ T-cell clones 94–5–14, 73R3, 73R11, and 73R13 were derived from PBL of 2 distinct donors. Clones 18S3.1, 18S3.5, and 21S3.15 were derived from human fetal thymi of 2 distinct donors. (A–C) Data are the percentage of specific lysis (mean $\pm$ SD) and are representative of at least 3 independent experiments. **P* < .05. ***P* < .005.



T-cell lines derived from PBLs or thymocytes of different donors to react against B lymphoid cells was further confirmed and extended using a large panel of EBV⁺ and transformed B-cell lines (Figure 1B; supplemental Figure 1).

Taken together, these findings indicate that a wide range of B lymphoid cells, such as Burkitt lymphoma cells and EBV⁺ B-LCLs, strongly activate particular human V δ 2⁺ γ δ T-cell subsets, in an MHC class I- and II-independent manner.

mAb 256 specifically inhibits cytolytic responses of V δ 2⁺ γ δ T cells induced by human B lymphoid target cells

We next sought to identify key molecular partners that, on expression by B lymphoid cells, could contribute to their recognition by human V δ 2⁺ γ δ T cells. To this end, we performed intraperitoneal immunization of mice against human EBV⁺ B-LCLs, generated and cloned B hybridomas, which were screened for the production of mAbs able to stain B-LCLs and inhibit B-LCL killing by V δ 2⁺ γ δ T cells. For this initial screening and several forthcoming experiments described in this study, we used as responder T cells the 73R9 (V γ 8V δ 3) T-cell clone because of its strong cytolytic (CTL) and proliferative activity against B-LCL. The hybridoma clone 256 (murine IgG1) was further selected as it dramatically reduced the 73R9 T-cell clone cytolytic responses against B-LCL, compared with other B-LCL-reactive mAbs (Figure 2A). Importantly, although purified mAb 256 strongly inhibited the lysis of Daudi cells by V γ 8V δ 3 T cells, it had no effect on the reactivity of V γ 9V δ 2 T cells against the same target cells (clone G12, Figure 2B). Finally, the biologic effect of mAb 256 was confirmed and extended by analyzing its ability to block the reactivity of various clonal and polyclonal lines of human V δ 2⁺ γ δ T cells derived from different donors (Figure 2C; supplemental Figure 2).

Altogether, these results suggest that mAb 256 binds to surface molecules, which probably play a specific and critical role in the

recognition by several human V δ 2⁺ γ δ T-cell subsets of a wide range of B lymphoid target cells.

mAb 256 binds to approximately 110 kDa cell surface proteins widely expressed on human B cells and PBMCs

To better characterize the nature of the molecule(s) bound by mAb 256, we first analyzed their cellular distribution. mAb 256 stained almost all types of transformed B cells tested (LCLs and lymphomas; data not shown). Within ex vivo human PBMCs, mAb 256 bound to a fraction of T cells, most NK cells (although at heterogeneous levels) and brightly stained almost all CD19⁺ B cells and CD14⁺ monocytes (Figure 3A). Confocal microscopy analysis of Raji cells confirmed that the Ag 256 was mainly expressed at the cell surface and showed a distribution within numerous patches on B-cell membranes (Figure 3B). Finally, the Ag#256 was susceptible to proteolytic digestion by pronase (data not shown), which supported the protein nature of these molecules that were detected by Western blot as a single band of approximately 110 kDa in B-LCL and Daudi cell lysates (Figure 3C).

These results indicated that mAb 256 specifically recognizes membrane-bound protein(s) of approximately 110 kDa, which are highly expressed on B cell-related targets, such as Daudi, Raji, and B-LCLs, as well as on main subsets of human PBMCs.

mAb 256 recognizes the ILT2 (LILRB1/CD85j) receptor

Staining of various human cell lines by mAb 256 revealed the presence of 2 clearly distinct cell subsets within a batch of the 721.221 cell line, an MHC class I⁺ B-LCL variant generated by EMS-induced mutagenesis.²⁶ The lack of Ag#256 surface expression by a substantial fraction of 721.221 B cells (~20%) was stable and not the result of the presence of cell contaminants (data not shown). Both subsets were next sorted, and several clonal populations, expressing or not Ag#256 molecules, were isolated

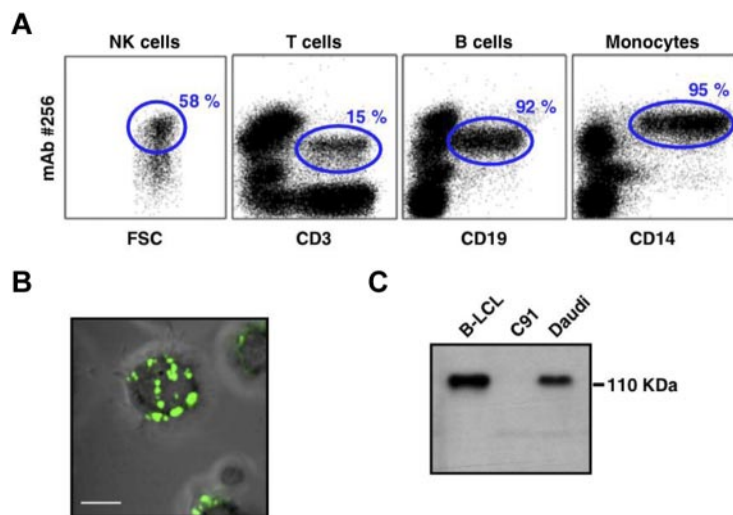


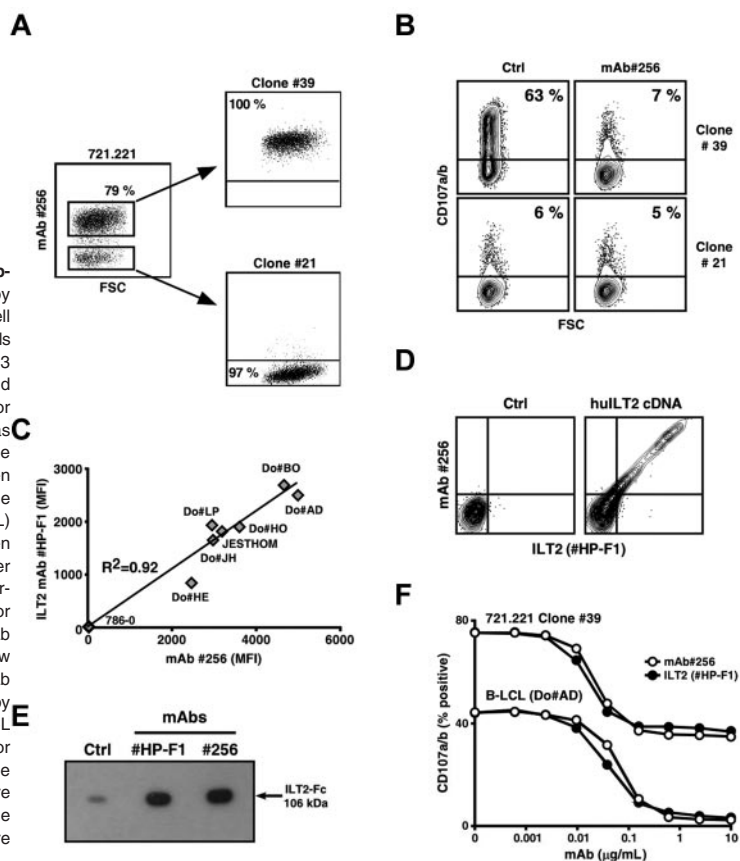
Figure 3. PBMC expression and biochemical features of mAb 256 ligand(s). (A) Surface expression of Ag#256 on NK cells ($CD3^{-}$, $CD56^{+}$), T cells ($CD3^{+}$), B cells ($CD19^{+}$), and monocytes ($CD14^{+}$) within ex vivo human PBMCs was analyzed by flow cytometry (mAb 256, 10 μ g/mL). Values for the frequency of Ag#256 $^{+}$ cells within each total cell subset are indicated in the quadrants (gated events). Results are representative of at least 3 independent experiments performed with PBMCs of different donors. (B) Surface expression of Ag#256 (green staining) was analyzed on Raji cells by confocal microscopy. Scale bar represents 5 μ m. No significant staining was detected when purified mouse IgG1 (isotype control) was used as the primary mAb. (C) Cell lysates of human B-LCL (Do#AD), C91 T2.2, and Daudi cell lines were analyzed by immunoblotting using mAb 256 as primary mAb.

(Figure 4A). Strong up-regulation of CD107a/b occurred in $\gamma\delta$ V δ 3 T cells after short-term incubation with Ag#256 $^{+}$ 721.221 B cells (clone 39; Figure 4B upper left dot plot). This reactivity was drastically reduced in the presence of the mAb 256 (Figure 4B upper right dot plot), that is, to background levels observed after coincubation of $\gamma\delta$ V δ 3 T cells with Ag#256-negative B-LCL variants (Figure 4B lower dot plots).

Having established a tight correlation between Ag#256 expression by 721.221 B cells and their ability to activate $\gamma\delta$ V δ 3 T cells, we selected 721.221 B-cell variants expressing or not Ag#256 (clones 39 and 21) for a comparative microarray analysis of gene expression. Among differentially expressed genes, in-

creased levels of mRNA coding for LILRB1 (for leukocyte Ig-like receptor, subfamily B, member 1) were detected within the Ag#256 $^{+}$ clone, compared with its negative counterpart (data not shown). In line with previous studies suggesting similar cell expression and distribution patterns between ILT2 and Ag#256 in PBMCs,^{20,27} additional experiments relying on the use of specific anti-human ILT2 mAbs unambiguously identified ILT2 as the surface molecule specifically recognized by mAb 256. This assumption was supported by: (1) the tight correlation between the mean fluorescence intensity values obtained after staining of various cell lines with either ILT2-specific or 256 mAbs (Figure 4C), (2) costaining of human ILT2 transfectants by ILT2-specific and

Figure 4. mAb 256 specifically recognizes the LILRB1/CD85/ILT2 receptor. (A) Expression of Ag#256 was analyzed on 721.221 human B cells by flow cytometry. Ag#256 $^{+}$ and Ag#256 $^{-}$ B cells were next isolated by cell sorting and cloned. Values for the frequency of Ag#256 $^{+}$ and Ag#256 $^{-}$ cells within each cell subset are indicated in the quadrants. (B) $\gamma\delta$ V δ 3 T cells (clone 73R9) were incubated together with Ag#256 $^{+}$ (39) and Ag#256 $^{-}$ (21) 721.221 B-cell clones (ratio: 1/1) in the absence (Ctrl, left) or presence (right) of mAb 256 (10 μ g/mL). CD107a/b mobilization was measured by flow cytometry within activated $\gamma\delta$ T cells. Values for the percentage of CD107a/b $^{+}$ T cells are indicated in the quadrants. (C) Seven human B-cell lines and a negative control human renal carcinoma line (786-0) were stained with either α -ILT2 specific mAb (HP-F1, 10 μ g/mL) or mAb 256 (10 μ g/mL). Correlation coefficient (R^2) calculation between ILT2 and Ag#256 mean fluorescence intensities (MFIs) obtained after analysis by flow cytometry is indicated on the graph. (D) Human osteosarcoma cells (U2OS) were stably transfected with either empty (left) or human ILT2 cDNA (right) plasmids, costained with α -ILT2 specific mAb (HP-F1, 10 μ g/mL) and mAb 256 (10 μ g/mL), and analyzed by flow cytometry. (E) The binding of both α -ILT2 specific mAb (HP-F1) and mAb 256 to recombinant human ILT2-Fc molecule (106 kDa) was analyzed by immunoblotting. Ctrl indicates secondary mAb alone. (F) Human B-LCL (Do#AD) and Ag#256 $^{+}$ 721.221 B cells (clone 39) were preincubated for 15 minutes with either α -ILT2 mAb (HP-F1, ●) or mAb 256 (○) at the indicated increasing concentrations. $\gamma\delta$ V δ 3 T cells (clone 73R9) were next incubated for 4 hours together with B cells (ratio = 1:1). Values for the percentage of CD107a/b $^{+}$ $\gamma\delta$ T cells are indicated in the graph. Data are representative of at least 3 independent experiments.



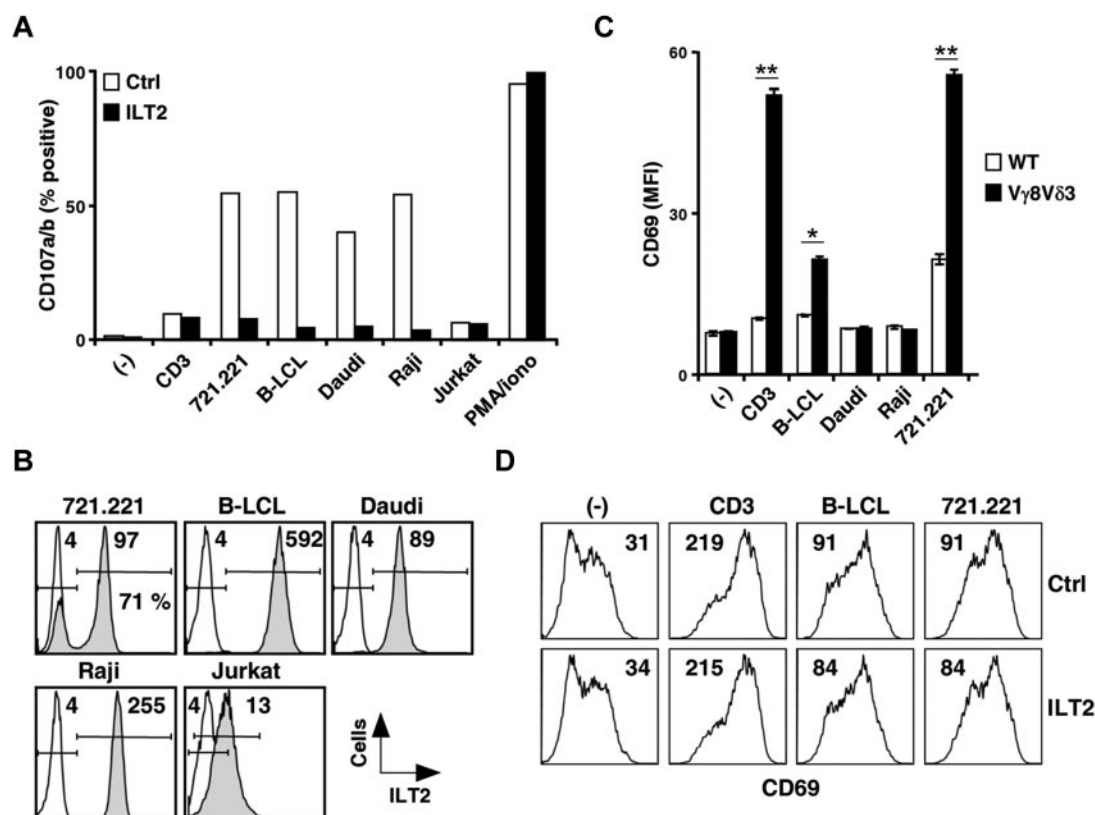


Figure 5. B cell-expressed ILT2 acts as a ligand for a costimulatory receptor for the antigenic activation of V γ 8V δ 3 T cells. (A) The 73R9 $\gamma\delta$ T-cell clone (V γ 8V δ 3) was incubated for 4 hours together with different target cells (721.221, B-LCL, Do#AD; Daudi, Raji, and Jurkat) in the absence (open bars) or presence (filled bars) of α -ILT2 mAb (256, 10 μ g/mL). CD107a/b mobilization was measured by flow cytometry, and the values for the percentage of CD107a/b $^+$ $\gamma\delta$ T cells are indicated. – indicates no stimulation; CD3, α -CD3 mAb (UCHT1, 5 μ g/mL); and PMA/Iono, phorbol myristate acetate and ionomycin control. (B) Target cells described in panel A were stained with α -ILT2 mAb (256, shaded histograms) or control mAb (IgG1, open histograms) and analyzed by flow cytometry. Values for MFI of ILT2 $^+$ cells are indicated. The frequency of ILT2 $^+$ cells within the 721.221 B-cell line is indicated. (C) J.RT3-T3.5 Jurkat T cells expressing the 73R9 TCR (V γ 8V δ 3, filled bars) or not (WT, open bars) were incubated for 4 hours with different human B-cell lines (B-LCL, Do#AD; Daudi, Raji, and 721.221). Surface expression of CD69 on Jurkat T cells was measured by flow cytometry. – indicates no stimulation; and CD3, α -CD3 mAb (UCHT1, 5 μ g/mL). Data are MFI of triplicate samples (mean $\pm$ SD) and are representative of at least 3 independent experiments. * P < .05. ** P < .005. (D) V γ 8V δ 3 (73R9) Jurkat T cells were incubated for 4 hours together with human B cells (721.221 or B-LCL, Do#AD) in the absence (Ctrl) or presence of α -ILT2 mAb (256, 10 μ g/mL, ILT2). – indicates no stimulation; and CD3, α -CD3 mAb (UCHT1, 5 μ g/mL). Surface expression of CD69 on Jurkat T cells was measured by flow cytometry. Values for the MFI of CD69 stainings are indicated. Data are representative of at least 3 independent experiments.

256 mAbs (Figure 4D), (3) Western blot analysis of recombinant human ILT2-Fc molecules (Figure 4E) and, finally (4) comparative titrations of the inhibitory effect of anti-ILT2 and 256 mAbs on V γ 8V δ 3 T-cell reactivity, after preincubation of B cells with these mAbs (Figure 4F). Importantly, no expression of ILT2 was detected on clone 73R9 used in these experiments (data not shown).

Taken together, these results indicate that ILT2, initially described as an inhibitory receptor expressed by NK and T cells, plays a mandatory role in the antigenic activation of particular subsets of human V δ 2 $^-$ $\gamma\delta$ T cells, when expressed on B lymphoid target cells.

B cell-expressed ILT2 surface molecules are necessary for the antigenic activation of the V γ 8V δ 3 T-cell clone 73R9 but do not interact with the $\gamma\delta$ TCR

We next assessed induction of CD107a/b up-regulation on V γ 8V δ 3 T cells (73R9) after incubation with different ILT2 $^{\text{bright}}$ target cells (eg, 721.221, B-LCLs, Daudi, Raji cells) or ILT2 $^{\text{dim}}$ cells (eg, Jurkat T cells). Whereas saturating doses of anti-TCR/CD3 mAbs and ILT2 $^{\text{dim}}$ cells had a weak stimulatory effect, strong CD107 up-regulation was induced by all ILT2 $^{\text{bright}}$ target cells tested and efficiently abrogated by anti-ILT2 mAbs

(Figure 5A; and data not shown). Strikingly, similar levels of $\gamma\delta$ T-cell activation (% of CD107a/b) were observed in the presence of these various ILT2 $^{\text{bright}}$ B cells (Figure 5A), despite major differences in terms of ILT2 expression intensities (Figure 5B). We next tested whether the necessary contribution of ILT2 for $\gamma\delta$ T-cell activation involved direct ILT2 recognition by $\gamma\delta$ TCRs (eg, V γ 8V δ 3). As shown in Figure 5C, a significant TCR-mediated activation of Jurkat J.RT3-T3.5 T-cell transfectants, expressing V γ 8 and V δ 3 TCR chains from clone 73R9 (supplemental Figure 3), was detected after coculture with both B-LCL and 721.221 cells. Surprisingly, Daudi and Raji target cells, which both strongly expressed ILT2 and were previously shown to induce strong degranulation of activated V γ 8V δ 3 T cells, were unable to stimulate Jurkat V γ 8V δ 3 TCR transductants. Moreover, we failed to detect any inhibitory effect of anti-ILT2 mAbs on the activation of V γ 8V δ 3 TCR Jurkat transductants induced by B-LCLs and 721.221 cells (Figure 5D). Finally, we noticed that numerous ILT2 $^-$ cell lines, including the 721.221 B-cell clone 21, were able to strongly activate V γ 8V δ 3 TCR Jurkat transductants, despite their weak ability to stimulate the V γ 8V δ 3 T-cell clone 73R9 (data not shown).

Altogether, these results strongly suggest that ILT2 is not a direct ligand of the V γ 8V δ 3 TCR but, instead, probably delivers

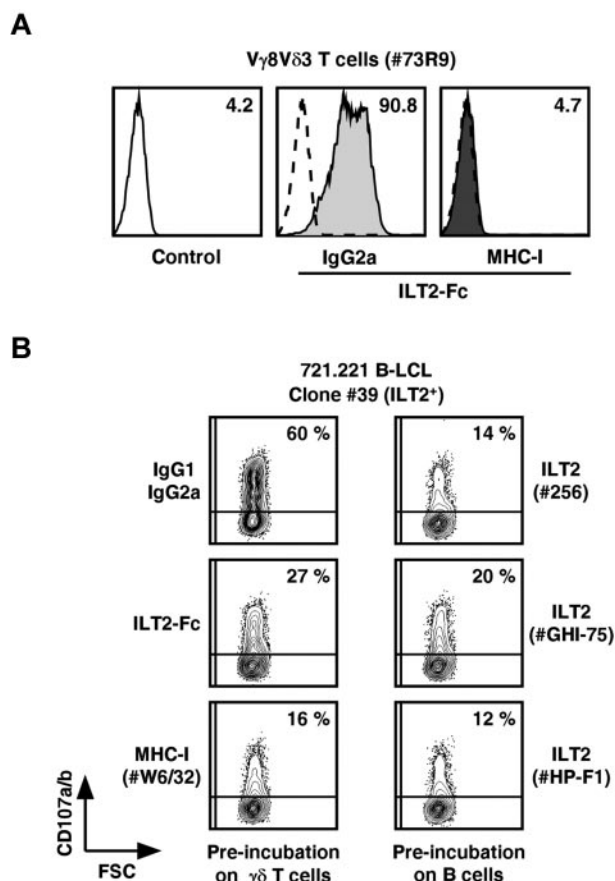


Figure 6. Inhibition of B-LCL-induced activation of V γ 8V δ 3 T cells by ILT2-Fc molecules and mAbs specific for ILT2 or MHC class I molecules. (A) The 73R9 $\gamma\delta$ T-cell clone (V γ 8V δ 3) was preincubated for 15 minutes with either isotypic control mAb (IgG2a) or α -MHC-I mAb (W6/32, 10 μ g/mL, MHC-I) and next stained with soluble human recombinant ILT2-Fc molecules (30 μ g/mL). Values for MFI of ILT2 staining measured by flow cytometry are indicated. Control indicates secondary mAb alone. (B) The 73R9 $\gamma\delta$ T-cell clone (V γ 8V δ 3) was incubated for 4 hours with an ILT2⁺ B-cell line (721.221, clone 39). Control mAb (IgG1, IgG2a), ILT2-Fc molecules (30 μ g/mL), α -MHC-I mAb (W6/32, 10 μ g/mL), or α -ILT2 mAbs (256, GHI-75, HP-F1, 10 μ g/mL) were preincubated with either effector (left) or target cells (right), as indicated. CD107a/b mobilization was measured by flow cytometry, and values for the percentage of CD107a/b⁺ $\gamma\delta$ T cells are indicated in the quadrants. Data are representative of at least 3 independent experiments.

critical and necessary costimulatory signals during antigenic activation of particular subsets of human V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells.

ILT2 costimulates the antigenic activation of some V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-cell subsets through engagement of MHC class I molecules

We next sought whether interactions between ILT2 and MHC class I membrane molecules, the only ILT2 ligands so far described, could deliver a mandatory costimulatory signal for productive $\gamma\delta$ T-cell activation when expressed by B and T cells, respectively. The establishment of specific interactions between recombinant human ILT2-Fc and MHC class I molecules expressed on V γ 8V δ 3 T cells was first assessed by cytometric analysis (Figure 6A). These interactions were abrogated on preincubation of T cells with anti-MHC class I mAbs. V γ 8V δ 3 T-cell degranulation induced by ILT2⁺ 721.221 B cells (clone 39) was inhibited by different anti-ILT2 mAbs. Similarly, preincubation of effector V γ 8V δ 3 T cells with ILT2-Fc molecules or anti-MHC class I mAbs reduced their reactivity against ILT2⁺ B-cell targets (Figure 6B). Of note,

the specificity of blocking mAbs and ILT2-Fc molecules was assessed by the lack of MHC class I and ILT2 molecules expression on, respectively, 721.221 B cells and $\gamma\delta$ T-cell effectors.

These observations indicate that the ILT2 receptor, when expressed by B lymphoid cells, provides critical and mandatory costimulation anti-transformed B-cell responses mediated by a subset of human V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells, through interactions with their MHC class I surface molecules.

Discussion

Most of our understanding of human $\gamma\delta$ T-cell immunobiology has been drawn from analyses of the V γ 9V δ 2 T-cell subset, which represents the major $\gamma\delta$ PBL population in adults. However, the localization, functions, and antigenic/costimulation requirements of human V δ 2⁺ T-cell subsets remain ill defined. To further address these issues and identify key molecules implicated in the activation process of human V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-cell subsets, we took advantage of mixed lymphocyte-tumor culture assays to first isolate tumor reactive subsets among human V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells. We showed that PBL-derived V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells, although initially detected at very low frequencies in adult PBMCs, predominated after 2 weeks of culture in the presence of Raji tumor cells, a Burkitt lymphoma cell line. After cell sorting and cloning, we further demonstrated that several polyclonal and clonal V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-cell populations reacted against transformed human B cells, such as the Raji and Daudi Burkitt lymphoma cells and EBV⁺ B-LCLs, as evidenced in cytotoxicity and proliferation assays. In contrast, V γ 9V δ 2 T cells did not react to any B-cell targets, with the exception of Daudi cells, in line with previous observations showing the absence of cytolytic and proliferative responses of V γ 9V δ 2 T cells against human B-LCLs.²⁸

Interestingly, an important fraction of PBL- $\gamma\delta$ T-cell lines and clones that reacted against B cells expressed a V δ 3⁺ $\gamma\delta$ TCR, frequently associated with V γ 8 chains. Several other V δ 3⁺ T-cell lines and clones were next isolated from PBLs of different donors and displayed similar B-cell reactivity patterns. Moreover, our data further showed that various V γ 8V δ 3 T-cell polyclonal and clonal populations of thymic origin exhibited similar reactivities against B cells, thus indicating that these intrinsic functional responses did not reflect a bias response of peripheral populations. Human V δ 3⁺ $\gamma\delta$ T cells, rarely detected in PBLs of healthy adults, are generally located in liver and gut epithelia. It will be interesting to determine whether similar B-cell reactivity is observed among mucosal human V δ 3⁺ $\gamma\delta$ T cells. Our knowledge about human V δ 3⁺ $\gamma\delta$ T-cell subsets remains very limited as these cells have been primarily studied under pathologic circumstances. These subsets were identified within lymphoid infiltrates during local tissue inflammation, such as synovial fluids in rheumatoid arthritis or epithelia in celiac disease, where expression of the V δ 3 segment was frequently associated with the V γ 8 chain.^{29,30} Increased frequency of V δ 3⁺ subsets was also detected within PBLs and skin of lupus patients^{31,32} or after viral infections by HIV³³ or cytomegalovirus (CMV), particularly in an immunodepressed environment.³⁴⁻³⁶ In these latter studies, dramatic expansion of V δ 1, V δ 3, and V δ 5 $\gamma\delta$ T-cell subsets expressing diverse V γ chains was detected in the PBLs of patients receiving renal, lung, or stem cell allografts. Importantly, V δ 1 and V δ 3 T cells from CMV-infected transplanted patients specifically proliferated in response to CMV-infected fibroblast lysates through a TCR-dependent mechanism. CMV infection in transplanted

patients was accompanied by a striking restriction of CDR3 size distribution in the V δ 3 segment. In a recent study, Vermijlen et al also detected oligoclonal expansions of V δ 2⁺ subsets of $\gamma\delta$ T cells, including V δ 3⁺ T cells, in the cord blood of CMV-infected newborns.³⁷ Altogether, these studies showing important peripheral expansions of rare $\gamma\delta$ T-cell subsets, including V δ 3⁺ T cells, suggest that most of these T cells probably originate from tissues, where they are activated after CMV or HIV infection and redistributed into the blood.³⁸ Interestingly, our results are fully in line with 2 previous studies describing peripheral expansions of V δ 1⁺ and V δ 3⁺ $\gamma\delta$ T cells in PBLs of patients with EBV-infected Burkitt lymphoma cells or B-cell leukemia.^{39,40} Accordingly, we showed that several subsets of human V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells, originally present at low frequencies in PBLs of healthy donors, are able to recognize a variety of B-cell lymphomas and EBV⁺ lymphoid B cells, in an MHC-independent manner. Importantly, B-LCLs or B-cell tumors induced strong *in vitro* proliferative and cytolytic $\gamma\delta$ T-cell functional responses. Antitumor reactivities of V δ 3⁺ T cells have been further confirmed in experiments showing their ability to efficiently lyse a variety of human myeloma cell lines (data not shown). Altogether, these results suggest that peripheral V δ 2⁺ subsets of $\gamma\delta$ T cells, as well as the major V γ 9V δ 2 T-cell population, play complementary roles in immunosurveillance against lymphoid and myeloid tumor cells.

Comparative analysis of $\gamma\delta$ T-cell reactivities and tumor-binding patterns of multimerized recombinant $\gamma\delta$ TCRs (data not shown) suggested that several subsets of human V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-cell populations, which express different TCR V segments (eg, V γ 8, V γ 9, V δ 1, and V δ 3), show antigenic reactivity patterns clearly distinct from that of V γ 9V δ 2 T cells. In an attempt to identify new V δ 2⁺ $\gamma\delta$ TCR ligand(s), we immunized mice against a B-LCL target and selected mAbs that specifically inhibited V δ 2⁺ $\gamma\delta$ CTL responses to B lymphoma lines. Surprisingly, although mAb 256 did not affect the activation of V γ 9V δ 2 T cells induced by the same Daudi target cells, it had also no effect on the reactivity of V γ 8V δ 3 TCR Jurkat transductants. This suggested that Ag#256 molecules, which play a key role in the activation process of V δ 2⁺ T cells by B-LCLs and tumors B cells, was not a V δ 2⁺ TCR ligand. Nevertheless, our results clearly indicated that Ag#256, further characterized for its protein nature and cell surface expression, was expressed not only by B lymphoid cells but also by many PBMC subsets and plays a key role as a costimulatory molecule of antitumor responses mediated by V δ 2⁺ T cells.

Although we failed to isolate and identify the cell membrane molecules bound to mAb 256 by biochemistry approaches, RNA profiling of B-LCL variants that differed by their expression of the 256 epitope allowed us to identify the ILT2 receptor as the Ag of mAb 256. Leukocyte immunoglobulin-like receptors are encoded by a set of genes within the leukocyte receptor cluster on chromosome 19q13.4, adjacent to the killer Ig-like receptor genes that are responsible for controlling NK- and CD8 T-cell survival and effector functions.^{41,42} The ILT2 inhibitory receptor, also known as LILRB1/leukocyte immunoglobulin-like receptor-1/CD85j, is the only leukocyte immunoglobulin-like receptor expressed by human T cells, including $\gamma\delta$ T cells, and has been shown to down-regulate their effector functions.^{19,23,43} ILT2 is an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing receptor for most classic and nonclassic MHC class I molecules, and directly interacts with the monomorphic α 3 domain of MHC class I and the associated β 2-microglobulin molecules. Interestingly, ILT2 is expressed by a variety of

myeloid and lymphoid cell subsets, such as dendritic cells, but its functions in the latter cell subsets remain ill defined.^{24,44} In B cells, cross-linking of ILT2 has been shown to inhibit both IgG and IgE production and to down-regulate cytokine production.⁴⁵

To our knowledge, this study describes a new role played by ILT2 as a critical costimulatory molecule of V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-cell activation, when expressed by B lymphoid cell targets. Moreover, our results suggest that this effect is probably not the result of target cell alterations induced by ILT2 signaling, but rather by ILT2-mediated engagement of MHC class I molecules on effector $\gamma\delta$ T cells. These findings extend previous studies showing that engagement of MHC class I molecules by natural ligands, such as CD8 or CD160, or anti-MHC class I mAbs can provide a signal to T cells that may either amplify functional responses induced by TCR/CD3 crosslinking or induce cell death by apoptosis.⁴⁶⁻⁴⁹ Whether MHC class I costimulation is induced in $\gamma\delta$ T cells through specific signal pathways or is consecutive of a particular remodeling of the immunologic synapse between effector and target cells, eventually associated with a particular kinetic of activation, remains to be determined. However, a comparative preliminary analysis by confocal microscopy revealed no differences of ILT2, TCR/CD3, or MHC class I molecule expression or localization on conjugates established between either ILT2⁺ or ILT2⁺ B-LCLs and V γ 8V δ 3 T cells (data not shown). Thus, in addition to their well-described ability to present peptides to TCRs, MHC class I molecules might be directly involved in T-cell costimulation, especially for T-cell subsets expressing low levels of "classic" costimulatory molecules, such as $\gamma\delta$ T cells. Importantly, such a costimulatory process is probably not restricted to either particular MHC class I molecules, as indicated by the broad range of specificities described for ILT2 binding (HLA-A, B, C, E, F, and G alleles) as well as the extended reactivities of a variety of V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-cell populations from different donors, or ILT2, as many other MHC class I-ligands, such as the CD166 natural killer receptor have also been identified.⁴¹

In conclusion, this study provides new insights into the activation modalities of ill-defined human $\gamma\delta$ T-cell subsets against stressed/transformed lymphoid or myeloid cells. The fact that ILT2 is strongly up-regulated along several physiopathologic processes, associated with expansion of V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-cell subsets (eg, HIV and CMV infections)⁵⁰ would suggest a more prominent costimulatory function played by this receptor in this particular pathologic circumstances, an issue that remains to be formally tested. On a more general standpoint, our results provide new evidence for the importance of costimulatory signals triggered in some particular T-cell subsets by "nonprofessional" surface partners, such as MHC class I molecules.

Acknowledgments

The authors thank Philippe Hulin and the PICell platform (IFR26, Nantes, France) for providing expert technical assistance in videomicroscopy, Michelle Heslan (Inserm U643, Nantes, France) for her help with cell sorting on the FACSaria, Dr Miguel Lopez-Botet (IMIM, Barcelona, Spain) for providing the ILT2 plasmid, and M. J. Loirat (EFS, Nantes, France) for providing blood samples.

This work was supported by Inserm, Université de Nantes, Agence Nationale de la Recherche (no. ANR A05118GS), Association pour la Recherche sur le Cancer (no. 4953), and the Commission

of the European Union Program (Cancer Immunotherapy; no. E06005NP/EEA06004GNP).

Authorship

Contribution: C.H., M.-A.P., and S.N. performed experiments; C.H. and E.S. analyzed results and made the figures; J.D.-M., M.B.,

and E.S. designed the research; C.H., M.B., and E.S. wrote the paper; and all authors read and edited the paper.

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

Correspondence: Emmanuel Scotet, Inserm UMR 892, CRCNA, IRT UN, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes cedex, France; e-mail: Emmanuel.Scotet@inserm.fr; and Marc Bonneville, Inserm UMR 892, CRCNA, IRT UN, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes cedex, France; e-mail: bonnevil@inserm.fr.

References

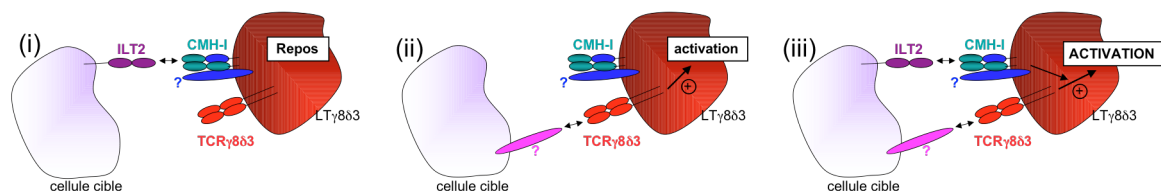
- Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:637-685.
- Hayday AC. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:975-1026.
- Hayday AC. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity*. 2009;31(2):184-196.
- Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gamma-delta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):467-478.
- Bonneville M, Fournie JJ. Sensing cell stress and transformation through Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of the isoprenoid pathway metabolites. *Microbes Infect*. 2005;7(3):503-509.
- 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.
- Thedrez A, Sabourin C, Gertner J, et al. Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunol Rev*. 2007;215:123-135.
- Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(12):6879-6884.
- Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science*. 1998;279(5357):1737-1740.
- Spada FM, Grant EP, Peters PJ, et al. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med*. 2000;191(6):937-948.
- Flament C, Benmerah A, Bonneville M, Triebel F, Mami-Chouaib F. Human TCR-gamma/delta alloreactive response to HLA-DR molecules: comparison with response of TCR-alpha/beta. *J Immunol*. 1994;153(7):2890-2904.
- 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):3608-3613.
- 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):877-884.
- Pietschmann K, Beetz S, Welte S, et al. Toll-like receptor expression and function in subsets of human gammadelta T lymphocytes. *Scand J Immunol*. 2009;70(3):245-255.
- Angelini DF, Borsellino G, Pouput M, et al. FcgammaRIII discriminates between 2 subsets of Vgamma9Vdelta2 effector cells with different responses and activation pathways. *Blood*. 2004;104(6):1801-1807.
- Halary F, Peyrat MA, Champagne E, et al. Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing gamma delta T cell receptors by natural killer inhibitory receptors. *Eur J Immunol*. 1997;27(11):2812-2821.
- Das H, Groh V, Kuijl C, et al. MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity*. 2001;15(1):83-93.
- Nedellec S, Sabourin C, Bonneville M, Scotet E. NKG2D costimulates human Vgamma9Vdelta2 T cell antitumor cytotoxicity through protein kinase C θ -dependent modulation of early TCR-induced calcium and transduction signals. *J Immunol*. 2010;185(1):55-63.
- Trichet V, Benezech C, Dousset C, Gesnel MC, Bonneville M, Breathnach R. Complex interplay of activating and inhibitory signals received by Vgamma9Vdelta2 T cells revealed by target cell beta2-microglobulin knockdown. *J Immunol*. 2006;177(9):6129-6136.
- Colonna M, Navarro F, Bellon T, et al. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med*. 1997;186(11):1809-1818.
- Cosman D, Fanger N, Borges L, et al. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity*. 1997;7(2):273-282.
- Vitale M, Castriconi R, Parolini S, et al. The leukocyte Ig-like receptor (LIR)-1 for the cytomegalovirus UL18 protein displays a broad specificity for different HLA class I alleles: analysis of LIR-1 + NK cell clones. *Int Immunol*. 1999;11(1):29-35.
- Saverino D, Fabbi M, Ghiotto F, et al. The CD85/LIR-1/ILT2 inhibitory receptor is expressed by all human T lymphocytes and down-regulates their functions. *J Immunol*. 2000;165(7):3742-3755.
- Lamar DL, Weyand CM, Goronzy JJ. Promoter choice and translational repression determine cell type-specific cell surface density of the inhibitory receptor CD85j expressed on different hematopoietic lineages. *Blood*. 2010;115(16):3278-3286.
- Geronimi F, Richard E, Redonnet-Vernhet I, et al. Highly efficient lentiviral gene transfer in CD34+ and CD34+/38-/- cells from mobilized peripheral blood after cytokine prestimulation. *Stem Cells*. 2003;21(4):472-480.
- Shimizu Y, Geraghty DE, Koller BH, Orr HT, DeMars R. Transfer and expression of three cloned human non-HLA-A,B,C class I major histocompatibility complex genes in mutant lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(1):227-231.
- Colonna M, Samaridis J, Cella M, et al. Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. *J Immunol*. 1998;160(7):3096-3100.
- Davodeau F, Peyrat MA, Hallet MM, 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):1214-1223.
- Soderstrom K, Bucht A, Halapi E, et al. High expression of V gamma 8 is a shared feature of human gamma delta T cells in the epithelium of the gut and in the inflamed synovial tissue. *J Immunol*. 1994;152(12):6017-6027.
- Soderstrom K, Bucht A, Halapi E, et al. Human gamma delta T-cells in the epithelium of the gut and in the inflamed synovial tissue preferentially express the V gamma 8 T-cell receptor chain. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;756:406-409.
- Robak E, Blonski JZ, Bartkowiak J, Niewiadomska H, Sysa-Jedrzejowska A, Robak T. Circulating TCR gammadelta cells in the patients with systemic lupus erythematosus. *Mediators Inflamm*. 1999;8(6):305-312.
- Robak E, Niewiadomska H, Robak T, et al. Lymphocytes Tgammadelta in clinically normal skin and peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus and their correlation with disease activity. *Mediators Inflamm*. 2001;10(4):179-189.
- Taupin JL, Halary F, Dechanet J, et al. An enlarged subpopulation of T lymphocytes bearing two distinct gammadelta TCR in an HIV-positive patient. *Int Immunol*. 1999;11(4):545-552.
- Dechanet J, Merville P, Lim A, et al. Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest*. 1999;103(10):1437-1449.
- Halary F, Pitard V, Dlubek D, et al. Shared reactivity of V δ 2(neg) $\gamma\delta$ T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J Exp Med*. 2005;201(10):1567-1578.
- Knight A, Madrigal AJ, Grace S, et al. The role of Vdelta2-negative gamma-delta T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplants. *Blood*. 2010;116(12):2164-2172.
- Vermijlen D, Brouwer M, Donner C, et al. Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. *J Exp Med*. 2010;207(4):807-821.
- De Rosa SC, Mitra DK, Watanabe N, Herzenberg LA, Roederer M. Vdelta1 and Vdelta2 gammadelta T cells express distinct surface markers and might be developmentally distinct lineages. *J Leukoc Biol*. 2001;70(4):518-526.
- Hacker G, Kromer S, Falk M, Heeg K, Wagner H, Pfeffer K. V delta 1+ subset of human gamma delta T cells responds to ligands expressed by EBV-infected Burkitt lymphoma cells and transformed B lymphocytes. *J Immunol*. 1992;149(12):3984-3989.
- Bartkowiak J, Kulczyk-Wojdala D, Blonski JZ, Robak T. Molecular diversity of gammadelta T cells in peripheral blood from patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Neoplasma*. 2002;49(2):86-90.
- Brown D, Trowsdale J, Allen R. The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue Antigens*. 2004;64(3):215-225.
- Vivier E, Anfossi N. Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(3):190-198.

43. Dietrich J, Cella M, Colonna M. Ig-like transcript 2 (ILT2)/leukocyte Ig-like receptor 1 (LIR1) inhibits TCR signaling and actin cytoskeleton reorganization. *J Immunol.* 2001; 166(4):2514-2521.
44. Young NT, Waller EC, Patel R, Roghanian A, Austyn JM, Trowsdale J. The inhibitory receptor LILRB1 modulates the differentiation and regulatory potential of human dendritic cells. *Blood.* 2008;111(6):3090-3096.
45. Merlo A, Tenca C, Fais F, et al. Inhibitory receptors CD85j, LAIR-1, and CD152 down-regulate immunoglobulin and cytokine production by human B lymphocytes. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(6):705-712.
46. Geppert TD, Wacholtz MC, Patel SS, Lightfoot E, Lipsky PE. Activation of human T-cell clones and Jurkat cells by cross-linking class I MHC molecules. *J Immunol.* 1989;142(11):3763-3772.
47. Sambhara SR, Miller RG. Programmed cell death of T cells signaled by the T cell receptor and the alpha 3 domain of class I MHC. *Science.* 1991; 252(5011):1424-1427.
48. Amiryan N, Machy P. MHC class I molecules are implicated in costimulatory signals during TCR/CD3-induced activation. *Cell Immunol.* 1996;168(1):1-12.
49. Agrawal S, Marquet J, Freeman GJ, et al. Cutting edge: MHC class I triggering by a novel cell surface ligand costimulates proliferation of activated human T cells. *J Immunol.* 1999;162(3): 1223-1226.
50. Anfossi N, Doisne JM, Peyrat MA, et al. Coordinated expression of Ig-like inhibitory MHC class I receptors and acquisition of cytotoxic function in human CD8⁺ T cells. *J Immunol.* 2004;173(12): 7223-7229.

2) Résultats complémentaires et discussion : implication des molécules de CMH de classe I, costimulation ou coinhibition ?

Le mécanisme précis de la « costimulation » par les molécules de CMH de classe I n'a pas été étudié dans le cas du clone 73R9, mais le domaine intracellulaire de ces molécules a été décrit comme étant dépourvu de propriétés signalisatrices. Par ailleurs, les études mentionnant des événements de signalisation intracellulaire engendrés par le cross-link des molécules de CMH de classe I par des Acm spécifiques, attribuent cet effet à des molécules membranaires non identifiées, associées aux molécules de CMH de classe I, et capables de médier la transduction du signal d'aggrégation de ces molécules en une signalisation costimulatrice classique (**figure 30A**).

A. Costimulation classique



B. Coinhibition constitutive

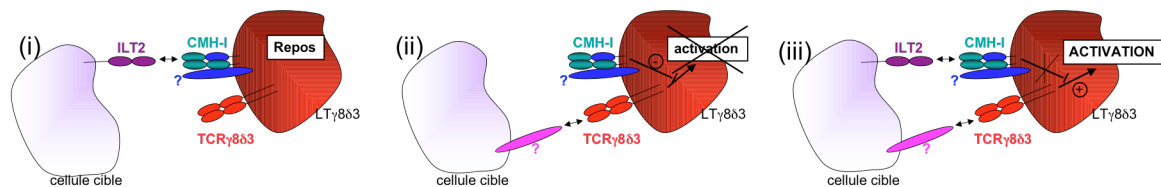


Figure 30 : Modèles d'implication des molécules de CMH-I dans l'activation TCR-dépendante des LTy8δ3.

(A) Dans le cas d'une costimulation classique (directe ou indirecte) de l'activation TCR-dépendante par les molécules de CMH de classe I, (i) l'aggrégation des molécules de CMH-I seules ne suffit pas à activer les LTy8δ3, (ii) si le seuil d'activation des LT est élevé, l'aggrégation des TCRs peut ne pas suffire au déclenchement d'une réponse effectrice efficace, et (iii) la costimulation peut alors être nécessaire à une activation TCR dépendante effective. (B) Dans le cas d'une coinhibition constitutive de l'activation TCR dépendante par les molécules de CMH de classe I, l'expression de l'ILT-2 par les cellules cibles (ex : ILT-2 exprimé ubiquitairement par les cellules saines hématopoïétiques), ou d'un ligand de TCRγ8δ3 (ex : ligand non identifié exprimé ubiquitairement par les cellules saines intra-épithéliale ?) ne suffit pas à l'activation des LTy8δ3. (iii) Seul la coexpression des deux ligands permet le déclenchement des fonctions effectrices du LTy8δ3 (co-expression uniquement en conditions pathologiques ?).

Pourtant, certains résultats préliminaires suggèrent que l'effet « costimulateur » de l'ILT2 sur le clone 73R9 par engagement des molécules de CMH-I est un phénomène tout à fait distinct de ceux précédemment décrits. En effet, l'augmentation de l'activation TCR-

dépendante du clone 73R9 en présence d'ILT2 exprimé à la surface de cellules cibles a pu être mimé par son incubation en présence d'anti-CMH-I, d'anti-b2m ou d'ILT2 recombinante, ajoutés à des anti-TCR ou anti-CD3 agonistes (non montré). Mais contre toute attente, alors que l'effet « costimulateur » des anti-CMH-I, anti-b2m ou de l'ILT2 sur l'activation TCR était maximal lorsque ces protéines étaient utilisées sous forme soluble, il était tout à fait indétectable sous cross-link (coating sur plaque, chargement sur P815, cross-link par anticorps secondaires).

Par ailleurs, alors que le clone 73R9 répondait très efficacement à des activations en présence d'ILT2 (ex : 721.221 ILT2pos), aucune activation en absence d'ILT2 n'était significative (ex : 721.221 ILT2neg) (**figure 4B article 1**). En particulier, les stimulations par des anti-TCR $\gamma\delta$ et anti-CD3 pourtant considérés comme de très puissants agonistes étaient quasiment indétectables (**figure 5A article 1** et non montré). Pourtant, le TCR $\gamma\delta$ 3 de ce clone était tout à fait fonctionnel puisque les Jrt3 l'exprimant répondaient fortement à ces mêmes stimulations, ainsi qu'à de nombreuses lignées tumorales d'origines principalement épithéliales (non montré).

Cet ensemble de résultats suggère donc que l'activation médiée par le TCR du clone 73R9 serait constitutivement inhibée, et que cette inhibition pourrait être levée par un engagement particulier des molécules du CMH de classe I par ILT2 (**figure 30B**). Ainsi, le CMH-I, au lieu d'être un co-stimulateur pourrait être un inhibiteur constitutif de certains TCR incluant celui du clone 73R9.

La large polyréactivité de la lignée Jrt3 73R9 contre des lignées tumorales d'origines diverses est probablement attribuable à une expression relativement ubiquitaire du ligand de TCR #73R9, notamment au niveau épithélial. Cet Ag, dont l'identification fait actuellement l'objet d'une étude dans l'équipe de J Déchanet, est donc probablement un Ag du Soi, comme la plupart des ligands de TCR $\gamma\delta$ décrits jusqu'à présent. Ainsi, l'inhibition constitutive par les molécules de CMH de classe I de réactivités TCR dirigées contre de tels ligands pourrait jouer un rôle crucial dans la prévention de réactions auto-immunes impliquant les LT $\gamma\delta$, largement décrits comme étant naturellement auto-réactifs.

III. EphA2 et stimulation de sous-populations V δ 1 chez l'homme

Modulation of T cell activation by EphA receptors recognized by $\gamma\delta$ TCR and/or Ephrins.

Couzi L¹, Déchanet-Merville J¹, Halary C¹, Netzer S¹, Pitard V¹, Willcox CR², Willcox BE².

¹ UMR CNRS 5164, Université de Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France.

² Birmingham Cancer Research UK Cancer Centre, School of Cancer Sciences, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham, United Kingdom.

Article à venir.

1) Introduction

L'équipe de Julie Déchanet, spécialisée dans l'étude de la réponse $\gamma\delta$ V δ 2-, a observé il y a quelques années une expansion polyclonale persistante de LT $\gamma\delta$ V δ 2 négatifs dans le sang périphérique de patients receveurs d'allogreffes d'organes, lorsque ceux-ci développaient une infection par le CMV (Dechanet et al., 1999), (Halary et al., 2005). Cette expansion a ensuite été corrélée à la résolution de l'infection CMV (Lafarge et al., 2001), ainsi qu'à une réduction du risque de carcinome chez ces patients (Couzi et al., 2010). Ces données cliniques, suggérant un rôle protecteur à la fois antiviral et anti-tumoral des LT $\gamma\delta$ V δ 2- ont alors été évaluées *in vitro*, par une étude approfondie de LT $\gamma\delta$ issus du sang périphérique de patients receveurs d'allogreffes d'organes.

Des populations polyclonales et des clones $\gamma\delta$ V δ 2- ainsi isolés se sont révélés capables d'être activés à la fois par des fibroblastes infectés par le CMV (Halary et al., 2005. JEM), et par des cellules épithéliales tumorales *in vitro* (Devaud et al., 2009). Ce type de réactivités pourrait participer à la fois à l'inhibition de la réplication virale du CMV *in vitro* (Halary et al., 2005) et *in vivo* (M Capone, non publié), et à l'inhibition du développement de xénogreffes de tumeurs coliques humaines *in vivo*, dans des modèles de souris immunodéficientes (Devaud et al., 2009). Cette double réactivité, dépendante du TCR $\gamma\delta$ au moins chez certains clones (Halary et al., 2005), (V Pitard non publiées),

pourrait être due à la reconnaissance d'Ag de stress communs à certains contextes infectieux et tumoraux. Ainsi, les populations V δ 2-, pourraient se rapprocher de leurs contre-partes V δ 2+, dont la large polyréactivité est attribuée à la reconnaissance TCR-dépendante d'une seule famille de molécules, la famille des PAg. Ces composés, sur-exprimés par les cellules du Soi dans de nombreuses conditions pathologiques telles que la transformation tumorale et l'infection (virale et bactérienne) sont considérés comme des Ag du Soi Altéré.

Ce travail s'inscrit dans projet à grande échelle, dont le but est d'identifier une série de ligands de TCR $\gamma\delta$ humains V δ 2-, exprimés à la fois par des cellules épithéliales tumorales et infectées par le CMV, et éventuellement dans d'autres contextes physiopathologiques, afin de mettre en exergue des modalités d'activations communes à différentes populations de LT $\gamma\delta$ V δ 2- et d'évaluer le potentiel immuno-thérapeutique éventuel de cette population cellulaire méconnue.

Les LT $\gamma\delta$ V δ 2-, dont la localisation est principalement épithéliale en conditions physiologiques, semblent être relocalisées et/ou amplifiées en périphérie dans certaines conditions pathologiques incluant l'infection CMV. Ce type d'amplifications polyclonales suggère la rencontre d'un ou plusieurs Ag particuliers capables d'activer spécifiquement une proportion extrêmement réduite de LT $\gamma\delta$ V δ 2-. Afin d'identifier les ligands de TCR $\gamma\delta$ impliqués dans ces phénomènes d'activations, une série de clones $\gamma\delta$ V δ 2 négatifs isolés à partir de sang périphérique de patients receveurs d'allogreffes d'organes, et présentant une double réactivité envers des cellules tumorales ou infectées par le CMV a été sélectionnée (Halary et al., 2005). Leurs TCRs, composés de diverses combinaisons de chaînes V γ et V δ ont été clonés et exprimés à la surface de lignées T Jurkat permettant d'en étudier la spécificité.

Ce projet, portant sur l'un de ces clones (#MAU, #MAU4 ou #5-4) exprimant un TCR composé des chaînes V γ 9 et V δ 1 (Halary et al., 2005), a permis d'identifier un nouveau ligand de TCR $\gamma\delta$ V δ 2- potentiel, l'EphA2, qui, exprimé à la surface de nombreuses cellules épithéliales tumorales, semble suffisant à leur reconnaissance spécifique par le clone #MAU. Les modalités fines de reconnaissance de cette protéine par le clone #MAU, ainsi que l'extension de cette réactivité à d'autres populations $\gamma\delta$ reste à être approfondie.

2) Matériels et méthodes

Voir matériels et méthodes **article 1**. Matériel et méthode additionnel :

Acs et réactifs

Les anti-EphA2, anti-EphA4 et isotype contrôle (polyclonal, chèvre) sont de chez RetD. Les anti-TCR $\gamma\delta$ (#IMMU510), anti-TCRV δ 1 (), anti-TCRV γ 9 (#IMMU360) de chez Beckman Coulter et le témoin isotypique (IgG1, souris) de chez BD biosciences. Les anti-efna1 et 4 sont de chez Santa Cruz Biotechnology, les anti-efna2, 3 et 5 de chez abcam et le témoin isotypique (polyclonal, lapin) de chez Dako.

l'anti-CD3 (IgG2a souris, #OKT3) vient de chez biolegend. Les protéines recombinantes EphA2 et EphA4 murines fusionnées avec un fragment Fc humain sont de chez RetD. La PIPLCy vient de chez Sigma Aldrich.

Lignées cellulaires

Les cellules adhérentes humaines : Jar, U373, HT29, Huh7, HeLa ev2, HeLa pf et murines : L-cells, 3T3, MEF, sont cultivées en DMEM4,5 complet. Les cellules non adhérentes humaines : Jurkat variant J.RT3-T3.5 (Jrt3), CEM, H9, Daudi, K562, 721.221, B-EBV et murines : P815, sont cultivées en RPMI complet.

Expression d'EphA2 par transduction cellulaire :

Le cDNA codant pour EphA2 a été cloné à partir d'extraits ARNm de la lignée humaine U373, dans un vecteur de production de particules lentivirales (**article 1**). Après production des particules, diverses lignées cellulaires ont été transduites (MOI = 3) puis triées sur la base de leur expression d'EphA2 (tri cytométrique, Aria). Les contrôles de transduction ont été obtenus par transduction de cDNA codant pour la protéine GFP.

3) Résultats

Le clone MAU reconnaît spécifiquement des lignées infectées par le CMV et des lignées tumorales par le biais de son TCR γ 9 δ 1

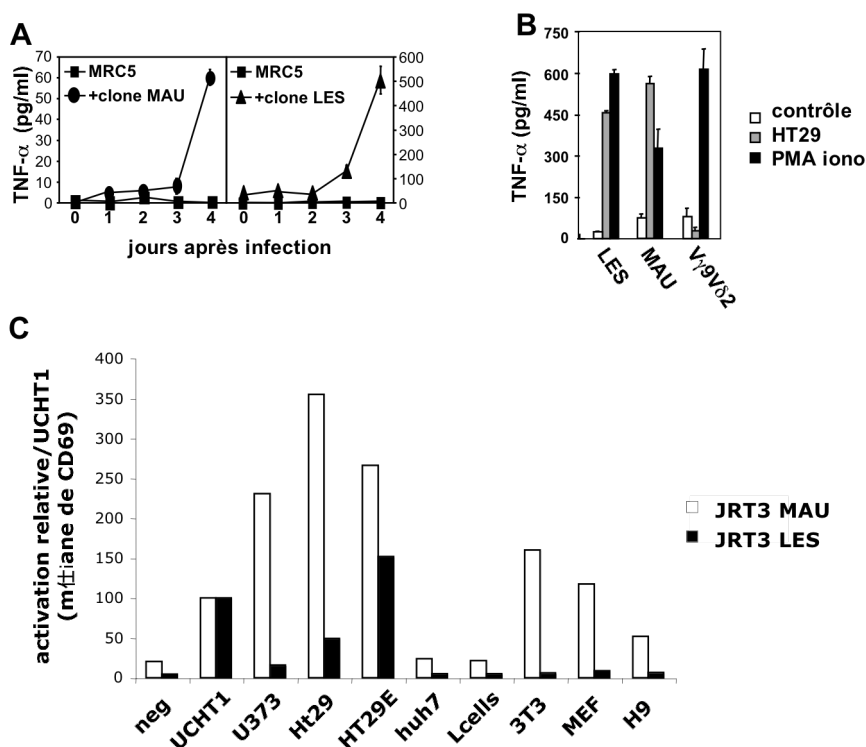


Figure 31 : La reconnaissance de lignées tumorales ou infectées CMV par le clone MAU est spécifique et dépendante du TCR γ 9 δ 1.

(A) Les cellules MRC5 ont été infectées par le CMV pendant 1 à 4 jours, puis cocultivées ou non avec les clones V γ 9V δ 1 MAU (gauche) ou V γ 4V δ 5 LES (droite) (Halary et al., 2005 modifié). (B) Les clones V γ 9V δ 1 MAU, V γ 4V δ 5 LES, et V γ 9V δ 2 ont été incubés en présence de la lignée HT29 ou du contrôle positif PMA ionomycine. La production de TNF α , quantifiée par ELISA, est présentée sous forme de moyennes de triplicates $\pm$ ET (Halary et al., 2005 modifié). (C) Les lignées Jurkat exprimant les TCR γ 9 δ 1 du clone MAU, ou γ 4 δ 5 du clone LES ont été incubées en présence de diverses lignées tumorales humaines ou murines, avant d'être marquées par un anti-CD69 et analysées en cytométrie de flux (V Pitard). La lignée HT29E correspond à une lignée HT29 surexprimant un ligand de TCR γ 4 δ 5 spécifique du clone LES.

Les clones MAU et LES (également référencés comme #5-4 et #4-29 respectivement), issus de deux patients transplantés CMV+, sont tous deux capables de reconnaître des lignées infectées par le CMV (**figure 31A**), ainsi que différentes lignées tumorales d'origines épithéliales (ex : SKCO1, HeLa, HT29, Caco2,...) (**figure 31B** et non montré), contrairement à d'autres populations $\gamma\delta$ dont les V γ 9V δ 2 (**figure 31B**). Le rôle du TCR dans ce type de reconnaissance a été examiné par transfert des chaînes TCR de chacun de ces clones dans la lignée Jurkat (variant JrT3-T3.5), afin d'obtenir une lignée

reporter de la reconnaissance médiée spécifiquement par le TCR $\gamma\delta$ de ces clones. Ainsi, les lignées Jurkat exprimant le TCR $\gamma\delta$ 1 du clone MAU, ou le TCR $\gamma\delta$ 5 du clone LES ont permis de mettre en évidence le rôle de ces TCR $\gamma\delta$ dans la plupart des phénomènes de reconnaissance de lignées tumorales épithéliales et infectées CMV par les clones associés. Par ailleurs, la comparaison des réactivités de ces deux lignées Jurkat contre diverses lignées tumorales ou infectées a montré que les TCR $\gamma\delta$ 1 et $\gamma\delta$ 5 portaient chacun une spécificité envers des contextes d'activation distincts (**figure 31C** et non montré). En particulier, la lignée Jurkat $\gamma\delta$ 1 a révélé une large polyréactivité envers diverses lignées tumorales adhérentes d'origines humaines et murines (**figure 31C**), alors que son activation n'était détectable pour aucune des lignées non adhérentes testées (ex : lignée H9 **figure 31C** et non montré). Par la suite, la réactivité du clone LES a été analysée en détail, et un ligand de son TCR $\gamma\delta$ 5 a été identifié. Les outils associés à ce clone seront fréquemment utilisés pour contrôler la spécificité de ceux développés pour le clone MAU dans cette étude.

L'Ac #6G8 bloque spécifiquement les reconnaissances médiées par le TCR $\gamma\delta$ 1 du clone MAU

Dans le but d'identifier un ligand de TCR $\gamma\delta$ 1 pouvant expliquer la polyréactivité du clone MAU et de la lignée Jurkat associée, la lignée humaine de glioblastome U373, efficacement reconnue de manière TCR-dépendante par le clone #MAU et la lignée Jurkat associée (**figure 31C** et non montré), a été utilisée dans un protocole d'immunisation chez la souris. Par la suite, des hybridomes murins produisant des Acm potentiellement dirigés contre un ligand de TCR $\gamma\delta$ 1 ont été générés, et leurs surnageants ont été criblés sur la base de leur capacité à bloquer la reconnaissance de la lignée U373 par la lignée Jrt3 MAU. L'Ac #6G8 ainsi sélectionné s'est révélé capable de marquer de nombreuses lignées tumorales adhérentes humaines, et d'inhiber l'activation de la lignée Jrt3 MAU par ses cellules cibles humaines (**figure 32A**). Par ailleurs, cet Acm ne marquait aucune des lignées murines testées, et n'avait pas d'effet bloquant sur la réactivité de la Jrt3 MAU contre ses cibles murines (non montré). Cette observation suggérerait que le ligand reconnu sur les lignées humaines soit distinct de celui reconnu sur les lignées murines ou peu conservé entre les deux espèces, ou encore que ce ligand soit conservé entre les deux espèces, mais naturellement exprimé chez la souris et considéré comme un Ag du Soi

contre lequel l'Acm murin ne serait pas cross réactif. En outre, une lignée HT29 particulière exprimant un ligand du TCR $\gamma\delta$ 5 (HT29E), et capable d'activer à la fois la lignée Jrt3MAU et la lignée Jrt3LES, a permis de s'assurer de la spécificité de ce blocage. En effet, l'Ac #6G8 était capable d'inhiber la reconnaissance de la lignée HT29E par les Jrt3MAU sans affecter sa reconnaissance par les Jrt3LES (**figure 32B**). A l'inverse, un Acm dirigé contre le ligand de TCR $\gamma\delta$ 5 (#2E9) exprimé par la lignée HT29E et capable de bloquer la reconnaissance de cette lignée par les Jrt3LES, mais n'avait aucun effet sur la reconnaissance de cette même lignée par les Jrt3 $\gamma\delta$ 1MAU (**figure 32B**).

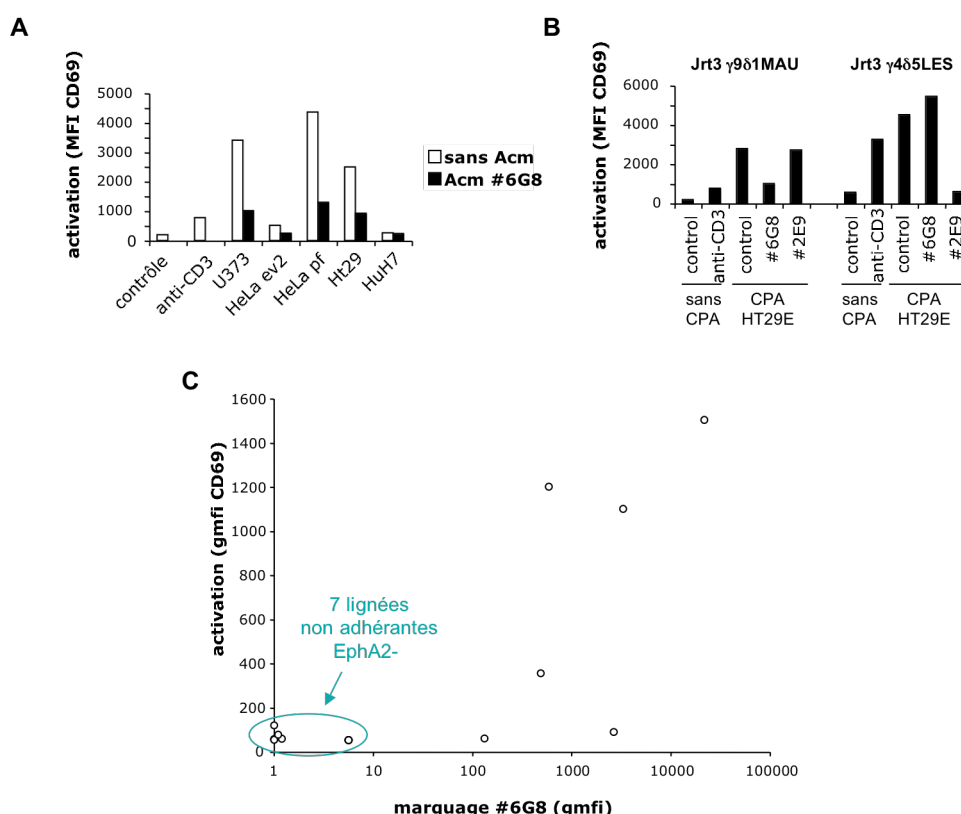


Figure 32 : L'Acm #6G8 reconnaît une molécule participant de manière cruciale et spécifique à l'activation de la lignée Jrt3 $\gamma\delta$ 1 MAU.

Parmi différents hybridomes murins générés suite à une immunisation par la lignée tumorale U373, l'hybridome #6G8 a été sélectionné pour sa capacité à produire un Acm capable de bloquer sélectivement la réactivité de la Jrt3 $\gamma\delta$ 1 MAU. (**A**) La lignée Jrt3 MAU a été cocultivée avec différentes lignées tumorales en présence (barres noires) ou non (barres blanches) du surnageant de l'hybridome #6G8. (V Pitard) (**B**) Les lignées Jrt3 MAU (gauche) et LES (droite) ont été activées par la lignée HT29E, en présence de surnageants d'hybridomes #6G8 ou #2E9. Leur niveau d'expression du marqueur d'activation CD69 a ensuite été analysé par cytométrie de flux (V Pitard) (**C**) 7 lignées non adhérentes et 6 lignées adhérentes ont été marquées par l'Acm #6G8 ou utilisées dans un test d'activation de la lignée Jrt3 MAU afin d'analyser la corrélation entre ces deux paramètres.

De manière importante, l'Acm #6G8 n'était pas capable de marquer les cellules Jurkat ni aucune autre lignée humaine non adhérente, alors que toutes les cellules adhérentes reconnues par la lignée Jrt3 MAU étaient marquées par cet Acm. La réactivité

de la lignée Jrt3 MAU contre diverses lignées humaines était donc globalement corrélée avec le marquage de ces lignées par l'Acm #6G8 (**figure 32C**).

Cet ensemble de résultats suggère donc que l'Acm #6G8 a pour cible une molécule participant spécifiquement à l'activation de la lignée Jrt3 MAU, exprimée par de nombreuses lignées humaines adhérentes, et a conduit à caractériser la cible de cet Acm, dans le but d'identifier un éventuel ligand de TCR γ 9 δ 1.

L'Acm #6G8 reconnaît spécifiquement la protéine humaine EphA2, partenaire spécifique et crucial de l'activation de la lignée Jrt3 MAU

En collaboration avec le groupe de B. Willcox (Birmingham, UK), une étude protéomique a été réalisée afin d'identifier la molécule ciblée par l'Ac #6G8. Des immunoprécipitations par l'Acm #6G8 à partir de lysats de différentes cellules ont permis de mettre en évidence une protéine de 130 kDa, immunoprécipité à partir des lysats de cellules adhérentes reconnues par la lignée Jrt3 γ 9 δ 1 (HeLa et U373), mais absente des lysats de cellules non adhérentes humaines non reconnues (K562 et Daudi) (**figure 33A**). Par spectrométrie de masse, le micro-séquençage de cette protéine a conduit à l'identification de l'EphA2 humain comme étant la cible de l'Acm #6G8 (non montré). Ce résultat a pu être confirmé par des expériences de compétitions entre l'Acm #6G8 et un Ac polyclonal commercial dirigé contre l'EphA2 (**figure 33B**), ainsi que par l'acquisition du marquage par l'Acm #6G8 après expression de l'EphA2 humain dans une lignée non adhérente (lignée 721.221 EphA2 négative) (**figure 33C**). En outre, l'anti-EphA2 commercial s'est révélé capable de bloquer l'activation de la lignée Jrt3 MAU par ses lignées cibles bien plus efficacement que l'Acm #6G8 (**figure 33C**). L'Acm #6G8 reconnaît donc spécifiquement l'EphA2, exprimé à la surface de nombreuses cellules adhérentes humaines. Par contre, il n'est pas cross réactif contre l'EphA2 murins, en accord avec la génération de cet Acm dans des souris exprimant naturellement l'EphA2.

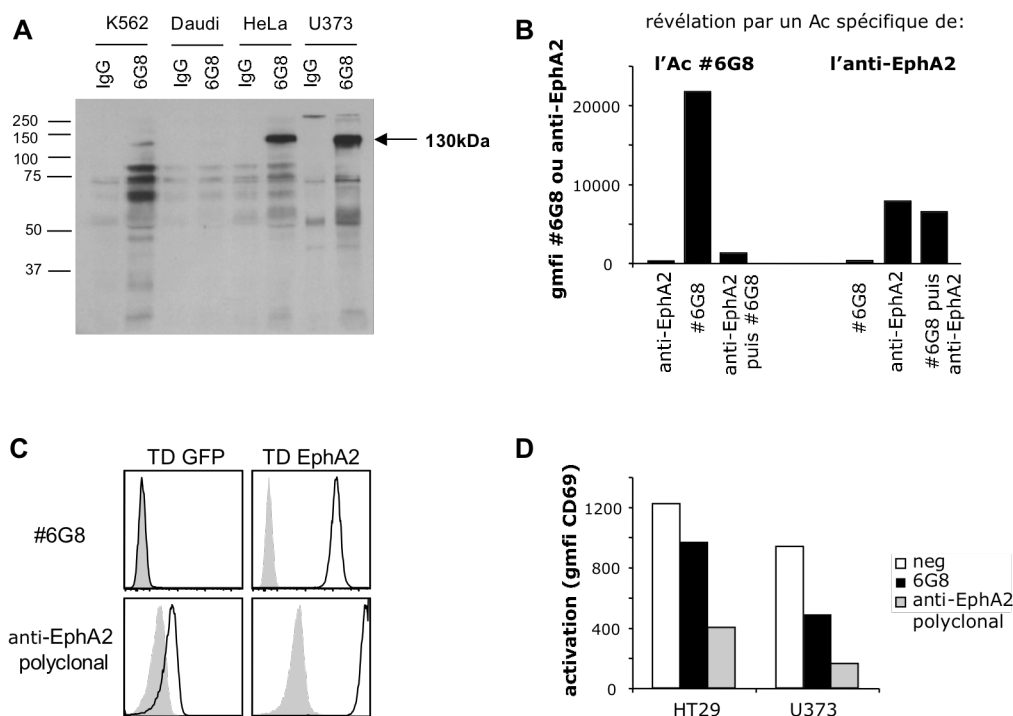


Figure 33 : L'Acm #6G8 reconnaît spécifiquement la protéine EphA2 humaine.

(A) Profil d'immunoprécipitation de l'Acm #6G8 à partir de lysats de lignées humaines reconnues (HeLa et U373) ou non (K562 et Daudi) par la lignée Jrt3 MAU, révélation ? biotine ? (C Willcox) (B) Compétition entre l'Acm #6G8 et un anti-EphA2 polyclonal commercial pour le marquage membranaire de la lignée U373. Les cellules sont incubées successivement avec les deux Acs purifiés ou les isotypes correspondants dans l'ordre indiqué, puis le marquage est révélé par un Ac secondaire spécifique de l'un ou de l'autre de ces Acs, et analysé en cytométrie de flux. (V Pitard) (C) Les lignées 721.221, transduites avec le cDNA de l'EphA2 humain ou un cDNA contrôle GFP, ont été marquées avec l'Acm #6G8, un anti-EphA2 commercial (histogrammes en traits pleins), ou les contrôles isotypiques correspondants (histogrammes grisés), et analysées en cytométrie de flux. (D) La lignée Jrt3 MAU a été incubée avec les lignées HT29 ou U373, en présence de l'Acm #6G8 ou d'un anti-EphA2 commercial. L'expression du marqueur d'activation CD69 est analysée sur les Jrt3 en cytométrie de flux.

EphA2 est reconnu spécifiquement par la lignée Jrt3 MAU

Alors qu'une corrélation entre l'expression de l'EphA2 à la surface de cellules cibles et leur reconnaissance par la lignée Jrt3 MAU avait pu être mise en évidence dans le cas de cibles humaines (marquages par l'Acm #6G8) (**figure 33C**), l'anti-EphA2 commercial capable de reconnaître l'EphA2 humain et murin a permis d'étendre cette corrélation aux lignées murines (non montré). Par ailleurs, cet Ac s'est révélé capable d'inhiber spécifiquement la réactivité de la lignée Jrt3 MAU contre toutes ses cellules cibles, humaines et murines, bien plus efficacement que l'Acm #6G8 (**figure 33D** et non montré).

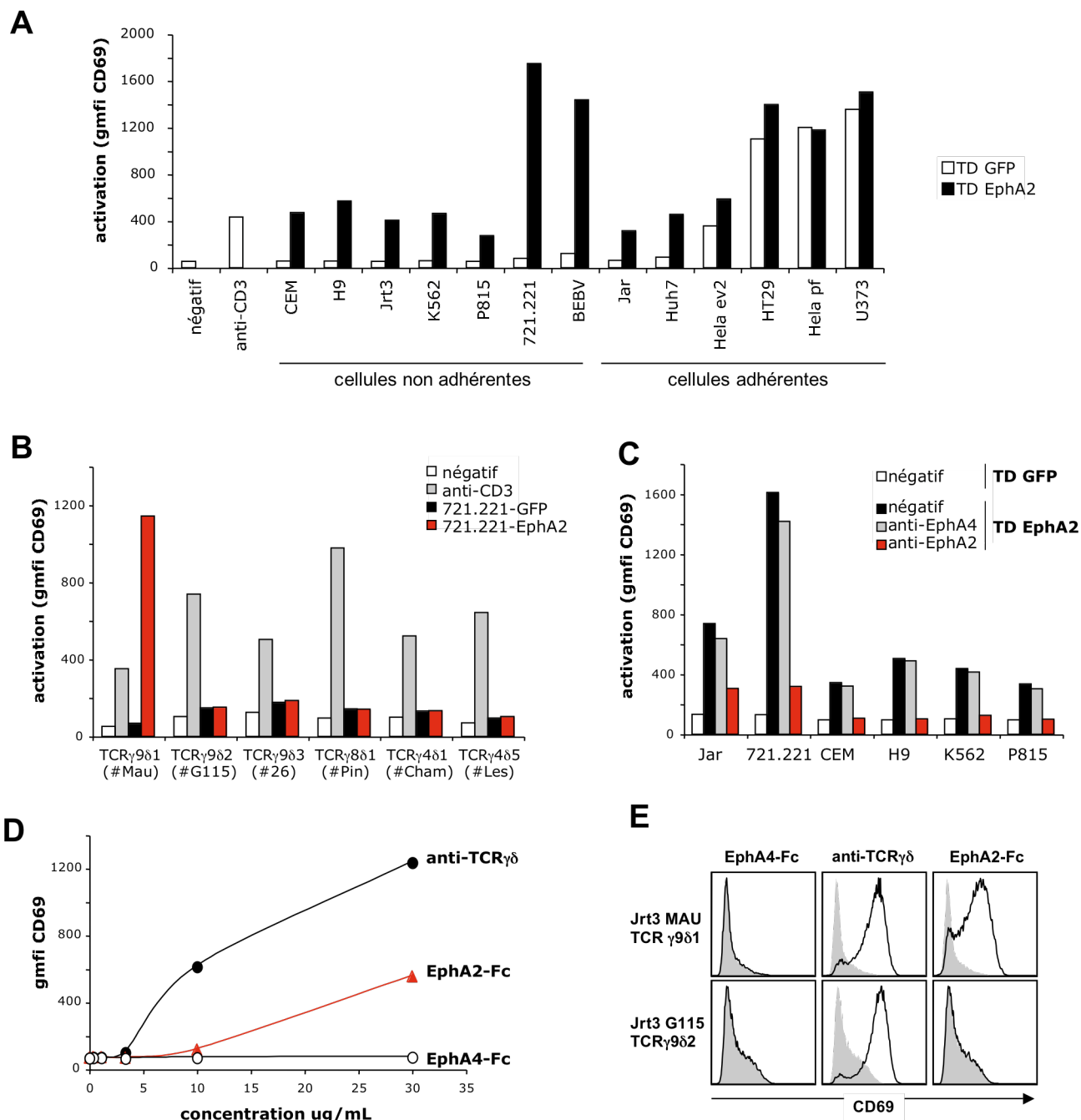


Figure 34 : EphA2 est un activateur spécifique de la lignée Jrt3 MAU.

(A) La lignée Jrt3 MAU a été cultivée en présence de diverses lignées, adhérentes ou non, transduites par le cDNA codant pour la protéine humaine EphA2 ou par un cDNA contrôle codant pour la GFP. (B) Des lignées Jrt3 exprimant divers TCR γ δ ont été incubées en présence d'un anti-CD3 agoniste, ou de la lignée 721.221 transduite avec un cDNA codant pour l'EphA2 humain ou la GFP. (C) La lignée Jrt3 MAU a été activée par diverses lignées exprimant l'EphA2 humain ou la GFP en présence d'anti-EphA2 ou d'anti-EphA4 polyclonal. (D) La lignée Jrt3 MAU a été incubée en présence de gammes d'anti-TCR γ δ , d'EphA2 murin recombinant, ou d'EphA4 murin recombinant, coâté sur plaque. (E) Les lignées Jrt3 MAU ou G115 ont été incubées en présence d'anti-TCR γ δ , d'EphA2 ou d'EphA4 murin recombinant, coâté sur plaque. (A) (B) (C) (D) (E) L'expression du marqueur d'activation CD69 par les Jrt3 a été analysée en cytométrie de flux par immunomarquage.

En outre, la surexpression d'EphA2 sur les lignées adhérentes exprimant EphA2 mais incapables d'activer la lignée Jrt3, ou encore l'expression d'EphA2 à la surface de cellules non adhérentes (EphA2 négatives), a conduit dans tous les cas à une reconnaissance de ces cellules cibles par la lignée $\gamma 9\delta 1$ spécifiquement (**figure 34A**). De plus, toutes ces réactivités étaient fortement inhibées par l'anti-EphA2 polyclonal, alors qu'un anti-EphA4 polyclonal, spécifique d'une protéine très proche de l'EphA2 n'avait aucun effet (**figure 34B**). Finalement, de l'EphA2 recombinant murin coaté sur plaque était capable d'activer spécifiquement la lignée Jrt3 $\gamma 9\delta 1$, mais aucune autre lignée Jrt3 $\gamma \delta$ (**figure 34D et E**). De l'EphA4 coaté sur plaque, ou encore de l'EphA2 soluble n'avaient par ailleurs aucun effet activateur (**figure 34D et E** et non montré).

L'ensemble de ces données suggère donc un rôle nécessaire et suffisant d'EphA2 murin et humain dans l'activation spécifique de la lignée Jrt3 MAU. Par ailleurs, l'absence de réactivité de la lignée Jrt3 contre certaines cellules humaines exprimant de l'EphA2 membranaire peut être attribuée à un manque de sensibilité de la lignée Jrt3 (seuil d'activation élevé), ou encore à un masquage de l'épitopes d'EphA2 reconnue, par association entre EphA2 et d'autres molécules à la surface de certaines cellules cibles.

La reconnaissance d'EphA2 par la lignée Jrt3 MAU est dépendante des chaînes V γ 9 et V δ 1 du TCR $\gamma 9\delta 1$

Au vu de la grande spécificité de réactivité de la lignée Jrt3 MAU contre EphA2 comparé à d'autres Jrt3, nous avons ensuite examiné le rôle du TCR $\gamma 9\delta 1$ dans la reconnaissance de l'EphA2. L'analyse de la signalisation spécifique du TCR par l'étude de la phosphorylation du CD3z au cours de l'activation par EphA2 (OO, CH, non montré), ainsi que des études de biacore (BW, CW, non montré) n'ont pas permis de mettre en évidence d'interaction directe entre le TCR $\gamma 9\delta 1$ du clone MAU et EphA2. Par contre, des Acm dirigés contre les chaînes variables du TCR de la lignée Jrt3 MAU se sont révélés capables d'inhiber sa réactivité contre EphA2 (**figure 35A**). De plus, la génération de lignées Jrt3 exprimant des TCR chimériques associant la chaîne V γ 9MAU à d'autres chaînes V δ , ou encore la chaîne V δ 1MAU à d'autres V γ , ont permis de confirmer le rôle du TCR $\gamma 9\delta 1$ dans ce processus (**figure 35B**). En effet, alors qu'aucun autre TCR $\gamma \delta$ que celui du clone MAU n'avait fait preuve de réactivité contre EphA2, l'association entre la chaîne V γ 9MAU et une autre chaîne V δ 1, ou entre la chaîne V δ 1MAU et une chaîne V γ 8

ou V γ 4 formait des TCR $\gamma\delta$ capables de reconnaître des lignées exprimant l'EphA2 humain (**figure 35B**), ou de l'EphA2 murin recombinant coâté sur plaque (non montré).

Ainsi, malgré l'absence de preuves formelles d'une interaction entre EphA2 et le TCR $\gamma\delta$ 1 du clone MAU, nous avons pu mettre en évidence le rôle central du TCR $\gamma\delta$ 1 dans la reconnaissance de l'EphA2 par la lignée Jrt3 MAU. Par ailleurs, l'EphA2-Fc, mais également l'EphA4 murin recombinant étaient capables d'interagir directement avec la membrane des Jrt3 exprimant ou non des TCR $\gamma\delta$ (non montré), et la fixation de l'EphA2 à la surface des Jrt3 MAU n'était inhibée par aucun anti-TCR $\gamma\delta$ ou anti-CD3 (non montré). Ceci suggérait l'éventuelle implication d'autres molécules que le TCR $\gamma\delta$ 1 dans la reconnaissance d'EphA2 par les Jrt3.

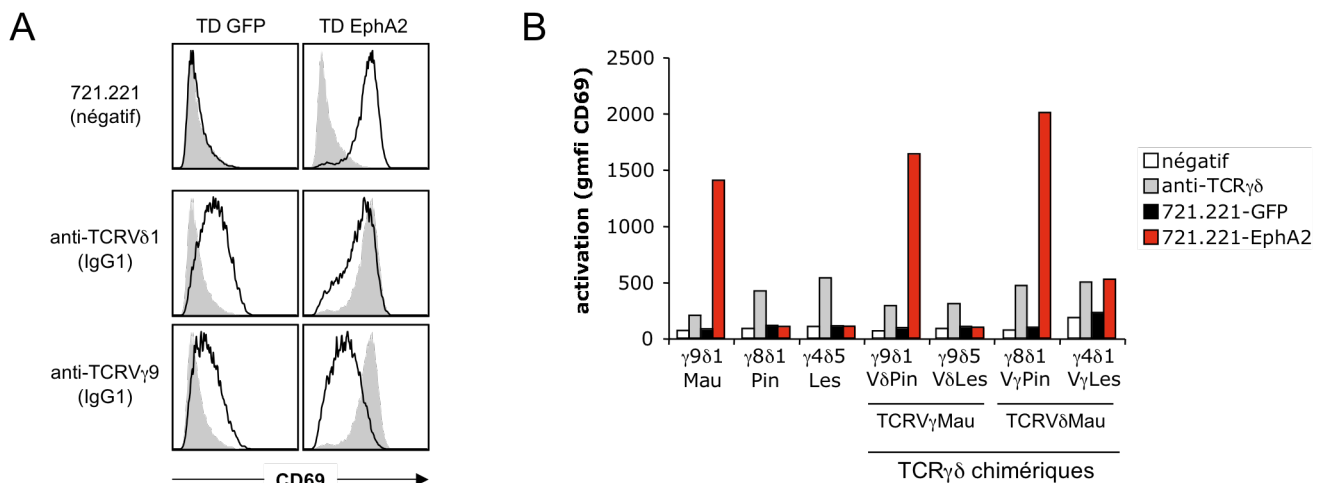


Figure 35 : Implication du TCR $\gamma\delta$ 1 dans la reconnaissance d'EphA2 par la lignée Jrt3 MAU.

(A) La lignée Jrt3 MAU a été activée par les lignées 721.221 transduites avec un cDNA codant pour la GFP ou pour EphA2 humain, en présence ou non d'anti-TCR dirigés contre les chaînes V γ 9 et V δ 1 du TCR MAU. L'expression du marqueur d'activation CD69 à la surface des Jrt3 a été analysée en cytométrie de flux après immunomarquage. Les deux panneaux du haut présentent l'activation des Jrt3 MAU par les lignées 721.221 (histogrammes en traits pleins) comparé au témoin négatif (histogrammes grisés). Les quatre panneaux du bas montrent l'effet d'anticorps spécifiques des chaînes TCR (histogrammes en traits pleins) sur l'activation des Jrt3 par les 721.221, comparé à l'effet d'Acm contrôles (histogrammes grisés). (B) Les lignées Jrt3 exprimant divers TCR $\gamma\delta$ ont été activées en présence d'anti-TCR $\gamma\delta$ activateur ou de cellules 721.221 exprimant ou non l'EphA2. L'expression du marqueur d'activation CD69 à la surface des Jrt3 a été analysée en cytométrie de flux après immunomarquage.

Les efn participent à la reconnaissance d'EphA2 par la lignée Jrt3 MAU

EphA2 ainsi que d'autres protéines apparentées comme EphA4 sont connues pour interagir avec une famille de protéines liées à la membrane plasmique par une ancre GPI, les éphrines A (efna1 à 5) (ref). Les efna1, efna3 et efna4 étant détectables à la surface des cellules Jrt3 (non montré), nous avons voulu évaluer l'implication de ces protéines dans la reconnaissance d'EphA2 par les Jrt3 MAU. À cette fin, nous avons mis à profit les propriétés de l'enzyme PIPLCy, capable de digérer spécifiquement les ancres GPI. Le traitement des cellules Jrt3 γ 9 δ 1 par la PIPLCy s'est révélé capable d'abroger la fixation d'EphA2 et d'EphA4 à la membrane des cellules Jrt3 (**figure 36A** et non montré). Ce traitement, également capable de digérer d'autres protéines à ancre GPI comme le CD59, n'avait aucun effet sur des protéines transmembranaires comme le CD3 ou le TCR (**figure 36A** et non montré). Ainsi, la fixation d'EphA2-Fc à la surface des cellules Jrt3 était due à des protéines à ancres GPI, et plus probablement aux éphrines A exclusivement. En particulier, après traitement PIPLCy, aucune fixation résiduelle d'EphA2-Fc n'était visible à la surface des Jrt3 MAU (**figure 36A**), confirmant la faiblesse de l'éventuelle interaction entre EphA2-Fc et TCR γ 9 δ 1. L'implication des éphrines dans la reconnaissance d'EphA2 par les Jrt3 a ensuite été évaluée par activation, en présence d'EphA2 recombinant, de la lignée Jrt3 MAU prétraitée par différentes doses de PIPLCy. Ce traitement inhibait significativement la reconnaissance d'EphA2 par les Jrt3 MAU, sans avoir d'effet sur l'activation par un anti-CD3 (**figure 36B**). Pourtant, alors que l'expression membranaire des éphrines A n'était plus détectable après traitement à dose saturante de PIPLCy (**figure 36A** 0,1U/mL), l'activation des Jrt3 MAU par EphA2 restait très significative (**figure 36B**). Par ailleurs, l'incubation des Jrt3 MAU avec divers anti-efna activateurs n'a pas permis de mimer l'effet activateur de l'EphA2 (**figure 36C**).

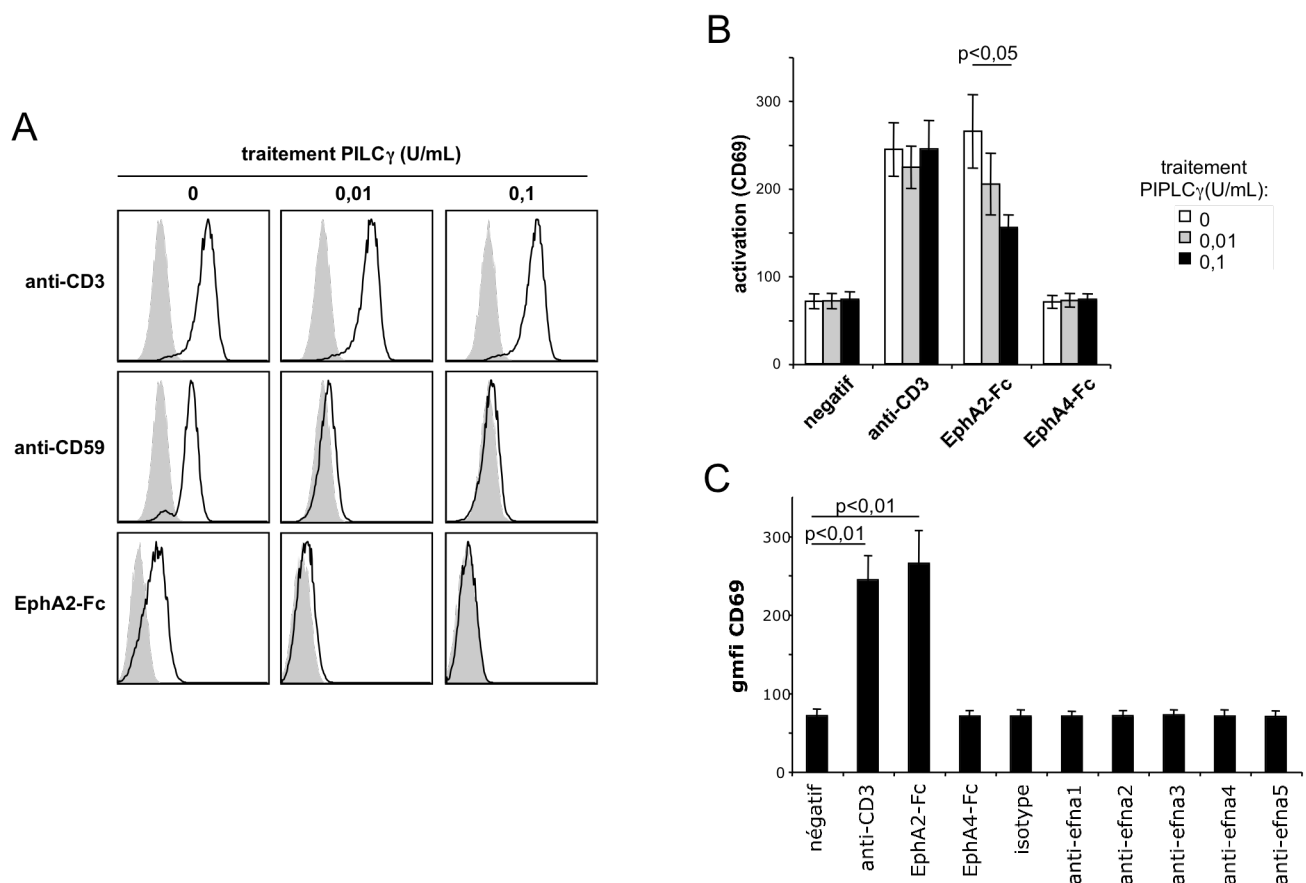


Figure 36 : Implication des efna dans la reconnaissance d'EphA2 par les Jrt3 MAU.

Les Jrt3 MAU ont été incubées pendant 1h à 37°C en RPMI en présence de différentes concentrations de PIPLC γ . Les cellules lavées ont ensuite été **(A)** marquées par des anti-CD3, anti-CD59 ou EphA2 et analysées en cytométrie de flux, ou **(B)** utilisées dans un test d'activation en présence d'anti-CD3, d'EphA2-Fc ou d'EphA4-Fc coatés sur plaque. Les Jrt3 MAU ont été incubées en présence d'anti-CD3, d'EphA2-Fc et d'EphA4-Fc recombinants murins, d'anti-efna1 à 5, ou d'isotype contrôle, coatés sur plaque. **(B)** et **(C)** L'expression du marqueur d'activation CD69 a été analysée en cytométrie de flux après immunomarquage. Les données sont présentées sous forme de moyennes de 4 expériences indépendantes +/- ET.

Cet ensemble de résultats suggère donc une reconnaissance d'EphA2 par les Jrt3 MAU médiée spécifiquement par le TCR γ 9 δ 1, et renforcée significativement par un co-engagement impliquant des efna.

4) Discussion

Ce travail de recherche a permis d'identifier un nouvel acteur potentiellement central dans l'activation spécifique de sous-populations de LT $\gamma\delta$ V δ 2neg. Les modalités fines de la reconnaissance de l'EphA2 par les LT $\gamma\delta$ sont encore peu claires, et pourraient impliquer une interaction conjointe avec le TCR $\gamma\delta$ et les efna exprimées à la surface des LT $\gamma\delta$. La pertinence physiologique de cette reconnaissance n'a pas encore été évaluée, en raison d'un problème d'accessibilité à des populations $\gamma\delta$ naturellement réactives à EphA2, probablement localisées exclusivement dans certains épithélia.

Interaction entre EphA2 et TCR V γ 9V δ 1 MAU ?

L'implication du TCR $\gamma\delta$ 1 MAU dans la reconnaissance d'EphA2 a été mise en évidence par transfert de TCR dans la lignée Jrt3, et par utilisation d'Acms bloquants dirigés contre les chaînes variables de TCR V γ 9 et V δ 1. Pourtant, aucune des techniques utilisées n'a pas permis de détecter de signalisation spécifique du TCR lors de l'activation des Jrt3 MAU par EphA2, ni d'interaction directe entre le TCR $\gamma\delta$ 1 et EphA2.

L'un des obstacles majeurs rencontré par la plupart des équipes travaillant à l'identification de nouveaux ligands de TCR $\gamma\delta$, est l'extrême faiblesse des interactions entre les TCR $\gamma\delta$ et leurs ligands. Ainsi, parmi les nombreux ligands de TCR $\gamma\delta$ suspectés, très peu ont formellement été identifiés par interaction directe avec un TCR $\gamma\delta$. Notre échec est donc probablement imputable à ce problème récurrent, et de nouvelles techniques biochimiques plus sensibles pourraient à l'avenir permettre d'identifier formellement l'EphA2 comme un nouveau ligand de TCR $\gamma\delta$.

Rôle des efna dans la reconnaissance d'EphA2 par la lignée Jrt3 MAU

La reconnaissance d'EphA2 par les LT $\gamma\delta$ pourrait également impliquer les efna, une famille de protéines largement décrites comme interagissant avec EphA2, et dont certains membres sont naturellement exprimés à la surface des LT $\gamma\delta$ *ex vivo* (notamment efna1 et 4, non montré). La reconnaissance d'EphA2 par les efna n'est pas suffisante pour l'activation des Jrt3 MAU par EphA2, puisque les efna interagissant avec EphA2

intéragissent également avec la protéine apparentée mais non-activatrice EphA4, et que des anti-efna pourtant activateurs dans d'autres contextes (non montré) ne permettent pas de mimer l'activation des Jrt3 par EphA2. Par ailleurs, les efna ne sont peut-être pas nécessaires à la reconnaissance d'EphA2 par les Jrt3 MAU, puisque cette reconnaissance reste très significative après digestion des efna à la surface des Jrt3. Cette hypothèse sera vérifiée dans un proche avenir par l'extinction de l'expression des efna à la surface des Jrt3 (shRNA), manipulation qui permettra également d'évaluer le rôle respectif des différentes efna potentiellement exprimées par les LT dans ce phénomène.

Pour le moment, le mode d'action des efna dans la reconnaissance d'EphA2 par les Jrt3 MAU reste obscur. En effet, la signalisation par les efna n'a pas été formellement mise en évidence, mais est seulement suggérée par quelques études. Par ailleurs, ces protéines sont largement impliquées dans divers phénomènes d'adhésions. En outre, l'EphA2 pourrait interagir à la fois avec le TCR $\gamma\delta$ et les efna, mais cette éventuelle interaction tripartite n'a pu être détectée par biacore (BW, CW non montré).

Les efna pourraient donc être impliquées dans l'activation des Jrt3 MAU par EphA2 en tant que costimulateurs, molécules d'adhésion, ou encore corécepteurs du TCR. Ces différents modes d'action hypothétiques seront notamment évalués par (i) l'étude des voies de signalisation déclenchées en présence d'anti-efna et/ou anti-TCR (Western Blot), (ii) l'étude des interactions cellulaires impliquant les efna et/ou le TCR (vidéomicroscopie), (iii) l'étude des interactions moléculaires entre efna, TCR, EphA2 (vidéomicroscopie, biochimie).

Réactivité anti-EphA2 généralisable à d'autres TCR V δ 1 ?

Alors que chacune des chaînes TCR du clone MAU a permis de créer des TCR $\gamma\delta$ chimériques réactifs contre EphA2, il est peu probable que ces deux chaînes TCR soient capables, indépendamment l'une de l'autre, de porter la réactivité contre EphA2. De plus, le TCR formé par l'association entre la chaîne V γ 9MAU et une chaîne V δ 5 n'a pas montré de réactivité contre EphA2. Il est donc plus probable d'envisager que la reconnaissance d'EphA2 soit principalement due à des déterminants majeurs partagés entre plusieurs chaînes d1 (notamment V δ 1MAU et V δ 1PIN), ainsi qu'à des déterminants antigéniques mineurs apportés par un nombre restreint de chaînes V γ spécifiques à chaque chaîne V δ 1. Pour le moment, aucune lignée Jrt3 exprimant un TCR naturel V δ 1 autre que le TCR

MAU n'a montré de réactivité contre EphA2 (**figure 31B** et non montré). Pourtant, il semble que la chaîne TCRV δ 1 PIN soit également capable, une fois associée à certaines chaînes Vy, de conférer une réactivité anti-EphA2.

Il serait donc intéressant d'étendre l'étude de la réactivité anti-EphA2 à un nombre plus important de Jrt3 exprimant des TCRV δ 1 naturels, ainsi qu'à divers TCR $\gamma\delta$ chimériques composés des chaînes Vy9MAU, V δ 1MAU ou V δ 1PIN appariées à diverses chaînes V δ et Vy respectivement. Cette analyse permettrait de confirmer le rôle central de la chaîne V δ 1, et d'évaluer plus précisément les déterminants antigéniques V δ 1 et Vy nécessaires à la reconnaissance d'EphA2 par les Jrt3 TCR $\gamma\delta$.

En outre, il apparaît crucial de rechercher des populations de LT $\gamma\delta$ réactives contre EphA2, afin de confirmer les données obtenues avec les cellules Jrt3, et d'étudier l'impacte de ce type d'activation sur la biologie des LT $\gamma\delta$ dans différents contextes physiopathologiques. Jusqu'à présent, toutes les tentatives visant à détecter des populations $\gamma\delta$ réactives contre EphA2 au sein de PBMCs ont échoué (non montré). Cette recherche mériterait d'être étendue à d'autres types d'échantillons biologiques humains incluant des épithélia, principaux lieux de résidence des LT $\gamma\delta$ V δ 2neg.

Pertinence physiologique de la reconnaissance d'EphA2 par une sous-population de LT $\gamma\delta$.

Pour le moment, les familles de protéines EphA et efna ont principalement été impliquées dans divers processus développementaux (neurogénèse, croissance tumorale,...) (Pasquale, 2008), et leur rôle au cours de la réponse immunitaire est très peu étudié.

Pourtant, l'augmentation de l'expression membranaire d'EphA2 a été corrélée avec la transformation tumorale de cellules tumorales épithéliales (Easty et al., 1995; Nemoto et al., 1997; Ogawa et al., 2000; Walker-Daniels et al., 1999; Zelinski et al., 2001), ou encore la différenciation des DCs (de Saint-Vis et al., 2003). Pour revue, voir (Tandon et al., 2011). La reconnaissance de ces contextes pathologiques par les LT $\gamma\delta$ spécifiques d'EphA2 pourrait ainsi jouer un rôle dans la surveillance des tumeurs ou dans la réponse immunitaire anti-infectieuse.

Par ailleurs, l'EphA2, largement exprimé à la surface des cellules épithéliales, est donc un Ag du Soi, comme la plupart des Ags de LT $\gamma\delta$. Sa reconnaissance spécifique par d'éventuelles sous-populations intraépithéliales de LT $\gamma\delta$ V δ 2neg, est vraisemblablement finement régulée par diverses molécules d'adhésion et de costimulation qui restent à être identifiées. Ces acteurs additionnels permettront aux LT $\gamma\delta$ spécifiques d'EphA2 de distinguer efficacement les conditions pathologiques des conditions physiologiques d'expression d'EphA2 par les cellules du Soi. Ce type de régulation est particulièrement important dans la prévention des éventuelles réactions auto-immunes engendrées par des activations inopportunes de LT naturellement autoréactifs.

L'analyse de la pertinence physiologique de l'activation de LT $\gamma\delta$ par EphA2 nécessite à présent l'identification et la caractérisation de populations $\gamma\delta$ réactives afin d'étudier l'impact physiologique de la reconnaissance d'EphA2, ainsi que les éventuelles applications thérapeutiques impliquant EphA2 et ces populations de LT $\gamma\delta$.

ChapII Rôle de la famille BTN3 dans l'activation des L γ 9 δ 2 par les PAg

I. Rôle clé de BTN3 dans l'activation des L γ 9 δ 2 humains par les PAg

1) Article 2: Key implication of CD277/Butyrophilin-3 (BTN3A) in phosphoisoprenoid sensing by a major human $\gamma\delta$ T cell subset.

Harly C^{*}, Guillaume Y^{*}, Nedellec S, Mönkkönen H, Mönkkönen J, Kuball J, Adams EJ, Netzer S, Déchanet-Merville J, Léger A, Breathnach R, Olive D, Bonneville M, Scotet E.

^{*} Co-premiers auteurs.

Manuscrit soumis.

Ce projet, originaire de l'équipe de D Olive (UMR_S891, Marseilles), est né d'une observation inattendue d'Yves Guillaume, dont la thèse portait sur la caractérisation fonctionnelle d'Acms dirigés contre BTN3 (Compte et al., 2004), une protéine humaine ubiquitaire, liée à la famille de molécules costimulatrices B7, et dont le fonction était alors inconnue. En effet, la culture de PBMCs humains en présence de ces Acms et d'IL-2 aboutissait à long terme à une amplification spécifique des L γ 9 δ 2.

Par la suite, une collaboration fructueuse entre l'équipe de D Olive et la nôtre a permis de décrire une partie du mode d'action de cet anti-BTN3, capable, au premier abord, de mimer en tous points l'effet activateur spécifique des PAg sur les L γ 9 δ 2. La caractérisation d'un autre anti-BTN3, capable, à l'inverse, de bloquer les activations PAg-induites des L γ 9 δ 2 a permis de suspecter une fonction particulière des BTN3 dans ce processus. Le rôle clé des protéines BTN3 au cours de la

reconnaissance des PAg par les L γ 9 δ 2 a ensuite été établit par l'extinction de l'expression de ces protéines à la surface de certaines cellules humaines. Ce déficit aboutissait à une absence totale de reconnaissance de ces cellules par les L γ 9 δ 2 après divers traitements impliquants des PAg exogènes ou endogènes.

Le mécanisme précis d'action des anti-BTN3 activateurs et bloquants, ainsi que les interactions reliant les PAg, les BTN3, et le TCR γ 9 δ 2 est encore loin d'être compris, mais ce travail de recherche a abouti à la génération et la caractérisation partielle de nombreux outils cellulaires, protéiques et moléculaires qui n'ont pas encore livré tous leurs secrets et seront utilisés dans un proche avenir pour approfondir cette étude. Par ailleurs, les Acms anti-BTN3 activateurs et bloquants pourraient s'avérer être de puissants outils immunothérapeutiques applicables dans diverses stratégies ciblant les L γ 9 δ 2 (Intro ChapII II 3c).

Key implication of CD277/Butyrophilin-3 (BTN3A) in phosphoisoprenoid sensing by a major human $\gamma\delta$ T cell subset

Christelle Harly,^{1*} Yves Guillaume,^{2*} Steven Nedellec,¹ Hannu Mönkkönen,³ Jukka Mönkkönen,³ Jürgen Kuball,⁴ Erin J. Adams,⁵ Sonia Netzer,⁶ Julie Déchanet-Merville,⁶ Alexandra Léger,¹ Richard Breathnach,¹ Daniel Olive,^{2\$} Marc Bonneville,^{1†\$} Emmanuel Scotet^{1†\$}

¹ INSERM UMR892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Institut de Recherche Thérapeutique Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes cedex, France.

² INSERM UMR891, Centre de Recherche en Cancérologie Marseille, Institut Paoli-Calmettes, 232 Boulevard Sainte Marguerite, 13009 Marseille, France.

³ School of Pharmacy, University of Eastern Finland, Yliopistonranta 1 B, P.O. Box 1627, FIN-70211 Kuopio, Finland.

⁴ Department of Hematology and Department of Immunology, University Medical Center Utrecht, Lundlaan 6, 3584 EA Utrecht, The Netherlands.

⁵ Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Chicago, 929 E. 57th Street, Chicago, IL 60637, USA.

⁶ UMR CNRS 5164, Université Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France.

* These authors contributed equally to this work.

\$ co-senior authorship

† To whom correspondence should be addressed. Emails:

marc.bonneville@nantes.inserm.fr, Emmanuel.Scotet@inserm.fr

Abstract

Detection of microbial and mammalian phosphoisoprenoids by human V γ 9V δ 2 T cells leads to activation of this major peripheral $\gamma\delta$ T cell subset following infectious or metabolic distress. The mechanisms underlying $\gamma\delta$ T cell activation by phosphoisoprenoids are not known. We show that antibodies against CD277, a member of the extended B7 receptor superfamily related to butyrophilins, either mimic or abrogate phosphoisoprenoid-induced-V γ 9V δ 2 T cell activation. Gene expression knock down and domain-shuffling approaches confirmed the key role played by CD277 in this phenomenon. They also indicated that phosphoisoprenoids are not cognate antigens for $\gamma\delta$ T cell receptors, but act upstream of CD277-induced $\gamma\delta$ T cell activation. This study demonstrates a novel and unique role played by B7-like molecules in human $\gamma\delta$ T cell activation, and paves the way for new strategies to improve the efficacy of immunotherapies targeting this $\gamma\delta$ T cell subset.

$\gamma\delta$ T cells are key players in the immune surveillance of cellular distress, thanks to their ability to recognize conserved determinants that are upregulated following inflammation, infection or cell transformation¹⁻². While $\gamma\delta$ T cell receptors (TCR) contribute to detection of danger-associated determinants, cognate interactions between $\gamma\delta$ TCR and defined antigens have been reported in a few cases only³. Thus the antigenic specificity and fine activation modalities of $\gamma\delta$ T cells in response to cell stress remain largely unknown.

One of the best studied $\gamma\delta$ T cell subsets in humans expresses V γ 9V δ 2 TCR and predominates in blood, where it makes up several percent of the whole peripheral lymphoid pool in most adults. V γ 9V δ 2 T cells are activated by non-peptidic phosphorylated isoprenoid pathway metabolites, referred to as phosphoantigens or phosphoisoprenoids (PiP)⁴⁻⁵. Natural V γ 9V δ 2-stimulating PiP include isopentenyl pyrophosphate (IPP)⁶, a metabolite of the mevalonate pathway found in mammalian cells, and hydroxy-methyl-butyl-pyrophosphate (HMBPP)⁷, an intermediate of the desoxyxylulose phosphate pathway shared by many microorganisms. PiP detection by $\gamma\delta$ T cells underlies their broad reactivity towards infected and transformed cells. Indeed tumor cell recognition by V γ 9V δ 2 T cells is linked to enhanced production of the weak agonist IPP, as the result of increased cell metabolism and cholesterol biosynthesis. Accordingly, pharmacological inhibitors of the mevalonate pathway that upregulate (e.g. aminobisphosphonates, NBP) or downregulate (e.g. statins) IPP production respectively, increase or decrease anti-tumor V γ 9V δ 2-T cell responses⁸⁻⁹. Moreover, owing to the high V γ 9V δ 2 T cell-stimulating activity of the microbial agonist HMBPP, V γ 9V δ 2 T cell responses are elicited by infected cells producing even traces of this PiP⁷. While PiP-induced activation is restricted to V γ 9V δ 2 T cells and can be

conferred by V γ 9V δ 2 TCR gene transfer¹⁰⁻¹¹, attempts to detect cognate interactions between PiP and V γ 9V δ 2 TCR have failed so far¹². Therefore, how exactly V γ 9V δ 2 T cells sense PiP remains an enigma. PiP rapidly induce calcium signaling and activation of V γ 9V δ 2 T cell clones but have no effect on cells maintained in suspension, which suggests implication of additional target cell surface receptors in this phenomenon. PiP or NBP elicit V γ 9V δ 2 T cell responses against basically all human target cells, irrespective of their tissue origin, but do not induce recognition of murine target cells. Therefore the putative target cell receptors involved in PiP-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 receptors¹³. The latter receptor family includes more recently identified members, like the Skint and butyrophilin (BTN) receptors. The mandatory role played by Skint-1 in the intrathymic positive selection and functional maturation of the murine intraepidermal V γ 5V δ 1 T cell subset raises issues about the general role played by Skint1-related receptors in the selection and activation of $\gamma\delta$ T cells in mice and other species¹⁴⁻¹⁷. While there are ten intact *skint1* paralogs in the mouse, the only human *skint1* orthologue is a pseudogene. Besides murine B7S3/SKINT2, the closest homologues of *skint1* gene products in their extracellular part are the mouse and human BTN. These are type I membrane proteins with two extracellular Ig domains frequently linked to an intracellular B30.2 (PRY/SPRY) domain, which encompass three gene subfamilies in humans : *btn1*, *btn2* and *btn3*. BTN receptors exert both non-immunological and immune modulating functions. In particular BTN1A1 plays a

role in milk fat globule formation. Moreover in line with their homology with several B7-related co-inhibitory receptors, most BTN gene products can downmodulate TCR-induced T cell activation and contribute to dampening of inflammatory responses^{15,18-19}.

In this study, we provide evidence that the ubiquitous human CD277/BTN3A molecules play a mandatory role for TCR-mediated activation of V γ 9V δ 2 T cells induced by PiP in both tumor and infectious physiopathological situations. These results yield new insights into a novel mechanism linking metabolic and infectious distress and immune cell activation. On a more applied standpoint, this study describes several CD277-specific reagents and monoclonal antibodies that either boost or inhibit V γ 9V δ 2 T cell responses towards tumor or infected cells.

RESULTS

Broad activation of human V γ 9V δ 2 T cells by anti-CD277 antibodies

While screening monoclonal antibodies (mAb) raised against isoforms of the BTN3 (CD277) subfamily²⁰, we noticed that one mAb (clone #20.1) elicited a dramatic expansion of $\gamma\delta$ T cells in IL-2-supplemented peripheral blood lymphocyte cultures (**Fig. 1a** and data not shown). Accordingly, mAb #20.1 induced proliferation (**Supplementary Fig. S1a**) and ex vivo production of IFN- γ and TNF- α (**Fig. 1b**) by $\gamma\delta$ T cells, but had no effect on other mononuclear cell subsets. This mAb also induced rapid CD69 upregulation and IFN- γ production by most V δ 2^{pos}, but not V δ 2^{neg}, $\gamma\delta$ PBL ex vivo (**Fig. 1c** and **Supplementary Fig. S1b**), and triggered

degranulation and cytokine responses of V γ 9V δ 2 T cell clones only (**Fig. 1d** and data not shown).

Since CD277 is ubiquitously expressed by human cells²⁰ and since anti-CD277 mAb readily induced V γ 9V δ 2 T cell activation in the absence of third-party cells, we performed pre-incubation experiments to test whether this mAb acted on effector or on target cells. Pretreatment of Raji tumor target cells, but not effector V γ 9V δ 2 T cell lines, with the #20.1 mAb (and several other anti-CD277 mAb such as the clone #7.2) enhanced tumor cell killing by V γ 9V δ 2 T cells (**Fig. 2a** and **Supplementary Fig. S2a**). However, it had no effect on cytolytic responses mediated by human CD8^{pos} $\alpha\beta$ T cell clones (data not shown). Raji target cell pre-incubation with anti-CD277 mAb also induced V γ 9V δ 2 T cell degranulation and TNF- α cytokine responses to levels reached after target cell pre-treatment with NBP (**Fig. 2b**). Similarly, anti-CD277 mAbs enhanced degranulation and cytotoxic V γ 9V δ 2 T cell responses towards a wide array of CD277^{pos} human cell lines, irrespective of their tissue origin and basal susceptibility to V γ 9V δ 2 T cell recognition (**Fig. 2c** and **Supplementary Fig. S2b**). This effect was not due to mAb-redirected killing or mAb-dependent cell cytotoxicity, as it did not depend on CD16, CD32 or CD64 Fc-receptors expression on target or effector cells (**Supplementary Fig. S3**). Taken together our data indicate that anti-CD277 mAbs can sensitize human target cells to V γ 9V δ 2 T cell recognition, in a cell-to-cell contact dependent manner.

V γ 9V δ 2 TCR implication in anti-CD277 mAb-induced activation

The broad stimulatory effects of anti-CD277 mAb, but exquisitely on V γ 9V δ 2 T cells, suggested implication of the TCR in this activation process. Accordingly down-regulation of V δ 2 TCR chain expression was rapidly induced on T cells after incubation with anti-CD277 mAb-sensitized target cells (**Fig. 3a**). Moreover mAb-treatment induced co-recruitment of target cell-derived CD277 and effector cell-derived CD3 molecules at the target/ $\gamma\delta$ T cell interface, as shown by confocal and video microscopy studies using HEK293 cells expressing fluorescent CD277-EGFP chimeric receptors (**Fig. 3b,c**). TCR implication in anti-CD277-induced activation was also supported by the reduced velocity and enhanced Ca²⁺ signaling of $\gamma\delta$ T cells incubated with anti-CD277 mAb-treated target cells, when compared to those incubated with untreated target cells (**Fig. 3d,e**). To more directly assess the TCR dependency of anti-CD277 Ab-induced T cell activation, we studied the in vitro responses of human T cell lines transduced with $\gamma\delta$ TCRs. Unlike non-transduced or V γ 8V δ 3-transduced human T lymphomas (Jurkat cell line derivatives,²¹), V γ 9V δ 2 Jurkat transductants were readily activated by mAb #20.1 (**Fig. 4a**). Similarly, V γ 9V δ 2 TCR gene transfer into non-transformed human CD4^{pos} $\alpha\beta$ T cells²² conferred strong in vitro T cell responsiveness to both anti-CD277- and NBP-pretreated human target cells (**Fig. 4b**). Therefore, V γ 9V δ 2 TCR expression is necessary and sufficient for recognition of anti-CD277-treated target cells.

Lack of PiP upregulation by anti-CD277 mAbs

Analysis of Jurkat TCR transfectants carrying point-mutated V γ 9V δ 2 TCR²³ suggested the same key residues within the TCR antigen-binding loops, such as the

positively charged lysine L97 in the V δ 2 chain, are implicated in recognition of NBP- and anti-CD277-treated cells (**Supplementary Fig. S4** and data not shown). This observation led us to assess the PiP levels in cells treated with NBP or anti-CD277 mAb by mass spectrometric analysis of two major V γ 9V δ 2-stimulating PiP (IPP and its adenosine triphosphate isopentenol (Apppl) derivative)²⁴. Both IPP and Apppl were detected in target cells incubated with NBP, but not anti-CD277 mAb, although both treatments led to strong V γ 9V δ 2 T cell activation (**Fig. 5a,b,c**). Taken together, our results indicate that although V γ 9V δ 2 T cell recognition of anti-CD277-treated target cells is linked to endogenous PiP, upregulation of their production and/or accumulation in target cells by anti-CD277 mAb seems unlikely.

Abrogation of V γ 9V δ 2 T cell responses by blocking anti-CD277 mAbs and CD277 expression knock-down

Further insight into the mechanisms underlying CD277-dependent activation of $\gamma\delta$ T cells was gained from analysis of additional anti-CD277 mAbs. Among the various clones that were screened and tested, one clone (#103.2) efficiently stained CD277^{pos} cells, such as Raji cells (**Fig. 6a**), but did not sensitize them to V γ 9V δ 2 T cell recognition (**Fig. 6b**, middle left vs. middle right panels). In fact this mAb strongly inhibited V γ 9V δ 2 T cell activation and Ca²⁺ responses induced by NBP- and PiP-treated cells (**Fig. 6c,d**, left panels and data not shown). mAb #103.2 also abrogated V γ 9V δ 2 T cell responses induced by the V γ 9V δ 2-susceptible Daudi lymphoma (C.H., M.B., E.S., unpublished) and by *Mycobacterium bovis* BCG- in vitro infected THP-1 cells (**Fig. 6e**). Importantly, mAb #103.2 did not modulate anti-CD3-induced

activation of V γ 9V δ 2 T cells (**Fig. 6d**, right panel). Nor did it affect activation of CD8^{pos} $\alpha\beta$ T cell clones by anti-CD3 mAb or a specific antigenic peptide (**Supplementary Fig. S5a**). Moreover, like their stimulating counterparts, blocking CD277-specific mAb acted on target rather than on effector cells (**Supplementary Fig. S5b**). These results indicate a unique mandatory role played by CD277 in V γ 9V δ 2 T cell responses elicited by both tumor and infected cells and PiP-treated cells.

In support of this, two short-hairpin RNAs (shRNA) mediating knockdown of all CD277 isoforms (**Fig. 7a**) significantly reduced V γ 9V δ 2 T cell cytolytic and cytokine responses to target cells treated with either agonist anti-CD277 mAb (#20.1), NBP or soluble PiP (**Fig. 7b,c** and 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 (data not shown).

Key role played by BTN3A1 in PiP-induced activation of V γ 9V δ 2 T cells

The CD277 subfamily comprises 3 isoforms (BTN3A1, -A2 and -A3) with highly (> 95 %) homologous extracellular domains but less conserved intracellular sequences¹⁹⁻²⁰. Since CD277-specific mAbs cross reacted with all three CD277 isoforms²⁰, they did not allow the role played by individual isoforms in V γ 9V δ 2 T cell activation to be assessed. To address this, we generated cells expressing each of the three CD277 isoforms, by transfecting CD277-knockdown HEK cells with cDNAs carrying mutations in the sh#284 target nucleotidic sequence designed to confer resistance to shRNA-mediated down-modulation without changing the protein sequence coded

(**Fig. 8a**). Selective re-expression of each of the three CD277 isoforms restored $V\gamma 9V\delta 2$ T cell responses induced by the agonist anti-CD277 mAb #20.1 (**Fig. 8b**). In contrast, only re-expression of BTN3A1 isoform, 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 PiP-induced $\gamma\delta$ T cell responses were restored after BTN3A1, but not BTN3A2 or -A3 re-expression in CD277-knockdown cells (**Fig. 8c**).

Unlike BTN3A1 and BTN3A3, BTN3A2 is devoid of an intracellular B30.2 domain¹⁹. Could this domain be involved in translating intracellular PiP 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 crosslinking by agonist anti-CD277 mAb. Furthermore we obtained strong $V\gamma 9V\delta 2$ T cell responses against NBP-treated target cells expressing chimeric CD277 molecules in which the extracellular domain of BTN3A3 was fused to the intracellular B30.2 domain of BTN3A1 (**Fig. 8d** and data not shown). Weakness of PiP-induced $\gamma\delta$ T cell responses towards transductants expressing BTN3A3, which carries a B30.2 domain highly homologous to that of BTN3A1, is most probably explained by the presence of a peptidic tail at the carboxy-terminal end of the protein, which could interfere with proper B30.2-dependent CD277 recruitment. This hypothesis is supported by the fact that, unlike wild-type BTN3A1, transduction of CD277 knockdown cells with BTN3A1-GFP chimeras carrying a GFP sequence at the carboxy-terminal end of their B30.2 domain did not restore NBP- or PiP-induced activation. By contrast BTN3A1-GFP transductants were still able to activate $V\gamma 9V\delta 2$ T cells after sensitization by agonist anti-CD277 mAb (data not shown). Taken together these results indicate that

protein/protein interactions involving the B30.2 intracellular domain of BTN3A1 are required for sensing of both endogenous and exogenous PiP by human V γ 9V δ 2 T cells.

DISCUSSION

Sensing of microbial and mammalian PiP represents an elegant strategy for immune detection of infectious and metabolic distress that is exploited by a major $\gamma\delta$ T cell subset shared by primates, but absent in other species^{2,4}. Although expression of V γ 9V δ 2 TCR has been known for years to be a prerequisite for PiP-induced activation¹¹, how such small non-peptidic metabolites could promote $\gamma\delta$ TCR engagement has remained a mystery. By identifying a key role for the recently identified member of the extended B7 receptor family CD277, our results yield important insights into an immune mechanism that has puzzled immunologists for more than 15 years. 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 PiP-induced $\gamma\delta$ T cell responses¹⁰. Moreover the lack of functional CD277 orthologues in rodents could explain the absence of PiP-responding $\gamma\delta$ T cell subsets in the latter species², and the lack of V γ 9V δ 2 T cell reactivity towards NBP- or PiP-treated murine cell lines^{4,10}. Nevertheless, CD277 transduction into murine recipient cells failed to restore V γ 9V δ 2 T cell responses induced by either agonist anti-CD277 mAb or PiP (C.H., R.B., M.B., E.S., unpublished observations). Therefore this would indicate implication of additional species-specific players in this phenomenon.

While CD277 is implicated in V γ 9V δ 2 responses, we have found no evidence that it plays a role in human V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ or $\alpha\beta$ T cell activation. This observation 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 cells¹⁴⁻¹⁶. While Skint-1 deficiency prevents differentiation of T cells expressing invariant V γ 5V δ 1 TCR, it has no effect on other $\gamma\delta$ or $\alpha\beta$ T cell compartments. Whether Skint-1 directly interacts with V γ 5V δ 1 TCR or modulates TCR engagement by yet undefined antigens remains unclear. It is striking that apart from murine B7S3/SKINT2, the gene products that are most homologous to SKINT1 in their extracellular regions are the mouse and human butyrophilins, including CD277¹⁹. 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.

So how are CD277, PiP and the V γ 9V δ 2 TCR linked together ? We suggest, consistent with previous failures to demonstrate interactions between PiP and V γ 9V δ 2 TCR¹², that PiP is not a *bona fide* $\gamma\delta$ T cell antigen. Our results suggest that PiP acts in fact through CD277, and particularly through the intracytoplasmic domain of its BTN3A1 isoform. On the basis of further functional and structural studies described in a companion paper²⁵, we hypothesize that PiP induces, directly or indirectly, topological or conformational changes in the CD277 extracellular domain. These changes could be sensed by the V γ 9V δ 2 TCR directly, or alternatively promote recruitment or unmasking of another molecule recognized by the V γ 9V δ 2 TCR, such as ecto-F1 ATP synthase²⁶. In either case the changes would also be provoked by binding of CD277 mAb agonists to the extracellular domain of any of the

three CD277 isoforms, thus bypassing the PiP requirement. Binding of CD277 mAb antagonists could block these changes or block their consequences.

On an applied standpoint, trials using clinical grade V γ 9V δ 2 T cell agonists (like NBP or synthetic PiP) have yielded promising preclinical and clinical responses in viral infections and several cancers^{2,4}. Such protocols are nevertheless suboptimal because of the progressive exhaustion of V γ 9V δ 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 γ 9V δ 2 T cells towards fresh autologous tumor cells⁴. Enhancing antitumor responses of V γ 9V δ 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 γ 9V δ 2 T cell responses, for instance during *Mycobacterium tuberculosis*-induced immune restoration syndrome in acquired immunodeficiency syndrome patients under therapy²⁷.

Acknowledgments

We thank T. Santolaria, C.M. Peigné and A. Giraud for assistance and discussion; M.C. Devilder for assistance with cytometry, M.C. Gesnel and S. Heijhuurs for technical assistance. We thank 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. We thank 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. 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) and UU (#2010-4669).

Author contributions

Phenotypic and functional assays were performed by C.H., A.L. and Y.G.; confocal and videomicroscopic studies by S. Nedellec; TCR transduction studies by C.H., S. Netzer, J.DM., J.K.; endogenous PiP quantification by H.M. and J.M.; molecular immunology (shRNA, cDNA constructs and transductions) by R.B. and C.H.; E.J.A. and D.O. contributed intellectual input and reagents; M.B. and E.S. performed investigation leadership and wrote the manuscript.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

Figure Legends

Figure 1: Broad activation of human V γ 9V δ 2 T cells by anti-CD277 mAbs. **(a)** Frequency of human $\gamma\delta$ T cells in IL-2-supplemented ex vivo PBMCs following a 2 week-incubation in the presence of anti-CD277 mAb (#20.1; 10 μ g/ml). The values for the percentage of $\gamma\delta$ T cells within PBL are indicated. No stim., no stimulation. **(b)** Intracellular stainings of IFN- γ and TNF- α in ex vivo human PBL- $\gamma\delta$ T cells following incubation with anti-CD277 mAb (#20.1; 10 μ g/ml). Numbers inside or adjacent to outlined areas indicate the values for the percentage of IFN- γ^{pos} (*top row*) or TNF- α^{pos} (*bottom row*) cells within $\gamma\delta^{\text{neg}}$ and $\gamma\delta^{\text{pos}}$ PBL subsets. **(c)** Expression of CD69 on ex vivo human PBL subsets following treatment with either anti-CD277 mAb (#20.1; 10 μ g/ml) or soluble PiP (BrHPP; 3 μ M). MFI, geometric mean of fluorescence intensity. Data are presented in the graph as mean values $\pm$ s.d. (n=3 healthy donors). *, p < 0.05 and **, p < 0.005 (Student's *t*-test). **(d)** Stainings of CD107a/b (*left*), IFN- γ (*middle*) and TNF- α (*right*) of V γ 9V δ 2 (clone GR4), V γ 8V δ 3 (clone 73R9), CD8 $^{\text{pos}}$ $\alpha\beta$ (clone 13) and invariant NK (iNKT, line MAD11) T cells after treatment with anti-CD277 mAb (#20.1; 10 μ g/ml). PMA/Iono., non-specific activation induced by PMA and ionomycin. Data in **(a)**, **(b)**, and **(d)** are representative of at least three experiments.

Figure 2: Anti-CD277 mAb induces strong V γ 9V δ 2 T cell cytolytic and cytokine responses. **(a)** Cytolytic activity of human V γ 9V δ 2 T cells (clone GR4) against Raji Burkitt's lymphoma cells. Raji (targets) or V γ 9V δ 2 T (effectors) cells were treated for 2 h with anti-CD277 mAb (#20.1; 10 μ g/ml), washed and cocultured at the indicated

$\gamma\delta$ T cell-to-target (E/T) ratios. Data are presented as mean values $\pm$ s.d. of triplicate measurements. **, $p < 0.005$ and ***, $p < 0.0005$ (Student's *t*-test). **(b)** Stainings of CD107a/b (top row; surface) and IFN- γ (bottom row; intracellular) of V γ 9V δ 2 T cells (clone GR4) following coculture with anti-CD277 mAb (#20.1; 10 μ g/ml)- or NBP (Pamidronate, 250 μ M)-treated Raji cells. Numbers adjacent to outlined areas indicate percent and geometric mean of fluorescence intensity (numbers in brackets) of CD107a/b^{pos} and TNF- α ^{pos} T cells. **(c)** Expression of CD107a/b on V γ 9V δ 2 T cells (clone GR4) following coculture with anti-CD277 mAb (#20.1; 10 μ g/ml)-treated human tumor/transformed cell lines (n=18). The values for the percentage of CD107a/b^{pos} V γ 9V δ 2 T cells are represented in the graph. Control, no antibody.

Figure 3: V γ 9V δ 2 TCR implication in anti-CD277 mAb-induced activation. **(a)** Kinetics of $\gamma\delta$ TCR expression (V δ 2 chain) on V γ 9V δ 2 T cells (line AL) following incubation with either anti-CD277 mAb (#20.1; 10 μ g/ml) or soluble PiP (BrHPP; 3 μ M). (-), untreated cells. geo. mfi, geometric mean of fluorescence intensity. One experiment representative of three is shown. **(b)** Confocal microscopy. CD3 (red) and CD277 (green) distribution in conjugates of V γ 9V δ 2 T cells (line AL) and HEK293 cells expressing EmGFP-CD277 molecules, following pre-incubation of target cells with anti-CD277 mAb (#20.1; 10 μ g/ml). Composite pictures showing overlays of both colors and bright field pictures. Confocal images of representative $\gamma\delta$ T cell–HEK293 conjugates are shown. Bars, 10 μ m. (-), untreated cells. One experiment representative of three is shown. **(c)** Time-lapse imaging. Kinetics of BTN3 accumulation at synaptic area. *Left*, HEK293 cells in conjugates with V γ 9V δ 2 T cells

were divided into two regions of interest (ROI) of identical size and parallel to the synaptic interphase. Kinetics of EmGFP fluorescence intensities were determined for each ROI by calculating the number of thresholded pixels above background fluorescence. Pseudocolor representation (blue to red). *Right*, graph represents the values for the percentage of synaptic pixels above threshold, calculated at the indicated timepoints according to the following formula: (number of synaptic pixels / number of total pixels in the cell) x100 (n=30 conjugates). Results are shown as mean $\pm$ s.e.m. frequencies. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$ (Student's *t*-test). **(d)** $V\gamma 9V\delta 2$ T cells velocity. Graph represents the mean $\pm$ s.e.m. values of calculated velocity of $\gamma\delta$ T cells in the field (n=30). ** $p < 0.005$ (Student's *t*-test). **(e)** Intracellular Ca^{2+} levels measured by videomicroscopy within $V\gamma 9V\delta 2$ T cells for the indicated acquisition time. Graph represents the kinetics of intracellular Ca^{2+} levels (340/380 nm ratio). Values correspond to the mean of emissions measured among all $\gamma\delta$ T cells engaged with HEK293 cells within the field (n=30).

Figure 4: Anti-CD277 mAbs activate human T cells transduced with $V\gamma 9V\delta 2$ TCRs.

(a) Surface expression of CD69 on Jurkat T cell $\gamma\delta$ TCR transductants (human $V\gamma 8V\delta 3$ or $V\gamma 9V\delta 2$ TCRs) following incubation with either anti-CD3 (#OKT3; 10 μ g/ml) or anti-CD277 (#20.1; 10 μ g/ml) mAbs. WT, wild-type Jurkat cells with no TCR expression. The values for the MFI of stained cells are represented in the graph. ** $p < 0.005$ and *** $p < 0.0005$ (Student's *t*-test). Data are representative of three independent experiments. **(b)** IFN- γ response in PBL-derived human $\alpha\beta$ T cells expressing a human $V\gamma 9V\delta 2$ TCR following incubation with NBP (Pamidronate)- or

anti-CD277 (#20.1; 10 μ g/ml) mAb-treated Daudi cells. Production of IFN- γ was determined via ELISpot analysis. Data are presented as mean values $\pm$ s.e.m. ** $p < 0.005$ and *** $p < 0.0005$ (two-way ANOVA). Comparable results were obtained in three independent experiments.

Figure 5: Lack of PiP upregulation by anti-CD277 mAbs. (a) CD107a/b surface expression on V γ 9V δ 2 T cells following incubation with either pamidronate (250 μ M)- or anti-CD277 mAb (#20.1; 10 μ g/ml)-treated Raji target cells. The values for the percentage of CD107a/b⁺ T cells are indicated. (b) Selective reaction monitoring chromatograms of extracts from: untreated Raji cells (-), Raji cells treated with NBP (Pamidronate, 250 μ M), Raji cells treated with both NBP (Pamidronate, 250 μ M) and mevastatin (25 μ M), and Raji cells treated with anti-CD277 mAb (#20.1; 10 μ g/ml). The chromatograms are drawn on the same scale. (c) IPP and Apppl formation in either human B-LCL or Raji cells treated with NBP (Pamidronate) or anti-CD277 mAb (#20.1; 10 μ 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).

Figure 6: Specific abrogation of V γ 9V δ 2 T cell responses by a blocking anti-CD277 mAb. (a) Surface staining on Raji cells with either 20.1 and 103.2 CD277-specific mAbs. Filled histogram, control IgG. (b) Stainings of CD107a/b (top), IFN- γ (middle)

and TNF- α (bottom) of V γ 9V δ 2 T cells (clone GR4) activated by soluble PiP (BrHPP, 3 μ M) or incubated with Raji cells treated with either 20.1 or 103.2 anti-CD277 mAbs (10 μ g/ml). Numbers adjacent to outlined areas indicate the percentage of CD107a/b^{pos}, IFN- γ ^{pos} and TNF- α ^{pos} $\gamma\delta$ T cells. (-), no activation. (c) Staining of CD107a/b on V γ 9V δ 2 T cells (line GUI) following coculture with 721.221 target B cells, treated, or not, with NBP (Pamidronate; 250 μ M) in the presence of either control IgG or anti-CD277 (#103.2) mAbs (10 μ g/ml each). Numbers adjacent to outlined areas indicate the percentage of CD107a/b⁺ $\gamma\delta$ T cells. (d) TNF- α production by V γ 9V δ 2 T cells (clone GR4) after activation induced by grading doses of either soluble BrHPP (*left graph*) or anti-CD3 mAb (*right graph*, #UCHT1) in the presence of control IgG or anti-CD277 (#103.2) mAbs (10 μ g/ml). (e) *Left*, expression of CD107a on V γ 9V δ 2 T cells (line AL) following coculture with *Mycobacterium bovis* BCG-infected THP-1 cells, in the presence or in the absence of blocking anti-CD277 mAb (#103.2, 10 μ g/ml). The values for the percentage of CD107a^{pos} $\gamma\delta$ T cells and infected THP-1 cells are indicated, respectively, on the left and right y-axis. MOI, multiplicity of infection. Data are presented as mean values $\pm$ s.d. (n=3). * p < 0.05 and ** p < 0.005 (Student's *t*-test). *Right*, a representative experiment is shown. Numbers adjacent to outlined areas indicate percent of CD107a^{pos} T cells. (-), no antibody; Ctrl, non-infected THP-1 cells. Data are representative of three independent experiments.

Figure 7: Abrogation of V γ 9V δ 2 T cell responses by CD277 expression knock-down. (a) Surface expression of CD277 molecules on human HEK293FT cells following

transduction with lentivirus encoding for irrelevant (Control) or CD277-specific (#240 and #284) shRNAs. Open histograms, control IgG. (b) CD107a/b expression on human V γ 9V δ 2 T cells (line GUI) following incubation with anti-CD277 mAb (#20.1; 10 μ g/ml)- or NBP (Pamidronate, 100 μ M)-treated HEK293FT clones described in (a). Numbers adjacent to outlined areas indicate the percentage and mean of fluorescence intensity of CD107a/b^{pos} T cells. (c) CD107a/b expression and IFN- γ production of V γ 9V δ 2 T cells (line GUI) following incubation with anti-CD277 mAb (#20.1; 10 μ g/ml)- or NBP (Pamidronate, 100 μ M)-treated HEK293FT clones transduced for the stable expression of CD277-specific (sh#284, 6 clones; sh#240, 3 clones) or Control (3 clones) shRNAs. Data are presented as the percentage of CD107a^{pos} and IFN- γ ^{pos} T cells versus the values for the intensity of fluorescence (MFI) of CD277 staining.

Figure 8: Key role played by BTN3A1 in PiP-induced activation of V γ 9V δ 2 T cells. (a) Stainings of human HEK293FT cells (sh#284, clone #30), previously knocked-down for the expression of endogenous CD277 molecules and re-expressing silently mutated BTN3A1, BTN3A2 or BTN3A3 isoforms. shControl clone #3, random shRNA sequence; Empty vector, transfection of an empty plasmid. The values for the percentage of CD277^{pos} cells are indicated. Data are representative of more than three independent experiments. (b) Expression of CD107a on V γ 9V δ 2 T cells (line GUI) following coculture with NBP (Pamidronate)- or anti-CD277 mAb (#20.1, 10 μ g/ml)-treated HEK293FT cells expressing either the BTN3A1, BTN3A2 or BTN3A3 isoforms. No stim., no stimulation. (c) TNF- α release from V γ 9V δ 2 T cells (line GUI) induced by grading doses of soluble PiP (BrHPP) in coculture with HEK293 cells

expressing either the BTN3A1, BTN3A2 or BTN3A3 isoforms. Data are presented as specific mean values $\pm$ s.d. and are representative of three independent experiments.

(d) Expression of CD107a on V γ 9V δ 2 T cells (line AL) following coculture with anti-CD277 mAb (#20.1, 10 μ g/ml)- or NBP (Pamidronate)-treated HEK293FT cells transiently expressing either full-length BTN3A1, BTN3A3, truncated BTN3A1 proteins lacking the intracellular B30.2 domain (BTN3A1^m Δ B30.2), or chimeric BTN3A3 proteins assembled with the BTN3A1 intracellular B30.2 domain (BTN3A3^mB30.2A1). Data are presented as the mean of specific values $\pm$ s.d. of the percentage of CD107a⁺ $\gamma\delta$ T cells (n=3). * p < 0.05 (Student's *t*-test).

Materials and Methods

Monoclonal antibodies and reagents

The following monoclonal antibodies were from Beckman Coulter: phycoerythrin-cyanin 5.1-labeled anti-pan TCR $\gamma\delta$ (#IMMU510) and anti-CD69 (#TP1.55.3), fluorescein isothiocyanate-labeled anti-V δ 2 (#IMMU389), phycoerythrin-cyanin 7-labeled and purified anti-CD3 ϵ (#UCHT1). The following monoclonal antibodies were from BD Biosciences: purified mouse IgG1, allophycocyanin-labeled pan TCR $\gamma\delta$ (#B1), allophycocyanin-H7 (analog of cyanin 7)-labeled anti-CD3 (#SK7), fluorescein isothiocyanate-or phycoerythrin-cyanin 5.1-labeled anti-CD107a (#H4A3), anti-CD107b (#H4B4). Fluorescein isothiocyanate- or phycoerythrin-labeled anti-IFN- γ (#B27) and phycoerythrin- or allophycocyanin-labeled anti-TNF- α (MAb11) were used for intracellular stainings. Purified anti-CD3 (#OKT3) was kindly provided by H. Vié. Alexa-647-labeled goat anti-mouse IgG and anti-IgG1 were from Invitrogen. Purified mouse anti-CD277 monoclonal antibodies (clones #7.2, #20.1, #103.2) were generated, produced and purified as described²⁰. Synthetic bromohydrin pyrophosphate/phosphostim (BrHPP) was kindly provided by Innate Pharma. Pamidronate, supplied as disodium salts, was obtained from Mayne Pharma. Monensin A, phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), ionomycin and leucoagglutinin were purchased from Sigma-Aldrich. Live/Dead cell marker, Lipofectamine 2000 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 kindly provided by F. Altare.

Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of human healthy donors were isolated from blood samples obtained from the Etablissement Français du Sang (Nantes, France) after a Ficoll gradient centrifugation. Human V γ 9V δ 2 (clone GR4, polyclonal lines GUI and AL), V γ 8V δ 3 (clone 73R9), iNKT (polyclonal line MAD11), $\alpha\beta$ CD8^{pos} (HCV-1/A2-restricted clone 13, provided by X. Saulquin) T cells were maintained in complete RPMI 1640 medium with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 10 μ g/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin, supplemented with 300 IU/ml rhIL-2. Human T cells (clones and polyclonal lines) were expanded *in vitro* in the above described medium supplemented with 1 μ g/ml of purified leucoagglutinin and irradiated (35 Gy) allogeneic feeder cells. Human polyclonal $\alpha\beta$ T cells expressing the V γ 9V δ 2 G115 TCR after retroviral transduction were generated and expanded as described²². Human Jurkat T cells (J.RT3-T3.5, β -chain-deficient variant) expressing either V γ 9V δ 2 (from clone G115) or V γ 8V δ 3 (from clone 73R9) TCR were generated and maintained as described²¹. The following human cell lines were kept in complete RPMI 1640 or DMEM medium: Epstein-Barr virus^{pos} and 721.221 B-lymphoblastoid cell lines (B-LCL); C91 T2.2 (T cell leukemia); Daudi and Raji (Burkitt's lymphoma); THP-1 (acute monocytic leukemia); HeLa (cervix adenocarcinoma); SVK14 (simian virus-40-transformed keratinocytes); HEK293FT (embryonic kidney); Med (breast cancer); MG63, HOS, U2OS (osteosarcoma), provided by D. Heymann; PC3 (prostate cancer) and HMEC-1 (endothelial cells), provided by F. Paris; M88 and M6 (melanoma) provided by N. Labarrière; meso 45, meso 152 and meso 134 (mesothelioma), provided by M. Grégoire.

Functional assays

Target cells were pretreated for 2-10 h with either CD277-specific mAbs or NBP (pamidronate) at the indicated concentrations. Treated target cells were next washed and cocultured with effector T cells at 37°C in complete RPMI 1640 medium. When indicated, T cells were activated by either BrHPP, at the indicated concentrations, or PMA and ionomycin (respectively, 1 μ M and 0.5 μ g/ml). Cytolytic activity of T cells was analyzed by measuring CD107a/b surface mobilization by flow cytometry. In this assay, T cells were activated at 37°C in complete RPMI 1640 medium containing 10 μ M monensin and a combination of fluorochrome-labeled CD107a- and CD107b-specific antibodies. After 4 h, T cells were harvested and stained with fluorochrome-labeled TCR specific antibodies and a viability marker (Live/Dead cell marker, 0.3 μ M). When indicated, intracellular stainings of IFN- γ and TNF- α were performed within the same samples. T cells stained for cell surface markers and viability, were next fixed at room temperature for 20 min with 2% paraformaldehyde, permeabilized for 20 min with BD PhosFlow Perm/Wash buffer (BD Biosciences), and incubated for 30 min with fluorochrome-conjugated specific antibodies. Surface expression of CD69 on PBL and T cells was measured by flow cytometry after a 4- or 7 h-activation 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 (Tree Star). TNF- α concentration was assessed by a biological assay based on WEHI 164 clone 13 cell viability as described²⁸. ELISpot for IFN- γ was performed as described²². When indicated, the cytolytic activity of human $\gamma\delta$ T cells was also measured by a 4 h-⁵¹Cr release assay. Percentage of target cell lysis was calculated according to the following formula: (experimental release-spontaneous

release)/(maximum release-spontaneous release) x100. Maximum and spontaneous release were determined by, respectively, adding 1% Triton X-100 or medium to ⁵¹Cr-labelled target cells in the absence of T cells.

Confocal microscopy and time-lapse imaging

HEK293FT cells (1×10^5) expressing carboxy-terminus Emerald GFP (EmGFP)-tagged BTN3 molecules (generated as described in the corresponding section below) were laid on BD Cell-Tak pre-coated slides (BD Biosciences) and left to adhere overnight at 37°C in complete DMEM medium. V γ 9V δ 2 T cells (1×10^5) were added and left to conjugate to HEK293FT cells for 30 min at 37°C, pretreated or not with anti-BTN3 mAb (#20.1, 10 μ g/ml for 30 min). Cells were next fixed (0.5% and 1% paraformaldehyde for 5 min each at room temperature). After addition of primary anti-CD3 mAb (#OKT3, 10 μ g/ml) and incubation for 10 min at 37°C, samples were stained with Alexa 568-labeled anti-mouse IgG2a (2 μ g/ml) for 10 min at 37°C and washed with DMEM. The slides were mounted by using Fluoromount reagent (Southern Biotechnology) and analyzed using a Nikon A1 RS confocal microscope (60 $\times$ NA 1.40 oil immersion objective). For time-lapse imaging, HEK293FT target cells (2×10^5) expressing EmGFP-CD277 molecules were left to adhere on Lab-Tek glass chamber slides (Nunc) coated with polyL-lysine (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37°C before addition of $\gamma\delta$ T cells. V γ 9V δ 2 T cells were loaded with 0.5 μ M Fura-2/AM (Molecular Probes) for 1 h at room temperature in HBSS medium (Invitrogen), washed and resuspended in HBSS 1% FCS before seeding in chamber slides. Measurements of intracellular Ca²⁺ responses were performed at 37°C with a Leica

DMI 6000 B microscope. Cells were illuminated every 15 s with a 300 W xenon lamp by using 340/10 nm and 380/10 nm excitation filters. Emission at 510 nm was used for analysis of Ca^{2+} responses and captured with a Roper Cool Snap HQ2 camera. Intracellular Ca^{2+} responses, velocity of $\gamma\delta$ T cells and synaptic accumulation of EmGFP-BTN3 molecules on HEK293FT cells were analyzed with Metamorph 7.5 and Metafluor 7.1 imaging softwares (Molecular Devices, Universal Imaging).

Quantification of endogenous PiP

The detection and quantification of endogenous IPP and Apppl was performed as described²⁹.

Mycobacterial infections

THP-1 cells (4×10^5) were cultured in complete RPMI 1640 medium without antibiotics and infected for 2 h with GFP-BCG, at indicated multiplicity of infection (MOI) values. BCG-infected THP-1 cells were extensively washed in RPMI 1640 medium and cocultured together with $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ T cells for 5 h at 37°C. Infection of THP-1 cells by GFP-expressing mycobacteria was measured flow cytometry. When indicated, THP-1 cells were preincubated for 20 min with blocking anti-CD277 mAb (#103.2, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) before coculture with $\gamma\delta$ T cells.

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'-ACCGGAAGGCTGCTCTCCGAATACCGAAGTATTCGGAGAGCAGCCTTCCTTTTG-3', 5'-TCGACAAAAAGGAAGGCTGCTCTCCAA TACTTCGGTATTCGGAGAGCAGCCTTC-3' (sh#240); 5'-ACCGGAAAGTACTTGTGTT ATTTCCGAAGAAATAACACAAGTACTTTTCCTTTTTTG-3, 5'-TCGACAAAAAGGAAA GTACTTGTGTTATTTCTTCGGAAATAACACAAGTACTTTTC-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 FG12³⁰. Lentiviral particles were produced by transient transfection of HEK293FT cells as described³⁰. Virus particules 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.

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. The cDNA for BTN3A1 was subcloned between EcoRI and SmaI sites of pEGFP-1 (Clontech), while the cDNA for BTN3A2 and BTN3A3 were subcloned between SphI and Sac I sites of pSP72 (Promega). 5' phosphorylated oligonucleotides 5'-

TCTGCTACTTTCAAGATGGTGACTTCTATGA-3' and 5'-GATATTTGCCACTGTCAGAGGCTGTGACGT-3' were used for PCR mutagenesis of the above BTN3A1, BTN3A2 and BTN3A3 plasmids to mutate the whole sequence targeted by shRNA#284 (mutation of 5'-GGAAAGTACTTGTGTTATTTC-3' to 5'-GGCAAATATCTCTGCTACTTT-3'). Mutated cDNAs were sequenced and subcloned between XhoI and EcoRV sites of a modified pIRES1hyg (Clontech). Plasmids were used for transient and stable Lipofectamine 2000-mediated transfections of HEK293FT (sh#284 clone#30). Following hygromycin selection, stable transfectants were checked for the selective re-expression of BTN3A1, BTN3A2 or BTN3A3 by flow cytometry. Carboxy-terminus EmGFP-tagged BTN3 molecules were obtained by cloning cDNAs for BTN3 into the pcDNA6.2/C-EmGFP-GW/TOPO vector (Invitrogen), according to manufacturer's procedures. Expression constructs were sequenced and plasmids used for stable transfections in HEK293FT cells. Following blasticidin selection, stable transfectants were isolated by cytometric cell sorting using a FACSAriaIII cell sorter (BD Biosciences). 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'.

Statistical analysis

The statistical significance of differences between populations was assessed with Student's *t*- or two way ANOVA-tests. P values of less 0.05 than were considered significant.

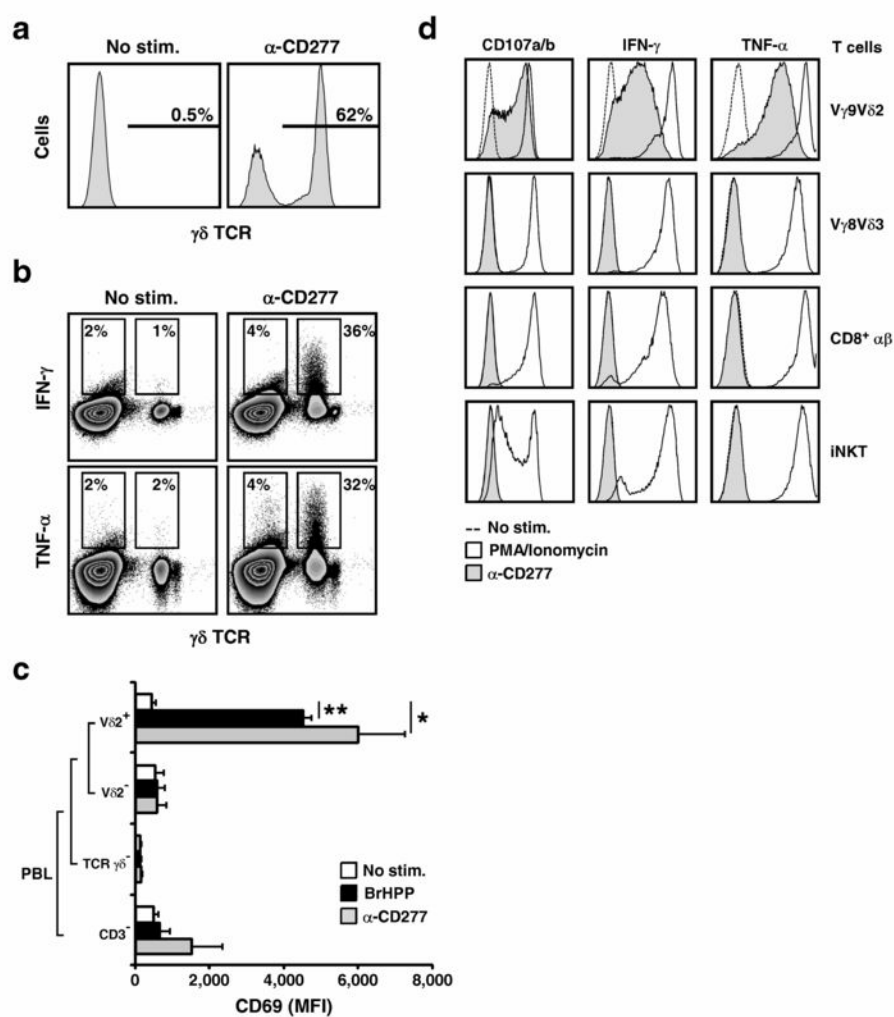
References:

1. Hayday, A.C. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity* **31**, 184-196 (2009).
2. Bonneville, M., O'Brien, R.L. & Born, W.K. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* **10**, 467-478 (2010).
3. Chien, Y.H. & Konigshofer, Y. Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunol Rev* **215**, 46-58 (2007).
4. Bonneville, M. & Scotet, E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Curr Opin Immunol* **18**, 539-546 (2006).
5. Morita, C.T., 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* **215**, 59-76 (2007).
6. Tanaka, Y., Morita, C.T., Nieves, E., Brenner, M.B. & Bloom, B.R. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* **375**, 155-158 (1995).
7. 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* **509**, 317-322 (2001).
8. Kunzmann, V., Bauer, E. & Wilhelm, M. Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *N Engl J Med* **340**, 737-738 (1999).
9. Gober, H.J. *et al.* Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med* **197**, 163-168 (2003).
10. Lang, F. *et al.* 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 (1995).

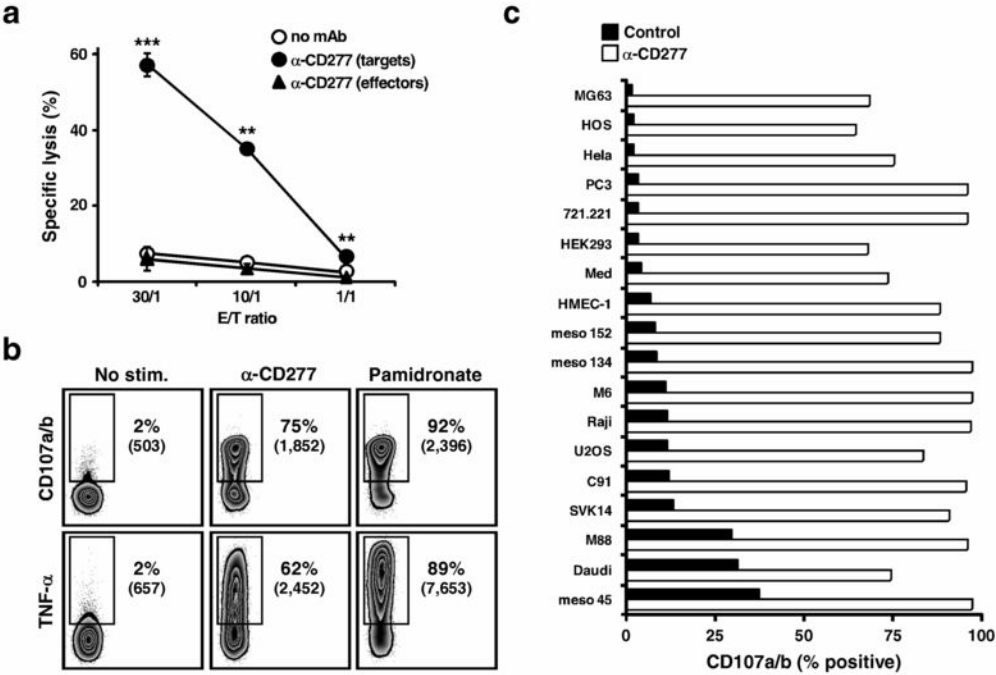
11. Bukowski, J.F., Morita, C.T., Band, H. & Brenner, M.B. Crucial role of TCR gamma chain junctional region in prenyl pyrophosphate antigen recognition by gamma delta T cells. *J Immunol* **161**, 286-293 (1998).
12. Allison, T.J., Winter, C.C., Fournie, J.J., Bonneville, M. & Garboczi, D.N. Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* **411**, 820-824 (2001).
13. Lenschow, D.J., Walunas, T.L. & Bluestone, J.A. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* **14**, 233-258 (1996).
14. Lewis, J.M. *et al.* Selection of the cutaneous intraepithelial gammadelta+ T cell repertoire by a thymic stromal determinant. *Nat Immunol* **7**, 843-850 (2006).
15. Boyden, L.M. *et al.* Skint1, the prototype of a newly identified immunoglobulin superfamily gene cluster, positively selects epidermal gammadelta T cells. *Nat Genet* **40**, 656-662 (2008).
16. Barbee, S.D. *et al.* Skint-1 is a highly specific, unique selecting component for epidermal T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3330-3335 (2011).
17. Turchinovich, G. & Hayday, A.C. Skint-1 identifies a common molecular mechanism for the development of interferon-gamma-secreting versus interleukin-17-secreting gammadelta T cells. *Immunity* **35**, 59-68 (2011).
18. Henry, J., Miller, M.M. & Pontarotti, P. Structure and evolution of the extended B7 family. *Immunol Today* **20**, 285-288 (1999).
19. Rhodes, D.A., Stammers, M., Malcherek, G., Beck, S. & Trowsdale, J. The cluster of BTN genes in the extended major histocompatibility complex. *Genomics* **71**, 351-362 (2001).
20. 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* **34**, 2089-2099 (2004).
21. Harly, C. *et al.* Up-regulation of cytolytic functions of human Vdelta2-gamma T lymphocytes through engagement of ILT2 expressed by tumor target cells. *Blood* **117**, 2864-2873 (2011).
22. Marcu-Malina, V. *et al.* Redirecting {alpha}{beta}T cells against cancer cells by transfer of a broadly tumor-reactive {gamma}{delta}T-cell receptor. *Blood* **118**, 50-59 (2011).
23. Miyagawa, F. *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* **167**, 6773-6779 (2001).

24. Monkkonen, H. *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* **147**, 437-445 (2006).
25. Palakodeti, A. *et al.* The molecular basis for modulation of human Vgamma9Vdelta2 T cell responses by CD277/Butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies. *Nat Immunol* **submitted** (2011).
26. Scotet, E. *et al.* Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity* **22**, 71-80 (2005).
27. Bourgarit, 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* **183**, 3915-3923 (2009).
28. 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* **95**, 99-105 (1986).
29. Monkkonen, H. *et al.* Zoledronic acid-induced IPP/Apppl production in vivo. *Life Sci* **81**, 1066-1070 (2007).
30. Qin, X.F., An, D.S., Chen, I.S. & Baltimore, D. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 183-188 (2003).

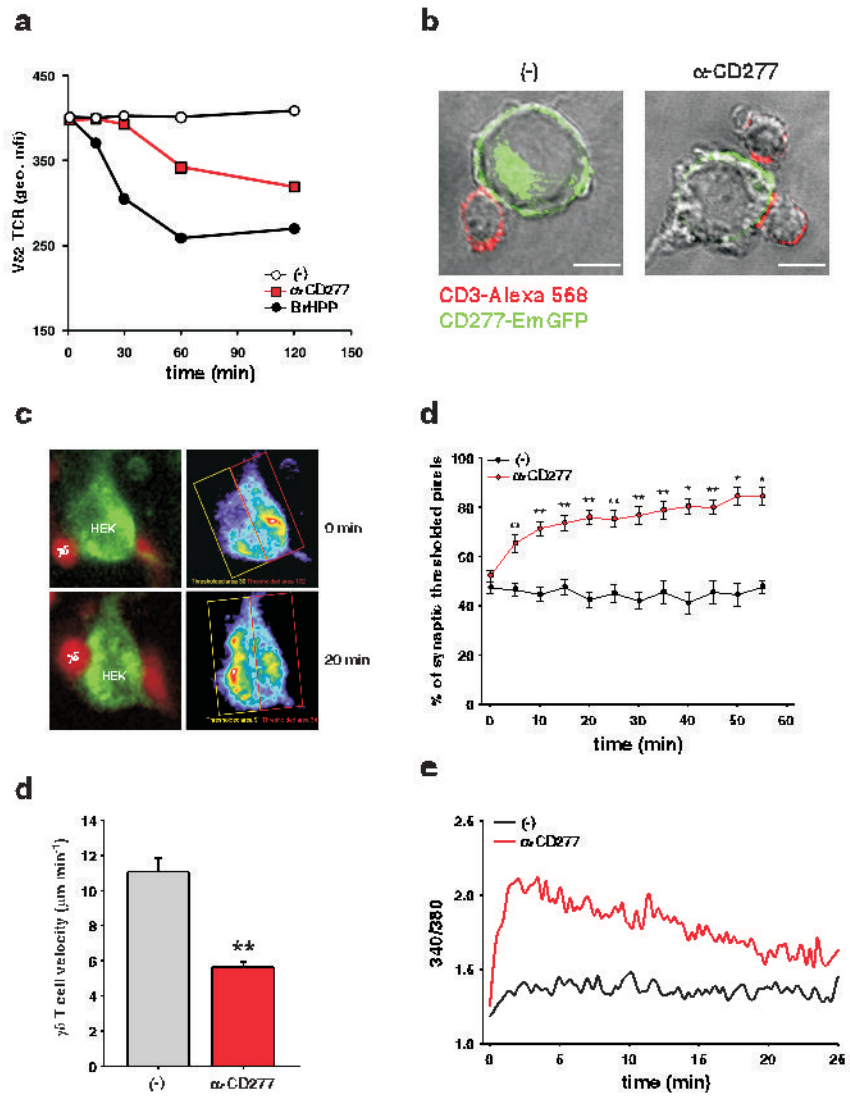
Harly et al.
Figure 1



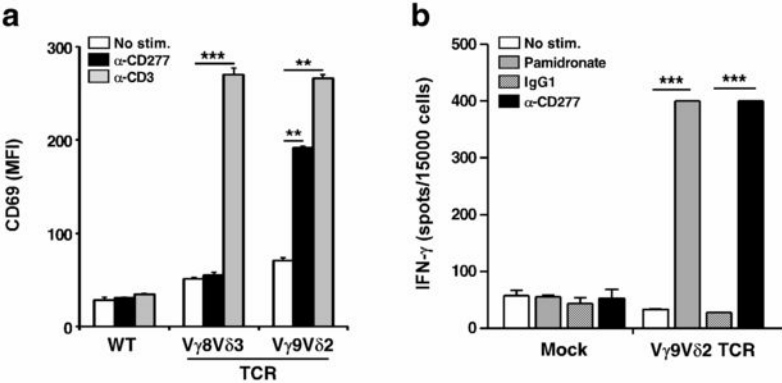
Harly et al.
Figure 2



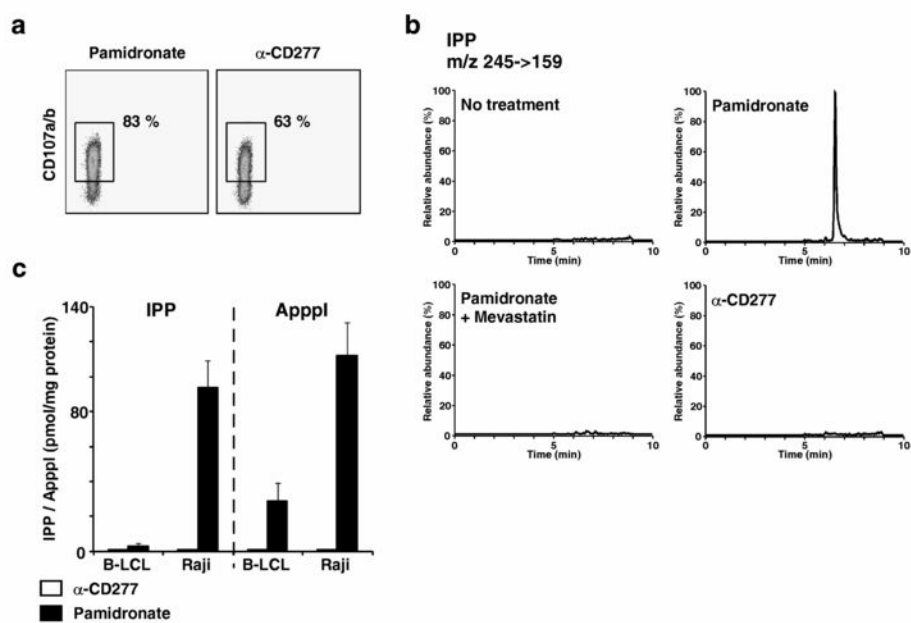
Harly et al.
Figure 3



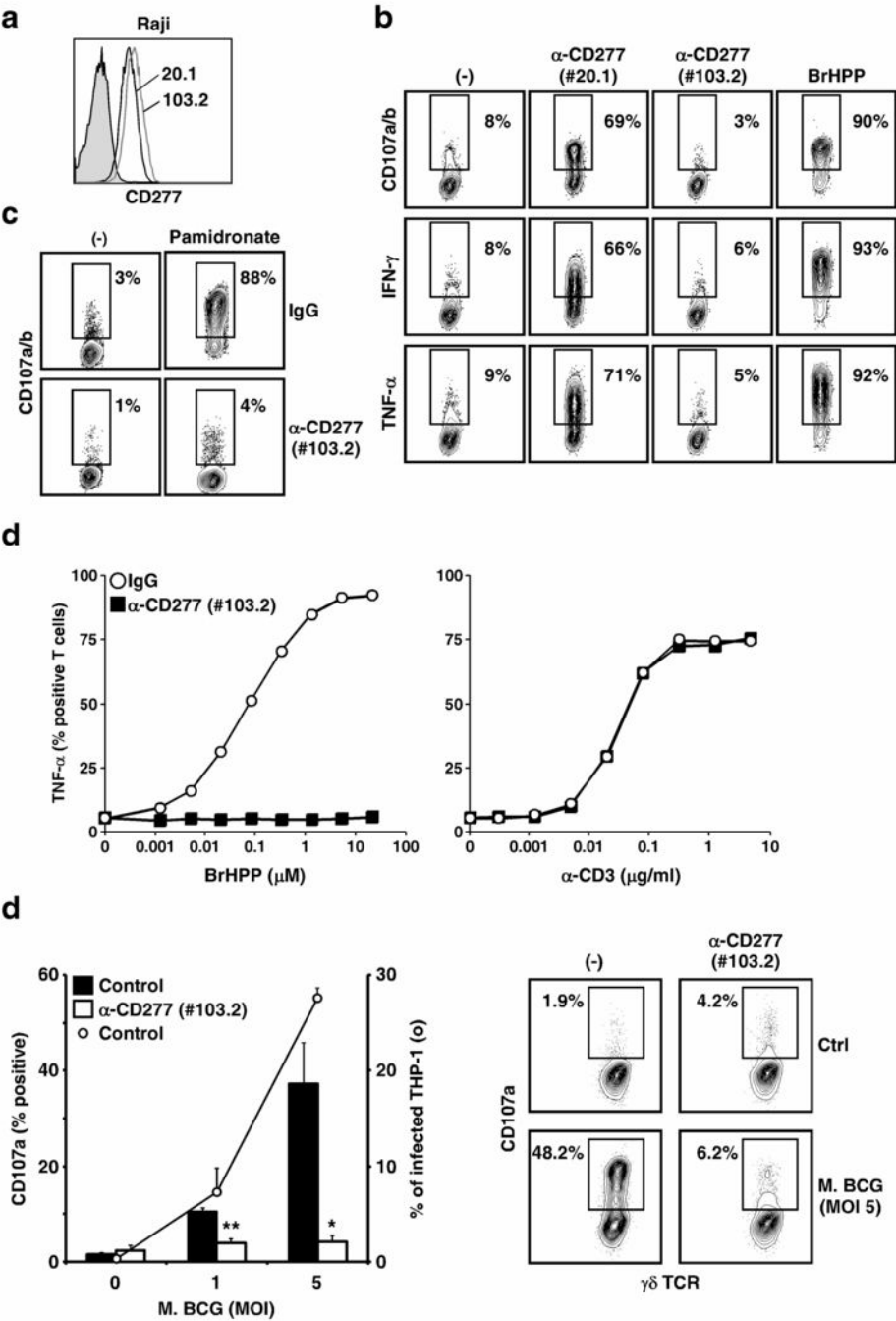
Harly et al.
Figure 4



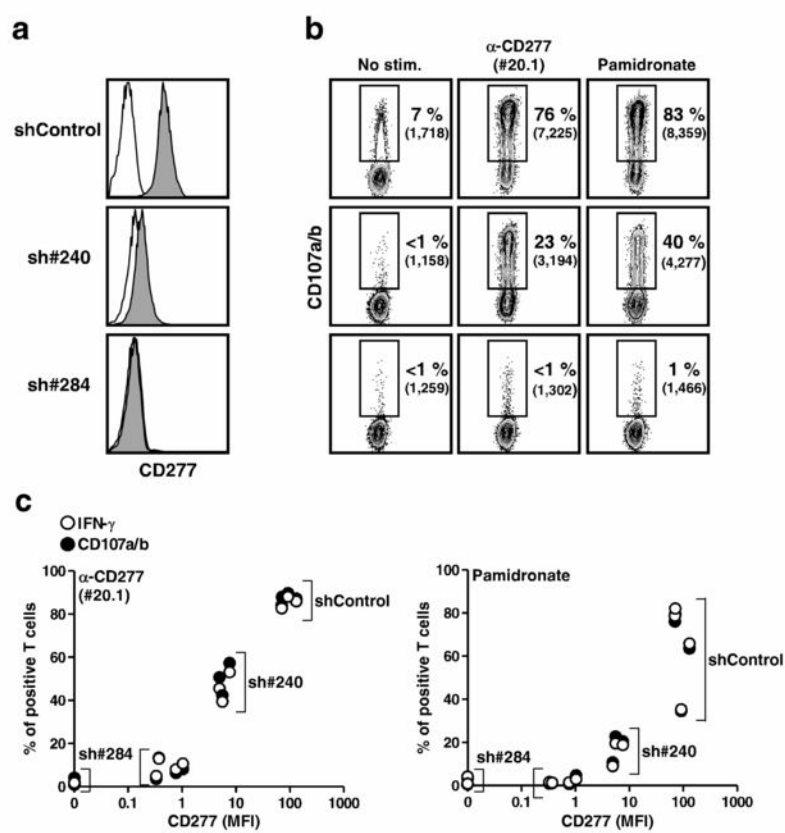
Harly et al.
Figure 5



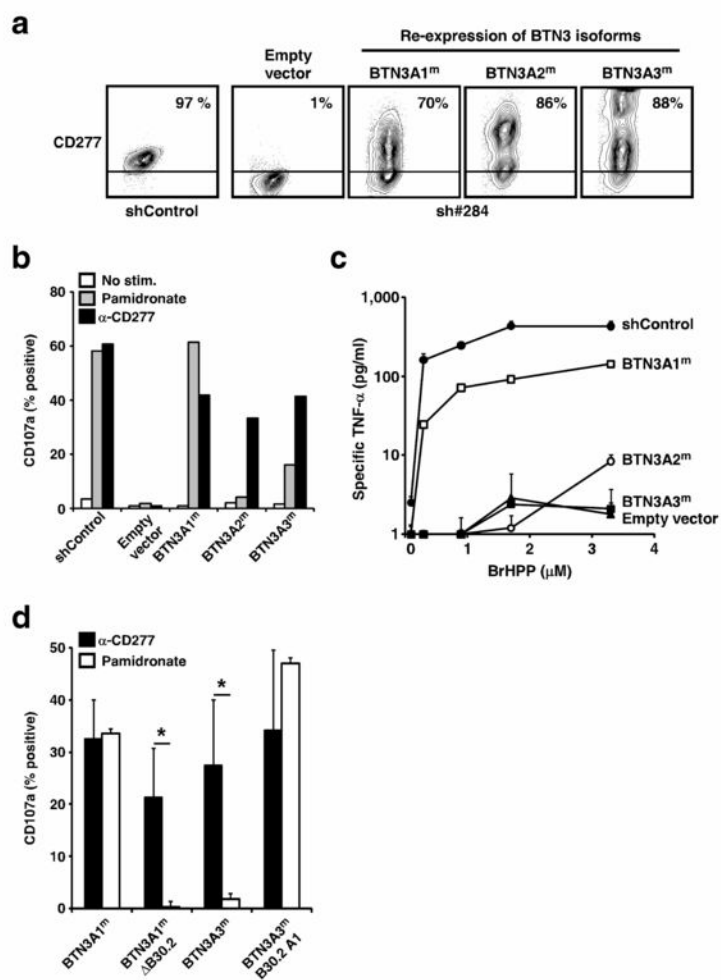
Harly et al.
Figure 6



Harly et al.
Figure 7



Harly et al.
Figure 8



Harly et al.

Supplemental Material

Figure S1

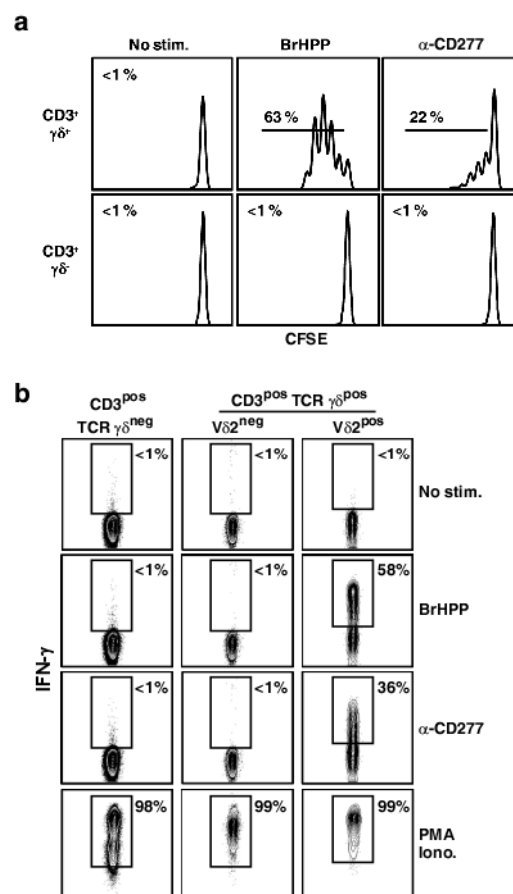


Fig.S1. (a) CFSE dilution measured within fresh ex vivo human PBMC-CD3⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺ or TCR $\gamma\delta$ ⁻ T cell subsets at day 4 following an initial stimulation with either PiP (BrHPP; 3 μ M) or anti-BTN3 mAb (#20.1; 10 μ g/ml) in the presence of rhIL-2. The values for the percentage of divided T cells are indicated. **(b)** Intracellular staining of IFN- γ in freshly isolated CD3⁺ PBL subsets after treatment with anti-BTN3 mAbs (#20.1; 10 μ g/ml), soluble PiP (BrHPP; 3 μ M) or PMA and ionomycin (PMA/Iono.). Numbers adjacent to outlined areas indicate the percentage of IFN- γ ⁺ T cells.

Figure S2

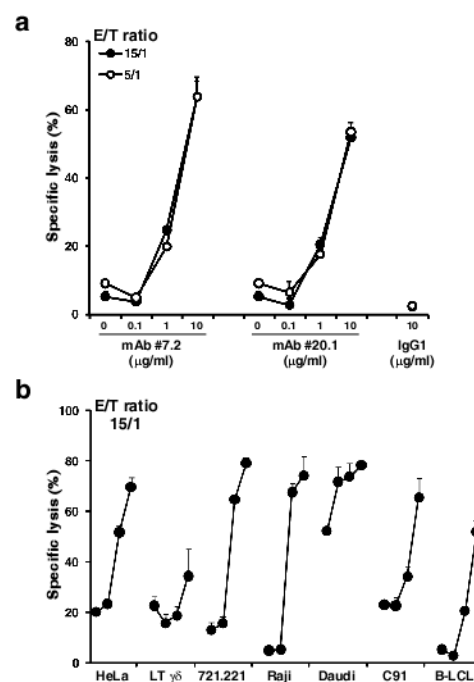


Fig.S2. (a) Cytolytic responses of human V γ 9V δ 2 T cells (clone GR4) against Raji target cells (effector to target ratios: 15/1 and 5/1) treated with grading doses of two clones of anti-BTN3 mAbs (#7.2 and #20.1). IgG1, isotype control. **(b)** Cytolytic responses of V γ 9V δ 2 T cells (clone GR4) against various human target cells (effector to target ratios: 15/1) sensitized by grading doses (0, 0.1, 1 and 10 μ g/ml) of anti-BTN3 mAb (#7.2). Data are presented as the mean value $\pm$ s.d. of triplicate samples.

Figure S3

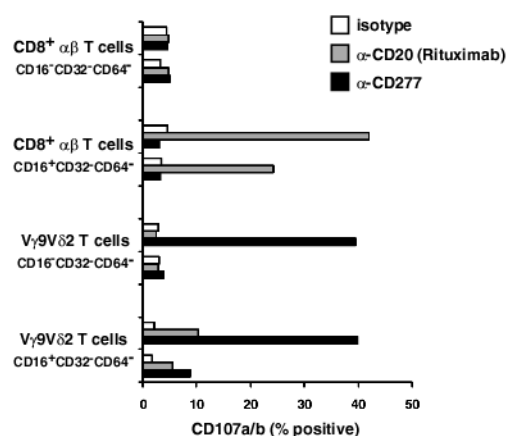


Fig.S3. Expression of CD107a/b on human $\alpha\beta$ $CD8^+$ and $V\gamma9V\delta2$ T cells, expressing or not Fc γ R molecules, following incubation with anti-CD20 (Rituximab) or anti-CD277 (#20.1) mAb-treated human B-LCL ($CD20^+CD277^+$). The surface expression of CD16 (Fc γ RIII), CD32 (Fc γ RII) and CD64 (Fc γ RI) molecules on effector $\alpha\beta$ (pp65 CMV/HLA-A2-specific line $\alpha\beta$ $CD8^+$ T cell transduced, or not, for CD16 expression) and $\gamma\delta$ ($CD16^-$, clone GR4; $CD16^+$, line GUI) T cells was checked by flow cytometry. The values for the percentage of CD107a/b $^+$ T cells are indicated and each antibody was used at 0.3 μ g/ml and 10 μ g/ml.

Figure S4

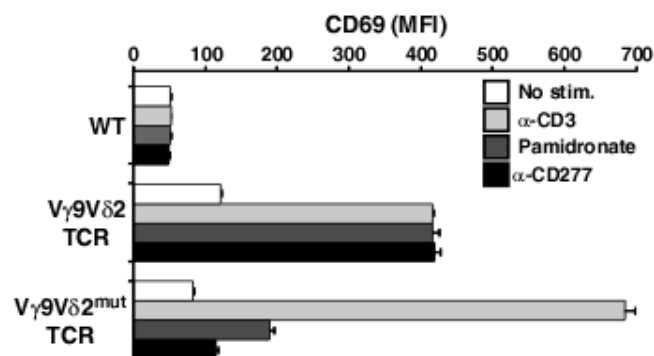


Fig.S4. Expression of CD69 on Vγ9Vδ2 TCR Jurkat T cell transductants following incubation with anti-CD277 mAb (#20.1; 10 μg/ml)- or NBP (Pamidronate, 250 μM)-treated B-LCL target cells (line 721.221). WT, control Jurkat T cells without TCR; Vγ9Vδ2 TCR, Jurkat T cells expressing a wild-type Vγ9Vδ2 TCR, Vγ9Vδ2^{mut} TCR, Jurkat cells expressing a Vγ9Vδ2 TCR carrying a mutation for the Vδ2 chain L97 residue. Anti-CD3 (#OKT3; 10 μg/ml). Data are presented as the mean value of geometric mean of fluorescence intensity (MFI) ± s.d. of triplicate samples and are representative of at least three independent experiments.

Figure S5

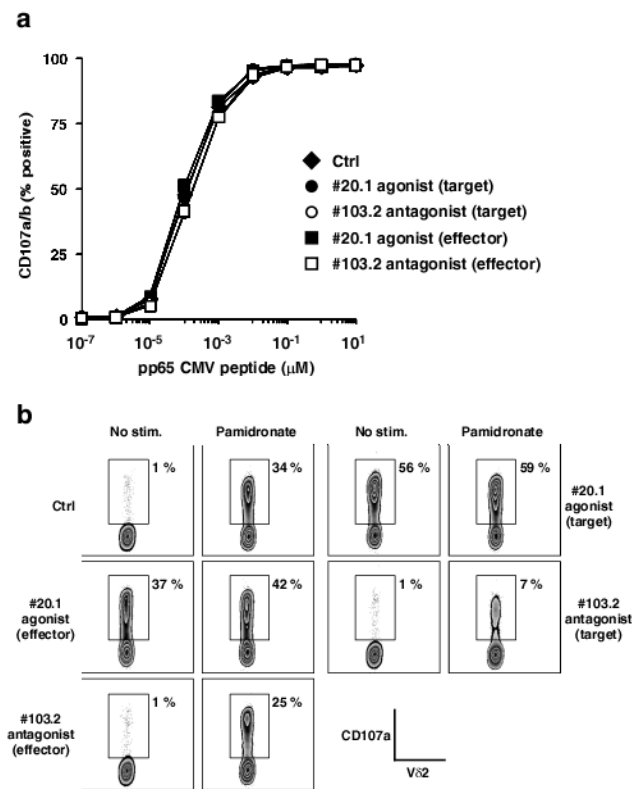


Fig.S5. CD107a expression on human $\alpha\beta$ CD8⁺ T cells (polyclonal line) following incubation with relevant peptide (CMV pp65/HLA-A2)-loaded HLA-A2⁺ human B-LCL (line HEN) target cells (**a**) or V γ 9V δ 2 T cells (line GUI) following incubation with NBP (Pamidronate, 100 μ M)-treated Raji target cells (**b**). As indicated, effector T or target cells were treated, or not (Ctrl), with either agonist (#20.1; 10 μ g/ml) or antagonist (#103.2; 10 μ g/ml) anti-CD277 mAbs. The values for the percentage of CD107a/b⁺ T cells are indicated.

Supplemental Materials and Methods

Cell division. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) was from Invitrogen. Freshly isolated PBMCs (2×10^6) were labeled with CFSE ($1.5 \mu\text{M}$ in PBS) for 10 min at 37°C , washed and maintained for 15 min at 37°C in complete medium to allow the release of dye excess. Labeled cells were activated, in the presence of IL-2 (300 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.

Ab-dependent cell cytotoxicity. Anti-human CD20 mAb (Rituximab) and human $\alpha\beta$ CD8⁺ T cells (CMVpp65/A2) expressing or not CD16 Fc γ RIII lentiviral transduction, were kindly provided by B. Clémenceau and H. Vié (INSERM UMR892).

2) Résultats complémentaires et discussion : lien entre structure et fonction des isoformes BTN3.

Les mécanismes reliant les protéines BTN3, les PAg et le TCR γ 9 δ 2 sont loin d'être clairs et sont à première vue extrêmement complexes. La structure globale des BTN3 et les homologues reliant leurs différents domaines protéiques aux familles IgSF, MhcSF, B7 et BTN (Intro chapIV) attribuent virtuellement aux BTN3 des fonctions de récepteurs, ligands, chaperonne ou même molécules de présentation.

Le rôle des différents domaines de BTN3 a seulement été partiellement caractérisé et sera approfondi lors de futurs travaux. Pour le moment, seule la fonctionnalité de quelques constructions protéiques dans la perception des PAg ou des anti-BTN3 par les LT γ 9 δ 2 a été examinée (**figure 37**).

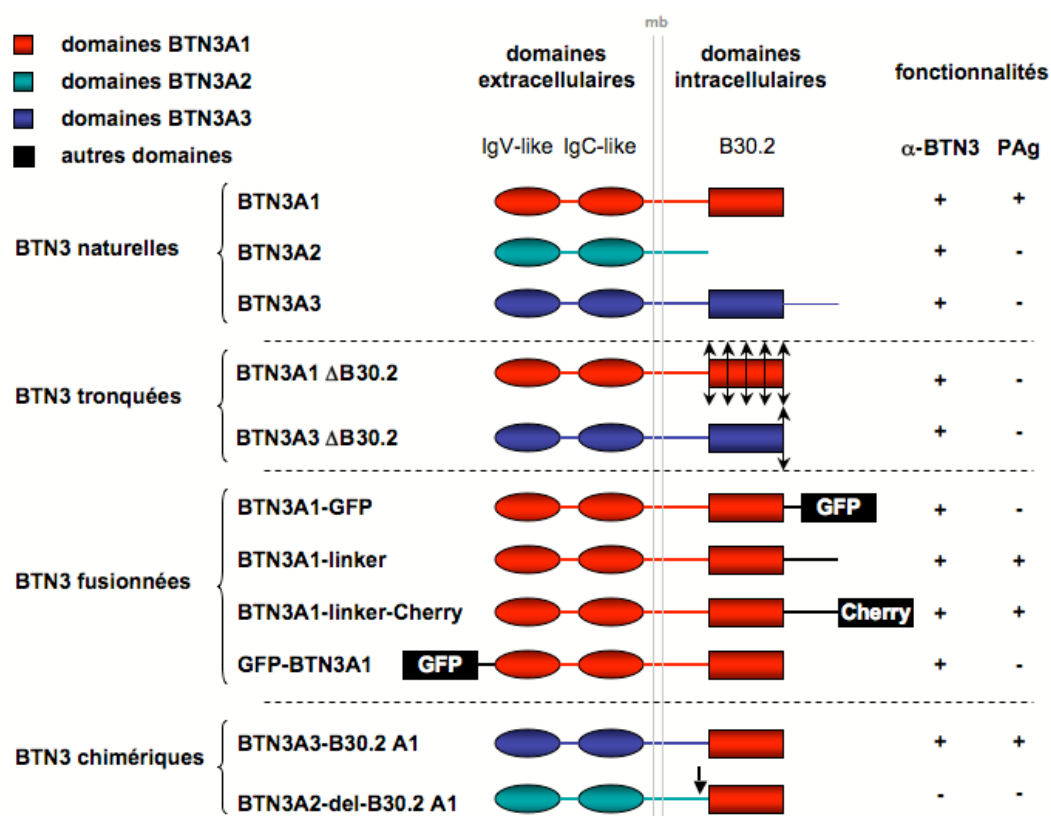


Figure 37 : Structure et fonction des différentes constructions BTN3.

BTN3A2-del-B30.2 A1 est composée de la fusion entre la protéine BTN3A2 complète et le domaine B30.2 intracellulaire de BTN3A1. Cette construction diffère de toutes les autres par la délétion d'un acide aminé (...) au niveau de la jonction avec le domaine B30.2. La fonctionnalité des protéines est définie, après réexpression transitoire dans les cellules HEK déficientes en BTN3 endogènes et vérification de l'expression membranaire, comme la capacité à activer les LT γ 9 δ 2 après traitement des HEK par du pamidonate (PAg) ou par l'anti-BTN3 #20.1 (α-BTN3).

Rôles des domaines intracellulaires dans la fonction des BTN3.

Des trois BTN3 naturelles, seule BTN3A1 permet la perception des PAg par les LTy9δ2 (**article 2**). Or ces trois isoformes diffèrent principalement par leur domaine intracellulaire B30.2 dont est dépourvue BTN3A2, et dont l'extrémité C-terminale est sensiblement plus longue pour BTN3A3 comparé à BTN3A1 (**figure 37**). Le rôle nécessaire de ce domaine dans la perception des PAg a été mis en évidence par la génération de diverses BTN3A1 tronquées à l'extrémité C-terminale (BTN3A1 DB30.2), et qui se sont toutes révélées déficientes pour la présentation des PAg aux LTy9δ2. Par ailleurs, le remplacement du domaine intracellulaire B30.2 complet de BTN3A3 par celui de BTN3A1 (BTN3A3-B30.2 A1) était suffisant pour restaurer la fonction de présentation de PAg à BTN3A3. Ainsi, seul le domaine B30.2 de BTN3A1, nécessaire dans sa totalité, était donc capable de conférer cette fonction aux protéines BTN3.

Par ailleurs, la perte de fonction de BTN3A1 après ajout d'un domaine GFP au niveau intracellulaire (BTN3A1-GFP), et le gain de fonction de BTN3A3 après remplacement de son domaine B30.2 par celui de BTN3A1 (BTN3A3-B30.2 A1) nous a conduit à étudier l'hypothèse que la région additionnelle du domaine B30.2 de la protéine BTN3A3 pouvait suffire à empêcher sa fonctionnalité par gêne stérique. Afin d'étudier cette hypothèse, une protéine BTN3A3 portant un domaine intracellulaire B30.2 tronqué, de longueur équivalente à celle du domaine B30.2 de BTN3A1, a été générée (BTN3A3 DB30.2). Cette modification ne suffisait pas à restaurer la fonction de BTN3A3, la région responsable d'une éventuelle interaction (directe ou indirecte) avec les PAg semblait être exclusivement portée par le domaine B30.2 de BTN3A1.

Le problème de gêne stérique probablement occasionnée par la fusion avec un domaine GFP du côté C-terminal de BTN3A1 a pu être contourné par l'ajout d'un linker entre le domaine B30.2 et un autre domaine protéiques (BTN3A1-linker-Cherry).

Par ailleurs, la fusion avec un domaine GFP du côté N-terminal de BTN3A1 a permis de mettre en évidence que le domaine intracellulaire B30.2 de BTN3A1 n'était pas suffisant pour la perception des PAg, puisque que la modification du domaine extracellulaire de BTN3A1 pouvait aboutir à la perte de sa fonction.

Pourtant, toutes ces modifications des extrémités N-terminale ou C-terminales préservait la fonctionnalité des protéines BTN3 pour l'activation des LTy9δ2 après traitement avec des anti-BTN3 agonistes. Seule la protéine chimérique BTN3A2-del-B30.2 A1 était non fonctionnelle pour l'activation des LTy9δ2, à la fois par les PAg et par les anti-BTN3. Ce singulier résultat, difficile à interpréter pour le moment, pourrait être dû à une subtile différence entre cette protéine et les autres BTN3 à domaines B30.2. En effet, le domaine B30.2 de BTN3A1 a directement été fusionné avec la protéine entière BTN3A2, et la comparaison de la région jonctionnelle de cette protéine de fusion avec toutes les autres a révélé la délétion d'un unique acide aminé situé juste avant le domaine B30.2. Cette délétion pourrait modifier subtilement l'organisation du domaine intracellulaire B30.2 des BTN3, empêchant toute fonction. Cette observation pourrait s'expliquer par une gêne stérique intracellulaire empêchant le remodellement extracellulaire des BTN3 sous l'effet des anti-BTN3 agonistes, ou encore par la participation de la région intracellulaire précédant le domaine B30.2, à l'effet fonctionnel des anti-BTN3.

Rôle des domaines extracellulaires IgC et IgV dans la fonction des BTN3.

A l'opposé de la variabilité entre les domaines intracellulaires, les domaines extracellulaires IgV-like et IgC-like sont extrêmement conservés entre toutes les isoformes BTN3 (Intro ChapIII II 2a). Cette observation suggère que tous les domaines extracellulaires des BTN3, par ailleurs fonctionnels pour la perception du traitement par les anti-BTN3 agonistes, pourraient être fonctionnellement équivalents lors du processus de présentation des PAg aux LTy9δ2. Cette hypothèse a été confirmée par la génération d'une protéine de fusion tout à fait fonctionnelle, portant les domaines extracellulaires de BTN3A3 et le domaine intracellulaire B30.2 de BTN3A1 (BTN3A3-B30.2 A1). La fonctionnalité des domaines extracellulaires de BTN3A2 n'a pas pu être évaluée puisque la protéine formée par la fusion entre les domaines extracellulaires de BTN3A2 et le domaine B30.2 de BTN3A1 n'était déjà pas fonctionnelle après traitement par les anti-BTN3 agonistes.

Ainsi, à la manière de Skint-1 (Intro ChapIII III), l'ensemble des régions et domaines des BTN3 est nécessaire à la perception des PAg par les LTy9δ2, et il est probable que chacun participe à une infime partie du processus complexe se déroulant entre la perception intracellulaire des PAg dans les cellules cibles, et à la perception extracellulaires des PAg par les LTy9δ2.

Modèle général impliquant les BTN3A1 dans la perception des PAg par les LTy9δ2.

Le modèle général découlant de l'ensemble du travail de recherche exposé précédemment (**article 2**) et des résultats préliminaires concernant le lien entre la structure des BTN3 et leurs fonctions dans la perception des PAg par les LTy9δ2 est résumé **figure 38**. (i) Le mécanisme de prise en charge des PAg exogènes et endogènes semble tout à fait équivalent. Les PAg endogènes pourraient être sécrétés par les cellules productrices et prises en charge en même temps que les PAg extracellulaires au niveau de la membrane des cellules cibles, mais l'importance du domaines intracellulaire de BTN3A1, ainsi que l'instabilité des PAg dans le milieu extracellulaire suggèrent plutôt une internalisation des PAg exogènes suivit de la prise en charge des PAg exogènes comme endogènes au niveau intracellulaire. (ii) Les PAg pourraient interagir de manière directe ou indirecte avec le domaine intracellulaire de BTN3A1. Les propriétés respectives des PAg échangeurs potentiels de phosphate (Intro ChapII II 2c), et du domaine B30.2 phosphorylable (Intro ChapIII II 3) nous permettent même d'envisager une interaction directe avec échange de phosphate entre les PAg et le domaine B30.2, hypothèse séduisante qui sera examinée dans un proche avenir. (iii) Cette interaction aboutit au remodellement intra/extracellulaire de BTN3, probablement au sein d'un complexe impliquant d'autres acteurs moléculaires non identifiés, et pourrait impliquer la formation/rupture de dimères de BTN3 par l'intermédiaire du domaine intracellulaire B30.2 et/ou des domaines extracellulaires Ig-like, comme le suggèrent les pertes de fonction de BTN3A1 par ajout de domaines GFP en C-terminal et N-terminal respectivement. En effet, des domaines intracellulaires B30.2 homologues à celui de BTN3A1 ont été décrits dans de multiples interactions, et sont largement connus comme participant à la formation de multimères nécessaires aux fonctions des protéines qui les portent (Intro ChapIII II 3). Les domaines extracellulaires de la IgSF sont capables d'interagir

avec de nombreuses molécules, en cis ou en trans, formant notamment des homo ou hétérodimères protéiques (Intro ChapIII II 2). (iv) Ce remodellement extracellulaire des cellules cibles, efficacement mimé par les anti-BTN3, est perçu par les LT γ 9 δ 2 de manière TCR dépendante. Cette reconnaissance est probablement indirecte, puisque dans le cas contraire il est plus que probable que l'ajout d'un domaine GFP immédiatement après l'extrémité N-terminale de BTN3A1 empêcherait stériquement l'interaction en trans du domaine IgV-like de BTN3A1 avec un éventuel contre-récepteur présent à la surface du LT γ 9 δ 2. Or une telle protéine permet encore la reconnaissance par les LT γ 9 δ 2 de cibles traitées par des anti-BTN3 agonistes. Des molécules non conservées entre l'homme et la souris pourraient intervenir lors de la prise en charge des PAg et/ou du remodellement de la surface des cellules cibles et expliquer l'échec du transfert de la fonction de BTN3A1 pour la présentation des PAg dans des cellules murines.

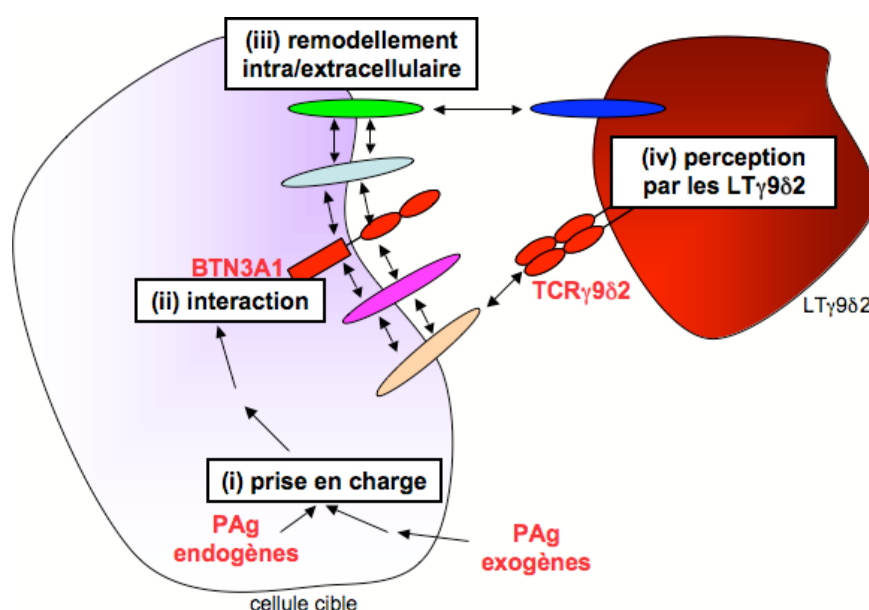


Figure 38 : Modèle hypothétique de perception des PAg par les LT γ 9 δ 2.

(i) Les PAg endogènes et exogènes sont pris en charge au niveau intracellulaire par un mécanisme qui reste à définir, aboutissant à (ii) une interaction directe ou indirecte avec le domaine intracellulaire de BTN3A1. Cette interaction va donner lieu à un remodellement surfacique de la cellule cible, impliquant probablement de nombreux partenaires indéterminés incluant vraisemblablement des acteurs espèces spécifiques. (iv) Ce remodellement sera finalement perçu par les LT γ 9 δ 2, par interaction spécifique avec le TCR γ 9 δ 2, et éventuellement d'autres contre-récepteurs tels que des costimulateurs, corécepteurs ou molécules d'adhésion.

Intégration des autres isoformes de BTN3 dans la fonction de perception des PAg par les LTy9δ2.

De nombreux aspects de ce modèle sont actuellement étudiés, mais un autre point central dans le mécanisme de perception des PAg par les LTy9δ2 réside dans les rôles physiologiques des différentes isoformes de la famille BTN3. En effet, seule la protéine BTN3A1 entière est capable de médier efficacement cette fonction, et il est envisageable que les isoformes issues des gènes BTN3A2 et BTN3A3 ou encore les produits de l'épissage alternatif du domaine intracellulaire de BTN3A1, puissent interférer avec cette fonction. En effet, l'étude des profils d'expression des BTN3 dans les cellules humaines révèle une expression de BTN3A1 particulièrement faible relativement aux autres isoformes, et des profils dépendant des types cellulaires (Messal et al., 2011), des tissus (Arnett et al., 2009, cytokines) et probablement des contextes physiopathologiques (Compte et al., 2004).

Les isoformes BTN3 définis au premiers abord comme non fonctionnels car incapables de médier l'effet des PAg sur l'activation des LTy9δ2 par eux-mêmes, pourraient (i) servir de récepteurs loeurs modulant négativement la fonction de BTN3A1, ou encore (ii) participer à cette fonction en étant impliqués dans la formation d'un complexe membranaire, en synergie avec les isoformes BTN3A1 fonctionnels. Par exemple, la formation de dimères de domaines B30.2 mise en évidence pour la protéine sRFLP1 (Intro ChapIII II 2) a révélé une participation dissymétrique des deux domaines, l'un jouant le rôle d'un domaine donneur (extrémité C-terminale), et l'autre étant le domaine accepteur (corps du domaine). De plus, les domaines IgSF de tous les isoformes BTN3 étants à première vue équivalents, ils pourraient également participer à la formation de dimères au niveau extracellulaires, contribuant à la mise en place d'un éventuel complexe à la surface des cellules cibles, étape ultime de la perception des PAg par les LTy9δ2.

II. Mode d'action des anti-BTN3 sur la modulation de l'activation des LT γ 9 δ 2 humains.

1) Article 3 : The molecular basis for modulation of human V γ 9V δ 2 T cell responses by CD277/Butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies.

Palakodeti A, Sandstrom A, Sundaresan L, Harly C, Nedellec S, Olive D, Scotet E, Bonneville M, Adams EJ.

Soumis.

L'une de nos hypothèses les plus simples concernant le lien entre BTN3 et les PAg, ainsi que le mode d'action des anti-BTN3 sur l'activation des LT γ 9 δ 2 était initialement:

(i) Les protéines BTN3 existent sous différentes conformations, dont certaines sont capables d'interagir directement avec le TCR γ 9 δ 2 et d'activer les LT γ 9 δ 2.

(ii) L'association entre BTN3 et les anti-BTN3 agonistes mime l'effet de l'interaction entre les PAg et BTN3 en induisant une modification conformationnelle de BTN3 reconnue par les LT γ 9 δ 2.

(iii) Les anti-BTN3 antagonistes préviennent cette reconnaissance par blocage stérique de l'interaction entre BTN3 et le TCR γ 9 δ 2, et/ou par inhibition du changement de conformation de BTN3.

L'équipe d'EJ Adams a étudié les différents aspects de cette séduisante hypothèse à l'aide de plusieurs techniques biochimiques et biophysiques de pointe. Ces travaux décrivant l'aspect moléculaire des interactions entre les PAg, le TCR γ 9 δ 2, les anti-BTN3, et le domaine extracellulaire des protéines BTN3, conjointement à notre étude du processus d'activation par les anti-BTN3 au niveau cellulaire (**article 2**), suggèrent un modèle tout à fait différent de celui énoncé initialement. En particulier, aucune interaction directe n'a pu être mise en évidence entre les PAg et les BTN3, ni entre les BTN3 et le TCR γ 9 δ 2 en présence d'anti-BTN3 ou de PAg.

Par contre, cette étude a permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs sites éventuels de dimérisation au niveau des domaines extracellulaires des BTN3, permettant d'envisager un remodellement moléculaire différentiel induit par les anti-BTN3 agonistes et antagonistes, par modification de la stabilité de ces dimères au niveau membranaire, et par cross-link différentiel des Acms. Ces spéculations *in silico* ne prennent malheureusement en compte, ni la participation du domaine intracellulaire B30.2 des BTN3 pourtant largement décrite dans les processus de dimérisations des protéines qui les portent, ni la formation éventuelle d'hétérodimères impliquant différents isoformes de BTN3, ni l'implication de molécules additionnelles pouvant interférer avec la formation/dissociation de ces dimères. L'ensemble de ces résultats encore très hypothétiques, suggère un modèle d'action des anti-BTN3 bien plus complexe que celui initialement envisagé.

Afin de mettre en place un nouveau modèle permettant d'expliquer les effets biologiques des anti-BTN3, et de le relier à l'effet des PAg sur l'activation des LTy9δ2, un certain nombre de pistes de recherches seront explorées dans un futur proche. En particulier, l'existence réelle de tels dimères de BTN3 à la surface de cellules, ainsi que les causes (PAg, anti-BTN3 agonistes) et conséquences (activation/inhibition des réponses γ9δ2) de la formation/rupture de ces dimères seront examinées.

**The molecular basis for modulation of human V γ 9V δ 2 T cell responses by
CD277/Butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies.**

Aparna Palakodeti^{1,2*}, Andrew Sandstrom^{1*}, Lakshmi Sundaresan¹, Christelle Harly³,
Steven Nedellec³, Daniel Olive⁴, Emmanuel Scotet³, Marc Bonneville³, Erin J. Adams^{1,2†}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Chicago, 929 E. 57th
St. GCIS W236 Chicago, USA.

² Committee on Immunology, University of Chicago, 929 E. 57th St. GCIS W236,
Chicago, USA.

³ INSERM UMR892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Institut de
Recherche Thérapeutique Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes
cedex, France.

⁴ INSERM UMR891, Centre de Recherche en Cancérologie Marseille, Institut Paoli-
Calmettes, 232 Boulevard Sainte Marguerite, 13009 Marseille, France.

*These authors contributed equally to this work.

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: ejadams@uchicago.edu

Abstract:

Human V γ 9V δ 2 T cells respond rapidly and potently to the presence of endogenous or exogenous phosphoantigens, leading to effective responses to infection or tumorigenic transformation. Evidence pointing to a role for the CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) molecules in this response led us to investigate the structures of these molecules and their modifications upon binding to an agonist antibody (20.1) that mimics phosphoantigen mediated V γ 9V δ 2 activation. In addition, we have also studied the interaction of BTN3A with an antagonist antibody (103.2) that blocks V γ 9V δ 2 stimulation. These structures provide a model by which to understand how these antibodies induce stimulation of V γ 9V δ 2 through conformational modification and subsequent multimerization of BTN3A, or can antagonize V γ 9V δ 2 stimulation through conformational stabilization of BTN3A in an auto-inhibited state.

Introduction:

$\gamma\delta$ T cells are an innate-like lineage of T cells that demonstrate a pre-activated or memory phenotype and are capable of secreting a diverse array of cytokines corresponding to either an immuno-stimulatory or immuno-regulatory phenotype^{1,2}. In addition, some $\gamma\delta$ T cells can directly kill target cells through induction of apoptosis and/or cytotoxicity. Most $\gamma\delta$ T cells in mice and humans reside in the epithelial tissues however there is a smaller percentage that circulates in the blood¹. In humans, $\gamma\delta$ T cells comprise between 0.5-20% of blood-circulating T cells, the majority of which express a rearranged T cell receptor (TCR) composed of V γ 9 and V δ 2 domains, thus, this population is referred to as V γ 9V δ 2. This $\gamma\delta$ T cell population responds to small phosphate based antigens (phosphoantigens) that derive from microbes (such as hydroxymethyl but-2-enyl pyrophosphate, HMBPP), or are endogenous intermediates of the mevalonate pathway (such as isoprenylpyrophosphate, IPP) that accumulate in virally infected and transformed cells^{3,4}. Thus this population can survey for both microbial infection and cellular transformation making phosphoantigens and their derivatives attractive targets for immunotherapy⁵.

The direct role of the V γ 9V δ 2 T cell receptor in phosphoantigen mediated recognition has been demonstrated through TCR transfer⁶; mutagenesis has further defined that phosphoantigen specific stimulation is mediated by an assemblage of the V γ 9V δ 2 TCR's complementary determining region (CDR) loops⁷. While a crystal structure of a V γ 9V δ 2 TCR revealed a basic patch formed by the CDR loops suitable for phosphoantigen binding⁸, there is no evidence of direct association between the two. Instead, several lines of evidence point to a cell-surface protein or protein complex that

directly mediates this interaction. For example, cell-cell contact is required for V γ 9V δ 2 stimulation⁹, trypsin treatment of target cells impairs V γ 9V δ 2 T cell activation¹⁰ and macaque but not mouse target cells¹⁰⁻¹² are recognized in the presence of phosphoantigen. Together these data implicate the presence of a primate specific, cell surface molecule or molecules that are recognized in the presence of high concentrations of phosphoantigens.

Recent characterization of an antibody that can mimic the stimulatory effect of phosphoantigens on V γ 9V δ 2 T cells¹³ has focused attention on a class of cell surface proteins belonging to the B7 superfamily. B7 and related molecules contain two Immunoglobulin-like domains: an N-terminal Ig-V-like and a C-terminal Ig-C-like domain. These proteins have important functions in immune regulation, acting as co-stimulatory molecules (B7-1, B7-2) for T cell activation, and potent inhibitory molecules (PD-L1) to down-regulate T cell responses¹⁴. The B7-related butyrophilin (BTN) and butyrophilin-like (BTNL) proteins have recently been more fully characterized, revealing a range of immune and non-immune related functions¹⁵⁻¹⁹. Application of an antibody specific to a sub-class of BTN proteins, CD277/butyrophilin-3 (BTN3A)¹⁵ induced strong stimulation of V γ 9V δ 2 T cells¹³. This agonist antibody, 20.1, binds to the extracellular domain of BTN3A molecules and induces V γ 9V δ 2 activation with similar kinetics and potency as with addition of phosphoantigens. A second antibody, 103.2, has been characterized that inhibits this effect.

Three *BTN3A* genes have been characterized in humans, *BTN3A1*, *BTN3A2* and *BTN3A3*, which are members of a large family of butyrophilin genes located in the telomeric end of the Major Histocompatibility Complex Class I region²⁰⁻²² and encode

cell surface expressed proteins that have high similarity in their extracellular domains yet differ in the domain structure of their intracellular domains. BTN3A1 and BTN3A3 both contain an intracellular B30.2 domain whereas BTN3A2 does not. While crystal structures exist of B7 family members such as B7-1 (CD80)²³, B7-2 (CD86)²⁴ and PD-L1^{25,26}, none currently exist of the butyrophilin proteins. Therefore, to understand the molecular basis for BTN3A's role in V γ 9V δ 2 reactivity, we have determined the three dimensional structures of the extracellular domains of the three BTN3A isoforms and studied their binding by single-chain versions (scFvs) of the 20.1 and 103.2 antibodies. Along these lines, we co-crystallized BTN3A1 with 20.1 scFv and 103.2 scFv and determined their complex structures to 3.0Å and 3.6 Å respectively. Our biophysical studies of antibody interaction with BTN3A and their corresponding structures provide insight into the structures and adopted conformations of these proteins that serve to modulate V γ 9V δ 2 T cell activation.

Results:

Crystal structures of the three BTN3A extracellular domains

The extracellular domains of the three BTN3A isoforms were expressed recombinantly in insect cells for use in crystallization trials. Each isoform readily crystallized in related conditions producing large diamond-shaped plates that diffracted well. Datasets were collected for each isoform and their structures determined to 1.9Å, 2.4Å and 2.4Å resolution for BTN3A1, BTN3A2 and BTN3A3, respectively. The crystallographic and refinement statistics are summarized in Supplementary Table 1. One molecule was present in the asymmetric unit for each of the BTN3A isoforms. The general domain structure of BTN3A is shown in Figure 1, left panel. BTN3A molecules have two Ig-like domains: an N terminal canonical Ig-V like domain and a C terminal Ig-C type domain, similar to other B7 family members. The closest structural homologue, as determined through the DALI server (http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/) was Programmed Cell Death 1 Ligand 1 (PD-L1) (21% amino acid identity and 3.4Å² Root Mean Squared Deviation, RMSD). However, BTN3A's Ig-V like domain had higher structural homology (1.0Å RMSD) and amino acid identity (45%) to the single Ig domain containing protein, myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG)²⁷.

Comparing within the BTN3A structures, BTN3A1, BTN3A2 and BTN3A3 were highly similar, differing from each other by backbone C α RMSD of no more than 0.89Å². These RMSD differences were primarily due to slight shifts in the orientation of the C domain in relation to the V domain between the three isoforms. Aligning the three isoforms via their V domains and using BTN3A1 as a reference, BTN3A2's C terminal domain is shifted ~7° clockwise, while BTN3A3's C terminal domain is shifted ~3°

counter-clockwise (Figure 1 middle panel). There are no amino acid differences at the V-C domain interface between the three isoforms that would explain these shifts therefore it is likely that rotational flexibility of the V-C domain interface combined with subtle differences in crystal packing between the three isoforms explains these alternative orientations. Alignment of BTN3A1 with PD-L1 (PDB ID: 3BIK) via their V domains revealed a more exaggerated shift between the V-C domains of these two proteins. PD-L1's C domain is shifted $\sim 30^\circ$ counter-clockwise (Figure 1 right panel), explaining the higher RMSD between these two proteins. Indeed, the RMSD differences by domain between BTN3A and PD-L1 were $1.6\text{\AA}^2$ and $2.0\text{\AA}^2$ for the Ig-V and Ig-C type domains, respectively.

Dimerization of the BTN3A molecules

In our crystal structures of BTN3A1, BTN3A2 and BTN3A3, two separate dimer forms were noted in the crystal lattice (Figure 2). Dimer 1 consisted of two BTN3A molecules in a V-shape orientation, associated by a symmetrical interface at the membrane proximal region of the C domain (Figure 2, left panel). This interface would orient the BTN3A molecules in an upright position away from the membrane when modeled onto the cell surface with the transmembrane regions located close to each other. Dimer 2, in contrast, associates two BTN3A in a non-symmetrical interface in a head to tail orientation, joining a V domain from one BTN3A with a C domain from a second BTN3A (Figure 2, right panel). This association would require the BTN3A dimer to be oriented parallel to the cell membrane (Figure 2, bottom of right panel) and the transmembrane domains would be separated by $\sim 80\text{\AA}$, the approximate length of one

BTN3A molecule. Both interfaces occupy considerable surface area, with a combined Buried Surface Area (BSA) of $\sim 1523\text{\AA}^2$ for Dimer 1 and $\sim 1077\text{\AA}^2$ for Dimer 2. Both interfaces are mediated by hydrogen bonding and van der Waals (VDW) contacts (Supplementary Table 2). The hydrogen-bonding network of the Dimer 1 interface is predominantly main-chain/main-chain contacts that connect the Ig β -sheets together by two symmetric, parallel, β -strand pairings of strands A and G (Supplementary Figure 1, top). Only three residues contribute specific side-chain interactions to this interface: Asp 120, Asp 124 and Thr 203 and these contacts comprise only seven of the sixteen h-bonds between the two monomers. The Dimer 2 interface incorporates more side-chain h-bonding interactions (five of the seven h-bonds are side chain mediated) although the overall numbers of contacts is less than that of Dimer 1. The C' and C'' strands from the V domain dominate the interface of Dimer 2, pairing with residues from the A and D strands from the C domain of the opposing monomer. Neither Dimer 1 or Dimer 2 have been observed in the crystal structures of other B7 family members; while they are homodimeric molecules, each appear to have unique dimerization interfaces²³⁻²⁵.

Examination of the residues that constitute these two dimers across primate species, and between the three BTN3A isoforms, reveals striking conservation at these positions across evolutionary time (Supplementary Figure 2). The interface of Dimer 1 shows less conservation however the majority of contacts at this interface are main-chain interactions. The three residues contributing specific side-chain interactions, Asp 120, Asp 124 and Thr204 are either conserved across species and isoforms, or have only conservative changes at this position (D120N and D124E). The Dimer 2 interface

is completely conserved in the V domain (Supplementary Figure 2) and has moderate conservation in the C domain, although many of these differences are also observed in the other BTN3A isoforms. As Dimer 2 was observed in the crystal structures of all three BTN3A isoforms, these amino acid polymorphisms are clearly tolerated in the Dimer 2 interface.

To determine whether BTN3A molecules exist as a dimer in solution, we subjected our recombinant BTN3A molecules to multi-angle light-scattering (MALS) to determine the molecular weight of the species in solution. Figure 3A shows the UV absorbance profile of the three isoforms and the calculated molecular weight of these peaks. Each isoform produced a symmetric peak at elution volume ~14mls; the molecular weight of this peak was determined to be ~46-48 kD depending on the BTN3A isoform. The theoretical molecular weight of a BTN3A extracellular domain monomer is ~24kD, consistent with SDS-PAGE mobility of these proteins under denaturing and non-reducing conditions, therefore our MALS data supports BTN3A molecules as dimers in solution. All three monomeric BTN3A isoforms lack free cysteines, therefore these dimers represent non-covalently associated homodimers. The BTN3A2 isoform produced two peaks, the second of which was in the minority. This peak likely represents a population of monomer protein, a species not observed in the other isoforms.

Recognition of BTN3A by the 20.1 and 103.2 antibodies.

Two antibodies, 20.1 and 103.2, were shown to have opposing effects on the activation of V γ 9V δ 2 T cells by target cells¹³. 20.1 produced an agonist effect,

mimicking the addition of phosphoantigens on target cells and stimulating V γ 9V δ 2 expressing effector T cells. In contrast, 103.2 was able to antagonist the effect of 20.1 and phosphoantigens, inhibiting the activation of V γ 9V δ 2. In order to study the association of the 20.1 and 103.2 antibodies with BTN3A and to determine the structural basis of their binding, we generated single-chain versions of the heavy and light chain variable regions from each antibody. These scFv constructs were used to measure stoichiometry, determine binding kinetics and affinities and for structure determination.

To first determine the stoichiometry of binding of the scFvs to BTN3A, we performed MALS to measure the molecular weight of the scFvs alone and in complex with BTN3A. Shown in Figure 3B are the MALS profiles of BTN3A1, 20.1 scFv, 103.2 scFv and their complexes. This analysis was also performed for the BTN3A2 and BTN3A3 isoforms with similar results, therefore only the MALS profiles for BTN3A1 are shown here. The molecular weights of all species are shown in Table 1. The scFvs had a molecular weight consistent with monomers: ~28kD and 26kD for the 20.1 scFv and 103.2 scFv respectively. When associated with the BTN3A molecules, the calculated molecular weights of these species were consistent with two scFvs per BTN3A dimer (~98kD and ~95kD for 20.1-BTN3A1 and 103.2-BTN3A1, respectively), suggesting that each BTN3A monomer has one antibody epitope. In addition, we also tested whether there is competition in binding between the antibodies, suggestive of overlapping epitopes. The higher molecular weight of the BTN3A1-20.1scFv-103.2scFv complex (~110 kD) was consistent with both scFvs able to bind one BTN3A concurrently, our first line of evidence that these two antibodies recognize distinct epitopes on the BTN3A molecule. While the measured molecular weight was less than

that expected for the full BTN3A-20.1-103.2 complex (~150kD), we interpret this measured value to represents an average of saturated and unsaturated complexes, however it still provides evidence that both antibodies can associate with BTN3A concurrently.

To quantitate the strength of binding of the 20.1 and 103.2 scFvs to the BTN3A isoforms, we performed surface plasmon resonance on each BTN3A isoform with each scFv. Shown in Figure 4A are the concentration dependent sensograms used to determine the kinetics of binding reported in Table 2. The binding kinetics are similar across the BTN3A isoforms, suggesting these antibodies recognized epitopes conserved across the BTN3A isoforms. In addition, the association rate (K_a) was very similar between 103.2 and 20.1 (ranging from 1.2 to 2.4×10^5 1/Ms), however 20.1 dissociated approximately five times faster than 103.2, leading to an overall lower affinity of the agonist antibody (~50nM for 20.1 compared with ~10nM for 103.2). To further confirm that the antibodies bind to separate epitopes on the BTN3A molecule, we performed competition SPR where the 20.1 scFv antibody was immobilized on the chip and either the BTN3A-103.2 complex (Figure 4B left) or the BTN3A-20.1 complex (Figure 4B right) was flowed over this chip to assess binding. Clear binding was observed in the BTN3A-103.2 complex and not with the BTN3A-20.1 complex, establishing that 103.2 does not inhibit 20.1 binding. Therefore the antagonist effect of 103.2 is not simply due to blocking of the 20.1 epitope.

We also evaluated the biological effects of the scFv antibodies on V γ 9V δ 2 T cell activation. Figure 4C shows the effect of the 20.1 scFv relative to that of full-length 20.1 antibody and 20.1 Fab. The 20.1 scFv can clearly activate V γ 9V δ 2 as measured by

CD107a expression, but less well than that of the full length or Fab versions of the antibody, suggesting that the bivalent nature of the full-length antibody may function to enhance BTN3A mediated activation of V γ 9V δ 2 T cells. We also tested whether the scFv version of the 103.2 antibody could antagonize Vg9Vd2 activation (Figure 4D). While full-length 103.2 antibody was highly effective in blocking phosphoantigen activation of V γ 9V δ 2 cells, the scFv had no effect, suggesting an even more important role for the bivalent structure of this antibody for its antagonist function.

Complex structures of BTN3A1 with the 20.1 and 103.2 antibodies.

To fully understand the effect of antibody binding to the BTN3A molecules, and their role in V γ 9V δ 2 stimulation, we determined the structures of the complexes between each scFv and the extracellular domain of the BTN3A1 isoform. The 20.1-BTN3A1 complex crystals were well behaved and diffracted to moderate resolution, the structure of this complex was refined to 3.0 Å resolution with good statistics (Supplementary Table 1). The 103.2-BTN3A1 crystals, however, were difficult to reproduce and diffracted to low resolution, hence we report our preliminary model of this complex to 3.6Å resolution (Supplementary Table 1). While this resolution does not allow for side chain discrimination, it reveals the overall docking position of the 103.2 scFv on the BTN3A1 molecule. Together, these two complex structures shed light on the different association modes of the two scFv antibodies and allow us to generate a model of how the full-length antibody recognizes BTN3A molecules on the cell surface, and their effect on BTN3A dimerization and multimerization.

In the 20.1 scFv-BTN3A1 complex structure there are two 20.1scFv-BTN3A complexes in the asymmetric unit. These are related via a two-fold symmetry axis based on a dimerization interface of the two BTN3A1 molecules, similar in fashion to Dimer 1 noted in the uncomplexed BTN3A structures (Figure 5A). The complexed dimer, however, is shifted along the dimerization axis resulting in a $\sim 30\text{\AA}$ shift as measured from the most membrane-distal tip of the V domains. The relatively non-specific main-chain h-bonding of the Dimer 1 interface (Supplementary Figure 1, top) allows for this subtle shift that results in rotation of the V domains. The 20.1 scFvs bind to the outer region of the V domain, predominantly interfacing with the C' and C'' strands of the V domain with a footprint almost exactly overlapping with that of the V domain interface of Dimer 2. 33 of the 37 V domain contacts are identical to that seen in the Dimer 2 interface (Supplementary Table 3 and Supplementary Figure 2, shown as green stars), thus, binding of the 20.1 antibody to the V domain of BTN3A would directly compete with the Dimer 2 state. Indeed, this dimer is not observed in the 20.1scFv-BTN3A complex crystal lattice. However, Dimer 2 can still be bound by one 20.1 scFv through recognition of the "free" V domain interface from the BTN3A monomer complexed through its C domain. The heavy chain CDR loops of 20.1 scFv establish the majority of contacts and contribute $\sim 85\%$ of the BSA of the interface. The numbers of contacts are spread equitably across the CDR1, CDR2 and CDR3 heavy chain loops, with h-bonds, salt-bridges and VDW interactions well represented. The light chain contributes only $\sim 15\%$ of the BSA with seven of the eight contacts mediated by the CDR3 loop. The light chain CDR1 loop contributes one VDW contact to the interaction.

Based on our structures of the 20.1 scFv with BTN3A, we can establish a model for how the full-length antibody would recognize BTN3A on the cell surface, both in the Dimer 1 and Dimer 2 conformations. In the BTN3A Dimer 1 state, the orientation observed for 20.1scFv on the BTN3A monomer would make it improbable for one bivalent antibody molecule to bind one BTN3A dimer. Superposition of Fab models onto the docking position of the 20.1 scFvs provides a model by which to envision antibody binding; the distance between the two C termini of these Fabs is $\sim 215\text{\AA}$, a distance that could not be spanned by the linkers adjoining two Fabs to one Fc molecule. Even fully extended, these linkers span only $\sim 100\text{\AA}$. Therefore our structural model provides a strong argument for the stoichiometry of the 20.1 full-length antibody binding to the BTN3A Dimer 1 as 1:2, with one bivalent antibody binding two separate BTN3A Dimer 1s, leading to a multimerization of BTN3A dimers on the cell surface (Supplementary Figure 3, top left panel). Likewise, when the 20.1 scFv is modeled onto BTN3A Dimer 2, there is only one 20.1 exposed epitope, therefore we estimate the stoichiometry of binding to Dimer 2 to also be 1:2 (Supplementary Figure 3, bottom left panel). However, binding of the 20.1 full-length, bivalent antibody to this open epitope would only cross-link two BTN3A Dimer 2s (Supplementary Figure 3, bottom left panel, arrow to right), and thus would not be consistent with multimerization on the cell-surface. This mode of binding, however, would enhance the probability of Dimer 2 disruption through competition with the dimerization interface (Supplementary Figure 3, bottom left panel, arrow to left). This correlates with our observation of enhanced staining over time of the 20.1 antibody on target cells (Supplementary Figure 4), consistent with a

time-dependent increase of 20.1 epitopes on the cell surface, presumably through Dimer 2 disruption.

Our low-resolution structure of the 103.2 scFv/BTN3A1 complex reveals that the 103.2 antibody binds to the top of the BTN3A V domain via the BC, C'C", and DE loops (Figure 5B) which are the equivalent of the CDR1, CDR2 and HV4 loops of an antibody or TCR. This is a distinct epitope from that of the 20.1 scFv, confirming our MALS and SPR data that demonstrated both antibodies could bind in tandem. The 103.2 scFv interface with BTN3A1 is robust, with an estimated $880\text{\AA}^2$ BSA. The epitope is biased towards the heavy chain, with ~60% of the BSA due to heavy chain CDR loops. While our resolution precludes evaluating side chain involvement, it appears the heavy chain CDR1 and CDR2 loops are predominantly contacting BTN3A, although clear electron density was missing for the heavy chain CDR3 loop. The light chain, however, contacts BTN3A through all three CDR loops, comprising an estimated $330\text{\AA}^2$ of the complex BSA. The positioning of the 103.2 scFv on BTN3A would be consistent with a 1:1 stoichiometry of full-length antibody to BTN3A Dimer 1, as modeling of Fab onto the scFv of our complex model positions the C terminus of each Fab within a reasonable distance of ~70 Å to be connected by one Fc molecule (Supplementary Figure 3, top right panel).

Close examination of the crystal lattice of the 103.2-BTN3A1 complex revealed an alternative BTN3A1 dimerization form, with a similar head to tail conformation as that seen in the uncomplexed BTN3A lattices. This dimer interface had an estimated BSA of ~690 Å², nearly half of that of the uncomplexed Dimer 2. However, superposition of the 103.2 scFvs onto the uncomplexed BTN3A Dimer 2 showed no competition with the

Dimer 2 interface (Figure 5B), therefore it is unlikely that 103.2 scFv binding would disrupt Dimer 2 and that the shift seen in this complex structure is a product of crystal-packing. Indeed, both scFvs bind to the same plane of the BTN3A dimer thus making it plausible that Dimer 2 could be maintained on the cell surface in the presence of the 103.2 scFv and full-length antibody. Based on this model, we estimate that the stoichiometry of binding of the 103.2 full-length antibody with BTN3A Dimer 2 is 1:2 whereby one full-length antibody would bind to two BTN3A Dimer 2s. Because the Dimer 2 conformation has two antibody epitopes, this could lead to aggregation of BTN3A on the cell surface (Supplementary Figure 3, bottom right panel).

Our structural data provides a model by which to understand the agonist and antagonist effects of the 20.1 and 103.2 antibodies, respectively. Both antibodies can bind BTN3A Dimer 1 conformation, however our model suggests a bivalent association of the 20.1 with this BTN3A dimer, leading to multimerization of BTN3A in the context of membrane-bound BTN3A on the cell surface. In contrast, our model suggests the 103.2 antibody binds BTN3A Dimer 1 molecules monovalently. For BTN3A Dimer 2, we propose that 20.1 antibody binding would disrupt this dimer interface, whereas 103.2 binding is compatible with the Dimer 2 conformation and could potentially stabilize and multimerize this dimer form on the cell surface.

Discussion:

Our studies have focused on the structural features that implicate BTN3A molecules as antigens for V γ 9V δ 2 T cells in the context of phosphoantigen mediated activation. Our crystal structures of the BTN3A isoforms reveal remarkable homology to MOG and PD-L1, and comparisons within the BTN3A isoforms also demonstrate that these molecules have intrinsic flexibility between their membrane proximal Ig-C domain and their amino-terminal Ig-V domain. However these structures alone do not explain how these molecules could be involved in phosphoantigen mediated V γ 9V δ 2 activation. Key to this characterization has been two BTN3A specific antibodies that either mimic phosphoantigen induced activation (20.1) or antagonize this effect (103.2)¹³. The antigen-independent, antibody mediated stimulation of V γ 9V δ 2 via the BTN3A molecules argues against upregulation of BTN3A expression as the primary mechanism for V γ 9V δ 2 activation. Instead, our current model focuses on modification of the extracellular domains by the 20.1 antibody in a way that mimics phosphoantigen activation as the switch from non-stimulatory BTN3A to that of stimulatory.

Our structural and biophysical data establishes that the extracellular domains of BTN3A exist as dimers in solution and are thus likely preformed dimers on the cell surface. Two dimer forms were noted in our structures, both have appreciable BSAs to their interfaces suggesting both exist in solution. Our current model postulates that both dimers exist in equilibrium on the cell surface, as the orientation of both dimers are compatible with membrane bound forms. Our structural data of the complexes between the 20.1 and 103.2 antibodies addresses how binding of antibody induces changes to the organization of BTN3A molecules. We hypothesize that upon binding to BTN3A, the

agonist 20.1 antibody would lead to disruption of the Dimer 2 interface shifting the equilibrium to Dimer 1. Binding of 20.1 to Dimer 1 would also induce aggregation on the cell surface due to the 1:2 (antibody to BTN3A dimer) stoichiometry estimated from our crystal structure. The 103.2 antibody, in contrast, can bind to both BTN3A dimers forms and could perform distinct functions for both. For Dimer 1, 103.2 binds on the top of the BTN3A molecule, likely with a stoichiometry of 1:1 (antibody:BTN3A dimer) as the orientation of the 103.2 scFvs are ideal for binding of two Fab domains from one antibody. While we have no direct evidence that the V γ 9V δ 2 TCR binds BTN3A molecules, the orientation of the 103.2 on BTN3A would be highly suggestive of performing a blocking function, as the mass of the antibody would preclude other receptors being able to associate with BTN3A. However the antagonist function of the 103.2 antibody is completely dependent on its bivalent structure as the 103.2 scFv does not antagonize phosphoantigen mediated V γ 9V δ 2 T cell activation, so whether 103.2 does indeed directly block is unclear from our studies. 103.2 can also bind to Dimer 2, and may serve to stabilize and aggregate this conformation on the cell surface, in an “inactive” state. Combining the data and models we have thus far, we hypothesize that a putative recognition epitope for a V γ 9V δ 2 TCR on BTN3A lies on the surface left exposed after binding of both scFvs, accessible in the Dimer 1 state. This surface would include the N-terminal amino acids, the B strand and BC loop, and the FG loop. The amino acid residues encoded within these regions are completely conserved across the BTN3A isoforms as well as between humans and non-human primate species, consistent with the cross-reactivity seen between human and macaque V γ 9V δ 2 TCRs¹⁰⁻¹². Stabilization of Dimer 2 on the cell surface would orient these loops away

from receptor engagement, and thus we propose that this dimer form represents an auto-inhibited state.

How might this model be applied to phosphoantigen mediated activation? BTN3A1 is the only isoform of the three BTN3A molecules that promotes V γ 9V δ 2 activation upon addition of phosphoantigen and removal of the BTN3A1 intracellular domain of BTN3A1 inhibits this effect¹³. Therefore, we speculate that the B30.2 intracellular domain plays a direct role in phosphoantigen-mediated activation. From our crystal structures, we can model the estimated distances of the B30.2 intracellular domains in the two Dimer conformations. In Dimer 2, our proposed “in-active” state, the B30.2 domains would be separated by ~80Å. Dimer 1, stabilized by the agonist 20.1 antibody, however, would position the B30.2 domains essentially together. Therefore we propose that presence of high concentrations of phosphoantigen induces association of the B30.2 domains, transitioning the BTN3A extracellular domains from the Dimer 2 state to that of Dimer 1. This “activated” Dimer 1 conformation is mimicked by that induced and/or stabilized by the 20.1 antibody. “Inside-out” signaling such as this is seen in other receptor/ligand systems such as integrin signaling, whereby modification of the intracellular domains of integrins causes significant conformation changes in the extracellular domains that transforms a “low-affinity” integrin to “high-affinity” for ligand binding²⁸. In our model, the transition from Dimer 2 to Dimer 1 would bring the BTN3A V domain loops in a position where they could be recognized by a receptor (i.e. V γ 9V δ 2 TCR). Therefore our molecular studies provide a model by which to understand how antibody modification of the BTN3A extracellular domains may

induce Vg9Vd2 TCR engagement and to further study the role of the B30.2 intracellular domain in phosphoantigen-mediated activation.

Accession Numbers

Coordinates and structure factors for the BTN3A1, BTN3A2, BTN3A3, BTN3A1-20.1scFv complex and BTN3A1-103.2scFv complex have been deposited in the Protein Data Bank under the accession codes XXXX, XXXX, XXXX, XXXX and XXXX, respectively.

Acknowledgements

We thank the staff of the Advanced Proton Source at GM/CA-CAT (23ID) and LS-CAT (21ID) for their use and assistance with X-ray beamlines; Ruslan Sanishvili and Joseph Brunzelle in particular for help and advice during data collection. This study was supported by National Institutes of Health grant R01AI073922 and the Kinship Foundation Searle Scholars Award to Erin J. Adams.

Author Contributions

A.P. and E.J.A. designed and cloned the BTN3A, 20.1 and 103.2 scFv constructs; A.P., A.S. and L.S. performed protein expression and purification; C.H. and S.N. performed scFv stimulation experiments and full-length antibody staining; A.P. crystallized and determined the structures of the BTN3A isoforms; A.P. and A.S. crystallized and determined the structures of the BTN3A-scFv complexes; A.P. performed SPR and

MALS; D.O. contributed the 20.1 and 103.2 hybridoma cDNA; E.J.A, D.O., E.M., and M.B. contributed intellectual input and project conception and E.J.A. performed investigation leadership and manuscript preparation.

Figure Legends:

Figure 1: Crystal structures of the BTN3A isoforms. The structure of BTN3A1 is shown colored in cyan in ribbon format (left panel). BTN3A molecules are composed of a membrane-distal Ig-V domain and a membrane-proximal Ig-C domain. The canonical Ig β -strand designations (A-G) are shown for both. Middle panel: superposition of the BTN3A1 (cyan), BTN3A2 (orange) and BTN3A3 (pink) structures determined in this study. The three structures are superimposed via their highly conserved V domain, demonstrating subtle shifts in the orientation of the C domain. The angle of rotation is shown at the bottom of the structures, with color-coded arrows corresponding to the particular isoform. Right panel: structural comparison of BTN3A1 with PD-L1, the closest structural homologue to the BTN3A molecules. PD-L1 is shown in yellow. The two molecules were superimposed via their V domains, revealing a C domain shift of $\sim 30^\circ$ between the two molecules.

Figure 2: Dimerization of the BTN3A molecules in the crystal lattice. Two potentially physiologically relevant dimerization states were noted in the crystal lattices of each BTN3A isoform. BTN3A1 is shown as the representative. Top: BTN3A1 is colored in rainbow from the N terminus to C terminus to clarify domain orientation of the two dimerization states. The Dimer 1 contact surface is symmetric via the A and G β -strands of the C domains of BTN3A, whereas the Dimer 2 contact surface is asymmetric, via a head-to-tail orientation via the C, C' and C'' b-strands of the V domain with the A and D β -strands of the C domain. Both Dimers are shown as surface representations (middle panel), with the dimerization interface color coded in hot pink. The Buried

Surface Area (BSA) in $\text{\AA}^2$ is indicated next to both Dimer forms. Bottom: A cartoon representation of how these dimers would exist on the cell surface based on the location of the C-terminal transmembrane domains.

Figure 3: Multi-angle light scattering (MALS) establishes that BTN3A molecules exist as dimers in solution. A) MALS data of each BTN3A isoform reveals a clear dimer peak in solution with an estimated molecular weight of ~46kD, ~49kD and ~47kD for isoforms A1, A2 and A3, consistent with a BTN3A dimer. The left axis is UV absorbance from S200 size exclusion chromatography, the right axis is the calculated molecular weight (kilodaltons, kD) from the light scattering. B) MALS data of BTN3A1 alone (solid black line) and in complex with the 20.1 scFv (~98kD), the 103.2 scFv (~95kD) (dashed lines) and both 20.1 and 103.2 (~110kD) (grey solid line). Shown also are the profiles for the 20.1 and 103.2 scFvs alone indicating an estimated molecular weight of ~26kD and ~28kD, respectively.

Figure 4: Surface Plasmon Resonance (SPR) of the 20.1 and 103.2 antibodies with BTN3A1, BTN3A2 and BTN3A3 reveal high affinities and non-competitive binding. A) Representative sensograms are shown for the SPR analysis of 20.1 scFv and 103.2 scFv binding to the three BTN3A isoforms. Each BTN3A isoform was immobilized on an individual flowcell on a sensor chip and the scFv were flowed as analyte at concentrations ranging from 10nM to 70nM. Data curves are shown in grey and the modeled fit as black lines. B) Competition assay between the 20.1 and 103.2 scFv for BTN3A isoforms. The 20.1 scFv was immobilized on the sensor chip surface

and complexes of either BTN3A-103.2scFv (left) or BTN3A-20.1 scFv (right) were flowed as analyte. Clear binding is observed with the BTN3A-103.2 scFv complex whereas binding is blocked with the BTN3A-20.1 scFv, indicating that the two scFvs bind different epitopes on the BTN3A molecules. C) CD107a expression on the human V γ 9V δ 2 T cell line GUI following incubation with either 20.1 full-length antibody, (open circles), 20.1 Fab fragments (filled triangles) or 20.1 scFv (filled circles) used at the indicated concentrations. Data are presented as the percentage of CD107a+ $\gamma\delta$ T cells and are representative of more than three experiments. D) IFN- γ expression in human V γ 9V δ 2 T cell line GUI following activation by increasing doses of BrHPP in the presence of the 103.2 full-length antibody (filled triangles), 103.2 scFv (filled circles) or no antibody (open circles). Data are presented as the percentage of IFN- γ + $\gamma\delta$ T cells and are representative of more than three experiments.

Figure 5: Complex structures of BTN3A1 with the 20.1 scFv and 103.2 scFv. A) Ribbon diagram showing the complex between the BTN3A1 isoform (cyan) and the 20.1 scFv (green). The 20.1 scFv binds BTN3A1 on the side of the V domain, contacting the C' and C'' β -strands (see inset), with the binding interface dominated by heavy chain CDR1, CDR2 and CDR3 loop contacts (shown in green, light chain is shown in yellow for contrast). The BTN3A1 dimer present in the complex structure (shown in cyan with 20.1scFv in green) is similar in its general orientation to that of Dimer 1 in the uncomplexed BTN3A (shown in yellow), however it is shifted at the dimerization interface, resulting in an $\sim 20\text{\AA}$ displacement as measured between V domains, as indicated by the red arrow. B) Complex between the 103.2 scFv and BTN3A1, shown

as ribbons in red and cyan, respectively. The 103.2 scFv binds at the top of the V domain, contacting the DE, BC and C'C" loops (see inset). The dimerization interface of the BTN3A molecules is similar to that of the unliganded BTN3A molecules, where Dimer 1 is strictly conserved and Dimer 2 is shifted and rotated $\sim 33\text{\AA}$ as measured from the C termini of the two dimer forms (lower left panel). The 20.1 (green) and 103.2 (red) scFvs bind to separate epitopes on BTN3A as shown from their superposition on the BTN3A1 Dimer 1 (lower right panel).

Table 1. Molecular weight determinations of BTN3A isoforms and their complexes with scFvs.

Molecular Weight (kD)				
	-----	103.2 scFv	20.1 scFv	103.2+20.1 scFv
-----	-----	25.8 ± 0.1	27.5 ± 0.4	-----
BTN3a1	45.8 ± 0.3	94.7 ± 0.2	98.2 ± 0.4	109.8 ± 0.7
BTN3a2	48.7 ± 0.1	70.6 ± 1.1	90.4 ± 0.3	-----
BTN3a3	46.8 ± 0.0	91.4 ± 0.1	95.0 ± 0.3	-----

Table 2. SPR analysis of the interaction between the BTN3A isoforms and the 20.1 and 103.2 scFvs.

<u>Complex</u>	<u>K_a (1/Ms)</u>	<u>K_d (1/s)</u>	<u>K_D (nM)</u>
BTN3A1 - 20.1 scFv	1.21 x 10 ⁵	7.98 x 10 ⁻³	66
BTN3A2 - 20.1 scFv	2.41 x 10 ⁵	7.82 x 10 ⁻³	33
BTN3A3 - 20.1 scFv	1.70 x 10 ⁵	8.28 x 10 ⁻³	48
BTN3A1 - 103.2 scFv	1.08 x 10 ⁵	1.63 x 10 ⁻³	15
BTN3A2 - 103.2 scFv	2.38 x 10 ⁵	1.67 x 10 ⁻³	7
BTN3A3 - 103.2 scFv	1.31 x 10 ⁵	1.06 x 10 ⁻³	8

Materials:

Protein Expression, Purification, and Crystallization of BTN3A proteins

The extracellular domains of BTN3A1, 2 and 3 were subcloned into the baculovirus transfer vector pAcGP67A (BD Biosciences) with a C-terminal hexa-Histidine tag and expressed in High Five insect cells with the baculovirus expression system (BestBac Linearized Baculovirus DNA, Expression Systems, LLC). The proteins were purified with Ni-NTA resin and eluted with buffer containing 200 mM imidazole. The proteins were further purified by gel filtration via a Superdex 200 column (GE Healthcare) equilibrated with HEPES Buffered Saline (HBS: 10mM HEPES [pH 7.2], 150 mM NaCl, 0.02% azide). Carbohydrate residues added by N-linked glycosylation were removed by Endoglycosidase F. The deglycosylated protein was purified over anion exchange column (GE Healthcare) and equilibrated in 20mM TrisCl pH 8, 260mM NaCl. For crystallization, peak fractions were pooled and concentrated to 10 mg/mL. Crystallization screens were carried out with the sitting drop method and initial hits were optimized by varying pH, precipitant concentration, and the use of additives. The best crystals were obtained via a sitting-drop setup combining 0.4 μ l protein solution and 0.4 μ l mother liquor. Optimal crystallization conditions for the three proteins were as follows- (1) BTN3A1: 0.1M Citric acid pH 4, 1.6M Sodium fluoride ammonium sulfate; (2) BTN3A2: 1M Lithium sulfate, 0.1M Sodium citrate pH 5.6, 0.5M ammonium sulfate; (3) BTN3A3: 0.1M Citric acid pH 4, 0.8M ammonium sulfate, 0.15M.

Co-crystallization of BTN3A1/antibody complexes

The BTN3A1 protein was expressed and purified in insect cells as described in the above section. The antibodies were expressed by periplasmic secretion in *E.coli* and purified using the Superdex 200 gel filtration column. The two proteins were mixed in a 1:1 ratio and the complex was purified by over a Superdex 200 gel filtration column equilibrated in HBS buffer. For crystallization, the protein complex was concentrated to 10mg/ml. Crystallization trials were set up using the Procomplex and PEG suites via a sitting-drop setup combining 0.4 μ l protein and 0.4 μ l mother liquor. BTN3A1/antagonist complex crystals were obtained in the following conditions- 0.2M ammonium sulfate, 0.1M Tris, pH 8.5 and 12% PEG 8000. Molecular replacement was performed using the BTN3A1 and a mouse Fab fragment (1MJU) as search models.

Data Collection and Processing

X-ray data sets were measured on a MAR300 CCD at beamline 23 ID-D for the BTN3A1 protein and 23 ID-G for the BTN3A2 and 3 proteins, at the Advanced Photon Source (APS) at Argonne National Laboratory. Crystals were cryoprotected with 20% glycerol before cooling to 100°K. A complete data set was collected with 1° oscillations over 150 frames and a 1.033×10^{-10} m wavelength. The crystals of all the three BTN3A proteins indexed in space group $P2_122_1$ with one molecule per asymmetric unit. HKL2000 was used to index, integrate, and scale the data²⁹.

Structure Determination and Analysis

We used a turkey telokin domain³⁰ and a constant domain of PD-L1 protein²⁶ as search models in molecular replacement with Phaser³¹ and located the single BTN3A1

molecule per asymmetric unit. Rigid body refinement was performed with Phenix³², followed by manual building with Coot³³ and individual site and B-factor refinement with Phenix. The stereochemistry of the model was improved via a backbone optimization procedure incorporating a torsional statistical potential contingent on amino acid type, its secondary structure, as well as the identity of its two neighbors³⁴, followed by real space refinement with a two-step algorithm developed by Haddadian *et al.*³⁵. The refined BTN3A1 protein was used as search model for the other two BTN3A proteins and refinement was performed as described above. All structural figures were generated with the program Pymol (DeLano Scientific).

Cloning and Expression of the antibodies

Total RNA for the agonist and antagonist antibodies were provided by Dr. Daniel Olive (INSERM, France). 30ng of each of the RNA was used to set up a one-step Reverse Transcription/amplification (RT-PCR) reaction according to the manufacturer's protocol (SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq, Invitrogen), using degenerate primers described by Wang *et al.*³⁶ Individual heavy and light chains of both the antibodies were cloned into the TopoTA vector (Invitrogen). Single chain constructs of the antibodies containing a hexa-His tag at the C-terminus were cloned into the pak400 expression vector. The antibodies were expressed by periplasmic secretion in *E.coli* using a protocol described by Maynard *et al.*³⁷ and purified over a Ni-NTA column. The proteins were further purified by gel filtration via a Superdex 200 column (GE Healthcare) equilibrated with HEPES Buffered Saline (HBS: 10mM HEPES [pH 7.2], 150 mM NaCl, 0.02% azide).

Multi-Angle Light Scattering (MALS)

All three BTN3A proteins were expressed in High Five insect cells and purified over a Superdex 200 column as described above. The agonist and the antagonist antibodies were expressed in *E. coli*. To generate the BTN3A/antibody complex, the two proteins were mixed in a 1:1 molar ratio and incubated at room temperature for 30 minutes. For molecular weight analysis, size exclusion chromatograph of the BTN3A proteins alone and in complex with the agonist and the antagonist was performed on a Superdex 200 column (GE Healthcare) equilibrated with HEPES Buffered Saline (HBS: 10mM HEPES [pH 7.2], 150 mM NaCl, 0.02% azide). The system was connected to a 18 angle DAWN-Heleos multiangle laser light scattering detector equipped with a K5 flow cell and a 658 nm laser diode and to an Optilab rEX refractometer operating with a 685 nm laser diode at 25 °C (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA). Data was collected at scattering angles θ ranging from 22.5–147°. Astra software version 5.3.4 was used to analyze the data and determine the molecular weight of the proteins.

Surface Plasmon Resonance

All surface plasmon resonance was measured at 25°C on a Biacore™ 3000 with NTA chips (NTA chips; Biacore™) used for immobilizing ligand. HBS buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5mM Imidazole and 0.005% (vol/vol) surfactant Tween20;) was used for all measurements. In each experiment, 5µl of 500 µM Nickel chloride solution in the SPR buffer was deposited on the NTA chip. This was followed by immobilization of approximately 179, 125 and 160 response units of Histidine-tagged BTN3A1, 2 and 3

proteins, respectively. 60 μ l of the agonist antibody was flowed over the immobilized proteins followed by a 300 buffer injection to allow for dissociation. This was followed by injection of 60 μ l of antagonist antibody. Sensograms were fit locally with Biacore™ 3000 analysis software (BIAevaluation Version 4.1) using 1:1 Langmuir binding with drifting baseline.

Antibody Reagents

Purified mouse anti-CD277 mAbs and Fab (clones #20.1, #103.2) were generated, produced and purified as described¹⁵. The following monoclonal antibodies were from BD Biosciences: phycoerythrin-cyanin 5.1-labeled anti-CD107a (#H4A3), phycoerythrin-labeled anti-IFN- γ (#B27). Monensin A was purchased from Sigma-Aldrich. Live/Dead cell marker and Alexa-647-labeled goat anti-mouse IgG were from Invitrogen. Recombinant human IL-2 (rhIL-2) was from Chiron Therapeutics.

Cells

Human V γ 9V δ 2 (polyclonal line GUI) and CD8^{pos} $\alpha\beta$ (clone 13, HCV-1/HLA-A2) T cells were maintained in complete RPMI 1640 medium with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 10 μ g/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin, supplemented with 300 IU/ml rhIL-2.

Functional assays

Human V γ 9V δ 2 T cells were activated with anti-CD277 (#20.1) mAb, scFv or Fab at the indicated concentrations. Cytolytic activity of $\gamma\delta$ T cells was analyzed by measuring CD107a surface mobilization by flow cytometry. In this assay, T cells were activated at

37°C in complete RPMI 1640 medium containing 10 µM monensin and a fluorochrome-labeled CD107a specific antibody. After 4 h, T cells were harvested and stained with fluorochrome-labeled TCR specific antibodies and a viability marker (Live/Dead cell marker, 0.3 µM). Intracellular stainings of IFN-γ was performed within the same samples. T cells stained for cell surface markers and viability, were next fixed at room temperature for 20 min with 2% paraformaldehyde, permeabilized for 20 min with BD PhosFlow Perm/Wash buffer (BD Biosciences), and incubated for 30 min with fluorochrome-conjugated specific antibodies. Data were collected on FACSCantoII (BD Biosciences). For blocking experiments, human Vγ9Vδ2 T cells were activated by grading doses of bromohydrin pyrophosphate/phosphostim (BrHPP), kindly provided by Innate Pharma, in the presence of #103.2 anti-CD277 mAb or scFv, at 10 µg/ml.

Kinetics of CD277 stainings

Human CD8^{pos} αβ T cells were incubated with either #103.2 or #20.1 anti-CD277 mAb (10 µg/ml). At the indicated timepoints, T cells were harvested and stained with fluorochrome-conjugated secondary antibody. Data were collected on FACSCantoII (BD Biosciences).

References:

1. Bonneville, M., O'Brien, R.L. & Born, W.K. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* **10**, 467-478 (2010).
2. Hayday, A.C. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity* **31**, 184-196 (2009).
3. Bonneville, M. & Scotet, E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Curr Opin Immunol* **18**, 539-546 (2006).
4. Morita, C.T., 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* **215**, 59-76 (2007).
5. Kabelitz, D. Human gammadelta T lymphocytes for immunotherapeutic strategies against cancer. *F1000 Med Rep* **2**(2010).
6. 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* **154**, 998-1006 (1995).
7. Wang, H., Fang, Z. & Morita, C.T. Vgamma2Vdelta2 T Cell Receptor recognition of prenyl pyrophosphates is dependent on all CDRs. *J Immunol* **184**, 6209-6222 (2010).
8. Allison, T.J., Winter, C.C., Fournie, J.J., Bonneville, M. & Garboczi, D.N. Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* **411**, 820-824 (2001).
9. Morita, C.T., *et al.* Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity* **3**, 495-507 (1995).
10. 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* **181**, 4798-4806 (2008).
11. Lang, F., *et al.* 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 (1995).
12. Wang, H., *et al.* Conservation of nonpeptide antigen recognition by rhesus monkey V gamma 2V delta 2 T cells. *J Immunol* **170**, 3696-3706 (2003).
13. Harly, C., *et al.* Key implication of CD277 in phosphoisoprenoid sensing by a major human gd T cell subset. *Nat Immunol* **submitted**(2011).

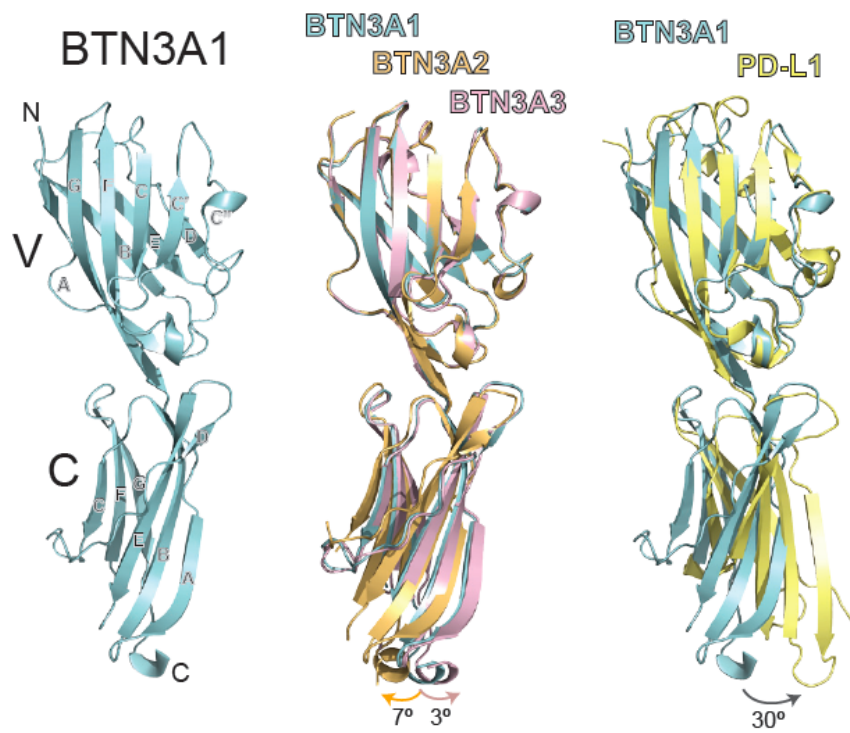
14. Greenwald, R.J., Freeman, G.J. & Sharpe, A.H. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* **23**, 515-548 (2005).
15. Compton, E., Pontarotti, P., Collette, Y., Lopez, M. & Olive, D. Frontline: Characterization of BT3 molecules belonging to the B7 family expressed on immune cells. *European journal of immunology* **34**, 2089-2099 (2004).
16. Arnett, H.A., Escobar, S.S. & Viney, J.L. Regulation of costimulation in the era of butyrophilins. *Cytokine* **46**, 370-375 (2009).
17. Yamashiro, H., Yoshizaki, S., Tadaki, T., Egawa, K. & Seo, N. Stimulation of human butyrophilin 3 molecules results in negative regulation of cellular immunity. *Journal of leukocyte biology* **88**, 757-767 (2010).
18. Yamazaki, T., et al. A butyrophilin family member critically inhibits T cell activation. *Journal of immunology* **185**, 5907-5914 (2010).
19. Smith, I.A., et al. BTN1A1, the mammary gland butyrophilin, and BTN2A2 are both inhibitors of T cell activation. *Journal of immunology* **184**, 3514-3525 (2010).
20. Ruddy, D.A., et al. A 1.1-Mb transcript map of the hereditary hemochromatosis locus. *Genome Res* **7**, 441-456 (1997).
21. Tazi-Ahnini, R., et al. Cloning, localization, and structure of new members of the butyrophilin gene family in the juxta-telomeric region of the major histocompatibility complex. *Immunogenetics* **47**, 55-63 (1997).
22. Rhodes, D.A., Stammers, M., Malcherek, G., Beck, S. & Trowsdale, J. The cluster of BTN genes in the extended major histocompatibility complex. *Genomics* **71**, 351-362 (2001).
23. Ikemizu, S., et al. Structure and dimerization of a soluble form of B7-1. *Immunity* **12**, 51-60 (2000).
24. Zhang, X., Schwartz, J.C., Almo, S.C. & Nathenson, S.G. Crystal structure of the receptor-binding domain of human B7-2: insights into organization and signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2586-2591 (2003).
25. Chen, Y., et al. A dimeric structure of PD-L1: functional units or evolutionary relics? *Protein Cell* **1**, 153-160 (2010).
26. Lin, D.Y., et al. The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3011-3016 (2008).
27. Clements, C.S., et al. The crystal structure of myelin oligodendrocyte glycoprotein, a key autoantigen in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11059-11064 (2003).

28. Luo, B.H., Carman, C.V. & Springer, T.A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* **25**, 619-647 (2007).
29. Otwinowski, Z. & Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol* **276**, 307-326 (1997).
30. Holden, H.M., Ito, M., Hartshorne, D.J. & Rayment, I. X-ray structure determination of telokin, the C-terminal domain of myosin light chain kinase, at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* **227**, 840-851 (1992).
31. McCoy, A.J., *et al.* Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**, 658-674 (2007).
32. Adams, P.D., *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 213-221 (2010).
33. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-2132 (2004).
34. DeBartolo, J., *et al.* Mimicking the folding pathway to improve homology-free protein structure prediction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3734-3739 (2009).
35. Haddadian, E.J., *et al.* Automated real-space refinement of protein structures using a realistic backbone move set. *Biophys J* **101**, 899-909 (2011).
36. Wang, Z., *et al.* Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. *Journal of immunological methods* **233**, 167-177 (2000).
37. Maynard, J., *et al.* High-level bacterial secretion of single-chain alphabeta T-cell receptors. *J Immunol Methods* **306**, 51-67 (2005).

Figures :

Palakodeti et al.,

Figure 1



Palakodeti et al.,

Figure 2

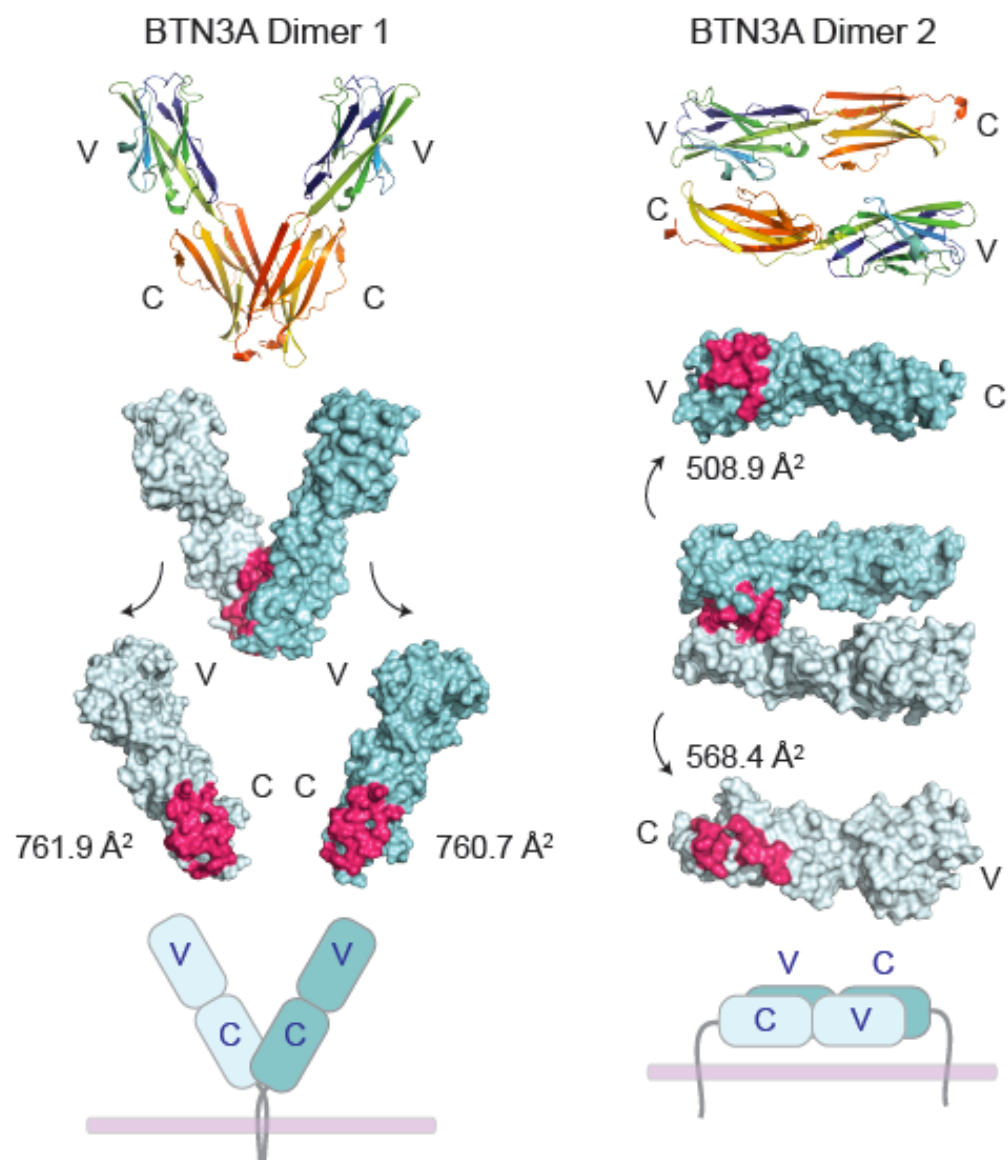
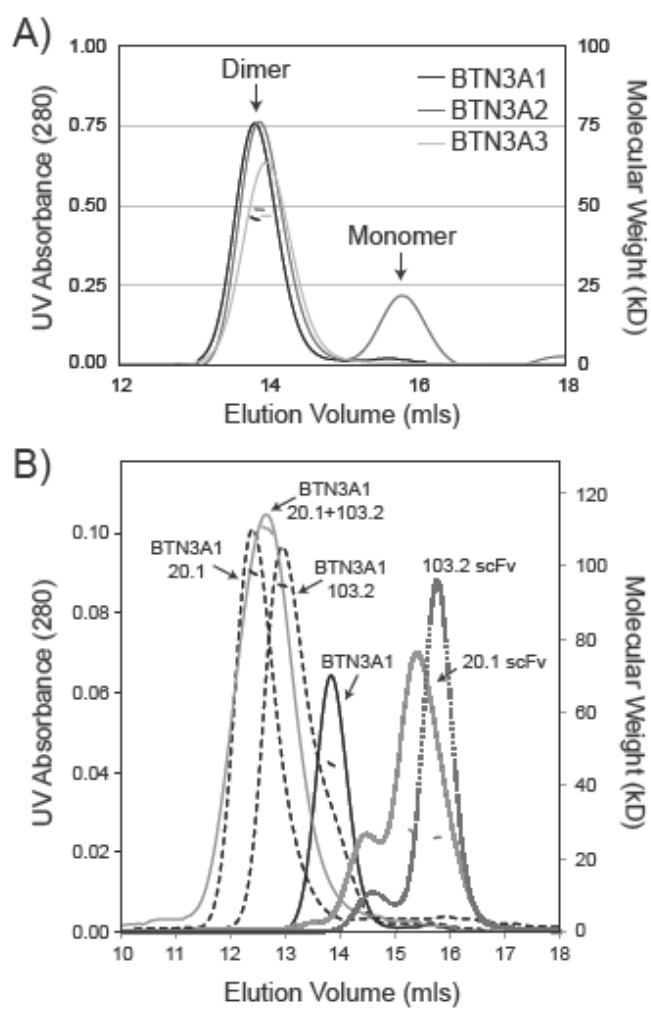


Figure 3



Palakodeti et al.,

Figure 4

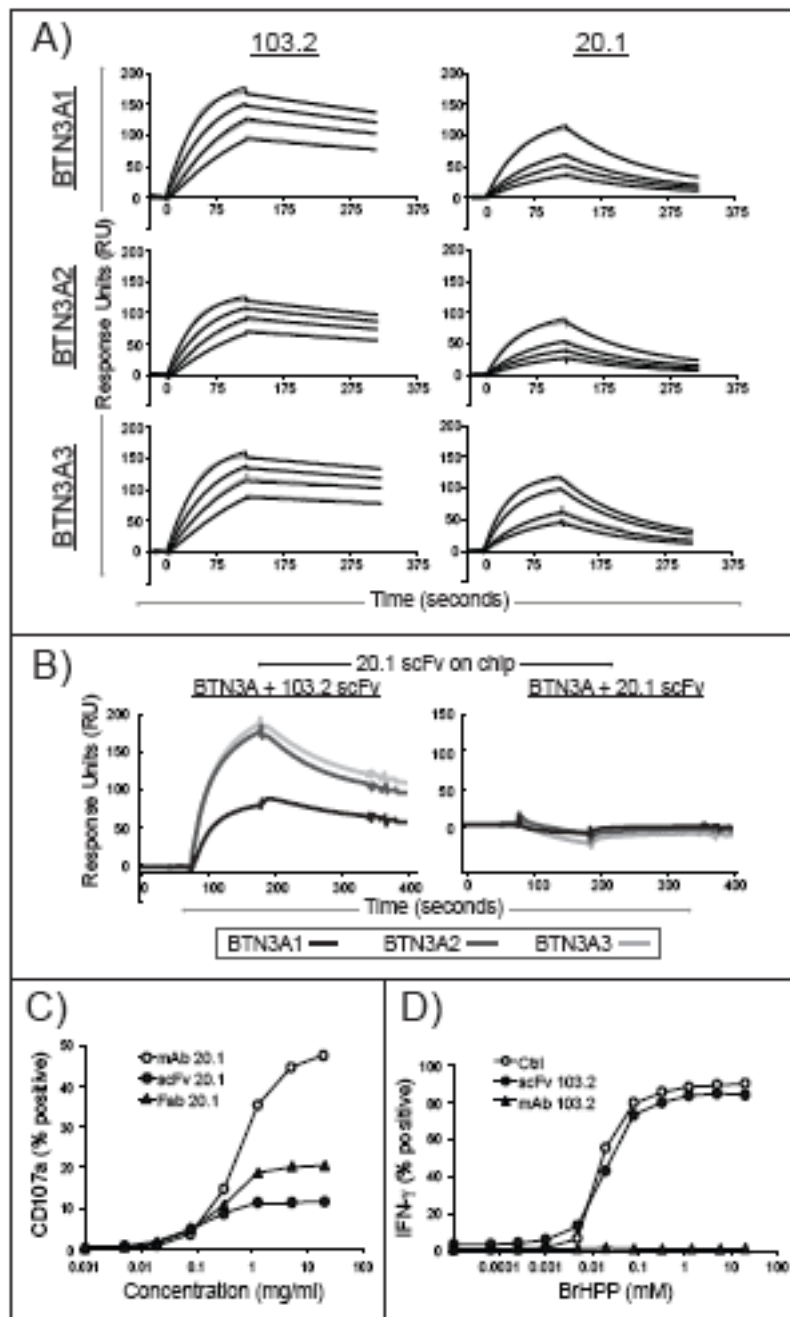
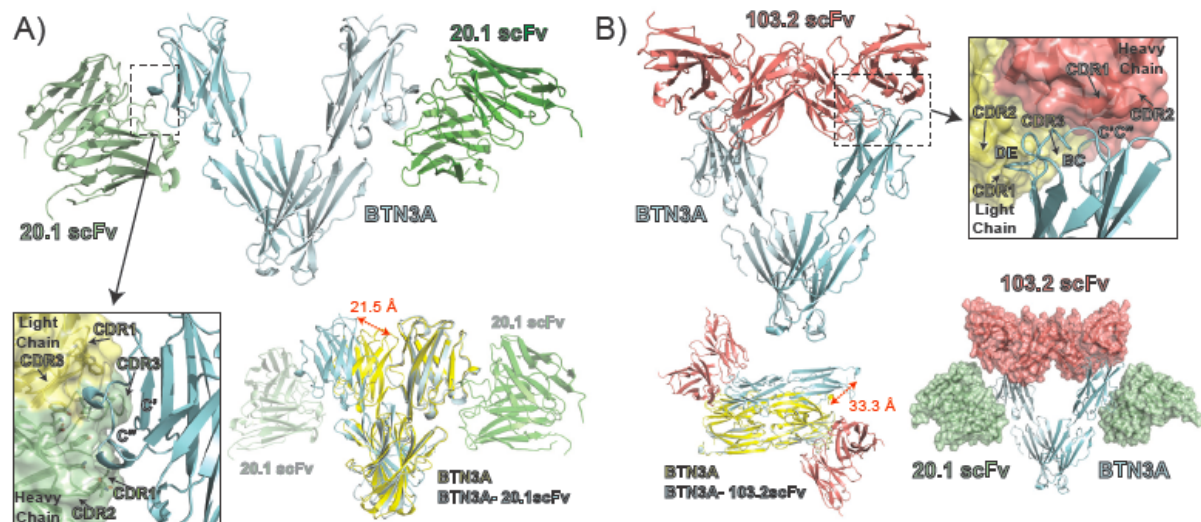


Figure 5



Matériel supplémentaire :

Palakodeti et al.,

Figure S1

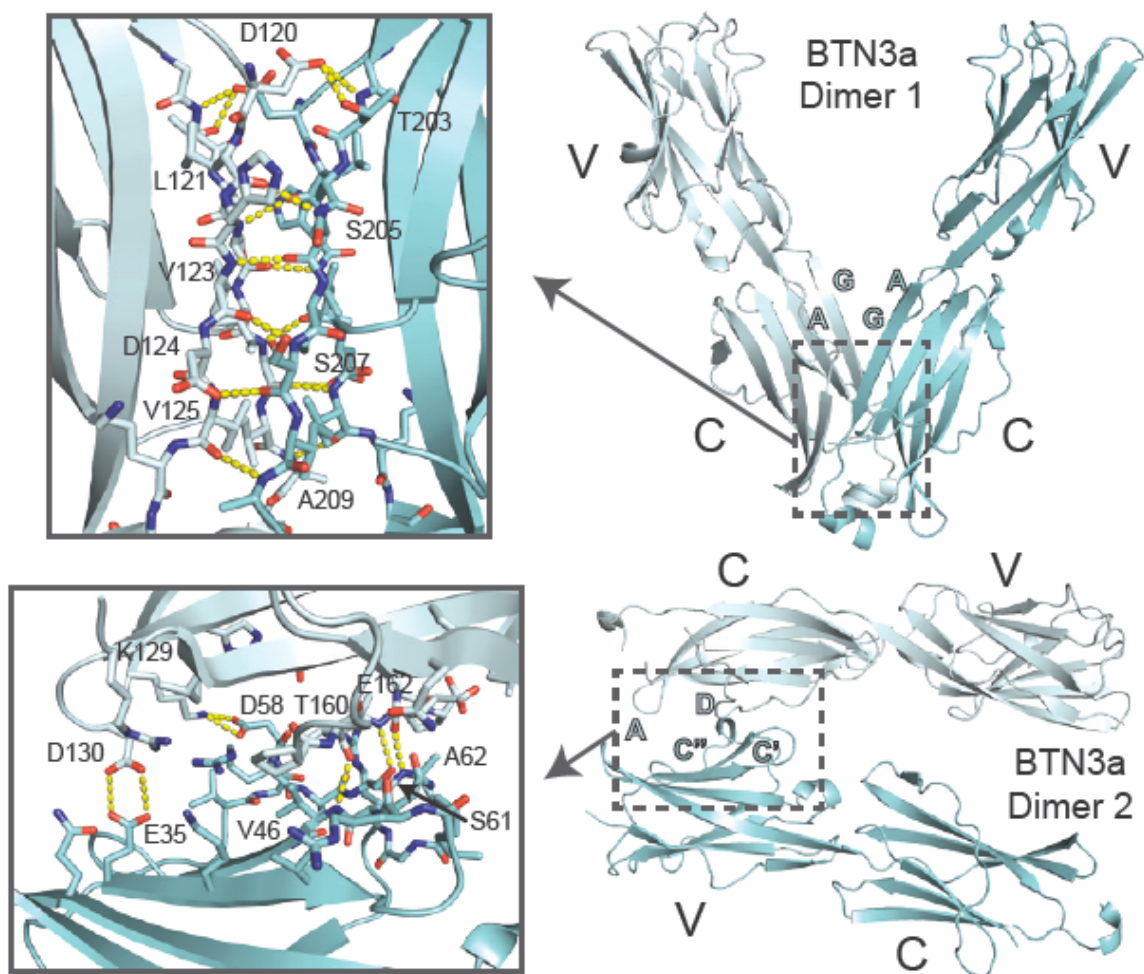
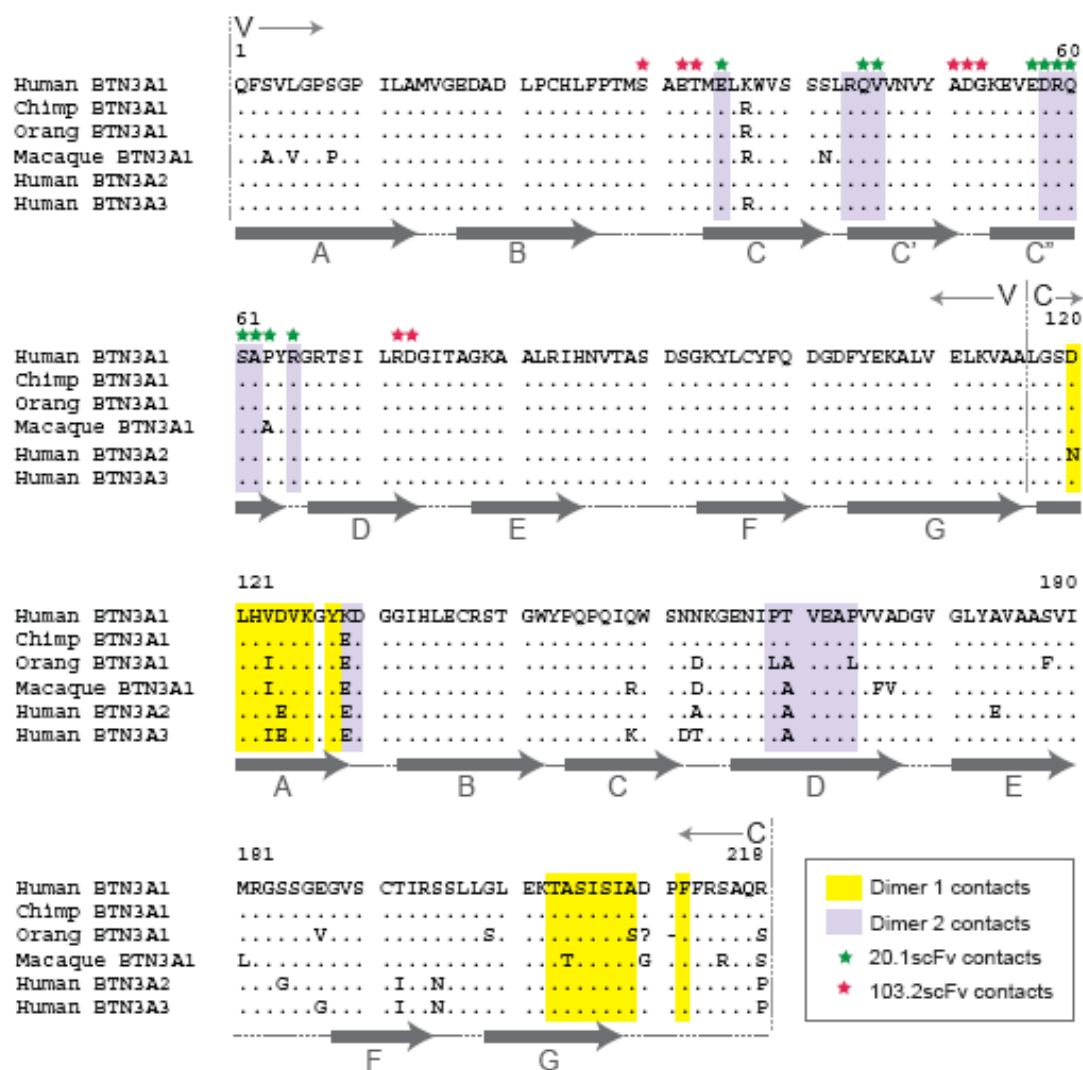


Figure S2



Palakodeti et al.,

Figure S3

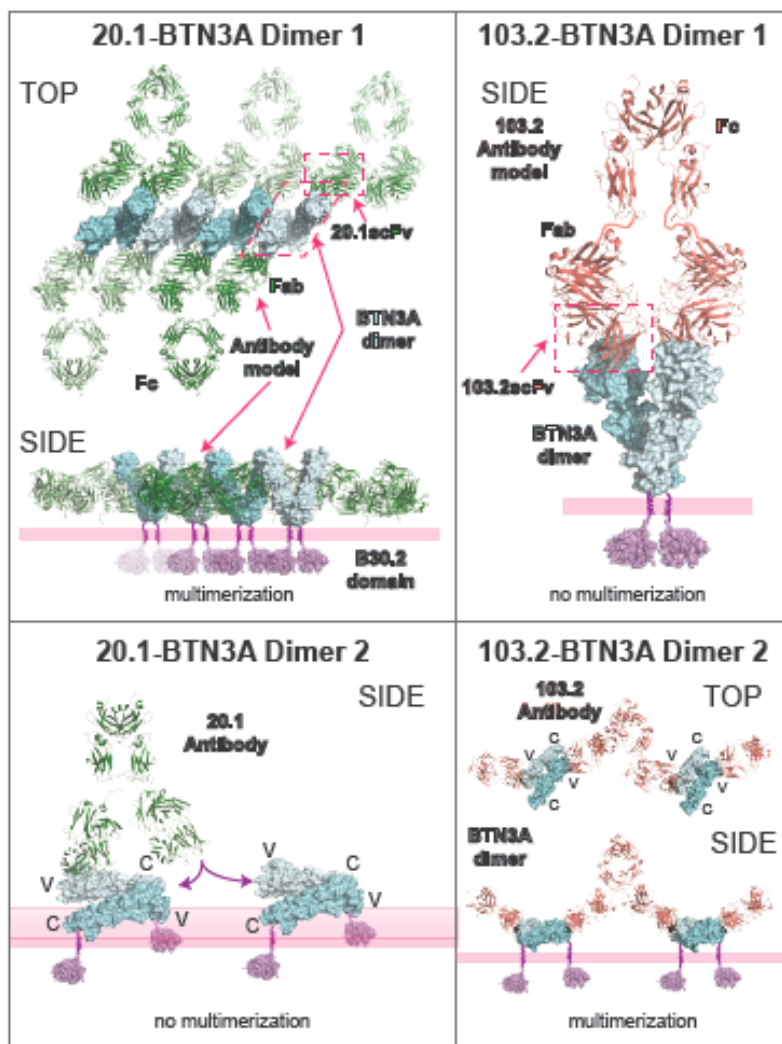
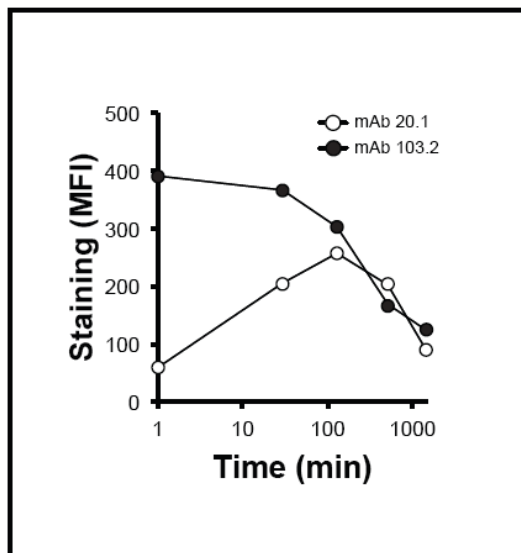


Figure S4



Supplementary Figure Legends:

Supplementary Figure 1. Dimerization interfaces of the two BTN3A dimers. The two dimer forms of BTN3A molecules are shown in ribbon format colored cyan and light cyan. Dimer 1 is shown at top and Dimer 2 at bottom; to the left are close-ups of the interface showing the residues involved in the interface. Hydrogen bonds (distance < 3.3Å) are shown as yellow dashed lines. The β -strands involved in the interface are labeled as shown.

Supplementary Figure 2. Amino acid alignment of the extracellular domains of the three human BTN3A isoforms and the related BTN3A molecules from chimpanzee (*Pan troglodytes*), orangutan (*Pongo albei*), and macaque (*Macaca mulatta*). Amino acid identity is shown as a "." and differences from the consensus (human BTN3A1) are shown as capital letters. Residues contributing to Dimer 1 interface are colored yellow, those to Dimer 2 are colored lavender. The BTN3A epitope for the 20.1scFv and 103.2 scFv are designated with green and red stars, respectively. Grey arrows beneath the aligned sequences show the β -strands secondary structure and are labeled according to the conventional Ig-V and Ig-C designations.

Supplementary Figure 3. Model of full-length 20.1 and 103.2 antibody binding to BTN3A. Left panel shows our model of the full length 20.1 antibody binding to BTN3A based on our BTN3A-20.1 scFv complex crystal structure. Full length antibodies are shown as ribbon format in green, BTN3A dimers are shown as surface representation in

cyan and light cyan. Fabs were superimposed on the scFvs and the Fc portions modeled based on the estimated linker distances between Fab and Fc. Dimer 1-20.1 model is shown at top left: The 20.1 antibody binds to two BTN3A dimers due to the orientation of the scFv on BTN3A. This cross-linking of BTN3A dimers results in oligomerization of these molecules on the cell surface, with antibodies laying parallel to the cell surface. A model of the B30.2 intracellular domain is shown in light purple connected to the BTN3A extracellular domains via a single pass transmembrane helix. Left Bottom Panel: Model of the 20.1 antibody binding to BTN3A in Dimer 2 state. Coloring is the same as above. One 20.1 epitope exists on BTN3A Dimer 2, therefore the “free” 20.1 Fab could either compete for the V domain epitope sequestered in the dimerization interface (left arrow) or bind to another BTN3A Dimer 2 (right arrow). Right Upper Panel shows the 103.2 full length antibody (shown in salmon) modeled onto a BTN3A Dimer 1 (cyan). Our model suggests a 1:1 binding stoichiometry of the 103.2 antibody to BTN3A dimer. Bottom Right Panel: Model of the 103.2 antibody binding to Dimer 2, causing multimerization on the cell surface.

Supplementary Figure 4. Kinetics of full-length 20.1 and 103.2 antibody staining on human T cells. Human CD8⁺ $\alpha\beta$ T cells were incubated with either 20.1 (open circles) or 103.2 (filled circles) mAbs (10 μ g/ml) and incubated at 37°C for the indicated time points. Stainings were performed by using fluorochrome-conjugated secondary mAbs and analyzed by flow cytometry. MFI, geometric mean of fluorescence intensity. Data are representative of more than three experiments performed on various human cell lines.

Supplementary Table 2. BTN3A1 dimer interface contacts.

Dimer 1 (symmetric)					Dimer 2 (asymmetric)				
BTN3A1 (A)	Strand	BTN3A1 (B)	Strand	Contact	BTN3A1 (A)	Strand	BTN3A1 (B)	Strand	Contact
Asp120 ^{Oδ2}	A ^C	Thr203 ^N	G ^C	H-bond	Glu35 ^{Oε1}	C ^V	Asp130 ^{Oδ1}	A ^C	H-bond
Asp120 ^{Oδ2}	A ^C	Thr203 ^{Oγ1}	G ^C	H-bond	Glu35 ^{Oε2}	C ^V	Asp130 ^{Oδ2}	A ^C	H-bond
Asp120	A ^C	Thr203	G ^C	VDW	Glu35	C ^V	Asp130	A ^C	VDW
Leu121 ^O	A ^C	Ser205 ^N	G ^C	H-bond	Arg44	C ^V	Thr160	D ^C	VDW
Leu121	A ^C	Ser205	G ^C	VDW	Gln45	C ^V	Thr160	D ^C	VDW
Leu121	A ^C	Ala204	G ^C	VDW	Gln45	C ^V	Glu162	D ^C	VDW
His122	A ^C	Ser205	G ^C	VDW	Val46	C ^V	Pro159	D ^C	VDW
Val123 ^N	A ^C	Ser205 ^O	G ^C	H-bond	Val46 ^N	C ^V	Thr160 ^O	D ^C	H-bond
Val123	A ^C	Ser205	G ^C	VDW	Val46	C ^V	Thr160	D ^C	VDW
Val123	A ^C	Ile206	G ^C	VDW	Val46	C ^V	Val161	D ^C	VDW
Val123 ^O	A ^C	Ser207 ^N	G ^C	H-bond	Val46	C ^V	Lys129	A ^C	VDW
Val123	A ^C	Ser207	G ^C	VDW	Asp58 ^{Oδ1}	C ^V	Lys129 ^{Nζ}	A ^C	H-bond
Asp124	A ^C	Ser207	G ^C	VDW	Asp58 ^{Oδ2}	C ^V	Lys129 ^{Nζ}	A ^C	H-bond
Asp124 ^{Oδ1}	A ^C	Ser207 ^O	G ^C	H-bond	Asp58 ^{Oδ1,Oδ2}	C ^V	Lys129 ^{Nζ}	A ^C	Salt-Bridge
Val125 ^N	A ^C	Ser207 ^O	G ^C	H-bond	Asp58	C ^V	Lys129	A ^C	VDW
Val125	A ^C	Ser207	G ^C	VDW	Asp58	C ^V	Val161	D ^C	VDW
Val125	A ^C	Ile208	G ^C	VDW	Arg59 ^{Nη1,Nη2}	C ^V	Asp130 ^{Oδ1,Oδ2}	A ^C	Salt-Bridge
Val125 ^O	A ^C	Ala209 ^N	G ^C	H-bond	Arg59	C ^V	Asp130	A ^C	VDW
Val125	A ^C	Ala209	G ^C	VDW	Arg59	C ^V	Val161	D ^C	VDW
Val125	A ^C	Phe212	G ^C	VDW	Gln60	C ^V	Val161	D ^C	VDW
Lys126	A ^C	Phe212	G ^C	VDW	Ser61	C ^V	Thr160	D ^C	VDW
Tyr128	A ^C	Phe212	G ^C	VDW	Ser61	C ^V	Val161	D ^C	VDW
Thr203 ^N	G ^C	Asp120 ^{Oδ2}	A ^C	H-bond	Ser61 ^{Oγ}	C ^V	Glu162 ^N	D ^C	H-bond
Thr203 ^{Oγ1}	G ^C	Asp120 ^{Oδ2}	A ^C	H-bond	Ser61	C ^V	Glu162	D ^C	VDW
Thr203	G ^C	Asp120	A ^C	VDW	Ala62 ^N	C ^V	Glu162 ^O	D ^C	H-bond
Ala204	G ^C	Leu121	A ^C	VDW	Ala62	C ^V	Glu162	D ^C	VDW
Ser205 ^N	G ^C	Leu121 ^O	A ^C	H-bond	Ala62	C ^V	Ala163	D ^C	VDW
Ser205	G ^C	Leu121	A ^C	VDW	Ala62	C ^V	Pro164	D ^C	VDW
Ser205	G ^C	His122	A ^C	VDW	Arg65	C ^V	Val161	D ^C	VDW
Ser205 ^O	G ^C	Val123 ^N	A ^C	H-bond	Arg65	C ^V	Pro164	D ^C	VDW
Ser205	G ^C	Val123	A ^C	VDW					
Ile206	G ^C	Val123	A ^C	VDW					
Ser207 ^N	G ^C	Val123 ^O	A ^C	H-bond					
Ser207	G ^C	Val123	A ^C	VDW					
Ser207 ^O	G ^C	Asp124 ^{Oδ1}	A ^C	H-bond					
Ser207	G ^C	Asp124	A ^C	VDW					
Ser207 ^O	G ^C	Val125 ^N	A ^C	H-bond					
Ile208	G ^C	Val125	A ^C	VDW					
Ala209 ^N	G ^C	Val125 ^O	A ^C	H-bond					
Ala209	G ^C	Val125	A ^C	VDW					
Phe212	G ^C	Val125	A ^C	VDW					
Phe212	G ^C	Lys126	A ^C	VDW					
Phe212	G ^C	Tyr128	A ^C	VDW					

Supplementary Table 3

Light Chain			Heavy Chain		
<u>CDR1</u>	<u>BTN3A1</u>	<u>Contact</u>	<u>CDR1</u>	<u>BTN3A1</u>	<u>Contact</u>
Trp32	Arg59§	VDW	Thr161	Ala62§	VDW
			Thr161	Pro63§	VDW
<u>CDR3</u>	<u>BTN3A1</u>	<u>Contact</u>	Arg162 ^O	Gln45 ^{Ne2} §	H-bond
Gly91	Arg59§	VDW	Tyr164	Gln60§	VDW
Gly91 ^O	Arg59 ^{Nη1} §	H-bond	Tyr164 ^{Oη}	Gln60 ^O §	H-bond
His92	Asp58§	VDW	Tyr164	Ser61§	VDW
Ser93	Asp58§	VDW	Tyr164	Ala62§	VDW
Tyr94	Asp58§	VDW	Tyr164 ^{Oη}	Ala62 ^N §	H-bond
Tyr94	Arg65§	VDW	Tyr164	Arg65§	VDW
Tyr94 ^{Oη}	Arg65 ^{Nη2} §	H-bond	Tyr164 ^{Oη}	Arg65 ^{Ne,Nη1} §	H-bond
			<u>CDR2</u>	<u>BTN3A1</u>	<u>Contact</u>
			Glu181	Arg65§	VDW
			Glu181 ^{Oε2}	Arg65 ^{Nη1} §	H-bond
			Glu181 ^{Oε2}	Arg65 ^{Nη1,Nη2} §	Salt-bridge
			Asn183	Ala62§	VDW
			Asn183 ^{Nδ2}	Ala62 ^O §	H-bond
			Asn185	Ala62§	VDW
			Asn185	Pro63	VDW
			Lys190	Glu57	VDW
			Lys190 ^{Nζ}	Glu57 ^{Oε2}	H-bond
			Lys190 ^{Nζ}	Glu57 ^{Oε1,Oε2}	Salt-bridge
			<u>CDR3</u>	<u>BTN3A1</u>	<u>Contact</u>
			Gly235	Gln45§	VDW
			Gly235	Ser61§	VDW
			Gly235 ^O	Ser61 ^{Oγ} §	H-bond
			Thr236	Val46§	VDW
			Thr236	Arg59§	VDW
			Thr236 ^{Oγ1}	Arg59 ^{Nη1} §	H-bond
			Pro237	Asp58§	VDW
			Pro237	Arg59§	VDW
			Pro237 ^O	Arg59 ^{Nη1,Nη2} §	H-bond

§ interface residues for BTN3A dimer 2.

2) Résultats complémentaires: lien entre propriétés intrinsèques et effets biologiques des anti-BTN3

Les effets biologiques des Acm et ScFv anti-BTN3, initialement envisagés comme étant dûs à une modification conformationnelle des protéines BTN3 directement reconnue via le TCR γ 9 δ 2 semblent en réalité découler de la perception par les LT γ 9 δ 2 d'un remodellement surfacique des cellules cibles, médié par BTN3, sous l'effet des anti-BTN3 ou des PAg. D'après les travaux D'EJ Adams, ce remodellement pourrait notamment impliquer la formation/rupture de dimères de BTN3, sous l'effet des Acm anti-BTN3. Selon ce modèle, les BTN3 pourraient exister à la surface des cellules sous forme de dimères 1 activateurs ou dimères 2 non-activateurs (**figure S3 article 3**). La proportion relative entre les dimères 1 et les dimères 2 à la surface des cellules cibles pourrait dépendre d'un ensemble de paramètres incluant la présence de PAg et d'autres protéines accessoires, et pourrait déterminer la reconnaissance ou non des cellules cibles par les LT γ 9 δ 2.

Mais les données d'EJ Adams prennent uniquement en compte les propriétés des anti-BTN3 sous forme de ScFv sur la formation d'homodimères de domaines extracellulaires de BTN3. Ainsi, il est très difficile d'en extrapoler le comportement réel des BTN3 membranaires sous l'effet des Acm, qui doivent tenir compte au minimum de (i) l'implication des domaines intracellulaire de BTN3 dans la formation/dissociation de dimères, (ii) la propriété de cross-link intra/inter-dimérique des Acm pouvant directement influencer la stabilité des dimères, (iii) l'effet d'une éventuelle signalisation par les BTN3 sous l'effet du cross-link par Acm, pouvant indirectement influencer la stabilité des dimères. En outre un modèle complet devrait également prendre en compte les acteurs membranaires interagissant potentiellement avec les BTN3 et pouvant par exemple influencer la disponibilité des épitopes de dimérisation de BTN3. Globalement, ce modèle ne permet pas tel quel d'expliquer un certain nombre de phénomènes concernant les effets des anti-BTN3, et l'existence réelle de ces dimères à la surface de cellules cibles reste à prouver.

L'étude des effets biologiques différentiels des ScFv/Acm des anti-BTN3 #20.1 et #103.2 permettent de dissocier différents aspects des processus activateurs/inhibiteurs impliquant ces anti-BTN3, et de proposer un modèle alternatif d'action des anti-BTN3 sur la reconnaissance de cellules cibles par les LT γ 9 δ 2.

L'Acm #20.1, initialement décrit comme agoniste $\gamma 9\delta 2$ chez l'homme présente en réalité un mélange de propriétés agonistes et antagonistes.

L'étude des effets de l'Acm #20.1 dans différents systèmes a permis de mettre en évidence une dualité des propriétés de cet anti-BTN3 sur l'activation des LT $\gamma 9\delta 2$, révèlent une balance subtile entre des effets agonistes et antagonistes (**table 10**).

Effecteurs $\gamma 9\delta 2$	LT $\gamma 9\delta 2$ humains	(i) LT rat/souris + TCR $\gamma 9\delta 2$ hum	(ii) LT $\alpha\beta$ humains + TCR $\gamma 9\delta 2$ hum		(iii) LT $\gamma 9\delta 2$ babouins
CPA	Daudi, Raji, BEBV, MDA-MB231	Raji	Daudi	MDA-MB231	BEV
Effet antagoniste	(très) très faible	fort	Non testé	Non testé	très fort
Effet agoniste	fort	faible	faible	nul	nul

Balance entre les 2 effets de l'Ac #20.1

effet agoniste

effet antagoniste

Table 10 : Propriétés agonistes/antagonistes de l'anti-BTN3 #20.1 sur l'activation des LT $\gamma 9\delta 2$ dans différents systèmes cellulaires.

L'effet agoniste est défini comme l'effet activateur de l'Acm sur l'activation induite par les cellules cibles indiquées (comparaison entre l'effet du traitement #20.1 et l'absence de traitement). L'effet antagoniste est défini comme l'effet inhibiteur de l'Ac sur l'activation induite par des cellules cibles traitées avec des ABP (comparaison entre l'effet du traitement ABP et l'effet du traitement #20.1+ABP). Après coculture des cellules cibles prétraitées avec les effecteurs $\gamma 9\delta 2$ indiqués, l'activation des LT est mesurée par des moyens variés. Tous les effecteurs $\gamma 9\delta 2$ sont répondeurs aux activations PAG, et toutes les CPA sont activatrices après traitement ABP.

(i) Une étude réalisée dans l'équipe de T Herrmann a permis de montrer que des hybridomes rats/souris exprimant un TCR $\gamma 9\delta 2$ humain étaient à peine activés par des cellules humaines Raji traitées par l'anti-BTN3 #20.1. Par ailleurs, l'activation de ces cellules $\gamma 9\delta 2$ par les Raji traitées par des ABP était fortement inhibée par ce même Acm (non publié).

(ii) L'équipe de J Kuball a observé que certaines cellules cibles humaines (ex : lignée MDA-MB231) n'étaient pas capables d'activer des LT $\alpha\beta$ humains exprimant un TCR $\gamma 9\delta 2$ humain, après traitement par l'anti-btn3 #20.1. Pourtant, ces mêmes cellules cibles étaient capables d'activer efficacement les LT $\alpha\beta/\gamma 9\delta 2$ humains après traitement ABP, ainsi que des LT $\gamma 9\delta 2$ humains normaux après traitement ABP ou #20.1, et les effecteurs ab transduits avec le TCR $\gamma 9\delta 2$ humain étaient efficacement activés par d'autres cellules cibles humaines traitées avec le #20.1 (non publié).

(iii) Finalement, une étude réalisée chez le babouin a permis de montrer que l'anti-btn3 agoniste #20.1 avait un effet antagoniste sur l'activation de LT $\gamma 9\delta 2$ de

babouins par des cellules cibles humaines traitées ABP, et n'avait aucun effet agoniste sur l'activation des LT γ 9 δ 2 de babouins par les mêmes cibles en absence d'ABP (non montré).

Ainsi, les effets agonistes vs antagonistes de l'anti-btn3 #20.1 peuvent être attribués à la fois au type de cellule effectrice (ex LT γ 9 δ 2 humain vs babouin sur BEBV humaines), et au type de cellule cible (ex Daudi vs MDA-MB231 sur activation LT α β exprimant un TCR γ 9 δ 2 humain, comparé à des LT γ 9 δ 2 naturels). Les 2 propriétés (agonistes et antagonistes) de l'anti-btn3 #20.1 semblent donc coexister et s'expriment plus ou moins en fonction d'un ensemble de variables subtiles impliquants à la fois la cellule effectrice et la cellule cible. Les effets biologiques agoniste vs antagoniste de cet Ac ne dépendent donc pas exclusivement de ses propriétés intrinsèques.

Par ailleurs, une analyse approfondie de l'action de l'anti-btn3 #20.1 dans un système d'autoprésentation de PAg par les LT γ 9 δ 2 humains montre que cet anticorps est en fait capable de court-circuiter l'activation PAg-induites de LT γ 9 δ 2 (**figure 39**). Cette interprétation fournit une explication simple à la co-existence des propriétés agonistes et antagonistes de cet Ac observée dans chacun des systèmes cellulaires précédemment exposés (**table 10**).

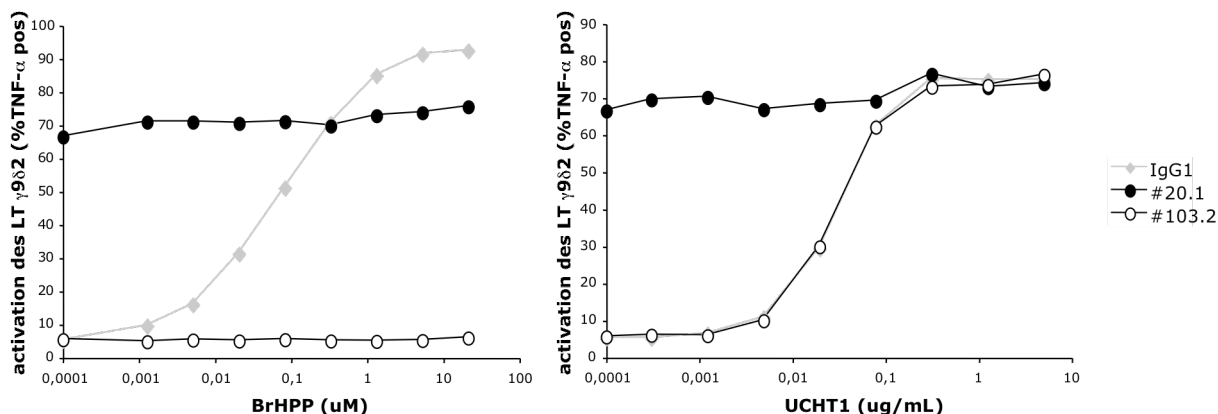


Figure 39 : Effet court-circuit des anti-BTN3 sur l'activation PAg-induite des LT γ 9 δ 2.

L'anti-BTN3 #20.1 est capable de court-circuiter l'activation PAg-induite des LT γ 9 δ 2, quelle que soit la dose de BrHPP (*gauche*). Ainsi, lorsque la dose de BrHPP est sous-optimale, l'effet du #20.1 apparaît comme agoniste, tandis que l'effet apparaît comme antagoniste pour des doses de BrHPP optimales. Ainsi, les deux anti-BTN3 sont tous deux capables de court-circuiter spécifiquement l'effet des PAg, sans interférer avec une activation TCR-dépendante des LT γ 9 δ 2 (*droite*).

Cet ensemble de résultats suggère que le remodellement membranaire induit par l'anti-btn3 #20.1, comme par l'anti-BTN3 #103.2, est tout simplement capable de « court-circuiter » les activations $\gamma 9\delta 2$ (humains comme babouins) PAg-induites (exogènes et endogènes). Cet effet « court-circuit » est probablement dû à l'immobilisation par les anti-BTN3, d'un ensemble d'acteurs moléculaires intervenant normalement dans l'activation des LT $\gamma 9\delta 2$ par les PAg, dans une certaine configuration, indépendamment de la présence ou non de PAg. Cette configuration surfacique des cellules cibles va alors définir, selon un ensemble de paramètres impliquant des acteurs exprimés par la cellule cible et effectrice, le niveau de l'activation (ou non) des LT $\gamma 9\delta 2$.

L'Acm #20.1 est donc visiblement capable d'induire un remodellement surfacique de cellules cibles pouvant être perçu comme activateur ou non par des LT $\gamma 9\delta 2$, en fonctions de subtiles variations de facteurs non identifiés impliquant les cellules cibles et/ou effectrices. Cette interprétation remet en question la frontière initialement établie entre « l'anti-btn3 #103.2 antagoniste » et « l'anti-BTN3 #20.1 agoniste ». Le remodellement membranaire non activateur induit par l'Acm #103.2 est-il fondamentalement différent de celui induit par l'Acm #20.1 ? Les propriétés intrinsèques distinctes de ces Acm définies dans l'article précédent (**article 3**) sont-elles effectivement reliées à des effets biologiques distincts de ces deux Acm?

Alors que l'anti-btn3 #103.2 semble totalement antagoniste, son ScFv possède des propriétés agonistes.

Afin d'approfondir l'analyse du mode d'action des anti-btn3, nous avons étudié l'effet de fragments Fab et ScFv correspondants aux anti-btn3 #20.1 et #103.2 sur l'activation de LT $\gamma 9\delta 2$. Alors que les Fab et ScFv #20.1 possèdent les propriétés activatrices atténuées de l'anticorps complet correspondant (**figure 40A**), le ScFv #103.2 semble avoir perdu toute propriété inhibitrice comparée à l'Ac complet correspondant (**figure 40B**). En outre, cette activité n'est pas restaurée par le cross-link du ScFv (non montré). A l'inverse, ce ScFv est capable de potentialiser fortement des activations induites par les anti-btn3 agonistes complets ou sous forme ScFv

(figure 40C et D). Par ailleurs, le ScFv 103.2 seul peut même se révéler activateur, selon l'état des LT γ 9 δ 2 en culture (figure 40D).

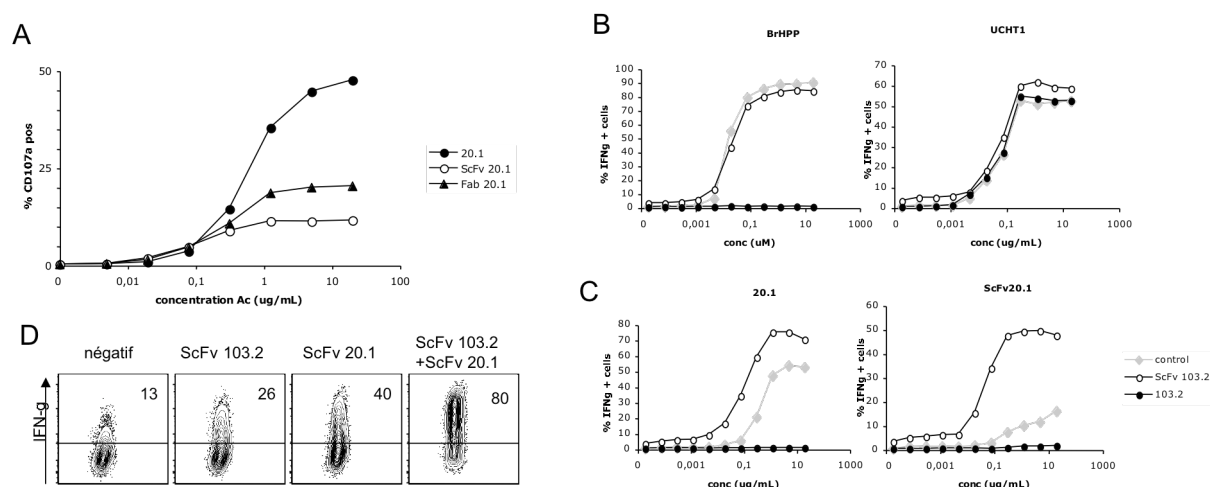


Figure 40 : Effets agonistes/synergiques des ScFv #103.2 et #20.1.

(A) Effet dose du #20.1, ScFv #20.1, Fab #20.1 sur la dégranulation de LT γ 9 δ 2, (B) Effet du #103.2 (10ug/mL) et ScFv #103.2 (10ug/mL) sur l'activation γ 9 δ 2 induite par une gamme de PAg (BrHPP, gauche) ou d'anti-CD3 (UCHT1, droite), (C) Effet du #103.2 (10ug/mL) et ScFv #103.2 (10ug/mL) sur l'activation γ 9 δ 2 induite par une gamme de 20.1 (gauche) ou de ScFv 20.1 (droite) (D) Effet synergique des ScFv #103.2 et 20.1 sur la production d'IFN γ par les LT γ 9 δ 2.

Le ScFv #103.2 semble capable d'induire un engagement puissant du TCR γ 9 δ 2.

Au cours d'investigations visant à comprendre le mécanisme de potentialisation de l'activation γ 9 δ 2 par le ScFv #103.2, nous avons pu observer que contrairement à l'Ac complet correspondant, ce ScFv Ac était capable de fortement accélérer l'internalisation TCR induite par différents types d'activations dépendantes du TCR γ 9 δ 2 (figure 41A). Par ailleurs, le ScFv #103.2 seul est également capable d'induire une internalisation du TCR à long terme, après 4h de contact avec les LT γ 9 δ 2 (figure 41B). L'effet de doses croissantes de ScFv #103.2 sur l'activation étant positivement corrélé avec leur effet sur l'internalisation TCR (figure 41B), ceci suggère fortement un lien entre les deux phénomènes. Même si on ne peut exclure totalement la présence de PAg dans les cultures de LT γ 9 δ 2 au moment du contact avec les ScFv #103.2 pouvant expliquer comment ce fragment d'Ac potentialisateur puisse paraître activateur dans certain cas, le ScFv #103.2 semble posséder certaines propriétés agonistes induisant un puissant engagement des TCR γ 9 δ 2.

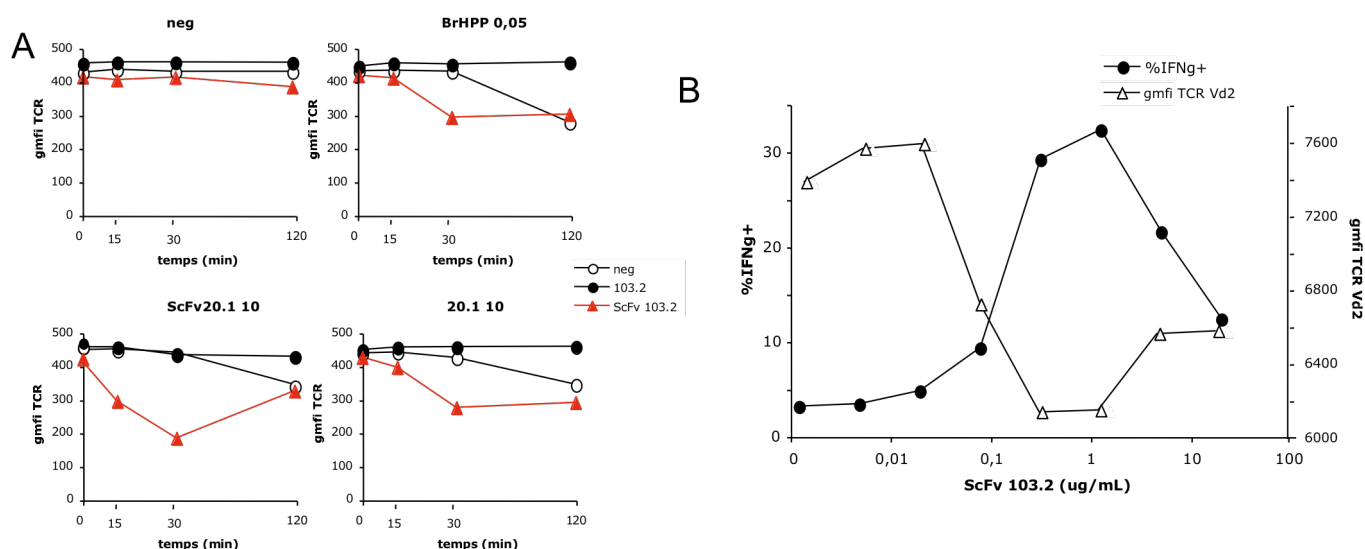


Figure 41 : Induction de l'engagement TCR des LTγ9δ2 par le ScFv #103.2.

(A) Cinétique d'internalisation TCR de LTγ9δ2 induite par des activations BrHPP (0,05uM), #20.1 (10ug/mL), ScFv #20.1 (10ug/mL), ou sans activation, en présence ou non d'anti-btn3 #103.2 (10ug/mL) ou de ScFv #103.2 (1ug/mL). **(B)** Analyse simultanée des paramètres d'activation (production d'IFNγ) et d'internalisation TCR, induites par des doses croissantes de ScFv #103.2 sur une lignée de LTγ9δ2, au bout de 4h de contact.

Mode d'action de l'Ac complet #103.2: blocage ou inhibition de l'activation PAg/#20.1-induite des LTγ9δ2 ?

L'hypothèse initiale permettant d'expliquer le plus simplement possible l'effet antagoniste de l'Acm #103.2 sur les activations par les PAg ou les anti-btn3 agonistes étaient celle d'un blocage stérique, empêchant la détection par les LTγ9δ2, du remodellement activateur induit par les PAg et l'Acm #20.1.

Le rapprochement des propriétés des Acm #20.1 et #103.2 grâce aux observations des effets biologiques antagonistes de l'Acm #20.1 et agonistes de l'Acm #103.2 sous forme ScFv, nous permettent à présent d'envisager un mode d'action antagoniste commun entre les Acm #103.2 et #20.1, dû à un remodellement similaire, pouvant être perçut comme activateur ou non selon des différences subtiles pouvant impliquer les cellules cibles et/ou effectrices.

Par ailleurs, certaines observations concernant l'anti-btn3 antagoniste #103.2 suggèrent un engagement non activateur du TCRγ9δ2 par son ligand à la surface de cellules cibles traitées par le #103.2. En effet, lors d'une co-culture entre des LTγ9δ2 et des cellules cibles activatrices (BEBV traitées par l'Ac #20.1), alors que l'ajout de cellules cibles non activatrices (BEBV non traitées) n'a que très peu d'effet sur

l'activation $\gamma\delta 2$ (**figure 42A**), l'ajout des mêmes cellules cibles prétraitées avec l'Ac #103.2 inhibe significativement cette activation (ratio 1 :4) (**figure 42A**). Ce résultat indique que des cibles non activatrices traitées par l'anti-btn3 #103.2 entrent activement en compétition avec des cibles activatrices, probablement par engagement compétitif des TCR $\gamma\delta 2$. En outre, l'étude cinétique de l'effet bloquant de l'anti-btn3 antagoniste 103.2 sur différents types d'activations (**figure 42B**) montre que cet Ac est capable de d'empêcher rétroactivement toute activation des LT $\gamma\delta 2$, jusqu'à 40 mn après contact avec l'agoniste TCR $\gamma\delta 2$, ce délai pouvant varier selon le type d'agoniste, et selon d'état des LT $\gamma\delta 2$. Cette inhibition rétroactive pourrait s'expliquer par un simple blocage des activations retardées induites par ces agonistes, mais les évènements de signalisation induits par ces agonistes, relativement précoces (flux calciques, WB), ne permettent pas de justifier cet effet. L'Acm #103.2 semble donc capable de bloquer des activations TCR-dépendantes effective, suggérant une forme de signalisation abortive, soutenant l'hypothèse d'un engagement TCR non productif, sous l'effet du remodellement surfacique induit par l'Acm #103.2 à la surface des cellules cibles.

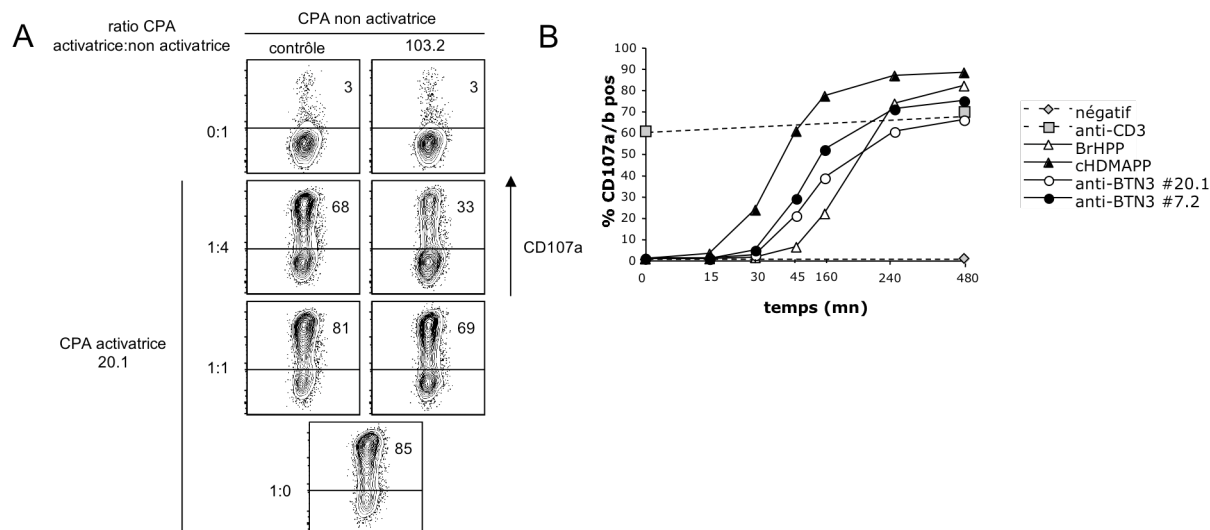


Figure 42 : Effet compétitif/inhibiteur de l'anti-BTN3 #103.2 sur l'activation des LT $\gamma\delta 2$.

(A) Effet compétitif de CPA-103.2 sur l'activation $\gamma\delta 2$ induite par des CPA prétraitées #20.1 (B) Effet retardé du blocage par le #103.2 de différents types d'activations $\gamma\delta 2$ (autoprésentation). Les différents agonistes TCR/CD3 sont ajoutés à t=0 mn, le #103.2 est ajouté au cours du temps, entre 0mn et 2h après le début de l'activation. Les LT $\gamma\delta 2$ restent en contact avec les agonistes 4h au total.

3) Discussion : mode d'action agoniste/antagoniste des anti-BTN3

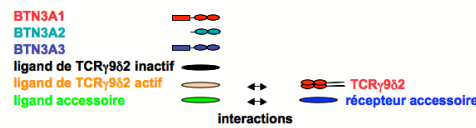
modèle alternatif au modèle de dimères activateurs/non activateurs

Le modèle proposé par EJ Adams pour expliquer les modes d'actions différentiels initialement observés pour les anti-BTN3 agonistes et antagonistes est basé sur un mode d'action fondamentalement distinct des anti-BTN3 #20.1 et #103.2, par stabilisation/déstabilisation de dimères de BTN3 possédant des propriétés différentielles sur l'activation des L γ 9 δ 2. En résumé, l'Acm #20.1 pourrait déstabiliser les dimères 2 non activateurs (épitope de fixation des L'Ac superposé avec le site de dimérisation du dimère 2) et/ou favoriser la formation de dimères 1 activateurs, tandis que l'Acm #103.2, capable d'interagir à la fois avec les dimères 1 et les dimères 2, pourrait bloquer stériquement toute interaction avec un contre-récepteur, empêchant la perception par les L γ 9 δ 2 des dimères 1 activateurs.

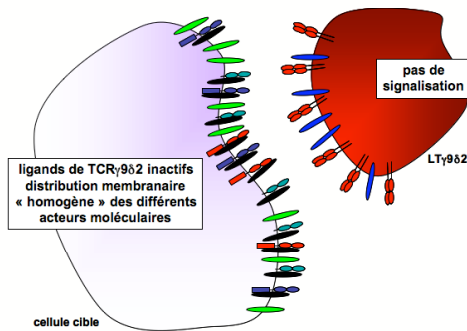
Mode d'action commun à tous les anti-BTN3, agonistes et antagonistes.

Le modèle proposé ci-après a été construit afin d'intégrer aux données moléculaires d'EJ Adams, toutes les observations réalisées à l'échelle cellulaire des effets biologiques des différents Ac sur l'activation des L γ 9 δ 2. Ce modèle attribut des effets tout à faits similaires à l'ensemble des anti-BTN3 (#103.2 comme #20.1, sous forme Acm, ScFv et Fab) (**figure 43**): (i) L'engagement des BTN3 par les anti-BTN3 entraîne l'induction/démasquage d'un ligand de TCR γ 9 δ 2 à la surface des cellules cibles, mimant l'action des PAg sur les isoformes BTN3A1. (ii) Les différents anti-BTN3 (différents clones/différentes formes d'Ac) sont capables d'aggréger plus ou moins fortement les BTN3 par engagement/cross link, provoquant une ségrégation plus ou moins importante entre les ligands de TCR γ 9 δ 2 et les molécules accessoires participant à l'activation (molécules d'adhésion, de costimulation et autres...). (iii) En fonction du niveau d'aggrégation des BTN3 à la surface des cellules cibles (corrélé avec le niveau de sécrégation ligands de TCR γ 9 δ 2/molécules accessoires), des molécules accessoires exprimées par les cellules cibles, et des co-sigaux requis pour l'activation des cellules effectrices, l'engagement TCR des L γ 9 δ 2 sous l'effet des différents anti-BTN3 abouti à une signalisation productive ou abortive.

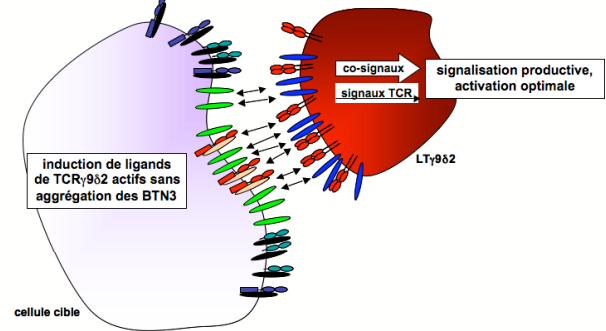
acteurs moléculaires intervenant lors de la perception des PiPs/anti-BTN3 par les LT γ 9 δ 2:
à la surface des cellules cibles à la surface des cellules effectrices



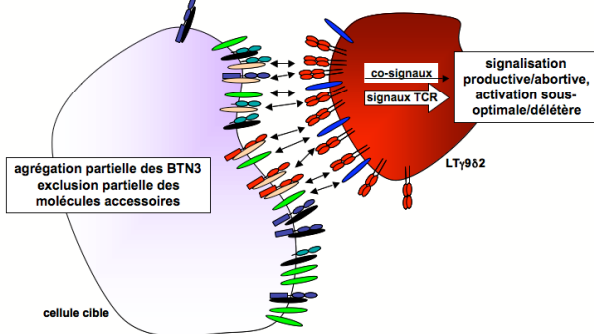
(i) En l'absence de PAg et d'anti-BTN3



(ii) En présence de PAg



(iii) En présence d'anti-BTN3 #20.1



(iv) En présence d'anti-BTN3 #103.2

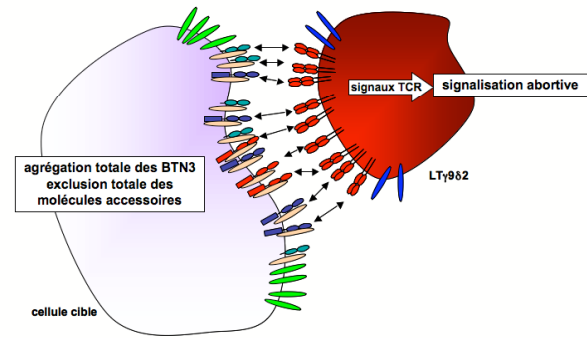


Figure 43 : Mode d'action hypothétique des anti-BTN3 #20.1 et #103.2 basé sur une ségrégation différentielle des ligands de TCR γ 9 δ 2 et des molécules accessoires à la surface des cellules cibles.

Les traitements PAg et anti-BTN3 des cellules cibles, en plus d'induire des ligands de TCR γ 9 δ 2 actifs, permettent une agrégation plus ou moins forte de ces ligands, ayant pour conséquence une exclusion des molécules accessoires (costimulation, adhésion,...) pouvant être cruciales dans l'activation TCR-dépendante des LT γ 9 δ 2. Cette ségrégation va déterminer la balance entre les signaux TCR et les co-sigaux perçus par le LT γ 9 δ 2, conditionnant ainsi l'effet de chacun de ces traitements sur l'activation des LT γ 9 δ 2. (i) En l'absence de PAg et d'anti-BTN3 les différentes isoformes de BTN3 (A1, A2, A3) co-existent à la surface des cellules, sous forme d'homo/hétérodimères (1 ou 2) ou encore de monomères, associés à des ligands de TCR γ 9 δ 2 inactifs, incapables d'interagir avec le TCR γ 9 δ 2. (ii) Les PAg induisent l'activation des ligands de TCR γ 9 δ 2 associés aux isoformes actifs BTN3A1. La perception de ces ligands par les LT γ 9 δ 2 ainsi que d'un ensemble de molécules accessoires aboutit à une signalisation productive des LT γ 9 δ 2 et une réponse effectrice optimale. (iii) et (iv) L'engagement des BTN3 par les anti-BTN3 permet de mimer l'effet des PAg en induisant l'activation des ligands de TCR γ 9 δ 2 associés à ces BTN3. L'agrégation partielle (#20.1, engagement des monomères et dimères 1 de BTN3) ou totale (#103.2, engagement des monomères et dimères 1 et 2) des BTN3 entraîne une ségrégation différentielle des ligands de TCR γ 9 δ 2 et des molécules accessoires nécessaires à l'activation des LT γ 9 δ 2. L'exclusion totale des molécules accessoires sous l'effet du #103.2 (iv) entraîne une signalisation abortive, tandis que l'effet fonctionnel de l'exclusion partielle des molécules accessoires sous l'effet du #20.1 (iii) dépend de la fraction des BTN3 engagée par l'anti-BTN3 #20.1, des molécules accessoires exprimées par la cellule cible, et des co-sigaux nécessaires à l'activation de la cellule effectrice. Pour simplifier ce modèle, les ligands de TCR γ 9 δ 2 sont constitutivement associés (directement ou indirectement) aux protéines BTN3. Ainsi, l'agrégation des BTN3 entraîne l'agrégation des ligands de TCR γ 9 δ 2. Cette hypothèse simplifiée n'est pas nécessairement vraie, et les ligands de TCR γ 9 δ 2 pourraient s'associer aux BTN3 au cours du processus de remodellement médié par les BTN3.

Dans ce modèle, alors que l'ensemble des anti-BTN3 porterait un potentiel agoniste plus ou moins fort en fonction de leur affinité pour les BTN3 et de la fraction des BTN3 reconnues par chaque Acm (en fonction de la localisation des épitopes), les effets différentiels des anti-BTN3 complets agonistes vs antagonistes seraient dus à des différences d'agrégation de BTN3, médiant un effet antagoniste susceptible de masquer partiellement (Acm #20.1) ou totalement (Acm #103.2) les effets agonistes de ces Acs selon un ensemble de paramètres incluant les propriétés intrinsèques des Acs (**table 11**), ainsi que certaines propriétés phénotypiques des cellules cibles et/ou effectrices.

<i>Traitement</i>	<i>Affinité pour BTN3</i>	<i>Fraction des BTN3 engagées</i>	<i>Cross link</i>
Fab/ScFv #20.1	+	Partielle (dimères 1 et monomères)	-
ScFv #103.2	++	Totale (dimères 1, 2 et monomères)	-
#20.1	+++	Partielle (dimères 1 et monomères)	+
#103.2	++++	Totale (dimères 1, 2 et monomères)	+

Table 11 : Propriétés intrinsèques des anti-BTN3 conditionnant leur effet agoniste/antagoniste.
L'effet agoniste vs antagoniste des différents clones/formes d'anti-BTN3 pourrait s'expliquer par (i) l'affinité des Ac pour les BTN3 et le niveau de BTN3 engagé, définissant le niveau de ligands de TCR γ 9 δ 2 activé (effet agoniste), et (ii) le niveau de BTN3 engagé et le potentiel de cross-link des Acm, entraînant l'agrégation des BTN3 et la ségrégation différentielle entre les ligands de TCR et les molécules accessoires participant à l'activation des LT γ 9 δ 2 (effet antagoniste). Ainsi, d'après ce modèle, l'effet agoniste serait partagé entre tous les anti-BTN3, tandis que l'effet antagoniste serait une propriété exclusive des Acm complets, en accord avec les effets fonctionnels de ces différents Ac.

D'après les données moléculaires d'EJ Adams, l'anti-BTN3 #20.1 interagirait seulement avec les dimères de BTN3 de type 1 et les monomères, tandis que l'anti-BTN3 #103.2, capable de se fixer sur l'ensemble des BTN3 incluant les dimères de types 2, avec une affinité plus grande que celle du #20.1, permettrait un niveau d'agrégation supérieur des BTN3 à la surface des cellules cibles. A l'échelle cellulaire, la disponibilité des épitope #103.2 est effectivement supérieure à celle des épitopes #20.1. Cette observation, pouvant s'expliquer par le modèle de dimères de BTN3, ou encore par le masquage des épitopes du #20.1 par l'association entre BTN3 et d'autres molécules, est cohérente avec l'hypothèse d'une différence de niveau d'agrégation entre les deux Acm, pouvant expliquer leurs effets biologiques. Par ailleurs, des données préliminaires de microscopie mettant en évidence des

différences notables du niveau d'agrégation et de mobilité de BTN3 induit par les deux Acm à la surface de cellules cibles, soutiennent fortement cette hypothèse (**figure 44**).

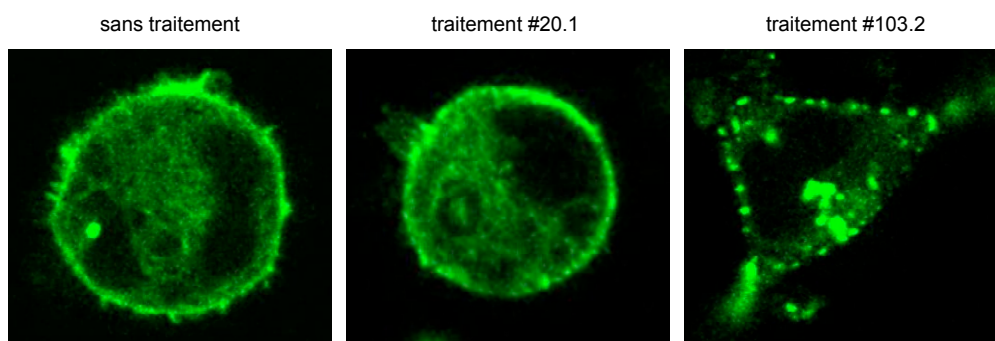


Figure 44 : Analyse de distribution et de mobilité membranaire de BTN3A1 sous l'effet des anti-BTN3.

Les distribution et mobilité de protéines BTN3A1-GFP (*vert*) exprimées dans des cellules HEK ont été étudiées respectivement en microscopie confocale sur cellules vivantes et en vidéomicroscopie par FRAP. Ces analyses mettent en évidence une très forte agrégation des BTN3A1 sous l'effet de l'Acm #103.2, tandis qu'il n'y a peu/pas d'agrégation visible sous l'effet du #20.1. Par ailleurs, la mobilité de ces protéines analysée en FRAP est considérablement diminuée sous l'effet des deux anti-BTN3 comparé à la condition sans traitement, suggérant une association des BTN3A1 avec d'autres constituant cellulaires (cytosquelette, molécules membranaires ou sous-membranaires,...) sous l'effet de ces Acms (S Nedellec).

Ce modèle, qui permet à première vue d'expliquer la quasi-totalité des observations réalisées jusqu'à présent concernant les diverses propriétés des anti-BTN3, ainsi que le modèle de dimères activateur/non activateur d'EJ Adams va être rapidement mis à l'épreuve grâce à un certain nombre d'approches ayant pour but l'analyse de (i) l'existence et la modulation des dimères membranaires de BTN3 ou d'agrégats de BTN3 dans différents contextes (anti-BTN3, PAg,...), (ii) l'effet fonctionnel de la modulation de ces multimères sur l'activation des LTy9δ2, (iii) les propriétés fonctionnelles d'Acs mixtes mélangeant des fragments #103.2 et #20.1.

En outre, le modèle proposé ci-dessus devra être complété pour prendre en compte les données qui seront accumulées dans un futur proche. En particulier, il est probable que des effets additionnels des anti-BTN3 sur la signalisation par les BTN3 et/ou l'association entre les BTN3 et d'autres molécules puissent, en plus des

propriétés de crosslink des Acm complets, moduler l'aggrégation des BTN3, ainsi que d'autres paramètres pouvant participer au processus d'activation des LT γ 9 δ 2.

Par ailleurs, le lien entre les effets biologiques des différents anti-BTN3, et l'effet des PAg sur l'activation des LT γ 9 δ 2 reste à étudier. Mais au vu de l'incroyable efficacité des PAg comparés à celle des anti-BTN3, et de l'absence d'effet synergique du ScFv #103.2 sur les activations PAg-induites (**figure 40B**), il est probable que les PAg soient capables, en plus de l'induction des ligands de TCR γ 9 δ 2 actifs efficacement mimée par les anti-BTN3, d'induire des processus additionnels permettant d'optimiser l'activation des LT γ 9 δ 2 (ex : recrutement de molécules accessoires).

III. Définition d'un complexe protéique membranaire impliquant BTN3, le CMH-I, et l'ATPs

1) Introduction

Alors que le rôle clé des BTN3 dans l'activation des L γ 9 δ 2 par les PAg est dorénavant indiscutable, aucun argument n'a permis d'identifier cette protéine à un éventuel ligand de TCR γ 9 δ 2. De plus, un certain nombre d'approches ont permis de mettre en évidence son rôle non suffisant dans l'activation des L γ 9 δ 2 par les PAg et les anti-BTN3, et en particulier, l'échec du transfert de la capacité à présenter les PAg aux L γ 9 δ 2 chez la souris par expression de BTN3 suggère l'implication d'acteurs espèces-spécifiques, nécessaires à ce processus (non montré). Cet échec n'est probablement pas attribuable à un mismatch des molécules d'adhésion/costimulation entre L γ 9 δ 2 humains et cellules cibles murines, puisque cette capacité n'était pas non plus observable dans un système complètement murin impliquant, en plus des cellules cibles murines exprimant des BTN3 humaines, des effecteurs murins portant un TCR γ 9 δ 2 humain (T Hermann, non publié).

Ainsi, il est probable que le ligand de TCR γ 9 δ 2 intervenant dans ce processus et/ou d'autres acteurs indispensables, soient uniquement conservés au sein du règne primate, seul à exprimer des L γ 9 δ 2 ainsi que la réactivité aux PAg. L'ATPs ectopique a été impliquée dans le processus d'activation des L γ 9 δ 2 par les PAg, et même si le rôle de cette protéine dans ce processus reste relativement obscur, elle est la seule molécule susceptible de pouvoir interagir à la fois avec les PAg (Vantourout et al., 2009, Mookerjee-Basu et al., 2010) et le TCR γ 9 δ 2 (Scotet et al., 2005) (Intro ChapII III 4b).

L'ATPase, exprimée ubiquitairement à la surface des cellules, pourrait expliquer la large réactivité des L γ 9 δ 2 contre les cellules cibles humaines exprimant des PAg. Mais la conservation inter-espèce de cette protéine pourtant suffisante (associée à des PAg) à l'activation des L γ 9 δ 2 explique difficilement la restriction de la réactivité de ces cellules effectrices aux seules cellules cibles d'origines primates. Par ailleurs, cette enzyme est généralement associée aux molécules de CMH de classe I à la surface des cellules (Vantourout et al., 2008), et cette interaction pourrait moduler l'accessibilité des sites d'interaction entre ATPase et TCR γ 9 δ 2.

L'implication des molécules de CMH-I faiblement conservées entre les espèces, dans le processus de présentation des PAg aux L γ 9 δ 2 pourrait en outre participer à la spécificité inter-espèce de ce processus.

Mais les modèles actuels intégrant l'ATPase ectopique et les molécules de CMH de classe I au processus d'activation des L γ 9 δ 2 par les PAg ne permettent d'expliquer que partiellement ce mécanisme (Intro ChapII III 4b). Le rôle clé des BTN3 récemment mis en évidence (**article 2**) pose la question de la place, à première vue centrale, de ce nouvel acteur au sein des modèles préexistants. Aucune donnée ne suggérerait initialement de lien entre le modèle d'activation des L γ 9 δ 2 exposé précédemment dans ce manuscrit, centré sur les BTN3, et celui proposé par E Champagne exclusivement centré sur l'ATPase (Intro ChapII III 4b). Pourtant, les efforts ayant pour but de mettre à jour une cohérence entre ces deux modèles ont permis de réunir un certain nombre de données préliminaires suggérant la participation de l'ensemble de ces acteurs (CMH-I, ATPase, BTN3) au cours du processus d'activation des L γ 9 δ 2 par les PAg.

2) Matériels et méthodes

Ac et réactifs :

Les anti-BTN3 (#7.2, IgG1, #19.5 couplé A647 (IgG1) ; #20.1, IgG1 ; #103.2, IgG2a ainsi que les protéines recombinantes BTN3A1-Fc sont produits par l'équipe de D Olive (Compte et al., 2004). Les anti-CMH-I suivant ont été utilisés : #LSM01 (IgG1, J Déchanet-Merville), #TP25-99 (S Ferrone), #W6.32 (IgG2a, eBioscience), anti-CMH-I couplé FITC (#B9..., IgG1, Beckman Coulter). L'anti-ATPsb (IgG1, #3D5) vient d chez Invitrogen. L'Ac 2^{daire} utilisé pour la révélation des protéines BTN3A1-Fc vient de chez Beckman Coulter, tous les autres Ac 2^{daire}s sont de chez Invitrogen.

Lignées cellulaires

Les lignées B-EBV humaines suivantes ont été utilisées : 721.221 WT (déficientes en molécules de CMH-I) et transfectants HLA-B35 (E Chalmeau), 721.221 transfectant HLA-G1 (B Favier), Daudi WT (déficientes en b2m, ATCC), Daudi transfectant b2m (A Quillet), ainsi que les lignées murines : RMA WT et RMA-S (TAP déficientes) (E Champagne).

3) Interaction entre *BTN3* et *ATP synthase ectopique* ?

*Certaines cellules humaines expriment un ligand potentiel de *BTN3*.*

Dans le but d'identifier des candidats potentiels à l'interaction avec les protéines *BTN3*, pouvant être impliqués dans le processus d'activation des *LT γ 9 δ 2* par les PAg, médié par *BTN3*, nous avons étudié les propriétés de protéines recombinantes constituées du domaine extracellulaire de *BTN3A1* (IgC+IgV) fusionné avec un fragment Fc humain (*BTN3A1*-Fc) générées dans l'équipe de D. Olive (Compte et al., 2004). Alors qu'une interaction de ces protéines avec un éventuel contre-récepteur situé à la membrane de *LT γ 9 δ 2* (TCR γ 9 δ 2 par exemple) n'était pas détectable (non montré), l'équipe de D Olive a pu mettre en évidence la fixation de *BTN3A1*-Fc sur les cellules humaines de la lignée C91 T2.2 (**figure 45**), une lignée leucémique T sans aucun lien antérieur avec les *LT γ 9 δ 2*. Une étude exhaustive du profil de fixation de *BTN3A1*-Fc à la surface de cellules humaines de diverses origines a révélé une fixation de cette protéine sur plusieurs lignées, comptant notamment des cellules naturellement capables d'activer les *LT γ 9 δ 2* (Daudi, K562), alors que d'autres lignées très proches mais non activatrices (Raji, BEBV) n'étaient pas marquées par la protéine.

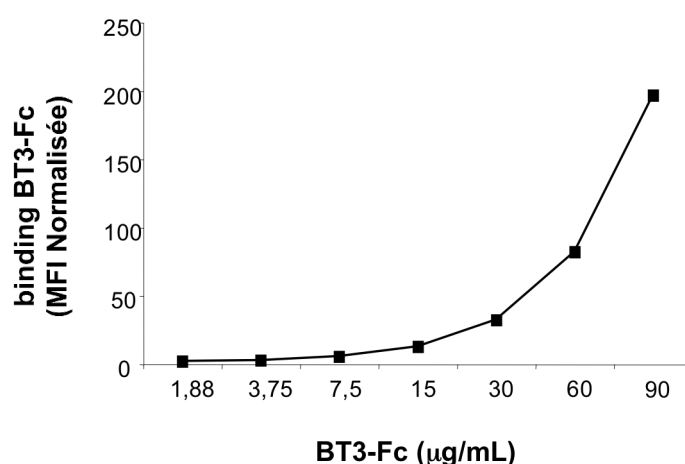


Figure 45 : Expression d'un éventuel ligand du domaine extracellulaire de *BTN3A1* à la surface de certaines lignées cellulaires.

Marquage membranaire de la lignée leucémique C91 T2.2 par la protéine recombinante *BTN3A1*-Fc (F Zambrano, UMR_S891, Marseilles).

Pourtant, le lien entre l'expression du ligand potentiel de BTN3 par des cellules humaines et leur capacité à activer les L γ 9 δ 2 n'était pas direct, puisque la lignée C91 T2.2 était marquée par BTN3A1-Fc mais incapable d'activer les L γ 9 δ 2, alors que la lignée de myélome RPMI8226, très bien reconnue par les L γ 9 δ 2, n'était peu ou pas marquée par BTN3A1-Fc (non montré).

Le marquage membranaire de certaines lignées par BTN3A1-Fc est corrélé négativement avec l'expression du CMH de classe I

L'analyse du marquage par BTN3A1-Fc de diverses lignées B a permis de constater qu'une majeure partie des cellules exprimant l'éventuel ligand de BTN3 étaient connues pour leur défaut d'expression en molécules du CMH de classe I. En effet, la lignée de lymphome de Burkitt Daudi, déficiente en b2m et n'exprimant pas de molécules de CMH de classe I à sa surface, ainsi que la lignée de leucémique B K562 délétée pour la plupart des molécules de CMH de classe I, étaient fortement marquées par BT3-Fc, tandis que les lignées RPMI8226 ou 786-0, également capables d'activer les L γ 9 δ 2 mais exprimant les molécules de CMH de classe I à un niveau relativement normal, n'était pas marquées (non montré).

Afin de confirmer cette corrélation, nous avons analysé le marquage membranaire par BTN3A1-Fc de modèles cellulaires strictement comparatifs, exprimant ou non des molécules du CMH de classe I. Ainsi, alors que lignée humaine Daudi WT négative pour le CMH de classe I était marquée par BTN3A1-Fc, sa contrepartie CMH I positive transfectée par la b2m humaine n'était pas marquée (**figure 46A**). Étonnamment, des résultats équivalents ont été obtenus avec la lignée murine de lymphome T RMA-S (TAP déficiente) qui n'exprimait pas de CMH de classe I murin à sa surface et était marquée par BTN3A1-Fc, tandis que son variant WT CMH I positif n'était pas marqué (**figure 46B**). L'expression du/des ligand (s) potentiel (s) de BTN3, possiblement conservé entre l'homme et la souris, semblait donc être corrélée négativement avec celle du CMH de classe I. En revanche, la corrélation n'était pas totale, puisque certaines lignées CMH-I négatives comme la lignée 721.221 n'étaient pas marquées par BTN3A1-Fc, et d'autres CMH-I positives comme la lignée C91 T2.2, étaient marquées (non montré).

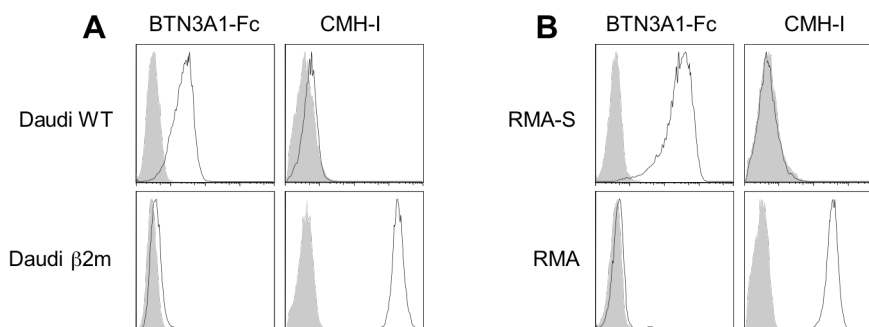


Figure 46 : Corrélation négative entre le marquage membranaire par BTN3-Fc et l'expression des molécules de CMH de classe I sur certaines lignées cellulaires.

Marquage de variants CMH-I/+ de lignées (A) humaines (DaudiWT/b2m) et (B) murines (RMA-S/RMA) par un anti-CMH de classe I ou BTN3A1-Fc.

Le domaine extracellulaire de BTN3A1 pourrait interagir avec l'ATP synthase ectopique de manière directe.

Une étude récemment menée dans l'équipe d'E. Champagne a permis de mettre en évidence un lien entre le CMH de classe I et l'activation des LT γ 9 δ 2, par le biais de l'ATP synthase ectopique. En effet, l'ATP synthase, enzyme mitochondriale essentielle, a été décrite il y a quelques années comme étant capable d'interagir avec le TCR γ 9 δ 2, et, exprimée à la membrane de cellules cibles, d'activer les LT γ 9 δ 2 (Scotet et al., 2005). Le groupe d'E. Champagne a par la suite montré que l'ATP synthase était potentiellement exprimée au niveau membranaire par de très nombreux types cellulaires, mais que cette expression était généralement masquée par son association directe avec le CMH de classe I, qui prévenait sa détection par les anti-ATP synthase et les LT γ 9 δ 2 (Vantourout et al., 2008).

Nous avons donc examiné l'hypothèse que la corrélation négative observée entre l'expression des molécules du CMH de classe I et le marquage par BTN3A1-Fc puisse correspondre à une corrélation positive entre le démasquage de l'ATP synthase ectopique et le marquage par BTN3A1-Fc. Le regroupement de données issues de la littérature et de certains résultats non publiés concernant l'expression de l'ATP synthase à la surface de quelques lignées nous ont permis de confirmer cette hypothèse (**table 12**). En effet, le marquage par BTN3A1-Fc semble strictement

corrélé à l'accessibilité de l'ATP synthase ectopique, quel que soit le niveau d'expression du CMH de classe I.

	Daudi	Daudi B2m	RMA-S	RMA	K562	721.221	721.221 HLA-B et G	C91 T2.2
Marquage extracellulaire par des anti-CMH-I	-	+++	-	+++	-	-	++	++
Marquage extracellulaire par BTN3A1-Fc	+++	-	+++++	-	+	-	-	++
Marquage extracellulaire par des anti-ATPs	+++	-	++++	-	+	-	-	++

Table 12 : Comparaison de l'expression des molécules de CMH-I, du marquage de l'ATPase ectopique, et du binding de BTN3A1-Fc sur diverses lignées.

Une partie des données d'expression de l'ATPase sont issues de la littérature et n'ont pas été reproduites expérimentalement.

Par ailleurs, un essai préliminaire de compétition entre la fixation d'anti-ATP synthase et de BTN3A1-Fc sur les cellules Daudi a montré des résultats encourageants (**figure 47**), suggérant que le domaine extracellulaire de BTN3A1 pourrait interagir directement avec l'ATP synthase ectopique, et peut-être plus particulièrement avec la sous-unité b de l'ATP synthase. Malheureusement, la pénurie actuelle en réactifs (anti-ATP synthase et ATP synthase purifiée) ne nous permet pas d'étudier plus avant cette hypothèse pour le moment.

BTN3A1-Fc

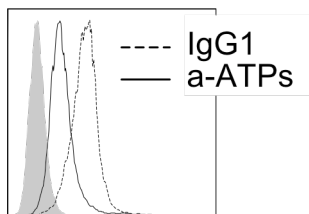


Figure 47 : Compétition de marquage membranaire entre un anti-ATPase et le domaine extracellulaire de BTN3A1.

Les cellules Daudi ont été pré-incubées avec un anti-ATPase b (#3D5) ou l'isotype contrôle correspondant puis marquées par BTN3A1-Fc et analysées en cytométrie de flux. Le profil des cellules non marquées est indiqué en histogramme grisé.

Modalités d'interaction entre BTN3 et son ligand.

Le marquage des cellules Daudi par BTN3A1-Fc a pu être reproduit avec les domaines extracellulaires des protéines recombinantes BTN3A1, BTN3A2, BTN3A3 fusionné avec un tag His (BTN3A1, A2, A3-His) (non montré), suggérant que les trois membres de la famille BTN3 interagissent avec le même ligand extracellulaire par le

biais de leur domaine extracellulaire conservé. La fixation de ces protéines à la surface des Daudi n'était inhibée par aucun des anti-BTN3 (non montré).

Discussion : interaction entre BTN3 et l'ATPase ectoplasmique à la surface des cellules ?

Les protéines de la famille BTN3 pourraient donc interagir avec un/des ligand(s) membranaire(s) non identifié(s), éventuellement conservé(s) entre l'homme et la souris par le biais de leur domaine extracellulaire (IgV et/ou IgC). Une interaction homotypique entre BTN3A1-Fc et BTN3 membranaires à la surface des cellules Daudi est envisageable, mais ne peut expliquer le binding de BTN3A1-Fc à la surface de cellules murines RMA-S, puisque celles-ci n'expriment aucun orthologue de BTN3.

L'ATPase ectopique, conservée entre l'homme et la souris, pourrait être un ligand direct du domaine extracellulaire des protéines de la famille BTN3, mais les résultats préliminaires en faveur de cette hypothèse restent à être confirmés. Par ailleurs, l'interaction entre BTN3A1, A2, A3, et l'ATPase ectopique pourrait avoir lieu en trans et/ou en cis, et le rôle des éventuelles interactions homotypiques entre BTN3, des interactions entre CMH-I et ATPase, ainsi que l'effet des anti-BTN3 sur ces différentes interactions devra être précisément analysé. Il semble en tous cas que l'association entre les molécules de CMH de classe I ou l'anti-ATPase b (#3D5) et l'ATPase ectopique empêchent l'association entre BTN3 et l'ATPase, et que les anti-BTN3 n'ont pas d'effet sur cette même interaction. Finalement, le mystère reliant ces différents interactants et l'activation des LTy9δ2 par les anti-BTN3 et/ou les PAg reste entier.

En particulier, il serait intéressant d'étudier l'effet des anti-BTN3 ou PAg sur l'association entre ces différentes molécules dans un contexte membranaire dynamique (vidéomicroscopie), ainsi que l'effet de ces différentes associations sur l'activation des LTy9δ2.

4) Interaction entre BT3 et CMH-I par l'intermédiaire de l'ATP synthase ectopique?

L'Acm #23F8-6 est capable de favoriser l'interaction entre BTN3A1 et son ligand membranaire.

Afin d'identifier un/des ligand(s) de BTN3, la lignée cellulaire C91 T2.2, efficacement marquée par les protéines recombinantes BTN3A1-Fc, a été utilisée dans un protocole d'immunisation réalisé dans l'équipe de D. Olive, chez le rat. Les hybridomes ont été criblés dans le but d'isoler des Acm dirigés contre le ligand de BTN3A1-Fc, et capables d'empêcher l'interaction entre BTN3A1-Fc et son ligand situé à la surface des C91 T2.2. Malheureusement, aucun Acm n'a fait montre de cette propriété, et à l'inverse, certains Acm tels que le #23F8-6 (IgG2a de rat) se sont révélés capables d'augmenter la fixation de BTN3A1-Fc à la surface de cellules (non montré).

L'Acm #23F8-6 reconnaît les molécules du CMH de classe I humaines.

Une des hypothèse permettant d'expliquer cette propriété inattendue était que sous l'effet de l'Acm #23F8-6, le ligand de BTN3A1 soit induit à la surface des cellules. Cette possibilité renforçait par ailleurs l'hypothèse que ce ligand soit l'ATP synthase ectopique, celle-ci étant naturellement masquée par les molécules du CMH de classe I à la surface des cellules. Dans la ligne directe de cette hypothèse, nous avons examiné la possibilité que l'Acm #23F8-6 soit capable de reconnaître les molécules du CMH de classe I, et l'utilisation de méthodes classiques de biologie moléculaire et cellulaire a rapidement permis de vérifier cette hypothèse (**figure 48**). En effet, l'Acm #23F8-6 semble capable de reconnaître toutes les molécules classiques de CMH de classe I humaines (**figure 48**), mais pas murines (non montré). Par ailleurs, utilisé dans le cadre de marquage membranaire de cellules, il entre en compétition avec divers anti-CMH de classe I, et les anti-b2m (non montré).

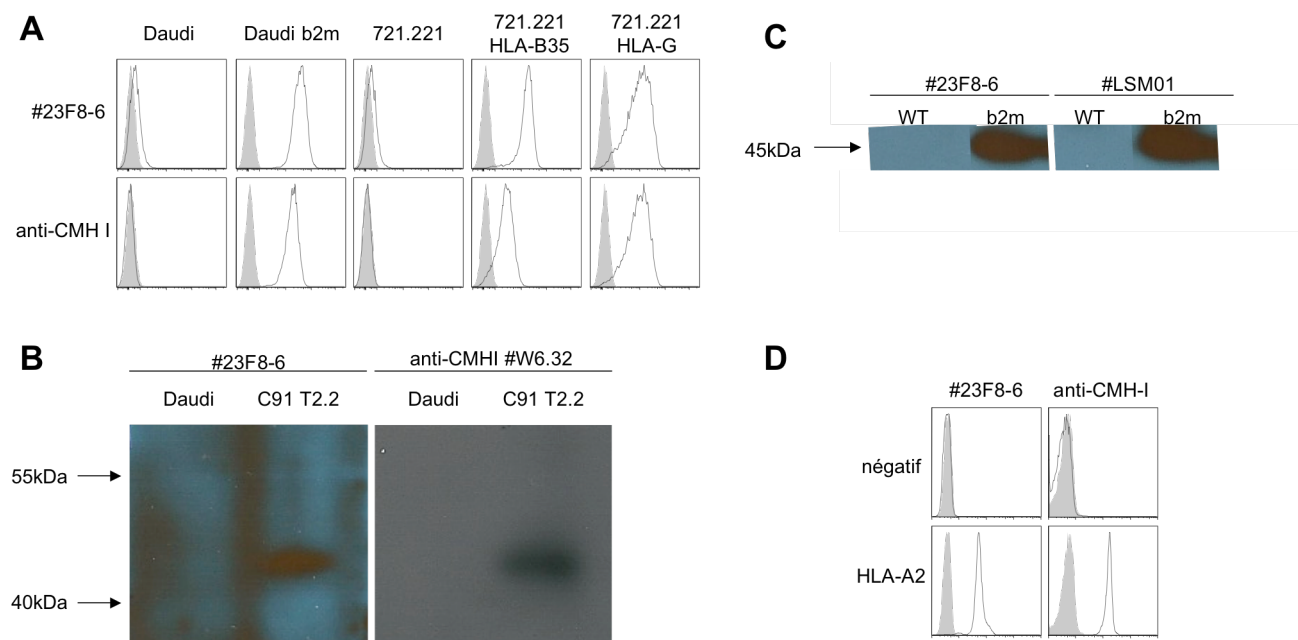


Figure 48 : Caractérisation de l'Acm #23F8-6 comme étant un anti-CMH de classe I.

(A) Corrélation de marquage membranaire entre le #23F8-6 et un anti-CMH de classe I sur des lignées humaines n'exprimant pas de molécules de CMH de classe I (Daudi et 721.221) ou transfectées pour obtenir une expression membranaires de ces mêmes molécules (Daudi transfectées b2m, ou 721.221 transfectées HLA-B35 ou HLA-G1). (B) WB semi-dénaturant effectué à partir de lysat de cellules exprimant (C91 T2.2) ou non (Daudi) des molécules de CMH-I et révélé avec l'Acm #23F8-6 ou un anti-CMH de classe I (#W6.32). (C) Immuno-précipitation par l'Acm #23F8-6 ou un anti-CMH de classe I (#LSM01) à partir de lysat de cellules Daudi exprimant (b2m) ou non (WT) des molécules de CMH-I, suivi d'un WB révélé par un anti-CMH-I (#TP25-99). (D) Marquage par l'Acm #23F8-6 ou un anti-CMH-I (#W6.32) de billes coatées ou non avec des monomères de HLA-A2 recombinants

Discussion : compétition entre les protéines BTN3 et CMH-I pour l'interaction avec l'ATPase ectopique ?

Ce résultat ajouté à l'hypothèse d'une interaction directe entre BTN3 et l'ATPase suggère que l'Acm 23F8-6, en se fixant sur les molécules de CMH de classe I, pourrait rompre l'interaction entre les molécules de CMH-I et l'ATPase, démasquant ces dernières et les rendant disponibles pour l'interaction avec BTN3. Ceci confirme donc l'éventuelle compétition entre les molécules des CMH-I et les BTN3 pour l'interaction avec l'ATPase, mais ces résultats préliminaires restent à être confirmés par des méthodes plus directes (marquage membranaire par l'anti-ATPase b 3D5 après traitement avec l'Acm #23F8-6, etc...)

Les questions soulevées précédemment à propos de la pertinence de ces interactions au niveau membranaire et lors de l'activation des LT γ δ 2 par les anti-

BTN3 ou les PAg s'appliquent également dans ce modèle. Par ailleurs, dans le cas où ces différentes interactions pourraient effectivement avoir lieu en cis, il serait intéressant de déterminer si le démasquage de l'ATPase ectopique par l'Acm #23F8-6 entraîne naturellement son association avec les protéines BTN3 membranaires, ou si celle-ci est dépendante d'autres événements (changements de conformation, modulation par d'autres interactants membranaires ou par les PAg,...). En tous cas, l'Acm #23F8-6 n'a pas d'effet évident sur l'activation des LT γ 9 δ 2 (non montré), donc le démasquage de l'ATPase n'est pas un événement suffisant pour l'activation des LT γ 9 δ 2.

5) Interaction directe entre BTN3 et CMH de classe I ?

Les anti-BTN3 peuvent être séparés en 2 catégories, selon la localisation de leur épitope

L'analyse des propriétés de marquage des différents Ac anti-BTN3 a révélé des différences flagrantes entre eux, et a permis de les séparer en 2 catégories. Tout d'abord, l'analyse de la compétition entre les différents anti-BTN3 disponibles a permis de séparer 2 zones de fixation d'Ac (**table 13**). En effet, les clones #20.1, #7.2, #19.5 entraînent tous en compétition les uns avec les autres (zone 1 de fixation), tandis qu'aucune compétition n'était visible entre chacun d'entre eux et le clone #103.2 (zone 2 de fixation) (non montré, données obtenues dans l'équipe de D. Olive). Ainsi que la zone de fixation des différents clones n'est pas directement liée à leur propriété sur l'activation γ 9 δ 2 humains (cohérent avec les propriétés antagonistes de certains agonistes, mises en évidence sur les γ 9 δ 2 babouins).

Clone d'anti-BTN3	Zone ciblée sur BTN3	Propriété sur l'activation γ9δ2 humains
7.2	1	Agoniste
19.5	1	Antagoniste
20.1	1	Agoniste
103.2	2	Antagoniste

Table 13 : Liste des anti-BTN3, localisation de leurs épitopes et propriété sur l'activation des LT γ 9 δ 2 humains.

La zone de BTN3 contenant les épitopes des clones d'Ac #7.2, #19.5 et #20.1 est généralement masquée à la surface des cellules.

En outre, des marquages de diverses cellules cibles par les anti-BTN3 ont rapidement mis en évidence une absence totale de corrélation entre les marquages obtenus avec les anti-BTN3 #20.1 et #103.2 (**figure 49A**). Les moyennes de fluorescentes obtenues par marquage avec le #103.2 étaient presque toujours beaucoup plus fortes qu'avec le #20.1, allant jusqu'à des facteurs de 10 de différence entre les intensités de marquage par ces deux Ac, notamment dans le cas des lymphocytes T (**figure 49A**). Cette disparité ne pouvait pas s'expliquer par une différence de cible, puisque chacun des Ac était capables de fixer chacun des isoformes BTN3 (non montré), et les lignées humaines KO pour BTN3 ont permis de confirmer qu'ils ne reconnaissaient aucune autre protéine que BTN3. Par ailleurs, une simple différence d'affinité de reconnaissance ou encore de nombre d'épitopes reconnues entre deux les Ac pouvaient difficilement expliquer le phénomène, au vu de l'absence totale de corrélation entre les marquages. De plus la lignée Daudi (**figure 49A**) était marquées de manière tout à fait similaire par les 2 Ac.

Au cours d'essais d'optimisation des conditions de marquages par les anti-BTN3, en augmentant les temps de contacts avec les anti-BTN3 purifiés avant de révéler le marquage final à l'aide d'un Ac secondaire, nous avons pu observer une disparité flagrante entre les dynamiques de fixation des Ac #20.1 et #103.2 au cours du temps (**figure 49B**). Alors que le contact prolongé de lymphocytes T avec le #103.2 induisait une diminution du marquage, correspondant probablement à une internalisation des protéines BTN3, le marquage par l'anti-BTN3 #20.1, initialement beaucoup plus faible que le marquage #103.2, augmentait rapidement au cours du temps, atteignant un maximum au bout de 2h de coculture avant de diminuer d'une manière similaire à celle observée en présence de l'Ac #103.2. Ce type de cinétique a été observé sur presque toutes les cellules testées, chez l'homme ou encore sur des cellules murines transduites avec des protéines BTN3 humaines. La seule lignée échappant à ce modèle est la lignée Daudi, qui présentait à la fois des marquages initiaux #20.1 et #103.2 identiques, et une absence d'augmentation du marquage 20.1 (**figure 49B**).

Nous avons ensuite étudié l'hypothèse d'une augmentation de l'expression de BTN3 en surface des cellules, sous l'effet de l'anti-BTN3 #20.1 (par signalisation par BTN3 par exemple). À l'aide d'un double marquage, grâce à des anticorps secondaires isotypes spécifiques permettant de dissocier les anti-BTN3 #20.1 et #103.2, nous avons pu constater (**figure 49C**) qu'une coculture avec l'anti-BTN3 #20.1 n'avait pas d'effet sur l'augmentation du marquage par l'anti-BTN3 #103.2, excluant ainsi l'augmentation globale de l'expression des BTN3 à la surface des cellules sous l'effet du #20.1.

Finalement, un marquage secondaire révélant à la fois les anticorps 103.2 et 20.1 nous a permis d'évaluer grossièrement la stoechiométrie entre les épitopes 20.1 et 103.2 à la surface des cellules au cours de la co-culture avec l'anti-BTN3 20.1 (**figure 49D**). Alors que durant les deux premières heures de contact avec l'Ac 20.1 le nombre d'épitopes reconnus par l'Ac #103.2 était largement supérieur à celui de l'Ac #20.1 à la surface des cellules, après 2 heures de contact, les nombres d'épitopes reconnus par les deux anti-BTN3 étaient tout à fait équivalents. Ce dernier résultat, cohérent avec les données stoechiométriques obtenues par l'équipe d'Erin Adams (même nombre d'épitope #103.2 que #20.1 par BTN3), permettait d'interpréter la modulation des marquages #20.1 et #103.2 au cours du temps par un démasquage progressif des épitopes reconnus par l'anti-BTN3 20.1 durant les deux premières heures de traitement avec cet Ac, tandis que les épitopes #103.2 étaient démasqués en totalité. Au bout de 2h de contact avec l'Acm #20.1, la totalité des épitopes #20.1 présents à la surface des cellules étaient démasqués, atteignant ainsi le nombre d'épitope #103.2. Pour durant le temps additionnel de contact des cellules avec le #20.1, le nombre d'épitopes #20.1 à la surface des cellules restait égal à celui de l'Acm #103.2, mais l'internalisation progressives des BTN3 au cours du temps réduisait peu à peu la disponibilité de ces deux types d'épitopes. L'anti-BTN3 #103.2 n'avait quant à lui aucun effet visible sur le démasquage d'épitopes, et induisait seulement une diminution de l'expression membranaire des BTN3 au cours du temps (**figure 49D**).

Cet ensemble de résultats met en évidence une différence de disponibilité des épitopes #20.1 et #103.2, ainsi qu'une différence d'effet des anti-BTN3 sur la disponibilité de ces épitopes. Ainsi, les épitopes #20.1 seraient en grande majorité masqués à la surface de toutes les cellules (exception faite des cellules Daudi),

tandis que les épitopes #103.2 semblent démasqués en totalité, et révèlent le niveau réel d'expression des BTN3 à la surface des cellules. De plus, le traitement de cellules par l'anti-BTN3 #20.1 a pour effet un démasquage progressif des épitopes reconnus par cet Ac, consécutivement à une internalisation des BTN3. L'Acm #103.2 induit seulement une internalisation de BTN3, tout à fait similaire à celle observée dans le cas du #20.1 (non montré). Les résultats obtenus avec l'anti-BTN3 #20.1 pourraient probablement être généralisable aux clones #7.2 et #19.5, les épitopes de ces Acm étant situé dans la même zone que celui du 20.1, et les marquages obtenus étant comparativement beaucoup plus faible que ceux du 103.2. Il est donc probable que toute la zone 1 des BTN3 (épitopes #7.2, #19.5, #20.1) se trouve généralement masquée à la surface des cellules.

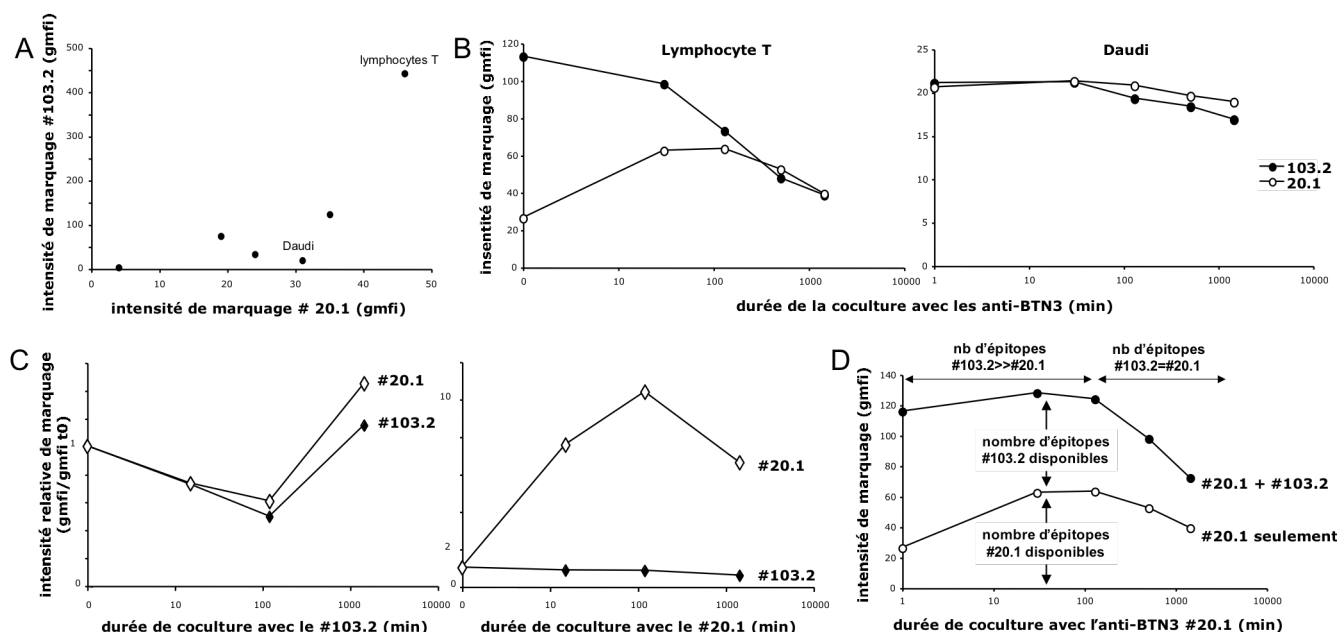


Figure 49 : Lien entre les marquages par Acm anti-BTN3 #20.1 et #103.2 à la surface des cellules.

(A) Analyse de corrélation entre les marquages simples par les anti-BTN3 #103.2 et #20.1 sur des cellules humaines d'origines diverses, révélé par un même Ac secondaire et analysé en cytométrie de flux. (B) Analyse de la fixation des anti-BTN3 #103.2 et #20.1 à la surface de LT (*gauche*) ou cellules Daudi (*droite*) au cours du temps. Les cellules sont cultivées à 37°C en présence de l'un ou l'autre des anti-BTN3 durant le temps indiqué. La fixation des deux anti-BTN3 est révélée par un même Ac secondaire fluorescent et analysée en cytométrie de flux. (C) Des cellules B-BEBV ont été cultivées à 37°C en présence de l'anti-BTN3 #103.2 (*gauche*) ou #20.1 (*droite*) durant le temps indiqué. L'effet de la coculture avec ces Ac est ensuite étudié par double marquage #103.2 et #20.1 révélé avec des réactifs secondaires isotopes spécifiques. Les données sont exprimées en gmfi relatives par rapport à t0, correspondant au marquage sans préincubation avec les anti-BTN3. (D) Des LT ont été cultivés avec l'anti-BTN3 #20.1 à 37°C durant le temps indiqué. Les cellules sont ensuite marquées avec ce même Acm, ou un mélange d'anti-BTN3 #20.1 et #103.2. Le marquage est révélé avec un Ac secondaire fixant les deux anti-BTN3 de manière indifférenciée, et analysé en cytométrie de flux.

Le masquage de l'épitope reconnu par l'anti-BTN3 #20.1 est lié à l'expression des molécules de CMH de classe I à la surface des cellules.

Le démasquage des épitopes #20.1 au cours d'une coculture avec cet anti-BTN3 a été évalué sur le nombreux types cellulaires, et a permis de montrer que le niveau du masquage de l'épitope #20.1 par rapport à l'expression des protéines BTN3 évalué par marquage #103.2 était extrêmement variable d'une lignée à une autre (**figure 49A**). L'étude des facteurs pouvant éventuellement intervenir dans ce phénomène de masquage a permis de mettre en évidence une grossière corrélation entre la différence de marquage #20.1/103.2 et le niveau d'expression des molécules de CMH de classe I à la surface des cellules. En particulier, à la surface des cellules Daudi, déficientes en b2m et n'exprimant pas de CMH-I membranaire, l'épitope #20.1 était visiblement démasqué (**figure 49B**), tandis que les cellules 721.221 exprimant très faiblement des molécules de CMH-I, présentaient un masquage très faible de l'épitope #20.1 en surface, ainsi qu'un faible démasquage de cet épitope durant la coculture avec l'anti-BTN3 #20.1 (non montré).

Ce résultat suggérait un éventuel lien entre le masquage des épitopes #20.1 et l'expression des molécules de CMH de classe I à la surface des cellules, qui a été examiné par l'étude de ce phénomène sur des modèles cellulaires comparatifs exprimant ou non le CMH-I membranaire (**figure 50**). Cette étude a permis de montrer que le masquage de l'épitope #20.1 à la surface des cellules Daudi pouvait être induit par l'expression membranaire de molécules associées à la b2m telles que les molécules du CMH de classe I (Daudi transfectées b2m), tandis que le masquage de ces même épitopes n'était pas augmenté à la surface des 721.221 après augmentation de l'expression du CMH-I (721.221 transfectées HLA-B35 ou HLA-G).

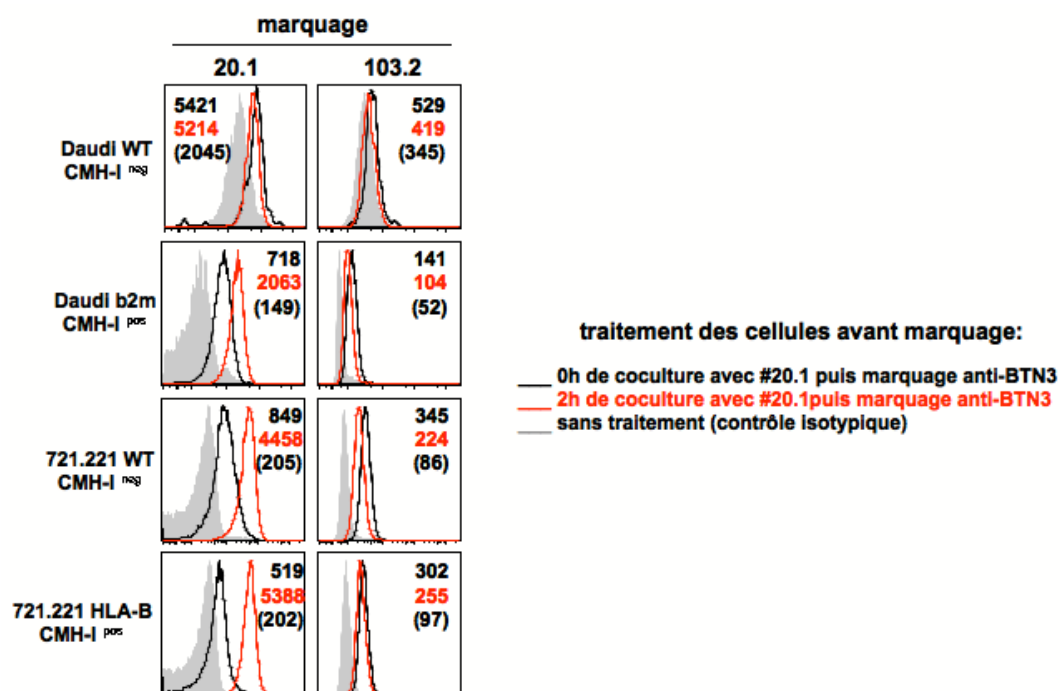


Figure 50 : Effet de l'expression membranaire du CMH-I et de la b2m sur le phénomène de masquage/demasquage de l'épitope #20.1 à la surface des cellules.

Les cellules ont été cultivées pendant 0 ou 2h en présence d'anti-BTN3 #20.1, puis marquées par l'anti-BTN3 #20.1 ou #103.2 et analysées en cytométrie de flux.

Ainsi, le masquage des épitopes #20.1 à la surface des cellules Daudi pouvait être favorisé par l'expression de molécules associées à la b2m. En particulier, les molécules du CMH de classe I pourraient être impliquées dans ce phénomène, mais ne seraient pas suffisantes (pas de modification du masquage #20.1 à la surface des 721.221 transfectées avec les HLA-B35) et nécessiteraient l'intervention d'autres molécules exprimées par les Daudi et pas par les 721.221, ou ces molécules pourraient jouer un rôle redondant avec d'autres protéines (éventuellement associées à la b2m) exprimées par les 721.221 mais pas par les Daudi WT.

Association directe/indirecte entre BTN3 et CMH-I à la surface des cellules.

Une étude préliminaire du lien éventuel existant entre les molécules de CMH-I et BTN3 suggère que ces deux protéines pourraient être directement associées l'une à l'autre à la surface des cellules, ou encore associées indirectement, par

l'intermédiaire d'une/plusieurs molécules additionnelles. En effet, les phénomènes de compétition entre des anti-BTN3 et des anti-CMH-I observé par marquage extracellulaire de diverses lignées (**figure 51**) indique une étroite association de ces deux protéines à la surface des cellules.

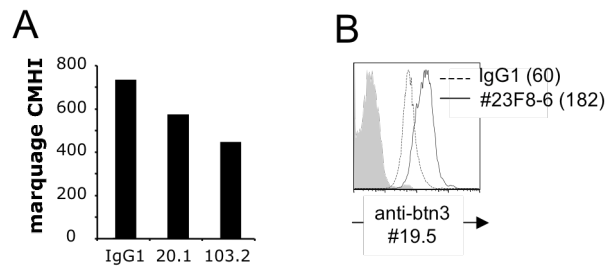


Figure 51 : Association étroite entre BTN3 et CMH-I à la surface des cellules.

(A) Compétition de marquage entre des anti-BTN3 et un anti CMH-I à la surface de Daudi transfectées avec la b2m. Le marquage par un anti-CHH-I des cellules et prétraitées ou non avec des anti-BTN3 purifiés est analysé en cytométrie de flux. (B) Des cellules B-EBV sont prétraitées avec l'anti-CMH-I (#23F8-6), marquées avec l'anti-BTN3 (#19.5) puis analysées en cytométrie de flux. Les données obtenues sont présentées sous forme de gmfi.

Discussion : modèle du masquage de l'épitope de l'anti-BTN3 #20.1 à la surface des cellules.

Les résultats concernant le masquage de l'épitope #20.1 à la surface des cellules peut être rapproché des données moléculaires obtenue par EJ Adams (**article 3**), qui mettent en évidence un potentiel de dimérisation des BTN3 par le biais d'un site superposé avec le site de fixation de l'anti-BTN3 #20.1 (dimères 1). D'après ces données, les BTN3 pourraient coexister à la surface des cellules sous forme de dimères 1 ou 2 (**figure S3 article 3**), et probablement sous forme de monomères. L'anti-BTN3 #103.2 pourrait reconnaître l'ensemble de ces formes de BTN3, tandis que l'anti-BTN3 #20.1 ne reconnaîtrait que les dimères 2 et les monomères. Ce modèle est donc tout à fait cohérent avec les observations réalisées sur cellules entières et exposées ci-dessus, soutenant l'existence réelle de ces dimères à la surface des cellules.

L'interprétation du masquage des épitopes #20.1 par formation des dimères de BTN3 proposés par EJ Adams devra être confirmé par des méthodes plus directes (vidéomicroscopie, FRET,...). Par ailleurs, ce masquage pourrait également

être dû à l'association des BTN3 à d'autres molécules par de biais de sites d'interactions superposés avec l'épitope #20.1.

Les différences de masquage de l'épitope #20.1 observé à la surface de différentes cellules cible sont encore difficiles à interpréter. Le modèle comparatif DaudiWT/b2m a permis de relier ce masquage avec l'expression des molécules de CMH de classe I à la surface de telles lignées, mais ce lien n'est pas directe puisque la comparaison de cellules 721.221 exprimant ou non le CMH-I n'a pas permis de mettre en évidence de différence de masquage de cet épitope. Ainsi, ce masquage semble être favorisé par la présence de CMH-I, mais implique visiblement d'autres molécules pouvant interférer (i) positivement (exprimées par les 721.221), ou (ii) négativement (exprimées par les Daudi) avec ce phénomène.

(i) Des molécules susceptibles de favoriser le masquage de l'épitope #20.1 à la surface des cellules pourraient être surexprimées par les cellules 721.221WT comparées aux Daudi. Les molécules de CMH-I associées à la b2m pourraient être des candidates idéales, incluant les molécules de CMH-I classiques (absentes des 721.221 comme des Daudi) et non classiques (exprimées par les 721.221 mais pas par les Daudi).

(ii) Des molécules capables d'interférer négativement au cours du processus de masquage des épitopes #20.1 pourraient à l'inverse être surexprimées par les Daudi comparé aux 721.221. En particulier, deux différences flagrantes entre ces deux lignées ont été mises en évidence et reliées à l'activation des LTy9 δ 2 : l'expression des PAg par les Daudi contrairement aux 721.221, et l'expression de l'ATPase ectopique mise en évidence pour les Daudi à l'inverse des 721.221. Ces deux molécules ont été impliquées dans la différence de reconnaissance des lignées 721.221 et Daudi par les LTy9 δ 2 (Mookerjee-Basu et al., 2010). Le lien éventuel entre l'expression des PAg et/ou de l'ATPase ectopique par les cellules Daudi (et pas 721.221) et le démasquage de l'épitope #20.1 en l'absence de CMH-I mériterait d'être étudié précisément, et pourrait fournir une interprétation aux différences de phénomène de démasquage de l'épitope #20.1 observé avec diverses cellules.

IV. Discussion : Modèle (s) d'activation des LTy9δ2 par les anti-BTN3 et les PAg.

1) Lien entre les interactions dynamiques modulant la composition du complexe BTN3/CMH-I/ATPase et l'activation des LTy9δ2.

Les résultats présentés précédemment (Résult ChapII III) ont mis à jour un ensemble de processus dynamiques intervenants à la surface des cellules sous l'effet de divers réactifs (anti-BTN3, anti-ATPase, anti-CMH-I), et modulé par l'expression de certaines molécules (CMH-I, PAg, ATPase). En effet, des phénomènes de masquages/démasquage de certaines régions des protéines BTN3, et en particulier de l'épitope reconnu par l'anti-BTN3 #20.1, semblent être contrôlés par l'association/dissociation de cette protéine avec un ensemble de molécules au sein d'un complexe membranaire impliquant l'ATPase ectopique ainsi que des molécules du CMH de classe I. Le lien entre la fonction des BTN3 dans l'activation des LTy9δ2 et ces phénomènes dynamiques reste obscur, mais ces derniers peuvent être rapprochés des observations réalisées par l'équipe d'EJ Adams au niveau moléculaire (**article 3**).

En effet, ces travaux ont permis de mettre en évidence l'existence potentielle de plusieurs formes multimériques de BTN3 à la surface de cellules cibles (dimères 1 et dimères 2), dont la proportion relative pourrait être modulée par les anti-BTN3 (notamment le #20.1) (**article 3**). Selon ces modèles structuraux, l'épitope de l'Acm #20.1 étant masqué au sein des dimères 2 et démasqué à la surface des dimères 1, les proportions relatives entre les dimères 1 et 2 à la surface de cellules pouvaient être observées par simple immunomarquage à l'aide de l'Ac #20.1 (**figure 49**).

Le lien entre les modifications de l'état structural des BTN3 et l'activation des LTy9δ2 est pour le moment tout à fait hypothétique, et exclusivement basé sur les propriétés de l'anti-BTN3 #20.1, potentiellement capable d'induire (i) une transition des formes dimériques de BTN3 de dimère 2 à dimère 1 à la surface de cellules cibles (**figure S3 article 3, figure 49**), ainsi que (ii) leur reconnaissance par les LTy9δ2. À partir de cette observation, la reconnaissance des dimères 1 de BTN3 a été proposée comme étant responsable de l'activation des LTy9δ2 (**article 3**).

Pourtant, l'hypothétique transition de dimère 2 à dimère 1 induite par l'anti-BTN3 #20.1 n'était visiblement ni nécessaire, ni suffisante pour l'activation des LT γ 9 δ 2. En effet, l'incubation avec l'Acm #20.1 de cellules cibles murines exprimant des protéines humaines BTN3 induisait apparemment ce type de transition, de manière tout à fait similaire à celle observée sur des cellules cibles humaines (non montré), sans pour autant entraîner leur reconnaissance par des LT γ 9 δ 2 (humains ou murins transfecté avec un TCR γ 9 δ 2 humain). A l'inverse, l'expression de PAg par des cellules cibles humaines entraînait leur reconnaissance par les LT γ 9 δ 2 sans avoir d'effet visible sur le démasquage de l'épitope #20.1.

Ainsi, les transitions des formes dimériques de BTN3 à la surface de cellules cibles sous l'effet de l'anti-BTN3 #20.1 pourraient être sans aucun lien avec l'activation de LT γ 9 δ 2, ou encore y être reliées de manière plus subtile, comme le présente le modèle proposé **figure 52**. Ce modèle, en plus du rôle activateur non suffisant/indirect du dimère 1 dans l'activation des LT γ 9 δ 2, propose l'existence de BTN3 sous formes monomériques, et tente d'intégrer l'ensemble des observations dynamiques survenant au sein du complexe membranaire contenant les BTN3 sous l'effet de différents acteurs moléculaires (Résult ChapII III).

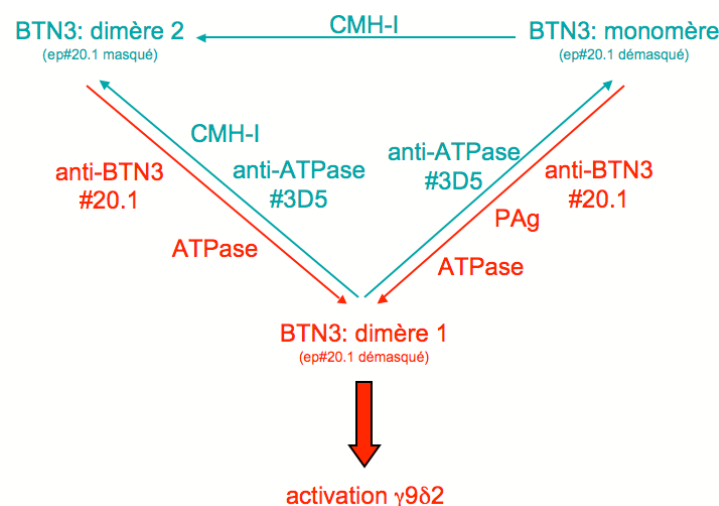


Figure 52 : Modèle hypothétique reliant l'état de multimérisation des BTN3 au sein d'un complexe membranaire impliquant divers acteurs moléculaires à l'activation des LT γ 9 δ 2.

Les molécules BTN3 pourraient exister sous trois formes à la surface des cellules : dimère 1, dimère 2, monomère. Seul le dimère 1 participerait à l'activation des LT γ 9 δ 2 (induction/démasquage d'un ligand de TCR), sans pour autant être suffisant. Les acteurs moléculaires participant positivement au remodellement membranaire des cellules cibles reconnu par les LT γ 9 δ 2 sont indiqués en *rouge*, les acteurs inhibant ce remodellement sont en *vert*.

Expression de l'ATPase par les cellules cibles

L'ATPase ectopique, ligand potentiel du TCR γ 9 δ 2 (Scotet et al., 2005), pourrait s'associer aux BTN3 à la surface des cellules et favoriser la transition vers une forme de dimère 1 activateur (Obs : les épitopes #20.1 sont démasqués à 100% à la surface des Daudi WT, **figure 49B**).

Expression des PAg par les cellules cibles

Les PAg, par interaction directe/indirecte avec le domaine intracellulaire de BTN3A1, pourraient participer à la transition monomère vers dimère 1, sans avoir d'effet sur les BTN3A1 sous forme dimère 2. (Obs : l'expression des PAg n'a aucun effet sur le marquage par l'anti-BTN3 #20.1, non montré)

Expression de molécules de CMH-I par les cellules cibles

L'expression de molécules de CMH-I favoriserait directement la formation de dimère 2 par interaction directe avec BTN3 et défavoriserait la formation de dimère 1 en empêchant l'interaction entre ATPase et BTN3 (compétition) (Obs: masquage de l'épitope #20.1 à la surface des Daudi b2m comparé aux Daudi WT, **figure 50**). L'effet fonctionnel d'un tel phénomène est difficilement observable en raison des effets multiples et antagonistes de l'expression des molécules de CMH-I à la surface de cellules cibles modulant l'activation des LT γ 9 δ 2 par le biais de NKR activateurs et inhibiteurs (Trichet et al., 2006).

Effet de l'anti-ATPase #3D5 sur les cellules cibles

L'anti-ATPase #3D5 empêche l'interaction entre ATPase et BTN3 (Obs : compétition entre marquage #3D5 et marquage BTN3A1-Fc, **figure 50**), inhibant l'effet de l'ATPase sur la formation des dimères 1. Cet Acn a effectivement un effet inhibiteur sur l'activation des LT γ 9 δ 2 par certaines cellules cibles comme les Daudi (Scotet et al., 2005). Cet effet a été partiellement attribué à un blocage direct de l'interaction entre TCR γ 9 δ 2 et ATPase, mais un effet additionnel indirect de cet Acn pourrait expliquer l'hétérogénéité des blocages par l'Acn #3D5 observés sur diverses cellules cibles (Marcu-Melina et al., 2011), pouvant être attribué à des disparités de stabilité d'interaction BTN3/ATPase, en fonction des acteurs moléculaires impliqués dans le complexe membranaire contenant BTN3 et l'ATPase.

Pourtant, la reconnaissance des dimères 1 de BTN3 ne semble pas suffisante pour l'activation des L γ 9 δ 2. En effet cette structure semble exister en solution (**article 3**) et au niveau membranaire sur toutes les cellules (humaines et murines, exceptée la lignée Daudi WT, non montré) mais aucune activation des L γ 9 δ 2 n'a pu être observée en présence de protéines recombinantes ou exprimée à la surface de cellules murines traitées par l'Acm #20.1 (non montré). Par ailleurs, rien n'indique pour le moment que cette structure soit nécessaire à l'activation des L γ 9 δ 2, et le lien entre les observations de masquage/démasquage d'épitopes #20.1 à la surface des cellules et des éventuelles transitions structurales de BTN3 reste tout à fait hypothétique. En effet, le masquage des épitopes #20.1 de BTN3 pourrait également être dû à des interactions moléculaires n'impliquant pas nécessairement la formation de dimères de BTN3 de type 2, comme le suggère l'association étroite entre BTN3 et plusieurs autres molécules, au sein de complexes surfaciques impliquants probablement de nombreux acteurs tels que l'ATPase et le CMH-I (Résult ChapII III).

2) Rôle de BTN3, CMHI, et ATPase dans l'activation des L γ 9 δ 2 par les PAg et les anti-BTN3.

La formation de dimère 1 de BTN3, sans pour autant être nécessaire à ce processus, pourrait participer au remodellement surfacique de cellules cibles, aboutissant à leur reconnaissance par les L γ 9 δ 2 pour l'effet de traitements PAg ou anti-BTN3. En particulier, les protéines BTN3 pourraient coordonner l'induction/démasquage d'un ligand de TCR γ 9 δ 2 central dans le processus d'activation des L γ 9 δ 2.

L'absence d'interactions directes détectables entre BTN3 et le TCR γ 9 δ 2 (Résult ChapII II 1), ainsi que la conservation de certaines propriétés activatrices de protéines BTN3 fusionnées avec la GFP du côté extracellulaire suggèrent que BTN3 n'interagisse pas directement avec le TCR γ 9 δ 2 (Résult ChapII I 2).

Par ailleurs, le lien hypothétique entre BTN3 et l'ATPase semble confirmer le rôle central de cette enzyme, défendu par l'équipe d'E Champagne, dans l'activation des L γ 9 δ 2 (Intro ChapII III 4). Pourtant, ce candidat, potentiellement capable d'interagir à la fois avec le TCR γ 9 δ 2 et les PAg, a été écarté par certaines

techniques (Intro ChapII III 4c). De plus, co-exprimé avec BTN3A1 à la surface de cellules murines (RMA-S transduites avec BTN3A1), il ne semble pas suffisant à l'activation des L γ 9 δ 2 par les PAg ou les anti-BTN3 (non montré). Il est donc probable que d'autres molécules espèce-spécifiques non identifiées soient nécessaires au processus d'activation des L γ 9 δ 2 par les PAg et les anti-BTN3.

Ainsi, un modèle additionnel du processus de remodellement surfaciques de cellules humaines induisant leur reconnaissance par les L γ 9 δ 2 peut être proposé (**figure 53**), complétant celui précédemment exposé (Résult ChapII IV 1). En plus des partenaires protéiques identifiés jusqu'à présents (Résult ChapII III), ce modèle inclue des acteurs moléculaires spécifiquement exprimés par certains primates (humains et non humains). Par exemple, certains adaptateurs pourraient être nécessaires à l'interaction (directe ou indirecte) entre les PAg et le domaine B30.2 de BTN3A1, mais dispensables à l'activation des L γ 9 δ 2 par les anti-BTN3 (Résult ChapIII I 2). D'autres molécules nécessaires à l'activation des L γ 9 δ 2 par les PAg et les anti-BTN3 pourraient interagir avec le TCR γ 9 δ 2 et être reconnues conjointement à l'ATPase par les L γ 9 δ 2.

D'après ce modèle, le domaine B30.2 de BTN3A1, crucial pour l'effet des PAg sur l'activation des L γ 9 δ 2 (Résult ChapII I), pourrait fonctionner comme un module d'interface protéique capable d'interagir avec de multiples acteurs moléculaires (Intro ChapI III 2d). Ainsi, BTN3 pourrait remplir une fonction de protéine chaperonne participant à l'interaction entre BTN3, PAg, et d'autres acteurs nécessaires qui restent à être identifiés. Ce modèle, centré sur le rôle du domaine B30.2 de BTN3A1 dans l'induction/démasquage de ligands de TCR γ 9 δ 2, ne prend pas en compte l'éventuelle dimérisation de BTN3 par le biais des domaines IgSF extracellulaires (Résult ChapII IV 1). Pourtant, le rôle clé des dimères de BTN3 de type 1 proposé précédemment (**article 3** et Résult ChapII IV 1) pourrait aisément y être intégré. En effet, le rapprochement des domaines B30.2 induit par la formation de dimères 1 contrairement aux dimères de type 2 (**article 3 figure S3**) pourrait largement participer au recrutement des multiples interactants intracellulaires impliqués dans le processus de remodellement surfacique des cellules cibles sous l'effet des PAg.

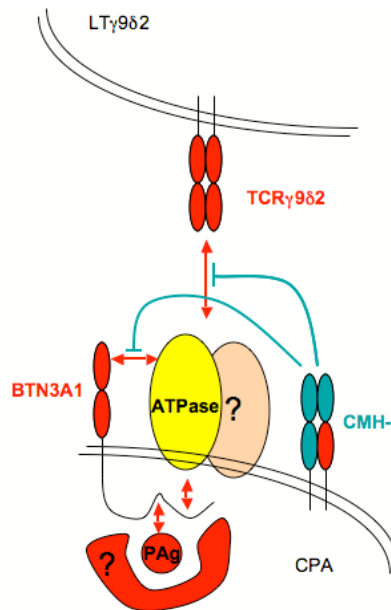


Figure 53 : Modèle hypothétique de la perception par les LTγ9δ2, de PAg exprimés par des cellules humaines.

Dans ce modèle, BTN3A1 pourrait jouer le rôle d'une protéine chaperonne participant à l'interaction (directe/indirecte) entre l'ATPase et les PAg, et nécessaire à l'induction d'une conformation activatrice de l'ATPase, ou au recrutement d'un 2^d ligand de TCRγ9δ2. La dimérisation de BTN3A1 (en particulier dimère 1) pourrait permettre une certaine agrégation/recrutement de différents acteurs moléculaires. Une partie de ces acteurs, spécifiquement exprimés dans les cellules de primates, restent à être identifiés.

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence le rôle clef de BTN3 dans l'activation des LTγ9δ2 par des cellules cibles traitées par des anti-BTN3 ou des PAg. Malheureusement, les modalités précises de l'action des PAg et des anti-BTN3 sur les cellules cibles humaines sont encore peu claires, et seuls quelques acteurs moléculaires pouvant participer à un éventuel processus de remodellement surfacique des cellules cibles sous l'effet des PAg et des anti-BTN3 ont été proposés. Finalement, l'ensemble des résultats obtenus jusqu'à présent ont apporté très peu de données clairement interprétables d'un point de vue mécanistique. Ces observations ont surtout donné lieu à un certain nombre de modèles hypothétiques et de pistes de recherches qui seront explorées dans un proche avenir.

3) Pertinence physiologique par rapport au cancer et utilisation thérapeutique des anti-btn3.

Ce projet de recherche fondamentale avait à l'origine pour objectif, la caractérisation plus précise de la sous-population de LT γ 9 δ 2, déjà connue pour son fort potentiel immuno-thérapeutique anti-tumoral, et actuellement utilisée dans divers essais impliquant des agonistes γ 9 δ 2 de grade clinique comme les ABP ou des PAg synthétiques (Intro ChapII II 3c). Au cours de ce travail de recherche, nous avons mis en évidence le rôle clé de la famille de protéines BTN3 dans l'action des ABP et des PAg, et caractérisé une série de réactifs capables de court-circuiter l'action de ces agonistes, soit en activant les LT γ 9 δ 2 en absence de PAg (anti-BTN3 #20.1), soit en empêchant l'activation de ces cellules par les PAg (anti-BTN3 #103.2). Ces résultats ouvrent d'importantes perspectives immunothérapeutiques, notamment dans le domaine de la lutte contre le cancer.

En effet, malgré une amplification efficace des LT γ 9 δ 2 *in vitro* et *ex vivo*, l'efficacité thérapeutique anti-tumorale des traitements actuellement disponibles reste relativement faible d'après l'ensemble des essais cliniques achevés jusqu'à présent (Intro ChapII II 3c). En particulier, la reconnaissance des cellules tumorales par les LT γ 9 δ 2 *in vivo* nécessite d'être améliorée. La plupart des cellules tumorales sont naturellement mal reconnues par les LT γ 9 δ 2 *in vitro*, et si cette reconnaissance peut être améliorée par le traitement de ces cellules par les ABP *in vitro*, certaines tumeurs résistent à l'action de cet inhibiteur pharmacologique. De plus, la reconnaissance efficace des cellules tumorales nécessite de fortes doses d'ABP, difficilement atteintes *in vivo*, et dont l'action ne se limite pas aux cellules tumorales.

Ce travail de recherche a permis de mettre en évidence l'existence d'un lien éventuel entre le profil d'expression des différentes isoformes de BTN3 dans des lignées tumorales, et leur susceptibilité à la reconnaissance et la lyse par les LT γ 9 δ 2 en présence de PAg. En effet, l'unique isoforme de BTN3 (BTN3A1 pourvu d'un domaine B30.2) capable d'induire une reconnaissance de cellules cibles après traitement par les ABP est visiblement peu exprimée relativement aux isoformes non fonctionnels, et son expression pourrait être finement régulée (Intro ChapIII II 1). Le profil d'expression de cet isoforme dans différents contextes physiopathologiques et

en particulier dans différents types de tumeurs n'a pas encore été exploré, mais un déficit d'expression de cet isoforme par certaines tumeurs pourrait expliquer l'inefficacité du traitement ABP à induire leur reconnaissance par les LT γ 9 δ 2. Ainsi, l'analyse du profil d'expression de cet isoforme pourrait, à terme, permettre d'appréhender plus directement la pertinence des essais immunothérapeutiques impliquant les LT γ 9 δ 2 et les PAg dans différents types de cancers.

D'autre part, ce projet a permis de développer et caractériser des réactifs à fort potentiel immunothérapeutique. En effet, les anticorps anti-BTN3 agonistes sont capables de déclencher le même type de réponses de la part des LT γ 9 δ 2 que les ABP ou les PAg actuellement utilisés en clinique. En outre, le potentiel d'utilisation des anti-BTN3 agonistes est beaucoup plus large que celui des ABP, puisque ces anticorps sont capables d'entraîner la lyse par les LT γ 9 δ 2 de toutes les cellules tumorales, y compris celles qui résistent à l'action des ABP (non montré) (résistance par sous-expression de la voie MVA ou de l'isoforme BTN3A1-B30.2). Les anti-BTN3 antagonistes, quant à eux, pourraient permettre d'inhiber spécifiquement les réponses γ 9 δ 2, lorsqu'elle s'avèrent délétères. Le potentiel immunothérapeutique de ces réactifs, déjà démontré *in vitro*, est actuellement évalué *in vivo*, chez la souris, dans des modèles de transfert adoptifs de tumeurs humaines. Par ailleurs, le développement de réactifs dérivés d'anti-BTN3 agonistes permettant un ciblage spécifique des cellules tumorales est actuellement envisagé dans l'équipe, par la génération d'Ac bispécifiques ciblant des Ag de tumeurs en plus des BTN3.

Par ailleurs, les mécanismes d'action des PAg et des anti-BTN3 sont encore mal compris, et contrairement aux hypothèses initialement formulées, ces deux types d'activation ne semblent pas tout à fait similaires. En effet, les anti-BTN3 ne semblent capables de reproduire qu'une partie des mécanismes induits par l'action des PAg (Résult Chap II 2), et l'effet des anti-BTN3 sur l'activation des LT γ 9 δ 2 est sous optimal voire clairement délétère comparé à celui des PAg (Résult ChapII II 2). Dans le cas d'une utilisation des anti-BTN3 à des fins thérapeutiques, les paramètres régissant l'efficacité des activations γ 9 δ 2 par les anti-BTN3 agonistes, qui semblent impliquer à la fois des acteurs moléculaires exprimés par les cellules cibles et par les LT γ 9 δ 2, devront être étudiés en détail afin de minimiser les éventuels effets délétères des anti-BTN3. En particulier, si l'utilisation d'anti-BTN3 pourrait

notablement améliorer le ciblage anti-tumoral des traitements impliquants les LT γ 9 δ 2, ils ne s'y substitueront probablement pas. En effet, les approches visant à évaluer l'efficacité des anti-BTN3 au cours du processus d'amplification des LT γ 9 δ 2 a révélé une prolifération sous-optimale des LT γ 9 δ 2, aboutissant à la génération de populations faiblement répondeuses voire anergiques (non montré). Ces réactifs pourraient donc seulement être utilisés en phase finale de traitement, suite à une amplification des LT γ 9 δ 2 par les techniques déjà utilisées en clinique (PAg, ABP, Intro ChapII II 3c).

Bibliographie

- 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.
- Adams, E.J., Strop, P., Shin, S., Chien, Y.H., and Garcia, K.C. (2008). An autonomous CDR3delta is sufficient for recognition of the nonclassical MHC class I molecules T10 and T22 by gammadelta T cells. *Nat Immunol* 9, 777-784.
- Alard, J.E., Hillion, S., Guillevin, L., Saraux, A., Pers, J.O., Youinou, P., and Jamin, C. (2011). Autoantibodies to endothelial cell surface ATP synthase, the endogenous receptor for hsp60, might play a pathogenic role in vasculitides. *PLoS One* 6, e14654.
- Allison, T.J., Winter, C.C., Fournie, J.J., Bonneville, M., and Garboczi, D.N. (2001). Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* 411, 820-824.
- Altincicek, B., Moll, J., Campos, N., Foerster, G., Beck, E., Hoeffler, J.F., Grosdemange-Billiard, C., Rodriguez-Concepcion, M., Rohmer, M., Boronat, A., *et al.* (2001). 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* 166, 3655-3658.
- Arnett, H.A., Escobar, S.S., Gonzalez-Suarez, E., Budelsky, A.L., Steffen, L.A., Boiani, N., Zhang, M., Siu, G., Brewer, A.W., and Viney, J.L. (2007). BTNL2, a butyrophilin/B7-like molecule, is a negative costimulatory molecule modulated in intestinal inflammation. *J Immunol* 178, 1523-1533.
- Arnett, H.A., Escobar, S.S., and Viney, J.L. (2009). Regulation of costimulation in the era of butyrophilins. *Cytokine* 46, 370-375.
- Aydintug, M.K., Roark, C.L., Yin, X., Wands, J.M., Born, W.K., and O'Brien, R.L. (2004). Detection of cell surface ligands for the gamma delta TCR using soluble TCRs. *J Immunol* 172, 4167-4175.
- Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., Okumura, K., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Somoza, C. (1993). B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 366, 76-79.
- Banghart, L.R., Chamberlain, C.W., Velarde, J., Korobko, I.V., Ogg, S.L., Jack, L.J., Vakharia, V.N., and Mather, I.H. (1998). Butyrophilin is expressed in mammary epithelial cells from a single-sized messenger RNA as a type I membrane glycoprotein. *J Biol Chem* 273, 4171-4179.
- Bank, I., Book, M., Huszar, M., Baram, Y., Schnirer, I., and Brenner, H. (1993). 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* 67, 17-24.
- Bank, I., DePinho, R.A., Brenner, M.B., Cassimeris, J., Alt, F.W., and Chess, L. (1986). A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes. *Nature* 322, 179-181.
- Barbee, S.D., Woodward, M.J., Turchinovich, G., Mention, J.J., Lewis, J.M., Boyden, L.M., Lifton, R.P., Tigelaar, R., and Hayday, A.C. (2011). Skint-1 is a highly specific, unique selecting component for epidermal T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3330-3335.
- Barclay, A.N. (2003). Membrane proteins with immunoglobulin-like domains--a master superfamily of interaction molecules. *Semin Immunol* 15, 215-223.
- Belmant, C., Espinosa, E., Halary, F., Tang, Y., Peyrat, M.A., Sicard, H., Kozikowski, A., Buelow, R., Poupot, R., Bonneville, M., and Fournie, J.J. (2000). A chemical basis for selective recognition of nonpeptide antigens by human delta T cells. *FASEB J* 14, 1669-1670.
- Belmant, C., Espinosa, E., Poupot, R., Peyrat, M.A., Guiraud, M., Poquet, Y., Bonneville, M., and Fournie, J.J. (1999). 3-Formyl-1-butyl pyrophosphate A novel mycobacterial metabolite-activating human gammadelta T cells. *J Biol Chem* 274, 32079-32084.

Bendelac, A., Bonneville, M., and Kearney, J.F. (2001). Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 1, 177-186.

Bennouna, J., Bompas, E., Neidhardt, E.M., Rolland, F., Philip, I., Galea, C., Salot, S., Saiagh, S., Audrain, M., Rimbert, M., *et al.* (2008). Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 57, 1599-1609.

Bernard, D., Hansen, J.D., Du Pasquier, L., Lefranc, M.P., Benmansour, A., and Boudinot, P. (2007). Costimulatory receptors in jawed vertebrates: conserved CD28, odd CTLA4 and multiple BTLAs. *Dev Comp Immunol* 31, 255-271.

Bertrand, G., Duprat, E., Lefranc, M.P., Marti, J., and Coste, J. (2004). Characterization of human FCGR3B*02 (HNA-1b, NA2) cDNAs and IMGT standardized description of FCGR3B alleles. *Tissue Antigens* 64, 119-131.

Bluestone, J.A., Cron, R.Q., Cotterman, M., Houlden, B.A., and Matis, L.A. (1988). Structure and specificity of T cell receptor gamma/delta on major histocompatibility complex antigen-specific CD3+, CD4-, CD8- T lymphocytes. *J Exp Med* 168, 1899-1916.

Bonneville, M., and Fournie, J.J. (2005). Sensing cell stress and transformation through Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of the isoprenoid pathway metabolites. *Microbes Infect* 7, 503-509.

Bonneville, M., O'Brien, R.L., and Born, W.K. (2010). Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 10, 467-478.

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.

Boonen, S., Body, J.J., Boutsen, Y., Devogelaer, J.P., Goemaere, S., Kaufman, J.M., Rozenberg, S., and Reginster, J.Y. (2005). Evidence-based guidelines for the treatment of postmenopausal osteoporosis: a consensus document of the Belgian Bone Club. *Osteoporos Int* 16, 239-254.

Born, W.K., Vollmer, M., Reardon, C., Matsuura, E., Voelker, D.R., Giclas, P.C., and O'Brien, R.L. (2003). Hybridomas expressing gammadelta T-cell receptors respond to cardiolipin and beta2-glycoprotein 1 (apolipoprotein H). *Scand J Immunol* 58, 374-381.

Boyden, L.M., Lewis, J.M., Barbee, S.D., Bas, A., Girardi, M., Hayday, A.C., Tigelaar, R.E., and Lifton, R.P. (2008). Skint1, the prototype of a newly identified immunoglobulin superfamily gene cluster, positively selects epidermal gammadelta T cells. *Nat Genet* 40, 656-662.

Brandes, M., Willimann, K., Bioley, G., Levy, N., Eberl, M., Luo, M., Tampe, R., Levy, F., Romero, P., and Moser, B. (2009). Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2307-2312.

Brandes, M., Willimann, K., Lang, A.B., Nam, K.H., Jin, C., Brenner, M.B., Morita, C.T., and Moser, B. (2003). Flexible migration program regulates gamma delta T-cell involvement in humoral immunity. *Blood* 102, 3693-3701.

Brandes, M., Willimann, K., and Moser, B. (2005). Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science* 309, 264-268.

Braud, V.M., Allan, D.S., and McMichael, A.J. (1999). Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules. *Curr Opin Immunol* 11, 100-108.

Braza, M.S., Caraux, A., Rousset, T., Lafaye de Micheaux, S., Sicard, H., Squiban, P., Costes, V., Klein, B., and Rossi, J.F. (2010). gammadelta T lymphocytes count is normal and expandable in peripheral blood of patients with follicular lymphoma, whereas it is decreased in tumor lymph nodes compared with inflammatory lymph nodes. *J Immunol* 184, 134-140.

- Bukowski, J.F., Morita, C.T., and Brenner, M.B. (1999). Human gamma delta T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implications for innate immunity. *Immunity* 11, 57-65.
- Campbell, D.G., Williams, A.F., Bayley, P.M., and Reid, K.B. (1979). Structural similarities between Thy-1 antigen from rat brain and immunoglobulin. *Nature* 282, 341-342.
- Carding, S.R., and Egan, P.J. (2002). Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2, 336-345.
- Casetti, R., Perretta, G., Taglioni, A., Mattei, M., Colizzi, V., Dieli, F., D'Offizi, G., Malkovsky, M., and Poccia, F. (2005). Drug-induced expansion and differentiation of V gamma 9V delta 2 T cells in vivo: the role of exogenous IL-2. *J Immunol* 175, 1593-1598.
- Catros, V., Toutirais, O., Bouet, F., Cabillic, F., Desille, M., and Fournie, J.J. (2010). [Tgammadelta lymphocytes in oncology: unconventional killer lymphocytes]. *Med Sci (Paris)* 26, 185-191.
- Chae, J.J., Wood, G., Masters, S.L., Richard, K., Park, G., Smith, B.J., and Kastner, D.L. (2006). The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1beta production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9982-9987.
- Champagne, E. (2011). gammadelta T cell receptor ligands and modes of antigen recognition. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 59, 117-137.
- Champagne, E., Martinez, L.O., Collet, X., and Barbaras, R. (2006). Ecto-F1Fo ATP synthase/F1 ATPase: metabolic and immunological functions. *Curr Opin Lipidol* 17, 279-284.
- Chen, J., Niu, H., He, W., and Ba, D. (2001a). Antitumor activity of expanded human tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes. *Int Arch Allergy Immunol* 125, 256-263.
- Chen, Z.W., Li, Y., Zeng, X., Kuroda, M.J., Schmitz, J.E., Shen, Y., Lai, X., Shen, L., and Letvin, N.L. (2001b). The TCR repertoire of an immunodominant CD8+ T lymphocyte population. *J Immunol* 166, 4525-4533.
- Chien, Y.H., and Konigshofer, Y. (2007). Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunol Rev* 215, 46-58.
- Choudhary, A., Davodeau, F., Moreau, A., Peyrat, M.A., Bonneville, M., and Jotereau, F. (1995). Selective lysis of autologous tumor cells by recurrent gamma delta tumor-infiltrating lymphocytes from renal carcinoma. *J Immunol* 154, 3932-3940.
- Ciccone, E., Viale, O., Pende, D., Malnati, M., Battista Ferrara, G., Barocci, S., Moretta, A., and Moretta, L. (1989). Specificity of human T lymphocytes expressing a gamma/delta T cell antigen receptor. Recognition of a polymorphic determinant of HLA class I molecules by a gamma/delta clone. *Eur J Immunol* 19, 1267-1271.
- Clark, S.P., Arden, B., Kabelitz, D., and Mak, T.W. (1995). Comparison of human and mouse T-cell receptor variable gene segment subfamilies. *Immunogenetics* 42, 531-540.
- Collins, M., Ling, V., and Carreno, B.M. (2005). The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol* 6, 223.
- Compte, E., Pontarotti, P., Collette, Y., Lopez, M., and Olive, D. (2004). Frontline: Characterization of BT3 molecules belonging to the B7 family expressed on immune cells. *Eur J Immunol* 34, 2089-2099.
- Constant, P., Davodeau, F., Peyrat, M.A., Poquet, Y., Puzo, G., Bonneville, M., and Fournie, J.J. (1994). Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 264, 267-270.

Correia, D.V., d'Orey, F., Cardoso, B.A., Lanca, T., Grosso, A.R., deBarros, A., Martins, L.R., Barata, J.T., and Silva-Santos, B. (2009). 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* 4, e5657.

Corvaisier, M., Moreau-Aubry, A., Diez, E., Bennouna, J., Mosnier, J.F., Scotet, E., Bonneville, M., and Jotereau, F. (2005). V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol* 175, 5481-5488.

Couzi, L., Levaillant, Y., Jamaï, A., Pitard, V., Lassalle, R., Martin, K., Garrigue, I., Hawchar, O., Siberchicot, F., Moore, N., *et al.* (2010). Cytomegalovirus-induced gammadelta T cells associate with reduced cancer risk after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 21, 181-188.

Crowley, M.P., Fahrner, A.M., Baumgarth, N., Hampl, J., Gutgemann, I., Teyton, L., and Chien, Y. (2000). A population of murine gammadelta T cells that recognize an inducible MHC class Ib molecule. *Science* 287, 314-316.

Cubillos-Ruiz, J.R., Martinez, D., Scarlett, U.K., Rutkowski, M.R., Nesbeth, Y.C., Camposeco-Jacobs, A.L., and Conejo-Garcia, J.R. (2010). CD277 is a negative co-stimulatory molecule universally expressed by ovarian cancer microenvironmental cells. *Oncotarget* 1, 329-338.

Das, H., Sugita, M., and Brenner, M.B. (2004). Mechanisms of Vdelta1 gammadelta T cell activation by microbial components. *J Immunol* 172, 6578-6586.

Das, H., Wang, L., Kamath, A., and Bukowski, J.F. (2001). Vgamma2Vdelta2 T-cell receptor-mediated recognition of aminobisphosphonates. *Blood* 98, 1616-1618.

Daubenberger, C.A., Salomon, M., Vecino, W., Hubner, B., Troll, H., Rodriques, R., Patarroyo, M.E., and Pluschke, G. (2001). Functional and structural similarity of V gamma 9V delta 2 T cells in humans and Aotus monkeys, a primate infection model for Plasmodium falciparum malaria. *J Immunol* 167, 6421-6430.

Davis, M.M., Boniface, J.J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B., and Chien, Y. (1998). Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16, 523-544.

Davodeau, F., Peyrat, M.A., Hallet, M.M., Houde, I., Vie, H., and Bonneville, M. (1993). Peripheral selection of antigen receptor junctional features in a major human gamma delta subset. *Eur J Immunol* 23, 804-808.

De Rosa, S.C., Andrus, J.P., Perfetto, S.P., Mantovani, J.J., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A., and Roederer, M. (2004). Ontogeny of gamma delta T cells in humans. *J Immunol* 172, 1637-1645.

de Saint-Vis, B., Bouchet, C., Gautier, G., Valladeau, J., Caux, C., and Garrone, P. (2003). Human dendritic cells express neuronal Eph receptor tyrosine kinases: role of EphA2 in regulating adhesion to fibronectin. *Blood* 102, 4431-4440.

Dechanet, J., Merville, P., Berge, F., Bone-Mane, G., Taupin, J.L., Michel, P., Joly, P., Bonneville, M., Potaux, L., and Moreau, J.F. (1999). Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. *J Infect Dis* 179, 1-8.

Devaud, C., Bilhere, E., Loizon, S., Pitard, V., Behr, C., Moreau, J.F., Dechanet-Merville, J., and Capone, M. (2009). Antitumor activity of gammadelta T cells reactive against cytomegalovirus-infected cells in a mouse xenograft tumor model. *Cancer Res* 69, 3971-3978.

Devilder, M.C., Maillet, S., Bouyge-Moreau, I., Donnadieu, E., Bonneville, M., and Scotet, E. (2006). 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* 176, 1386-1393.

Dieli, F., Troye-Blomberg, M., Ivanyi, J., Fournie, J.J., Krensky, A.M., Bonneville, M., Peyrat, M.A., Caccamo, N., Sireci, G., and Salerno, A. (2001). Granulysin-dependent killing of intracellular and

extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *J Infect Dis* 184, 1082-1085.

Dieli, F., Vermijlen, D., Fulfaro, F., Caccamo, N., Meraviglia, S., Cicero, G., Roberts, A., Buccheri, S., D'Asaro, M., Gebbia, N., *et al.* (2007). Targeting human {gamma}delta T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 67, 7450-7457.

Dudal, S., Turriere, C., Bessoles, S., Fontes, P., Sanchez, F., Liautard, J., Liautard, J.P., and Lafont, V. (2006). Release of LL-37 by activated human Vgamma9Vdelta2 T cells: a microbicidal weapon against *Brucella suis*. *J Immunol* 177, 5533-5539.

Easty, D.J., Guthrie, B.A., Maung, K., Farr, C.J., Lindberg, R.A., Toso, R.J., Herlyn, M., and Bennett, D.C. (1995). Protein B61 as a new growth factor: expression of B61 and up-regulation of its receptor epithelial cell kinase during melanoma progression. *Cancer Res* 55, 2528-2532.

Eberl, M., Altincicek, B., Kollas, A.K., Sanderbrand, S., Bahr, U., Reichenberg, A., Beck, E., Foster, D., Wiesner, J., Hintz, M., and Jomaa, H. (2002). Accumulation of a potent gammadelta T-cell stimulator after deletion of the *lytB* gene in *Escherichia coli*. *Immunology* 106, 200-211.

Ehl, S., Schwarz, K., Enders, A., Duffner, U., Pannicke, U., Kuhr, J., Mascart, F., Schmitt-Graeff, A., Niemeyer, C., and Fisch, P. (2005). A variant of SCID with specific immune responses and predominance of gamma delta T cells. *J Clin Invest* 115, 3140-3148.

Elliott, J.F., Rock, E.P., Patten, P.A., Davis, M.M., and Chien, Y.H. (1988). The adult T-cell receptor delta-chain is diverse and distinct from that of fetal thymocytes. *Nature* 331, 627-631.

Espinosa, E., Belmant, C., Pont, F., Luciani, B., Poupot, R., Romagne, F., Brailly, H., Bonneville, M., and Fournie, 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.

Evans, P.S., Enders, P.J., Yin, C., Ruckwardt, T.J., Malkovsky, M., and Pauza, C.D. (2001). In vitro stimulation with a non-peptidic alkylphosphate expands cells expressing Vgamma2-Jgamma1.2/Vdelta2 T-cell receptors. *Immunology* 104, 19-27.

Fisch, P., Malkovsky, M., Kovats, S., Sturm, E., Braakman, E., Klein, B.S., Voss, S.D., Morrissey, L.W., DeMars, R., Welch, W.J., and *et al.* (1990). Recognition by human V gamma 9/V delta 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science* 250, 1269-1273.

Fleisch, H. (2002). Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res* 4, 30-34.

Garapati, V.P., and Lefranc, M.P. (2007). 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* 31, 1050-1072.

Garbe, A.I., and von Boehmer, H. (2007). TCR and Notch synergize in alphabeta versus gammadelta lineage choice. *Trends Immunol* 28, 124-131.

Garboczi, D.N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q.R., Biddison, W.E., and Wiley, D.C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384, 134-141.

Garcia, K.C., Degano, M., Stanfield, R.L., Brunmark, A., Jackson, M.R., Peterson, P.A., Teyton, L., and Wilson, I.A. (1996). An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 274, 209-219.

Girardi, M., Oppenheim, D.E., Steele, C.R., Lewis, J.M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R.E., and Hayday, A.C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294, 605-609.

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.

Gomes, A.Q., Martins, D.S., and Silva-Santos, B. (2011). Targeting gammadelta T lymphocytes for cancer immunotherapy: from novel mechanistic insight to clinical application. *Cancer Res* 70, 10024-10027.

Green, A.E., Lissina, A., Hutchinson, S.L., Hewitt, R.E., Temple, B., James, D., Boulter, J.M., Price, D., and Sewell, A.K. (2004). Recognition of nonpeptide antigens by human V gamma 9V delta 2 T cells requires contact with cells of human origin. *Clin Exp Immunol* 136, 472-482.

Greenwald, R.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2005). The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23, 515-548.

Groh, V., Steinle, A., Bauer, S., and Spies, T. (1998). Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 279, 1737-1740.

Grutter, C., Briand, C., Capitani, G., Mittl, P.R., Papin, S., Tschopp, J., and Grutter, M.G. (2006). Structure of the PRYSPRY-domain: implications for autoinflammatory diseases. *FEBS Lett* 580, 99-106.

Guggenmos, J., Schubart, A.S., Ogg, S., Andersson, M., Olsson, T., Mather, I.H., and Linington, C. (2004). Antibody cross-reactivity between myelin oligodendrocyte glycoprotein and the milk protein butyrophilin in multiple sclerosis. *J Immunol* 172, 661-668.

Halary, F., Pitard, V., Dlubek, D., Krzysiek, R., de la Salle, H., Merville, P., Dromer, C., Emilie, D., Moreau, J.F., and Dechanet-Merville, J. (2005). Shared reactivity of V{delta}2(neg) {gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 201, 1567-1578.

Hamada, S., Umemura, M., Shiono, T., Tanaka, K., Yahagi, A., Begum, M.D., Oshiro, K., Okamoto, Y., Watanabe, H., Kawakami, K., *et al.* (2008). IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against listeria monocytogenes infection in the liver. *J Immunol* 181, 3456-3463.

Harwood, H.J., Jr., Alvarez, I.M., Noyes, W.D., and Stacpoole, P.W. (1991). 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* 32, 1237-1252.

Havran, W.L., Chien, Y.H., and Allison, J.P. (1991). Recognition of self antigens by skin-derived T cells with invariant gamma delta antigen receptors. *Science* 252, 1430-1432.

Hayday, A.C. (2009). Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity* 31, 184-196.

Hayes, S.M., and Love, P.E. (2007). A retrospective on the requirements for gammadelta T-cell development. *Immunol Rev* 215, 8-14.

Heilig, J.S., and Tonegawa, S. (1986). Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes. *Nature* 322, 836-840.

Henry, J., Mather, I.H., McDermott, M.F., and Pontarotti, P. (1998). B30.2-like domain proteins: update and new insights into a rapidly expanding family of proteins. *Mol Biol Evol* 15, 1696-1705.

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.

Hochstenbach, F., and Brenner, M.B. (1990). Newly identified gamma delta and beta delta T-cell receptors. *J Clin Immunol* 10, 1-18.

Holoshitz, J., Vila, L.M., Keroack, B.J., McKinley, D.R., and Bayne, N.K. (1992). Dual antigenic recognition by cloned human gamma delta T cells. *J Clin Invest* 89, 308-314.

Horton, R., Wilming, L., Rand, V., Lovering, R.C., Bruford, E.A., Khodiyar, V.K., Lush, M.J., Povey, S., Talbot, C.C., Jr., Wright, M.W., *et al.* (2004). Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* 5, 889-899.

Hosking, D. (2006). Pharmacological therapy of Paget's and other metabolic bone diseases. *Bone* 38, S3-7.

Huck, S., Dariavach, P., and Lefranc, M.P. (1988). Variable region genes in the human T-cell rearranging gamma (TRG) locus: V-J junction and homology with the mouse genes. *Embo J* 7, 719-726.

Hunkapiller, T., and Hood, L. (1989). Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. *Adv Immunol* 44, 1-63.

Ishii, T., Aoki, N., Noda, A., Adachi, T., Nakamura, R., and Matsuda, T. (1995). Carboxy-terminal cytoplasmic domain of mouse butyrophilin specifically associates with a 150-kDa protein of mammary epithelial cells and milk fat globule membrane. *Biochim Biophys Acta* 1245, 285-292.

Ito, K., Van Kaer, L., Bonneville, M., Hsu, S., Murphy, D.B., and Tonegawa, S. (1990). Recognition of the product of a novel MHC TL region gene (27b) by a mouse gamma delta T cell receptor. *Cell* 62, 549-561.

Jack, L.J., and Mather, I.H. (1990). 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* 265, 14481-14486.

James, L.C., Keeble, A.H., Khan, Z., Rhodes, D.A., and Trowsdale, J. (2007). Structural basis for PRYSPRY-mediated tripartite motif (TRIM) protein function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6200-6205.

Jameson, J., and Havran, W.L. (2007). Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol Rev* 215, 114-122.

Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (1998). Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol* 10, 349-350.

Javanbakht, H., Yuan, W., Yeung, D.F., Song, B., Diaz-Griffero, F., Li, Y., Li, X., Stremlau, M., and Sodroski, J. (2006). Characterization of TRIM5alpha trimerization and its contribution to human immunodeficiency virus capsid binding. *Virology* 353, 234-246.

Jensen, K.D., Su, X., Shin, S., Li, L., Youssef, S., Yamasaki, S., Steinman, L., Saito, T., Locksley, R.M., Davis, M.M., *et al.* (2008). Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma. *Immunity* 29, 90-100.

Jeong, J., Rao, A.U., Xu, J., Ogg, S.L., Hathout, Y., Fenselau, C., and Mather, I.H. (2009). 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* 284, 22444-22456.

Johnson, R.M., Lancki, D.W., Sperling, A.I., Dick, R.F., Spear, P.G., Fitch, F.W., and Bluestone, J.A. (1992). A murine CD4-, CD8- T cell receptor-gamma delta T lymphocyte clone specific for herpes simplex virus glycoprotein I. *J Immunol* 148, 983-988.

Jomaa, H., Feurle, J., Luhs, K., Kunzmann, V., Tony, H.P., Herderich, M., and Wilhelm, M. (1999). 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* 25, 371-378.

Kaas, Q., Ehrenmann, F., and Lefranc, M.P. (2007). IG, TR and IgSF, MHC and MhcSF: what do we learn from the IMGT Colliers de Perles? *Brief Funct Genomic Proteomic* 6, 253-264.

Kaas, Q., and Lefranc, M.P. (2005). T cell receptor/peptide/MHC molecular characterization and standardized pMHC contact sites in IMGT/3Dstructure-DB. *In Silico Biol* 5, 505-528.

Kar, A.K., Mao, Y., Bird, G., Walensky, L., and Sodroski, J. (2011). Characterization of a core fragment of the rhesus monkey TRIM5alpha protein. *BMC Biochem* 12, 1.

Kato, Y., Tanaka, Y., Hayashi, M., Okawa, K., and Minato, N. (2006). Involvement of CD166 in the activation of human gamma delta T cells by tumor cells sensitized with nonpeptide antigens. *J Immunol* 177, 877-884.

Kato, Y., Tanaka, Y., Tanaka, H., Yamashita, S., and Minato, N. (2003). Requirement of species-specific interactions for the activation of human gamma delta T cells by pamidronate. *J Immunol* 170, 3608-3613.

Kazen, A.R., and Adams, E.J. (2011). Evolution of the V, D, and J gene segments used in the primate gammadelta T-cell receptor reveals a dichotomy of conservation and diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, E332-340.

Kistowska, M., Rossy, E., Sansano, S., Gober, H.J., Landmann, R., Mori, L., and De Libero, G. (2008). Dysregulation of the host mevalonate pathway during early bacterial infection activates human TCR gamma delta cells. *Eur J Immunol* 38, 2200-2209.

Klein, J. (1986). Seeds of time: fifty years ago Peter A. Gorer discovered the H-2 complex. *Immunogenetics* 24, 331-338.

Kong, Y., Cao, W., Xi, X., Ma, C., Cui, L., and He, W. (2009). The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCRgamma9/delta2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCRgammadelta and NKG2D. *Blood* 114, 310-317.

Koulova, L., Clark, E.A., Shu, G., and Dupont, B. (1991). The CD28 ligand B7/BB1 provides costimulatory signal for alloactivation of CD4+ T cells. *J Exp Med* 173, 759-762.

Krangel, M.S., Yssel, H., Brocklehurst, C., and Spits, H. (1990). 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* 172, 847-859.

Kress, E., Hedges, J.F., and Jutila, M.A. (2006). Distinct gene expression in human Vdelta1 and Vdelta2 gammadelta T cells following non-TCR agonist stimulation. *Mol Immunol* 43, 2002-2011.

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.

Kunzmann, V., Bauer, E., and Wilhelm, M. (1999). Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *N Engl J Med* 340, 737-738.

Lafarge, X., Merville, P., Cazin, M.C., Berge, F., Potaux, L., Moreau, J.F., and Dechanet-Merville, J. (2001). Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis* 184, 533-541.

Lafont, V., Liautard, J., Sable-Teychene, M., Sainte-Marie, Y., and Favero, J. (2001). 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* 276, 15961-15967.

- Lang, F., Peyrat, M.A., Constant, P., Davodeau, F., David-Ameline, J., Poquet, Y., Vie, H., Fournie, 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.
- Lauritsen, J.P., Haks, M.C., Lefebvre, J.M., Kappes, D.J., and Wiest, D.L. (2006). Recent insights into the signals that control alphabeta/gammadelta-lineage fate. *Immunol Rev* **209**, 176-190.
- Lefranc, M.P. (2005). IMGT, the international ImMunoGeneTics information system: a standardized approach for immunogenetics and immunoinformatics. *Immunome Res* **1**, 3.
- Lefranc, M.P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Bodmer, J., Muller, W., Bontrop, R., Lemaitre, M., Malik, A., Barbie, V., and Chaume, D. (1999). IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* **27**, 209-212.
- Lefranc, M.P., and Rabbitts, T.H. (1990). A nomenclature to fit the organization of the human T-cell receptor gamma and delta genes. *Res Immunol* **141**, 615-618.
- Lewis, J.M., Girardi, M., Roberts, S.J., Barbee, S.D., Hayday, A.C., and Tigelaar, R.E. (2006). Selection of the cutaneous intraepithelial gammadelta+ T cell repertoire by a thymic stromal determinant. *Nat Immunol* **7**, 843-850.
- Li, H., Lebedeva, M.I., Llera, A.S., Fields, B.A., Brenner, M.B., and Mariuzza, R.A. (1998). Structure of the Vdelta domain of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* **391**, 502-506.
- Li, J., Herold, M.J., Kimmel, B., Muller, I., Rincon-Orozco, B., Kunzmann, V., and Herrmann, T. (2009). Reduced expression of the mevalonate pathway enzyme farnesyl pyrophosphate synthase unveils recognition of tumor cells by Vgamma9Vdelta2 T cells. *J Immunol* **182**, 8118-8124.
- Li, L., and Wu, C.Y. (2008). CD4+ CD25+ Treg cells inhibit human memory gammadelta T cells to produce IFN-gamma in response to M tuberculosis antigen ESAT-6. *Blood* **111**, 5629-5636.
- Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L.S., Damle, N.K., and Ledbetter, J.A. (1991). CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* **174**, 561-569.
- Linsley, P.S., Peach, R., Gladstone, P., and Bajorath, J. (1994). Extending the B7 (CD80) gene family. *Protein Sci* **3**, 1341-1343.
- MacDougall, A., Enders, P., Hatfield, G., Pauza, D., and Rakasz, E. (2001). V gamma 2 TCR repertoire overlap in different anatomical compartments of healthy, unrelated rhesus macaques. *J Immunol* **166**, 2296-2302.
- Malcherek, G., Mayr, L., Roda-Navarro, P., Rhodes, D., Miller, N., and Trowsdale, J. (2007). The B7 homolog butyrophilin BTN2A1 is a novel ligand for DC-SIGN. *J Immunol* **179**, 3804-3811.
- Malkovska, V., Cigel, F.K., Armstrong, N., Storer, B.E., and Hong, R. (1992). Antilymphoma activity of human gamma delta T-cells in mice with severe combined immune deficiency. *Cancer Res* **52**, 5610-5616.
- Marcu-Malina, V., Heijhuurs, S., van Buuren, M., Hartkamp, L., Strand, S., Sebestyen, Z., Scholten, K., Martens, A., and Kuball, J. (2011). Redirecting alphabeta T cells against cancer cells by transfer of a broadly tumor-reactive gammadeltaT-cell receptor. *Blood* **118**, 50-59.
- Martin, B., Hirota, K., Cua, D.J., Stockinger, B., and Veldhoen, M. (2009). Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* **31**, 321-330.
- Martinez, L.O., Jacquet, S., Esteve, J.P., Rolland, C., Cabezon, E., Champagne, E., Pineau, T., Georgeaud, V., Walker, J.E., Terce, F., *et al.* (2003). Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* **421**, 75-79.

Masters, S.L., Yao, S., Willson, T.A., Zhang, J.G., Palmer, K.R., Smith, B.J., Babon, J.J., Nicola, N.A., Norton, R.S., and Nicholson, S.E. (2006). The SPRY domain of SSB-2 adopts a novel fold that presents conserved Par-4-binding residues. *Nat Struct Mol Biol* 13, 77-84.

Mather, I.H., and Keenan, T.W. (1998). Origin and secretion of milk lipids. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3, 259-273.

Matis, L.A., Fry, A.M., Cron, R.Q., Cotterman, M.M., Dick, R.F., and Bluestone, J.A. (1989). Structure and specificity of a class II MHC alloreactive gamma delta T cell receptor heterodimer. *Science* 245, 746-749.

Meraviglia, S., Eberl, M., Vermijlen, D., Todaro, M., Buccheri, S., Cicero, G., La Mendola, C., Guggino, G., D'Asaro, M., Orlando, V., *et al.* (2010). In vivo manipulation of Vgamma9Vdelta2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. *Clin Exp Immunol* 161, 290-297.

Messal, N., Mamessier, E., Sylvain, A., Celis-Gutierrez, J., Thibult, M.L., Chetaille, B., Firaguay, G., Pastor, S., Guillaume, Y., Wang, Q., *et al.* (2011). Differential role for CD277 as co-regulator of the immune signal in T and NK cells. *Eur J Immunol*.

Miyagawa, F., Tanaka, Y., Yamashita, S., and Minato, N. (2001). Essential requirement of antigen presentation by monocyte lineage cells for the activation of primary human gamma delta T cells by aminobisphosphonate antigen. *J Immunol* 166, 5508-5514.

Monkkonen, H., Auriola, S., Lehenkari, P., Kellinsalmi, M., Hassinen, I.E., Vepsäläinen, J., and Monkkonen, J. (2006). 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* 147, 437-445.

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

Mookerjee-Basu, J., Vantourout, P., Martinez, L.O., Perret, B., Collet, X., Perigaud, C., Peyrottes, S., and Champagne, E. (2010). F1-adenosine triphosphatase displays properties characteristic of an antigen presentation molecule for Vgamma9Vdelta2 T cells. *J Immunol* 184, 6920-6928.

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.

Morita, C.T., Lee, H.K., Leslie, D.S., Tanaka, Y., Bukowski, J.F., and Marker-Hermann, E. (1999). Recognition of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens by human gammadelta T cells. *Microbes Infect* 1, 175-186.

Morita, C.T., Lee, H.K., Wang, H., Li, H., Mariuzza, R.A., and Tanaka, Y. (2001). Structural features of nonpeptide prenyl pyrophosphates that determine their antigenicity for human gamma delta T cells. *J Immunol* 167, 36-41.

Morita, C.T., Mariuzza, R.A., and Brenner, M.B. (2000). Antigen recognition by human gamma delta T cells: pattern recognition by the adaptive immune system. *Springer Semin Immunopathol* 22, 191-217.

Moser, B., and Eberl, M. (2007). gammadelta T cells: novel initiators of adaptive immunity. *Immunol Rev* 215, 89-102.

Mungall, A.J., Palmer, S.A., Sims, S.K., Edwards, C.A., Ashurst, J.L., Wilming, L., Jones, M.C., Horton, R., Hunt, S.E., Scott, C.E., *et al.* (2003). The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature* 425, 805-811.

- Nakajima, J., Murakawa, T., Fukami, T., Goto, S., Kaneko, T., Yoshida, Y., Takamoto, S., and Kakimi, K. (2010). A phase I study of adoptive immunotherapy for recurrent non-small-cell lung cancer patients with autologous gammadelta T cells. *Eur J Cardiothorac Surg* 37, 1191-1197.
- Nedellec, S., Sabourin, C., Bonneville, M., and Scotet, E. (2011). 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* 185, 55-63.
- Nemoto, T., Ohashi, K., Akashi, T., Johnson, J.D., and Hirokawa, K. (1997). Overexpression of protein tyrosine kinases in human esophageal cancer. *Pathobiology* 65, 195-203.
- Nepveu-Traversy, M.E., Bérubé, J., and Berthou, L. (2009). 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* 3.
- Nguyen, T., Liu, X.K., Zhang, Y., and Dong, C. (2006). BTNL2, a butyrophilin-like molecule that functions to inhibit T cell activation. *J Immunol* 176, 7354-7360.
- Niikura, T., Hashimoto, Y., Tajima, H., Ishizaka, M., Yamagishi, Y., Kawasumi, M., Nawa, M., Terashita, K., Aiso, S., and Nishimoto, I. (2003). A tripartite motif protein TRIM11 binds and destabilizes Humanin, a neuroprotective peptide against Alzheimer's disease-relevant insults. *Eur J Neurosci* 17, 1150-1158.
- Nowell, P.C. (1960). Differentiation of human leukemic leukocytes in tissue culture. *Exp Cell Res* 19, 267-277.
- Nurieva, R.I., Liu, X., and Dong, C. (2009). Yin-Yang of costimulation: crucial controls of immune tolerance and function. *Immunol Rev* 229, 88-100.
- Nussbaumer, O., Gruenbacher, G., Gander, H., and Thurnher, M. (2011). DC-like cell-dependent activation of human natural killer cells by the bisphosphonate zoledronic acid is regulated by gammadelta T lymphocytes. *Blood* 118, 2743-2751.
- O'Brien, R.L., Fu, Y.X., Cranfill, R., Dallas, A., Ellis, C., Reardon, C., Lang, J., Carding, S.R., Kubo, R., and Born, W. (1992). Heat shock protein Hsp60-reactive gamma delta cells: a large, diversified T-lymphocyte subset with highly focused specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4348-4352.
- O'Brien, R.L., Roark, C.L., Jin, N., Aydin, M.K., French, J.D., Chain, J.L., Wands, J.M., Johnston, M., and Born, W.K. (2007). gammadelta T-cell receptors: functional correlations. *Immunol Rev* 215, 77-88.
- Ogawa, K., Pasqualini, R., Lindberg, R.A., Kain, R., Freeman, A.L., and Pasquale, E.B. (2000). The ephrin-A1 ligand and its receptor, EphA2, are expressed during tumor neovascularization. *Oncogene* 19, 6043-6052.
- Ogg, S.L., Weldon, A.K., Dobbie, L., Smith, A.J., and Mather, I.H. (2004). 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* 101, 10084-10089.
- Panchamoorthy, G., McLean, J., Modlin, R.L., Morita, C.T., Ishikawa, S., Brenner, M.B., and Band, H. (1991). 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* 147, 3360-3369.
- Parker, C.M., Groh, V., Band, H., Porcelli, S.A., Morita, C., Fabbi, M., Glass, D., Strominger, J.L., and Brenner, M.B. (1990). Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *J Exp Med* 171, 1597-1612.
- Pasquale, E.B. (2008). Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 133, 38-52.
- Perry, C.M., and Figgitt, D.P. (2004). Zoledronic acid: a review of its use in patients with advanced cancer. *Drugs* 64, 1197-1211.

Pfeffer, K., Schoel, B., Plesnila, N., Lipford, G.B., Kromer, S., Deusch, K., and Wagner, H. (1992). A lectin-binding, protease-resistant mycobacterial ligand specifically activates V gamma 9+ human gamma delta T cells. *J Immunol* 148, 575-583.

Poccia, F., Agrati, C., Martini, F., Capobianchi, M.R., Wallace, M., and Malkovsky, M. (2005). Antiviral reactivities of gammadelta T cells. *Microbes Infect* 7, 518-528.

Poccia, F., Boullier, S., Lecoecur, H., Cochet, M., Poquet, Y., Colizzi, V., Fournie, J.J., and Gougeon, M.L. (1996). Peripheral V gamma 9/V delta 2 T cell deletion and anergy to nonpeptidic mycobacterial antigens in asymptomatic HIV-1-infected persons. *J Immunol* 157, 449-461.

Poljak, R.J., Amzel, L.M., Avey, H.P., Chen, B.L., Phizackerley, R.P., and Saul, F. (1973). Three-dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2,8-A resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 3305-3310.

Porcelli, S., Brenner, M.B., Greenstein, J.L., Balk, S.P., Terhorst, C., and Bleicher, P.A. (1989). Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4-CD8-cytolytic T lymphocytes. *Nature* 341, 447-450.

Radojkovic, C., Genoux, A., Pons, V., Combes, G., de Jonge, H., Champagne, E., Rolland, C., Perret, B., Collet, X., Terce, F., and Martinez, L.O. (2009). Stimulation of cell surface F1-ATPase activity by apolipoprotein A-I inhibits endothelial cell apoptosis and promotes proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1125-1130.

Rhodes, D.A., de Bono, B., and Trowsdale, J. (2005). Relationship between SPRY and B30.2 protein domains. Evolution of a component of immune defence? *Immunology* 116, 411-417.

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.

Rhodes, D.A., and Trowsdale, J. (2007). TRIM21 is a trimeric protein that binds IgG Fc via the B30.2 domain. *Mol Immunol* 44, 2406-2414.

Ribot, J.C., deBarros, A., Pang, D.J., Neves, J.F., Peperzak, V., Roberts, S.J., Girardi, M., Borst, J., Hayday, A.C., Pennington, D.J., and Silva-Santos, B. (2009). CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. *Nat Immunol* 10, 427-436.

Rodgers, J.R., and Cook, R.G. (2005). MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. *Nat Rev Immunol* 5, 459-471.

Rudd, P.M., Wormald, M.R., Stanfield, R.L., Huang, M., Mattsson, N., Speir, J.A., DiGennaro, J.A., Fetrow, J.S., Dwek, R.A., and Wilson, I.A. (1999). Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. *J Mol Biol* 293, 351-366.

Ruddy, D.A., Kronmal, G.S., Lee, V.K., Mintier, G.A., Quintana, L., Domingo, R., Jr., Meyer, N.C., Irrinki, A., McClelland, E.E., Fullan, A., *et al.* (1997). A 1.1-Mb transcript map of the hereditary hemochromatosis locus. *Genome Res* 7, 441-456.

Rudolph, M.G., Stanfield, R.L., and Wilson, I.A. (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 24, 419-466.

Rust, C.J., Verreck, F., Vietor, H., and Koning, F. (1990). Specific recognition of staphylococcal enterotoxin A by human T cells bearing receptors with the V gamma 9 region. *Nature* 346, 572-574.

Saito, H., Kranz, D.M., Takagaki, Y., Hayday, A.C., Eisen, H.N., and Tonegawa, S. (1984). A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 312, 36-40.

Sarikonda, G., Wang, H., Puan, K.J., Liu, X.H., Lee, H.K., Song, Y., Distefano, M.D., Oldfield, E., Prestwich, G.D., and Morita, C.T. (2008). Photoaffinity antigens for human gammadelta T cells. *J Immunol* 181, 7738-7750.

Schild, H., Mavaddat, N., Litzenberger, C., Ehrlich, E.W., Davis, M.M., Bluestone, J.A., Matis, L., Draper, R.K., and Chien, Y.H. (1994). The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells. *Cell* 76, 29-37.

Schwaber, J., and Cohen, E.P. (1973). Human x mouse somatic cell hybrid clone secreting immunoglobulins of both parental types. *Nature* 244, 444-447.

Scotet, E., Martinez, L.O., Grant, E., Barbaras, R., Jenö, P., Guiraud, M., Monsarrat, B., Saulquin, X., Mailliet, S., Esteve, J.P., *et al.* (2005). Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity* 22, 71-80.

Shawar, S.M., Vyas, J.M., Rodgers, J.R., and Rich, R.R. (1994). Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules. *Annu Rev Immunol* 12, 839-880.

Shen, Y., Zhou, D., Qiu, L., Lai, X., Simon, M., Shen, L., Kou, Z., Wang, Q., Jiang, L., Estep, J., *et al.* (2002). Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections. *Science* 295, 2255-2258.

Shibata, K., Yamada, H., Hara, H., Kishihara, K., and Yoshikai, Y. (2007). Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after *Escherichia coli* infection via IL-17 production. *J Immunol* 178, 4466-4472.

Shin, S., El-Diwany, R., Schaffert, S., Adams, E.J., Garcia, K.C., Pereira, P., and Chien, Y.H. (2005). Antigen recognition determinants of gammadelta T cell receptors. *Science* 308, 252-255.

Short, K.M., Hopwood, B., Yi, Z., and Cox, T.C. (2002). MID1 and MID2 homo- and heterodimerise to tether the rapamycin-sensitive PP2A regulatory subunit, alpha 4, to microtubules: implications for the clinical variability of X-linked Opitz GBBB syndrome and other developmental disorders. *BMC Cell Biol* 3.

Sicard, H., Ingoure, S., Luciani, B., Serraz, C., Fournie, J.J., Bonneville, M., Tiollier, J., and Romagne, F. (2005). In vivo immunomanipulation of V gamma 9V delta 2 T cells with a synthetic phosphoantigen in a preclinical nonhuman primate model. *J Immunol* 175, 5471-5480.

Smith, I.A., Knezevic, B.R., Ammann, J.U., Rhodes, D.A., Aw, D., Palmer, D.B., Mather, I.H., and Trowsdale, J. (2010a). BTN1A1, the mammary gland butyrophilin, and BTN2A2 are both inhibitors of T cell activation. *J Immunol* 184, 3514-3525.

Smith, L., Page, R.C., Xu, Z., Kohli, E., Litman, P., Nix, J.C., Ithychanda, S.S., Liu, J., Qin, J., Misra, S., and Liedtke, C.M. (2010b). Biochemical basis of the interaction between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and immunoglobulin-like repeats of filamin. *J Biol Chem* 285, 17166-17176.

Song, B., Gold, B., O'Huigin, C., Javanbakht, H., Li, X., Stremlau, M., Winkler, C., Dean, M., and Sodroski, J. (2005). The B30.2(SPRY) domain of the retroviral restriction factor TRIM5alpha exhibits lineage-specific length and sequence variation in primates. *J Virol* 79, 6111-6121.

Song, Y., Zhang, Y., Wang, H., Raker, A.M., Sanders, J.M., Broderick, E., Clark, A., Morita, C.T., and Oldfield, E. (2004). Synthesis of chiral phosphoantigens and their activity in gamma delta T cell stimulation. *Bioorg Med Chem Lett* 14, 4471-4477.

Spada, F.M., Grant, E.P., Peters, P.J., Sugita, M., Melian, A., Leslie, D.S., Lee, H.K., van Donselaar, E., Hanson, D.A., Krensky, A.M., *et al.* (2000). Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med* 191, 937-948.

Spencer, C.T., Abate, G., Blazevic, A., and Hoft, D.F. (2008). Only a subset of phosphoantigen-responsive gamma9delta2 T cells mediate protective tuberculosis immunity. *J Immunol* **181**, 4471-4484.

Stefflerl, A., Schubart, A., Storch, M., Amini, A., Mather, I., Lassmann, H., and Linington, C. (2000). Butyrophilin, a milk protein, modulates the encephalitogenic T cell response to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **165**, 2859-2865.

Stremlau, M., Perron, M., Lee, M., Li, Y., Song, B., Javanbakht, H., Diaz-Griffero, F., Anderson, D.J., Sundquist, W.I., and Sodroski, J. (2006). Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5514-5519.

Sturm, E., Bontrop, R.E., Vreugdenhil, R.J., Otting, N., and Bolhuis, R.L. (1992). T-cell receptor gamma/delta: comparison of gene configurations and function between humans and chimpanzees. *Immunogenetics* **36**, 294-301.

Tanaka, Y., Kobayashi, H., Terasaki, T., Toma, H., Aruga, A., Uchiyama, T., Mizutani, K., Mikami, B., Morita, C.T., and Minato, N. (2007). Synthesis of pyrophosphate-containing compounds that stimulate Vgamma2Vdelta2 T cells: application to cancer immunotherapy. *Med Chem* **3**, 85-99.

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.

Tandon, M., Vemula, S.V., and Mittal, S.K. (2011). Emerging strategies for EphA2 receptor targeting for cancer therapeutics. *Expert Opin Ther Targets* **15**, 31-51.

Taylor, M.R., Peterson, J.A., Ceriani, R.L., and Couto, J.R. (1996). Cloning and sequence analysis of human butyrophilin reveals a potential receptor function. *Biochim Biophys Acta* **1306**, 1-4.

Tazi-Ahnini, R., Henry, J., Offer, C., Bouissou-Bouchouata, C., Mather, I.H., and Pontarotti, P. (1997). Cloning, localization, and structure of new members of the butyrophilin gene family in the juxta-telomeric region of the major histocompatibility complex. *Immunogenetics* **47**, 55-63.

Thedrez, A., Sabourin, C., Gertner, J., Devilder, M.C., Allain-Maillet, S., Fournie, J.J., Scotet, E., and Bonneville, M. (2007). Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunol Rev* **215**, 123-135.

Thompson, K., and Rogers, M.J. (2004). Statins prevent bisphosphonate-induced gamma,delta-T-cell proliferation and activation in vitro. *J Bone Miner Res* **19**, 278-288.

Thompson, K., Rojas-Navea, J., and Rogers, M.J. (2006). Alkylamines cause Vgamma9Vdelta2 T-cell activation and proliferation by inhibiting the mevalonate pathway. *Blood* **107**, 651-654.

Trichet, V., Benezech, C., Dousset, C., Gesnel, M.C., Bonneville, M., and Breathnach, R. (2006). Complex interplay of activating and inhibitory signals received by Vgamma9Vdelta2 T cells revealed by target cell beta2-microglobulin knockdown. *J Immunol* **177**, 6129-6136.

Tu, W., Zheng, J., Liu, Y., Sia, S.F., Liu, M., Qin, G., Ng, I.H., Xiang, Z., Lam, K.T., Peiris, J.S., and Lau, Y.L. (2011). The aminobisphosphonate pamidronate controls influenza pathogenesis by expanding a gammadelta T cell population in humanized mice. *J Exp Med* **208**, 1511-1522.

Valentonyte, R., Hampe, J., Huse, K., Rosenstiel, P., Albrecht, M., Stenzel, A., Nagy, M., Gaede, K.I., Franke, A., Haesler, R., *et al.* (2005). Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nat Genet* **37**, 357-364.

van Seventer, G.A., Kuijpers, K.C., van Lier, R.A., de Groot, E.R., Aarden, L.A., and Melief, C.J. (1987). Mechanism of inhibition and induction of cytolytic activity in cytotoxic T lymphocytes by CD3 monoclonal antibodies. *J Immunol* **139**, 2545-2550.

- Vantourout, P., Martinez, L.O., Fabre, A., Collet, X., and Champagne, E. (2008). Ecto-F1-ATPase and MHC-class I close association on cell membranes. *Mol Immunol* **45**, 485-492.
- Vantourout, P., Mookerjee-Basu, J., Rolland, C., Pont, F., Martin, H., Davrinche, C., Martinez, L.O., Perret, B., Collet, X., Perigaud, C., *et al.* (2009). Specific requirements for Vgamma9Vdelta2 T cell stimulation by a natural adenylated phosphoantigen. *J Immunol* **183**, 3848-3857.
- Viey, E., Fromont, G., Escudier, B., Morel, Y., Da Rocha, S., Chouaib, S., and Caignard, A. (2005). Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. *J Immunol* **174**, 1338-1347.
- Vincent, M.S., Roessner, K., Sellati, T., Huston, C.D., Sigal, L.H., Behar, S.M., Radolf, J.D., and Budd, R.C. (1998). Lyme arthritis synovial gamma delta T cells respond to *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and lipidated hexapeptides. *J Immunol* **161**, 5762-5771.
- Walker-Daniels, J., Coffman, K., Azimi, M., Rhim, J.S., Bostwick, D.G., Snyder, P., Kerns, B.J., Waters, D.J., and Kinch, M.S. (1999). Overexpression of the EphA2 tyrosine kinase in prostate cancer. *Prostate* **41**, 275-280.
- 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., 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, L., Das, H., Kamath, A., and Bukowski, J.F. (2001). Human V gamma 2V delta 2 T cells produce IFN-gamma and TNF-alpha with an on/off/on cycling pattern in response to live bacterial products. *J Immunol* **167**, 6195-6201.
- 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 Vgamma2Vdelta2 TCR. *J Immunol* **181**, 4798-4806.
- Weinert, C., Grutter, C., Roschitzki-Voser, H., Mittl, P.R., and Grutter, 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.
- Welsh, M.D., Kennedy, H.E., Smyth, A.J., Girvin, R.M., Andersen, P., and Pollock, J.M. (2002). Responses of bovine WC1(+) gammadelta T cells to protein and nonprotein antigens of *Mycobacterium bovis*. *Infect Immun* **70**, 6114-6120.
- Wiest, D.L. (2010). Origins of gammadeltaT cells: a forum for opposing perspectives. *Semin Immunol* **22**, 191-192.
- Wilhelm, M., Kunzmann, V., Eckstein, S., Reimer, P., Weissinger, F., Ruediger, T., and Tony, H.P. (2003). Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* **102**, 200-206.
- Williams, A.F., and Barclay, A.N. (1988). The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* **6**, 381-405.
- Woo, J.S., Imm, J.H., Min, C.K., Kim, K.J., Cha, S.S., and Oh, B.H. (2006a). Structural and functional insights into the B30.2/SPRY domain. *Embo J* **25**, 1353-1363.
- Woo, J.S., Suh, H.Y., Park, S.Y., and Oh, B.H. (2006b). Structural basis for protein recognition by B30.2/SPRY domains. *Mol Cell* **24**, 967-976.

Wu, Y., Wu, W., Wong, W.M., Ward, E., Thrasher, A.J., Goldblatt, D., Osman, M., Digard, P., Canaday, D.H., and Gustafsson, K. (2009). Human gamma delta T cells: a lymphoid lineage cell capable of professional phagocytosis. *J Immunol* **183**, 5622-5629.

Xu, B., Pizarro, J.C., Holmes, M.A., McBeth, C., Groh, V., Spies, T., and Strong, R.K. (2011). Crystal structure of a gammadelta T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2414-2419.

Yamashiro, H., Yoshizaki, S., Tadaki, T., Egawa, K., and Seo, N. (2010). Stimulation of human butyrophilin 3 molecules results in negative regulation of cellular immunity. *J Leukoc Biol* **88**, 757-767.

Yamashita, S., Tanaka, Y., Harazaki, M., Mikami, B., and Minato, N. (2003). Recognition mechanism of non-peptide antigens by human gammadelta T cells. *Int Immunol* **15**, 1301-1307.

Yang, Y., Liu, X.K., Nguyen, T., Bishop, C., Graf, D., and Dong, C. (2007). Characterization of B7S3 as a novel negative regulator of T cells. *J Immunol* **178**, 3661-3667.

Zelinski, D.P., Zantek, N.D., Stewart, J.C., Irizarry, A.R., and Kinch, M.S. (2001). EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cancer Res* **61**, 2301-2306.

Zhao, J., Huang, J., Chen, H., Cui, L., and He, W. (2006). Vdelta1 T cell receptor binds specifically to MHC I chain related A: molecular and biochemical evidences. *Biochem Biophys Res Commun* **339**, 232-240.

Annexes

I. Article 4 : IL-21-Mediated Potentiation of Antitumor Cytolytic and Proinflammatory Responses of Human V γ 9V δ 2 T Cells for Adoptive Immunotherapie.

Thedrez A, Harly C, Morice A, Salot S, Bonneville M, Scotet E.

J. Immunol., 2009, 182(6):3423-31.

IL-21-Mediated Potentiation of Antitumor Cytolytic and Proinflammatory Responses of Human V γ 9V δ 2 T Cells for Adoptive Immunotherapy¹

Aurélien Thedrez,* Christelle Harly,* Alexis Morice,* Samuel Salot,[†] Marc Bonneville,^{2*} and Emmanuel Scotet^{2*}

V γ 9V δ 2 T lymphocytes are a major human $\gamma\delta$ T cell subset that react against a wide array of tumor cells, through recognition of phosphorylated isoprenoid pathway metabolites called phosphoantigens. Immunotherapeutic protocols targeting V γ 9V δ 2 T cells have yielded promising, yet limited, signs of antitumor efficacy. To improve these approaches, we analyzed the effects on $\gamma\delta$ T cells of IL-21, a cytokine known to enhance proliferation and effector functions of CD8⁺ T cells and NK cells. IL-21 induced limited division of phosphoantigen-stimulated V γ 9V δ 2 T cells, but did not modulate their sustained expansion induced by exogenous IL-2. V γ 9V δ 2 T cells expanded in the presence of IL-21 and IL-2 showed enhanced antitumor cytolytic responses, associated with increased expression of CD56 and several lytic molecules, and increased tumor-induced degranulation capacity. IL-21 plus IL-2-expanded V γ 9V δ 2 T cells expressed higher levels of inhibitory receptors (e.g., ILT2 and NKG2A) and lower levels of the costimulatory molecule NKG2D. Importantly, these changes were rapidly and reversibly induced after short-term culture with IL-21. Finally, IL-21 irreversibly enhanced the proinflammatory Th1 polarization of expanded V γ 9V δ 2 T cells when added at the beginning of the culture. These data suggest a new role played by IL-21 in the cytotoxic and Th1 programming of precommitted Ag-stimulated $\gamma\delta$ T cells. On a more applied standpoint, IL-21 could be combined to IL-2 to enhance $\gamma\delta$ T cell-mediated antitumor responses, and thus represents a promising way to optimize immunotherapies targeting this cell subset. *The Journal of Immunology*, 2009, 182: 3423–3431.

Most peripheral blood $\gamma\delta$ T cells in human adults express a particular combination of TCR variable regions, V γ 9 and V δ 2. V γ 9V δ 2 T cells, which make up 0.5–5% of the peripheral lymphoid pool, recognize in vitro a wide array of transformed and infected cells and are activated in vivo in a variety of infectious and tumor contexts. This broad reactivity pattern is due to V γ 9V δ 2 TCR-dependent recognition of a particular set of phosphorylated compounds, referred to as phosphoantigens. Phosphoantigens are produced through the isoprenoid pathway shared by either mammalian cells (mevalonate pathway) or microorganisms (desoxyxylulose-phosphate pathway) (1–3). Owing to their ability to directly kill tumor cells and produce inflammatory cytokines boosting antitumor properties of other immune effectors (such as IFN- γ), V γ 9V δ 2 T cells probably contribute to protective immunity against cancers. These observations, and the

recent availability of synthetic clinical grade phosphoantigens or pharmacological inhibitors of the mevalonate pathway (e.g., aminobisphosphonates) able to trigger V γ 9V δ 2 T cell proliferation and antitumor responses (4–7), have fostered development of immunotherapeutic approaches targeting this $\gamma\delta$ subset (see for recent reviews Refs. 7–9). Phosphoantigens or aminobisphosphonates together with IL-2 can trigger the selective outgrowth of V γ 9V δ 2 T cells in vitro and in vivo in both preclinical (nonhuman primate) models and in cancer patients (10, 11). Passive immunotherapy, resting on adoptive transfer of autologous in vitro expanded V γ 9V δ 2 T cells (12–15), has been so far evaluated in phase I trials in metastatic renal carcinoma patients (16, 17). Regarding active immunotherapy, both preclinical studies and phase I/II trials performed in myeloma, lymphoma, and metastatic renal carcinoma and prostate cancer patients have demonstrated efficient but transient in vivo V γ 9V δ 2 T cell systemic expansions after treatment with $\gamma\delta$ agonists and IL-2 (10, 18, 19). These treatments are generally well tolerated with limited side effects and may lead to disease stabilization or partial tumor regression in some treated patients (17–19).

Although yielding encouraging results in terms of feasibility, tolerance and preliminary efficacy, V γ 9V δ 2-based immunotherapies might not yet be optimal owing in particular to the limited, yet significant, killing of primary tumors by these lymphocytes. A way to improve clinical efficacy of V γ 9V δ 2 T cell-based immunotherapies could be through enhancement of the overall antitumor effector response, possibly with potentiators of cytolytic and proinflammatory properties. In this respect, IL-21 represents a good candidate for such a purpose. IL-21R is broadly expressed by lymphoid cells, including activated $\gamma\delta$ T cells (20). This cytokine acts synergistically with IL-2, IL-7, or IL-15 to induce proliferation of conventional naive and memory

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Nantes, France, and [†]Innate Pharma, Marseille, France

Received for publication September 16, 2008. Accepted for publication January 9, 2009.

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

¹ This work was supported by institutional grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Agence Nationale de la Recherche Grants A05118GS and PRIB/017, Association pour la Recherche sur le Cancer Grants 3662 and 4953, Institut National du Cancer Grant PLA074, and from the Commission of the European Union Program Cancer Immunotherapy Grants E06005NP/EEA06004GNP.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Emmanuel Scotet or Dr. Marc Bonneville, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Institut de Biologie, Centre Hospitalier de l'Université, 9 quai moncoussu, 44035 Nantes Cedex, France. E-mail addresses: Emmanuel.Scotet@inserm.fr or bonnevil@inserm.fr

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/\$2.00

CD8⁺ T cells (21) as well as CD1d-restricted NKT cells (22, 23). Similarly IL-21 has been shown to drive short-term proliferation of human $\gamma\delta$ T cells (20, 24). On a functional standpoint, IL-21 has been involved in the functional polarization of T cells, more particularly toward production of proinflammatory Th17 cytokines like IL-21, IL-22, and IL-17, and it may affect Th1/Th2 polarization as well, reviewed in (25). It also enhances antitumor immunity in vitro and in vivo through mechanisms involving up-regulation of perforin and granzyme production by NK or CD8⁺ T cells (26–28). Although IL-21 leads to acquisition of a follicular B helper-like phenotype by human V γ 9V δ 2 T cells (20, 24), its effects on cytokine and cytolytic responses elicited by tumor cells have not yet been assessed.

In this study, we show that human recombinant IL-21: 1) does not sustain, by itself, long-term Ag-induced V γ 9V δ 2 T cell proliferation in vitro, 2) neither inhibits nor enhances IL-2-induced proliferation of Ag-stimulated $\gamma\delta$ T cells, 3) dramatically increases, in a rapid but reversible manner, the expression of several lytic effector molecules and antitumor lytic activity of $\gamma\delta$ T cells and, 4) drives V γ 9V δ 2 T cell cytokine polarization during in vitro expansion toward an effector proinflammatory phenotype. Altogether our results indicate that IL-21 can be combined with IL-2 for in vitro or in vivo generation of V γ 9V δ 2 T cells showing enhanced antitumor functions. Moreover, our data provide new evidence that IL-21 can affect the differentiation/polarization of human $\gamma\delta$ T cells, by driving them toward a proinflammatory Th1 cytokine profile.

Materials and Methods

Abs and flow cytometry

The following mAbs (with clone number) were used for extracellular stainings: V δ 2-FITC (IMMU389), CD3-PC5 (UCHT1), CD56-PE (N901), CD45RA-PE (ALB11), CD27-PC5 (1A4), CD244-PE (C1.7), NKG2D-PE (ON72), NKG2A-PE (Z199), ILT2-PE (HP-F1) from Immunotech/Beckman Coulter; CD107a-FITC (H4A3) and CD107b-FITC (H4B4) from BD Biosciences; and V γ 9-allophycocyanin (7B6) provided by Innate Pharma. For intracellular stainings, IFN- γ -allophycocyanin (B27), IL-4-PE (MP4-25D2), granzyme A-FITC (CB9), granzyme B-FITC (GB11), and perforin-PE (γ G9) were obtained from BD Biosciences. Isotype-matched mAbs were obtained from BD Biosciences, Beckman Coulter, or R&D Systems and used as staining controls. Flow cytometry acquisition and analysis were performed by using LSR/FACSCalibur (BD Biosciences) and CellQuest Pro (BD Biosciences) systems with FlowJo (Tree Star) software.

Reagents

Synthetic C-HDMAPP (IPH1201/Picostim) was provided by Innate Pharma (29). Recombinant human IL-2 (Proleukin) and IL-21 were obtained, respectively, from Chiron Therapeutics and Clinisciences. CFDA-SE, (CFSE) was obtained from Molecular Probes/Invitrogen. Brefeldin A, L-glutamine, streptomycin, penicillin, monensin, PMA, ionomycin, and RPMI 1640 were purchased from Sigma-Aldrich.

Tumor cell lines

The 786-0 (renal adenocarcinoma) and Raji (Burkitt's lymphoma) human tumor cell lines were obtained from the American Type Culture Collection and cultured at 37°C in RPMI-FCS medium (RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 μ g/ml streptomycin, and 100 U/ml penicillin).

Expansion of human V γ 9V δ 2 PBL

PBMC of human healthy donors (identified in this study as Donor A–H) were isolated from blood samples and obtained from the Etablissement Français du Sang (Nantes, France) after Ficoll-Hypaque (Eurobio) density centrifugation. For V γ 9V δ 2 PBL expansions, fresh or frozen PBMC (1×10^6 cells/ml) were specifically activated by C-HDMAPP (80 nM) in RPMI-FCS medium supplemented with recombinant human IL-2 (20 ng/ml) or IL-21 (10 ng/ml). After 4 days, cultures were sup-

plemented with IL-2 (60 ng/ml) or IL-21 (30 ng/ml). Specific expansion of V δ 2⁺ T cells within PBL was measured by calculating frequency (V δ 2/CD3 stainings) and absolute (V δ 2 T cell number) at days 5, 7, 10, 14, and 20 following activation. The fold amplification rates of V δ 2⁺ T cells were calculated according to the following formula: (absolute number of V δ 2⁺ T cells)/(absolute number of V δ 2⁺ T cells at day 0). Resting V γ 9V δ 2 PBL lines expanded under these conditions were checked for purity by flow cytometry (>80% of V δ 2⁺ T cells) and subsequently used in phenotype/functions experiments. For gene expression analysis, $\gamma\delta$ T cells were purified following in vitro expansion by positive magnetic selection by using MACS technology (Miltenyi Biotec), according to the manufacturer's instructions.

Cell division analysis

Freshly isolated PBMC were labeled with CFSE (2 μ M) for 15 min at 37°C, washed and maintained for 15 min at 37°C in RPMI-FCS medium to allow the release of dye excess, according to the manufacturer's instructions. Labeled cells (1×10^6 cells/ml) were activated by C-HDMAPP (80 nM) in the presence of IL-2 (60 ng/ml) or IL-21 (30 ng/ml). After 3 days of culture, cells were harvested and stained for TCR V γ 9 chain, CD27, and CD45RA surface expression. Cell division profile and surface markers expression were measured by flow cytometry. Peaks of cell division and frequency were calculated by using the *Proliferation Platform* of the FlowJo analysis software.

⁵¹Cr release assays

Cytolytic activity of V γ 9V δ 2 PBL was measured by a standard 4-h ⁵¹Cr release assay (30). Percentage of tumor target cell lysis was calculated according to the following formula: (experimental release – spontaneous release)/(maximum release – spontaneous release) $\times$ 100. Maximum and spontaneous release were determined, respectively, by adding 0.1% Triton X-100 or medium to ⁵¹Cr-labeled tumor target cells in the absence of $\gamma\delta$ T cells. Data are presented as the mean of triplicate samples. Lytic units were calculated by using the formula described by Friberg and colleagues (31). Lytic units were used to represent lytic activity that increases with potency per lytic batch, where a lytic batch equals 10^6 effector cells. An estimate of lysis at 20% was calculated from a regression line plotting percentage of lysis by E:T ratio of 20 by using the following formula: $10^{(6/20)(3 \times 10^3)}$, where 10^6 was the standard number of effector cells and 3×10^3 was the standard number of targets.

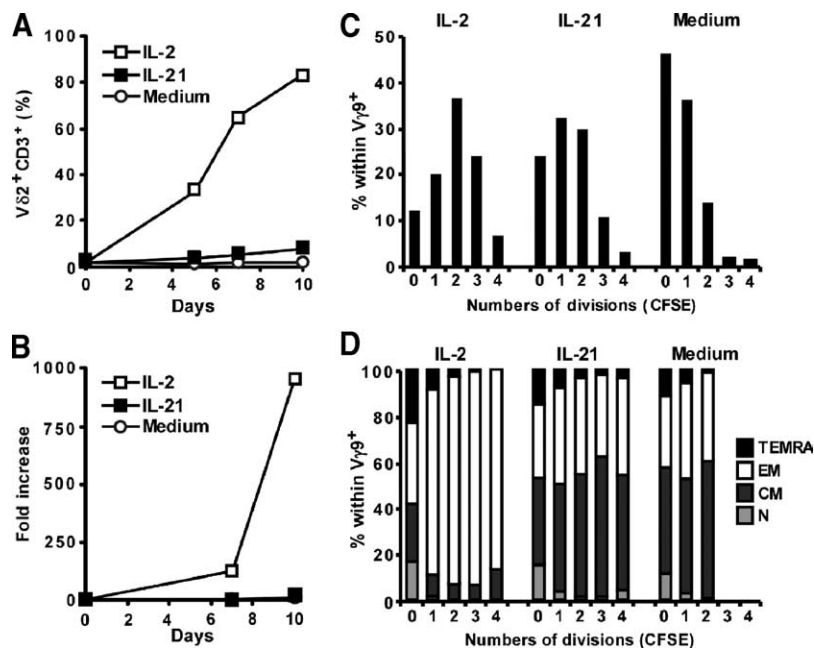
CD107 mobilization assays

V γ 9V δ 2 T cells (2×10^5 cells/well) were activated by either C-HDMAPP (80 nM) or tumor cells at a $\gamma\delta$ T cell to target cell ratio of 1:1 at 37°C in RPMI-FCS containing monensin (10 μ M) and a combination of FITC-conjugated anti-CD107a and anti-CD107b mAbs. After 4 h, cells were harvested, stained with a TCR V γ 9-specific mAb and fixed with 0.5% paraformaldehyde. Double-stained cells were analyzed by flow cytometry.

Comparative gene expression analysis

V γ 9V δ 2 PBL were amplified within human PBMC of three different healthy donors under IL-2 or IL-2+IL-21 conditions and purified 3 wk after the initial C-HDMAPP activation by using magnetic positive $\gamma\delta$ selection (purity >99%) and stored as frozen pellets. RNA was extracted (NucleoSpin RNA II; Macherey-Nagel) and quality checked (RNA integrity number between 9.6 and 10) using an Agilent 2100 Bioanalyzer platform (Agilent Technologies). The total of 1 μ g of total RNA was used for a linear T7-based amplification step and checked as described. Fluorescently labeled (Cy3/Cy5) cDNAs were hybridized to topic-defined glass slides (1076 genes spotted in quadruplicates) PIQOR Immunology Microarrays (Miltenyi Biotec) and scanning was performed by the Miltenyi Microarray Service. Hybridization, scanning, and data analysis were performed according to the PIQOR protocol and comply with the MIAME standards (minimum information about a microarray experiment standards). In this assay, the PIQOR Analyzer calculates all normalized mean Cy5/Cy3 ratio (IL-2+IL-21 to IL-2 ratio) of the four replicates per gene (including the respective coefficient of variation). A fold change ≥ 1.7 was considered to be a good discriminatory criteria to select genes of interest. Genes that did not pass the quality filtering for very low signal intensity were not evaluated (<2-fold above average signal intensity of the background in both Cy3 and Cy5 channels). Data have been deposited in the NCBI GEO database (<http://geo.ncbi.nlm.nih.gov>) as accession number GSE13912.

FIGURE 1. Effects of IL-21 on the expansion of V γ 9V δ 2 PBL following activation by phosphoantigens. *A* and *B*, kinetics of V δ 2⁺CD3⁺ cells frequency within PBMC of a healthy human donor (Do#A) (*A*) and corresponding fold amplifications relative to day 0 (*B*) were measured following a specific activation (C-HDMAPP, 80 nM) performed in the absence of any cytokine (Medium) or in IL-2- or IL-21-supplemented medium. *C*, distribution of V γ 9V δ 2 PBL according to their CFSE fluorescence is shown at day 3 in culture performed under conditions described in *A* and *B*. *D*, analysis of the memory status of V γ 9V δ 2 PBL generated in the same experiment. The percentage of naive (N) (CD27⁺/CD45RA⁺), central memory (CM) (CD27⁺/CD45RA⁻), effector memory (EM) (CD27⁻/CD45RA⁻), and terminally differentiated effector memory (TEMRA) (CD27⁻/CD45RA⁺) cells are indicated within each dividing $\gamma\delta$ subset. One representative result of at least three experiments performed by using PBMC samples from different donors is shown.



Measurement of IFN- γ and IL-4 responses

$\gamma\delta$ T cells (3×10^4 cells/well) were activated with C-HDMAPP (0.8 and 80 nM) or PMA/ionomycin at 37°C in RPMI-FCS medium (200 μ l/well). After 24 h, supernatants were harvested and analyzed for IFN- γ and IL-4 secretion by ELISA following standard procedures. Data are presented as the mean of triplicate samples. For intracellular cytokine detection, $\gamma\delta$ T cells (2×10^6 cells/well) were activated for 5 h at 37°C in RPMI-FCS by adding grading doses of C-HDMAPP (up to 100 nM) or PMA/ionomycin. After 2 h, intracellular accumulation of cytokines was induced by adding brefeldin A (10 μ g/ml). After 3 h, cells were collected, stained for TCR V δ 2 chain expression and fixed at 4°C with 0.5% paraformaldehyde. Fixation was followed by a cell permeabilization with BD PhosFlow Perm/Wash buffer (BD Biosciences) for 20 min and by incubation with IFN- γ and IL-4-specific mAbs for 30 min. Stained cells were analyzed by flow cytometry.

Results

IL-21 fails to induce long-term proliferation of ex vivo V γ 9V δ 2 PBL following phosphoantigen activation

We studied the effects of recombinant human IL-21 on human ex vivo V γ 9V δ 2 PBL, by measuring its ability to trigger either cell division or differentiation, following exposure to C-HDMAPP, a potent synthetic V γ 9V δ 2 T cell agonist. Grading doses of IL-21 induced limited and transient increase of the frequency of V δ 2⁺ T cells within PBMC (from 10 to 20%) but did not promote efficient $\gamma\delta$ T cell expansion when compared with IL-2 (>80%) (Fig. 1, *A* and *B*) (also see supplemental Fig. S1).³ Accordingly $\gamma\delta$ T cells could not be maintained more than 10 days in IL-21-supplemented cultures. These observations suggest that IL-21 induces cell division but is not sufficient, by itself, to sustain full proliferation of activated V γ 9V δ 2 T cells. To further address this issue, we combined CFSE dilution assays and phenotypic analysis of the memory status of V γ 9V δ 2 T cells, 3 days after initial antigenic activation. As shown in Fig. 1C, IL-21 induced a significant entry into cell division (more than 75% of dividing cells in which more than 50% achieved 1–2 divisions). However, the average number of cell divisions was much higher in IL-2-supplemented cultures, in which the majority of activated $\gamma\delta$ T cells achieved 2–3 divisions

at the same time point. In line with a previous study (24), $\gamma\delta$ T cells with a central memory (CD27⁺CD45RA⁻) phenotype were more frequent in IL-21- than IL-2-supplemented cultures,

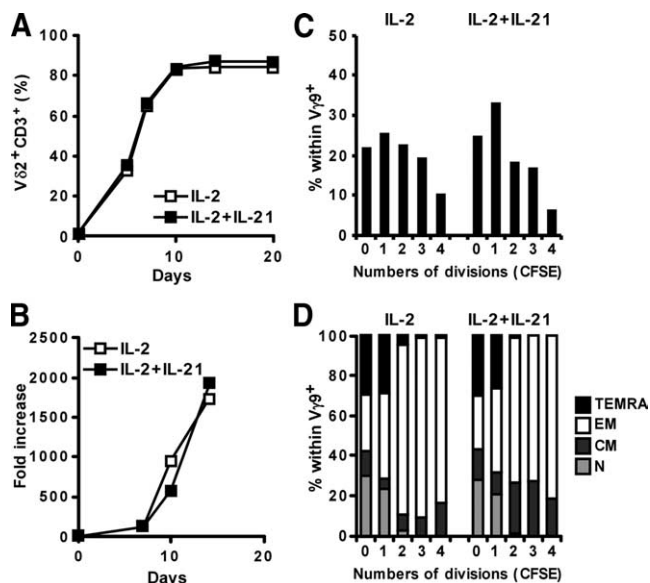


FIGURE 2. Effects of IL-21 in combination with IL-2 on the expansion of V γ 9V δ 2 PBL following activation by phosphoantigens. *A* and *B*, Kinetics of V δ 2⁺CD3⁺ cell frequency within PBMC of a healthy human donor (Do#B) (*A*) and corresponding fold amplification relative to day 0 (*B*) were measured following a specific activation (C-HDMAPP, 80 nM) performed in the absence of any cytokine (Medium) or in IL-2- or IL-2+IL-21-supplemented medium. *C*, distribution of V γ 9V δ 2 PBL according to their CFSE fluorescence is shown at day 3 in culture performed under the conditions described in *A* and *B*. *D*, analysis of the memory status of V γ 9V δ 2 PBL generated in the same experiment. Percentages of naive (N) (CD27⁺/CD45RA⁺), central memory (CM) (CD27⁺/CD45RA⁻), effector memory (EM) (CD27⁻/CD45RA⁻), and terminally differentiated effector memory (TEMRA) (CD27⁻/CD45RA⁺) cells are indicated within each dividing $\gamma\delta$ subset. One representative result of at least three experiments performed using PBMC samples from different donors is shown.

³ The online version of this article contains supplemental material.

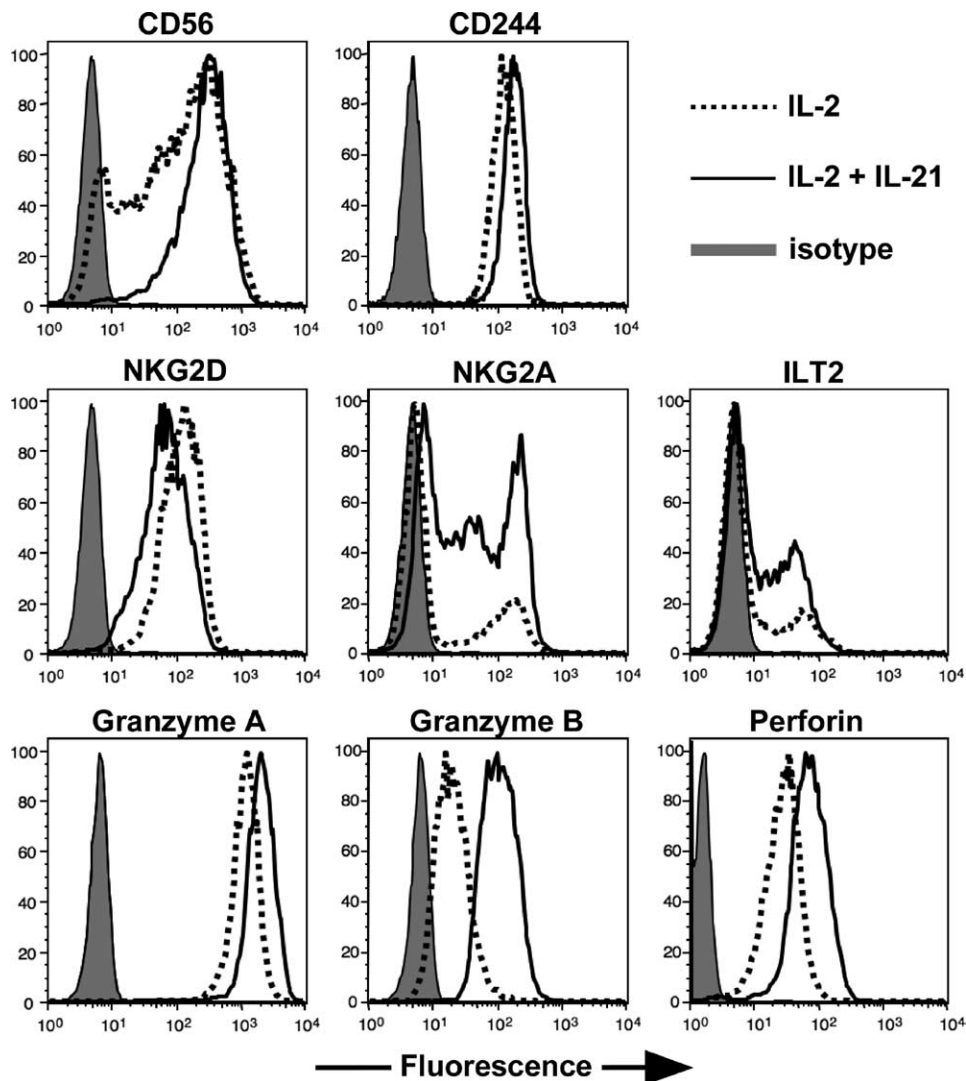


FIGURE 3. IL-21 modulates the expression NK receptors and lytic molecules in V γ 9V δ 2 PBL expanded following activation by phosphoantigens. Expression of cell surface markers (CD56, CD244, NKG2D, NKG2A, and ILT2) and intracellular lytic molecules (granzyme A, granzyme B, and perforin) was measured at day 25 postactivation by flow cytometry in V γ 9V δ 2 PBL (Do#D) generated in IL-2- or IL-2+IL-21-supplemented medium. Background stainings obtained using isotype control Abs are also shown (gray-filled histogram).

even among cells having achieved several divisions (Fig. 1D). Altogether these results indicate that IL-21, though triggering $\gamma\delta$ T cell division with maintenance of the central memory subset, is unable to promote long-term ex vivo expansion of activated human PBMC-V γ 9V δ 2 T cells.

IL-21 neither synergizes nor interferes with IL-2

We further analyzed the pro-proliferative activity of IL-21 in combination with IL-2 on the ex vivo expansion of PBMC-V γ 9V δ 2 T cells. IL-21 did not synergize or interfere with IL-2-induced proliferation because similar enrichment for V γ 9V δ 2 T cells (>80% of V δ 2⁺ T cells) and expansion (>2,000-fold) were observed in IL-2- vs IL-2+IL-21-supplemented cultures (Fig. 2, A and B). Moreover, IL-21 did not synergize nor inhibited entry into cell division of activated $\gamma\delta$ T cells, as indicated by the similar CFSE profiles of PBMC cultured in both conditions (Fig. 2C). Finally, like IL-2-supplemented cultures, most V γ 9V δ 2 T cells stimulated by both IL-21 and IL-2 displayed an effector memory phenotype (Fig. 2D). This response suggests that the increased frequency of central memory cells within IL-21-supplemented cultures reflects the limited proliferative activity of these cells rather than a specific effect targeting a particular memory subset.

IL-21 polarizes V γ 9V δ 2 T cells toward a CTL effector phenotype

To further investigate the effects of IL-21 on human $\gamma\delta$ T cell differentiation, we performed a comparative phenotypic analysis of ex vivo Ag-stimulated PBMC-V γ 9V δ 2 T cells in IL-2 alone or in combination with IL-21, using mAbs specific for chemokine and NK receptors, adhesion molecules, activation and memory markers, and lytic effector molecules. V γ 9V δ 2 T cells that expanded in the presence of either IL-2 plus IL-21 or IL-2 alone expressed similar levels of $\gamma\delta$ TCR, chemokine receptors (e.g., CXCR3), adhesion molecules (e.g., CD11a), and activation/memory markers (e.g., CD16) (see supplemental Table S2).³ However IL-2+IL-21-supplemented cultures expressed significantly higher levels of lytic granules such as granzyme A, granzyme B, and perforin, when compared with standard IL-2 conditions (Fig. 3) (see also supplemental Table S2).³ Accordingly semiquantitative PCR analysis showed higher levels of mRNA coding for granzymes and perforin in IL-2+IL-21- than in IL-2-supplemented V γ 9V δ 2 T cells. Therefore, this observation suggests that IL-21 acts primarily at the level of transcription or stability of mRNA encoding these lytic molecules (data not shown). Interestingly, increased expression levels of inhibitory NK receptors (e.g., NKG2A, ILT2, and CD244 (2B4)) and

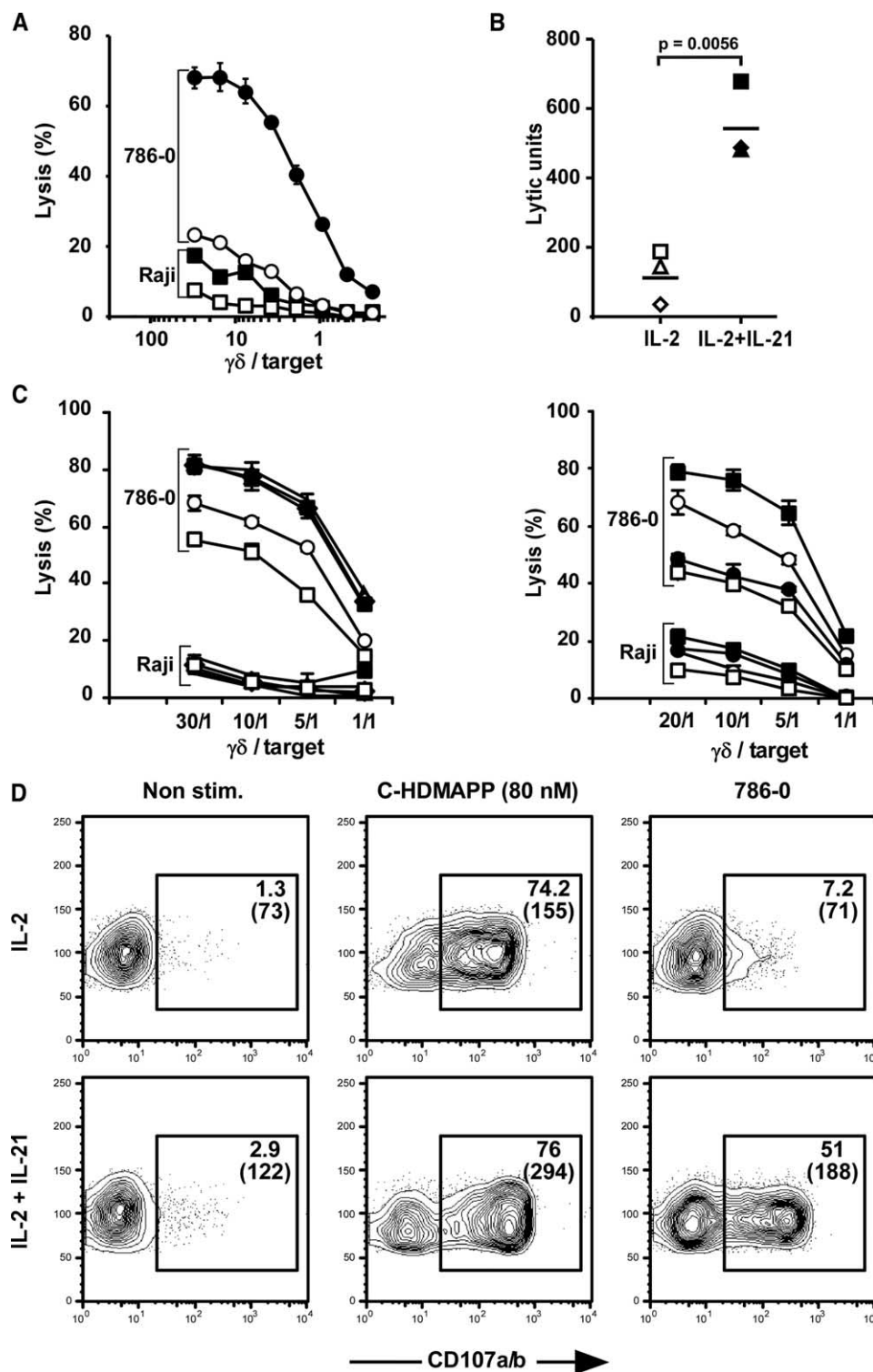


FIGURE 4. IL-21 enhances antitumor cytolytic activity of V γ 9V δ 2 T cells. **A**, cytolytic activity in V γ 9V δ 2 PBL lines from healthy human donor (Do#C), generated following activation by phosphoantigen in IL-2- or IL-2+IL-21-supplemented medium, were measured by ^{51}Cr release assay after coculture together with V γ 9V δ 2-susceptible (786-0) or V γ 9V δ 2-resistant (Raji) tumor cell targets at increasing $\gamma\delta$ T cell to target ratios. **B**, Lytic units (per 10^6 effector cells) in V γ 9V δ 2 PBL expanded in IL-2-supplemented (*open symbols*) or IL-2+IL-21-supplemented (*filled symbols*) medium were calculated according to the formula described in *Materials and Methods*. Three independent experiments are shown. Horizontal bar indicates calculated median values. **C**, V γ 9V δ 2 PBL (Do#C) expanded in IL-2-supplemented medium (*left*) were preincubated in IL-2+IL-21 medium for 5 days (Δ), 2 days ($\diamond$), or 16 h ($\circ$) before coculture at day 29 with tumor target cells. Cytolytic activity of V γ 9V δ 2 PBL was measured at the indicated $\gamma\delta$ T cell to target ratio and compared with the values obtained with V γ 9V δ 2 PBL expanded and maintained for 29 days in IL-2 ($\square$) or IL-2+IL-21 ($\blacksquare$) medium. V γ 9V δ 2 PBL were expanded in IL-2- or IL-2+IL-21-supplemented medium and cultured at day 18 (*right*), respectively, in IL-2-supplemented ($\bullet$) or in IL-2+IL-21-supplemented ($\circ$) medium. Cytolytic activity of V γ 9V δ 2 PBL were measured at day 30 and compared with cultures maintained with IL-2 ($\square$) and IL-2+IL-21 ($\blacksquare$). Data are presented as the mean $\pm$ SEM of triplicate samples. **D**, CD107 mobilization was measured by flow cytometry in V γ 9V δ 2 PBL expanded with IL-2 or IL-2+IL-21 and activated at day 27 by C-HDMAPP or 786-0 tumor cells ($\gamma\delta$ T cell to target ratio of 1:1). The percentage of CD107a/b $^{+}$ cells and mean fluorescence intensity (MFI) are indicated. Cytotoxicity and CD107 mobilization experiments were conducted at least three independent times and one representative result of at least three experiments is shown.

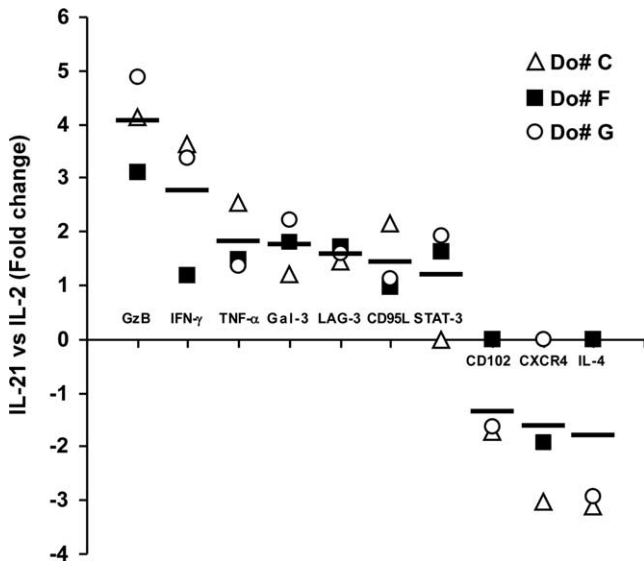


FIGURE 5. Comparative analysis of gene expression in V γ 9V δ 2 PBL expanded with IL-2 or IL-2+IL-21. Values correspond to fold changes in V γ 9V δ 2 PBL generated IL-2+IL-21-supplemented medium and compared with IL-2 cultures, based on quadruplicate microarray experiments. A selection of the products (genes of a known immunological relevance in T cells) of the most strongly upmodulated (positive values) and downmodulated (negative values) transcripts prepared at day 23 from healthy human donors (Do#F and Do#G) or at day 28 (Do#C) postactivation is presented. Granzyme B (GzB), IFN- γ , TNF- α , galectin-3 (Gal-3), CD95 ligand (CD95L), STAT-3, CXCR4, and IL-4 are represented. Microarray data were performed by comparing $\gamma\delta$ T cell samples from three different donors (Do#C, Do#F, and Do#G) and generated in both cytokine conditions. Horizontal bar indicates median fold change value.

lower levels of costimulatory NK receptors (e.g., NKG2D) were detected in $\gamma\delta$ T cells amplified with IL-21, as compared with standard IL-2 conditions. Also consistent with enhanced differentiation toward an effector phenotype (32), IL-21-supplemented $\gamma\delta$ T cells showed increased expression of CD56 (Fig. 3) (and see supplemental Table S2).³

IL-21 enhances the specific antitumor cytolytic activity of V γ 9V δ 2 T cells

We next tested whether increased accumulation of lytic molecules within IL-21-treated V γ 9V δ 2 T cells could result in modulation of their specific antitumor cytolytic activity. To this end, we compared cell-mediated lysis of naturally V γ 9V δ 2 T cell-susceptible (786-0) or T cell-resistant (Raji) tumor cell targets. Although IL-21-supplemented V γ 9V δ 2 T cells did not lyse to significant extent Raji cells, their cytolytic activity against susceptible 786-0 cells was approximately five times higher than that of IL-2-supplemented cultures, when estimated as lytic units (see *Material and Methods*) (Fig. 4, A and B). Similar results were obtained with several other V γ 9V δ 2-susceptible tumor targets, such as SW-1116 (a colorectal adenocarcinoma), 769-P, G401, and G402 (renal carcinomas) (data not shown). Consistent with expression of MHC class I-specific inhibitory NK receptor, V γ 9V δ 2 T cells lyse more efficiently β_2 -microglobulin (β_2m)⁴ knockdown tumor target than wild-type ones (33). However despite modulation of some activating or inhibitory NK receptor by IL-21 (Fig. 3), IL-21 enhanced to a similar extent lysis of both wild-type and β_2m knockdown target cells (see supplemental Fig. S3).³

⁴ Abbreviation used in this paper: β_2m , β_2 -microglobulin.

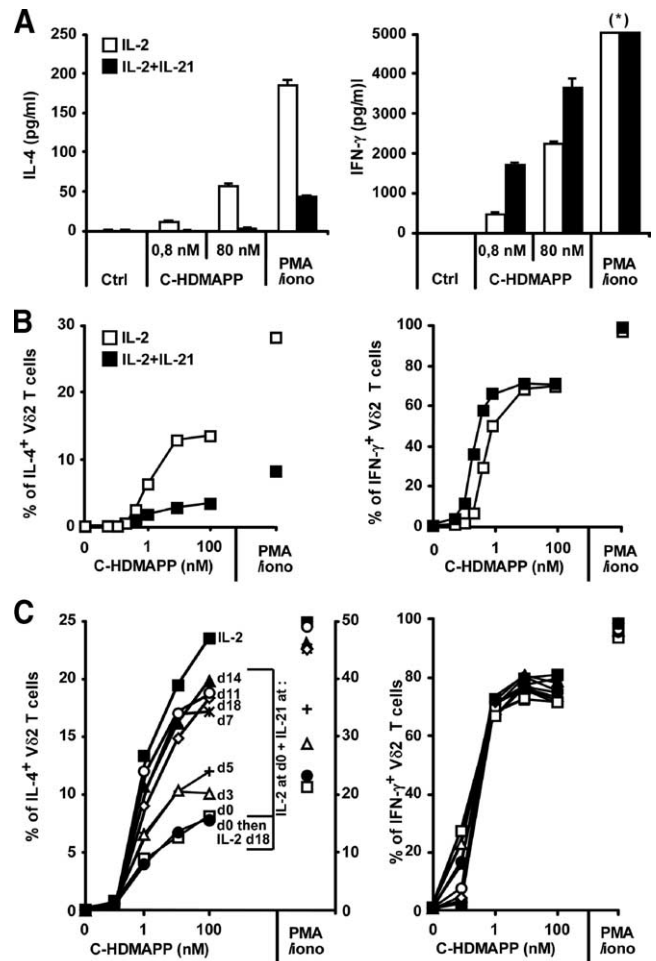


FIGURE 6. IL-21 drives V γ 9V δ 2 PBL functions toward proinflammatory Th1 responses. **A**, ELISA titrations of IL-4 (left) and IFN- γ (right) produced in culture supernatants by V γ 9V δ 2 PBL of a healthy human donor (Do#C) expanded for 34 days in IL-2- or IL-2+IL-21-supplemented medium and activated by C-HDMAPP (at 0.8 and 80 nM) or PMA/ionomycin (PMA/iono). Data are presented as the mean $\pm$ SEM of triplicate samples. Asterisk shows saturating levels of cytokines. **B**, Intracellular accumulation of IL-4 (left) and IFN- γ (right) in the same V γ 9V δ 2 PBL (IL-2 vs IL-2+IL-21) following activation by grading doses of C-HDMAPP or PMA/ionomycin (PMA/iono). **C**, Kinetics of proinflammatory Th1 programming of V γ 9V δ 2 PBL induced by IL-21. V γ 9V δ 2 PBL (Do#H) were specifically activated by C-HDMAPP in the presence of IL-2 (day 0). Expanding V γ 9V δ 2 T cells were transferred in IL-2+IL-21-supplemented medium at the indicated time points (days 3, 5, 7, 11, 14, and 18). Intracellular accumulation of IL-4 (left) and IFN- γ (right) induced following a recall activation at day 34 was measured as described in B. Scale (right side) indicates percentage of IL-4-producing $\gamma\delta$ T cells following activation by PMA/ionomycin.

Importantly, IL-21 enhanced within 16 h the specific antitumor cytolytic activity of Ag-stimulated V γ 9V δ 2 PBL expanded in IL-2. Moreover, removal of IL-21 from the culture medium lowered the cytolytic activity of V γ 9V δ 2 T cells expanded in IL-2+IL-21 to the basal levels obtained with IL-2-supplemented cultures. This response indicates that the effect of IL-21 on V γ 9V δ 2 CTL activity is a reversible process (Fig. 4C). To extend these observations, we analyzed the polarized exocytosis of secretory lysosomes by measuring cell surface mobilization of CD107a/b (also called LAMP-1/2), which correlates with functional recognition of target cells by T lymphocytes (34). V γ 9V δ 2 T cells amplified under IL-21 conditions underwent much stronger CD107a/b

degranulation when incubated with 786-0 target cells than $\gamma\delta$ T cells cultured in IL-2 alone (50.8% vs 7.3% of positive $\gamma\delta$ T cells) (Fig. 4D). Altogether, our results indicate that IL-21 can rapidly boost in a reversible fashion the specific antitumor cytolytic functions of cultured V γ 9V δ 2 T cells, presumably through up-regulation of lytic molecules production.

IL-21 drives functional programming of V γ 9V δ 2 PBL toward a proinflammatory Th1 phenotype

To better characterize the effects of IL-21 on the acquisition of particular antitumor effector functions during in vitro expansion of V γ 9V δ 2 PBL, we compared the transcriptomes of magnetically sorted Ag-stimulated V γ 9V δ 2 T cells, from three donors, expanded with either IL-2 or IL-2+IL-21 using microarrays spotted with a selected set of 1076 genes (see *Materials and Methods*). A direct comparison of the two cytokine conditions revealed few changes of the gene expression program (see supplemental Fig. S4).³ As shown in Fig. 5, IL-21 triggered a significant up-regulation in at least two of three donors of genes coding for molecules associated with a CTL proinflammatory phenotype such as granzyme B, IFN- γ , TNF- α , and CD95 ligand. STAT-3, a major target of the IL-21R signaling cascade, was also up-regulated, though to a lower extent. By contrast CD102 (ICAM-2), CXCR4, and IL-4 were strongly downmodulated by IL-21. Consistent with enhanced Th1 polarization induced by IL-21, we found by semiquantitative PCR decreased levels of mRNA coding for GATA-3, a critical transcription factor implicated in the regulation of IL-4 production by Th2 cells (data not shown).

To confirm these effects at the protein level, we performed a comparative analysis of IFN- γ (Th1) and IL-4 (Th2) production induced after a recall activation (by either C-HDMAPP or PMA/ionomycin) in resting V γ 9V δ 2 T cells that were previously expanded in IL-2 vs IL-2+IL-21. ELISA titrations in culture supernatants (Fig. 6A) and intracellular stainings for IFN- γ and IL-4 (Fig. 6B) (see also supplemental Fig. S5A)³ indicated that 10–20% of IL-2 supplemented $\gamma\delta$ T cells produced IL-4 following phosphoantigen stimulation. By contrast IL-21-supplemented cultures produced almost exclusively IFN- γ , thus indicating enhanced Th1 polarization. Accordingly IL-2+IL-21-supplemented $\gamma\delta$ T cells yielded enhanced tumor-induced IFN- γ responses, when compared with IL-2 cultures (see supplemental Fig. S5B).³

We next sought to establish whether, similarly to cytolytic effector function, such a biased Th1 polarization could be induced or reverted by either short-term exposure or removal of IL-21. To this end, we performed kinetics experiments in which IL-21 was added at different time points following the initial C-HDMAPP activation (day 0) in the presence of IL-2. As shown in Fig. 6C, IL-21 induced Th1 polarization of day 0, day 3, and day 5 cultures (also see supplemental Fig. S5C).³ However IL-21 was no longer able to inhibit IL-4 programming of V γ 9V δ 2 T cells cultured at least for 1 wk in IL-2. Moreover, removal of IL-21 from cells expanded in both IL-2 and IL-21 did not restore IL-4 responses, even after 2 wk of culture in IL-2 alone. Importantly, these results could not be accounted for the production of IL-21 by V γ 9V δ 2 T cells (data not shown).

Discussion

The primary aim of this study was to design improved $\gamma\delta$ T cell based immunotherapeutic approaches combining synthetic $\gamma\delta$ agonists and cytokines known to stimulate effector functions associated with enhanced tumor clearance. To this end, IL-21 represented an interesting candidate as it was shown not only to trigger proliferation of NK cells and Ag-stimulated T cells but also to boost their cytolytic properties and particular cytokine responses.

Although our results extend to the $\gamma\delta$ system several properties of IL-21 described for other lymphoid subsets, they bring new insights into the role played by this cytokine in the acquisition or potentiation of unexpected functions by in vitro expanded $\gamma\delta$ T cells. In particular we show that IL-21 up-regulated in a rapid and reversible way antitumor properties and cytolytic effector functions of V γ 9V δ 2 T cells. Moreover IL-21 enhanced in a slower and irreversible way Th1 differentiation of V γ 9V δ 2 cells stimulated by Ag and IL-2. On a more applied standpoint, these results allowed us to propose new protocols leading to large scale expansion of $\gamma\delta$ T cells with enhanced antitumor properties, that could be easily set up under clinical grade conditions.

Because IL-21 was previously shown to trigger proliferation of Ag-stimulated $\gamma\delta$ T cells, we initially tested whether this cytokine could be used for large scale expansion of these lymphocytes. In line with previous reports, IL-21 induced short-term proliferation of Ag-stimulated $\gamma\delta$ T cells. However, unlike IL-2, IL-21 failed to induce efficient and long-term amplification of stimulated $\gamma\delta$ T cells. This result lead us to further assess the combined effect of IL-21 and IL-2 on the proliferation of Ag-stimulated $\gamma\delta$ T cells and to compare the functional properties of $\gamma\delta$ T cells cultured with either IL-2, IL-21, or both cytokines.

In agreement with previously published data, short-term $\gamma\delta$ T cell cultures stimulated in the presence of IL-21 alone were enriched for lymphocytes with a central memory (CD27⁺CD45RA⁺) phenotype, which could reflect polarization toward a follicular helper phenotype, as suggested by enhanced CXCL13 production (20). By contrast, whereas the combination of IL-2 and IL-21 allowed strong expansion of Ag-stimulated $\gamma\delta$ T cells, most actively dividing cells displayed an effector memory (CD27⁺CD45RA⁺) phenotype. Because these features were very similar to those of IL-2-supplemented cultures, we tested whether the combination of IL-21 and IL-2 could induce acquisition of unique properties by stimulated $\gamma\delta$ cells. In line with previous studies performed on NK, NKT, or CD8⁺ T cells (23, 26, 35), IL-21+IL-2-supplemented $\gamma\delta$ T cells showed up-regulation of 2B4 (CD244), NKG2A, and ILT2 and downmodulation of NKG2D, when compared with IL-2-supplemented cultures. The functional significance of these phenotypic alterations are still unclear; in particular, although several of these NK receptors are known to either enhance or inhibit cytotoxicity upon engagement by β_2 m-associated molecules (33), differential susceptibility of β_2 m knockdown vs wild-type targets to V γ 9V δ 2 lysis was not affected by IL-21+IL-2 treatment, when compared with IL-2 alone.

One of the most striking effects induced by IL-21+IL-2 on stimulated $\gamma\delta$ T cells was a dramatic increase of cytotoxic activity associated with enhanced tumor cell killing. This activity could be due to several nonexclusive mechanisms. IL-21 may increase the overall target avidity of V γ 9V δ 2 effectors. This enhanced activity could be explained by increased expression of either CD95 ligand or TRAIL whose transcript levels were enhanced in $\gamma\delta$ T cells by IL-21 treatment. However, we failed to detect increased expression of either these molecules at the protein level. Moreover, blocking Abs directed against CD95 ligand and TRAIL did not affect renal carcinoma cell lysis by IL-21-treated $\gamma\delta$ T cells, suggesting a minor role played by either of these two candidates. CD56, which is up-regulated by IL-21, is known to establish homotypic interactions that could enhance binding of V γ 9V δ 2 T cells to CD56⁺ tumors. Increased CD56 expression may also reflect differentiation into effectors with enhanced cytolytic potential, as suggested by several studies (32, 36). Accordingly, IL-2+IL-21-expanded V γ 9V δ 2 T cells showed strong up-regulation of several cytotoxic effector molecules, such as granzyme A, granzyme B, and perforin. Although a similar up-regulation of these molecules was previously reported in other IL-21-treated cell subsets, strong

downmodulation of granzyme B by IL-21 was recently described by Hinrichs et al. (37). These different behaviors might be explained by the cell differentiation status or the cytokinetic context: whereas IL-21 may inhibit acquisition of cytolytic effector functions during priming of naive precursors, it may have an opposite affect on memory T cells, as it typically the case here. Moreover, IL-21 might repress effector functions when used alone but enhance them when used in conjunction with IL-2. The mechanisms underlying coinduction or corepression of these effectors properties by IL-21 remain unclear but could involve modulation of several transcription factors known to control expression of perforin and granzyme and to be regulated by IL-21, such as Eomesodermin (37–39) or STAT factors (40–42). In any case, the fact that IL-21 up-regulated within a few hours of granzyme and perforin expression on established $\gamma\delta$ T cell clones and purified polyclonal lines indicates that this process is a direct consequence of IL-21R signaling on $\gamma\delta$ T cells, even though we failed to detect any surface expression of this receptor on these lymphocytes. However, the results of RT-PCR assays indicate that V γ 9V δ 2 T cells express substantial levels of the mRNA transcripts encoding for the specific IL-21R chain (data not shown).

Quite unexpectedly, granzyme and perforin expression in IL-21+IL-2-supplemented cultures returned to baseline levels found in IL-2-treated cells upon removal of IL-21. It will be interesting to determine whether this reversible phenomenon, which to our knowledge has not been reported before, parallels downmodulation or upmodulation of the previously mentioned transcription factors. In line with their enhanced cytolytic potential, IL-21+IL-2-treated $\gamma\delta$ T cells showed dramatically enhanced tumor-induced degranulation and cytotoxicity against most V γ 9V δ 2-susceptible tumor targets. Again in this study, this phenomenon was observed within a few hours after exposure to IL-21 and was reversible. Quite interestingly, IL-21 not only increased the percentage of $\gamma\delta$ T cells able to translocate CD107a/b to their surface upon tumor recognition, but also increased the surface expression levels of CD107a/b among positive cells, thus suggesting an overall increase in cytotoxic lysosomal granule production (34).

V γ 9V δ 2 T cells are classically considered as proinflammatory Th1 memory cells, able to readily produce TNF- α , IFN- γ but no IL-4 or IL-13 upon ex vivo Ag stimulation (43). For yet unknown reasons, these cells rapidly and stably acquire the capacity to produce IL-4 upon in vitro culture in IL-2 (44). This induced IL-4 production was strongly and irreversibly inhibited by IL-21 when the latter was added early after Ag stimulation of V γ 9V δ 2 T cells in IL-2-supplemented medium. By contrast IFN- γ production was either unaffected or enhanced by addition of IL-21 early after in vitro culture. This observation is reminiscent of previous studies describing enhancement of either Th1 or Th2 polarization by IL-21 (39, 45–47). Altogether, these data suggest that IL-21 is not a primary modulator of Th1/Th2 programming but may strengthen precommitment of memory cells toward either profile. By contrast, IL-21 might inhibit both Th1 and Th2 polarization of naive T cells, and favor instead their programming toward IL-17 production, as suggested by several studies (25). It remains to be determined whether IL-21 acts directly or indirectly on $\gamma\delta$ polarization. The fact that IL-21-induced inhibition of IL-4 occurred only when this cytokine was added from the beginning of the culture supports an indirect effect, possibly mediated by APC present in this system. Such an assumption will need to be confirmed through analysis of purified ex vivo $\gamma\delta$ T cells.

On an applied standpoint, IL-21 did not allow long-term expansion of Ag-stimulated $\gamma\delta$ T cells at least in vitro. This departs from previous studies describing efficient proliferation of NK and CD8⁺ T cells (21, 48, 49). This apparent discrepancy could reflect in-

volvement of cofactors not provided in the present study. Irrespective of this issue, IL-21 could nevertheless be used in conjunction with IL-2 because it did not inhibit long-term expansion of V γ 9V δ 2 T cells in the presence of the latter cytokine. In functional terms, IL-21 could rapidly up-regulate cytolytic function and antitumor killing mediated by V γ 9V δ 2 T cells; this effect was extremely rapid and could be obtained even on cultured/preactivated cells that had not been exposed before to this cytokine. Therefore, in vitro IL-21 pretreatment of expanded $\gamma\delta$ T cells could be exploited in passive immunotherapeutic settings to enhance the antitumor efficacy of adoptively transferred $\gamma\delta$ T cells, although this effect might be rapidly lost after in vivo transfer. IL-21 could be also used in conjunction with V γ 9V δ 2 agonists to potentiate in vivo cytotoxic programming of V γ 9V δ 2 T cells. In addition, based on our in vitro findings, IL-21 might enhance IFN- γ response of V γ 9V δ 2 T cells when coadministered with V γ 9V δ 2 agonists and IL-2. This response could be readily tested in nonhuman primates owing to the availability of GMP-grade cytokines and $\gamma\delta$ T cell agonists. Nevertheless one should be aware that IL-21 can boost proliferation of some V γ 9V δ 2-susceptible tumors such as multiple myeloma (50), thus precluding its use in vivo in this particular indications.

In conclusion our results indicate that IL-21 could be combined with IL-2 during specific in vitro expansion strategies to boost direct and indirect antitumor properties of human V γ 9V δ 2 T cells. This cytokine might therefore represent a candidate of choice that should be tested for optimization of $\gamma\delta$ T cell-based immunotherapeutic protocols.

Acknowledgments

We thank Sophie Allain and Dr. Marie-Claire Devilder for expert technical assistance.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Constant, P., F. Davodeau, M. A. Peyrat, Y. Poquet, G. Puzo, M. Bonneville, and J. J. Fournie. 1994. Stimulation of human $\gamma\delta$ T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 264: 267–270.
- Begley, M., C. G. Gahan, A. K. Kollas, M. Hintz, C. Hill, H. Jomaa, and M. Eberl. 2004. The interplay between classical and alternative isoprenoid biosynthesis controls $\gamma\delta$ T cell bioactivity of *Listeria monocytogenes*. *FEBS Lett.* 561: 99–104.
- Bonneville, M., and J. J. Fournie. 2005. Sensing cell stress and transformation through V γ 9V δ 2 T cell-mediated recognition of the isoprenoid pathway metabolites. *Microbes Infect.* 7: 503–509.
- Espinosa, E., C. Belmant, F. Pont, B. Luciani, R. Poupot, F. Romagne, H. Brailly, M. Bonneville, and J. J. Fournie. 2001. Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human $\gamma\delta$ T cells. *J. Biol. Chem.* 276: 18337–18344.
- Kunzmann, V., E. Bauer, J. Feurle, F. Weissinger, H. P. Tony, and M. Wilhelm. 2000. Stimulation of $\gamma\delta$ T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* 96: 384–392.
- Gober, H. J., M. Kistowska, L. Angman, P. Jen, L. Mori, and G. De Libero. 2003. Human T cell receptor $\gamma\delta$ cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J. Exp. Med.* 197: 163–168.
- Bonneville, M., and E. Scotet. 2006. Human V γ 9V δ 2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Curr. Opin. Immunol.* 18: 539–546.
- Thedrez, A., C. Sabourin, J. Gertner, M. C. Devilder, S. Allain-Maillet, J. J. Fournie, E. Scotet, and M. Bonneville. 2007. Self/non-self discrimination by human $\gamma\delta$ T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunol. Rev.* 215: 123–135.
- Scotet, E., S. Nedellec, M. C. Devilder, S. Allain, and M. Bonneville. 2008. Bridging innate and adaptive immunity through $\gamma\delta$ T-dendritic cell crosstalk. *Front. Biosci.* 13: 6872–6885.
- Sicard, H., S. Ingoure, B. Luciani, C. Serraz, J. J. Fournie, M. Bonneville, J. Tiollier, and F. Romagne. 2005. In vivo immunomanipulation of V γ 9V δ 2 T cells with a synthetic phosphoantigen in a preclinical nonhuman primate model. *J. Immunol.* 175: 5471–5480.
- Casetti, R., G. Perretta, A. Taglion, M. Mattei, V. Colizzi, F. Dieli, G. D'Offizi, M. Malkovsky, and F. Poccia. 2005. Drug-induced expansion and differentiation of V γ 9V δ 2 T cells in vivo: the role of exogenous IL-2. *J. Immunol.* 175: 1593–1598.

12. Viey, E., C. Laplace, and B. Escudier. 2005. Peripheral $\gamma\delta$ T-lymphocytes as an innovative tool in immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 5: 973–986.
13. Salot, S., C. Laplace, S. Saiagh, S. Bercegeay, I. Tenaud, A. Cassidianus, F. Romagne, B. Dreno, and J. Tiollier. 2007. Large scale expansion of $\gamma\delta$ T lymphocytes: Innacell $\gamma\delta$ cell therapy product. *J. Immunol. Methods* 326: 63–75.
14. Bouet-Toussaint, F., F. Cabillic, O. Toutirais, M. Le Gallo, C. Thomas de la Piniere, P. Daniel, N. Genetet, B. Meunier, E. Dupont-Bierre, K. Boudjema, and V. Catros. 2007. $V\gamma 9V\delta 2$ T cell-mediated recognition of human solid tumors: potential for immunotherapy of hepatocellular and colorectal carcinomas. *Cancer Immunol. Immunother.* 57: 531–539.
15. Burjanadze, M., M. Condomines, T. Reme, P. Quittet, P. Latry, C. Lugagne, F. Romagne, Y. Morel, J. F. Rossi, B. Klein, and Z. Y. Lu. 2007. In vitro expansion of $\gamma\delta$ T cells with anti-myeloma cell activity by Phosphostim and IL-2 in patients with multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 139: 206–216.
16. Kobayashi, H., Y. Tanaka, J. Yagi, Y. Osaka, H. Nakazawa, T. Uchiyama, N. Minato, and H. Toma. 2007. Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using $\gamma\delta$ T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol. Immunother.* 56: 469–476.
17. Bennouna, J., E. Bompas, E. M. Neidhardt, F. Rolland, I. Philip, C. Galea, S. Salot, S. Saiagh, M. Audrain, M. Rimbart, et al. 2008. Phase-I study of Innacell $\gamma\delta$ trade mark, an autologous cell-therapy product highly enriched in $\gamma\delta$ T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 57: 1599–1609.
18. Wilhelm, M., V. Kunzmann, S. Eckstein, P. Reimer, F. Weissinger, T. Ruediger, and H. P. Tony. 2003. $\gamma\delta$ T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 102: 200–206.
19. Dieli, F., D. Vermijlen, F. Fulfaro, N. Caccamo, S. Meraviglia, G. Cicero, A. Roberts, S. Buccheri, M. D'Asaro, N. Gebbia, et al. 2007. Targeting human $\gamma\delta$ T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 67: 7450–7457.
20. Vermijlen, D., P. Ellis, C. Langford, A. Klein, R. Engel, K. Willmann, H. Jomaa, A. C. Hayday, and M. Eberl. 2007. Distinct cytokine-driven responses of activated blood $\gamma\delta$ T cells: insights into unconventional T cell pleiotropy. *J. Immunol.* 178: 4304–4314.
21. Zeng, R., R. Spolski, S. E. Finkelstein, S. Oh, P. E. Kovanen, C. S. Hinrichs, C. A. Pise-Masison, M. F. Radonovich, J. N. Brady, N. P. Restifo, et al. 2005. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8⁺ T cell expansion and function. *J. Exp. Med.* 201: 139–148.
22. Smyth, M. J., M. E. Wallace, S. L. Nutt, H. Yagita, D. I. Godfrey, and Y. Hayakawa. 2005. Sequential activation of NKT cells and NK cells provides effective innate immunotherapy of cancer. *J. Exp. Med.* 201: 1973–1985.
23. Coquet, J. M., K. Kyriakoudis, D. G. Pellicci, G. Besra, S. P. Berzins, M. J. Smyth, and D. I. Godfrey. 2007. IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production. *J. Immunol.* 178: 2827–2834.
24. Eberl, M., R. Engel, E. Beck, and H. Jomaa. 2002. Differentiation of human $\gamma\delta$ T cells towards distinct memory phenotypes. *Cell Immunol.* 218: 1–6.
25. Leonard, W. J., R. Zeng, and R. Spolski. 2008. Interleukin 21: a cytokine/cytokine receptor system that has come of age. *J. Leukocyte Biol.* 84: 348–356.
26. Skak, K., K. S. Frederiksen, and D. Lundsgaard. 2008. Interleukin-21 activates human natural killer cells and modulates their surface receptor expression. *Immunology* 123: 575–583.
27. Ma, H. L., M. J. Whitters, R. F. Konz, M. Senices, D. A. Young, M. J. Grusby, M. Collins, and K. Dunussi-Joannopoulos. 2003. IL-21 activates both innate and adaptive immunity to generate potent antitumor responses that require perforin but are independent of IFN- γ . *J. Immunol.* 171: 608–615.
28. Casey, K. A., and M. F. Mescher. 2007. IL-21 promotes differentiation of naive CD8 T cells to a unique effector phenotype. *J. Immunol.* 178: 7640–7648.
29. Boedec, A., H. Sicard, J. Dessolin, G. Herbette, S. Ingoure, C. Raymond, C. Belmant, and J. L. Kraus. 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.
30. Davodeau, F., M. A. Peyrat, M. M. Hallet, J. Gaschet, I. Houde, R. Vivien, H. Vie, and M. Bonneville. 1993. Close correlation between Daudi and mycobacterial antigen recognition by human $\gamma\delta$ T cells and expression of V9JPC1/ γ V2DJC8-encoded T cell receptors. *J. Immunol.* 151: 1214–1223.
31. Friberg, D. D., J. L. Bryant, and T. L. Whiteside. 1996. Measurements of natural killer (NK) activity and NK-cell quantification. *Methods* 9: 316–326.
32. Alexander, A. A., A. Maniar, J. S. Cummings, A. M. Hebbeler, D. H. Schulze, B. R. Gastman, C. D. Pauza, S. E. Strome, and A. I. Chapoval. 2008. Isopentenyl pyrophosphate-activated CD56⁺ $\gamma\delta$ T lymphocytes display potent antitumor activity toward human squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 14: 4232–4240.
33. Trichet, V., C. Benezech, C. Doussset, M. C. Gesnel, M. Bonneville, and R. Breathnach. 2006. Complex interplay of activating and inhibitory signals received by $V\gamma 9V\delta 2$ T cells revealed by target cell β_2 -microglobulin knockdown. *J. Immunol.* 177: 6129–6136.
34. Rubio, V., T. B. Stuge, N. Singh, M. R. Betts, J. S. Weber, M. Roederer, and P. P. Lee. 2003. Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. *Nat. Med.* 9: 1377–1382.
35. Burgess, S. J., A. I. Marusina, I. Pathmanathan, F. Borrego, and J. E. Coligan. 2006. IL-21 down-regulates NKG2D/DAP10 expression on human NK and CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 176: 1490–1497.
36. Pittet, M. J., D. E. Speiser, D. Valmori, J. C. Cerottini, and P. Romero. 2000. Cutting edge: cytolytic effector function in human circulating CD8⁺ T cells closely correlates with CD56 surface expression. *J. Immunol.* 164: 1148–1152.
37. Hinrichs, C. S., R. Spolski, C. M. Paulos, L. Gattinoni, K. W. Kerstann, C. D. Palmer, C. A. Klebanoff, S. A. Rosenberg, W. J. Leonard, and N. P. Restifo. 2008. IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8⁺ T cells for adoptive immunotherapy. *Blood* 111: 5326–5333.
38. Pearce, E. L., A. C. Mullen, G. A. Martins, C. M. Krawczyk, A. S. Hutchins, V. P. Zediak, M. Banica, C. B. DiCioccio, D. A. Gross, C. A. Mao, et al. 2003. Control of effector CD8⁺ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* 302: 1041–1043.
39. Suto, A., A. L. Wurster, S. L. Reiner, and M. J. Grusby. 2006. IL-21 inhibits IFN- γ production in developing Th1 cells through the repression of Eomesodermin expression. *J. Immunol.* 177: 3721–3727.
40. Demoulin, J. B., E. Van Roost, M. Stevens, B. Groner, and J. C. Renauld. 1999. Distinct roles for STAT1, STAT3, and STAT5 in differentiation gene induction and apoptosis inhibition by interleukin-9. *J. Biol. Chem.* 274: 25855–25861.
41. Yu, C. R., J. R. Ortaldo, R. E. Curiel, H. A. Young, S. K. Anderson, and P. Gosselin. 1999. Role of a STAT binding site in the regulation of the human perforin promoter. *J. Immunol.* 162: 2785–2790.
42. Morishima, N., T. Owaki, M. Asakawa, S. Kamiya, J. Mizuguchi, and T. Yoshimoto. 2005. Augmentation of effector CD8⁺ T cell generation with enhanced granzyme B expression by IL-27. *J. Immunol.* 175: 1686–1693.
43. Battistini, L., G. Borsellino, G. Sawicki, F. Poccia, M. Salvetti, G. Ristori, and C. F. Brosnan. 1997. Phenotypic and cytokine analysis of human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells expressing NK cell receptors. *J. Immunol.* 159: 3723–3730.
44. Devilder, M. C., S. Maillat, I. Bouyge-Moreau, E. Donnadieu, M. Bonneville, and E. Scotet. 2006. 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.* 176: 1386–1393.
45. Wurster, A. L., V. L. Rodgers, A. R. Satoskar, M. J. Whitters, D. A. Young, M. Collins, and M. J. Grusby. 2002. Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon γ -producing Th1 cells. *J. Exp. Med.* 196: 969–977.
46. Monteleone, G., I. Monteleone, D. Fina, P. Vavassori, G. Del Vecchio Blanco, R. Caruso, R. Tersigni, L. Alessandroni, L. Biancone, G. C. Naccari, et al. 2005. Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon- γ production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 128: 687–694.
47. Pesce, J., M. Kaviratne, T. R. Ramalingam, R. W. Thompson, J. F. Urban, Jr., A. W. Cheever, D. A. Young, M. Collins, M. J. Grusby, and T. A. Wynn. 2006. The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. *J. Clin. Invest.* 116: 2044–2055.
48. Toomey, J. A., F. Gays, D. Foster, and C. G. Brooks. 2003. Cytokine requirements for the growth and development of mouse NK cells in vitro. *J. Leukocyte Biol.* 74: 233–242.
49. Moroz, A., C. Eppolito, Q. Li, J. Tao, C. H. Clegg, and P. A. Shrikant. 2004. IL-21 enhances and sustains CD8⁺ T cell responses to achieve durable tumor immunity: comparative evaluation of IL-2, IL-15, and IL-21. *J. Immunol.* 173: 900–909.
50. Brenne, A. T., T. B. Ro, A. Waage, A. Sundan, M. Borset, and H. Hjorth-Hansen. 2002. Interleukin-21 is a growth and survival factor for human myeloma cells. *Blood* 99: 3756–3762.

II. Brevet : Anti-CD277 antibodies and uses thereof

Co-inventeurs (20% chaque) : Harly C, Guillaume Y, Scotet E, Bonneville M, Olive D.

Déposé.

Anti-CD277 antibodies and uses thereof

FIELD OF THE INVENTION

5

The invention relates to anti-CD277 antibodies and uses thereof.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10

White blood cells are cells of the immune system involved in defending the body against pathogens. Among these cells, lymphocytes, monocytes, and dendritic cells can be cited. Monocytes may migrate from the bloodstream to other tissues and differentiate into tissue resident macrophages or dendritic cells. Dendritic cells play a role as antigen presenting cells (APC) that activate lymphocytes. Among lymphocytes, T cells can be divided into $\gamma\delta$ T cells and $\alpha\beta$ T cells.

15

V γ 9/V δ 2 T cells are important effectors of the immune defence. They lyse directly pathogen infected or abnormal cells. In addition, they regulate immune responses by inducing dendritic cell (DC) maturation as well as the isotypic switching and immunoglobulin production. This important cell platform of the immune system is strictly regulated by surface receptors, chemokines and cytokines.

20

The priming of T cells is modulated by involvement of specialised cells and secretion of chemotactic cytokines. Nowadays, we know that T-cell activation is the result of two synergistic events. The first is the interaction between the receptor of T cell (TCR) and the major histocompatibility complex (MHC) conjugated with processed antigen on the surface of the antigen presenting cells (APC). The second event is a co-stimulatory antigen-independent signal involving B7 molecules. The lack of co-stimulatory signal induces anergy, i.e. the inhibition of T cells proliferation, cytokines secretion and cytotoxic activities. The study of these pathways may provide insight about the triggering of pathologic events, such as autoimmune or lymphoproliferative disorders.

25

30

The B7 family is an extended group of costimulatory molecules (Coyle et al., 2001). To the B7 family belong the ligands B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86): their receptors are CD28, which leads to T cell activation (Linsley and Ledbetter, 1993, June, et al., 1994, Lenschow et al., 1996), and CTLA-4 (CD152), which competes with CD28 and transduces an inhibitory signal (Waterhouse et al., 1996). The critical role of CD152 as a negative regulator of T cell activation is demonstrated by the occurrence of lymphoproliferative disorders in CTLA-4 deficient mice (Waterhouse et al., 1995). Most data on the inhibitory function exerted by CD152 are gathered from studies of proliferation or cytokine production by naïve T lymphocytes during T cell priming (Linsley et al., 1992, Walunas et al., 1995, Walunas and Bluestone, 1998). In particular, CD152 is expressed following T-lymphocyte activation and inhibits the cytolytic functions of CTL clones obtained following PHA stimulation or Ag selection (Saverino et al., 1998).

B7-H1 (PD-L1, CD274) and B7-DC (PD-L2, CD273), whose receptor is PD-1 (CD279), proved to inhibit T-cell proliferation and cytokine secretion (Freeman et al., 2000, Latchman et al., 2001). Otherwise, different studies showed that PD-L1 and PD-L2 engagement increase T cell proliferation and IL-10 or IFN- γ production (Dong et al., 1999, Freeman et al., 2000, Latchman et al., 2001, Chapoval et al., 2001, Tseng et al., 2001). Other molecules related to the family B7 expressed on the surface of T cells are B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4 whose roles are not fully understood (Hutloff et al., 1999, Sun et al., 2002).

Henry et al. (1999) found that the region coding for butyrophilin (BT) is located at a telomeric position from the MHC class I region on human chromosome 6. In particular they described two genes *Bt2* and *Bt3*, coding for a new group of co-stimulatory molecules (BT2.1, BT2.2, BT2.3, BT3.1, BT3.2 and BT3.3) belonging to the Ig superfamily (IgSF) (Williams and Barclay, 1988) and related to B7 family by sequence similarity analysis: in particular, it shows similarity with the Ig-V like extracellular domain of CD80 and CD86 (Linsley et al., 1992).

The BT3 family members appear in literature with different names: BT3.1 is also called BTF5 (Rhodes et al., 2001), or BTN3A1 (Ruddy et al., 1997), or more recently CD277 (Bensussan and Olive, 2005); BT3.2 is also called BTF4 (Rhodes et al., 2001), or BTN3A2 (Ruddy et al., 1997); and, finally, BT3.3 appears also as BTF3 (Rhodes et al.,

2001) or BTN3A3 (Ruddy et al., 1997). BT3 has two Ig-like extracellular domains that characterize the IgSF.

It has been proposed that *b7* genes and MHC class I and II genes may have a common ancestral gene and could encode for proteins involved in similar function, such as T cell activation (Rhodes et al., 2001). BT3 molecules have been found on immune cells, such as T, B and NK cells, monocytes and dendritic cells as well as hematopoietic precursors and some neoplastic cell lines (Compte et al., 2004). As for other co-stimulatory molecules, their structure is characterized by three domains: an extracellular domain to bind the ligand, a transmembrane domain and an intracellular domain termed B30.2 which is presumably involved in the regulation of intracellular superoxide concentrations (Henry et al., 1998). So far, the ligand(s) of CD277 is still unknown.

To date, no satisfactory approach has been proven to induce potent immune responses against vaccines, especially in cancer patients. Methods have yet to be devised to overcome the immunosuppressive mechanisms observed in cancer patients, and during chronic infections.

Treatment of autoimmune diseases and prevention of transplantation rejection in graft versus host diseases (GVHD) depends on immunosuppressive agents that have serious side effects, or are not always effective. New immunosuppressive agents are desired.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to an anti-CD277 antibody, which activates or inhibits the cytolytic function, cytokine production and proliferation of V γ 9/V δ 2 T cells. The present invention also relates to an anti-CD277 antibody, which costimulates T cells together with CD3-TCR, and/or which costimulates T cells in addition to CD28-B7 costimulation. The present invention also relates to an anti-CD277 antibody, which increases the activity and/or survival of monocytes and dendritic cells.

Preferably, the antibody according to the invention is an anti-CD277 antibody, which:
- activates the cytolytic function of V γ 9/V δ 2 T cells, and

- costimulates T cells together with CD3-TCR, and
- costimulates T cells in addition to CD28-B7 costimulation, and
- increases the activity and/or survival of monocytes and dendritic cells.

5

Particularly, the present invention relates to an anti-CD277 antibody (chosen from mAbs 20.1, 7.2 and 103.2) which is obtainable from one of the hybridomas accessible under CNCM deposit number I-4401, I-4402 and I-4403.

10 The invention also relates to an anti-CD277 antibody which comprises the CDRs of mAb 20.1. The invention also relates to an anti-CD277 antibody which comprises the CDRs of mAb 7.2. The invention also relates to an anti-CD277 antibody which comprises the CDRs of mAb 103.2.

The invention also relates to one of the mAbs 20.1, 7.2 and 103.2, or a derivative thereof, for the use in therapy.

15

The invention relates to one of the mAbs 20.1 and 7.2, or a derivative thereof, for use for the treatment of a cancer or a chronic infection.

The invention relates to a vaccine for the treatment of a cancer or a chronic infection comprising one of the mAbs 20.1 and 7.2, or a derivative thereof. The invention relates to a kit for the treatment of a cancer or a chronic infection comprising:

20

- a) mAb 20.1 or 7.2 or a derivative thereof; and
- b) a vaccine for the treatment of a cancer or a chronic infection.

25 The invention relates to an anti-CD277 antibody as defined above for the use in therapy.

The invention finally relates to an anti-CD277 antibody which inhibits the functions of V γ 9/V δ 2 T cells, particularly for use for the treatment of an autoimmune disease, transplantation rejection or a graft versus host disease.

30

Modalités d'activation et fonctions des lymphocytes T $\gamma\delta$ humains

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$), situés à l'interface entre l'immunité innée et adaptative, sont capables de répondre à divers types de stimulations antigéniques, reflétant leur implication probable dans de nombreux contextes physiopathologiques infectieux ou tumoraux. Leurs modalités fines d'activation sont actuellement peu claires, mais leurs propriétés phénotypiques et fonctionnelles en font des acteurs potentiellement cruciaux de la réponse immunitaire. L'étude des modalités d'activation des LT $\gamma\delta$ représente un enjeu actuel important pour la compréhension de la biologie de ces cellules et l'évaluation de leur potentiel thérapeutique.

Ce travail de thèse porte sur les modalités d'activation de plusieurs sous-populations de LT $\gamma\delta$ humains, et a conduit à l'identification de trois acteurs majeurs dans ces processus. Ainsi, (i) la reconnaissance d'ILT2 à la surface de cellules lymphoïdes B via les molécules de CMH de classe I est essentielle à l'activation de LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg}, (ii) la reconnaissance d'EphA2 exprimée par des cellules tumorales épithéliales joue un rôle clé dans l'activation de sous-populations de LT V δ 1^{pos}, (iii) et l'expression de CD277 par les cellules cibles est nécessaire à leur reconnaissance spécifique par les LT $\gamma\delta$ V δ 2^{pos}.

Cependant, les mécanismes impliquant ces différentes molécules dans le processus d'activation des LT $\gamma\delta$ demeurent peu clairs et feront l'objet de travaux à venir. Ces données permettront d'évaluer le rôle de ces acteurs moléculaires et cellulaires *in vivo*, ainsi que leur potentiel immunothérapeutique dans diverses pathologies humaines.

Mots clés : Homme; lymphocyte T gamma delta; récepteur des cellules T; antigène; costimulation; activation.

Activation modalities and function of human $\gamma\delta$ T cells

$\gamma\delta$ T lymphocytes ($\gamma\delta$ TL), stand in between innate and adaptative immunity. These lymphocytes are able to respond to various antigenic stimulations which reflects their potential implication in many infectious and tumoral physiopathological contexts. Fine activation modalities of these cells remain unclear, although their phenotypical and functional properties turn them potentially into pivotal players of the immune response. Understanding the modalities of activation of $\gamma\delta$ TL currently represents an important issue for understanding the biology of these cells and evaluation of their therapeutical potential.

The work achieved in this thesis is focused on the activation modalities of several human $\gamma\delta$ TL subsets, and leads to the identification of three major molecular players in these processes. (i) ILT2 expressed at the cell surface of B cell lines is essential for the activation of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ TL, (ii) EphA2 expressed by epithelial tumor cells is a key partner of V δ 1^{pos} $\gamma\delta$ TL activation, (iii) expression of CD277 by target cells is mandatory for their specific recognition by V δ 2^{pos} $\gamma\delta$ TL.

However, the mechanisms implying these molecules in $\gamma\delta$ TL activation processes remain still to be clearly defined and will be analyzed in further investigations. The expected results should lead to the evaluation of the role of these molecular and cellular players *in vivo*, along with their immunotherapeutical potential in various human pathologies.

Key words : Human; gamma delta T cell; T cell receptor; antigen; costimulation; activation.