UNIVERSITE TOULOUSE III
PAUL SABATIER
UFR SVT

THESE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE TOULOUSE III

DISCIPLINE : IMMUNOLOGIE

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PAR

ERIC ESPINOSA

septembre 2002

Titre : Activation et mode d'activation des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ humains par les phosphoantigènes

JURY

Rapporteurs :	Mme Marie-Paule Lefranc	Professeur Université Montpellier II
	M. Jean-François Moreau	Professeur Université Bordeaux II
Examinateurs :	M. Salvatore Valitutti	Professeur Université Toulouse III
	M. Marc Bonneville	Directeur de Recherche CNRS, INSERM U463, Nantes
	Mme Virginie Lafont	Chargée de Recherche, INSERM U431 Montpellier
Directeur de thèse :	M. Jean-Jacques Fournié	Directeur de Recherche CNRS, INSERM U 563, CPTP Toulouse.

AUTEUR : Eric Espinosa

TITRE : Activation et mode d'activation des LT γ9δ2 par les phosphoantigènes

DIRECTEUR DE THESE : Jean-Jacques Fournié

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toulouse, septembre 2002

RESUME

Les LT γ9δ2 sont des cellules cytotoxiques impliquées dans la réponse immunitaire à de nombreux pathogènes et cellules tumorales. Ils reconnaissent des antigènes solubles, non peptidiques et de faible masse moléculaire comme les phosphoantigènes, les aminobiphosphonates et les alkylamines. Parmi les phosphoantigènes naturels les plus puissants, on trouve le 3-formyl-1-butylpyrophosphate produit par *M.tuberculosis* et *E.coli*. Des analogues de synthèse comme les phosphohalohydrines présentent les mêmes propriétés biologiques et pourraient être utilisés en immunothérapie. La reconnaissance de ces antigènes ne requiert pas de présentation par des molécules du CMH ou apparentées connues à ce jour. Elle est extrêmement sélective mais fait paradoxalement preuve d'une large dégénérescence. Néanmoins, ont peut dégager trois points essentiels associés à l'activation des LT γ9δ2 en réponse aux phosphoantigènes : répondre à une contrainte topologique, posséder une réactivité chimique (qui conditionne la bioactivité du ligand) et présenter d'une moitié pyrophosphate hydrolysable. Si le partenaire du TCR γ9δ2 (en tant que molécule présentatrice ou accessoire) reste inconnu, un contact cellulaire demeure cependant nécessaire et aboutit à la formation d'une synapse immunologique particulière avec la cellule cible. Nous montrons que lors de cette interaction du matériel membranaire de la cible est transféré à la surface du LT γ9δ2. Ce transfert synaptique est un mécanisme actif, impliquant le cytosquelette et qui est moins régulé que d'autres réponses biologiques puisque non soumis à l'inhibition par les NKR inhibiteurs.

MOTS-CLES

Lymphocytes T γδ, TCR, phosphoantigènes, antigènes, présentation, transfert synaptique, synapse immunologique.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE

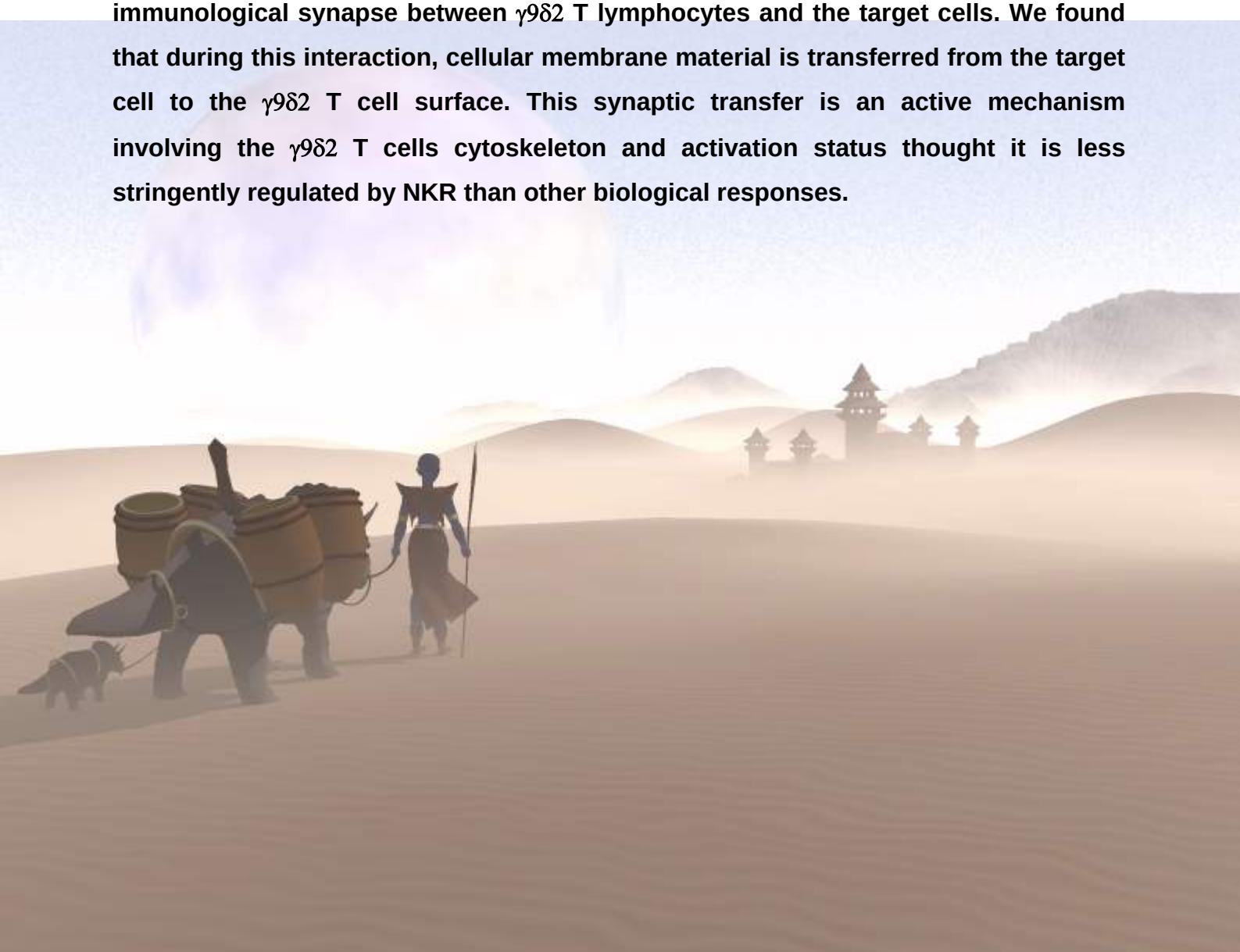
Immunologie

ADRESSE DU LABORATOIRE

INSERM U563, CPTP CHU Purpan, BP 3028, 31024 TOULOUSE

ABSTRACT

γ9δ2 T lymphocytes are cytotoxic cells involved in the immune response against several pathogens and tumoral cells. They recognise non-peptide, low molecular weight soluble antigens as phosphoantigens, aminobiphosphonates and alkylamines. 3-formyl-1-butyl-pyrophosphate, produced by *M.tuberculosis* and *E.coli* is among the most powerful phosphoantigen known so far. Synthetic analogues as phosphohalohydrin share the same biological properties and could be used as promising immunotherapeutics. The recognition of such antigens does not require CMH or CMH-like molecules known so far. It is highly selective but paradoxically very cross-reactive. One may underline three major features of activation by phosphoantigen ligands: ability to topological fit, a chemical reactivity (correlated to bioactivity) and to display a hydrolysable pyrophosphate moiety. The putative phosphoantigen presenting molecule remains unknown thought a cellular contact appears mandatory for activation and leads to establishment of a peculiar immunological synapse between γ9δ2 T lymphocytes and the target cells. We found that during this interaction, cellular membrane material is transferred from the target cell to the γ9δ2 T cell surface. This synaptic transfer is an active mechanism involving the γ9δ2 T cells cytoskeleton and activation status thought it is less stringently regulated by NKR than other biological responses.



Remerciements

Je remercie

Le Professeur Marie-Paule LEFRANC et le Professeur Jean-François MOREAU d'avoir accepté la tâche de rapporteurs de cette thèse

Le Docteur Jean-Jacques FOURNIE de m'avoir accueilli dans son équipe de recherche et de m'avoir permis de mener ce travail très librement, avec confort financier et de collaborer de manière fructueuse avec les équipes italienne et allemande.

Tous les membres de l'équipe qui ont collaboré à ces travaux et tout particulièrement Julie TABIASCO, pour ses discussions, son aide et son amitié et Christian BELMANT, chimiste de son Etat, qui a bien éclairé ma lanterne sur la chimie de nos molécules.

Le personnel de l'unité 395 et notamment Danielle GRANDIN, Aline DARMANA et Marie PARRA pour leur gentillesse et leur dévouement et le personnel de l'IFR30 : Sabina MUELLER pour mon initiation à la microscopie confocale, Frédéric PONT pour sa maîtrise du "Spectro de masse" et Georges CASSAR pour son aide précieuse en cytométrie en flux.

A Jo, Monique, Thierry

A Pascal

Je dédie ce travail

La façon dont la chance au mérite s'engage,
Jamais les fous n'en sauront le secret.
Quand bien même ils l'auraient, cette Pierre du Sage,
Qu'à la Pierre le Sage encore manquerait.
Goethe, second Faust

Table des matières

Liste des abbréviations 5

INTRODUCTION 6

I - Présentation des lymphocytes T γδ 7

1 - Ontogénie des lymphocytes T γδ 7
a - Choix de la lignée αβ ou γδ 8
b - Loci γ, δ et populations γδ 9
c - La sélection du TCR 14
2 - Les TCR γδ 15
3 - Caractéristiques des lymphocytes T γδ 21
a - Marqueurs moléculaires exprimés 21
b - Fonctions cellulaires 23

II - La réactivité γδ 25

1 - Les ligands 25
a - Les ligands des lymphocytes T Vδ1 25
b - Les ligands des lymphocytes T γ9δ2 29
2 - Reconnaissance de l'Ag 42
a - Reconnaissance médiée par le TCR 42
b - Reconnaissance par des NKR 48
c - "It takes two to tango" 52
3 - Les rôles des lymphocytes T γδ dans la défense immunitaire 53
a - Implication dans la lutte contre différents pathogènes 53
b - Implication dans la défense antitumorale 62
c - Intégration des lymphocytes T γ9δ2 dans la réponse immunitaire 63

III - Interactions des cellules cytotoxiques avec la cellule cible 67

1 - Etablissements de contacts étroits avec la cible 67
a - Formation d'une synapse immunologique 67
b - Capture de membrane et de molécules lors du contact LTC-cellule cible 74
2 - La cytotoxicité : « the kiss of death » 75
b – Mise en jeux de la voie FAS-FAS-L 78
3 - Contrôle de l'activation 79
a – Rôle des NKR 79
b - La co-stimulation 80
c – Régulation de l'expression du TCR à la membrane 81

RESULTATS

I - Caractérisation de phosphoantigènes de forte bioactivité 85

1 - Phosphoantigènes naturels 85
a - Recherche de la structure des PAg mycobactériens TUBag 85

b - Recherche de la structure des PAg d'*E coli* 86
2 - Phosphoantigènes de synthèse 88
3 - Le point sur les phosphoantigènes en 2001 88

II - Mode de reconnaissance des phosphoantigènes 89

1 - Modèle à trois composantes 89
2 - La phosphatase alcaline ne semble pas impliquée dans l'apprêtement des phosphoantigènes. 90
a - Principe 90
b - Résultats et discussion 91

III - Caractéristiques de la réponse aux phosphoantigènes 95

1 - Activation différentielle 95
2 - Le transfert synaptique. 97
CONCLUSION ET PERSPECTIVES **98**
Références 105

Liste des abréviations

Ac : Anticorps
Ac_m : Anticorps monoclonal
Ag : Antigène
AICD : Activation Induced Cell Death
CD : Cluster of Differenciation
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMH_I : molécules de classe I du CMH
CMH_{II} : molécules de classe II du CMH
CMV : Cytomégalovirus
CPA : Cellule Présentatrice de l'Antigène
DN : Double Négatif ($CD4^-$, $CD8^-$)
EBV : Epstein-Barr Virus
Fab : Fragment with specific antigene binding
HIV : Human Immunodeficiency Virus
HLA : Human Leukocyte Antigen
HSV : Herpes Simplex Virus
hTNSAP : human Tissue-Non Specific Alkaline Phosphatase
ICAM : Intercellular adhesion molecule
IELs : Intraepithelial T lymphocytes
IFN : Interféron
IL : Interleukine
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activatory Motif
ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif
KIR : Killer cells Ig-like Receptor
LTC : Lymphocyte T Cytotoxique
lymphocytes Th : Lymphocyte T helper
MAPK : Mitogen-Activated Protein kinase
MTOC : MicroTubule-Organising Center
NK : Natural Killer
NKR : Natural Killer Receptor
PAg : Phosphoantigène
PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern
PBL : Peripheral Blood Lymphocyte
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
PI-PLC : Phosphatidyl Inositol - PhospoLipase C
PRR : Pattern Recognition Receptor
RPS : Résonance Plasmonique de Surface
RU : Resonance Units
SHP : SH2 domain-containing Phosphatase
TCR : T Cell Receptor
TdT : Terminal desoxynucleotidyl Transferase
TILs : Tumor Infiltrating Lymphocytes
TNF : Tumor Necrosis Factor
UA : Unités d'Absorbance
ZAP70 : Zeta-Associated Protein-70

INTRODUCTION

Le système immunitaire des vertébrés supérieurs est classiquement découpé en deux composantes innée et adaptative. Le système immunitaire Inné s'appuie sur un jeu de molécules acquises lors d'une co-évolution avec les pathogènes, codées par l'ADN en configuration germinale : les "pattern recognition receptors" (PRRs), qui reconnaissent des composants conservés de micro-organismes appelés PAMPs ("pathogen associated molecular pattern"). Ces molécules, véritables signatures de grands groupes de parasites, sont pour l'hôte un moyen de discrimination entre le soi et le non-soi. Le système immunitaire adaptatif utilise des immunorécepteurs, BCR et TCR, clonalement distribués sur les lymphocytes B et T respectivement. Ils sont générés par des processus somatiques de recombinaison au hasard de segments de gènes codant ces immunorécepteurs. L'ensemble de récepteurs ainsi produit constitue un répertoire très vaste. En conséquence le système immunitaire adaptatif fonctionne par sélection clonale de lymphocytes exprimant un récepteur avec une spécificité particulière face à un antigène donné. A cette diversité, s'ajoute une dégénérescence dans la reconnaissance de l'antigène qui accroît les potentialités de ce répertoire.

Nous nous intéressons ici aux lymphocytes T $\gamma\delta$ humains, plus précisément à la population Vγ9Vδ2, ainsi qu'à son mode de reconnaissance de l'antigène. En raison de ses caractéristiques nous verrons que cette population est à la charnière de ces deux composantes innée et adaptative de l'immunité.

I - Présentation des lymphocytes T γδ

Les lymphocytes T γδ sont des cellules issues de la lignée lymphoïde qui expriment à leur surface un TCR constitué d'un hétérodimère γδ associé à CD3. On trouve cette population lymphocytaire chez tous les vertébrés dans des proportions et avec des fonctions très différentes. Ainsi, chez l'homme et chez la souris, les lymphocytes T γδ sont dans l'ensemble des populations minoritaires par rapport aux lymphocytes T αβ. En revanche, ils représentent la majorité des lymphocytes chez les oiseaux et les ruminants. Les lymphocytes T γδ sont des cellules cytotoxiques et/ou régulatrices dont la réactivité est multiple et très étendue. Ils interviennent aussi bien dans l'élimination de cellules infectées par un pathogène intracellulaire (bactéries et virus) que dans la défense antitumorale.

Contrairement aux lymphocytes T αβ, les lymphocytes T γδ ont un biais dans la distribution de leur répertoire et chaque réarrangement préférentiel au niveau des gènes codant le TCR, constitue une sous population aux caractéristiques fonctionnelles particulières. Il ne faut donc pas se contenter de parler des lymphocytes T γδ en général mais il faut préciser la nature du TCR des lymphocytes T γδ étudiés. En outre chaque espèce possède un répertoire de TCR γδ qui lui est propre rendant très difficile la généralisation des faits observés aux autres espèces. Nous nous intéressons dans cette étude aux lymphocytes T γδ humains exprimant un TCR Vγ9Vδ2. Ces cellules ne sont présentes que chez les primates (1).

1 - Ontogénie des lymphocytes T γδ

Lors de leur ontogenèse, les lymphocytes T passent par plusieurs stades de maturation. Une étape importante est la nature du réarrangement des chaînes du TCR qui oriente la différenciation vers la lignée αβ ou γδ. La particularité des lymphocytes T γδ est une expression spatiale et temporelle restreinte de leurs gènes variables du TCR.

a - Choix de la lignée $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$

Les modèles étudiés sont murins car les expériences menées consistent à rendre obligatoire ou bloquer certaines étapes de l'ontogenèse (utilisation de souris aux gènes d'intérêt invalidés ou souris transgéniques). Plusieurs études ont ainsi permis d'appréhender les règles qui déterminent l'orientation vers la lignée $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ (2-4). Elle se fait lors des réarrangements des chaînes β, γ et δ du TCR dans un lymphocyte en cours de maturation (phénotype DN, $CD25^+$, $CD44^-$) aboutissant à l'expression d'un TCR $\gamma\delta$ ou d'un pré-TCR ($pT\alpha$). Ces deux complexes ont des propriétés de signalisation différentes (5) et seraient impliqués dans l'engagement vers une lignée ou l'autre (6). Le TCR $\gamma\delta$ ou le pré-TCR pourraient avoir un rôle instructif (7) ou bien sélectif (8) dans l'engagement vers la voie la voie $\gamma\delta$ ou $\alpha\beta$. Selon le modèle instructif l'expression du TCR $\gamma\delta$ ou du pré-TCR est suffisante *per se* pour orienter un précurseur commun vers la voie $\gamma\delta$ ou $\alpha\beta$. Au contraire, selon le modèle sélectif, le choix se fait indépendamment du TCR mais un signal du TCR $\gamma\delta$ ou du pré-TCR est requis pour la survie et la poursuite de la différenciation.

Alternativement, le rôle de ces TCR pourrait être mineur, l'engagement s'étant pris bien avant les réarrangements (modèle stochastique, (9)). Le choix entre les lignées $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ est aussi orienté par des interactions cellulaires impliquant le récepteur Notch. C'est une molécule transmembranaire, fortement conservée au cours de l'évolution, qui régule le développement d'un très large éventail de types cellulaires chez les métazoaires. Des études chez la souris ont montré qu'un signal délivré par le récepteur Notch favoriserait l'orientation $\alpha\beta$ alors que l'inactivité de Notch orienterait vers la lignée $\gamma\delta$ (10, 11). Un modèle de développement des Lymphocytes T dans le thymus est illustré figure 1.

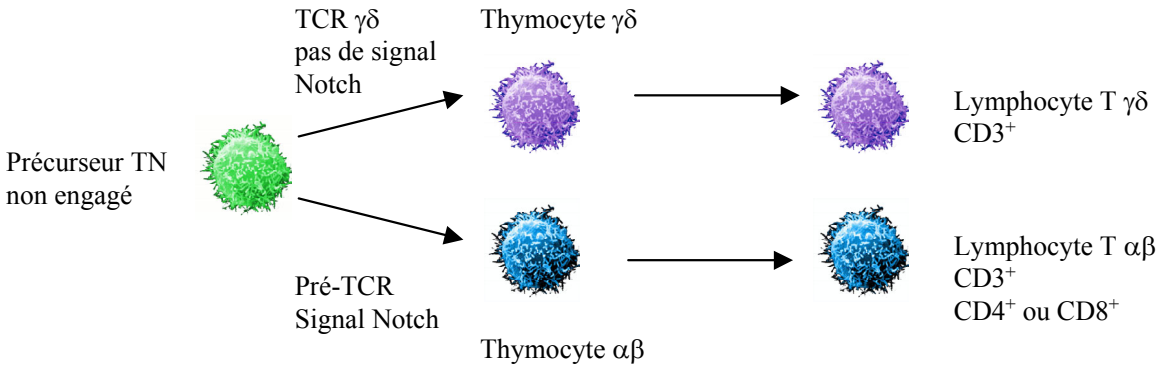
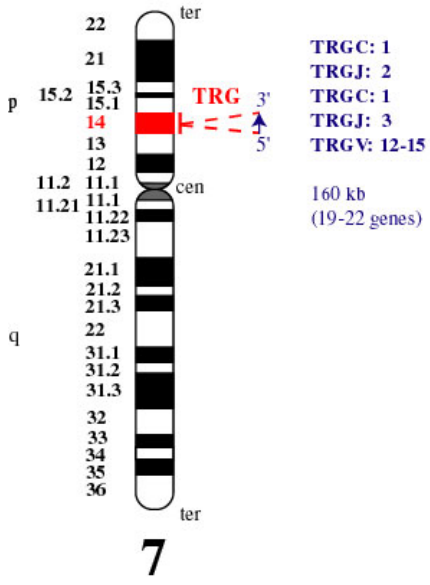


Figure 1 : modèle de développement des lymphocytes T dans le thymus

b - Loci γ, δ et populations γδ

Les lymphocytes T γδ colonisent l'organisme par vagues successives au cours du développement. Chez l'homme, le foie et l'intestin fœtal sont les premiers sites d'ontogenèse des lymphocytes T γδ (12) entre les 7 et 11ème semaines (Ce sont les premiers lymphocytes à apparaître). Le thymus est ensuite colonisé par vagues successives dès la 10ème semaine. Une étude de l'évolution des populations γδ au cours de la vie (13) a montré une expansion périphérique de la sous-population Vδ2 (cf. *infra*) lors de l'enfance sans qu'il y ait de colonisation thymique, suggérant ainsi un développement périphérique de cette population.

La diversité du TCR, comme celle des Ig, est générée par la combinaison de différents segments V, J et C pour les chaînes α et γ ou V, D, J et C pour les chaînes β et δ : il s'agit de la diversité combinatoire. Il existe chez l'homme plusieurs segments de gènes codant les chaînes des TCR αβ et γδ (14). Le locus de la chaîne γ du TCR (TRG) se trouve sur le chromosome 7. Son organisation est schématisée figure 2. Le locus de la chaîne δ du TCR (TRD) est inclus dans celui de la chaîne α du TCR (TRA) entre les segments Vα et Jα. Son organisation est représentée figure 3. Le nombre de segments γ et δ est bien inférieur à celui des segments α et β (cf.Table I). Ainsi les potentialités combinatoires γδ sont limitées par rapport aux αβ.



Carte du chromosome 7 humain

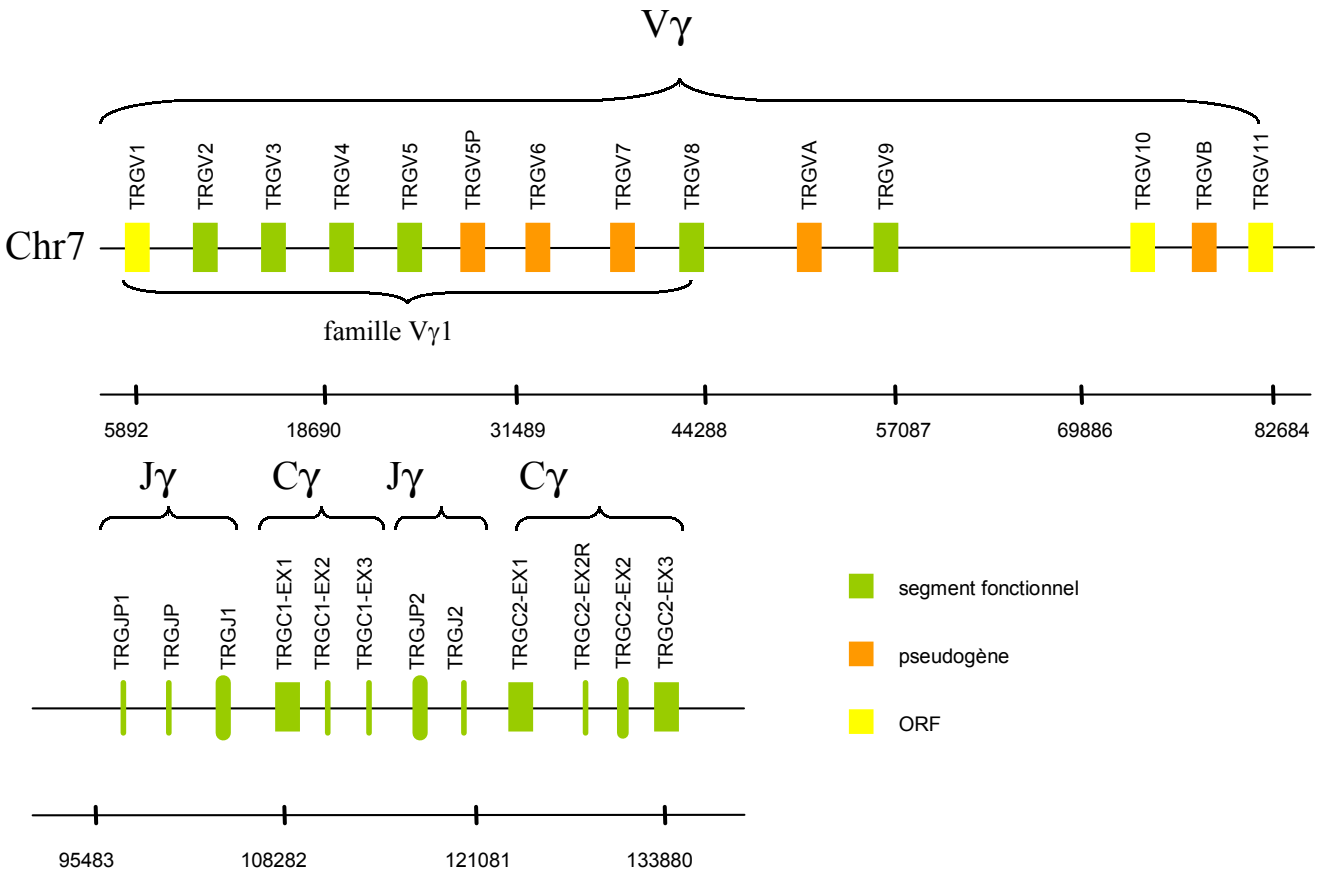
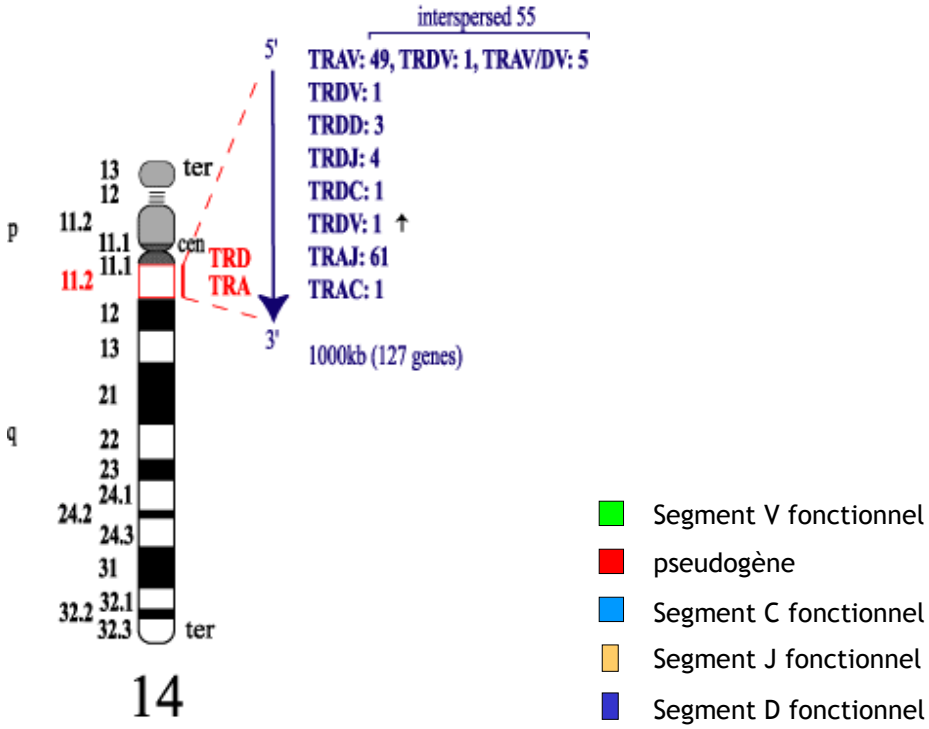


Figure 2 : Organisation génétique du locus γ humain sur le chromosome 7. D'après (25) et site http://imgt.cnusc.fr:8104/textes/IMGTrepertoire/LocusGenes.



Carte du chromosome 14 humain

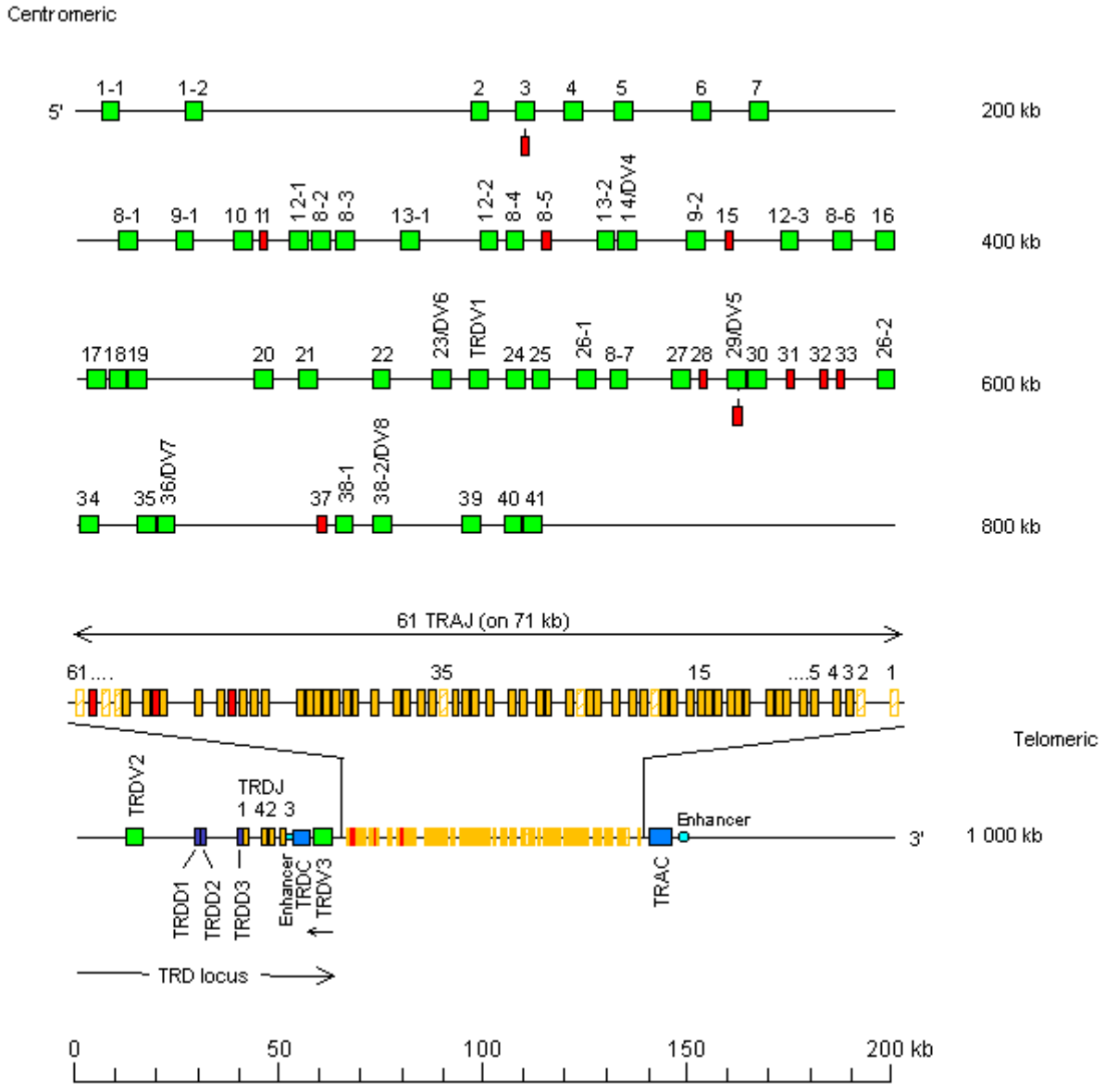


Figure 3 : Organisation génétique des loci α et δ ;d'après (25) et site http://boree.cines.fr:8104/textes/IMGTrepertoire/LocusGenes/locus/human/TRA/Hu_TRAmap.html

nombre de segments fonctionnels	chaînes			
	α	β	γ	δ
V	46	47	6	8
D	-	2	-	3
J	50	13	5	4
C	1	2	2	1

Table I : nombre de segments fonctionnels disponibles dans les loci α,β,γ et δ

Lors des jonctions des segments V-(D)-J, il y a clivage imprécis au niveau des extrémités des segments avec excision de nucléotides puis rajouts sans matrice de quelques nucléotides (fait de la TdT) générant ainsi une diversité jonctionnelle. Cette dernière est extrêmement étendue et permet l'obtention d'un répertoire γδ aussi vaste que le répertoire αβ. Chez les lymphocytes T γδ murins, la diversité combinatoire est limitée mais la diversité jonctionnelle peut être importante. De plus elle varie selon la localisation tissulaire ; pour revue voir (15).

Des études génétiques ont montré que chez l'homme, toutes les familles Vδ et Vγ sont exprimées et réarrangées dans le thymus dès la 11ème semaine de la vie fœtale (sauf Vδ4) avec la prédominance des TCR utilisant le segment Vδ2. Dans tous les cas, les TCR exprimés sont limités aux Vδ1 et Vδ2. Comme chez la souris, les réarrangements au niveau des différents loci se font de manière ordonnée chez l'homme (16). Le répertoire γδ évolue au cours du temps. Majoritairement généré dans le thymus, chez le foetus de 8 à 15 semaines, il est très restreint du fait de l'utilisation d'un petit nombre de segments variables : on assiste à des jonctions Vδ2 et Dδ3 et Vγ8 ou Vγ9 au "cluster" Jγ1 avec une diversité jonctionnelle très limitée (17, 18). Nous nous intéressons particulièrement dans cette étude aux cellules qui expriment le TCR Vγ9Vδ2, les lymphocytes T γ9δ2.

Quatre à six mois après la naissance, les réarrangements impliquent les segments Vδ1 avec Dδ1 et Dδ2 et les segments Vγ2,3,5,8 (famille VγI) au cluster Jγ2 avec une diversité jonctionnelle plus grande. Les cellules qui expriment ces TCR

sont les lymphocytes T VγIVδ1. Ainsi dans le thymus postnatal et tout du long de la vie on compte 15% de lymphocytes T Vγ9Vδ2 et 80% de lymphocytes TVγ1Vδ1. Toutefois, dans le sang les lymphocytes T γ9δ2 finissent par être majoritaires (plus de 70%) au détriment des Vγ1Vδ1 (13).

En ce qui concerne les lymphocytes T γδ du sang circulant, 80% sont des lymphocytes T Vγ9Vδ2 avec un récepteur Vγ9-JγP-Cγ1/Vδ2-J δ1-Cδ ; les autres 20% sont des lymphocytes T Vγ2/4Vδ1 avec un récepteur Vγ2/Vγ4-Jγ2-Cγ2/Vδ1-Jδ1-Cδ (19). La Table II récapitule les populations majeures trouvées chez l'adulte.

TCR	*%γδ /LT*	*localisation chez l'adulte*	*diversité jonctionnelle*	*références*
Vγ9Vδ2	0,5 à 5%	sang	oui	(16, 20-24)
VγIVδ1	20 à 30%	rate (pulpe rouge) epithélia des muqueuses	oui	

Table II : populations γδ majeures du sang circulant chez l'adulte

Ces proportions, représentées figure 4, résultent d'une évolution continue des deux populations en périphérie alors qu'elles restent quasiment constantes dans le thymus (13).

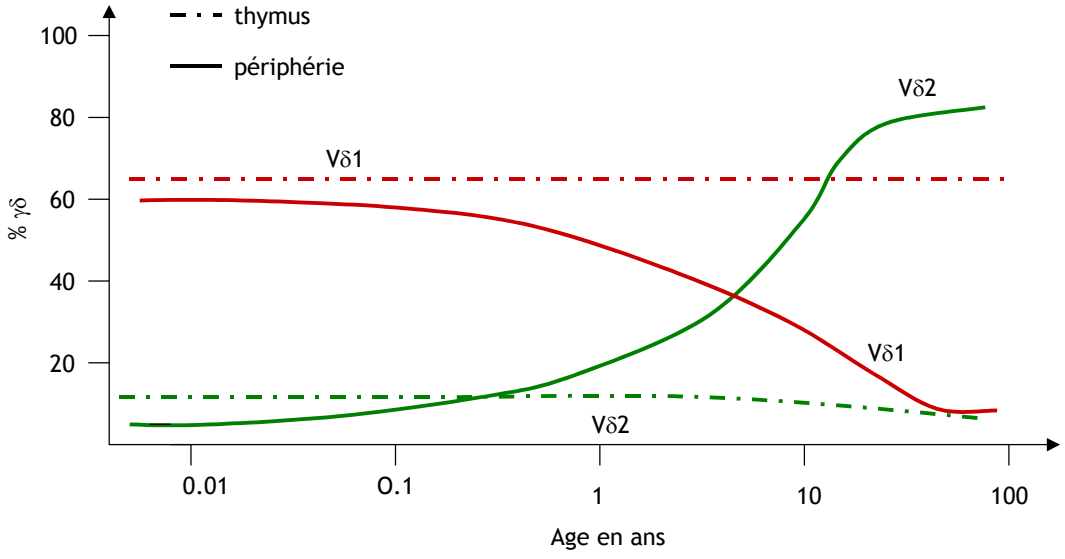


Figure 4 : évolution des populations Vδ1 et Vδ2 thymiques et périphériques au cours de la vie chez l'homme. D'après (13).

Malgré un nombre limité de segments et une diversité combinatoire faible, les TCR réarrangés chez l'adulte ont une grande diversité jonctionnelle, cette dernière serait plus importante que chez les lymphocytes T $\alpha\beta$. En outre, la variabilité est augmentée :

- par l'existence d'un polymorphisme de Cγ. TRGC1 possède à la différence de TRGC2 un exon II avec un résidu cystéine conservé conférant à la chaîne γ la capacité à former un pont dissulfure avec la chaîne δ.
- par l'utilisation de 1 à 3 segments D en tandem
- par des jonctions V-D et D-J imprécises avec raccourcissement des extrémités par exonucléases et incorporation de nucléotides N sans matrice par la TdT.

Pour revue voir (25).

c - La sélection du TCR

Chez le nouveau-né, de nombreux réarrangements et appariements entre différentes chaînes γ et δ ont été observés (26). En revanche, le répertoire exprimé en périphérie chez l'adulte est très restreint avec en plus l'utilisation de segments V et J canoniques malgré l'énorme possibilité génétique des loci γ et δ. Cette amplification des lymphocytes T γ9δ2 est corrélée avec leur expression de CD45RO, phénotype de cellules mémoires (27). Ce changement au cours de la vie serait ainsi dû à une expansion périphérique et non à une augmentation de la production thymique (aucune vague secondaire de colonisation thymique n'ayant été montrée). De plus, des différences notoires de l'ampleur de cette expansion périphérique chez des individus génétiquement liés ont été trouvées. Cela souligne l'importance du facteur environnemental dans ce déterminisme (13).

Ainsi, les lymphocytes T γ9δ2 sont le fruit d'une expansion périphérique en réponse à des stimuli antigéniques apparentés mais de diverses provenances (13, 27-29). Nous verrons en effet qu'il existe un large panel de molécules activatrices. Cependant, l'analyse de la diversité jonctionnelle des TCR Vγ9Vδ2 exprimés par la population majeure du sang chez l'adulte montre, dans l'ensemble, une dérive du répertoire avec apparition chez l'adulte, de motifs récurrents - bien qu'ils existent

déjà en proportion élevée dans le thymus ou dans le sang de cordon (28-30). Une étude suggérant cette sélection clonale (31) relève chez l'adulte des motifs récurrents dans les séquences jonctionnelles de la chaîne γ avec la séquence V9JPγ (30% des cas). Elle décrit aussi une chaîne δ associée présentant une très grande diversité jonctionnelle mais avec un résidu hydrophobe (VAL, LEU ou ILE) en position conservée 97 (90% des cas) de la région CDR3. De plus cette position correspond à un nucléotide N, non codé par le génome suggérant une sélection positive des lymphocytes qui l'expriment.

Confortant cette hypothèse, un cas particulier a été relaté où un patient montrait des fièvres récurrentes avec une expansion périphérique des lymphocytes T Vγ9/Vδ1 provoquée par un antigène. Ces cellules portaient un phénotype mémoire CD45RO et une région CDR3 consensus. (32). Il ne faut cependant pas généraliser cette hypothèse aux autres populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ car il peut y avoir expansion sélective de lymphocytes T $\gamma\delta$ en périphérie sans biais dans la diversité CDR3. Ainsi, une augmentation des lymphocytes T Vδ1 du sang chez des individus HIV^+ a été observée (33), sans qu'il y ait de préférence pour une séquence consensus donnée ou une chaîne Vγ associée (34). De même, la population Vδ1 est sur-représentée dans le sang circulant des africains de l'Ouest par rapport aux caucasiens sans relation avec un répertoire préférentiel induit par un Ag quelconque (35).

2 - Les TCR $\gamma\delta$

Le clonage des chaînes γ et δ du TCR et la connaissance de leur structure primaire classe le TCR $\gamma\delta$ dans la superfamille des Ig et laisse supposer une structure quaternaire proche de celle du TCR $\alpha\beta$ ou du Fab d'une Ig.

L'existence de plusieurs segments Cγ différant par leur nombre d'exon se traduit par la possibilité d'exprimer différents TCR. Ainsi, selon la chaîne γ, il existe 3 types de TCR (36, 37). Ces molécules ont été initialement caractérisées grâce à l'existence de différent Ac_m (38). Leurs caractéristiques, leurs architectures déduites de la structure primaire et les principaux Ac_m permettant de les identifier sont reportés dans la **Table III**.

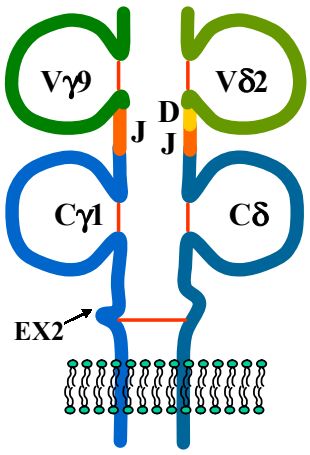
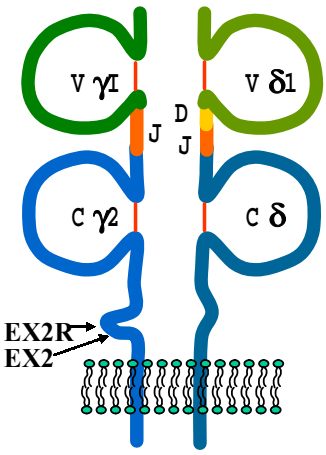
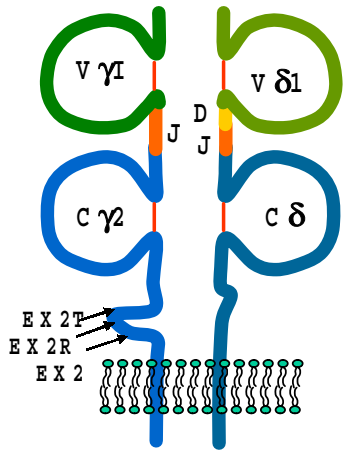
TCR			
MM (kDa)	40 - 43	40 - 43	55 - 43
Ac_m			
BB3	+ (Vδ2)	-	-
δTCS1	-	+ (Vδ1)	+ (Vδ1)
A13	-	+ (Vδ1)	+ (Vδ1)
TiγA	+ (Vγ9)	-	-
IMMU389	+ (Vδ2)	-	-
IMMU360	+ (Vγ9)	-	-

Table III : les trois types de TCR γδ, les masses moléculaires (MM) apparente des chaînes γ et δ ainsi que certains Ac_m permettant de les différentier (16, 39).

Ces Ac_m servent au typage des lymphocytes T γδ lors de leur étude chez l'homme. Les sous-populations majeures et les plus étudiées restent les Vγ9Vδ2 et les VγIVδ1. Le répertoire Vγ a même été étudié de manière exhaustive par une batterie d'Ac_m (40). D'autres populations de lymphocytes T γδ peuvent devenir majoritaires dans certains cas pathologiques comme les Vγ3Vδ3 (41), mais leur connaissance reste limitée.

Structure fine du TCR γ9δ2

Les premières données sur les structures secondaires et tertiaires ont été obtenues pour les Ig puis pour le TCR αβ. Pour dresser une analogie avec ces immunorécepteurs, les parties CDR3 on été analysées et comparées à celles des Ig et du TCR αβ. Les deux premières colonnes de la Table IV récapitulent les résultats obtenus.

chaîne	*CDR3*	*nombre d'acides aminés*	*Angle entre les domaines V et C*	*Angle entre les parties V et C*
***TCR*α**	court	6 à 12	100°	140 à 159°
***TCR*β**	court	6 à 12	67°	
IgL	court	2 à 10	92°	125 à 225°
IgH	long	3 à 25	76°	
***TCR*γ**	court	1 à 12	42°	110°
***TCR*δ**	long	8 à 21	101°	

Table IV : caractéristiques des 2 chaînes des TCR αβ, γδ et Ig ; d'après (42, 43)

Sur ces bases, le TCR γδ s'apparente plus à une Ig que du TCR αβ (44). La cristallographie a permis par la suite d'appréhender beaucoup plus précisément les structures tertiaire et quaternaire du TCR γδ. En 1998, la structure du domaine Vδ3 a été reportée avec une précision de 1,9 Å (45). Ces données confirmaient la ressemblance du domaine Vδ avec le domaine VH d'une Ig. En 2001, la cristallographie d'un TCR Vγ9Vδ2 complet a été réalisée avec une résolution de 3,1 Å (43). Le cristal a été obtenu à partir d'un clone G115 dérivé du sang d'un donneur sain et répondant (prolifération, cytotoxicité, sécrétion de cytokines) aux phosphoantigènes.

Sa structure globale ressemble bien à celle d'un TCR αβ ou d'un fragment Fab, mais avec cependant quelques différences. La figure 5 donne un aperçu tridimensionnel comparatif de ces molécules.

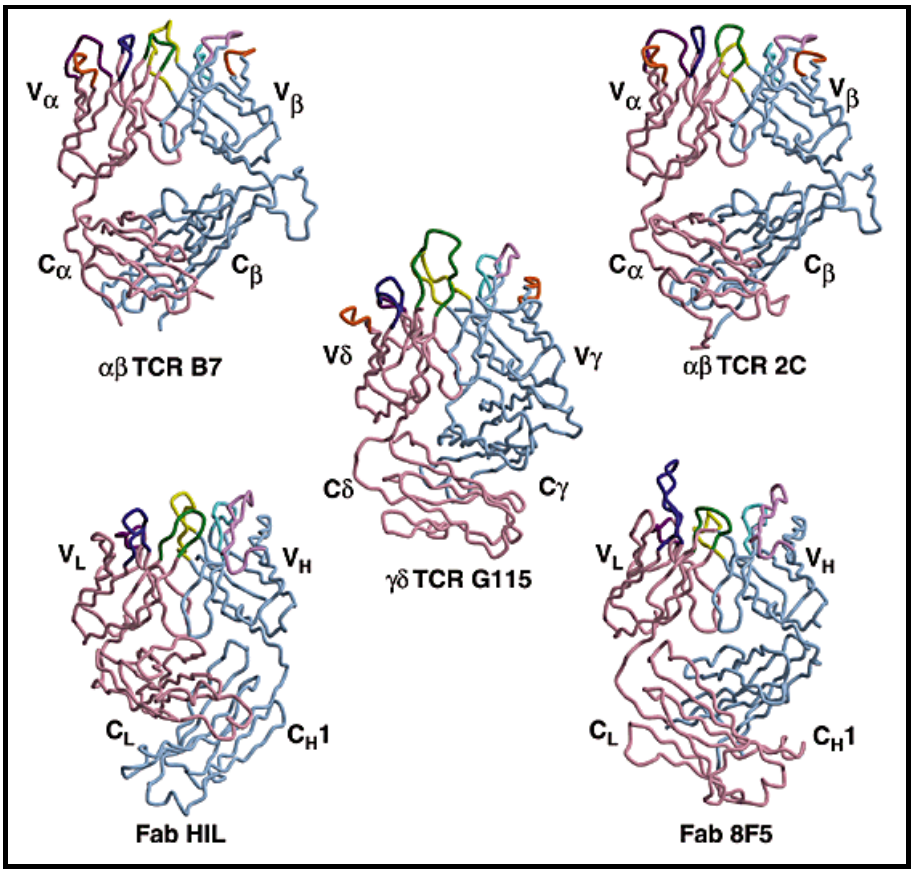


Figure 5 : comparaison des structures du TCR γ9δ2 (G115) avec deux TCR αβ et deux Fab. En bleu : chaînes β,γ ou H (dont CDR1 cyan, CDR2 rose, CDR3 jaune et α4, δ4, HV4 oranges; en rose : chaînes α,δ ou L(dont CDR1 violet, CDR2 pourpre et CDR3 vert). D'après (46).

Chaque domaine V est formé de deux planchers de feuillets β avec 4 feuillets externes et 5 feuillets internes (nommés de A à G plus A', C' et C" sur la figure 6). Les boucles formant les régions CDR sont au sommet des domaines V et pointent vers l'extérieur (figure 6). Les domaines C sont eux aussi formés de deux planchers de feuillets β avec 3 feuillets externes et 4 feuillets internes (nommés de A à G).

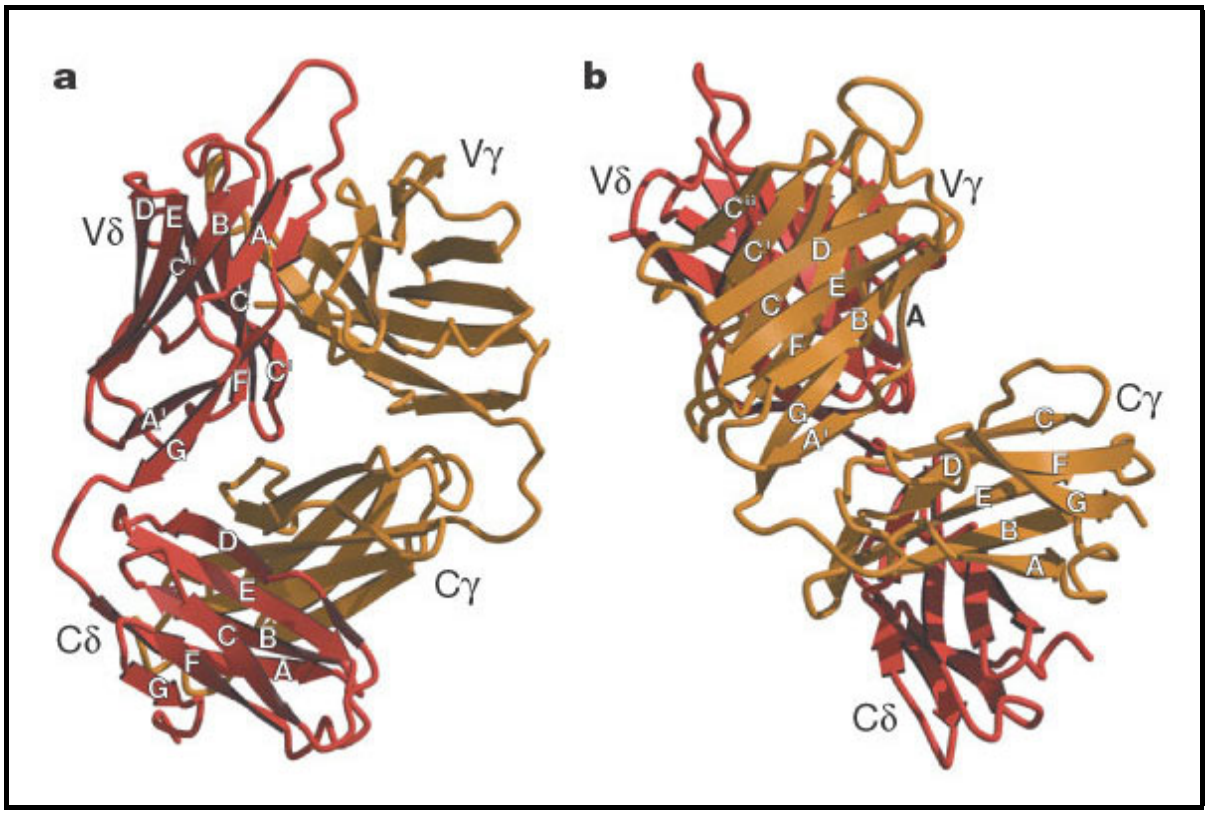


Figure 6 : structure tridimensionnelle (avec mise en évidence de la structure secondaire, cf. texte) du TCR γ9δ2 avec Vδ et Cδ en rouge et Vγ et Cγ en doré. Les boucles CDR3 pointent vers le haut. En b : rotation de 90° de la vue en a par rapport à un axe vertical. D'après (43).

Le positionnement relatif des domaines V et C est particulier : la partie C est fortement décalée par rapport à l'axe de la partie V contrairement au TCR αβ ou au Fab. Ainsi, l'angle formé entre les deux axes des parties V et C est plus petit (figure 7). L'angle inter domaines Vγ-Cγ est, lui aussi, le plus petit (42°) par rapport aux angles mesurés pour les Fab ou le TCR αβ (Table IV, colonnes de droite et figure 7). En conséquence, les domaines Cγ et Cδ sont décalés sur le côté par rapport à l'axe central Vγ et Vδ.

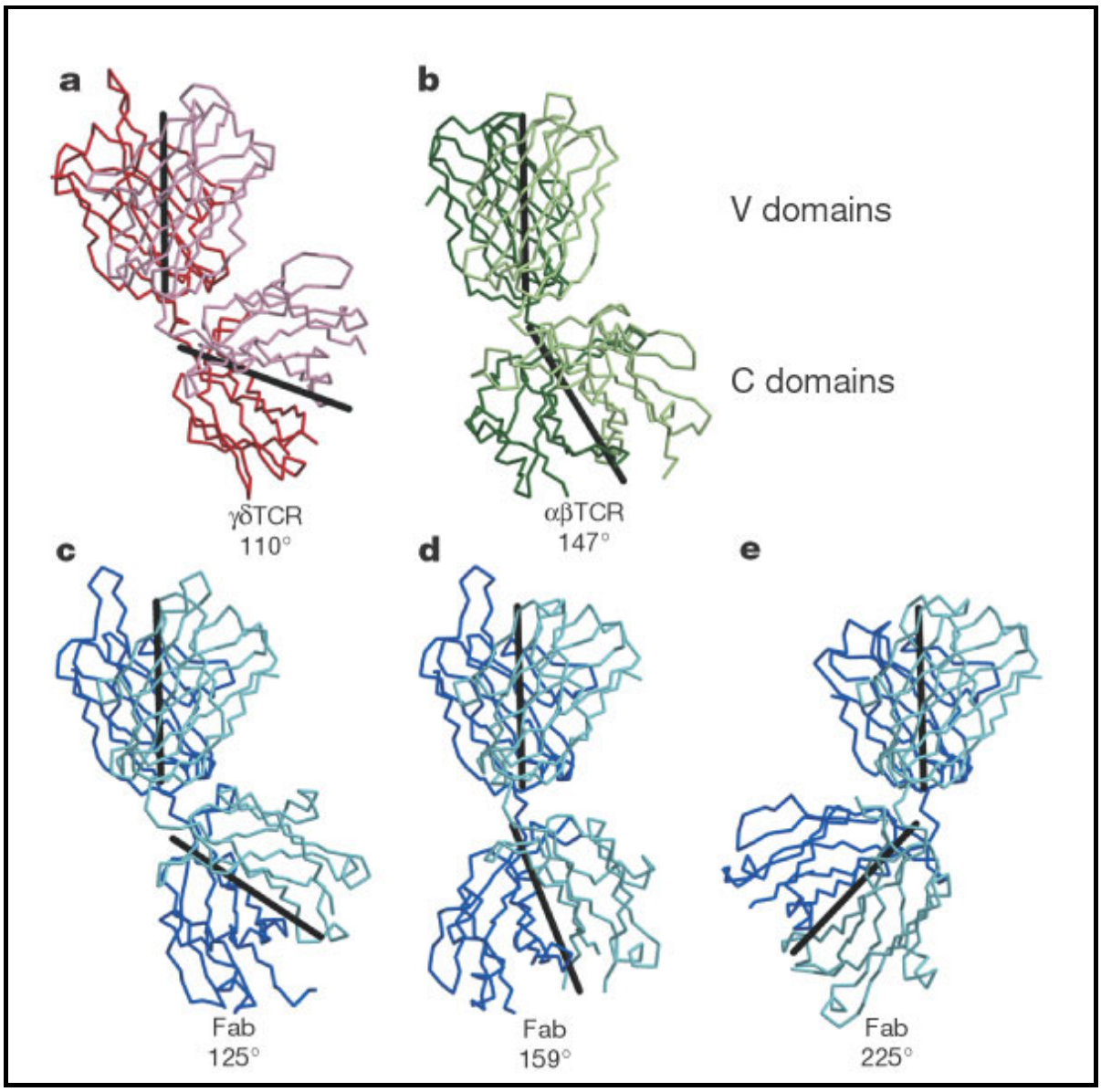


Figure 7 : Comparaison de l'angle que font les axes de symétrie des domaines V et C du TCR γ9δ2 (a), d'un TCR αβ (b) et de trois Fab (c,d,e). Les chaînes γ,b et H sont en bleu clair, les chaînes δ,α et L en bleu foncé. D'après (43)

Le domaine Cγ présente en outre une différence avec le domaine Cβ : la boucle FG de Cγ est courte et plaquée contre le cœur de la molécule alors que celle de Cβ est longue et fait saillie (figure 8). Ces différences pourraient avoir des répercussions sur la nature des molécules membranaires en interaction avec le TCR ou bien sur la manière dont le TCR interagit avec elles, et notamment avec les sous-unités CD3.

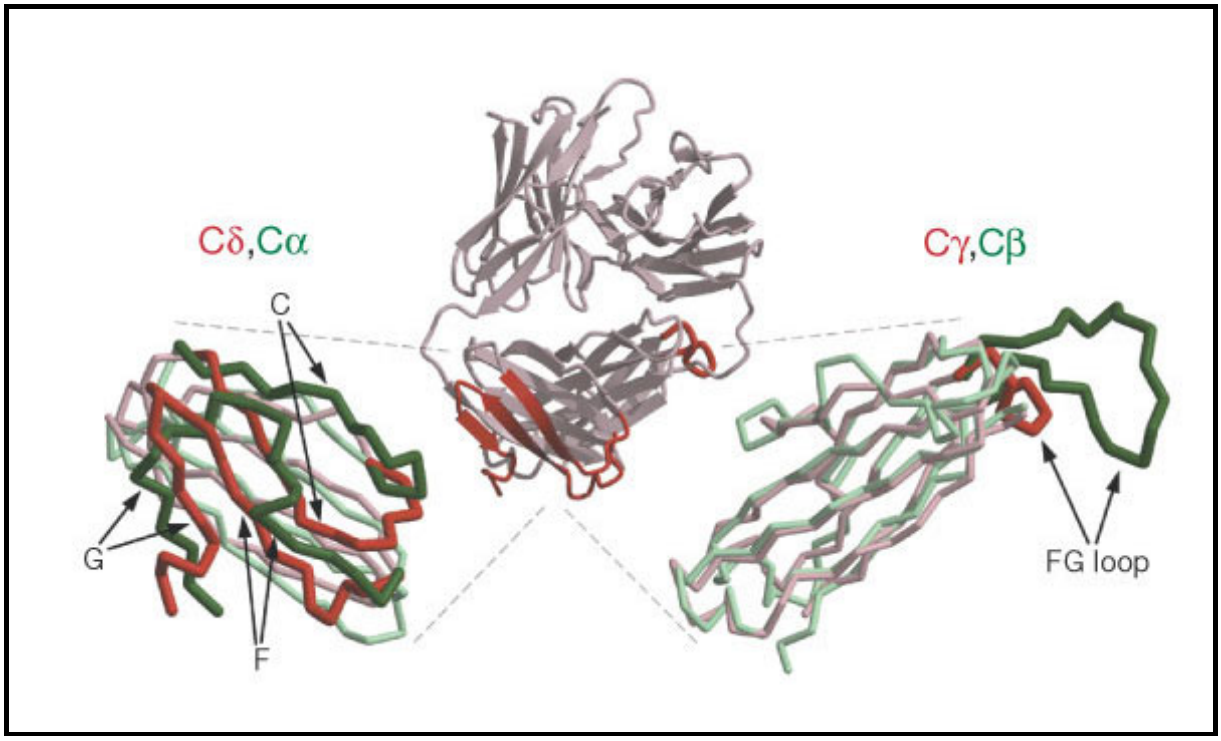


Figure 8 : Comparaison des domaines constants des TCR γδ et αβ en superposant Cα et Cδ à gauche et Cγ et Cβ à droite. Les différences sont mises en évidence notamment au niveau des portions C,F et G qui forment des feuillets β pour Cδ et la boucle FG très courte pour Cγ. D'après (43)

3 - Caractéristiques des lymphocytes T γδ

a - Marqueurs moléculaires exprimés

Les lymphocytes T γ9δ2 partagent de nombreux marqueurs avec les lymphocytes T αβ. La Table V ci-dessous récapitule de nombreux marqueurs et molécules exprimées par les lymphocytes T γ9δ2 en faisant la distinction entre l'expression constitutive et l'expression induite (marqueurs d'activation).

Marqueur	% de cellules exprimant le marqueur	Remarques	Références
CD2 CD3 CD5 CD7 LFA-1 LFA-3 CD26 CD44	100	Marqueurs lymphocytaires T	(47) (48)
CD4	nd (faible)	Populations helper	(49, 50)
CD8$\alpha\alpha$	25		(47)
CD28	40-60 (v)	Ligand de B7	(51)
CD56	30 (v)	Marqueur NK (N-CAM)	(52)
CD94	60-80		(53)
CD95/Fas	100		(54)
Récepteurs : CCR1-3, 5, 8 CXCR1-3	100	Ligands: MIP1-α,β RANTES	(55, 56)
VLA-4	40-100		(57)

Marqueurs d'activation	% de cellules exprimant le marqueur	Remarques	références
CD16	v	Apparaît une semaine après activation	(58)
CD25 (IL2-Rα)	100		(59)
CD27	v	Appartient à la famille des TNF-R, lie	(60)
CD30	100	Appartient à la famille des TNF-R	(61, 62)
CD38	v	ADP-ribosyl cyclase	(63)
CD40L	v		(64)
CD45RO	v		(27)
CD69	100		(59)
CD71 (Tf-R)	15		(65)
CD95L (FasL)	v		(66)
HLA-DR	100		(63)

Table V : principaux marqueurs moléculaires exprimés par les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$. v : % d'expression variable

b - Fonctions cellulaires

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ ont une morphologie de lymphocytes granuleux d'après des analyses cytologiques et en microscopie électronique (67). Ce sont des cellules effectrices essentiellement cytotoxiques (68). Elles lysent leur cible notamment grâce au système granzyme/perforine au cours de la réponse immunitaire (cf. *infra*). Le spectre de cellules cibles est large : cellules tumorales, cellules activées, cellules infectées par des virus, des bactéries et des protozoaires. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ humains sécrètent aussi de nombreuses cytokines le plus souvent de type Th1 (69). Le but n'est pas ici de reporter toutes les cytokines sécrétées reportées dans

la littérature car elles varient selon la sous-population étudiée et sa localisation. Les caractéristiques des lymphocytes T intra-épithéliaux ont été décrites dans une revue récente (70). Il faut noter que la majorité des études fonctionnelles impliquant les lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la physiologie et la régulation du système immunitaire ont été réalisées chez la souris (71). Les cytokines caractéristiques des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ sont l'IFNγ et le TNFα. (72, 73). Ils sécrètent aussi des chimiokines en réponse aux phosphoantigènes comme MIP-1α,β et RANTES (74, 75). En retour, ils expriment des récepteurs aux IL2, 7, 15, 12, à l'IFNγ, au TNFα (73, 76, 77) et à de nombreuses chimiokines (56, 78).

Ces fonctions cellulaires associées aux particularités de localisation dans l'organisme et de réactivité permettent aux lymphocytes T $\gamma\delta$ d'intervenir dans de nombreuses pathologies (*cf. infra*) mais aussi de participer à la régulation de la réponse immunitaire (79-82). Une récente étude a montré qu'ils assuraient, par leur action sur des PBMC, une production efficace de MIF (migration-inhibitory factor), TNFα et IL1-β en réponse à une stimulation par le LPS (82).

L'ensemble de ces fonctions *in vivo* est encore mal connu, surtout pour les populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ sans contrepartie dans le modèle murin comme les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ humains. Les données sont majoritairement obtenues à partir d'expériences *in vitro* ou *ex vivo*.

In vitro, plusieurs réponses biologiques des lymphocytes T $\gamma\delta$ sont mesurées après stimulation : phosphorylation des tyrosines des chaînes associées à la transduction du signal, flux calciques, acidification extracellulaire, down-modulation du TCR, cytotoxicité et auto-cytotoxicité, prolifération et enfin production de cytokines. Il faut toutefois se rappeler qu'*in vivo*, les seuils de réponse sont conditionnés par l'état de différenciation cellulaire et par le micro environnement où se déroule la réponse (nature des cytokines, hormones, facteurs de croissance…)(83).

1 - Les ligands

La reconnaissance de l'Ag par les lymphocytes T αβ classiques $CD4^+$ ou $CD8^+$ est très bien documentée (84).

Chez l'homme, les lymphocytes T γδ reconnaissent dans la majorité des cas leur Ag directement, sans besoin de molécules du CMH (42, 85). Cette particularité est à mettre en relation avec leur faible ou non-expression des molécules CD4 et CD8.

a - Les ligands des lymphocytes T Vδ1

Les ligands reconnus par la population Vδ1 sont nombreux et disparates. Certaines populations reconnaissent leurs Ag dans le contexte de molécules du CMH de classe I et de classe II ; d'autres reconnaissent directement des molécules apparentées au CMH_I (CD1 et MIC).

MICA et MICB

Les lymphocytes T Vδ1, reconnaissent des molécules apparentées à celles du CMH (CMH de classe Ib, indépendante de la β2m), induites par le stress : MICA et MICB (MHC class I-related chain A,B (86-88)). Cependant, la reconnaissance n'est pas classique car des lymphocytes T Vδ1 avec des chaînes γ et δ aux séquences jonctionnelles différentes sont capables de reconnaître ces molécules (87).

La cristallographie de MICA a révélé une structure apparentée au CMH mais très distordue par rapport à la structure canonique et sans interaction particulière avec un ligand. (89). Cette molécule apparaît comme dévolue à l'indication d'un stress intracellulaire et non à la présentation d'un Ag. Il ne s'agit pas d'une molécule présentatrice d'Ag mais d'une structure directement reconnue.

Il faut noter que cette réactivité se retrouve chez la souris où ont été identifiés des ligands du TCR $\gamma\delta$ apparentés à MIC : T10 et T22. La molécule T22 est apparentée au CMH Ib non classique, ne lie pas de peptide et interagit directement avec le TCR $\gamma\delta$ (90-92). Sa surexpression, notamment par les lymphocytes, est liée à une activation cellulaire et concerne jusqu'à 0,4% des lymphocytes T $\gamma\delta$ chez la souris. Ces derniers pourraient avoir une fonction régulatrice sur la réponse immunitaire.

Bien que le TCR semble impliqué dans la reconnaissance de MICA et MICB, (*i.e.* des Ac anti-TCR inhibent cette reconnaissance (87)) la démonstration formelle de cette interaction n'a pas été faite comme pour T22.

De manière très intéressante, il a par la suite été montré que MIC-A et B sont formellement reconnues par un récepteur NK : NKG2D (*cf. infra*). La cristallographie du complexe a été réalisée (cf. figure 9) et l'interaction a clairement été montrée par la technologie Biacore (93). Ainsi, MICA soluble biotinylé se fixe sur les lymphocytes T $\gamma\delta$ ($V\delta1^+$ et $V\delta2^+$), les lymphocytes T $\alpha\beta$ $CD8^+$ et les cellules NK (94). Le récepteur NKG2D est un NKR activateur homodimérique, associé à la molécule DAP10 qui assure la transduction du signal. Il a été montré que des lymphocytes T $V\delta1$ ou des cellules NK sont capables de lyser des tumeurs sur-exprimant MICA (87, 94). De même l'engagement de MICA par les lymphocytes T $\gamma9\delta2$ potentialise leur activation par des Ag solubles ou des superantigènes (95).

NKG2D se comporterait donc comme un corécepteur du TCR, venant renforcer le signal de ce dernier, lorsque le lymphocyte effecteur se retrouve face à une cellule soumise à un stress (96, 97).

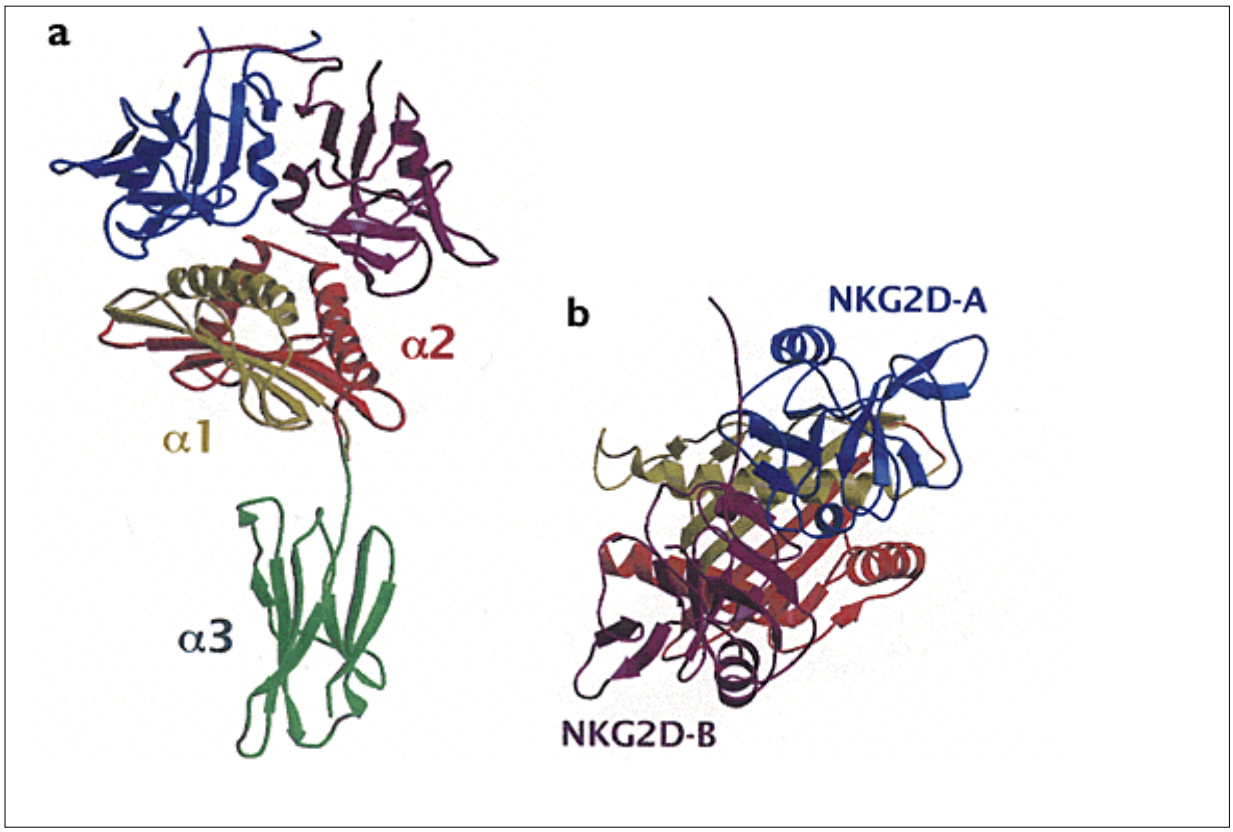


Figure 9 : représentation en ruban de la structure du complexe MICA-NKG2D vue de côté (a) et de dessus (b). Les domaines Ig de MICA sont en jaune (a1), rouge (a2) et bleu (a3); NKG2-A est en bleu, NKG2-B en pourpre. D'après (93)

CD1

La famille CD1 comprend un groupe hétérogène de molécules associées à la β2m qui ont de fortes ressemblances structurales avec les molécules du CMH, mais qui ne présentent pas de polymorphisme et dont les gènes n'appartiennent pas au CMH. Chez l'homme, quatre gènes fonctionnels sont répartis en deux groupes : groupe I comprenant CD1a,b,c et groupe II comprenant CD1d. Ces molécules sont exprimées majoritairement par les CPA et présentent des ligands lipidiques et glycolipidiques bactériens (pour revues voir (98-100)).

Les lymphocytes qui reconnaissent ces molécules sont des lymphocytes T αβ $CD4^-CD8^-$, $CD8^+$, $CD4^+$ et lymphocytes T γδ $V\delta1^+$ pour le groupe I et lymphocytes T $CD4^-CD8^-$, $CD4^+$, NKT pour le groupe II (table VI). A la différence de MIC, la poche à

peptide est fonctionnelle, loge un glycolipide et participe au phénomène d'interaction avec le TCR αβ.

	Groupe I : CD1a,b et c	**Groupe II : CD1d**
Expression cellulaire	Lymphocytes B (CD1c) et Cellules dendritiques immatures	Lymphocytes B, CPA
Populations répondeuses	Lymphocytes Tαβ • $CD4^+$ • $CD8^+$ • $CD4^-CD8^-$ Lymphocytes Tγδ • $V\delta1^+$	Lymphocytes Tαβ • $CD4^+$ • $CD4^-CD8^-$ • NKT

Table VI : populations lymphocytaires reconnaissant des Ag présentés par CD1

Des clones de lymphocytes T Vδ1 qui reconnaissaient CD1c ont pu être isolés mais ils sont peu représentés parmi les lymphocytes T γδ (101, 102). Des expériences de transfection du TCR Vδ1 (103) ont montré que cette reconnaissance se fait grâce au TCR, semble indépendante de l'Ag et provoque la sécrétion massive de granulysine et la cytotoxicité dépendante de FAS avec un profil Th1. Bien que des études aient montré l'existence de clones T $V\delta1^+$ reconnaissant CD1c (101, 102), leur proportion exacte chez le sujet sain et leur rôle reste inconnue.

CMH et alloréactivité

Plusieurs études ont décrit une alloréactivité chez des clones T $V\delta1^+$ humains impliquant des allèles du CMH_I (104, 105) et du CMH_{II} (106, 107). Dans ces études, des transfectants exprimant les haplotypes du CMH sont reconnus, ce qui laisse penser qu'aucun peptide spécifique n'est nécessaire pour la reconnaissance par les lymphocytes T γδ. De plus des lymphocytes T γδ stimulés par des cellules

autologues ou allogéniques dans des cultures en dilution limite n'ont pas été capables par la suite de discriminer des cibles autologues ou allogéniques (108).

Malgré le nombre important d'études qui montrent une réponse des lymphocytes T γδ à des cellules exprimant un CMH allogénique, il ne ressort pas une règle claire d'utilisation de ces molécules par les lymphocytes T γδ dans un contexte physiologique et la restriction par le CMH ne semble pas s'appliquer comme dans le cas des lymphocytes T αβ. Le groupe de Y. Chien a montré chez la souris que le peptide associé à la molécule IE^k du CMH ne confère pas la spécificité d'un clone γδ qui reconnaît cette molécule. L'épitope se trouve sur la chaîne β du CMH et sa reconnaissance est profondément influencée par l'état de N-glycosylation de la chaîne α de la molécule (109). Ceci est en relation avec les modifications post-traductionnelles des protéines qui sont modifiées dans les cellules infectées ou stressées. Les γδ pourraient ainsi par ce biais détecter des cellules dans de telles situations.

b - Les ligands des lymphocytes T γ9δ2

Après leur découverte et l'obtention d'Ac_m permettant de les reconnaître, les lymphocytes T γ9δ2 ont été associés à de nombreuses réactivités impliquant des pathologies très diverses. Ils sont notamment retrouvés amplifiés dans le sang périphérique et dans les lésions des patients atteints de tuberculose (*cf. infra*). Des études *in vitro* ont ensuite été menées pour caractériser les Ag reconnus.

Ag solubles

Des antigènes non-peptidiques aux phosphoantigènes

Des études, utilisant des modèles murins pour caractériser l'Ag de *M. tuberculosis*, ont mis en évidence HSP65 et ses peptides dérivés comme Ag majeurs (110-112). On a alors recherché la même réactivité chez l'homme mais seuls de très rares clones réactifs à HSP65 ont pu être isolés (113) et ils n'étaient pas représentatifs de la réactivité globale T γδ humaine contre *M. tuberculosis* (114).

Les travaux suivants engagèrent la recherche de l'Ag de *M. tuberculosis* sur une piste révolutionnaire à l'époque : celle d'un Ag non-peptidique de faible masse moléculaire (<3KDa) (115).

Cette piste a été suivie par notre laboratoire en collaboration avec l'équipe de Marc Bonneville et a abouti à l'élucidation de la nature des ligands mycobactériens pour les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$. Ainsi, un isolement des antigènes par chromatographies successives à partir d'extraits mycobactériens fut entrepris. Après séparation, la bioactivité était maintenue et se concentrait dans 4 fractions appelées TUBag1 à 4 (tuberculosis antigens 1-4). Des analyses structurales (RMN et spectrométrie de masse) ont permis par la suite d'élucider, étape par étape, les structures des TUBag ((116-118), cf. figure 10). Ces molécules, de faible masse moléculaire et comportant toutes une partie pyrophosphate, ont été appelées phosphoantigènes.

Parallèlement, un autre groupe a identifié d'autres phosphoantigènes naturels (isopentényl-pyrophosphate, diméthylallyl-pyrophosphate) ou synthétiques (alkyl phosphates) et confirmé la nécessité de groupes phosphates (119 , 120).

Les phosphoantigènes : un vaste groupe de molécules

La formule générique des TUBag est indiquée dans la figure 10**.** La Table VII répertorie les caractéristiques des PAg TUBag de *M.tuberculosis*.

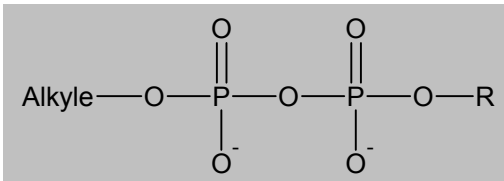


Figure 10 : formule générale des Pag

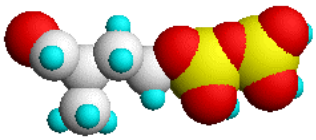
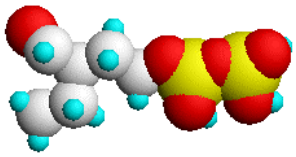
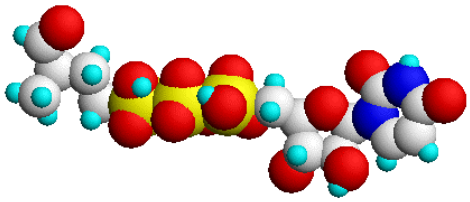
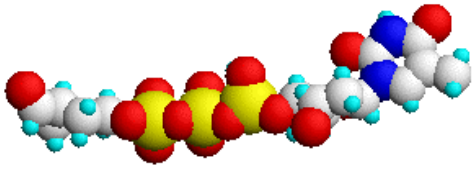
Phosphoantigène	Aperçu tridimensionnel[1]	Bioactivité	Références
TUBag1 : X-P-P X=3-formyl-1-butyl		5-10 nM	(121)
TUBag2 : X'-P-P X'=3-formyl-1-pentyl		nd	Structure possible selon le MW
TUBag3 : X-P-P-P-uridine		1-10 nM	(117)
TUBag4 : X-P-P-P-thymidine		10-20 nM	(116)

Table VII : les TUBag (code des couleurs des atomes : P en jaune, O en rouge, C en blanc, N en marine, H en cyan).

Sur cette base moléculaire, de nombreuses molécules naturelles ou synthétiques se sont révélées activatrices pour les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$, avec cependant des bioactivités très différentes. table VIII et (119, 120 , 122, 123).

[1] Les molécules ont été représentées après optimisation géométrique grâce au logiciel Alchemy 2000.

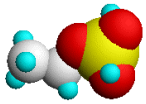
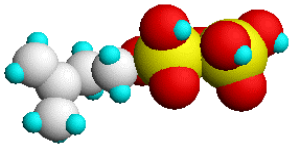
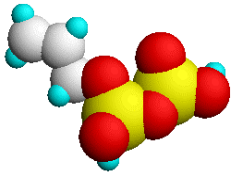
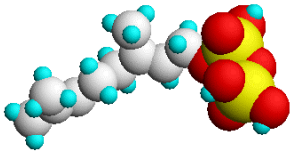
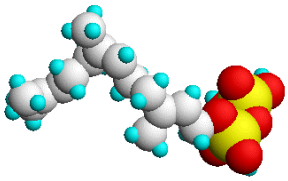
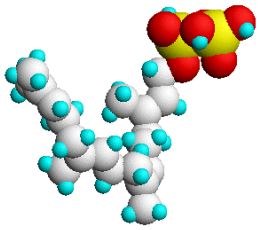
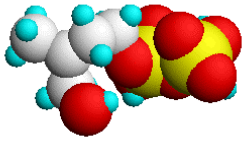
Phosphoantigène	Aperçu tridimensionnel[1]	Bioactivité	Références
Ethyl-P		5 - 10 mM	(120)
Isopentényl-P-P (IPP)		1 - 10 µM	(119, 123)
Allyl-P-P		5 µM	(119)
Géranyl-P-P		10-20 µM	
Farnésyl-P-P		10-20 µM	
Géranyl-géranyl-P-P		10-20 µM	
4-hydroxy-3méthyl-but-2enyl-P-P		1-5 nM	(124)

table VIII : des PAg parmi les plus représentatifs (code des couleurs des atomes : P en jaune, O en rouge, C en blanc, H en cyan).

[1] Les molécules ont été représentées après optimisation géométrique grâce au logiciel Alchemy 2000.

Les phosphoantigènes les plus bioactifs font partie des isoprénoïdes. Plusieurs études et particulièrement des résultats exposés dans ce mémoire ont tenté de déterminer les caractéristiques chimiques conférant la réactivité aux Ag des lymphocytes T γ9δ2. En étudiant différents alkenyl-pyrophosphates et prenyl-pyrophosphates, l'équipe de Bloom (125) a proposé sans grande surprise l'unité antigénique core reconnue par les lymphocytes T γ9δ2 (cf. figure 11).

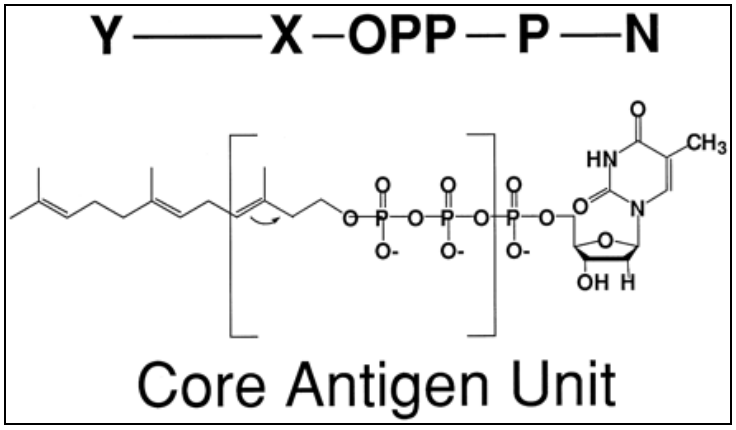


Figure 11 : d'après (125)

Les PAg les plus bioactifs sont des intermédiaires des voies de biosynthèse des isoprénoïdes. Il existe deux voies de biosynthèse des isoprénoïdes (représentées figure 12) : la voie du mévalonate, ubiquitaire et la voie de Rohmer ou du DOXP - 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (126). Cette dernière voie est l'apanage de nombreux micro-organismes dont *E. coli*. Ses métabolites intermédiaires se sont révélés être de puissants Ag pour les lymphocytes T γ9δ2 (127, 128) comme le 3-formyl-1-butyl-P-P (TUBag1) (118) ou le 4-hydroxy 3-méthyl-but-2enyl-P-P (124).

Ces voies métaboliques différentes permettraient ainsi aux lymphocytes T γ9δ2 de faire la différence entre des cellules saines et infectées de par la qualité et la quantité des PAg produits (129). L'IPP est le métabolite final de ces deux voies. Ainsi, il n'est pas caractéristique de l'une ou l'autre et s'avère peu bioactif comparé aux PAg de micro-organismes. En outre, des fractions de faible poids moléculaire obtenues à partir d'extraits de différentes bactéries se sont révélées stimulantes sans présence d'IPP en quantité suffisante pour stimuler, indiquant la présence d'autres composés bioactifs (128). Les micro-organismes possédant les enzymes de la voie de Rohmer ont été recensés dans une récente revue (130).

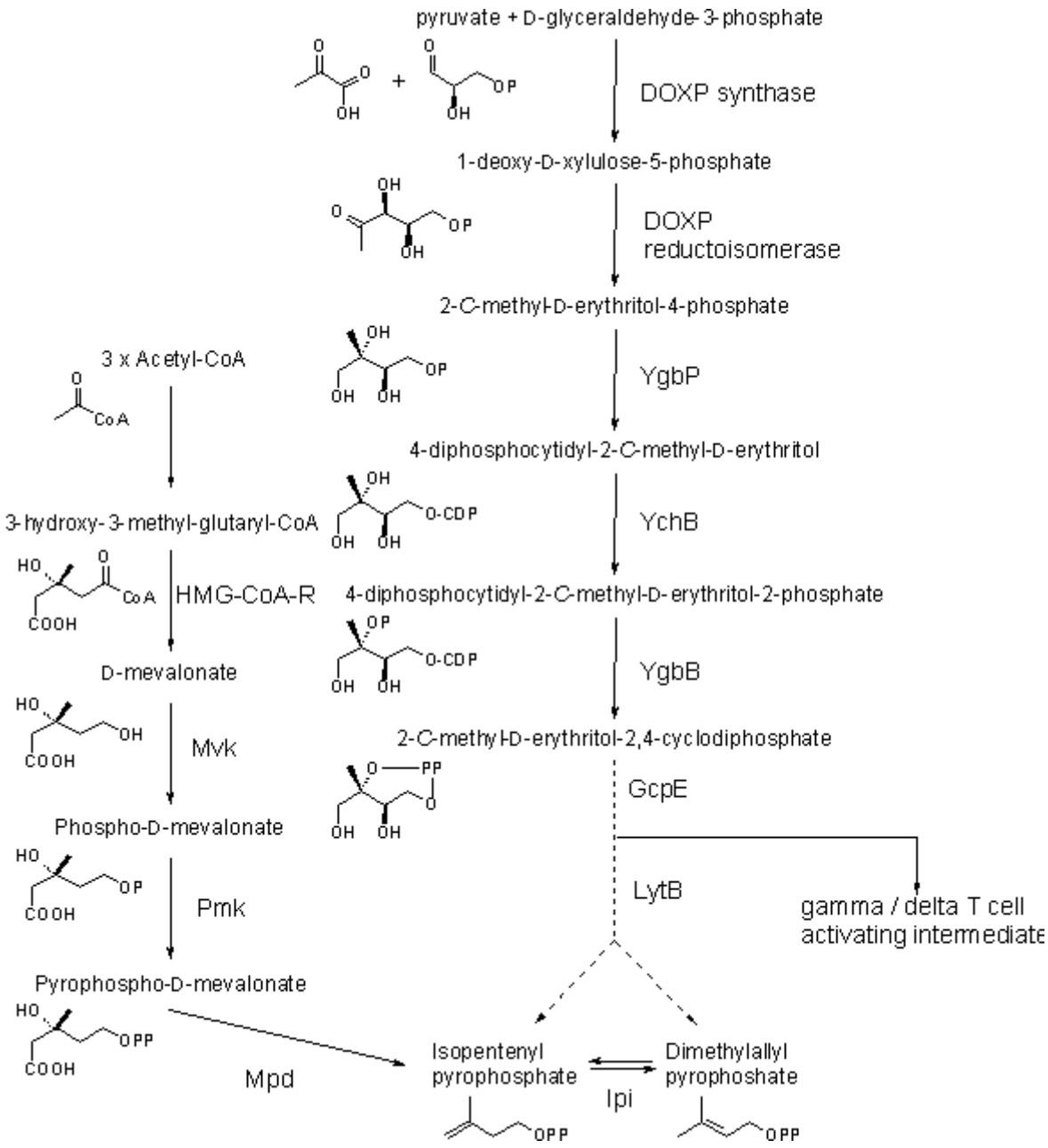


Figure 12 : voies de biosynthèse des isoprénoïdes. A gauche voie ubiquiste du mévalonate et à droite voie de Rohmer ou du DOXP. d'après http://www.jomaa-pharmaka.de

Par la suite deux autres groupes de molécules stimulatrices spécifiques pour les lymphocytes T γ9δ2 ont été trouvés : les alkylamines et les aminobiphosphonates (ABP). Il faut cependant noter que leurs bioactivités sont beaucoup plus faibles.

Les alkylamines

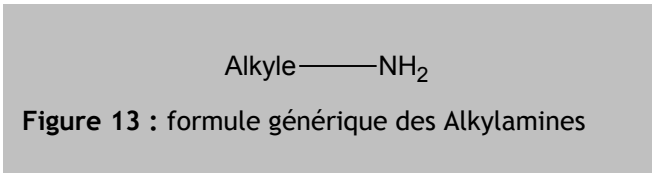


Figure 13 : formule générique des Alkylamines

Les alkylamines constituent un groupe hétérogène de molécules (figure 13). Une étude récente a montré que certaines d'entre elles (éthylamine, iso-butylamine) étaient capables d'activer sélectivement les lymphocytes T γ9δ2 (131), mais avec une bioactivité millimolaire. De plus l'utilisation de transfectants du TCR γ9δ2 a permis de montrer que ce TCR est nécessaire à leur reconnaissance. Certaines de ces molécules sont présentes en quantités millimolaires dans la nature (extraits microbiens mais aussi de nombreuses plantes comestibles), mais leur rôle dans une immunorégulation générale impliquant les lymphocytes T γ9δ2 reste à démontrer. Les alkylamines les plus bioactives sont celles présentant la plus longue chaîne avec une substitution (Table IX).

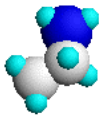
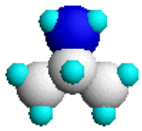
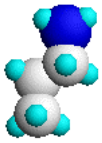
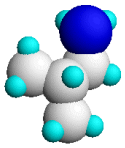
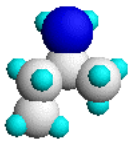
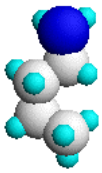
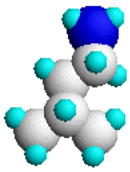
Antigène	Aperçu tridimensionnel[1]	Bioactivité	Références
Ethylamine		10-20 mM	(131)
Isopropylamine		5-10 mM	
n-propylamine		5-10 mM	
Iso-butylamine		1-2 mM	
Sec-butylamine		1-2 mM	
n-butylamine		5-10 mM	
Iso-amylamine		2-5 mM	

Table IX : principales alkylamines bioactives (code des couleurs des atomes : (N en marine, C en blanc, H en cyan).

[1] Les molécules ont été représentées après optimisation géométrique grâce au logiciel Alchemy 2000.

Les aminobisphosphonates (ABP)

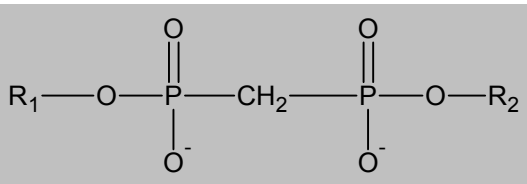


Figure 14 : formule générique des ABP

Les ABP sont de petites molécules qui ont été développées par l'industrie pharmaceutique comme agents thérapeutiques inhibiteurs de la résorption osseuse. Ces molécules sont constituées d'une courte chaîne carbonée attachée à un groupement phosphonate (figure 14). Elles sont de ce fait des analogues structuraux bioisostères des pyrophosphomonoesters. En outre, les ABP ont une fonction alkyl-amine leur faisant partager les caractéristiques chimiques à la fois des alkylamines et des phosphoantigènes. Les ABP se révèlent en effet capables de stimuler la prolifération des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ in vitro comme in vivo (132, 133) alors que les phosphonates (étidronate et clodronates) sont très faiblement ou non bioactifs (*cf*. Table X). Une récente étude a montré en utilisant des transfectants du TCR $\gamma 9\delta 2$ que les ABP étaient reconnus par ce TCR et que des cellules tumorales ou des monocytes incubés avec ces derniers devenaient des cibles des $\gamma 9\delta 2$. (134), (135). Ceci suggère que ces molécules sont soit métabolisées, soit apprêtées par les CPA et donc que leur mode de reconnaissance diffère des PAg typiques.

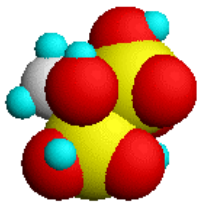
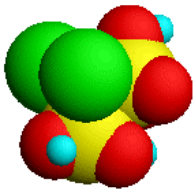
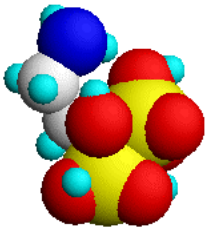
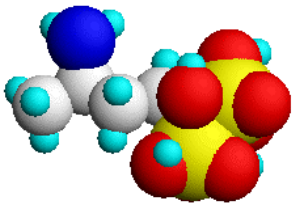
antigène	Aperçu tridimensionnel[1]	Bioactivité	Références
Etidronate		non bioactif	(132, 133)
Clodronate		non bioactif	
Pamidronate		5-10 mM	
Ibandronate		1-2 mM	

Table X : principaux biphosphonates (code des couleurs des atomes : P en jaune, O en rouge, C en blanc, H en cyan, N en marine et Cl en vert).

Superantigènes

Les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ répondent uniquement au superantigène SEA (Staphylococcal Enterotoxin A) (136 , 137). Cette réactivité est corrélée à l'expression du segment Vγ9 et est indépendante de la chaîne δ appariée (138, 139). A l'instar de la réponse T$\alpha\beta$ aux superantigènes, la SEA induit la prolifération de clones V$\gamma 9^+$. Le site de fixation de la SEA au TCR $\gamma\delta$ a été déterminé et se trouve être proche structuralement de celui reconnu par le domaine Vβ du TCR $\alpha\beta$ (139). La reconnaissance de la molécule SEA par les lymphocytes T $\gamma\delta$ se fait ainsi de

[1] Les molécules ont été représentées après optimisation géométrique grâce au logiciel Alchemy 2000.

manière similaire aux lymphocytes T $\alpha\beta$ (nécessité des molécules du CMH_{II} et de la présence de CPA) et est très différente de celle des PAg.

Antigènes cellulaires

Certaines cellules humaines, d'origine hématopoïétique, sont stimulantes pour les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$. La majorité est représentée par des lignées tumorales.

Cellules cancéreuses

Les cellules Daudi (lymphome de Burkitt) sont connues depuis 1990 comme de puissants Ag des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$. Des cellules Daudi incubées avec des PBL humains induisent une forte amplification de lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ (140, 141). Les cellules Daudi sont aussi fortement lysées par des lignées ou des clones T $\gamma 9\delta 2$. D'autres lignées tumorales et notamment le myélome RPMI 8226 (142) ou le lymphome de Burkitt Akata (50), se sont révélés capables de stimuler les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$. Tous les lymphomes de Burkitt ne sont cependant pas stimulants à l'instar des cellules Raji (68). La Table XI récapitule les caractéristiques de différentes lignées tumorales courantes, cibles des LT $\gamma 9\delta 2$. Cette table n'est pas exhaustive car de nombreuses cellules tumorales peuvent être la cible des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$.

Les Ag de ces cellules ne sont pas connus et on ne dispose que de maigres données à leur égard. Une étude a montré que la spécificité de clones $\gamma 9\delta 2$ générés avec des cellules Daudi était la même que celle des clones $\gamma 9\delta 2$ générés avec des cellules Akata, sans lyse préférentielle pour la cellule cancéreuse ayant servi à la stimulation initiale (50). De plus, une analyse comparative n'a indiqué aucune différence entre les séquences jonctionnelles de la chaîne $V\delta 2$ de cellules d'un même individu amplifiées soit à partir de Daudi, soit à partir d'Akata. Ainsi, le ligand présent sur les cellules Daudi pourrait être partagé par d'autres cellules tumorales.

Etant donné que les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ expriment plusieurs NKR (*cf.infra*), une lyse de type NK a été recherchée. Plusieurs données nous indiquent que la lyse des cellules Daudi ou RPMI 8226 est différente de la lyse NK. Cette lyse est en effet bloquée par des Ac anti-TCR (68, 143) et des cellules Jurkat transfectées avec

le TCR Vγ9Vδ2 deviennent cytotoxiques pour les lignées Daudi et RPMI 8286. En outre, le fait que la lignée Daudi soit β2m$^-$, donc déficiente en molécules du CMH_I, n'explique pas son profil stimulant car des variants non déficients sont certes plus faiblement, mais toujours activateurs (68, 140, 144). En revanche, pour les autres lignées comme K562, Jurkat ou Molt4, la cytotoxicité pourrait être le résultat des récepteurs NKR. Cependant, l'absence de molécules du CMH_I à la surface de K562 ne suffit pas à induire une prolifération (140). Ainsi la reconnaissance des cellules tumorales a deux composantes : la première, spécifique, implique le TCR et confère la réactivité à des cellules comme Daudi ou RPMI 8226 et la seconde, plus importante, implique les NKR et détermine l'issue de la réponse en réglant le seuil d'activation des lymphocytes T γ9δ2.

Cellule tumorale	**nature**	**expression des molécules CMH_I**	**stimule les LT γ9δ2**		**références**
			cytotoxicité	prolifération	
Daudi	Lymphome de Burkitt	-	+++	+++	(140, 145)
Daudi β2m		+	+	-	(50)
RPMI8226	Myélome	+	++	+	(142)
Ataka	Lymphome de Burkitt	nd	++	+	(50)
MCF7	Carcinome	nd	+	nd	(146)
K562	Erythroleucémie	-	+	-	(140, 141)
Molt 4	Leucémie T	+	+	-	(140, 141)
Jurkat	Leucémie T	+	+	-	(142)

Table XI : Cellules tumorales reconnues par les lymphocytes T γ9δ2 (nd : non déterminé).

Cellules infectées par des virus

Dans de rares cas d'infections virales, une réactivité a été montrée : des cellules infectées par HSV ont été capables de stimuler une prolifération et une amplification des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ (147). Cependant la cytotoxicité provoquée n'était pas restreinte aux cellules HSV^+ mais été aussi dirigée contre ces cellules infectées par le virus de la vaccine très différent de HSV. Les auteurs suggéraient alors la présence d'un antigène cellulaire, surexprimé dans le cadre de ces deux infections, plutôt qu'un antigène viral reconnu. On sait que de nombreux virus inhibent la présentation de l'Ag par la cellule infectée, notamment en empêchant l'expression des molécules du CMH_I à la surface (148, 149). Cette absence de molécules du CMH_I pourrait favoriser une lyse de type NK contrôlée par les NKR (*cf. infra*).

Implication des HSP

Les premières études sur la réactivité T $\gamma\delta$ avaient montré que les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ reconnaissaient des HSP (famille HSP60) dans des extraits mycobactériens stimulants (113). De même, des antisera contre HSP58 inhibaient la prolifération des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ induite par les cellules Daudi, et des HSP étaient retrouvées à la surface de ces dernières (68). Indépendamment, une autre étude suggérait l'implication des HSP dans la reconnaissance de RPMI 8226, mais les Ac anti HSP liaient plusieurs cibles tumorales sans relation avec leur caractère stimulant (142). Cependant des HSP purifiées ou recombinantes n'étaient pas stimulatrices pour les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ ((114); J-J Fournié, communication personnelle). De plus, les ligands HSP des cellules tumorales n'ont jamais été caractérisés. Il est concevable que dans ces études, les préparations d'HSP étaient contaminées par des PAg d' *E. coli*.

Compte tenu de la grande diversité structurale des Ag reconnus par les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$, certains auteurs ont essayé de trouver un dénominateur commun expliquant cette réactivité. Tanaka (119) a proposé les prényls phosphates comme présents chez les micro-organismes et les cellules de mammifères (voie de biosynthèse des isoprénoides), hypothèse renforcée par le rôle important de la farnésylation dans la tumorigénèse. Ces molécules seraient ainsi présentes dans des

cellules infectées, transformées ou en détresse et impliqueraient les lymphocytes T γ9δ2.

2 - Reconnaissance de l'Ag

Les premières études portant sur la réactivité γδ ont mis l'accent sur la recherche d'une activation par des superantigènes (150). En effet on était d'une part, face à des lymphocytes dont une large proportion était capable de répondre à des extraits de *M.tuberculosis in vitro* chez des patients non exposés (114) et d'autre part, en présence d'amplifications sélectives de cellules dont les TCR Vγ9Vδ2 présentaient une grande diversité jonctionnelle (141, 151).

La reconnaissance de tels ligands est extrêmement intrigante et incite à rechercher la manière dont ils sont reconnus. Différentes études ont en plus montré que la réactivité des lymphocytes T γ9δ2 croise entre différents Ag pour une même population, renforçant encore cette singularité. Par exemple, des clones obtenus par stimulation avec des Ag mycobactériens répondent aussi à *E.coli* et *Listeria* (28); ou bien une population γ9δ2 amplifiée par des extraits de *E.Coli* répond aussi à *P.aeruginosa* (152).

Autre caractéristique majeure, les lymphocytes T γδ humains ne nécessitent pas de présentation par les molécules du CMH pour reconnaître leur Ag (72, 140, 153) qu'il soit soluble ou cellulaire, à de rares exceptions près concernant la population $V\delta1^+$.

Ces particularités éloignent les lymphocytes T γδ de leurs homologues αβ et les rapprochent des cellules NK. En effet, outre le TCR, les lymphocytes T γδ possèdent d'autres immunorécepteurs de type NKR. Cet ensemble de récepteurs conditionne à la fois leur spécificité et leur réactivité.

a - Reconnaissance médiée par le TCR

Par analogie avec les lymphocytes T αβ, on a souvent inféré que le TCR était impliqué dans la reconnaissance de l'Ag. Cependant le grand nombre et la diversité de nature des antigènes auxquels répond la sous-population T γ9δ2 rendait l'analogie difficile. Les premières études sur les Ag mycobactériens ou les cellules Daudi ont montré que la réactivité était réduite à la population γ9δ2 (151, 154-

156). Plusieurs études ont par la suite montré que des Ac anti-TCR (72, 116 , 120) ou Fab anti-CD3 (123), bloquaient les réponses aux PAg ou à Daudi (68) ce qui était un argument fort, mais non démonstratif, en faveur de l'implication du TCR dans la reconnaissance. Il a fallu attendre la création de cellules Jurkat transfectées avec le TCR $\gamma 9\delta 2$ (157) pour démontrer formellement l'implication du TCR dans la reconnaissance des phosphoantigènes et des antigènes cellulaires portés par le lymphome Daudi ou le myélome RPMI 8226. Ces transfectants (DBS4.3), ont ensuite été utilisés pour montrer l'implication du TCR dans la reconnaissance des alkylamines et des ABP. Ce résultat a récemment été confirmé par l'utilisation d'autres transfectants, produits dans le laboratoire de Y. Tanaka au Japon (135).

Si l'implication du TCR dans la reconnaissance des ligands solubles ou de certaines cellules tumorales est aujourd'hui largement acceptée, le mode de reconnaissance de l'Ag demeure mal compris. La majorité des études sur ce sujet abondent dans le sens d'une non restriction par le CMH mais d'un contact cellulaire nécessaire (85). Bien qu'ayant des particularités structurales, le TCR $\gamma\delta$ n'en demeure pas moins un immunorécepteur associé à des tyrosines kinases comme le BCR ou le TCR $\alpha\beta$. Il est connu depuis longtemps que ces récepteurs nécessitent une agrégation pour déclencher une réponse cellulaire (158). Si la capacité d'un Ag cellulaire à agréger son récepteur est évidente, le cas des Ag solubles est plus épineux. Le problème du mode de présentation de ces Ag solubles se pose ainsi que la possibilité de l'intervention d'une molécule présentatrice ou "porteuse".

Un site de fixation des phosphoantigènes ?

Toujours en raisonnant par analogie avec le TCR $\alpha\beta$ ou les Ig, un lien entre les régions CDR3 (codées au niveau de la jonction Vγ-Jγ pour la chaîne γ et la jonction Vδ-D-Jδ pour la chaîne δ) et la spécificité antigénique a été recherché. L'analyse des régions CDR3 des chaînes γ et δ des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ obtenus par amplification in vitro à partir de PBL stimulés par des cellules Daudi ou des phosphoantigènes bactériens a révélé une polyclonalité (156). Néanmoins, la majorité des séquences jonctionnelles des clones $\gamma 9\delta 2$ périphériques (mais pas thymiques) présentent des motifs avec des acides aminés hydrophobes (LEU, ILE,

VAL et GLY) conservés en position 97 de la chaîne δ (31) codés par les nucléotides N (*cf.supra*). Parallèlement, l'usage préférentiel de segments V9JPC1γ et V2DJCδ a été constaté chez des clones réactifs au lymphome Daudi et aux Ag mycobactériens (156) ou aux alkyl-phosphates (159) . Des expériences de transfection de TCR constitués de segments Jγ différents ont permis de montrer que le remplacement de la région Vγ9-N-JγP par Vγ9-N-Jγ1 abolissait la réponse à l'éthyl-P-P ou à l'IPP et qu'en outre le remplacement d'un seul nucléotide N abolissait aussi cette réactivité. Cela invalidait l'hypothèse du mode de reconnaissance de type superantigènes des PAg et allait dans le sens d'une reconnaissance de type Ig, pour un haptène par exemple, avec implication de résidus de la région CDR3 (160, 161).

Le même segment JγP est retrouvé de manière récurrente chez les lymphocytes T γ9δ2 répondant à l'éthyl-P-P, à l'isobutylamine ou au pamidronate. Ce résultat ne provient pas d'une situation déjà pré-établie, avec des donneurs ayant déjà ce segment surepresenté parmi leur population de lymphocytes T γ9δ2 car seuls des transfectants exprimant des TCR avec ce segment JγP (et non Jγ1 ou Jγ2) répondent à ces 3 classes d'Ag.

De plus, l'analyse des segments Jγ chez l'homme et la souris (figure 15) révèle des résidus non conservés en position N-terminale et notamment des résidus (KKIK) chargés positivement (figures 15 et 16). Les deux premières lysines sont propres au segment JγP alors que la troisième se retrouve dans tous les segments Jγ des deux espèces. L'importance de ces acides aminés a été évaluée en les remplaçant par une glutamine par mutagenèse. Les cellules transfectées avec les mutants pour l'un ou l'autre des deux premiers résidus lysines n'ont plus répondu aux 3 classes d'Ag. La mutation du dernier résidu lysine n'a pas conduit à l'expression membranaire du TCR (161).

Il est intéressant de comparer les séquences humaines avec celles du singe du nouveau monde Aotus. En effet, les singes sont les seuls animaux qui partagent

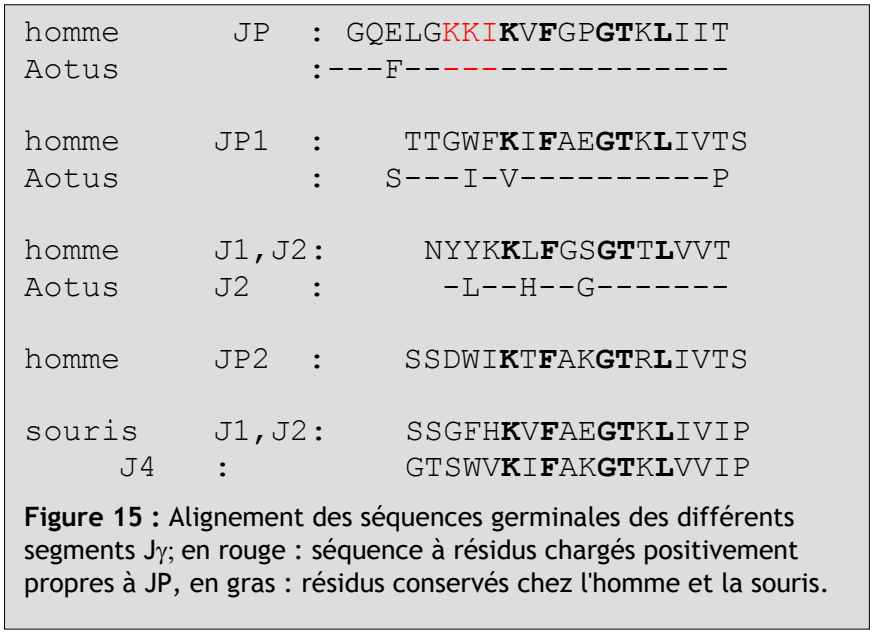


Figure 15 : Alignement des séquences germinales des différents segments Jγ; en rouge : séquence à résidus chargés positivement propres à JP, en gras : résidus conservés chez l'homme et la souris.

avec l'homme la population T γ9δ2. Les Ac_m anti-TCR Vγ9Vδ2 humain croisent avec les TCR Vγ9Vδ2 simiens et les lymphocytes T γ9δ2 s'amplifient in vivo en réponse à l'IPP chez de nombreuses espèces de singe (162). L'analyse des séquences montre que les plus conservées, entre l'homme et l'Aotus, sont Jγ1 et JγP, avec présence de la cassette KKIK dans cette dernière (figure 15). En outre, comme chez l'homme, les clones T Vγ9Vδ2 issus d'une stimulation par l'IPP présentent majoritairement un résidu hydrophobe conservé dans le CDR3δ. Ces observations, ajoutées au fait que la séquence TRGV9 est hautement conservée parmi les primates, sont en faveur de caractéristiques conservées au cours de l'évolution (ces deux espèces ont divergé il y a 60 millons d'années), conférant cette réactivité γ9δ2 (162).

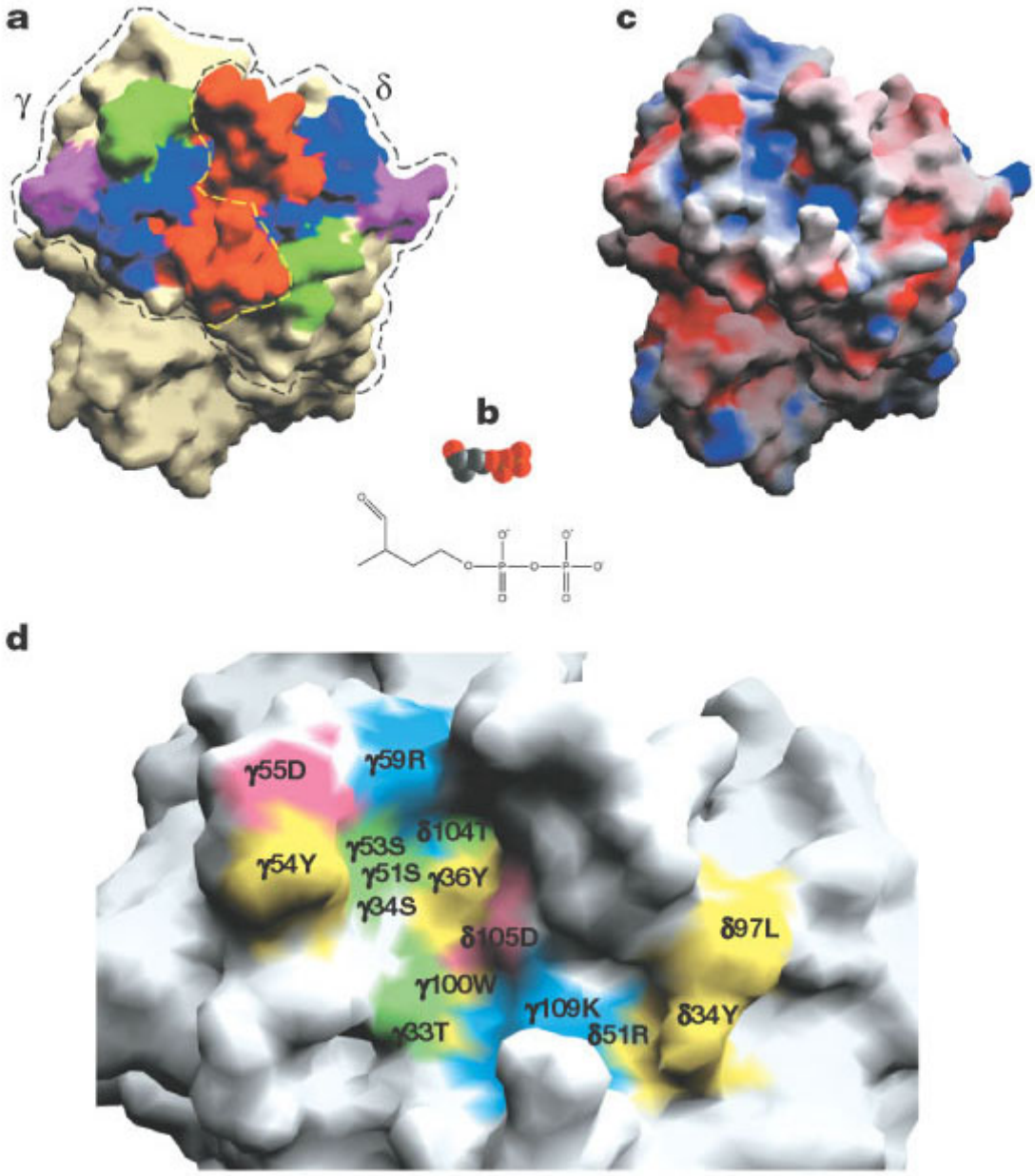


Figure 16 : Représentation de la surface du TCR, a) positions des boucles CDR (CDR1 : bleu, CDR2 : vert, CDR3 : rouge, HV4 : violet); b) 3fbPP représenté à la même échelle que le TCR en a et c; c) potentiel de surface codé par couleurs : du rouge -10kT au bleu +10 kT; d) zoom de la cavité pouvant accueillir le PAg. (résidus chargés négatif en rouge, positif en bleu, hydrophobe en jaune et polaires en vert); d'après (43)

Ces données associées à celles de la cristallographie du TCR $\gamma 9\delta 2$, fournissent plusieurs indices pour comprendre l'interaction des PAg avec le TCR. Selon la structure tridimensionnelle du TCR, la surface du TCR $\gamma 9\delta 2$ présente des cavités, comme la surface d'un Fab liant une petite molécule et contrairement à celle plus plane des TCR $\alpha\beta$ contactant les molécules du CMH. En effet, les boucles des CDR3

font saillie et créent deux protubérances auxquelles s'associent les portions CDR1δ, CDR1γ et CDR2γ pour former une cavité susceptible de recevoir le PAg (figure 16a,b,c). Il existe effectivement dans la poche, des résidus positivement chargés (Arg 59 de CDR2γ, Lys 108 et 109 de CDR3γ et Arg51 de CDR2δ) qui pourraient interagir avec les groupements phosphates. Le résidu Lys 109 a été montré par ailleurs indispensable à la réactivité aux PAg (deuxième résidu de la séquence KKIK, cf. *supra* (161)). Il est intéressant de noter que parmi les rares clones réactifs aux PAg qui n'utilisent pas le segment JP, on trouve cependant une lysine en position équivalente (43). En ce qui concerne la partie Vγ, tous les résidus formant la cavité, à l'exception de deux (Thrγ33 et Trpγ100), sont propres à Vγ9 (figure 16d), ce qui explique la nécessité de Vγ9 pour conférer une réactivité aux PAg.

En ce qui concerne le CDR3 de la chaîne δ, les TCR de clones réactifs ont des CDR3δ divers allant de 3 à 12 acides aminés codés en général par des nucléotides N et un seul segment Dδ3. Pour le TCR cristallographié, il comprend 15 résidus avec notamment le résidu hydrophobe leucine en position 97 (*cf. supra* et figure 16d). Nous avons vu que ce résidu est sélectionné par l'Ag et les auteurs ont proposé qu'il puisse interagir avec la portion hydrophobe des PAg.

Les alkylamines présentent des structures un peu différentes des PAg mais qui ne sont pas incompatibles avec une fixation à la surface du TCR. Ces molécules présentent une courte chaîne alkyle hydrophobe terminée par un groupement amine positif pouvant établir une liaison hydrogène. Au niveau de la cavité ménagée par les boucles CDR3, on trouve des résidus hydrophobes qui pourraient interagir avec la partie alkyle des akylamines et constituer des contraintes topologiques strictes de fixation. En bout de cavité se présente une tyrosine (Tyrδ34) pouvant interagir avec le groupement amine. Cependant l'absence de partie pyrophosphate ne permet pas de lien avec les résidus chargés positivement : on doit s'attendre à une moins bonne affinité. Ces composés sont effectivement bioactifs aux concentrations millimolaires (131).

Fonctionnement du TCR γδ

Comme le TCR αβ, le TCR γδ ne possède pas d'activité kinase intrinsèque et s'associe au complexe CD3 (ε,γ,δ et ζ–ζ) comportant les motifs ITAM nécessaires au démarrage de la transduction du signal impliquant les kinases $p56^{lck}$ et ZAP70 (163, 164).

Peu d'études ont été menées sur la transduction du signal par le TCR γδ, mais de par son association à CD3, Il est probable qu'une fois le signal transmis, la cascade de transduction soit très proche (165, 166). Cependant, les Ag et les modes de reconnaissance sont très différents, ceci pouvant induire des particularités pour la mise en jeu de ce TCR dans les événement précoces de la transduction du signal.

Des résultats intéressants ont été obtenus chez des lymphocytes T γ9δ2 purifiés en comparant le signal induit par un PAg, l'IPP, et un anti-CD3 (167). En réponse à l'IPP, $p56^{lck}$ est activée rapidement comme pour les lymphocytes T αβ. Cependant, des événements avals comme l'activation de ZAP70, de la PI3-kinase et de la voie des MAP-kinases sont retardés par rapport à la cinétique observée en réponse à un anti-CD3 ou à celle obtenue chez les lymphocytes T αβ. Une autre particularité des lymphocytes T γ9δ2 est l'existence d'un signal soutenu en réponse à l'IPP comparé à celui provoqué par un anti-CD3.

Contrairement aux lymphocytes T αβ, les lymphocytes T γ9δ2 expriment peu ou de façon variable CD28. La même équipe a montré que la co-stimulation *via* CD28, absolument nécessaire aux lymphocytes T αβ, n'était pas indispensable pour déclencher la production de TNFα. (168).

b - Reconnaissance par des NKR

Expression des NKR par les lymphocytes T γ9δ2

Les cellules NK expriment à leur surface un ensemble d'immunorécepteurs, les NKR, qui leur permet de reconnaître leurs cibles et de contrôler leurs réponses. Certains de ces récepteurs sont exprimés par d'autres cellules comme les LTC $CD8^+$ (169) et γδ (170).

Chez l'homme, les NKR sont regroupés en deux grandes classes de glycoprotéines membranaires : les récepteurs de type lectine (hétérodimères CD94/NKG2 ou homodimère NKG2D et NKRP1A) et les récepteurs appartenant à la superfamille des Ig (KIRs et LIRs).

Les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ expriment à leur surface des récepteurs NKR. Ces derniers, ainsi que l'unité de transduction du signal qui leur confère un pouvoir activateur ou inhibiteur, sont récapitulés dans la Table XII.

NKR	% expression des LT $\gamma 9\delta 2$	Ligands connus	Fonction et module de transduction	Références
Type lectine				
CD94-NKG2A	60 à 80%	HLA-E	Inhibiteur 1 ITIM	(171-173)
NKG2D	60 à 80%	MICA,MICB	Activateur DAP10	(94)
NKR-P1A (CD161)	15 à 25%	?	Activateur FcRIγ	(52, 174)
Type Ig				
p58	10 à 20%	HLA-C	Inhibiteur 2 ITIM	(52)

Table XII : les NKR exprimés par les lymphocytes T $\gamma\delta$

Fonctionnement des NKR

La réponse NK résulte de l'intégration des signaux intracellulaires mis en jeu par les récepteurs de type inhibiteurs et activateurs. Ces récepteurs permettent aux cellules NK de faire la différence entre une cellule saine et une cellule infectée, activée ou tumorale. Ce contrôle de la réactivité NK est aujourd'hui bien documenté (175-178).

Le contrôle négatif se fait par un ensemble de récepteurs NKR inhibiteurs. La liaison des NKR inhibiteurs, notamment aux aux molécules du CMH_I exprimées à la

surface d'une cible potentielle, empêche sa lyse (hypothèse du soi manquant (179)). En effet, l'absence de marqueur du soi (notamment CMH_I) sur une cellule est souvent le résultat d'un état de détresse ou d'un parasitisme intracellulaire. Ces récepteurs contiennent dans leur portion intracytoplasmique des motifs ITIM dont la phosphorylation (survenant seulement lors de la transduction du signal en réponse à leur pontage avec un récepteur activateur à ITAM), recrute des phosphatases de la famille SHP (180, 181). L'action de ces phosphatases (en déphosphorylant les résidus phosphorylés par les kinases activatrices) interrompt la cascade de transduction du signal. En outre le signal inhibiteur de ces récepteurs l'emporte souvent sur le signal activateur des récepteurs à ITAM.

Nous avons vu que le principal récepteur activateur sélectif des lymphocytes T $\gamma\delta$ est le TCR. Cependant d'autres récepteurs activateurs, de type NKR, peuvent entrer en jeu et augmenter le signal émis par le TCR, selon un système de co-récepteur comme il en existe chez d'autres lymphocytes. Le co-récepteur NKR-P1A amène ici un module ITAM supplémentaire pour renforcer le signal, alors que le co-récepteur NKG2D est associé à une protéine adaptatrice DAP10 (182). DAP10 ne comporte pas d'ITAM mais contient un motif YxxM, liant les domaines SH2 (Src homology 2), qui permet le recrutement de la PI3K. Il faut noter que la molécule costimulatrice CD28 utilise la même voie chez les lymphocytes T $\alpha\beta$. Ainsi un co-engagement de NKG2D et du TCR renforce la réponse spécifique aux PAg (95).

A côté de ces récepteurs activateurs, les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ expriment fortement des NKR inhibiteurs de type KIR, non polymorphes, constitués de CD94 associé de manière covalente à NKG2A/C (172). CD94 et NKG2 sont des lectines de type C. Le récepteur ainsi formé reconnaît HLA-E (183). Compte tenu des connaissances acquises chez les cellules NK et des récepteurs exprimées par les lymphocytes T $\gamma\delta$, la figure 17 illustre l'implication des NKR inhibiteurs selon l'hypothèse du soi manquant et la possibilité de sur-exprimer des ligands inductibles comme MIC dans le cas de détresses cellulaires.

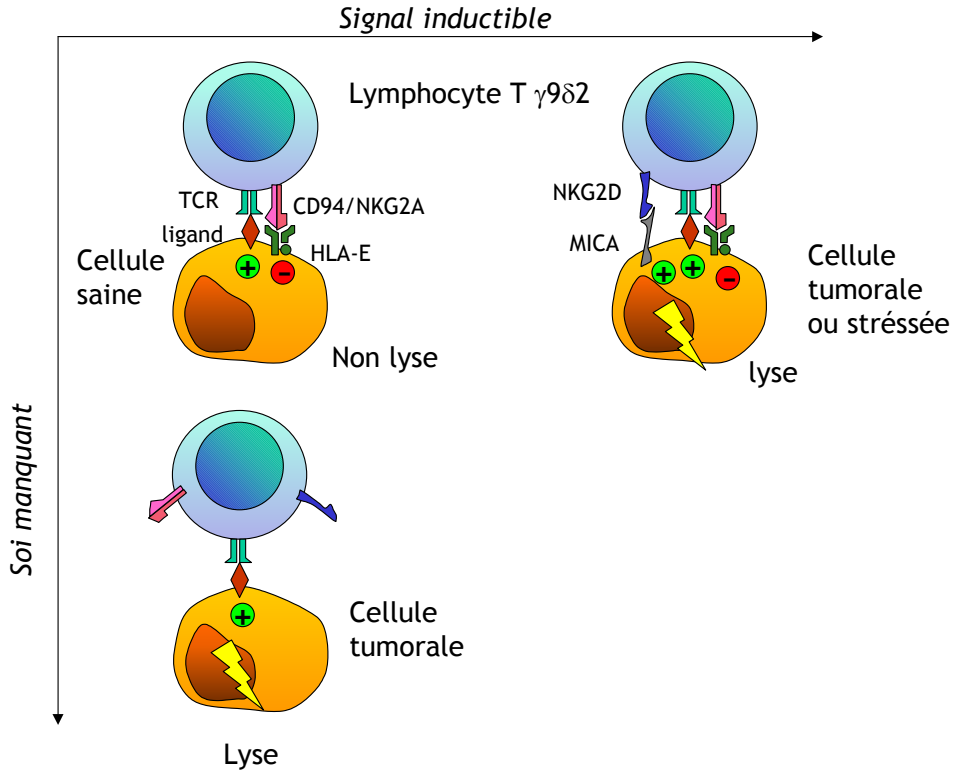


Figure 17 : implication des NKR dans le contrôle de la cytotoxicité des LT γδ (d'après (184))

Par ce mode de reconnaissance particulier, les LT γδ sont capables de lyser de nombreuses cibles si les signaux d'activations sont suffisants ou, inversement, si les signaux inhibiteurs sont sous-représentés. Ainsi, une fois activées par un Ag donné *in vitro*, ces cellules deviennent cytotoxiques pour de nombreuses autres cibles, y compris elles-mêmes (lyse fratricide). On assiste alors à des réactivités multiples comme celles des lymphocytes T activés par des cellules infectées par le virus HSV qui deviennent cytotoxiques pour des cellules infectées par le virus de la vaccine (147). Le seul frein à ce phénomène étant l'expression cellulaire de NKR inhibiteurs et de leurs ligands par les cellules cibles potentielles. On constate d'ailleurs que les lymphocytes T γ9δ2 expriment beaucoup plus CD94/NKG2A (80%) que leurs homologues cytotoxiques αβ (4%) qui sont, eux, principalement contrôlés par la coopération avec la CPA et les lymphocytes Th.

c - "It takes two to tango"

Lorsque la nature des Ag solubles reconnus par les lymphocytes T γ9δ2 s'est précisée, le mode de reconnaissance et la présentation de ces molécules ont été activement recherchés. Dans le cas des PAg, il n'y a pas de restriction par le CMH, mais l'hypothèse d'une molécule présentatrice apparentée demeure. En effet de nombreuses études ont montré la nécessité d'un contact cellulaire pour que les PAg déclenchent une réponse.

Tout d'abord, une caractéristique frappante des lymphocytes T γ9δ2 est leur capacité à exercer une lyse fratricide ou à libérer du TNF-α, par exemple lorsqu'un clone est stimulé avec TUBag4 (72) sans présence d'aucun autre type cellulaire. En outre, ces réponses n'ont lieu que si un contact cellulaire est permis. Ces résultats sont confirmés et renforcés par une autre étude (85) qui montre que des clones γ9δ2 prolifèrent en réponse au mono-éthyl-phosphate ou à l'IPP sans CPA, mais aussi que cette réponse est toutefois meilleure en présence de CPA (PBMC). La même chose fut obtenue avec les transfectants du TCR γ9δ2, DBS 4.3. En outre, en l'absence de CPA, un contact cellulaire entre les cellules d'un clone γ9δ2 s'est révélé nécessaire pour répondre au mono-éthyl-phosphate. Il faut noter que d'autres travaux avaient souligné l'importance des cellules accessoires comme les monocytes ou les macrophages alvéolaires pour une réponse à *M.tuberculosis* ((185, 186) mais vis à vis de préparations antigéniques moins purifiées (sonicats de *M.tuberculosis*).

Les lymphocytes T γ9δ2 ont ainsi besoin d'un contact avec une autre cellule pour répondre aux PAg, cette cellule pouvant être un autre lymphocyte T γ9δ2 ou mieux une cellule de type monocytaire. Cependant cette coopération entre les deux cellules ne met pas en jeu les molécules classiquement retrouvées pour l'apprêtement des Ag pour les lymphocytes T αβ comme les molécules des classes I ou II du CMH, CD1 ou TAP1/2. En outre cette pseudo-présentation des PAg peut se faire par des cellules préalablement fixées au glutaraldéhyde contrairement aux peptides présentés par les molécules du CMH (76).

L'activation par les ABP semble requérir encore davantage la présence de cellules accessoires monocytaires (THP-1) puisque les lymphocytes T γ9δ2 sont

tributaires de leur présence dans la culture pour sécréter de l'IFNγ ou proliférer en réponse aux ABP (135). De même des transfectants pour le TCR γ9δ2 nécessitent la présence des THP-1 pour répondre aux ABP. Cependant, la présentation des ABP n'est pas l'apanage des CPA classiques puisque des cellules cancéreuses non myéloïde peuvent induire la prolifération de lymphocytes T γ9δ2 après incubation avec des ABP ou des PAg (187). Il faut noter que le temps de contact avec les ABP peut être très court (10 min.), ce qui suggère que ces molécules s'attachent rapidement à la surface des THP-1 sans apprêtement préalable. On ne peut pas exclure que ces cellules servent juste à concentrer l'Ag à leur surface, car elles présentent simplement une affinité plus élevée que les autres types cellulaires.

3 - Les rôles des lymphocytes T γδ dans la défense immunitaire

Les lymphocytes T γδ jouent un rôle important dans la protection de l'organisme contre de nombreux pathogènes et tumeurs grâce à leur grande réactivité, leurs localisations stratégiques et leur nombre important. Les paragraphes qui suivent décrivent en détail le rôle des lymphocytes T γ9δ2 mais il faut savoir que les populations Vγ IVδ1 interviennent de manière plus localisée dans la lutte antitumorale, antivirale (CMV, HIV) et dans certaines pathologies impliquant une réponse inflammatoire chronique, voire une auto-immunité (188).

a - Implication dans la lutte contre différents pathogènes

Parasites intracellulaires

L'entrée d'un pathogène dans l'organisme est détectée dans un premier temps par les cellules du système immunitaire inné. Il exerce la fonction de première ligne de défense et contribue à la mise en place et au contrôle de la réponse adaptative. Les micro-organismes possèdent des structures invariantes qui

leur sont propres, les PAMPs. Chaque grand groupe de micro-organisme est ainsi représenté par une classe de PAMPs (LPS pour les bactéries Gram-, mannanes pour les levures…). Ces molécules sont perçues par le système immunitaire inné comme des signatures moléculaires d'une infection assurant la distinction entre le soi et le non-soi. Leur reconnaissance, grâce à un ensemble de récepteurs (les PRRs), conduit à la mise en place d'une réponse immunitaire (189).

De son côté, le système immunitaire adaptatif détecte la présence de micro-organismes par l'intermédiaire de molécules présentatrices d'Ag codées par le CMH et CD1 à la surface des CPA. L'Ag, complexé à ces molécules, est reconnu par le TCR $\alpha\beta$ du lymphocyte Th. Il en résulte une coopération entre la CPA et le lymphocytes Th mettant en jeu par la suite la réponse immunitaire adaptative (190).

Entre ces deux modes de détection se trouvent les lymphocytes T $\gamma\delta$ qui, comme nous l'avons vu, reconnaissent sans présentation des molécules issues de microorganismes par leur TCR $\gamma\delta$. Ainsi, comme les cellules de l'immunité innée, les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont capables de reconnaître directement des molécules issues de pathogène. Ces lymphocytes sont intégrés dans l'immunité à médiation cellulaire et sont mis en jeu notamment face à des parasites intracellulaires. Ils ne sont jamais mis en jeu seuls face à un pathogène, mais leur action est intégrée dans la réponse immunitaire globale de l'organisme. Leur rôle se révèle majeur dans plusieurs pathologies.

L'implication des lymphocytes T $\gamma\delta$ a été mise en évidence dans plusieurs affections en mesurant leur amplification au niveau des lésions occasionnées et/ou dans le sang circulant des patients. La Table XIII ci-dessous récapitule les pathogènes causant des amplifications T $\gamma 9\delta 2$ *in vivo* (d'après (130)) dans le sang circulant des patients.

Pathogènes	% LT γ9δ2/ CD3$^+$ chez les donneurs sains	% γ9δ2/ CD3$^+$ LT chez les patients	références
Bactéries			
Mycobacterium	6	14	(191)
.tuberculosis	5	6	(192)
Legionella	5	16	(193)
Francisella tularensis	5	30	(194, 195)
Salmonella	5	18	(196)
Nesseria meningitidis	7	25	(197)
Listeria monocytogenes	2	12	(198)
Brucella	4	29	(199)
Coxiella burnetii	4	16	(200)
Protozoaires			
Plasmodium	4	16	(201)
Leishmania	3	13	(202)
Toxoplasma	4	9	(203)
Virus			
EBV	4	8	(63)
HIV	délétion précoce après activation		(204, 205)

Table XIII : pathogènes causant des amplifications γ9δ2 *in vivo*

Cette amplification observée laisse supposer un rôle des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ dans la défense immunitaire, mais l'étendue de leur champ d'action et leur rôle dans la réponse immunitaire contre ces pathogènes restent dans la majorité des cas mal compris.

La grande majorité de ces pathogènes produit des Ag solubles. La Table XIV donne des exemples de pathogènes produisant des PAg solubles, sensibles à un traitement à la PAL (phosphatase alcaline). L'expansion des $\gamma 9\delta 2$ peut être reproduite *in vitro* en les incubant avec des lysats de ces micro-organismes (119, 130, 206). De plus, les lymphocytes T $\gamma\delta$ ainsi obtenus sont fonctionnels et tuent des cellules infectées (207) ou des cibles tumorales (208).

Pathogène	Ag soluble	PAL sensible	Références
M.tuberculosis	TUBag 1-4	+	(116)
Plasmodium	MALag	+	(209)
F.tularensis	TUBag1 et 3	+	(195)
P.aeruginosa	?	+	(210)
E.coli	TUBag 1 et 2	+	(211)

Table XIV : PAg produits par différents pathogènes

Il a été clairement montré chez la souris que les lymphocytes T $\gamma\delta$ jouent un rôle important dans la lutte contre de nombreuses infections bactériennes. Toutefois, la nature et le mode de reconnaissance des Ag étant différents chez l'homme, on ne peut pas en tirer des conclusions analogues quant aux rôles des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$. Chez l'homme, le rôle joué par les lymphocytes T $\gamma\delta$ n'est pas bien défini dans toutes les infections où leur amplification a été constatée. Cependant on peut dégager des caractéristiques générales de leurs fonctions effectrices, notamment en se basant sur les connaissances établies dans le modèle de la tuberculose comme archétype de pathologie à bactérie intracellulaire.

Un exemple d'infection par une bactérie intracellulaire : la tuberculose

La tuberculose est responsable de plus d'un million de morts par an et touche un individu sur trois dans le monde. *M.tuberculosis*, après avoir été inhalée, est phagocytée par les macrophages alvéolaires. Son pouvoir pathogène consiste notamment à survivre dans le macrophage et échapper aux mécanismes de lyse consécutifs à la phagocytose (212). La majorité des individus infectés parvient à surmonter la primo-infection en développant une immunité protectrice. La caractéristique de l'immunité cellulaire mise en place est la formation de granulomes dans les poumons avec au centre des macrophages infectés et en marge des lymphocytes. La réponse lymphocytaire est multiple et implique des lymphocytes T conventionnels $CD8^+$ et $CD4^+$ (Th1) ainsi que des non-conventionnels comme les lymphocytes T $\gamma\delta$ et des $\alpha\beta$ DN. Ils reconnaissent de nombreux Ag de *M.tuberculosis* (peptides-CMH, glycolipides-CD1, phosphoantigènes…) et participent avec les macrophages au contrôle de la maladie. En effet, les différents lymphocytes T produisent en particulier du TNFα et de l'IFNγ qui activent les macrophages (maturation des phagosomes, production de molécules antimicrobiennes comme les dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote, cf. figure 18 et (213)). Pour une minorité d'individus, la persistance bactérienne conduit à une réponse immunitaire inflammatoire chronique impliquant des macrophages coopérant avec des lymphocytes Th1, des lymphocytes T DN et des lymphocytes T $\gamma\delta$ (TCR $V\delta1^+$ et $V\delta2^+$).

La réponse lymphocytaire $\gamma9\delta2$ est importante au début de l'infection et jouerait le rôle d'immunité protectrice dans l'établissement de la maladie. Un récent travail, utilisant le modèle macaque, a montré une forte expansion des LT $\gamma9\delta2$ suite à une inoculation de *M.tuberculosis* ou de BCG (bacille de Calmette-Guérin) associée dans le temps à une clairance des bactéries (214). En effet les lymphocytes T $\gamma9\delta2$ sont capables de lyser les cellules infectées mais ont aussi un pouvoir bactéricide direct sur les bactéries grâce à la granulysine (207), comme cela avait été montré auparavant pour les lymphocytes T $CD8^+$ restreints par CD1 (215).

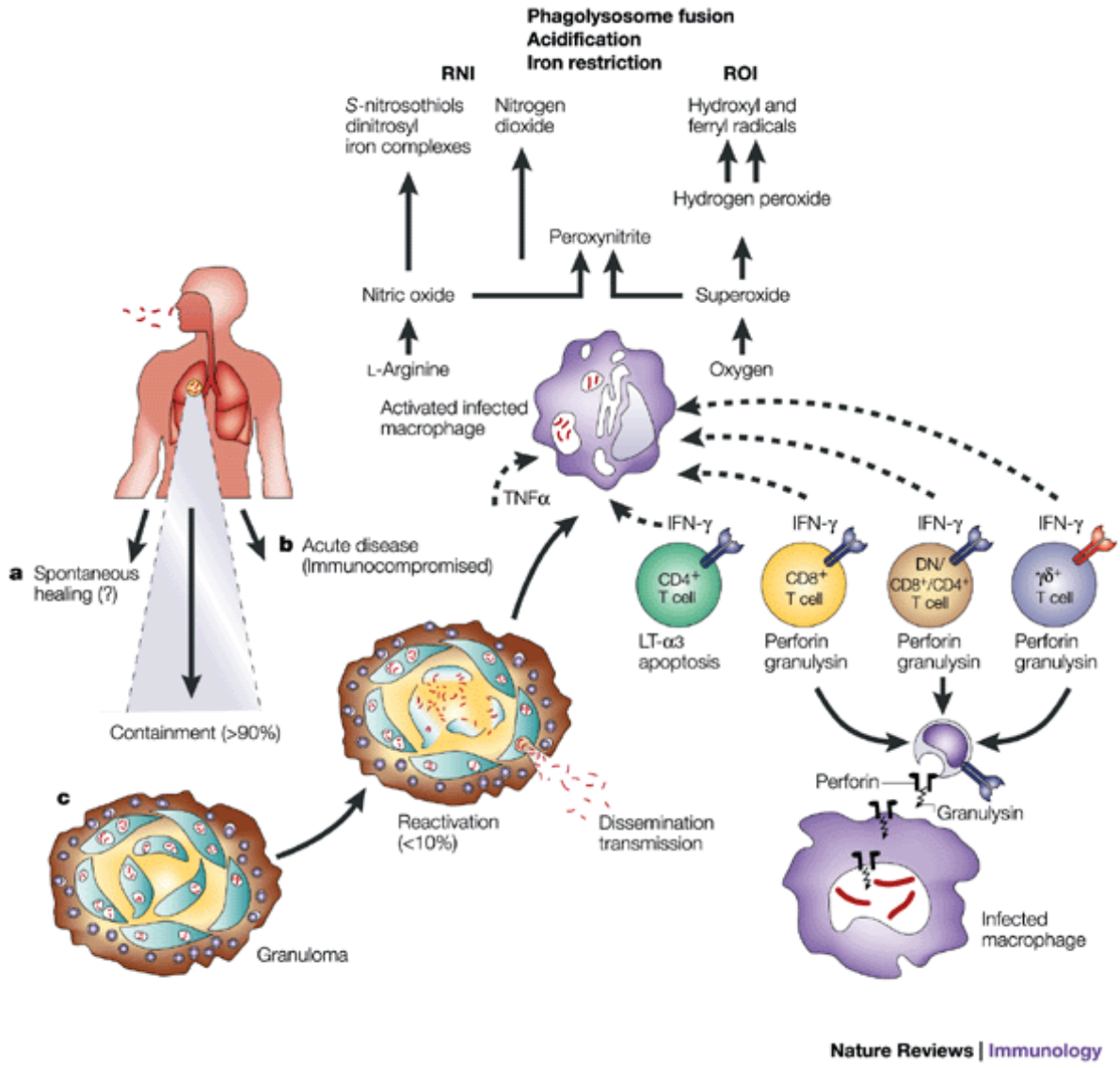


Figure 18 : principales caractéristiques de la tuberculose : de l'infection à la réponse de l'hôte. a) infection abortive et guérison spontanée (occurrence faible), b) chez l'hôte immunodéprimé, la maladie se développe directement après infection ; c) dans la plupart des cas, l'infection est initialement contenue et la maladie ne se développe qu'après réactivation. D'après (213)

Ainsi, les lymphocytes T γ9δ2 contribuent à une immunité de type adaptative par leur capacité à monter une réponse secondaire forte et rapide après une pré-exposition à l'Ag (216). On ne peut cependant pas exclure un effet des lymphocytes T CD4 mémoires dans ces résultats. Ces données, à la lumière de celles obtenues par l'équipe de F. Poccia (60), indiquent l'existence de lymphocytes T γ9δ2 effecteurs, différenciés en cellules de type mémoire qui ont perdu le marqueur CD27. Ils sont absents dans le sang de cordon comme chez les individus HIV^+ ou tuberculeux. Le marqueur CD27 est un membre de la famille des TNF-R, qui lie CD70. Il est impliqué dans la régulation des fonctions cellulaires (217). De manière intéressante, ce même phénotype mémoire est observé chez les LTC $CD8^+$ (218). Néanmoins, de telles observations phénotypiques ne sont pas généralisables à toutes les infections. En effet, une récente étude chez les lymphocytes T αβ $CD8^+$ a montré que le phénotype CD27 pouvait varier selon la nature de l'infection et que le statut d'activation était plus fiable que les marqueurs phénotypiques pour caractériser les cellules effectrices et mémoires (219).

Chez les patients présentant une tuberculose active, les lymphocytes T γ9δ2 sont absents ou non répondeurs aux Ag de *M.tuberculosis* (66, 192). La population répondeuse qui se différencie se raréfie rapidement sous l'effet de plusieurs mécanismes, notamment l'apoptose induite par Fas (CD95) dans le cadre de l'AICD (66). En effet, la reconnaissance des ligands mycobactériens induit l'expression de Fas-L (CD95L) sur les cellules γ9δ2 effectrices. Il en résulte un manque d'IFNγ, crucial pour une réponse efficace (220). Ainsi, seule demeure la population $CD27^+$, inefficace pour éradiquer l'infection. Ajouté à cela, les macrophages infectés produisent de l'IL10 et du TGFβ qui inhibent la réponse T γδ aux Ag mycobactériens (221).

On comprend ainsi l'importance de la vaccination antituberculeuse, soit avec le BCG (222), soit dans la recherche de nouveaux vaccins, combinant des phosphoantigènes de synthèse par exemple, qui viseraient à générer cette mémoire γδ en plus de la mémoire αβ.

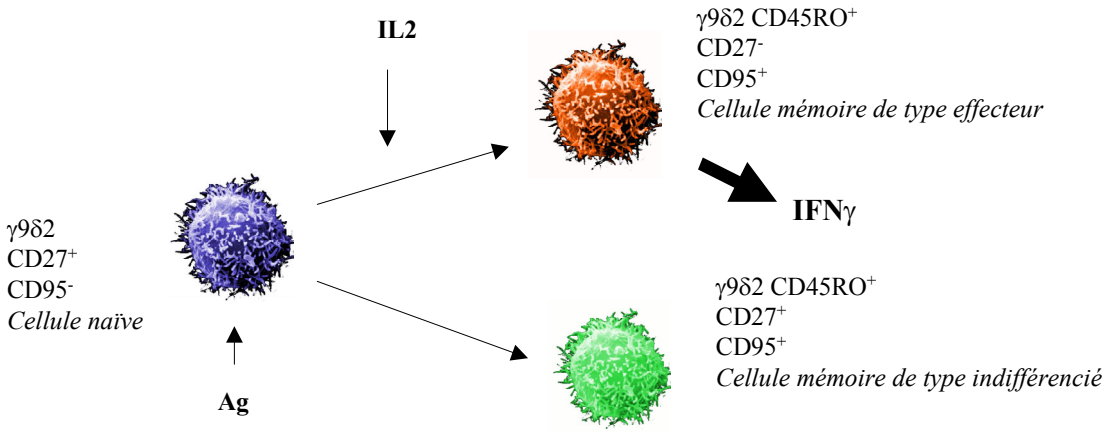


Figure 19 : Différenciation des Lymphocytes T γ9δ2 stimulés par *M.tuberculosis*

Ainsi, le rôle des lymphocytes T γ9δ2 dans la réponse immunitaire contre *M.tuberculosis* est multiple. Ces cellules répondent aux phosphoantigènes et constituent une immunité protectrice. Elles lysent les macrophages infectés et réduisent la viabilité des bactéries libérées, elles orientent la réponse vers un type I (inflammatoire) et activent les monocytes en sécrétant de l'IFNγ (223). Leur réponse est en retour dépendante de l'activation des lymphocytes Th1 car ces derniers sécrètent alors de l'IL2 qui leur est indispensable (59) et de l'IL15.

La connaissance des rôles des lymphocytes T γ9δ2 dans les autres pathologies présentant une expansion de ces cellules (cf. Table XIII) est très souvent partielle. Des rôles similaires à ceux décrits pour la tuberculose ont été démontrés pour la brucellose (224) : inhibition de la multiplication intracellulaire des bactéries et lyse des macrophages infectés.

La difficulté majeure rencontrée dans ces études est, excepté le modèle primate, l'absence de modèle animal adéquat. Un modèle de souris SCID humanisées (injection de PBMC humains) a été utilisé pour approcher l'effet antibactérien des lymphocytes T γ9δ2 (225). Cette étude a confirmé le rôle

protecteur des lymphocytes T γ9δ2 dans des infections à *E.coli* ou *M.morganii* et leur intégration dans la réponse immunitaire globale. De manière intéressante, une pré-exposition des PBMC à l'Ag a donné une meilleure protection des animaux et un effet antibactérien dès 17h après l'infection sans attendre l'amplification de la population T γ9δ2. Ce résultat confirme le statut mémoire effecteur des lymphocytes T γ9δ2 pré-exposés à leurs Ag spécifiques (*cf*. *supra*).

Cas des infections virales

Des modifications quantitatives des populations sanguines de lymphocytes T Vδ1 et Vδ2 ont été montrées dans plusieurs affections virales dues à HSV, CMV ou HIV par exemple (205, 226), laissant supposer leur implication dans ces pathologies.

Les lymphocytes T γ9δ2 sont moins impliqués que les lymphocytes T Vδ1 dans la réponse immunitaire antivirale. Dans le cadre de l'infection par le HIV et notamment en phase asymptomatique, le rapport lymphocytes T $V\delta1^+/V\delta2^+$ est inversé par rapport aux contrôles séronégatifs. Ce phénomène n'est pas dû a une amplification des lymphocytes T $V\delta1^+$ (aucune corrélation avec une utilisation d'une chaîne γ ou d'un CDR3 particuliers par ces cellules (33, 227)), mais plutôt à une disparition précoce des lymphocytes T γ9δ2. Les rares lymphocytes T γ9δ2 restants dans le sang des patients HIV^+ sont anergiques (incapacité à sécréter des cytokines (73) et à proliférer (228) en réponse à une stimulation phosphoantigénique chez les individus HIV^+. Il faut noter que les lymphocytes T γ9δ2 ont cependant été retrouvés majoritaires dans les fluides broncho-alvéolaires de patients HIV^+ suggérant leur possible redistribution au cours de l'infection (229).

Les lymphocytes T γ9δ2 jouent certainement un rôle dans l'infection par le HIV, car ils développent *in vitro* un effet antiviral. On observe une inhibition de la réplication virale dans des cultures de PBMC pré-infectées et traitées avec des phosphoantigènes et une expansion sélective des lymphocytes T γ9δ2 (74). En outre, une majorité de clones T γ9δ2 obtenus *in vitro* est capable de lyser des cellules infectées par le HIV (230). Cet effet est dû à des facteurs solubles libérés en réponse aux phosphoantigènes comme les chimiokines de la famille C-C. Ces chimiokines (MIP-1α,β et RANTES) se lient au récepteur CCR5 qui se trouve être un

co-récepteur important dans la pénétration du HIV dans la cellule cible (231). Cette étude, à défaut de montrer une réelle implication *in vivo* des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$, révèle un potentiel anti-HIV qu'on pourrait exploiter en immunothérapie.

b - Implication dans la défense antitumorale

La capacité des lymphocytes T $\gamma\delta$ à reconnaître de nombreux antigènes cellulaires tumoraux et à exercer une forte activité cytotoxique suggère leur implication dans l'élimination des cellules cancéreuses. Plusieurs études montrent effectivement leur présence parmi les TILs (lymphocytes infiltrant les tumeurs) de nombreuses tumeurs notamment d'origine épithéliale (232-234). Ces lymphocytes sont des IELs (lymphocytes intra-épithéliaux) de la lignée Vδ1 présentant une spécificité antitumorale restreinte (235-237). Une étude plus récente a montré que les TILs $\gamma\delta$ reconnaissent les molécules MICA et MICB sur-exprimées par les cellules tumorales épithéliales (234). Les lymphocytes T Vδ1 sont aussi impliqués contre les tumeurs d'origine hématopoïétique et se révèlent intéressants dans leur aptitude à exercer une GVL (graft versus leukemia) sans risque de GVHD (graft versus host disease (238)).

En ce qui concerne les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$, bien que leur réactivité antitumorale soit bien établie (*cf. supra*) leur implication et leur rôle dans l'élimination des tumeurs notamment d'origine hématopoïétique restent plus flous. Des études montrent leur amplification dans le sang de patients atteints de carcinomes rénaux (239) ou leur présence parmi les TILs (240). Par ailleurs des expériences montrent un effet antitumoral des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ greffés chez des souris SCID (241, 242) vis à vis de cellules Daudi inoculées aux animaux. Compte tenu de leur forte activité cytotoxique, et de leur régulation par l'expression de NKR, il semble cependant probable que les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ exercent *in vivo* une réponse contre des cellules tumorales sous-exprimant les molécules du CMH_I, comme cela a été montré in vitro pour des cellules CMH_I^- comme K562 ou

exprimant un antigène stimulateur comme RPMI 8226 ou bien combinant les deux comme Daudi.

c - Intégration des lymphocytes T γ9δ2 dans la réponse immunitaire

En raison de leur mode de reconnaissance particulier de l'Ag, les lymphocytes T γ9δ2 ne sont pas dépendants de CPA professionnelles et ne nécessitent pas le micro-environnement particulier d'un organe lymphoïde secondaire pour reconnaître l'Ag. Ils sont donc capables de réagir avec les cellules du système immunitaire inné dès la pénétration d'un pathogène dans l'organisme. A côté des immunorécepteurs que nous venons de voir il est probable que les lymphocytes T γ9δ2 expriment des TLR (Toll like receptors, qui font partie des PRRs) comme cela a été montré chez des lymphocytes T γδ murins (243). Ces récepteurs leur permettraient de reconnaître des signatures de pathogènes et de répondre en sécrétant des cytokines ou en abaissant leur seuil d'activation (244). Outre leur fonction cytotoxique, les lymphocytes T γ9δ2 sécrètent de nombreuses cytokines. Ils s'intègrent dans la réponse immunitaire principalement en tant qu'effecteurs mais aussi comme régulateurs.

Rôle des cytokines

Les lymphocytes T γ9δ2 sont tributaires de l'IL2 produite *in vivo* par les lymphocytes Th pour monter une réponse quand ils sont stimulés par leurs ligands spécifiques (245, 246). De manière corollaire, ils sont inhibés par l'IL10 (247) pouvant être produite par exemple par des lymphocytes T régulateurs (figure 20). Nous avons vu que les lymphocytes T γ9δ2 produisaient rapidement du TNFα et de l'IFNγ en réponse à leurs ligands spécifiques et ceci de manière plus efficace que les lymphocytes T αβ selon une étude comparative (248). Ces cytokines, libérées majoritairement, les classent dans un profil Th1 (249, 250). La régulation de leur

sécrétion est mal comprise mais est cruciale car elles peuvent, à forte concentration, avoir un effet délétère. Une étude récente montre que ces cytokines sont produites très rapidement suite à la mise en contact avec des alkylamines mais aussi que ce relargage cesse rapidement dès que l'Ag a disparu. (223). La production de TNFα est dépendante chez les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ de la voie des MAP-Kinases (empruntée par la signalisation du TCR) contrairement aux lymphocytes T $\alpha\beta$ et nécessite un seuil d'activation beaucoup plus bas (168).

La réponse en terme de cytokines sécrétées des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ est largement influencée par l'environnement cytokinique. Des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ stimulés *ex vivo* par des Ag solubles ou cellulaires répondront en libérant des cytokines de type Th1 (IFNγ et TNFα) ou Th2 (IL4) selon que l'environnement est de type Th1 ou Th2 respectivement (251). Il faut noter que la seule présence d'IL4 ne suffit pas à induire la production d'IL4 suite à une stimulation du TCR (250). De plus il faut garder à l'esprit qu'un environnement Th2 n'est pas physiologiquement caractéristique de cellules impliquées dans des réponses mettant en jeu des parasites intracellulaire avec forte production d'IL12 par les CPA.

En effet, l'IL12 et l'IL15 entrent en synergie avec l'IL2 pour augmenter la libération de cytokines (TNFα et IFNγ) par les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ stimulés avec des phosphoantigènes de mycobactéries (73, 252).

Les lymphocytes T γ9δ2 répondent aussi à des cytokines de type inné comme les IFNα et β libérés en réponse à des infections virales ou à la présence d'oligonucléotides CpG (253) qui potentialisent leur réponse spécifique.

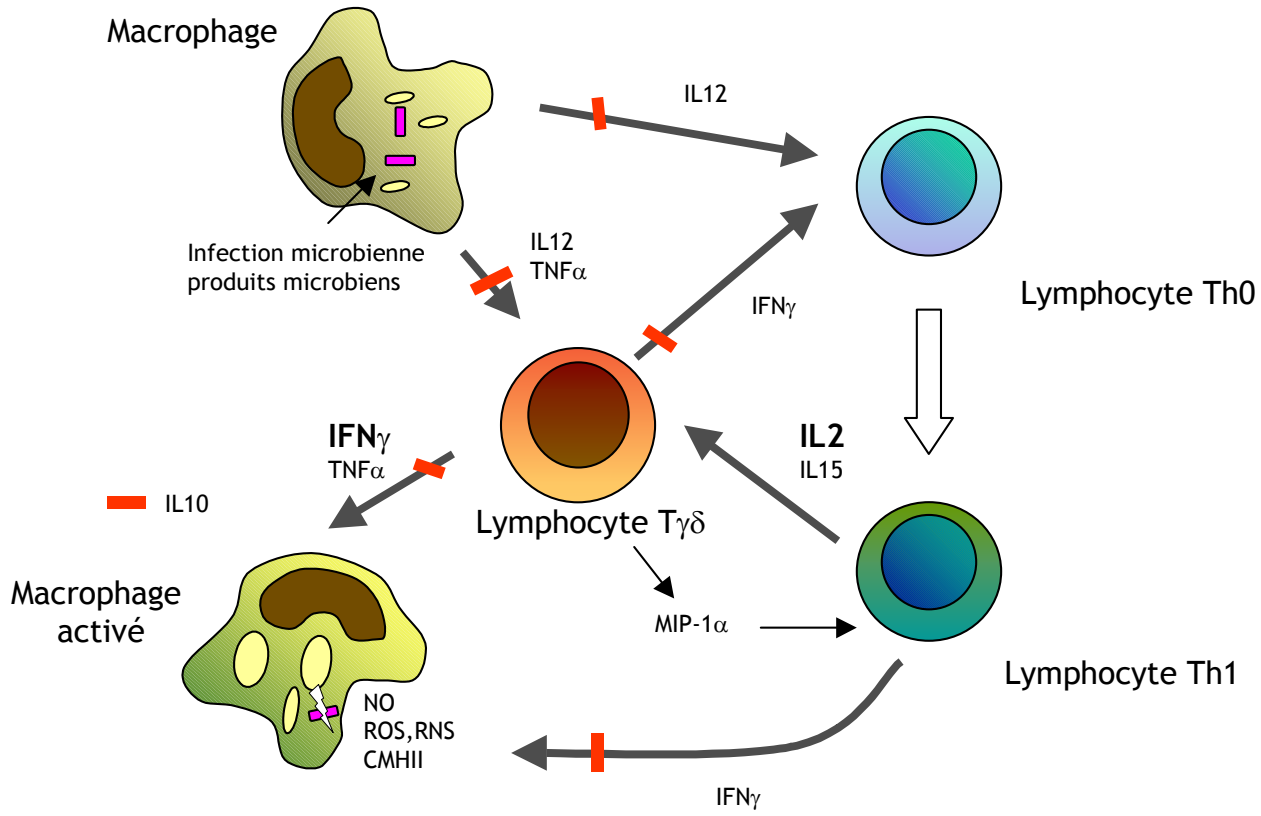


Figure 20 : principales cytokines impliquées dans la réponse des Lymphocytes T γδ. ROS : reactive oxygen species, RNS : reactive nitrogen species.

Les lymphocytes T γ9δ2 expriment, environ une semaine après activation, la molécule CD16 (RFcγIIIA), dont le pontage induit la sécrétion de cytokines (58). Cette particularité permet aux γ9δ2, comme aux cellules NK, de répondre à des cellules infectées ou tumorales recouvertes d'IgG après une réponse anticorps.

Cette capacité à sécréter des cytokines confère aux lymphocytes T γδ la possibilité de réguler la réponse. Il semble que parmi ces lymphocytes T γδ, certains soient dévolus à cette fonction, notamment les $CD4^+$ (69). Des clones de lymphocytes T γ9δ2 $CD4^+$ ont été obtenus *ex vivo* en réponse aux cellules Daudi (49, 50). Ces clones produisaient plus de cytokines (IFNγ, TNFα et GM-CSF) et étaient moins cytotoxiques pour les cellules Daudi que leurs homologues $CD4^-$. En outre, ils

étaient capables, en présence d'IL2, de fournir une aide à des lymphocytes B pour augmenter la production d'IgM, IgG, IgA et IgE.

Le chimiotactisme.

Nous avons vu que les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ appartiennent au sang circulant, cependant ils sont impliqués dans de nombreuses pathologies et foyers inflammatoires tissulaires. L'expression de molécules d'adressage et de récepteurs aux chimiokines (Table VI) leur permet de gagner les tissus concernés. A ces endroits, des macrophages sécrètent notamment de l'IL12 et les chimiokines C-C : MCP-1, MIP-1α et MIP-1β. Ces chimiokines recrutent les lymphocytes T $\gamma\delta$ (78) et l'IL12 induit l'expression de NKRP1A qui augmente leur capacité de diapédèse (174).

A leur tour, une fois dans le foyer inflammatoire, les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ sécrètent de nombreuses chimiokines en réponse à l'Ag et à l' IL12 (MIP-1α, MIP-1β et RANTES (75) et figure 11) qui permettent de recruter d'autres lymphocytes T effecteurs (lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$, LTC et lymphocytes Th1). Ces chimiokines ont aussi un effet chimiotactique positif sur des cellules de l'immunité innée comme les monocytes, les cellules NK et les granulocytes (254).

Homéostasie et résolution

La réponse lymphocytaire T $\gamma 9\delta 2$, comme les autres réponses T, est soumise à un rétrocontrôle négatif intrinsèque qui repose sur une mort programmée par l'activation (AICD). Ce phénomène repose sur l'expression membranaire de FAS-L suite à une stimulation *via* le TCR. FAS-L peut alors ponter FAS (constitutivement exprimé) qui déclenche l'apoptose (255, 256). L'apoptose n'est effectivement déclenchée que si la cellule ne reçoit plus de signaux d'activations en provenance du TCR ou des récepteurs de cytokines *i.e.* si l'Ag est éliminé. D'autres mécanismes, comme la sécrétion autocrine de NO protègent de l'apoptose et permettent le maintien de la réponse (257) dans des phases chroniques des pathologies.

Chez la souris, les lymphocytes T γδ participent activement aux stades terminaux de la réponse inflammatoire, notamment à la résolution et à la cicatrisation, en interaction avec les cellules épithéliales ; pour revue voir (80, 258). Toutefois, un tel parallèle n'a pas été établi chez l'homme.

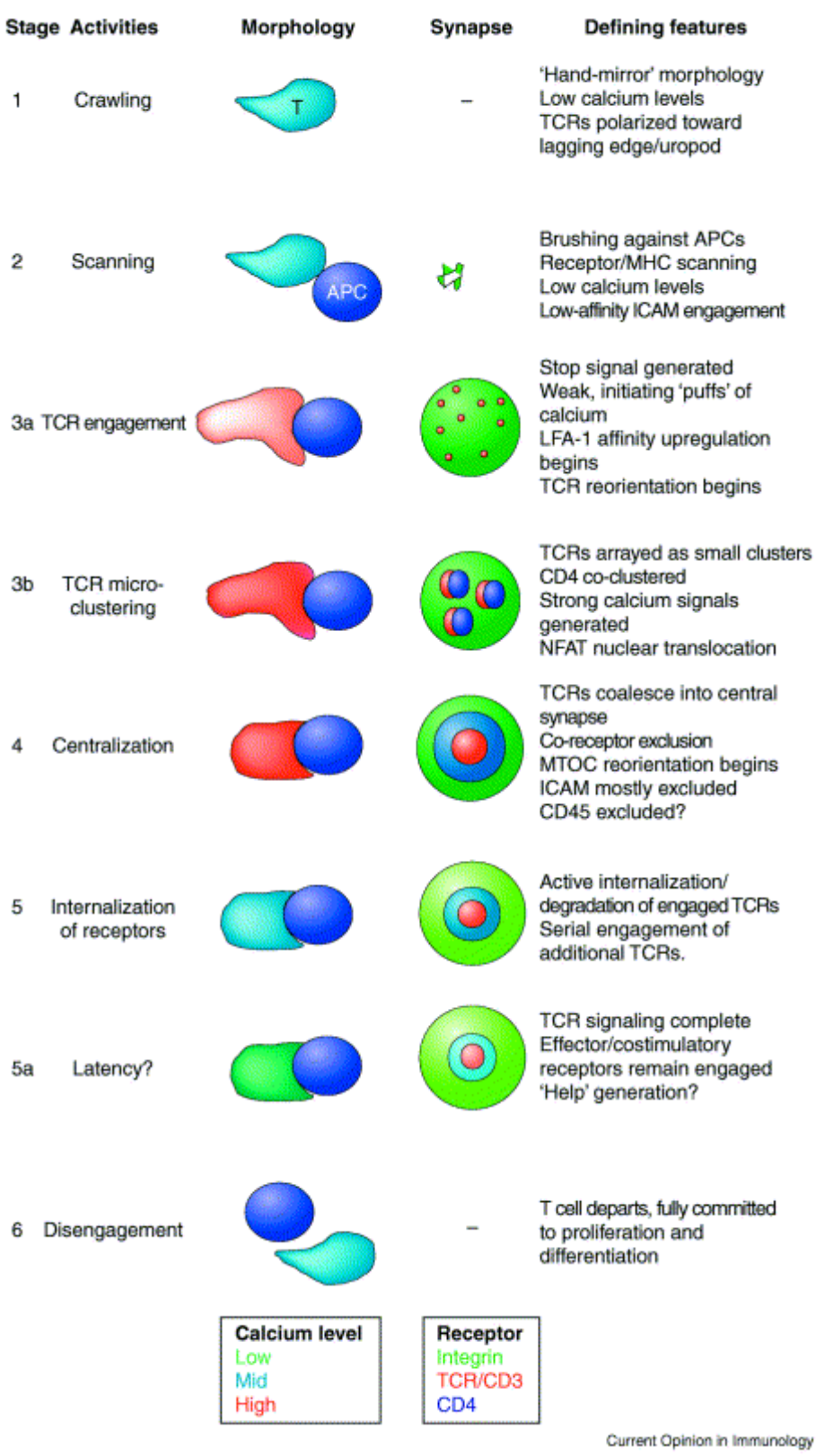
III - Interactions des cellules cytotoxiques avec la cellule cible

1 - Etablissements de contacts étroits avec la cible

Les travaux menés jusqu'à présent concernent les LTC $CD8^+$ ou les cellules NK. Dans tous les cas après contact avec la cible, la cellule cytotoxique scrute sa cible en établissant des contacts étroits. Grâce à son cytosquelette la cellule cytotoxique épouse la surface de sa cible potentielle. Après les premiers signaux de reconnaissance impliquant des immunorécepteurs, les deux cellules subissent alors un remodelage dynamique de leur surface cellulaire qui aboutit à la formation d'une ultrastructure cellulaire : la synapse immunologique.

a - Formation d'une synapse immunologique

Ce concept a été formulé par analogie avec le système nerveux quand plusieurs études ont montré la réorganisation de la surface lymphocyte T-CPA et l'importance de la mise en place d'une zone de contact priviliégiée par où passe l'information (259-262). Des études plus récentes ont établi l'existence d'une synapse immunologique entre les LTC (263 , 264) et leur cible.



La figure 21 récapitule les étapes clés de l'interaction entre un lymphocyte et une CPA (265).

La première étape consiste à la recherche de la cible qui est guidée par chimiotactisme (266). Le lymphocyte en mouvement comprend deux pôles : à l'avant se trouvent exprimés à la membrane les récepteurs aux chimiokines (CCR5) et la polymérisation d'actine qui permet à la cellule de progresser. A l'arrière on trouve l'uropode qui comprend la myosine II, le cytosquelette de microtubule géré par un MTOC (microtubule-organizing center), les granules lytiques et la membrane plasmique enrichie en molécules d'adhérence (ICAM-1,-2,-3, CD43 et CD44) et TCR (267), comme illustré figure 22.

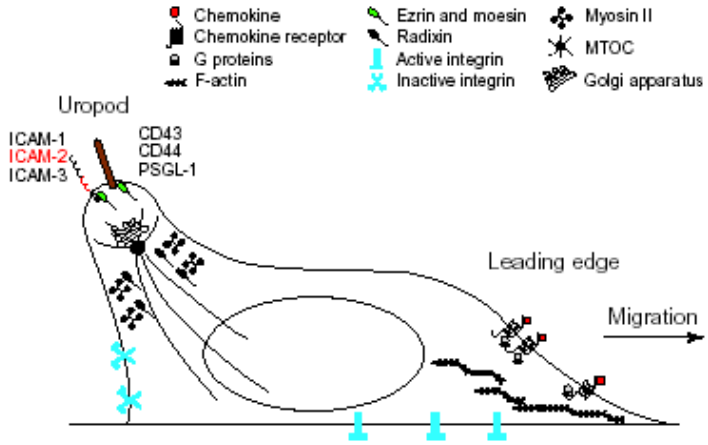


Figure 22 : Caractéristiques des deux compartiments fonctionnels d'un lymphocyte migrant vers sa cible, d'après (267)

En second lieu, Le lymphocyte scrute sa cible notamment par émission de villosités (stade 2 figure 19), y adhère et le TCR cherche son ligand. S'il le trouve, un signal calcique est émis arrêtant le lymphocyte sur sa cible. Vient ensuite la focalisation du TCR et l'établissement proprement dit de la synapse immunologique (stades 3 et 4 figure 19). Elle se manifeste par un réarrangement caractéristique des molécules de surface (262). Les grandes molécules d'adhérence comme LFA-1

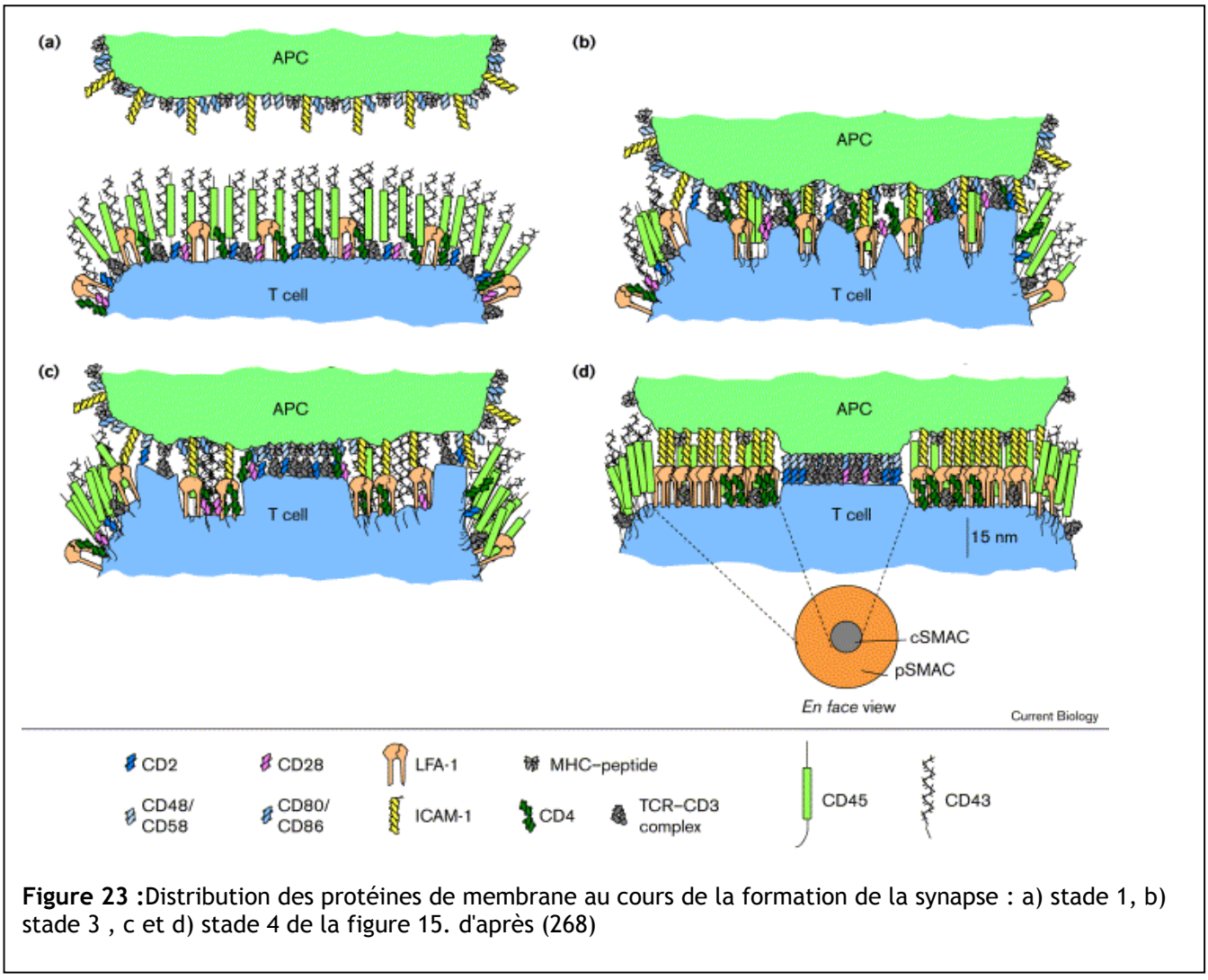


Figure 23 : Distribution des protéines de membrane au cours de la formation de la synapse : a) stade 1, b) stade 3 , c et d) stade 4 de la figure 15. d'après (268)

commencent à former des zones de contact qui stabilisent l'apposition des deux membranes (269) et ancrent le cytosquelette. Les molécules impliquées dans la signalisation se regroupent dans un complexe central supramoléculaire d'activation (cSMAC). En surface, se regroupent le TCR, CD4/CD8, les molécules de

costimulation comme CD28 et les petites molécules d'adhérence CD2. A ce niveau, la $p56^{lck}$ et la PKCθ s'accumulent sous la membrane. Ce complexe est entouré par un ensemble de molécules d'adhérence formant un SMAC périphérique (pSMAC) comprenant LFA-1, CD4/CD8 et la taline sous-membranaire (figure 22).

Le moteur de cette ségrégation moléculaire est le cytosquelette. Un groupe de petites molécules adaptatrices de la famille ERM (ezrin-raxidin-moesin) font le

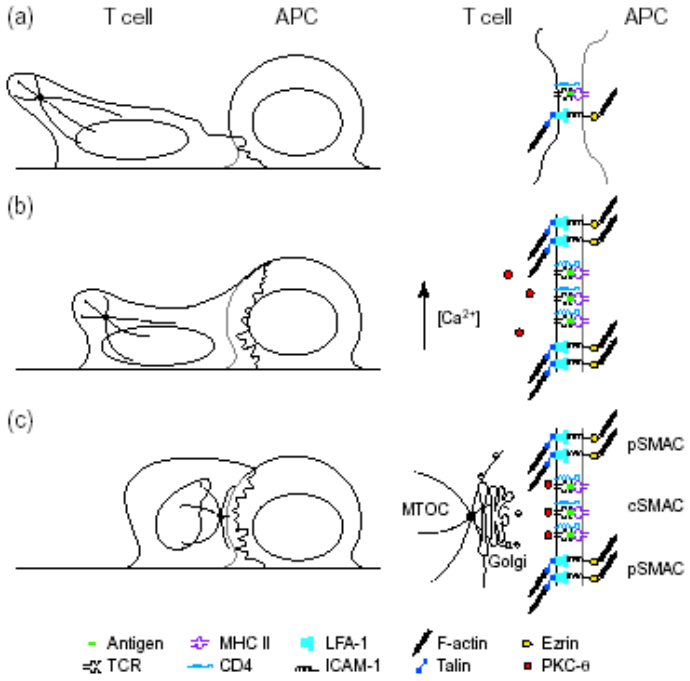


Figure 24 : changements morphologiques, réarrangement des molécules de surface et remodelage du cytosquelette lors de la formation du conjugué LT-CPA, d'après (267).

lien entre les molécules de surface (CD43, CD44, ICAM-1, -2 et -3 pour le lymphocyte T) et le cytosquelette sous-jacent (270). Elles participent activement au ballet moléculaire permettant à la fois aux molécules d'adhérence de former les premiers foyers de contact entre les deux cellules et de retirer les grandes molécules comme CD43 de la zone de contact, après la mise en jeu du TCR. Des marquages de la tubuline ont révélé une redistribution des microtubules avec la réorientation du MTOC sous la zone synaptique suite aux signaux transduits par le TCR (271).

Ainsi, après un premier signal émis par les premiers TCR qui ont reconnu leur Ag, la synapse se met en place. Les radeaux lipidiques (des parties de membranes enrichies en cholestérol et sphingolipides) sont impliqués dans ce phénomène car ils facilitent l'agrégation des différents composants membranaires importants dans la transduction du signal (TCR, $p56^{lck}$, CD28, PKCθ…) (272). En retour, la force du signal envoyé par le TCR (en présence de faibles ou forts agonistes) influence la nature des molécules régulatrices (CD28 ou CTLA-4) accumulées à la synapse (273). La mise en place de cette ultrastructure autorise de nouveaux événements comme la pleine activation de la cellule (synapse mature avec un foyer intense de signalisation au centre et exclusion de CD45) et la réalisation de fonctions effectrices comme la lyse de la cellule cible par exemple. En effet, en ce qui concerne la synapse des lymphocytes T CD8 avec leur cible, plus proches des lymphocytes T $\gamma\delta$, étudiée par Stinchcombe, le repositionnement du MTOC permet d'orienter les granules lytiques en direction de la cible (264). La figure 25 montre la cinétique des événements obtenus par microscopie confocale en marquant les granules lytiques en rouge et le système membranaire de la cellule cible en vert.

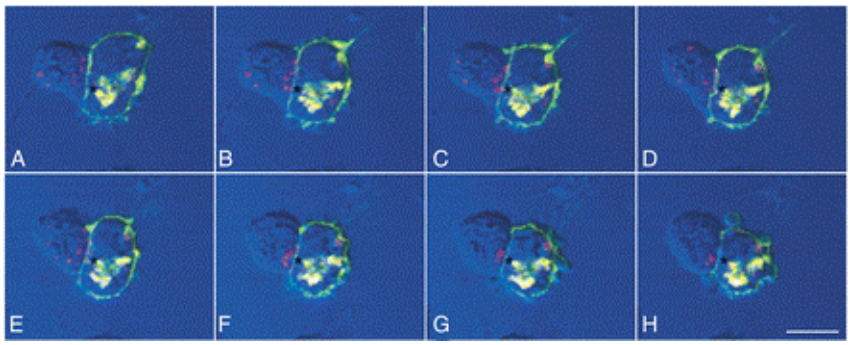


Figure 25 : la polarisation des granules lytiques et la mort de la cellule cible ont lieu rapidement après le contact cellulaire. Le LTC à gauche avec les granules lytiques marqués en rouge et la cible à droite dont la membrane est marquée en vert Les images sont prises à t=0 (A), 40 (B), 60 (C), 90 (D),120 (E), 180 (F),240 (G) et 300s (H), d'après (264).

Les granules lytiques se placent rapidement après le premier signal donné par le TCR sous la membrane où a lieu la synapse, permettant leur exocytose à cet endroit précis et exposant ainsi uniquement la cible à leur contenu (cf. *infra*). Les dernières étapes (5 et 6 figure 21), consistant en la terminaison de l'interaction des deux cellules, sont mal caractérisées et varient selon les systèmes étudiés

(lymphocyte Th-CPA ou LTC-cible). En plus, on connaît mal l'intervalle de temps que doit durer une synapse pour assurer la promotion d'une fonction cellulaire telle que l'expression de nouveaux gènes ou la libération de cytokines.

Il a récemment été montré que les cellules NK établissent avec leur cible un contact étroit que les auteurs qualifient également de synapse immunologique. En accord avec ce qui a été montré chez les lymphocytes T, la nature de la synapse est différente selon que la cellule NK est face à une cible fournissant un signal activateur (synapse activatrice) ou inhibiteur (synapse inhibitrice) (274). La synapse inhibitrice a été la plus étudiée (275, 276), son organisation est particulière et se rapproche de celle d'une synapse immunologique immature avec au centre LFA-1 et en périphérie les KIR. Son établissement ne dépend pas du cytosquelette et les radeaux lipidiques n'y sont pas polarisés (276). La taline, le MTOC, les granules lytiques ne sont pas focalisés sous la synapse. Ils ne sont trouvés que lorsque le signal inhibiteur est absent (i.e. la cible n'exprime pas les molécules du CMH_I), ils permettent alors de localiser les NKR activateurs au niveau de la cible (277).

Ainsi, la synapse immunologique, qui est formée consécutivement à la reconnaissance de son ligand par le TCR, assure l'établissement d'un complexe signalitique ordonné entre les deux cellules. Cette structure, à la fois stable et dynamique, permet pendant quelques temps, l'échange d'information et même de matière (*cf. infra*) entre les deux cellules. Lors de cet échange d'information, elle permet aux autres systèmes récepteurs-contre-récepteurs (co-stimulation, adhérence, cytokines, NKR) d'entrer en jeu et de moduler le signal initial du TCR affinant ainsi la réponse cellulaire au-delà de cette simple reconnaissance spécifique. Ainsi outre sa participation dans la signalisation, la synapse immunologique permet au lymphocyte T d'intégrer de nombreux signaux reçus modulant en conséquence sa réponse effectrice (278).

b - Capture de membrane et de molécules lors du contact LTC-cellule cible

Un événement inattendu lors de la synapse immunologique a récemment été découvert : le lymphocyte effectue une capture de membrane et de protéines membranaires de la cellules avec laquelle il interagit. Cette observation a été faite pour différents lymphocytes : lymphocytes Th avec sa CPA (279 , 280, 281), LTC avec sa cible (282), cellule NK avec sa cible (283 , 284) , lymphocyte B avec une cellule portant l'Ag (285, 286). En ce qui concerne les LTC, ce phénomène est

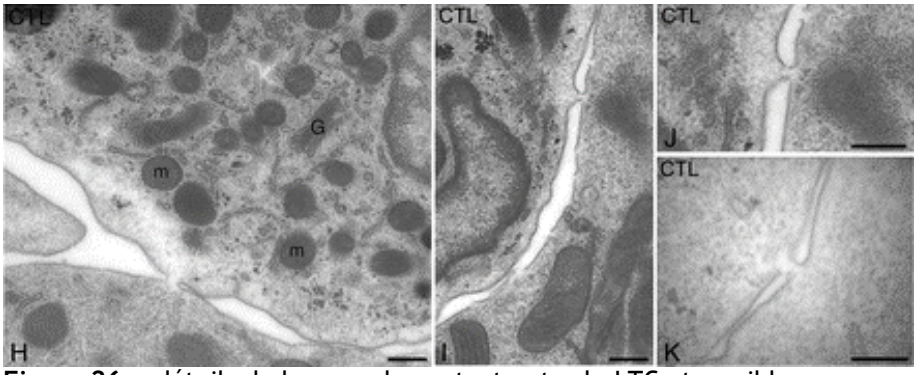


Figure 26 : détails de la zone de contact entre le LTC et sa cible en microscopie électronique montrant des fusions membrane à membrane d'après (264) ; m :mitochondrie, n :noyau, G : golgi. Echelle : barre = 4µm (H-J) ; barre = 250 nm (K)

concomitant de la synapse immunologique où le LTC acquiert les molécules du CMH de la cible. La microscopie électronique a permis de mettre en évidence l'établissement de ponts membranaires entre les deux cellules pouvant servir de lieu de passage de molécules d'une cellule vers l'autre (figure 24, (264)). Cette acquisition semble polarisée et implique activement le cytosquelette. Ce phénomène pourrait avoir pour conséquence une reconnaissance du LTC ayant « grignoté » sa cible par d'autres LTC et conduire à une lyse fratricide prenant part à un rétrocontrôle négatif de la réponse (279 , 287).

2 - La cytotoxicité : « the kiss of death »

Après activation, les LTC et les cellules NK tuent leurs cibles en utilisant leurs propre machinerie apoptotique qu'ils mettent en route. La cible se scinde par la suite en corps apoptotiques qui sont phagocytés et digérés par des macrophages. L'induction de l'apoptose peut se faire selon deux grands mécanismes. Le premier passe par la sécrétion polarisée au niveau de la cible de granules lytiques contenant un arsenal de molécules chargées d'enclencher l'apoptose. Le second implique un système récepteur-contre récepteur (principalement Fas-Fas-L, plus rarement TNF-TNF-R) présent sur l'effecteur et la cible qui déclenche le signal apoptotique (288-290). Les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ sont capables de tuer leurs cibles en utilisant ces diverses voies (207).

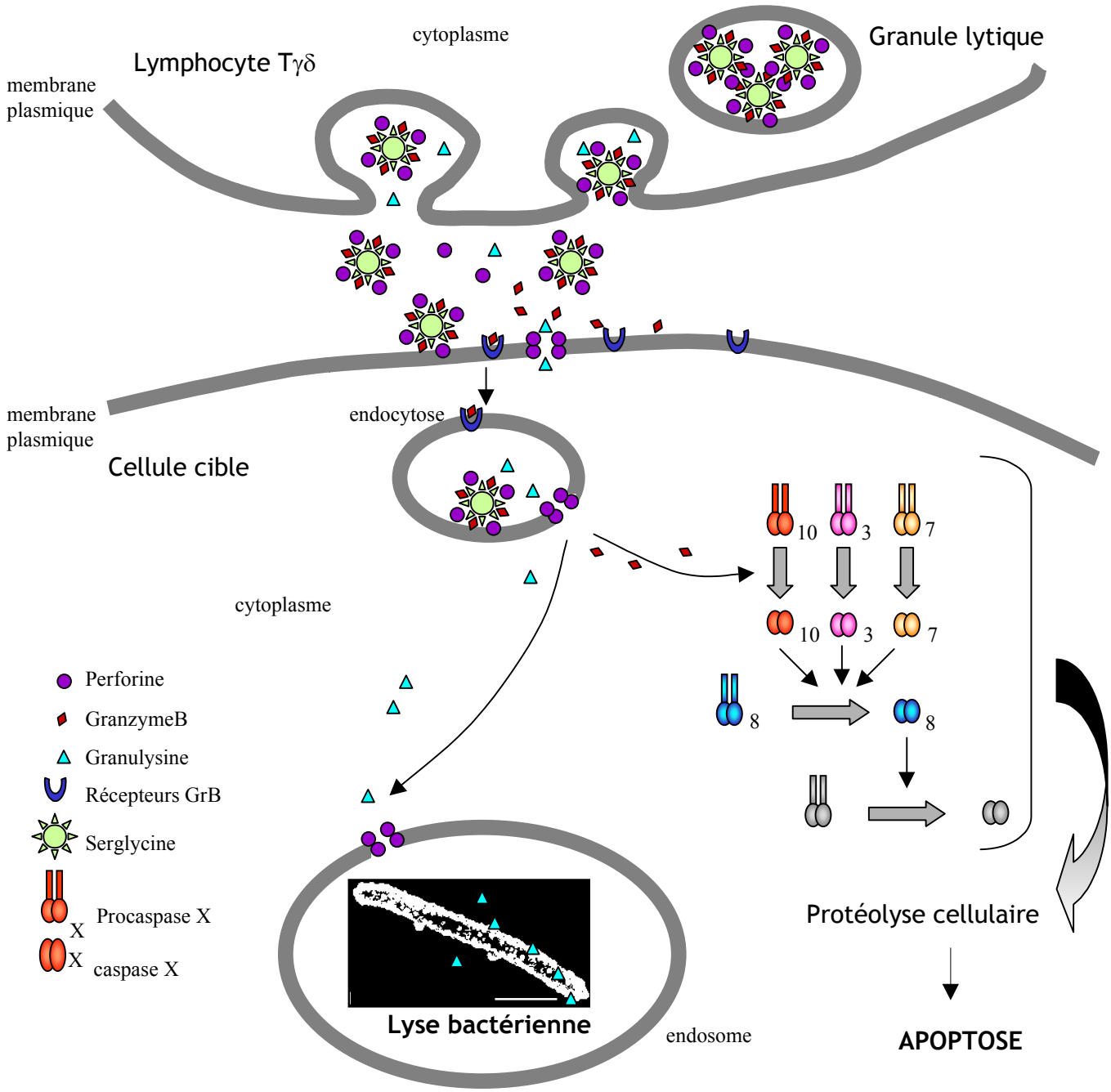


Figure 27 : Mécanismes moléculaires de la lyse d'une cellule infectée par un Lymphocyte T γδ impliquant la voie perforine/granzyme, et lyse des bactéries intracellulaires.D'après (290, 291)

a - Exocytose des granules lytiques

Les mécanismes de la cytotoxicité ont été étudiés chez les lymphocytes T $CD8^+$ ou les cellules NK. En ce qui concerne les lymphocytes T $\gamma\delta$, il a seulement été montré l'implication des mêmes molécules et il est raisonnable de penser que les mécanismes y sont similaires. Les granules lytiques contiennent une matrice de protéoglycanes (serglycine) dans laquelle sont localisées de nombreuses molécules dont la nature et la fonction sont répertoriées dans la Table XV.

Molécule	Rôle	Références	Présente chez les lymphocytes T $\gamma\delta$
Perforine	Forme des pores dans les systèmes membranaires (homologue du composant C9 du complément).	(289)	Oui (292, 293)
Granzyme A	Active une voie apoptotique indépendante des caspases	(294)	Oui (293)
Granzyme B	Active la voie ubiquiste des caspases (clive les caspases 10,3 et 7) menant à l'apoptose.	(295)	?
Granzyme M	?		Oui (293)
Granulysine	Altère l'intégrité membranaire des bactéries (notamment mycobactéries)	(215, 296, 297)	Oui (298)
β-chimiokines	Chimiotactisme	(299)	?

Table XV : molécules présentes dans les granules lytiques

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ expriment les granzymes A, M et la perforine (293). L'exocytose des granules est dépendante du calcium et fait suite à la transduction du signal déclenchée par la reconnaissance de la cible. Le modèle couramment admis est la formation de pores par les molécules de perforines à la surface cellulaire, qui permettent le passage des granzymes et granulysines et l'accès à leurs cibles intracellulaires. Cependant, ce modèle est à l'heure actuelle remis en cause car il a été montré que les molécules libérées se trouvaient associées dans

des complexes formés par la serglycine. Ces complexes perforine-serglycine-granzymes seraient internalisés par la cible et la perforine permettrait ensuite la sortie de serglycine-granzymes dans le cytoplasme (291, 300). Toutefois, ces modèles ont été établis *in vitro* et le mode de pénétration des molécules actives dans le cytoplasme est encore débattu (290, 301).

A côté de ce système menant à l'apoptose de la cible, une molécule apparentée aux SAPLIP (Saposin-like proteins), la granulysine, est co-libérée par certaines population de LTC (dont les lymphocytes T $\gamma\delta$). Cette molécule a un large spectre d'activité antimicrobienne (bactéries, parasites, champignons) et est capable de tuer *M.tuberculosis* à l'intérieur des macrophages. La figure 26 illustre en B et C l'effet de la granulysine (30 µM) sur *M.tuberculosis* (incubation 80h) comparé au témoin en A.

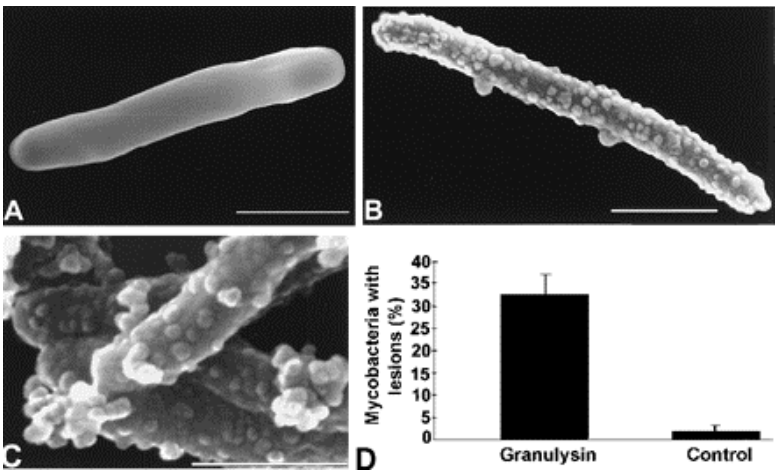


Figure 26 : Effets de la granulysine sur M.tuberculosis, d'après (215)

L'expression de cette molécule confère aux LTC la capacité à éliminer, outre la cellule infectée, les bactéries qui la parasitent et évite ainsi leur dissémination.

b – Mise en jeux de la voie FAS-FAS-L

FAS (ou APO-1 ou CD95) est un récepteur qui appartient à la famille des récepteurs au TNF contenant des domaines de mort (DD : death domain). Ces DD servent de motifs moléculaires impliqués dans le recrutement des protéines intervenant dans la transduction du signal apoptotique. Lorsqu'ils lient leurs

ligands ces récepteurs se trimérisent à la membrane (302, 303). Après activation, les LTC se différencient et expriment notamment le FAS-L (304) qui leur permet d'induire l'apoptose de leurs cibles exprimant FAS. Il faut noter que la stimulation du TCR augmente l'expression de FAS par les lymphocytes T et les rend ainsi susceptibles à l'apoptose (AICD, *cf. supra* (305)).

3 - Contrôle de l'activation

a – Rôle des NKR

Chez l'adulte non infecté, 70% des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ du sang circulant sont $CD94^+$. Cette expression dépend de l'état d'activation car ce sont des lymphocytes T matures qui l'expriment à la différence des lymphocytes T du sang de cordon ou thymiques. La majorité des PBL $\gamma 9\delta 2$ $CD94^-$ a cependant la possibilité d'exprimer ce KIR *ex vivo* car ces derniers possèdent un pool intra-cytoplasmique de CD94 qui peut ainsi être transloqué à la surface de la cellule, en réponse par exemple à une stimulation phosphoantigénique (306). Ainsi, l'expression *in vivo* de ce NKR est corrélée à l'activité cytotoxique des cellules. En outre, on peut émettre l'hypothèse que ces NKR inhibiteurs joueraient un rôle régulateur dans l'équilibre lymphocytes T mémoire/ lymphocytes T effecteur. Chez les lymphocytes T $CD8^+$, il a en effet été montré qu'un engagement des NKR inhibiteurs par le CMH induisait la différenciation des cellules vers un phénotype mémoire (Tm1) les protégeant de l'AICD au cours d'une réponse immunitaire (307, 308).

Plusieurs études ont montré clairement que CD94/NKG2 inhibait la réponse des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ (prolifération, lyse et sécrétion de cytokines) que l'Ag soit cellulaire ou soluble (53, 172, 309). Cependant cette inhibition est levée pour de fortes doses d'Ag soluble ajoutées (309). Les clones qui expriment des NKR inhibiteurs nécessitent donc une plus grande quantité de ligands activateurs pour outrepasser le signal inhibiteur des NKR engagés par les molécules du CMH_I. Ainsi les NKR inhibiteurs élèvent le seuil de réponse des lymphocytes T $\gamma\delta$. Le fait

d'empêcher la liaison CD94/CMH_I, provoque la lyse de lymphomes CMH_I^+ (50), de cibles infectées par des virus (310), et même de blastes T (172).

L'expression des NKR accroît donc les possibilités de régulation des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ au delà de la simple interaction TCR-Ag, aboutissant à un fin réglage de l'activité de ces cellules. Ainsi, en présence de faibles doses d'Ag ou bien d'Ag de piètre bioactivité, la réponse des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ est inhibée. Cette situation semble extrêmement courante dans l'organisme compte tenu du large panel de molécules reconnues (*cf. supra*). Par exemple, les alkylamines, présentes dans notre alimentation mais de faible bioactivité ou l'IPP, synthétisé par toutes nos cellules et par tous les micro-organismes y compris les commensaux sont dans ce cas. Les signaux négatifs des NKR inhibiteurs n'ont pas de difficulté à empêcher la réponse déclenchée par ces Ag de bioactivités faibles à moyennes.

Un autre argument sur le rôle physiologique de ces NKR inhibiteurs réside dans le fait que, contrairement aux LTC $CD8^+$ qui sont fortement contrôlés au niveau de la reconnaissance de l'Ag par la double restriction exercée par les CMH de classe I et II lors du phénomène de présentation croisée (311-313), la reconnaissance T $\gamma 9\delta 2$ est non restreinte et fortement dégénérée. Cette situation est potentiellement très dangereuse pour l'organisme compte tenu de leur activité cytotoxique puissante et de leur libération de cytokines à effets pléiotropes. En montant le seuil d'activation des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$, ces NKR inhibiteurs joueraient le rôle de "garde fou" dans la réponse de ces cellules qui peuvent démarrer ou fortement amplifier une réponse inflammatoire ou être autoréactives (314).

b - La co-stimulation

Nous avons vu que les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ expriment que rarement le co-récepteur CD4 et peu CD8. Ces molécules, chez les lymphocytes T $\alpha\beta$, lient le CMH sur la CPA, stabilisent l'interaction TCR-CMH et apportent la tyrosine kinase $p56^{lck}$ au niveau de la zone de synapse immunologique. l'existance de molécules analogues encore non identifiée à la surface des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ est

envisageable (167, 315), puisque la $p56^{lck}$ est clairement impliquée dans la transduction du signal. Toutefois, une sous-population sanguine T $\gamma 9\delta 2$ $CD4^+$ a été clairement caractérisée sur les plans phénotypique et fonctionnel (50).

Une autre particularité des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ est la probable non-nécessité d'un second signal tel qu'il a été décrit pour les lymphocytes T $\alpha\beta$. En effet, CD28 n'est pas exprimé par toutes les cellules T $\gamma 9\delta 2$ et leur activation peut se faire *in vitro* sans cellules exprimant B7. Toutefois, l'interaction CD2-LFA3 est requise pour la libération de cytokines ou la prolifération alors que LFA-1 est nécessaire à la cytotoxicité envers les cellules Daudi (48).

c – Régulation de l'expression du TCR à la membrane

Chez les lymphocytes T $\alpha\beta$, l'affinité entre le TCR et les molécules présentatrices est faible (de l'ordre du micromolaire) avec des temps de demi-vie des complexes courts (quelques secondes). D'autre part, il existe une faible densité de ligands pour le TCR à la surface de la CPA. Ces paramètres vont à l'encontre de la notion d'agrégation stable nécessaire aux immunorécepteurs pour transduire un signal soutenu et efficace. Ces données, couplés à l'observation qu'un seul complexe CMH-peptide ne liait qu'un TCR à la fois mais pouvait en lier successivement jusqu'à 200 en une heure, ont conduit au modèle de l'engagement en série du TCR ("serial triggering", (316)). Dans ce modèle, quelques complexes peptide-CMH s'accumulent au centre de la synapse immunologique et engagent séquentiellement des milliers de TCR pendant toute la durée de la synapse. Lorsque les complexes se dissocient, les TCR sont ôtés de la surface cellulaire par internalisation et de nouveaux TCR prennent leur place. Ce phénomène permet une transduction du signal efficace et aboutit à une "down-modulation" du TCR, mesurable dès 20 minutes après activation. Il participe de ce fait à un rétrocontrôle négatif de la réponse. Le degré de cette "down-modulation" reflète la puissance du ligand (317).

Chez les lymphocytes T $\gamma\delta$ une "down-modulation" du TCR a été observée mais est moins bien comprise et ne s'intègre pas dans un modèle d'activation comme chez les lymphocytes T $\alpha\beta$ (le mode de présentation restant inconnu). La

stimulation de lymphocytes T γ9δ2 par un PAg, l'IPP, ne conduit pas à une "down-modulation" du TCR même après 6 heures de contact avec l'Ag, en revanche la stimulation par un Ac_m anti-CD3 aboutit à une "down-modulation" du TCR mesurable après 30 minutes (167). Cependant une "down-modulation" a été observée de manière assez fortuite chez des lymphocytes T γ9δ2 stimulés deux jours en présence de pamidronate (un ABP) (135). Il est difficile de tirer un enseignement de ces observations car aucune étude systématique avec différents stimuli, sur des cinétiques longues, n'a été menée à ce jour. Néanmoins, ces résultats confirment la particularité des lymphocytes T γδ vis à vis de la règle définie chez les lymphocytes T αβ.

Les lymphocytes T γ9δ2 sont classés parmi les lymphocytes T non conventionnels. Ils sont la manifestation d'un biais énorme dans le répertoire γδ humain : par ce TCR Vγ9Vδ2, positivement sélectionné en périphérie, ils sont capables de répondre à un grand nombre d'Ag solubles naturels ou synthétiques (les PAg, les alkylamines et les ABP) et cellulaires (cellules tumorales). Le mode de reconnaissance de l'Ag est encore mal compris, mais semble notamment reposer sur les caractéristiques structurales du TCR γ9δ2, sans recours à une restriction par le CMH. Cette particularité les rapproche des cellules de l'immunité innée qui utilisent des récepteurs de motifs moléculaires de micro-organismes (PRRs). Ils peuvent ainsi réagir localement et rapidement n'importe où, sans passer par un organe lymphoïde secondaire pour s'activer. En outre, ils expriment un jeu de NKR inhibiteurs et activateurs qui règlent finement leurs réponses en ajustant leur seuil d'activation. Grâce à la réactivité de ce TCR et au contrôle de l'activation par les NKR, les lymphocytes T γ9δ2 sont tolérants au Soi et ils sont capables de détecter des bactéries, notamment grâce à des métabolites intermédiaires d'une voie de biosynthèse des isoprénoïdes particulière à ces dernières.

Les lymphocytes T γ9δ2 sont des cellules cytotoxiques qui participent à l'immunité cellulaire mais aussi des cellules qui sécrètent de nombreuses cytokines effectrices et régulatrices. Les lymphocytes T γ9δ2 fraîchement isolés démontrent une faible activité cytotoxique *ex vivo*, mais deviennent rapidement des LTC effecteurs très efficaces *in vitro* lorsque stimulés de façon répétitive par leurs ligands. Ces cellules, matures de type mémoire, sont ainsi capables de répondre *in vivo* très rapidement suite à la reconnaissance de leurs Ag. Cependant, ces lymphocytes restent tributaires d'un signal envoyé par des cellules accessoires (macrophages par exemple) et de l'IL2 sécrétée par des lymphocytes Th activés par ailleurs. Ce fait, ajouté à un contrôle de l'activation par les NKR, explique que les lymphocytes T γ9δ2 ne sont pas suractivés en permanence *in vivo* compte tenu de leur large réactivité comme ils le sont souvent *in vitro*.

Les lymphocytes T γ9δ2 pourraient aussi intervenir lors d'un stress cellulaire puisqu'ils reconnaissent les molécules MICA et MICB induites par un stress et l'IPP (présent dans toutes les cellules de l'organisme) qui pourrait être libéré lors de

nécroses par exemple. Leur libération de TNFα pourrait alors contribuer à démarrer ou entretenir une réponse inflammatoire. Cette hypothèse leur donnerait un rôle dans la détection d'un danger et dans le dialogue entre le système immunitaire et les autres cellules selon la théorie de Polly Matzinger (318, 319). Cependant ce rôle dans cette situation reste mal compris et cette théorie est controversée (320).

Ces particularités placent les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ à la frontière des immunités innée et acquise. D'autres cellules, comme les NKT (où on retrouve l'expression de TCR canoniques) et les lymphocytes T DN partagent cette situation. La connaissance de ces types cellulaires particuliers nous aide à comprendre, sans manichéisme, le fonctionnement du système immunitaire dans son ensemble. Elle nous montre combien les deux systèmes immunitaires sont intimement intégrés et redonne toute son importance au système immunitaire inné.

RESULTATS

I - Caractérisation de phosphoantigènes de forte bioactivité

1 - Phosphoantigènes naturels

Après la découverte des PAg comme ligands des lymphocytes T γ9δ2, la structure complète de ces molécules a été recherchée. Tanaka et al avaient trouvé des molécules de la famille des isoprénoides, avec pour chef de file l'IPP, comme PAg issus d'extraits mycobactériens. D'une part, ce groupe de molécules ne correspondait pas aux PAg TUBag précedemment identifiés dans notre laboratoire (nature chimique et biactivité) et d'autre part, ils ne rendaient pas compte de la bioactivité issue d'extraits d'*E.coli* (ordre du nM pour les extraits contre du µM pour l'IPP).

L'objectif était donc d'élucider, en premier lieu, la nature des molécules bactériennes TUBag isolées dans le laboratoire et de déterminer ensuite si ces molécules sont produites par d'autres micro-organismes.

a - Recherche de la structure des PAg mycobactériens TUBag

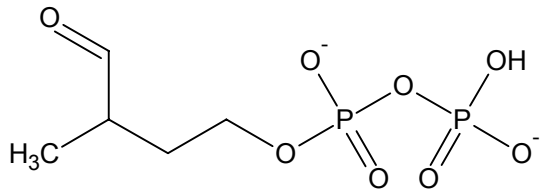
3-Formyl-1-butyl pyrophosphate A novel mycobacterial metabolite-activating human γδ T cells.

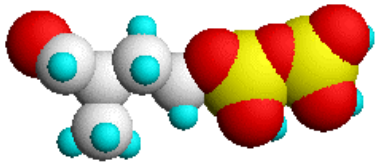
C.Belmant, E.Espinosa, R.Poupot, M.A.Peyrat, M.Guiraud, Y.Poquet, M.Bonneville and J.J.Fournié

Journal of Biological Chemistry, 1999

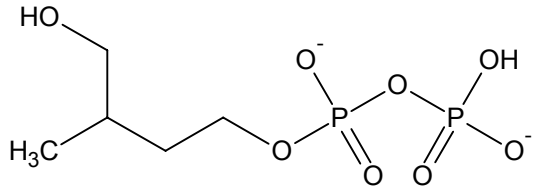
A partir de fractions purifiées de TUBag1 et 3, une analyse en spectrométrie de masse, couplée à des traitements chimiques mettant en évidence des fonctions particulières, nous avons pu déterminer la structure de ces PAg. TUBag1 est le 3fbPP et TUBag3 son conjugué nucléotidique 5'UMP.

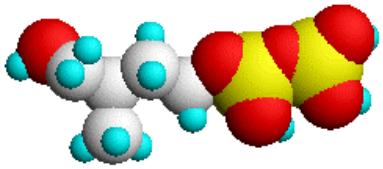
Le 3fbPP contient un groupement aldéhyde chimiquement réactif. Le fait de réduire cette fonction en alcool (schéma ci-dessous montrant à gauche la formule développée et à droite la géométrie, obtenue avec Alchemy 2000 des deux





3fbPP





forme réduite

molécules) abroge complètement la bioactivité de cette molécule alors que sa topologie reste quasiment inchangée. La reconnaissance par le TCR γ9δ2 est ainsi extrêmement sélective ou la réactivité chimique la conditionne fortement.

b - Recherche de la structure des PAg d'*E coli*

Compte tenu de l'implication des lymphocytes T γ9δ2 dans de nombreuses pathologies aux agents étiologiques très différents, il était intéressant de savoir si chaque espèce de pathogène avait ses propres PAg comme les TUBag *pour M. tuberculosis* ou si on pouvait mettre en évidence un dénominateur commun. Une collaboration avec l'équipe allemande de M. Wilhelm a permis de répondre dans le cas d'*E. coli*.

Escherichia coli produces phosphoantigens activating human γδ T cells

J. Feurle, E.Espinosa, S.Eckstein, F.Pont, V.Kunzmann, J.J.Fournié, M.Herderich and M.Wilhem

Journal of Biological Chemistry, 2002

Pour rechercher des PAg d'*E.coli*, des préparations de faible masse moléculaire issues d'extraits de cette bactérie ont été réalisées. Ces préparations ont été montrées activatrices des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ et leur bioactivité a été abrogée par un traitement à la phosphatase alcaline révélant leur caractère phosphoantigénique. Elles ont été soumises à une séparation par HPLC couplée à la spectroscopie de masse et à un test biologique sur les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$. Cela a permis de montrer que l'IPP n'était pas détecté dans les fractions activatrices (donc pas la molécule recherchée) et que la bioactivité des molécules activatrices d'*E.coli* était voisine de celle des TUBag. Nous avons alors recherché, avec les mêmes techniques utilisées pour l'identification des TUBag, le PAg issu d'*E. coli* et obtenu des profils identiques à TUBag1 et 2. Les PAg d'*E.coli* sont donc identiques à deux PAg de *M. tuberculosis* : le 3fbPP et le TUBag2. TUBag2 possède une masse moléculaire supérieure de 14 $g.mol^{-1}$ au 3fbPP. Cela correspond à un groupement CH_2 non localisé qu'il serait possible de placer par exemple sur le C4 du 3fbPP pour obtenir du 3fpePP (3-formyl 1-pentyl-pyrophosphate).

Cette unité de structure des PAg plaide en faveur d'une voie de biosynthèse commune à différents micro-organismes. La voie candidate est celle de Rohmer ou dite du DOXP (deoxyxylulose 5-phosphate), alternative à la voie du mévalonate pour la synthèse des isoprénoides. Cette hypothèse est confortée par le fait que d'une part, alimenter *E. coli* avec le précurseur deoxyxylulose de cette voie augmente leur capacité à stimuler les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ et que d'autre part, inhiber spécifiquement cette voie abroge complètement le caractère stimulant des bactéries (128).

La voie de Rohmer n'est pas encore entièrement élucidée (*cf. supra*). Cependant ses métabolites amonts sont connus et se sont révélés incapables de stimuler les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$. Ainsi ces PAg seraient des métabolites intermédiaires avals. Leur reconnaissance par les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ permettrait

au système immunitaire de détecter ainsi les microorganismes empruntant cette voie métabolique.

2 - Phosphoantigènes de synthèse

Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human γδ T cells

E.Espinosa, C.Belmant, F.Pont, B.Luciani, R.Poupot, F.Romagné, H.Brailly, M.Bonneville and J.J.Fournié

Journal of Biological Chemistry, 2001

En recherchant les bases chimiques de la bioactivité des PAg, de nombreux analogues ont été synthétisés (*cf. infra*). Parmi eux, les phosphohalohydrines se sont révélés de forts agonistes et ainsi particulièrement intéressants dans l'optique d'un usage thérapeutique, compte tenu de leur grande facilité d'obtention. Nous avons choisi de caractériser plus particulièrement le dérivé bromé, plus stable, appelé BrHPP (Bromométhyl-3-butanol-1-yl-diphosphate). Ses propriétés biologiques se sont révélées strictement identiques à celles de la molécule naturelle proche 3fbPP. Une étude approfondie par microphysiométrie (cf. annexe 1) nous a permis de montrer que le temps de réponse des lymphocytes T γ9δ2 à ces PAg est extrêmement rapide : 10 secondes. Cette observation conforte l'hypothèse selon laquelle les PAg n'ont pas besoin d'être apprêtés comme le sont les Ag protéiques et qu'ils sont très rapidement reconnus lors de leur contact avec le lymphocyte T γ9δ2.

3 - Le point sur les phosphoantigènes en 2001

Cet ensemble de résultats nouveaux nous a conduit à récapituler dans une revue les différents ligands solubles activant les lymphocytes T γ9δ2.

Y2K+1 state-of-the-art on non-peptide phosphoantigens, a novel category of immunostimulatory molecules

E.Espinosa, C.Belmant, H.Sicard, R.Poupot, M.Bonneville and J.J.Fournié

Microbes and Infection, 2001

II - Mode de reconnaissance des phosphoantigènes

1 - Modèle à trois composantes

Après l'identification du 3fbPP comme phosphoantigène de *M. tuberculosis*, la liste des PAg naturels ou de synthèse s'allongeait et la question du mode de reconnaissance de ces ligands se posait fortement. Nous sommes partis sur la constatation suivante : les plus forts agonistes connus alors étaient l'IPP et le 3fbPP, molécules ne différant que par les substituants en C3 mais présentant trois log d'écart en terme d'EC_{50}. En outre, la simple réduction de ces molécules abrogeait leur réactivité. Ces observations nous plongeaient dans un paradoxe : le TCR est à la fois extrêmement discriminant mais présente une large dégénérescence compte tenu du panel de ligands reconnus (cf. *supra*). Nous nous sommes alors intéressés au rôle de la nature des substituants en C3 des PAg. Dans cette optique, des analogues ne différant qu'au niveau des groupements portés par ce carbone ont été synthétisés.

A chemical basis for selective recognition of nonpeptide antigens by human γδ T cells

C.Belmant, E.Espinosa, F.Halary, Y.Tang, M.A.Peyrat, H.Sicard, A.Kozikowski, R.Buelow, R.Poupot, M.Bonneville and J.J.Fournié

FASEB Journal, 2000

Plusieurs enseignements ont alors été tirés de cette étude aboutissant à l'élaboration d'un modèle de reconnaissance des PAg par les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$. Trois propriétés du PAg conditionnent sa bioactivité :

- Capacité à répondre à des contraintes topologique. Ce facteur a depuis été confirmé par les données cristallographiques du TCR $\gamma 9\delta 2$ qui indiquent clairement la présence d'une cavité pouvant contenir une molécule de taille compatible avec celle des Pag. Il comporte des résidus chargés positivement pouvant accueillir une partie phosphate ou pyrophosphate et des protubérances hydrophobes pouvant interagir avec la partie alkyle des ligands.
- Réactivité chimique. La capacité du ligand à générer des réactions de substitution, d'addition ou d'élimination est cruciale et conditionne sa bioactivité.
- Susceptibilité à la phosphohydrolyse. L'hydrolyse du lien ester phosphorique entre les deux phosphates est corrélée à une activation.

Ce modèle soulève la question de l'existence d'un partenaire à activité phosphohydrolase, qui peut-être jouerait le rôle de molécule présentatrice.

2 - La phosphatase alcaline ne semble pas impliquée dans l'apprêtement des phosphoantigènes.

a - Principe

Traitement PI-PLC des cellules

Un traitement PI-PLC (à partir de la PI-PLC EC 3.1.4.10 d'origine bactérienne (SIGMA)) a été utilisé pour éliminer les protéines ancrées grâce à un GPI (glycosylphosphatidylinositol) à la membrane en suivant le protocole d'Anagnostou et al (321).

Production de la hTNSAP (Phosphatase alcaline tissu-non-sépcifique humaine) recombinante

L'ADNc codant la hTNSALP-histag nous a été fournie par le Dr Jun Kobayashi de l'université de Mie au Japon. Cet ADNc a été inséré dans le vecteur de transfert PVL92 (Baculogold™ transfection kit, Pharmigen) qui a permis la production de Baculovirus recombinant selon les recommandations du fabriquant. Ces Baculovirus recombinants ont été utilisés pour infecter des cellules d'insecte High Five cultivées en milieu sans sérum lnsect-XPRESS™ (Biowhittaker). La protéine recombinante à été ensuite produite et purifiée selon la méthode utilisée par Oda et al (322). L'activité enzymatique de la protéine ainsi purifiée a été évaluée à 0,03 UA/min pour une concentration de 30 $\mu g.mL^{-1}$. La protéine a ensuite été concentrée à $1mg.mL^{-1}$.

Analyses au biacore

La hTNSAP a été immobilisée sur une "CM5 sensor chip" en tampon HBS de la manière suivante : la surface a été activée avec un pulse de 4 min (pistes 1 et 2) du mélange NHS 0,05M et EDC 0,1M ($10\mu L.min^{-1}$, 40µL) ; 70µL de hTNSAP à $20\mu g.mL^{-1}$ ont ensuite été injectés sur 7 min (piste 2) et la surface a finalement été désactivée par 40µL d'éthanolamine-HCl pH 8,5 (pistes 1 et 2). Environ 5000 RUs de hTNSAP ont ainsi été fixées sur la chip piste 2. En parallèle une piste contrôle (piste 1) a subit les mêmes traitements excepté l'injection de hTNSAP.
30 µL de TCR $V\gamma9V\delta2$ ($10 \mu g.mL^{-1}$) plus BrHPP 10µM ou 35 µL d'Ac_m anti-hTNSAP B4-78 (université de l'IOWA) ont été injectés en tampon TBS pH 8,0 sur les deux pistes en parallèle à $10\mu L.min^{-1}$. Le signal obtenu a été calculé en soustrayant les RUs obtenues pour la piste 1 témoins de celles obtenues pour la piste 2 test.

b - Résultats et discussion

Dans l'optique de mettre en évidence l'enzyme impliquée, nous avons essayé de caractériser sa bioactivité en utilisant des inhibiteurs de phosphatases. Comme de nombreuses ecto-enzymes ont une ancre GPI, nous avons testé en parallèle les conséquences d'un traitement des lymphocytes T γ9δ2 par la PI-PLC sur leur réponse à un PAg (mesurée par microphysiométrie).

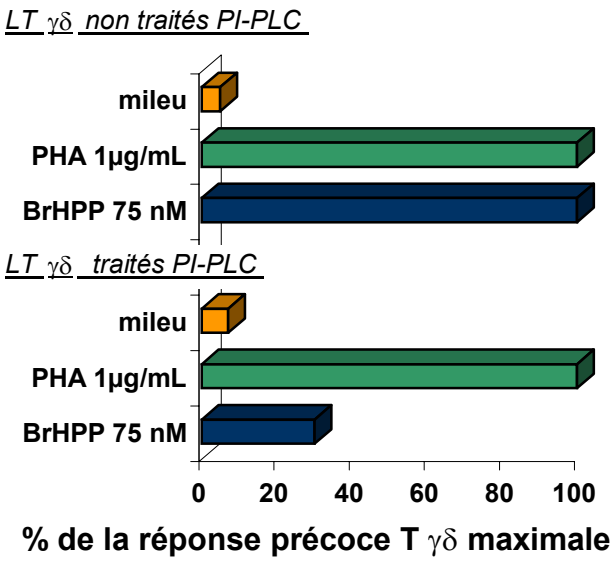


Figure 1 : Avant analyse en microphysiométrie les cellules ont été traitées ou pas 30 min à 37°C avec 0,1 U/mL PI-PLC en tampon privé de NaCl. Après lavage, les cellules ont été introduites dans le microphysiomètre (10^6 cellules dans 10µL de RPMI 0,75% agarose) et stimulées avec BrHPP et PHA comme indiqué. Les résultats sont fournis en % du maximum du taux d'acidification obtenu.

La Figure 1 montre que la réponse au BrHPP est fortement altérée lorsque les cellules ont été traitées avec la PI-PLC alors que la réponse à la PHA ne l'est pas. Une ou des molécules à ancre GPI sont impliquées spécifiquement dans l'activation par les PAg. Cette donnée nous a incités à rechercher plus particulièrement les phosphatases ancrées GPI. La plus caractérisée et ubiquiste d'entre elles est la phosphatase alcaline. Il en existe quatre isoformes : germinale, placentaire, intestinale et tissu-non spécifique (hTNSAP). Cette dernière est exprimée sur la majorité des cellules de l'organisme (notamment par le foie, les os et les reins) et leur permet une alimentation en phosphate inorganique (323). L'enzyme est présente à la surface des cellules sous forme d'un homotétramère ancré dans la membrane plasmique par une ancre GPI. L'isoforme hTNSAP est exprimée sur les blastes B, les blastes T γδ (non montré), et certains lymphomes.

L'utilisation d'un inhibiteur de la hTNSAP, comme le lévamisole (324), bloque la réponse des lymphocytes T γ9δ2 aux PAg mais pas à la PHA (figure2 et Espinosa *et al*, J.Immunol 2002 in press).

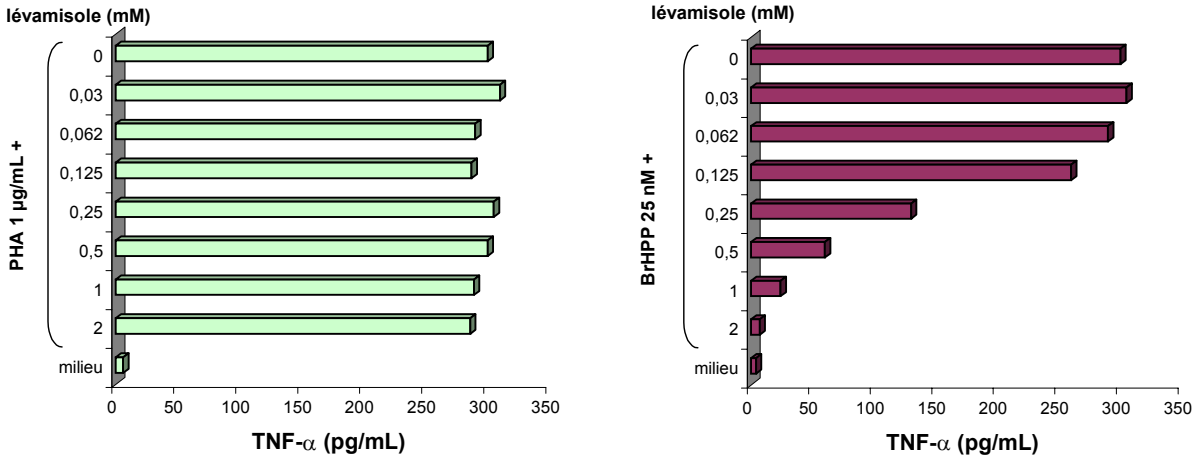


Figure 2 : Le TNF-α libéré après 24 d'incubation à 37°C d'une lignée γ9δ2 (10^5 C/puits) avec 1µg/mL de PHA (gauche) ou de 25 nM de BrHPP (droite) plus du lévamisole en quantité croissante

En outre, fait frappant, la structure tridimensionnelle de l'enzyme selon les extrapolations faites à partir de la structure primaire, ressemble à celle des molécules du CMH avec un plancher de feuillets β surmonté de deux hélices α (figure 3). L'hypothèse de la reconnaissance d'une telle molécule CMH-like par le TCR γ9δ2 était confortée par des résultats obtenus chez la souris où les molécules T10/T22 apparentées au CMH sont reconnues par le TCR γδ (92).

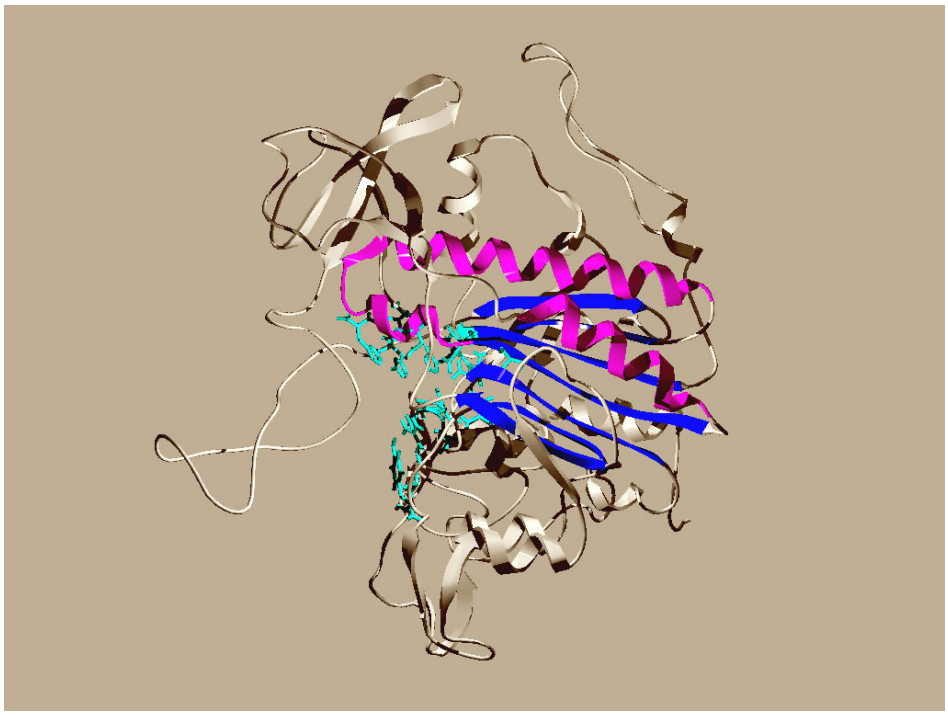


Figure 3 : Structure tridimensionnelle hypothétique d'un monomère de hTNSAP calculée à partir de la séquence primaire de la hTNSAP. En violet les hélices alpha et en bleu les feuillets bêta par analogie avec les molécules du CMH. Les résidus figurés en bleu forment le site actif de l'enzyme.

Cet ensemble de données militait en faveur d'une possible implication de cette enzyme dans l'apprêtement des phosphoantigènes. Pour tester cette hypothèse, nous avons produit cette enzyme dans un système d'expression hétérologue. La protéine recombinante a été soumise à un test d'interaction avec le TCR $\gamma 9\delta 2$ en résonance plasmonique de surface (RPS, technologie Biacore). Les résultats (figure 4) montrent clairement l'absence d'interaction entre la hTNSAP fixée et le TCR $\gamma 9\delta 2$ en présence de PAg. En revanche une interaction est bien mesurée entre la hTNSAP et un Ac_m B4-78 spécifique attestant de sa bonne conformation après fixation. La même expérience menée cette fois ci en fixant le TCR et injectant l'enzyme avec le PAg n'a pas donné de résultat positif (non montré).

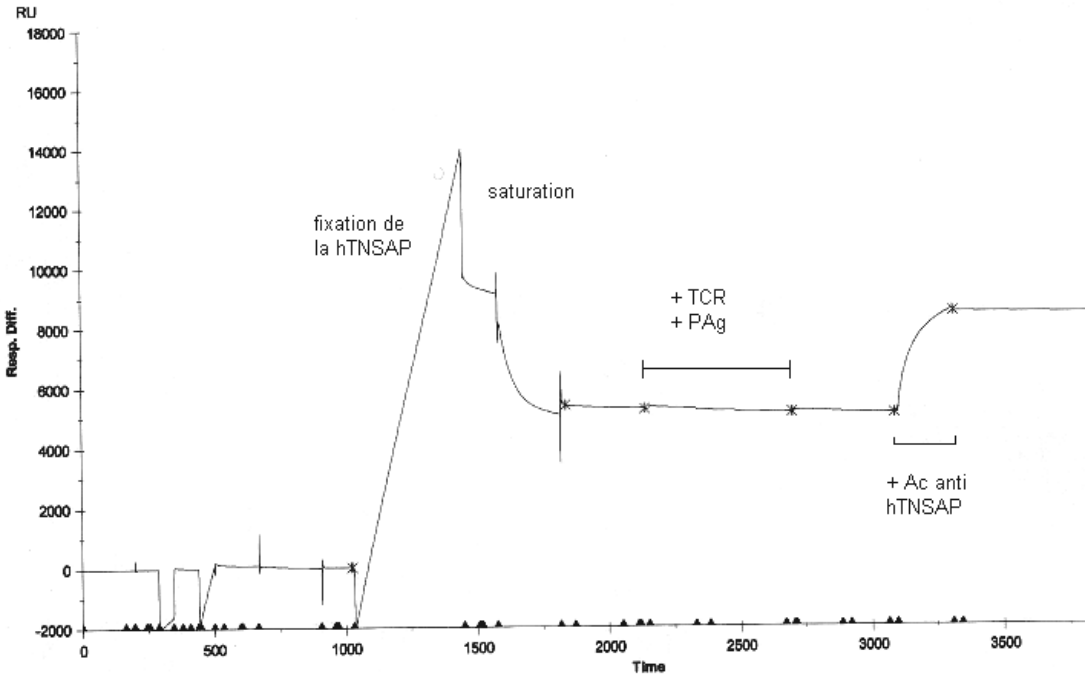


Figure 4 : tracé de la différence ($RU_{piste\ test}$-$RU_{piste\ témoin}$). L'enzyme hTNSAP a été immobilisée sur la surface de la piste test contre rien sur la piste témoin. Une injection de TCR γ9δ2 et de PAg, puis d'Acm anti hTNSAP B4-78 sont successivement réalisées.

Ainsi La hTNSAP n'est pas le partenaire du TCR Vγ9Vδ2, qui reste à identifier, mais ces expériences préliminaires suggèrent une autre molécule à activité ecto-phosphatase ou apparentée pouvant hydrolyser des PAg. Des travaux en cours, utilisant la RPS appliquée aux molécules de faible poids moléculaire devraient nous indiquer si le TCR Vγ9Vδ2 est capable de lier seul des PAg, donnant ou non une place centrale à cette activité phosphohydrolase.

III - Caractéristiques de la réponse aux phosphoantigènes

1 - Activation différentielle

Des résultats surprenants sur l'internalisation du TCR, observée chez des lymphocytes T γ9δ2 activés par des PAg de bioactivité différentes, furent obtenus par G. Sireci en Italie. Cela nous a conduit en collaboration avec cette équipe à mener une étude plus complète sur la réponse des lymphocytes T γ9δ2

stimulés par des PAg de bioactivités différentes. Le comportement des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ a été analysé en utilisant

- la microphysiométrie (annexe 1) comme test d'activation précoce,
- la "down modulation" du TCR comme observation connue chez les lymphocytes T $\alpha\beta$ pour être d'autant plus marquée que le peptide agoniste est fort
- la mesure de la quantité de cytokine libérée et l'autocytotoxicité comme tests d'activation et de différenciation des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ en cellules effectrices pleinement activées.

Differential activation of human $\gamma\delta$ cells by nonpeptide phosphoantigens

G.Sireci, E.Espinosa, C.Di Sano, F.Dieli, J.J.Fournié and A.Salerno

---

European Journal of Immunology, 2001

Nous avons ainsi pu montrer que les caractéristiques des réponses obtenues varient avec la nature et notamment la bioactivité des différents ligands. Les expériences que nous avions menées jusque là en microphysiométrie mettaient en jeu des stimulations brèves (de 1 à 10 minutes), les réponses étant analysées sur la première heure après stimulation. Nous avons voulu ici regarder le comportement métabolique ces cellules en présence continue de phosphoantigène sur une période plus longue (3h). Si rien n'est détectable avec un PAg de faible bioactivité comme le ribose-1-P, des différences sont clairements mises en évidence entre des PAg de moyenne et forte bioactivités. Plus l'agoniste est fort, plus la réponse immédiate est explosive. Cependant, elle ne peut pas être soutenue sur une longue période comme en témoigne une chute du taux d'acidification (*i.e* de la réponse métabolique) en dessous même de la ligne de base après une heure. Ainsi avec l'IPP (bioactivité moyenne), on obtient une réponse qui est soutenue sur toute la durée de l'expérience. Ces différences de comportement métabolique suite au stimulus antigénique sont difficiles à interpréter. En effet, si on regarde des réponses plus tardives comme l'autocytotoxicité ou la libération de cytokine, les résultats sont

semblables dans la mesure où la concentration optimale de chaque PAg est atteinte. En revanche, des différences apparaissent en ce qui concerne le taux d'expression du TCR. L'internalisation du TCR est surprenante puisqu'elle a lieu avec un PAg de bioactivité moyenne, l'IPP, mais pas avec des PAg de forte bioactivité comme le BrHPP ou le 3fbPP, contrairement à ce qui est attendu si on se réfère aux lymphocytes T $\alpha\beta$. Ces résultats divergent de ceux obtenus par l'équipe de V.Lafont (167), cependant les cellules $\gamma\delta$ utilisées dans les deux cas ont été obtenues par des moyens différents : tri positif avec Ac anti-TCR puis amplification avec des monocytes syngéniques et de l'IPP (50µM) dans le cas de l'équipe précédemment citée et amplification à partir de PBMC avec du 3fbPP (10 nM) et de l'IL2 durant trois semaines dans notre cas. Ces différents protocoles de stimulations antérieures pourraient conduire à des différenciations particulières et conduire à des comportements différents.

Ces résultats montrent des différences de signalisation manifestes lorsqu'un lymphocyte T $\gamma 9\delta 2$ est en présence d'un agoniste fort (le PAg naturel bactérien 3fbPP) ou d'un agoniste modéré (le PAg ubiquiste IPP). Il serait intéressant d'analyser notamment la nature de la synapse immunologique qui se forme en présence de ces deux types de PAg.

2 - Le transfert synaptique.

La majorité des résultats présentés ici sont obtenus par stimulation des lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$ avec des PAg sans cellules présentatrices ou accessoires. Ce fait témoigne encore en faveur d'une non présentation des PAg ou d'une autoprésentation entre lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$. Cependant nous avons vu en introduction qu'un contact cellulaire était nécessaire pour l'obtention d'un signal, attestant que s'il n'y a pas auto-présentation, il y a néanmoins une interaction cellulaire qui se produit.

Dans cette optique nous avons cherché à caractériser les événements qui ont lieu lorsque qu'un lymphocyte T $\gamma 9\delta 2$ entre en contact avec une autre cellule que ce soit une cellule accessoire comme cela a été décrit pour les macrophages ou que ce soit un cellule cible comme le lymphome Daudi par exemple.

Synaptic transfer by human γδ T cells stimulated with soluble or cellular antigens

E.Espinosa, J.Tabiasco, D.Hudrisier, and J.J.Fournié

Journal of Immunology, 2002

Pour pouvoir repérer par cytométrie en flux et par microscopie confocale les lymphocytes T γ9δ2 et leurs cellules partenaires nous avons dû mettre au point un système permettant de clairement les identifier (annexe 2). En bref, les membranes des cellules "présentatrices" ont été marquées par un phospholipide couplé à un fluorochrome vert (PKH 67) et les lymphocytes T ont été marqués au niveau cytoplasmique par un fluorochrome orange : le CMTMR. Ce système nous a permis d'observer la formation de conjugués et une synapse immunologique notamment en présence de phosphoantigènes ou de cellules cibles comme Daudi. Cette synapse semble de nature différente de celle des LTC $CD8^+$ puisque la focalisation des TCR γδ ne semble pas obligatoire alors que CD45 est clairement exclue de la zone de contact.

Fait marquant, lors de la formation de ces conjugués et en présence d'antigène, du matériel membranaire est transféré de la cellule cible vers le lymphocytes T γδ. Ce phénomène a pu être apprécié de manière qualitative en microscopie confocale et quantifié par cytométrie en flux. Nous avons pu montrer que le transfert synaptique est un mécanisme actif du lymphocyte T γδ qui met en jeu son cytosquelette et ses protéines kinases de la famille Src.

Nous avons ainsi mis en évidence une nouvelle réponse biologique des lymphocytes T γ9δ2 qui est "semi-précoce" puisque détectable juste après l'acidification extracellulaire ou les flux calciques, mais intervenant avant la cytotoxicité. Le contrôle de ce mécanisme et son intérêt physiologique restent cependant des questions encore sans réponse.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux ont contribué à mieux définir les caractéristiques de réactivité et du mode de reconnaissance de l'Ag par les lymphocytes T $\gamma 9\delta 2$. L'ensemble des connaissances accumulées nous donne quelques indices sur la place des lymphocytes T $\gamma\delta$ humains dans le système immunitaire. Les Ag bactériens qu'ils reconnaissent sont des phosphopantigènes certainement métabolites de la voie de Rohmer de biosynthèse des isoprénoides. Ces molécules sont extrêmement bioactives puisque leur EC_{50} est de l'ordre de $10^{-8}M^{-1}$. Leur mode de reconnaissance reste encore imparfaitement connu bien que le modèle que nous avons proposé soit compatible avec les informations apportées par la cristallographie du TCR $\gamma 9\delta 2$. Reste encore à découvrir quelle molécule apporte l'activité phosphohydrolase suspectée. Il existe de nombreuses ecto-enzymes capables d'hydrolyser les PAg à la surface des lymphocytes et toutes ne sont pas connues (325). De plus leur rôle central ou accessoire reste à définir.

Concernant le mode de reconnaissancen, la découverte de certaines alkylamines comme ligands du TCR $V\gamma 9V\delta 2$ ne facilite pas notre tâche pour proposer un modèle de reconnaissance comprenant à la fois les PAg, les ABP et les alkylamines. Ces dernières échappent même au modèle impliquant une activité enzymatique de type phosphohydrolase. Cependant la bioactivité des alkylamines est bien plus faible que celle des phosphoantigènes bactériens.

Toutefois, nous sommes en présence d'un mode de reconnaissance de l'antigène particulier qui répond à la fois à des traits des systèmes immunitaires innés et adaptatifs. Système immunitaire adaptatifs car les LT $\gamma 9\delta 2$ des cellules ayant biosynthétisé leurs récepteurs après réarrangement de segments de gènes en configuration germinale. Une spécificité existe, très large, avec une grande dégénérescence mais aussi extrêmement discriminante. Système immunitaire inné car nous sommes en présence de cellules certes génétiquement polyclonales mais immunologiquement de même spécificité, fortement représentées dans l'organisme et qui reconnaissent, de manière non restreinte par le CMH, des molécules issues d'un métabolisme propre aux pathogènes ayant des caractéristiques de PAMPs.

Comme les cellules NK, ces lymphocytes cytotoxiques sont fortement contrôlés par les NKR et sécrètent massivement du TNFα et de l'IFNγ.

Ainsi, la différence des lymphocytes T $\gamma\delta$ et $\alpha\beta$ se situe aussi au niveau de leur mode d'interaction avec leur cellule cible. Nous avons pu mettre en évidence un transfert synaptique de la cible vers la cellule effectrice, mais qui ne semble pas entièrement sous le même contrôle que les autres activités biologiques de ces cellules (*i.e.* la cytotoxicité ou la libération de cytokines). En effet le rôle des récepteurs inhibiteurs semble ici marginal.

En outre, la signification physiologique de ce phénomène reste énygmatique et nous pouvons juste avancer prudemment que cela pourrait servir à augmenter la lyse fratricide conduisant à un rétrocontrôle négatif de la réponse.

La synapse immunologique qui suit la reconnaissance de la cible semble elle aussi différente de la synapse $\alpha\beta$. Des travaux en cours dans le laboratoire visent à caractériser cette synapse et notamment le rôle et la place que tiennent les NKR. Existe-t-il comme pour les cellules NK des synapses de type inhibitrices ou activatrices?

annexe1 Microphysiométrie

La microphysiométrie est la mesure de micro-variations du pH du milieu extérieur où baignent des cellules (326, 327). Cette acquisition se fait dans les chambres de mesures du Cytosensor™ (enregistrement de photo-courants induits) où sont piégées des cellules irriguées par le biais de pompes péristaltiques avec un milieu RPMI faiblement tamponné et maintenu à 37°C. Lorsque les cellules sont stimulées, il y a consommation d'ATP et mise en route immédiate de la respiration cellulaire avec production de H+ qui sont évacués dans le milieu extracellulaire (figure 1)

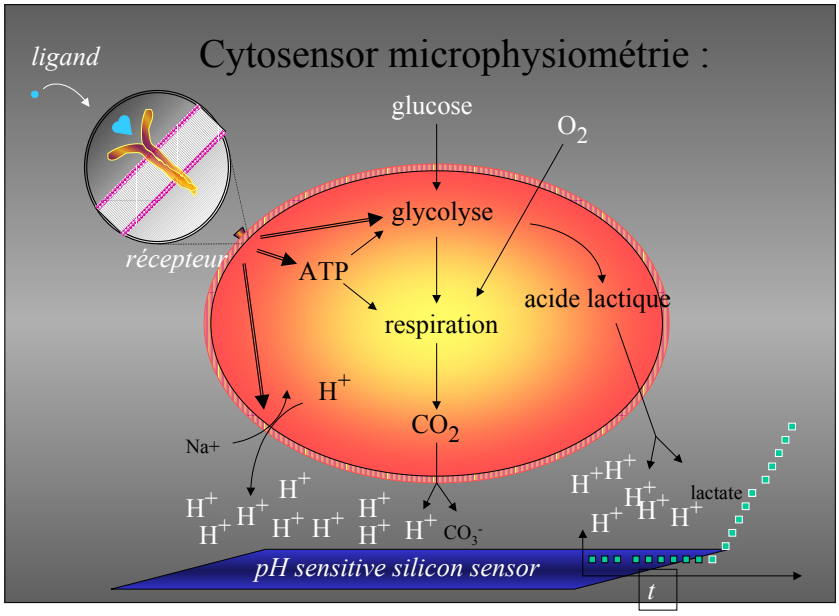


Figure 1 : extrusion de H+ suite à une stimulation

Les cellules sont irriguées selon un processus cyclique comprenant une période (1 min) où les pompes fonctionnent et irriguent les cellules et une période où les pompes sont arrêtées (30s). A chaque instant le courant (dû aux H+) est mesuré et correspond à un potentiel électrique E, lui même étant relié au pH. les variations de pH sont ainsi suivies en direct. Pendant le temps d'arrêt des pompes le milieu s'acidifie et si la variation de pH est mesurée pendant ce temps, le taux d'acidification $\Delta pH/\Delta t$ est obtenu : il est reporté pour chaque cycle en fonction du temps (figure 2).

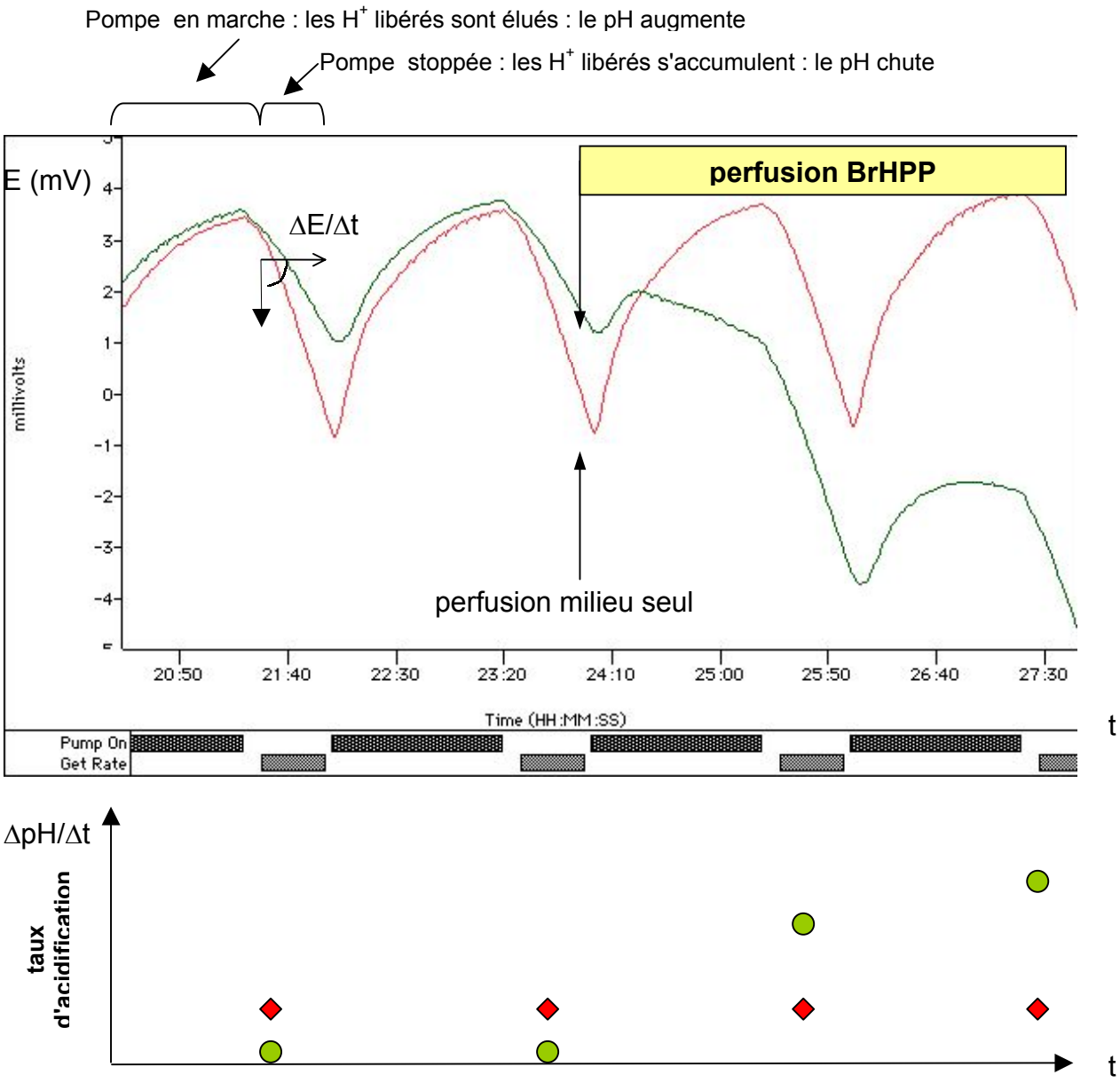


Figure 28 : des données brutes E=f(t) au taux d'acidification en fonction du temps.

De manière pratique, les cellules après décongélation sont emprisonnées dans du RPMI faiblement tamponné additionné de 0,75% d'agarose "low-melting" (10^6C/10µL) et placées dans la chambre de mesure. Les cycles d'irrigation commencent et la stimulation n'est effectuée que lorsque le taux d'acidification est stabilisé.

ANNEXE 2 Marquage des cellules

Pour clairement identifier les cellules cibles et les cellules effectrices en microscopie confocale et en cytométrie en flux, nous avions besoin de molécules non cytotoxiques et assurant un marquage intense, stable, uniforme et reproductible. Les marqueurs PKH (découverts par Karl Paul Horan) répondent à ces exigences. Ils comprennent une partie lipophile qui leur permet de se fixer

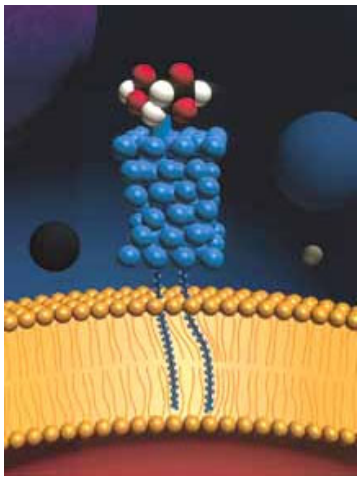


Figure 3a : schéma de la molécule PKH

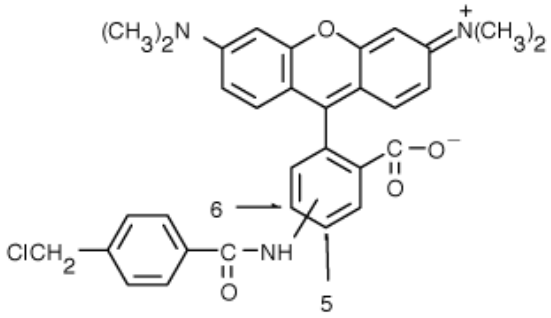


Figure 3b : structure du CMTMR

dans les membranes biologiques (figure 3a). Nous avons particulièrement utilisé le PKH27 (Sigma) qui a des propriétés spectrales voisines de la fluorescéine en excitation (490 nm) et émission (504 nm) pour marquer les cellules cibles et ainsi suivre le transfert de morceaux de membrane sur la cellule effectrice. Pour aisément différencier cette dernière nous l'avons marqué avec un fluorochrome CMTMR ((5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino) tetramethylrhodamine) , Molecular Probes, figure 3b). La figure 4 montre le marquage obtenu en microscopie confocale. Ce

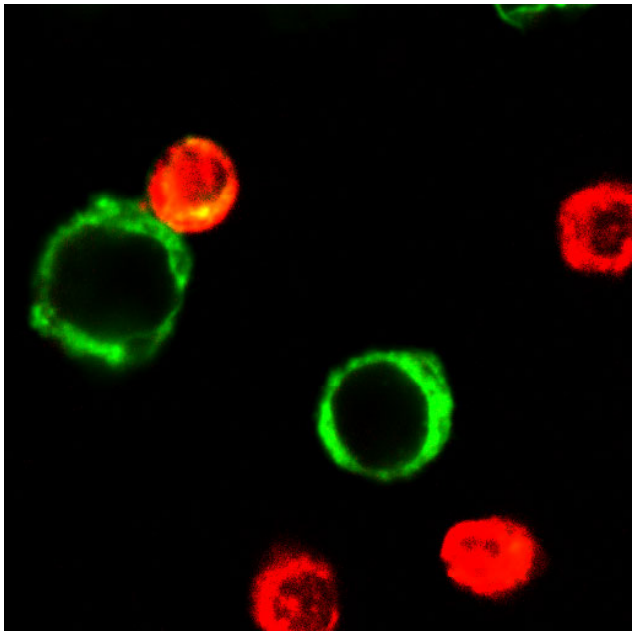


Figure 4 : cellules cibles Daudi marquées au PKH67 (vertes) et LT $\gamma 9\delta 2$ marqués au CMTMR (orange).

marquage homogène nous a permis d'analyser en cytométrie en flux les résultats de transfert synaptique en regardant l'augmentation de fluorescence verte sur les cellules effectrices oranges.

1. Sturm, E., R. E. Bontrop, R. J. Vreugdenhil, N. Otting, R. L. Bolhuis. 1992. T-cell receptor γδ: comparison of gene configurations and function between humans and chimpanzees. *Immunogenetics*. 36: 294-301
2. Kang, J., M. Coles, D. Cado, D. H. Raulet. 1998. The developmental fate of T cells is critically influenced by TCRγδ expression. *Immunity*. 8: 427-38.
3. Passoni, L., E. S. Hoffman, S. Kim, T. Crompton, W. Pao, M. Q. Dong, M. J. Owen, A. C. Hayday. 1997. Intrathymic δ selection events in γδ cell development. *Immunity*. 7: 83-95.
4. MacDonald, H. R., F. Radtke, A. Wilson. 2001. T cell fate specification and αβ/γδ lineage commitment. *Curr Opin Immunol*. 13: 219-24.
5. Saint-Ruf, C., M. Panigada, O. Azogui, P. Debey, H. von Boehmer, F. Grassi. 2000. Different initiation of pre-TCR and γδ TCR signalling. *Nature*. 406: 524-7.
6. Hayday, A. C., D. F. Barber, N. Douglas, E. S. Hoffman. 1999. Signals involved in γδ T cell versus αβ T cell lineage commitment. *Semin Immunol*. 11: 239-49.
7. Aifantis, I., O. Azogui, J. Feinberg, C. Saint-Ruf, J. Buer, H. von Boehmer. 1998. On the role of the pre-T cell receptor in αβ versus γδ T lineage commitment. *Immunity*. 9: 649-55.
8. Mertsching, E., A. Wilson, H. R. Macdonald, R. Ceredig. 1997. T Cell Receptor Alpha Gene Rearrangement and Transcription In Adult Thymic Gamma-Δ Cells. *European Journal of Immunology*. 27: 389-396
9. Ishida, I., S. Verbeek, M. Bonneville, S. Itohara, A. Berns, S. Tonegawa. 1990. T-cell receptor γδ and gamma transgenic mice suggest a role of a gamma gene silencer in the generation of αβ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87: 3067-71
10. Washburn, T., E. Schweighoffer, T. Gridley, D. Chang, B. J. Fowlkes, D. Cado, E. Robey. 1997. Notch Activity Influences the αβ Versus γδ T Cell Lineage Decision. *Cell*. 88: 833-843
11. Robey, E., B. J. Fowlkes. 1998. The αβ versus γδ T-cell lineage choice. *Curr Opin Immunol*. 10: 181-7.
12. McVay, L. D., S. R. Carding. 1996. Extrathymic origin of human γδ T cells during fetal development. *J Immunol*. 157: 2873-82.
13. Parker, C. M., V. Groh, H. Band, S. A. Porcelli, C. Morita, M. Fabbi, D. Glass, J. L. Strominger, M. B. Brenner. 1990. Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor γδ repertoire. *J Exp Med*. 171: 1597-612.
14. Arden, B., S. P. Clark, D. Kabelitz, T. W. Mak. 1995. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics*. 42: 455-500
15. Haas, W., S. Tonegawa. 1992. Development and selection of γδ T cells. *Curr Opin Immunol*. 4: 147-55.
16. Porcelli, S., M. B. Brenner, H. Band. 1991. Biology of the human γδ T-cell receptor. *Immunol Rev*. 120: 137-83.

17. Krangel, M. S., H. Yssel, C. Brocklehurst, H. Spits. 1990. A distinct wave of human T cell receptor γδ lymphocytes in the early fetal thymus: evidence for controlled gene rearrangement and cytokine production. *J Exp Med*. 172: 847-59
18. McVay, L. D., S. R. Carding, K. Bottomly, A. C. Hayday. 1991. Regulated expression and structure of T cell receptor γδ transcripts in human thymic ontogeny. *Embo J*. 10: 83-91.
19. Fagioli, M., E. Ciccone, C. Bottino, B. Falini, F. Grignani, A. Moretta, L. Moretta, P. G. Pelicci. 1990. The C gamma 1-encoded disulphide-linked and the C gamma 2-encoded nondisulphide-linked forms of the γδ heterodimer use different gamma and δ variable regions. *Blood*. 76: 279-84.
20. Triebel, F., F. Faure, F. Mami-Chouaib, S. Jitsukawa, A. Griscelli, C. Genevee, S. Roman-Roman, T. Hercend. 1988. A novel human V δ gene expressed predominantly in the Ti gamma A fraction of γδ+ peripheral lymphocytes. *Eur J Immunol*. 18: 2021-7
21. Bottino, C., G. Tambussi, S. Ferrini, E. Ciccone, P. Varese, M. C. Mingari, L. Moretta, A. Moretta. 1988. Two subsets of human T lymphocytes expressing γδ antigen receptor are identifiable by monoclonal antibodies directed to two distinct molecular forms of the receptor. *J Exp Med*. 168: 491-505
22. Borst, J., A. Wicherink, J. J. Van Dongen, E. De Vries, W. M. Comans-Bitter, F. Wassenaar, P. Van Den Elsen. 1989. Non-random expression of T cell receptor gamma and δ variable gene segments in functional T lymphocyte clones from human peripheral blood. *Eur J Immunol*. 19: 1559-68
23. Deusch, K., F. Luling, K. Reich, M. Classen, H. Wagner, K. Pfeffer. 1991. A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the γδ T cell receptor, the CD8 accessory molecule and preferentially uses the Vδ1 gene segment. *Eur J Immunol*. 21: 1053-9.
24. Takihara, Y., J. Reimann, E. Michalopoulos, E. Ciccone, L. Moretta, T. W. Mak. 1989. Diversity and structure of human T cell receptor δ chain genes in peripheral blood γδ-bearing T lymphocytes. *J Exp Med*. 169: 393-405
25. Lefranc, M. P., T. H. Rabbitts. 1990. Genetic organization of the human T-cell receptor gamma and δ loci. *Res Immunol*. 141: 565-77.
26. Morita, C. T., C. M. Parker, M. B. Brenner, H. Band. 1994. TCR usage and functional capabilities of human γδ T cells at birth. *J Immunol*. 153: 3979-88
27. Miyawaki, T., Y. Kasahara, K. Taga, A. Yachie, N. Taniguchi. 1990. Differential expression of CD45RO (UCHL1) and its functional relevance in two subpopulations of circulating TCR-γδ+ lymphocytes. *J Exp Med*. 171: 1833-8
28. De Libero, G., G. Casorati, C. Giachino, C. Carbonara, N. Migone, P. Matzinger, A. Lanzavecchia. 1991. Selection by two powerful antigens may account for the presence of the major population of human peripheral γδ T cells. *J Exp Med*. 173: 1311-22.

29. Uyemura, K., R. J. Deans, H. Band, J. Ohmen, G. Panchamoorthy, C. T. Morita, T. H. Rea, R. L. Modlin. 1991. Evidence for clonal selection of γδ T cells in response to a human pathogen. *J Exp Med*. 174: 683-92.

30. Delfau, M. H., A. J. Hance, D. Lecossier, E. Vilmer, B. Grandchamp. 1992. Restricted diversity of V gamma 9-JP rearrangements in unstimulated human γδ T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 22: 2437-43

31. Davodeau, F., M. A. Peyrat, M. M. Hallet, I. Houde, H. Vie, M. Bonneville. 1993. Peripheral selection of antigen receptor junctional features in a major human γδ subset. *Eur J Immunol*. 23: 804-8.

32. Jouen-Beades, F., F. Halary, L. Drouot, M. A. Peyrat, E. Paris, P. Joly, D. Gilbert, M. Bonneville, F. Tron. 1999. Expansion of circulating Vγ9/Vδ1 T cells in a patient with a syndrome of recurrent fever: evidence for an unusual antigen-driven process leading to selection of recurrent motifs within TCR junctional loops of diverse lengths. *Eur J Immunol*. 29: 3338-49.

33. Boullier, S., M. Cochet, F. Poccia, M. L. Gougeon. 1995. CDR3-independent γδ Vδ1+ T cell expansion in the peripheral blood of HIV-infected persons. *J Immunol*. 154: 1418-31.

34. Wesch, D., T. Hinz, D. Kabelitz. 1998. Analysis of the TCR Vγ repertoire in healthy donors and HIV-1-infected individuals. *Int Immunol*. 10: 1067-75.

35. Hviid, L., B. D. Akanmori, S. Loizon, J. A. Kurtzhals, C. H. Ricke, A. Lim, K. A. Koram, F. K. Nkrumah, O. Mercereau-Puijalon, C. Behr. 2000. High frequency of circulating γδ T cells with dominance of the Vδ1 subset in a healthy population. *Int Immunol*. 12: 797-805.

36. Pelicci, P. G., M. Subar, A. Weiss, R. Dalla-Favera, D. R. Littman. 1987. Molecular diversity of the human T-gamma constant region genes. *Science*. 237: 1051-5.

37. Lefranc, M. P., M. Bonneville. 1990. γδ T cells. *Res Immunol*. 141: 579-81.

38. Sturm, E., E. Braakman, R. E. Bontrop, P. Chuchana, R. J. Van de Griend, F. Koning, M. P. Lefranc, R. L. Bolhuis. 1989. Coordinated Vγ and Vδ gene segment rearrangements in human T cell receptor γδ+ lymphocytes. *Eur J Immunol*. 19: 1261-5

39. Lefranc, M. P., T. H. Rabbitts. 1989. The human T-cell receptor γ (TRG) genes. *Trends Biochem Sci*. 14: 214-8

40. Hinz, T., D. Wesch, F. Halary, S. Marx, A. Choudhary, B. Arden, O. Janssen, M. Bonneville, D. Kabelitz. 1997. Identification of the complete expressed human TCR Vγ repertoire by flow cytometry. *Int Immunol*. 9: 1065-72.

41. Kabelitz, D., T. Hinz, T. Dobmeyer, U. Mentzel, S. Marx, A. Bohme, B. Arden, R. Rossol, D. Hoelzer. 1997. Clonal expansion of Vγ3/Vδ3-expressing γδ T cells in an HIV-1/2-negative patient with CD4 T-cell deficiency. *Br J Haematol*. 96: 266-71.

42. Rock, E. P., P. R. Sibbald, M. M. Davis, Y. H. Chien. 1994. CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J Exp Med*. 179: 323-8

43. Allison, T. J., C. C. Winter, J. J. Fournie, M. Bonneville, D. N. Garboczi. 2001. Structure of a human γδ T-cell antigen receptor. *Nature*. 411: 820-4.

44. Chien, Y. H., R. Jores. 1995. γδ T cells. T cells with B-cell-like recognition properties. *Curr Biol*. 5: 1116-8

45. Li, H., M. I. Lebedeva, A. S. Llera, B. A. Fields, M. B. Brenner, R. A. Mariuzza. 1998. Structure of the Vδ domain of a human γδ T-cell antigen receptor. *Nature*. 391: 502-6.

46. Wilson, I. A., R. L. Stanfield. 2001. Unraveling the mysteries of γδ T cell recognition. *Nat Immunol*. 2: 579-81.

47. Groh, V., S. Porcelli, M. Fabbi, L. L. Lanier, L. J. Picker, T. Anderson, R. A. Warnke, A. K. Bhan, J. L. Strominger, M. B. Brenner. 1989. Human lymphocytes bearing T cell receptor γδ are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med*. 169: 1277-94

48. Wang, P., M. Malkovsky. 2000. Different roles of the CD2 and LFA-1 T-cell co-receptors for regulating cytotoxic, proliferative, and cytokine responses of human Vγ9/Vδ2 T cells. *Mol Med*. 6: 196-207.

49. Spits, H., X. Paliard, Y. Vandekerckhove, P. van Vlasselaer, J. E. de Vries. 1991. Functional and phenotypic differences between CD4+ and CD4- T cell receptor-γδ clones from peripheral blood. *J Immunol*. 147: 1180-8.

50. Fisch, P., E. Meuer, D. Pende, S. Rothenfusser, O. Viale, S. Kock, S. Ferrone, D. Fradelizi, G. Klein, L. Moretta, H. G. Rammensee, T. Boon, P. Coulie, P. van der Bruggen. 1997. Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human Vγ9/Vδ2 T cells in tumor immunity. *Eur J Immunol*. 27: 3368-79.

51. Testi, R., L. L. Lanier. 1989. Functional expression of CD28 on T cell antigen receptor γδ-bearing T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 19: 185-8.

52. Battistini, L., G. Borsellino, G. Sawicki, F. Poccia, M. Salvetti, G. Ristori, C. F. Brosnan. 1997. Phenotypic and Cytokine Analysis Of Human Peripheral Blood γδ T Cells Expressing Nk Cell Receptors. *Journal of Immunology*. 159: 3723-3730

53. Poccia, F., B. Cipriani, S. Vendetti, V. Colizzi, Y. Poquet, L. Battistini, M. Lopez-Botet, J. J. Fournie, M. L. Gougeon. 1997. CD94/NKG2 inhibitory receptor complex modulates both anti-viral and anti-tumoral responses of polyclonal phosphoantigen-reactive Vγ9Vδ2 T lymphocytes. *J Immunol*. 159: 6009-17.

54. Rovere, P., E. Clementi, M. Ferrarini, S. Heltai, C. Sciorati, M. G. Sabbadini, C. Rugarli, A. A. Manfredi. 1996. CD95 engagement releases calcium from intracellular stores of long term activated, apoptosis-prone γδ T cells. *J Immunol*. 156: 4631-7

55. Ferrarini, M., E. Ferrero, L. Dagna, A. Poggi, M. R. Zocchi. 2002. Human γδ T cells: a nonredundant system in the immune-surveillance against cancer. *Trends Immunol*. 23: 14-8.

56. Glatzel, A., D. Wesch, F. Schiemann, E. Brandt, O. Janssen, D. Kabelitz. 2002. Patterns of Chemokine Receptor Expression on Peripheral Blood gammaδ T Lymphocytes: Strong Expression of CCR5 Is a Selective Feature of Vδ2/Vγ9 γδ T Cells. *J Immunol*. 168: 4920-9.

57. Behr-Perst, S. I., M. E. Munk, T. Schaberg, T. Ulrichs, R. J. Schulz, S. H. Kaufmann. 1999. Phenotypically activated γδ T lymphocytes in the peripheral blood of patients with tuberculosis. *J Infect Dis*. 180: 141-9.

58. Lafont, V., J. Liautard, J. P. Liautard, J. Favero. 2001. Production of TNF-alpha by human Vγ9Vδ2 T cells via engagement of FcγRIIIA, the low affinity type 3 receptor for the Fc portion of IgG, expressed upon TCR activation by nonpeptidic antigen. *J Immunol*. 166: 7190-9.

59. Wesch, D., S. Marx, D. Kabelitz. 1997. Comparative analysis of αβ and γδ T cell activation by Mycobacterium tuberculosis and isopentenyl pyrophosphate. *Eur J Immunol*. 27: 952-6.

60. Gioia, C., C. Agrati, R. Casetti, C. Cairo, G. Borsellino, L. Battistini, G. Mancino, D. Goletti, V. Colizzi, L. P. Pucillo, F. Poccia. 2002. Lack of CD27-CD45RA-Vγ9Vδ2+ T cell effectors in immunocompromised hosts and during active pulmonary tuberculosis. *J Immunol*. 168: 1484-9.

61. Biswas, P., P. Rovere, C. D. Filippi, S. Heltai, C. Smith, L. Dagna, G. Poli, A. A. Manfredi, M. Ferrarini. 2000. Engagement of CD30 shapes the secretion of cytokines by human γδ T cells. *Eur J Immunol*. 30: 2172-2180

62. Munk, M. E., P. Kern, S. H. Kaufmann. 1997. Human $CD30^+$ cells are induced by Mycobacterium tuberculosis and present in tuberculosis lesions. *Int Immunol*. 9: 713-20.

63. De Paoli, P., D. Gennari, P. Martelli, V. Cavarzerani, R. Comoretto, G. Santini. 1990. γδ T cell receptor-bearing lymphocytes during Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis*. 161: 1013-6

64. Horner, A. A., H. Jabara, N. Ramesh, R. S. Geha. 1995. γδ T lymphocytes express CD40 ligand and induce isotype switching in B lymphocytes. *J Exp Med*. 181: 1239-44.

65. Mincheva-Nilsson, L., S. Hammarstrom, M. L. Hammarstrom. 1997. Activated human γδ T lymphocytes express functional lactoferrin receptors. *Scand J Immunol*. 46: 609-18.

66. Li, B., H. Bassiri, M. D. Rossman, P. Kramer, A. F. Eyuboglu, M. Torres, E. Sada, T. Imir, S. R. Carding. 1998. Involvement of the Fas/Fas ligand pathway in activation-induced cell death of mycobacteria-reactive human γδ T cells: a mechanism for the loss of γδ T cells in patients with pulmonary tuberculosis. *J Immunol*. 161: 1558-67.

67. Ferrini, S., D. Zarcone, M. Viale, G. Cerruti, R. Millo, A. Moretta, C. E. Grossi. 1989. Morphologic and functional characterization of human peripheral blood T cells expressing the T cell receptor γδ. *Eur J Immunol*. 19: 1183-8

68. Fisch, P., M. Malkovsky, E. Braakman, E. Sturm, R. L. Bolhuis, A. Prieve, J. A. Sosman, V. A. Lam, P. M. Sondel. 1990. γδ T cell clones and natural killer cell clones mediate distinct patterns of non-major histocompatibility complex-restricted cytolysis. *J. Exp. Med.* 171: 1567-1579

69. Morita, C. T., S. Verma, P. Aparicio, C. Martinez, H. Spits, M. B. Brenner. 1991. Functionally distinct subsets of human γδ T cells. *Eur J Immunol*. 21: 2999-3007

70. Hayday, A., E. Theodoridis, E. Ramsburg, J. Shires. 2001. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol*. 2: 997-1003.

71. Ferrick, D. A., R. K. Braun, H. D. Lepper, M. D. Schrenzel. 1996 γδ T cells in bacterial infections. *Res Immunol*. 147: 532-41.

72. Lang, F., M. A. Peyrat, P. Constant, F. Davodeau, J. David-Ameline, Y. Poquet, H. Vie, J. J. Fournie, M. Bonneville. 1995. Early activation of human Vγ9Vδ2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *J Immunol*. 154: 5986-94.

73. Boullier, S., Y. Poquet, T. Debord, J. J. Fournie, M. L. Gougeon. 1999. Regulation by cytokines (IL-12, IL-15, IL-4 and IL-10) of the Vγ9Vδ2 T cell response to mycobacterial phosphoantigens in responder and anergic HIV-infected persons. *Eur J Immunol*. 29: 90-9.

74. Poccia, F., L. Battistini, B. Cipriani, G. Mancino, F. Martini, M. L. Gougeon, V. Colizzi. 1999. Phosphoantigen-reactive Vγ9Vδ2 T lymphocytes suppress in vitro human immunodeficiency virus type 1 replication by cell-released antiviral factors including CC chemokines. *J Infect Dis*. 180: 858-61.

75. Cipriani, B., G. Borsellino, F. Poccia, R. Placido, D. Tramonti, S. Bach, L. Battistini, C. F. Brosnan. 2000. Activation of C-C beta-chemokines in human peripheral blood γδ T cells by isopentenyl pyrophosphate and regulation by cytokines. *Blood*. 95: 39-47.

76. Sireci, G., E. Champagne, J. J. Fournie, F. Dieli, A. Salerno. 1997. Patterns of phosphoantigen stimulation of human Vγ9Vδ2 T cell clones include Th0 cytokines. *Hum Immunol*. 58: 70-82.

77. Lahn, M., H. Kalataradi, P. Mittelstadt, E. Pflum, M. Vollmer, C. Cady, A. Mukasa, A. T. Vella, D. Ikle, R. Harbeck, R. O'Brien, W. Born. 1998. Early preferential stimulation of γδ T cells by TNF-alpha. *J Immunol*. 160: 5221-30.

78. Roth, S. J., T. G. Diacovo, M. B. Brenner, J. P. Rosat, J. Buccola, C. T. Morita, T. A. Springer. 1998. Transendothelial chemotaxis of human αβ and γδ T lymphocytes to chemokines. *Eur J Immunol*. 28: 104-13.

79. Carding, R., P. Egan. 2002. γδ T cells : functional plasticity and heterogeneity. *Nature reviews immunology*. 2: 336-45

80. Born, W., C. Cady, J. Jones-Carson, A. Mukasa, M. Lahn, R. O'Brien. 1999. Immunoregulatory functions of γδ T cells. *Adv Immunol*. 71: 77-144

81. Kaufmann, S. H. 1996. γδ and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 2272-9.

82. Wang, L., H. Das, A. Kamath, L. Li, J. F. Bukowski. 2002. Human Vγ2Vδ2 T Cells Augment Migration-Inhibitory Factor Secretion and Counteract the Inhibitory Effect of Glucocorticoids on IL- 1β and TNF-α Production. *J Immunol*. 168: 4889-96.

83. Grossman, Z., W. E. Paul. 1992. Adaptive cellular interactions in the immune system: the tunable activation threshold and the significance of subthreshold responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89: 10365-9.

84. Germain, R. N. 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*. 76: 287-99.

85. Morita, C. T., E. M. Beckman, J. F. Bukowski, Y. Tanaka, H. Band, B. R. Bloom, D. E. Golan, M. B. Brenner. 1995. Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human γδ T cells. *Immunity*. 3: 495-507.

86. Bahram, S., T. Spies. 1996. The MIC gene family. *Res Immunol*. 147: 328-33.

87. Groh, V., A. Steinle, S. Bauer, T. Spies. 1998. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial γδ T cells. *Science*. 279: 1737-40.

88. Groh, V., S. Bahram, S. Bauer, A. Herman, M. Beauchamp, T. Spies. 1996. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 12445-50.

89. Li, P., S. T. Willie, S. Bauer, D. L. Morris, T. Spies, R. K. Strong. 1999. Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a γδ T cell ligand. *Immunity*. 10: 577-84.

90. Weintraub, B. C., M. R. Jackson, S. M. Hedrick. 1994. γδ T cells can recognize nonclassical MHC in the absence of conventional antigenic peptides. *J Immunol*. 153: 3051-8.

91. Crowley, M. P., A. M. Fahrer, N. Baumgarth, J. Hampl, I. Gutgemann, L. Teyton, Y. Chien. 2000. A population of murine γδ T cells that recognize an inducible MHC class Ib molecule. *Science*. 287: 314-6.

92. Wingren, C., M. P. Crowley, M. Degano, Y. Chien, I. A. Wilson. 2000. Crystal structure of a γδ T cell receptor ligand T22: a truncated MHC-like fold. *Science*. 287: 310-4.

93. Li, P., D. L. Morris, B. E. Willcox, A. Steinle, T. Spies, R. K. Strong. 2001. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol*. 2: 443-51.

94. Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J. H. Phillips, L. L. Lanier, T. Spies. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 285: 727-9.

95. Das, H., V. Groh, C. Kuijl, M. Sugita, C. T. Morita, T. Spies, J. F. Bukowski. 2001. MICA engagement by human Vγ2Vδ2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity*. 15: 83-93.

96. Pardoll, D. M. 2001. Immunology. Stress, NK receptors, and immune surveillance. *Science*. 294: 534-6.

97. Vivier, E., E. Tomasello, P. Paul. 2002. Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Curr Opin Immunol*. 14: 306-11.

98. Park, S. H., Y. H. Chiu, J. Jayawardena, J. Roark, U. Kavita, A. Bendelac. 1998. Innate and adaptive functions of the CD1 pathway of antigen presentation. *Semin Immunol*. 10: 391-8.

99. Gumperz, J. E., M. B. Brenner. 2001. CD1-specific T cells in microbial immunity. *Curr Opin Immunol*. 13: 471-8.

100. Porcelli, S. A., R. L. Modlin. 1999. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol*. 17: 297-329

101. Faure, F., S. Jitsukawa, C. Miossec, T. Hercend. 1990. CD1c as a target recognition structure for human T lymphocytes: analysis with peripheral blood γδ cells. *Eur J Immunol*. 20: 703-6.

102. Porcelli, S., M. B. Brenner, J. L. Greenstein, S. P. Balk, C. Terhorst, P. A. Bleicher. 1989. Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4-CD8-cytolytic T lymphocytes. *Nature*. 341: 447-50.

103. Spada, F. M., E. P. Grant, P. J. Peters, M. Sugita, A. Melian, D. S. Leslie, H. K. Lee, E. van Donselaar, D. A. Hanson, A. M. Krensky, O. Majdic, S. A. Porcelli, C. T. Morita, M. B. Brenner. 2000. Self-recognition of CD1 by γδ T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med*. 191: 937-48.

104. Ciccone, E., O. Viale, D. Pende, M. Malnati, G. Battista Ferrara, S. Barocci, A. Moretta, L. Moretta. 1989. Specificity of human T lymphocytes expressing a γδ T cell antigen receptor. Recognition of a polymorphic determinant of HLA class I molecules by a γδ clone. *Eur J Immunol*. 19: 1267-71.

105. Spits, H., X. Paliard, V. H. Engelhard, J. E. de Vries. 1990. Cytotoxic activity and lymphokine production of T cell receptor (TCR)- αβ+ and TCR-γδ+ cytotoxic T lymphocyte (CTL) clones recognizing HLA-A2 and HLA-A2 mutants. Recognition of TCR-γδ+ CTL clones is affected by mutations at positions 152 and 156. *J Immunol*. 144: 4156-62.

106. Bosnes, V., E. Qvigstad, K. E. Lundin, E. Thorsby. 1990. Recognition of a particular HLA-DQ heterodimer by a human γδ T cell clone. *Eur J Immunol*. 20: 1429-33.

107. Flament, C., A. Benmerah, M. Bonneville, F. Triebel, F. Mami-Chouaib. 1994. Human TCR-γδ alloreactive response to HLA-DR molecules. Comparison with response of TCR-αβ. *J Immunol*. 153: 2890-904.

108. Kabelitz, D., A. Bender, S. Schondelmaier, M. L. da Silva Lobo, O. Janssen. 1990. Human cytotoxic lymphocytes. V. Frequency and specificity γδ+ cytotoxic lymphocyte precursors activated by allogeneic or autologous stimulator cells. *J Immunol*. 145: 2827-32.

109. Hampl, J., H. Schild, C. Litzenberger, M. Baron, M. P. Crowley, Y. H. Chien. 1999. The specificity of a weak γδ TCR interaction can be modulated by the glycosylation of the ligand. *J Immunol*. 163: 288-94.

110. Born, W., L. Hall, A. Dallas, J. Boymel, T. Shinnick, D. Young, P. Brennan, R. O'Brien. 1990. Recognition of a peptide antigen by heat shock--reactive γδ T lymphocytes. *Science*. 249: 67-9.

111. Fu, Y. X., R. Cranfill, M. Vollmer, R. Van Der Zee, R. L. O'Brien, W. Born. 1993. In vivo response of murine γδ T cells to a heat shock protein- derived peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 322-6.

112. O'Brien, R. L., Y. X. Fu, R. Cranfill, A. Dallas, C. Ellis, C. Reardon, J. Lang, S. R. Carding, R. Kubo, W. Born. 1992. Heat shock protein Hsp60-reactive γδ cells: a large, diversified T-lymphocyte subset with highly focused specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89: 4348-52.

113. Haregewoin, A., G. Soman, R. C. Hom, R. W. Finberg. 1989. γδ + T cells respond to mycobacterial heat-shock protein. *Nature*. 340: 309-12

114. Kabelitz, D., A. Bender, S. Schondelmaier, B. Schoel, S. H. Kaufmann. 1990. A large fraction of human peripheral blood γδ+ T cells is activated by Mycobacterium tuberculosis but not by its 65-kD heat shock protein. *J Exp Med*. 171: 667-79

115. Pfeffer, K., B. Schoel, H. Gulle, S. H. Kaufmann, H. Wagner. 1990. Primary responses of human T cells to mycobacteria: a frequent set of γδ T cells are stimulated by protease-resistant ligands. *Eur J Immunol*. 20: 1175-9

116. Constant, P., F. Davodeau, M. A. Peyrat, Y. Poquet, G. Puzo, M. Bonneville, J. J. Fournie. 1994. Stimulation of human γδ T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science*. 264: 267-70.

117. Poquet, Y., P. Constant, F. Halary, M. A. Peyrat, M. Gilleron, F. Davodeau, M. Bonneville, J. J. Fournie. 1996. A novel nucleotide-containing antigen for human blood γδ T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 26: 2344-9.

118. Belmant, C., E. Espinosa, R. Poupot, M. A. Peyrat, M. Guiraud, Y. Poquet, M. Bonneville, J. J. Fournie. 1999. 3-Formyl-1-butyl pyrophosphate A novel mycobacterial metabolite-activating human γδ T cells. *J Biol Chem*. 274: 32079-84.

119. Tanaka, Y., C. T. Morita, Y. Tanaka, E. Nieves, M. B. Brenner, B. R. Bloom. 1995. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human γδ T cells. *Nature*. 375: 155-8

120. Tanaka, Y., S. Sano, E. Nieves, G. De Libero, D. Rosa, R. L. Modlin, M. B. Brenner, B. R. Bloom, C. T. Morita. 1994. Nonpeptide ligands for human γδ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91: 8175-9

121. Belmant, C., E. Espinosa, F. Halary, Y. Tang, M. A. Peyrat, H. Sicard, A. Kozikowski, R. Buelow, R. Poupot, M. Bonneville, J. J. Fournie. 2000. A chemical basis for selective recognition of nonpeptide antigens by human γδ T cells. *Faseb J*. 14: 1669-70.

122. Hayday, A. C. 2000. γδ T cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol*. 18: 975-1026

123. Burk, M. R., L. Mori, G. De Libero. 1995. Human Vγ9Vδ2cells are stimulated in a cross-reactive fashion by a variety of phosphorylated metabolites. *Eur J Immunol*. 25: 2052-8.

124. Hintz, M., A. Reichenberg, B. Altincicek, U. Bahr, R. M. Gschwind, A. K. Kollas, E. Beck, J. Wiesner, M. Eberl, H. Jomaa. 2001. Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human γδ T cells in Escherichia coli. *FEBS Lett*. 509: 317-22.

125. Morita, C. T., H. K. Lee, H. Wang, H. Li, R. A. Mariuzza, Y. Tanaka. 2001. Structural features of nonpeptide prenyl pyrophosphates that determine their antigenicity for human γδ T cells. *J Immunol*. 167: 36-41.

126. Rohmer, M., M. Knani, P. Simonin, B. Sutter, H. Sahm. 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J*. 295: 517-24.

127. Altincicek, B., J. Moll, N. Campos, G. Foerster, E. Beck, J. F. Hoeffler, C. Grosdemange-Billiard, M. Rodriguez-Concepcion, M. Rohmer, A. Boronat, M. Eberl, H. Jomaa. 2001.

Cutting edge: human γδ T cells are activated by intermediates of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J Immunol*. 166: 3655-8.

128. Jomaa, H., J. Feurle, K. Luhs, V. Kunzmann, H. P. Tony, M. Herderich, M. Wilhelm. 1999. Vγ9/Vδ2 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: 371-8.
129. Sicard, H., J. J. Fournie. 2000. Metabolic routes as targets for immunological discrimination of host and parasite. *Infect Immun*. 68: 4375-7.
130. Morita, C. T., R. A. Mariuzza, M. B. Brenner. 2000. Antigen recognition by human γδ T cells: pattern recognition by the adaptive immune system. *Springer Semin Immunopathol*. 22: 191-217
131. Bukowski, J. F., C. T. Morita, M. B. Brenner. 1999. Human γδ T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implications for innate immunity. *Immunity*. 11: 57-65.
132. Kunzmann, V., E. Bauer, M. Wilhelm. 1999. γδ T-cell stimulation by pamidronate. *N Engl J Med*. 340: 737-8.
133. Kunzmann, V., E. Bauer, J. Feurle, F. Weissinger, H. P. Tony, M. Wilhelm. 2000. Stimulation of γδ T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood*. 96: 384-92.
134. Das, H., L. Wang, A. Kamath, J. F. Bukowski. 2001. Vγ9/Vδ2 T-cell receptor-mediated recognition of aminobisphosphonates. *Blood*. 98: 1616-8.
135. Miyagawa, F., Y. Tanaka, S. Yamashita, N. Minato. 2001. Essential requirement of antigen presentation by monocyte lineage cells for the activation of primary human γδ T cells by aminobisphosphonate antigen. *J Immunol*. 166: 5508-14.
136. Rust, C. J., F. Verreck, H. Vietor, F. Koning. 1990. Specific recognition of staphylococcal enterotoxin A by human T cells bearing receptors with the Vγ9 region. *Nature*. 346: 572-4
137. Rust, C., D. Orsini, Y. Kooy, F. Koning. 1993. Reactivity of human γδ T cells to staphylococcal enterotoxins: a restricted reaction pattern mediated by two distinct recognition pathways. *Scand J Immunol*. 38: 89-94
138. Loh, E. Y., M. Wang, J. Bartkowiak, R. Wiaderkiewicz, E. Hyjek, Z. Wang, D. Kozbor. 1994. Gene transfer studies of T cell receptor-γδ recognition. Specificity for staphylococcal enterotoxin A is conveyed by Vγ9 alone. *J Immunol*. 152: 3324-32
139. Morita, C. T., H. Li, J. G. Lamphear, R. R. Rich, J. D. Fraser, R. A. Mariuzza, H. K. Lee. 2001. Superantigen recognition by γδ T cells: SEA recognition site for human Vgamma2 T cell receptors. *Immunity*. 14: 331-44.
140. Fisch, P., M. Malkovsky, S. Kovats, E. Sturm, E. Braakman, B. S. Klein, S. D. Voss, L. W. Morrissey, R. De Mars, W. J. Welch, et al. 1990. Recognition by human Vγ9/Vδ2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science*. 250: 1269-73

141. Sturm, E., E. Braakman, P. Fisch, R. J. Vreugdenhil, P. Sondel, R. L. Bolhuis. 1990. Human Vγ9/Vδ2 T cell receptor-γδ lymphocytes show specificity to Daudi Burkitt's lymphoma cells. *J. Immunol*. 145: 3202-3208

142. Selin, L. K., S. Stewart, C. Shen, H. Q. Mao, J. A. Wilkins. 1992. Reactivity of γδ T cells induced by the tumour cell line RPMI 8226: functional heterogeneity of clonal populations and role of GroEL heat shock proteins. *Scand J Immunol*. 36: 107-17

143. Bosnes, V., R. Halvorsen, I. Skaftadottir, G. Gaudernack, E. Thorsby. 1989. Specificity of γδ receptor-bearing cytotoxic T lymphocytes isolated from human peripheral blood. *Scand J Immunol*. 29: 723-31.

144. L'Faqihi, F. E., M. Guiraud, N. Dastugue, P. Brousset, P. Le Bouteiller, F. Halary, M. Bonneville, J. J. Fournie, E. Champagne. 1999. Acquisition of a stimulatory activity for Vγ9/Vδ2 T cells by a Burkitt's lymphoma cell line without loss of HLA class I expression. *Hum Immunol*. 60: 928-38.

145. Kaur, I., J. de Jong, K. Schell, J. Hank, P. Fisch, P. M. Sondel. 1994. Human peripheral γδ T cells are stimulated by Daudi Burkitt's lymphoma and not by any other Burkitt's lymphoma tested. *Cell Immunol*. 156: 54-61.

146. Bank, I., M. Book, M. Huszar, Y. Baram, I. Schnirer, H. Brenner. 1993. Vδ2+ γδ 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.

147. Bukowski, J. F., C. T. Morita, M. B. Brenner. 1994. Recognition and destruction of virus-infected cells by human γδ CTL. *J Immunol*. 153: 5133-40

148. Hengel, H., U. H. Koszinowski. 1997. Interference with antigen processing by viruses. *Curr Opin Immunol*. 9: 470-6.

149. Brodsky, F. M. 1999. Stealth, sabotage and exploitation. *Immunol Rev*. 168: 5-11.

150. Bolhuis, R. L., E. Sturm, P. Fisch, P. M. Sondel, E. Braakman. 1990. Human γδ T lymphocyte subsets: activation by superantigens? *Res Immunol*. 141: 658-63.

151. Ohmen, J. D., P. F. Barnes, K. Uyemura, S. Z. Lu, C. L. Grisso, R. L. Modlin. 1991. The T cell receptors of human γδ T cells reactive to Mycobacterium tuberculosis are encoded by specific V genes but diverse V-J junctions. *J Immunol*. 147: 3353-9

152. Kersten, C. M., R. T. McCluskey, L. A. Boyle, J. T. Kurnick. 1996. Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa induce expansion of Vδ2 cells in adult peripheral blood, but of Vδ1 cells in cord blood. *J Immunol*. 157: 1613-9.

153. Holoshitz, J., N. C. Romzek, Y. Jia, L. Wagner, L. M. Vila, S. J. Chen, J. M. Wilson, D. R. Karp. 1993. MHC-independent presentation of mycobacteria to human γδ T cells. *Int Immunol*. 5: 1437-43.

154. Panchamoorthy, G., J. McLean, R. L. Modlin, C. T. Morita, S. Ishikawa, M. B. Brenner, H. Band. 1991. A predominance of the T cell receptor Vγ2/Vδ2 subset in human mycobacteria-responsive T cells suggests germline gene encoded recognition. *J Immunol*. 147: 3360-9

155. Kabelitz, D., A. Bender, T. Prospero, S. Wesselborg, O. Janssen, K. Pechhold. 1991. The primary response of human γδ+ T cells to Mycobacterium tuberculosis is restricted to Vγ9-bearing cells. *J Exp Med*. 173: 1331-8.

156. Davodeau, F., M. A. Peyrat, M. M. Hallet, J. Gaschet, I. Houde, R. Vivien, H. Vie, M. Bonneville. 1993. Close correlation between Daudi and mycobacterial antigen recognition by human γδ T cells and expression of V9JPC1 gamma/V2DJC δ-encoded T cell receptors. *J Immunol*. 151: 1214-23.

157. Bukowski, J. F., C. T. Morita, Y. Tanaka, B. R. Bloom, M. B. Brenner, H. Band. 1995. Vγ2Vδ2 TCR-dependent recognition of non-peptide antigens and Daudi cells analyzed by TCR gene transfer. *J Immunol*. 154: 998-1006.

158. Metzger, H. 1992. Transmembrane signaling: the joy of aggregation. *J Immunol*. 149: 1477-87.

159. Evans, P. S., P. J. Enders, C. Yin, T. J. Ruckwardt, M. Malkovsky, C. D. Pauza. 2001. In vitro stimulation with a non-peptidic alkylphosphate expands cells expressing Vγ2-Jγ1.2/Vδ2 T-cell receptors. *Immunology*. 104: 19-27.

160. Bukowski, J. F., C. T. Morita, H. Band, M. B. Brenner. 1998. Crucial role of TCR γ chain junctional region in prenyl pyrophosphate antigen recognition by γ δ T cells. *J Immunol*. 161: 286-93.

161. Miyagawa, F., Y. Tanaka, S. Yamashita, B. Mikami, K. Danno, M. Uehara, N. Minato. 2001. Essential contribution of germline-encoded lysine residues in Jγ1.2 segment to the recognition of nonpeptide antigens by human γδ T cells. *J Immunol*. 167: 6773-9.

162. Daubenberger, C. A., M. Salomon, W. Vecino, B. Hubner, H. Troll, R. Rodriques, M. E. Patarroyo, G. Pluschke. 2001. Functional and structural similarity of Vγ9Vδ2 T cells in humans and Aotus monkeys, a primate infection model for Plasmodium falciparum malaria. *J Immunol*. 167: 6421-30.

163. Weiss, A., D. R. Littman. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*. 76: 263-74.

164. Weiss, A. 1991. Molecular and genetic insights into T cell antigen receptor structure and function. *Annu Rev Genet*. 25: 487-510

165. Kane, L. P., J. Lin, A. Weiss. 2000. Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol*. 12: 242-9.

166. Acuto, O., D. Cantrell. 2000. T cell activation and the cytoskeleton. *Annu Rev Immunol*. 18: 165-84

167. Lafont, V., J. Liautard, M. Sable-Teychene, Y. Sainte-Marie, J. Favero. 2001. Isopentenyl pyrophosphate, a mycobacterial non-peptidic antigen, triggers delayed and highly sustained signaling in human γδ T lymphocytes without inducing eown-modulation of T cell antigen receptor. *J Biol Chem*. 276: 15961-7.

168. Lafont, V., J. Liautard, A. Gross, J. P. Liautard, J. Favero. 2000. Tumor necrosis factor-alpha production is differently regulated in γδ and alpha beta human T lymphocytes. *J Biol Chem*. 275: 19282-7.

169. Ugolini, S., E. Vivier. 2000. Regulation of T cell function by NK cell receptors for classical MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol*. 12: 295-300.

170. De Libero, G. 1999. Control of γδ T cells by NK receptors. *Microbes Infect*. 1: 263-7.

171. Rubio, G., J. Aramburu, J. Ontanon, M. Lopez-Botet, P. Aparicio. 1993. A novel functional cell surface dimer (kp43) serves as accessory molecule for the activation of a subset of human γδ T cells. *J Immunol*. 151: 1312-21.

172. Halary, F., M. A. Peyrat, E. Champagne, M. Lopez-Botet, A. Moretta, L. Moretta, H. Vie, J. J. Fournie, M. Bonneville. 1997. Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing γδ T cell receptors by natural killer inhibitory receptors. *Eur J Immunol*. 27: 2812-21.

173. Nakajima, H., H. Tomiyama, M. Takiguchi. 1995. Inhibition of γδ T cell recognition by receptors for MHC class I molecules. *J Immunol*. 155: 4139-42.

174. Poggi, A., M. R. Zocchi, P. Costa, E. Ferrero, G. Borsellino, R. Placido, S. Galgani, M. Salvetti, C. Gasperini, G. Ristori, C. F. Brosnan, L. Battistini. 1999. IL-12-mediated NKRP1A up-regulation and consequent enhancement of endothelial transmigration of Vδ2+ TCR γδ+ T lymphocytes from healthy donors and multiple sclerosis patients. *J Immunol*. 162: 4349-54.

175. Lanier, L. L. 1998. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*. 16: 359-93

176. Moretta, L., R. Biassoni, C. Bottino, M. C. Mingari, A. Moretta. 2000. Human NK-cell receptors. *Immunol Today*. 21: 420-2.

177. Vales-Gomez, M., H. Reyburn, J. Strominger. 2000. Interaction between the human NK receptors and their ligands. *Crit Rev Immunol*. 20: 223-44

178. Raulet, D. H., R. E. Vance, C. W. McMahon. 2001. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol*. 19: 291-330

179. Ljunggren, H. G., K. Karre. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 11: 237-44.

180. Olcese, L., P. Lang, F. Vely, A. Cambiaggi, D. Marguet, M. Blery, K. L. Hippen, R. Biassoni, A. Moretta, L. Moretta, J. C. Cambier, E. Vivier. 1996. Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases. *J Immunol*. 156: 4531-4.

181. Campbell, K. S., M. Dessing, M. Lopez-Botet, M. Cella, M. Colonna. 1996. Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C. *J Exp Med*. 184: 93-100.

182. Wu, J., Y. Song, A. B. Bakker, S. Bauer, T. Spies, L. L. Lanier, J. H. Phillips. 1999. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*. 285: 730-2.

183. Braud, V. M., D. S. Allan, C. A. O'Callaghan, K. Soderstrom, A. D'Andrea, G. S. Ogg, S. Lazetic, N. T. Young, J. I. Bell, J. H. Phillips, L. L. Lanier, A. J. McMichael. 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. 391: 795-9.

184. Watzl, C., E. O. Long. 2000. Exposing tumor cells to killer cell attack. *Nat Med*. 6: 867-8.

185. Boom, W. H., K. A. Chervenak, M. A. Mincek, J. J. Ellner. 1992. Role of the mononuclear phagocyte as an antigen-presenting cell for human γδ T cells activated by live Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*. 60: 3480-8.

186. Balaji, K. N., S. K. Schwander, E. A. Rich, W. H. Boom. 1995. Alveolar macrophages as accessory cells for human γ δ T cells activated by Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol*. 154: 5959-68.

187. Kato, Y., Y. Tanaka, F. Miyagawa, S. Yamashita, N. Minato. 2001. Targeting of tumor cells for human γδ T cells by nonpeptide antigens. *J Immunol*. 167: 5092-8.

188. De Libero, G. 2000. Tissue distribution, antigen specificity and effector functions of γδ T cells in human diseases. *Springer Semin Immunopathol*. 22: 219-38

189. Medzhitov, R., C. A. Janeway, Jr. 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 296: 298-300.

190. Janeway, C. A., Jr., K. Bottomly. 1994. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell*. 76: 275-85.

191. Holoshitz, J., F. Koning, J. E. Coligan, J. De Bruyn, S. Strober. 1989. Isolation of CD4- CD8- mycobacteria-reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid. *Nature*. 339: 226-9

192. Li, B., M. D. Rossman, T. Imir, A. F. Oner-Eyuboglu, C. W. Lee, R. Biancaniello, S. R. Carding. 1996. Disease-specific changes in γδ T cell repertoire and function in patients with pulmonary tuberculosis. *J Immunol*. 157: 4222-9.

193. Kroca, M., A. Johansson, A. Sjostedt, A. Tarnvik. 2001. Vγ9Vδ2 T cells in human legionellosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 8: 949-54.

194. Sumida, T., T. Maeda, H. Takahashi, S. Yoshida, F. Yonaha, A. Sakamoto, H. Tomioka, T. Koike, S. Yoshida. 1992. Predominant expansion of Vγ9/Vδ2 T cells in a tularemia patient. *Infect Immun*. 60: 2554-8

195. Poquet, Y., M. Kroca, F. Halary, S. Stenmark, M. A. Peyrat, M. Bonneville, J. J. Fournie, A. Sjostedt. 1998. Expansion of Vγ9Vδ2 T cells is triggered by Francisella tularensis-derived phosphoantigens in tularemia but not after tularemia vaccination. *Infect Immun*. 66: 2107-14.

196. Hara, T., Y. Mizuno, K. Takaki, H. Takada, H. Akeda, T. Aoki, M. Nagata, K. Ueda, G. Matsuzaki, Y. Yoshikai, et al. 1992. Predominant activation and expansion of Vγ9-bearing γ δ T cells in vivo as well as in vitro in Salmonella infection. *J Clin Invest*. 90: 204-10.

197. Raziuddin, S., N. A. Mir, M. e.-H. el-Awad, A. W. Telmesani, M. al-Janadi. 1994. γδ T lymphocytes and proinflammatory cytokines in bacterial meningitis. *J Allergy Clin Immunol*. 93: 793-8

198. Jouenbeades, F., E. Paris, C. Dieulois, J. F. Lemeland, V. Barredezelus, S. Marret, G. Humbert, J. Leroy, F. Tron. 1997. In Vivo and In Vitro Activation and Expansion Of γδ T Cells During Listeria Monocytogenes Infection In Humans. *Infection & Immunity*. 65: 4267-4272

199. Bertotto, A., R. Gerli, F. Spinozzi, C. Muscat, F. Scalise, G. Castellucci, M. Sposito, F. Candio, R. Vaccaro. 1993. Lymphocytes bearing the γδ T cell receptor in acute Brucella melitensis infection. *Eur J Immunol*. 23: 1177-80

200. Schneider, T., H. U. Jahn, O. Liesenfeld, D. Steinhoff, E. O. Riecken, M. Zeitz, R. Ullrich. 1997. The Number and Proportion Of Vγ9Vδ2 T Cells Rise Significantly In the Peripheral Blood Of Patients After the Onset Of Acute Coxiella Burnetii Infection. *Clinical Infectious Diseases*. 24: 261-264

201. Ho, M., H. K. Webster, P. Tongtawe, K. Pattanapanyasat, W. P. Weidanz. 1990. Increased γδ T cells in acute Plasmodium falciparum malaria. *Immunol Lett*. 25: 139-41

202. Russo, D. M., R. J. Armitage, M. Barral-Netto, A. Barral, K. H. Grabstein, S. G. Reed. 1993. Antigen-reactive γδ T cells in human leishmaniasis. *J Immunol*. 151: 3712-8

203. Scalise, F., R. Gerli, G. Castellucci, F. Spinozzi, G. M. Fabietti, S. Crupi, L. Sensi, R. Britta, R. Vaccaro, A. Bertotto. 1992. Lymphocytes bearing the γδ T-cell receptor in acute toxoplasmosis. *Immunology*. 76: 668-70

204. De Maria, A., A. Ferrazin, S. Ferrini, E. Ciccone, A. Terragna, L. Moretta. 1992. Selective increase of a subset of T cell receptor γδ T lymphocytes in the peripheral blood of patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis*. 165: 917-9.

205. Wallace, M., M. Malkovsky, S. R. Carding. 1995. γδ T lymphocytes in viral infections. *J Leukoc Biol*. 58: 277-83.

206. De Libero, G. 1997. Sentinel function of broadly reactive human γδ T cells. *Immunol Today*. 18: 22-6.

207. Dieli, F., M. Troye-Blomberg, J. Ivanyi, J. J. Fournie, M. Bonneville, M. A. Peyrat, G. Sireci, A. Salerno. 2000. Vγ9/Vδ2 T lymphocytes reduce the viability of intracellular Mycobacterium tuberculosis. *Eur J Immunol*. 30: 1512-9.

208. Young, J. L., J. C. Goodall, H. Beacocksharp, J. S. H. Gaston. 1997. Human γδ T-Cell Recognition Of Yersinia Enterocolitica. *Immunology*. 91: 503-510

209. Behr, C., R. Poupot, M. A. Peyrat, Y. Poquet, P. Constant, P. Dubois, M. Bonneville, J. J. Fournie. 1996. Plasmodium falciparum stimuli for human γδ T cells are related to phosphorylated antigens of mycobacteria. *Infect Immun*. 64: 2892-6

210. Julia, M. R., P. Serra, N. Matamoros, S. Raga, P. Martinez. 1998. Small cytoplasmic antigens from Pseudomonas aeruginosa stimulate γδ T lymphocytes. *Scand J Immunol*. 48: 672-8.

211. Feurle, J., E. Espinosa, S. Eckstein, F. Pont, V. Kunzmann, J. J. Fournie, M. Herderich, M. Wilhelm. 2002. Escherichia coli produces phosphoantigens activating human γδ T cells. *J Biol Chem*. 277: 148-54.

212. Russell, D. G. 2001. Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2: 569-77.

213. Kaufmann, S. H. 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Rev Immunol*. 1: 20-30.

214. Shen, Y., D. Zhou, L. Qiu, X. Lai, M. Simon, L. Shen, Z. Kou, Q. Wang, L. Jiang, J. Estep, R. Hunt, M. Clagett, P. K. Sehgal, Y. Li, X. Zeng, C. T. Morita, M. B. Brenner, N. L. Letvin, Z. W. Chen. 2002. Adaptive immune response of Vγ2Vδ2+ T cells during mycobacterial infections. *Science*. 295: 2255-8.

215. Stenger, S., D. A. Hanson, R. Teitelbaum, P. Dewan, K. R. Niazi, C. J. Froelich, T. Ganz, S. Thoma-Uszynski, A. Melian, C. Bogdan, S. A. Porcelli, B. R. Bloom, A. M. Krensky, R. L. Modlin. 1998. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*. 282: 121-5.

216. Langermans, J. A., P. Andersen, D. van Soolingen, R. A. Vervenne, P. A. Frost, T. van der Laan, L. A. van Pinxteren, J. van den Hombergh, S. Kroon, I. Peekel, S. Florquin, A. W. Thomas. 2001. Divergent effect of bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccination on Mycobacterium tuberculosis infection in highly related macaque species: implications for primate models in tuberculosis vaccine research. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 11497-502.

217. Lens, S. M., K. Tesselaar, M. H. van Oers, R. A. van Lier. 1998. Control of lymphocyte function through CD27-CD70 interactions. *Semin Immunol*. 10: 491-9.

218. Hamann, D., P. A. Baars, M. H. Rep, B. Hooibrink, S. R. Kerkhof-Garde, M. R. Klein, R. A. van Lier. 1997. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med*. 186: 1407-18.

219. Appay, V., P. R. Dunbar, M. Callan, P. Klenerman, G. M. Gillespie, L. Papagno, G. S. Ogg, A. King, F. Lechner, C. A. Spina, S. Little, D. V. Havlir, D. D. Richman, N. Gruener, G. Pape, A. Waters, P. Easterbrook, M. Salio, V. Cerundolo, A. J. McMichael, S. L. Rowland-Jones. 2002. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med*. 8: 379-85.

220. Sanchez, F. O., J. I. Rodriguez, G. Agudelo, L. F. Garcia. 1994. Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls. *Infect Immun*. 62: 5673-8

221. Rojas, R. E., K. N. Balaji, A. Subramanian, W. H. Boom. 1999. Regulation of human CD4(+) alphabeta T-cell-receptor-positive (TCR(+)) and γδ TCR(+) T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis by interleukin-10 and transforming growth factor beta. *Infect Immun*. 67: 6461-72.

222. Hoft, D. F., R. M. Brown, S. T. Roodman. 1998. Bacille Calmette-Guerin vaccination enhances human γδ T cell responsiveness to mycobacteria suggestive of a memory-like phenotype. *J Immunol*. 161: 1045-54.

223. Wang, L., H. Das, A. Kamath, J. F. Bukowski. 2001. Human Vγ2Vδ2 T cells produce IFN-γ and TNF-alpha with an on/off/on cycling pattern in response to live bacterial products. *J Immunol*. 167: 6195-201.

224. Ottones, F., J. Dornand, A. Naroeni, J. P. Liautard, J. Favero. 2000. Vγ9Vδ2 T cells impair intracellular multiplication of Brucella suis in autologous monocytes through soluble factor release and contact-dependent cytotoxic effect. *J Immunol*. 165: 7133-9.

225. Wang, L., A. Kamath, H. Das, L. Li, J. F. Bukowski. 2001. Antibacterial effect of human Vγ2Vδ2 T cells in vivo. *J Clin Invest*. 108: 1349-57.

226. Dechanet, J., P. Merville, V. Pitard, X. Lafarge, J. F. Moreau. 1999. Human γδ T cells and viruses. *Microbes Infect*. 1: 213-7.

227. Hinz, T., D. Wesch, K. Friese, A. Reckziegel, B. Arden, D. Kabelitz. 1994. T cell receptor γδ repertoire in HIV-1-infected individuals. *Eur J Immunol*. 24: 3044-9.

228. Poccia, F., S. Boullier, H. Lecoeur, M. Cochet, Y. Poquet, V. Colizzi, J. J. Fournie, M. L. Gougeon. 1996. Peripheral Vγ9/Vδ2 T cell deletion and anergy to nonpeptidic mycobacterial antigens in asymptomatic HIV-1-infected persons. *J Immunol*. 157: 449-61.

229. Agostini, C., R. Zambello, L. Trentin, A. Cerutti, P. Bulian, C. Crivellaro, A. Cipriani, G. Semenzato. 1994. Γ δ T cell receptor subsets in the lung of patients with HIV-1 infection. *Cell Immunol*. 153: 194-205.

230. Wallace, M., S. R. Bartz, W. L. Chang, D. A. Mackenzie, C. D. Pauza, M. Malkovsky. 1996. γδ T lymphocyte responses to HIV. *Clin Exp Immunol*. 103: 177-84.

231. Cocchi, F., A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, S. K. Arya, R. C. Gallo, P. Lusso. 1995. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*. 270: 1811-5.

232. Zocchi, M. R., M. Ferrarini, C. Rugarli. 1990. Selective lysis of the autologous tumor by δ TCS1+ γ/δ+ tumor-infiltrating lymphocytes from human lung carcinomas. *Eur J Immunol*. 20: 2685-9

233. Ferrarini, M., S. Heltai, S. M. Pupa, S. Mernard, R. Zocchi. 1996. Killing of laminin receptor-positive human lung cancers by tumor infiltrating lymphocytes bearing γδ(+) t-cell receptors. *J Natl Cancer Inst*. 88: 436-41

234. Groh, V., R. Rhinehart, H. Secrist, S. Bauer, K. H. Grabstein, T. Spies. 1999. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived γδ T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 6879-84.

235. Zocchi, M. R., M. Ferrarini, N. Migone, G. Casorati. 1994. T-cell receptor V δ gene usage by tumour reactive γδ T lymphocytes infiltrating human lung cancer. *Immunology*. 81: 234-9

236. Choudhary, A., F. Davodeau, A. Moreau, M. A. Peyrat, M. Bonneville, F. Jotereau. 1995. Selective lysis of autologous tumor cells by recurrent γδ tumor-infiltrating lymphocytes from renal carcinoma. *J Immunol*. 154: 3932-40

237. Maeurer, M. J., D. Martin, W. Walter, K. Liu, L. Zitvogel, K. Halusczcak, H. Rabinowich, R. Duquesnoy, W. Storkus, M. T. Lotze. 1996. Human intestinal Vδ1+ lymphocytes recognize tumor cells of epithelial origin. *J Exp Med*. 183: 1681-96

238. Lamb, L. S., Jr., P. Musk, Z. Ye, F. van Rhee, S. S. Geier, J. J. Tong, K. M. King, P. J. Henslee-Downey. 2001. Human γδ(+) T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response. *Bone Marrow Transplant*. 27: 601-6.

239. Kobayashi, H., Y. Tanaka, J. Yagi, H. Toma, T. Uchiyama. 2001. γδ T cells provide innate immunity against renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 50: 115-24.

240. Zhao, X., Y. Q. Wei, Y. Kariya, K. Teshigawara, A. Uchida. 1995. Accumulation of γ/δ T cells in human dysgerminoma and seminoma: roles in autologous tumor killing and granuloma formation. *Immunol Invest*. 24: 607-18.

241. Malkovska, V., F. Cigel, B. E. Storer. 1994. Human T cells in hu-PBL-SCID mice proliferate in response to Daudi lymphoma and confer anti-tumour immunity. *Clin Exp Immunol*. 96: 158-65

242. Malkovska, V., F. K. Cigel, N. Armstrong, B. E. Storer, R. Hong. 1992. Antilymphoma activity of human γδ T-cells in mice with severe combined immune deficiency. *Cancer Res*. 52: 5610-6

243. Mokuno, Y., T. Matsuguchi, M. Takano, H. Nishimura, J. Washizu, T. Ogawa, O. Takeuchi, S. Akira, Y. Nimura, Y. Yoshikai. 2000. Expression of toll-like receptor 2 on γ δ T cells bearing invariant Vγ6/Vδ1 induced by Escherichia coli infection in mice. *J Immunol*. 165: 931-40.

244. Underhill, D. M., A. Ozinsky. 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol*. 14: 103-10.

245. Pechhold, K., D. Wesch, S. Schondelmaier, D. Kabelitz. 1994. Primary activation of Vγ9-expressing γδ T cells by Mycobacterium tuberculosis. Requirement for Th1-type CD4 T cell help and inhibition by IL-10. *J Immunol*. 152: 4984-92

246. Burns, J., B. Bartholomew, S. Lobo. 1996. Induction of Vγ2Vδ2 T cell proliferation by activated antigen-specific CD4+ T cells and IL-2. *Clin Immunol Immunopathol*. 80: 38-46.

247. Marx, S., D. Wesch, D. Kabelitz. 1997. Activation Of Human γδ T Cells By Mycobacterium Tuberculosis and Daudi Lymphoma Cells - Differential Regulatory Effect Of Il-10 and Il-12. *Journal of Immunology*. 158: 2842-2848

248. Tsukaguchi, K., K. N. Balaji, W. H. Boom. 1995. CD4+ alpha beta T cell and γδ T cell responses to Mycobacterium tuberculosis. Similarities and differences in Ag recognition, cytotoxic effector function, and cytokine production. *J Immunol*. 154: 1780-96

249. Mosmann, T. R., S. Sad. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*. 17: 138-46.

250. Garcia, V. E., P. A. Sieling, J. Gong, P. F. Barnes, K. Uyemura, Y. Tanaka, B. R. Bloom, C. T. Morita, R. L. Modlin. 1997. Single-cell cytokine analysis of γδ T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens. *J Immunol*. 159: 1328-35.

251. Wesch, D., A. Glatzel, D. Kabelitz. 2001. Differentiation of resting human peripheral blood γδ T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cell Immunol*. 212: 110-7.

252. Garcia, V. E., D. Jullien, M. Song, K. Uyemura, K. Shuai, C. T. Morita, R. L. Modlin. 1998. IL-15 enhances the response of human γδ T cells to nonpeptide [correction of nonpetide] microbial antigens. *J Immunol*. 160: 4322-9.

253. Rothenfusser, S., V. Hornung, A. Krug, A. Towarowski, A. M. Krieg, S. Endres, G. Hartmann. 2001. Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human γδ T cells via interferon-alpha/-beta. *Eur J Immunol*. 31: 3525-34.

254. Luster, A. D. 2002. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*. 14: 129-35.
255. Gan, Y. H., M. Wallace, M. Malkovsky. 2001. Fas-dependent, activation-induced cell death of γδ cells. *J Biol Regul Homeost Agents*. 15: 277-85.
256. Mundle, S. D., A. Raza. 2002. Defining the dynamics of self-assembled Fas-receptor activation. *Trends Immunol*. 23: 187-94.
257. Sciorati, C., P. Rovere, M. Ferrarini, S. Heltai, A. A. Manfredi, E. Clementi. 1997. Autocrine nitric oxide modulates CD95-induced apoptosis in γδ T lymphocytes. *J Biol Chem*. 272: 23211-5.
258. Carding, S. R., P. J. Egan. 2000. The importance of γδ T cells in the resolution of pathogen-induced inflammatory immune responses. *Immunol Rev*. 173: 98-108.
259. Paul, W. E., R. A. Seder. 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. 76: 241-51.
260. Wulfing, C., M. D. Sjaastad, M. M. Davis. 1998. Visualizing the dynamics of T cell activation: intracellular adhesion molecule 1 migrates rapidly to the T cell/B cell interface and acts to sustain calcium levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 6302-7.
261. Dustin, M. L., M. W. Olszowy, A. D. Holdorf, J. Li, S. Bromley, N. Desai, P. Widder, F. Rosenberger, P. A. van der Merwe, P. M. Allen, A. S. Shaw. 1998. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell*. 94: 667-77.
262. Monks, C. R., B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, A. Kupfer. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*. 395: 82-6.
263. Potter, T. A., K. Grebe, B. Freiberg, A. Kupfer. 2001. Formation of supramolecular activation clusters on fresh ex vivo CD8+ T cells after engagement of the T cell antigen receptor and CD8 by antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 12624-9.
264. Stinchcombe, J. C., G. Bossi, S. Booth, G. M. Griffiths. 2001. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity*. 15: 751-61.
265. Krummel, M. F., M. M. Davis. 2002. Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Curr Opin Immunol*. 14: 66-74.
266. Dustin, M. L., P. M. Allen, A. S. Shaw. 2001. Environmental control of immunological synapse formation and duration. *Trends Immunol*. 22: 192-4.
267. Serrador, J. M., M. Nieto, F. Sanchez-Madrid. 1999. Cytoskeletal rearrangement during migration and activation of T lymphocytes. *Trends Cell Biol*. 9: 228-33.
268. Delon, J., R. N. Germain. 2000. Information transfer at the immunological synapse. *Curr Biol*. 10: R923-33.
269. Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, M. L. Dustin. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*. 285: 221-7.
270. Shaw, A. S. 2001. FERMing up the synapse. *Immunity*. 15: 683-6.
271. Kuhn, J. R., M. Poenie. 2002. Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL- mediated killing. *Immunity*. 16: 111-21.

272. Bi, K., Y. Tanaka, N. Coudronniere, K. Sugie, S. Hong, M. J. van Stipdonk, A. Altman. 2001. Antigen-induced translocation of PKC-theta to membrane rafts is required for T cell activation. *Nat Immunol*. 2: 556-63.

273. Egen, J. G., J. P. Allison. 2002. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity*. 16: 23-35.

274. Vyas, Y. M., H. Maniar, B. Dupont. 2002. Cutting edge: differential segregation of the SRC homology 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 within the early NK cell immune synapse distinguishes noncytolytic from cytolytic interactions. *J Immunol*. 168: 3150-4.

275. Davis, D. M., I. Chiu, M. Fassett, G. B. Cohen, O. Mandelboim, J. L. Strominger. 1999. The human natural killer cell immune synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 15062-7.

276. Fassett, M. S., D. M. Davis, M. M. Valter, G. B. Cohen, J. L. Strominger. 2001. Signaling at the inhibitory natural killer cell immune synapse regulates lipid raft polarization but not class I MHC clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 14547-52.

277. Lou, Z., D. Jevremovic, D. D. Billadeau, P. J. Leibson. 2000. A balance between positive and negative signals in cytotoxic lymphocytes regulates the polarization of lipid rafts during the development of cell-mediated killing. *J Exp Med*. 191: 347-54.

278. Davis, S. J., P. A. van der Merwe. 2001. The immunological synapse: required for T cell receptor signalling or directing T cell effector function? *Curr Biol*. 11: R289-91.

279. Huang, J. F., Y. Yang, H. Sepulveda, W. Shi, I. Hwang, P. A. Peterson, M. R. Jackson, J. Sprent, Z. Cai. 1999. TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells. *Science*. 286: 952-4.

280. Hwang, I., J. F. Huang, H. Kishimoto, A. Brunmark, P. A. Peterson, M. R. Jackson, C. D. Surh, Z. Cai, J. Sprent. 2000. T cells can use either T cell receptor or CD28 receptors to absorb and internalize cell surface molecules derived from antigen-presenting cells. *J Exp Med*. 191: 1137-48.

281. Hwang, I., J. Sprent. 2001. Role of the actin cytoskeleton in T cell absorption and internalization of ligands from APC. *J Immunol*. 166: 5099-107.

282. Hudrisier, D., J. Riond, H. Mazarguil, J. E. Gairin, E. Joly. 2001. Cutting edge: CTLs rapidly capture membrane fragments from target cells in a TCR signaling-dependent manner. *J Immunol*. 166: 3645-9.

283. Sjostrom, A., M. Eriksson, C. Cerboni, M. H. Johansson, C. L. Sentman, K. Karre, P. Hoglund. 2001. Acquisition of external major histocompatibility complex class I molecules by natural killer cells expressing inhibitory Ly49 receptors. *J Exp Med*. 194: 1519-30.

284. Carlin, L. M., K. Eleme, F. E. McCann, D. M. Davis. 2001. Intercellular transfer and supramolecular organization of human leukocyte antigen C at inhibitory natural killer cell immune synapses. *J Exp Med*. 194: 1507-17.

285. Batista, F. D., M. S. Neuberger. 2000. B cells extract and present immobilized antigen: implications for affinity discrimination. *Embo J*. 19: 513-20.

286. Batista, F. D., D. Iber, M. S. Neuberger. 2001. B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature*. 411: 489-94.

287. Hudrisier, D., P. Bongrand. 2002. Intercellular transfer of antigen-presenting cell determinants onto T cells: molecular mechanisms and biological significance. *Faseb J*. 16: 477-86.

288. Kagi, D., F. Vignaux, B. Ledermann, K. Burki, V. Depraetere, S. Nagata, H. Hengartner, P. Golstein. 1994. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*. 265: 528-30.

289. Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, R. M. Zinkernagel, H. Hengartner. 1996. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol*. 14: 207-32

290. Froelich, C. J., V. M. Dixit, X. Yang. 1998. Lymphocyte granule-mediated apoptosis: matters of viral mimicry and deadly proteases. *Immunol Today*. 19: 30-6.

291. Metkar, S. S., B. Wang, M. Aguilar-Santelises, S. M. Raja, L. Uhlin-Hansen, E. Podack, J. A. Trapani, C. J. Froelich. 2002. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B- serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity*. 16: 417-28.

292. Nakata, M., M. J. Smyth, Y. Norihisa, A. Kawasaki, Y. Shinkai, K. Okumura, H. Yagita. 1990. Constitutive expression of pore-forming protein in peripheral blood γ/δ T cells: implication for their cytotoxic role in vivo. *J Exp Med*. 172: 1877-80.

293. Sayers, T. J., A. D. Brooks, J. M. Ward, T. Hoshino, W. E. Bere, G. W. Wiegand, J. M. Kelley, M. J. Smyth. 2001. The restricted expression of granzyme M in human lymphocytes. *J Immunol*. 166: 765-71.

294. Beresford, P. J., Z. Xia, A. H. Greenberg, J. Lieberman. 1999. Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity*. 10: 585-94.

295. Darmon, A. J., D. W. Nicholson, R. C. Bleackley. 1995. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature*. 377: 446-8.

296. Pena, S. V., D. A. Hanson, B. A. Carr, T. J. Goralski, A. M. Krensky. 1997. Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *J Immunol*. 158: 2680-8.

297. Stenger, S., J. P. Rosat, B. R. Bloom, A. M. Krensky, R. L. Modlin. 1999. Granulysin: a lethal weapon of cytolytic T cells. *Immunol Today*. 20: 390-4. 00001449 00001449

298. Dieli, F., M. Troye-Blomberg, J. Ivanyi, J. J. Fournie, A. M. Krensky, M. Bonneville, M. A. Peyrat, N. Caccamo, G. Sireci, A. Salerno. 2001. Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vγ9/Vδ2 T lymphocytes. *J Infect Dis*. 184: 1082-5.

299. Wagner, L., O. O. Yang, E. A. Garcia-Zepeda, Y. Ge, S. A. Kalams, B. D. Walker, M. S. Pasternack, A. D. Luster. 1998. Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature*. 391: 908-11.

300. Galvin, J. P., L. H. Spaeny-Dekking, B. Wang, P. Seth, C. E. Hack, C. J. Froelich. 1999. Apoptosis induced by granzyme B-glycosaminoglycan complexes: implications for granule-mediated apoptosis in vivo. *J Immunol*. 162: 5345-50.

301. Trapani, J. A., J. Davis, V. R. Sutton, M. J. Smyth. 2000. Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. *Curr Opin Immunol*. 12: 323-9.

302. Siegel, R. M., F. K. Chan, H. J. Chun, M. J. Lenardo. 2000. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol*. 1: 469-74.

303. Nagata, S., P. Golstein. 1995. The Fas death factor. *Science*. 267: 1449-56.

304. Suda, T., T. Takahashi, P. Golstein, S. Nagata. 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*. 75: 1169-78.

305. Ju, S. T., D. J. Panka, H. Cui, R. Ettinger, M. el-Khatib, D. H. Sherr, B. Z. Stanger, A. Marshak-Rothstein. 1995. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T- cell activation. *Nature*. 373: 444-8.

306. Boullier, S., Y. Poquet, F. Halary, M. Bonneville, J. J. Fournie, M. L. Gougeon. 1998. Phosphoantigen activation induces surface translocation of intracellular CD94/NKG2A class I receptor on CD94- peripheral Vγ9Vδ2 T cells but not on CD94- thymic or mature $\gamma\delta$ T cell clones. *Eur J Immunol*. 28: 3399-410.

307. Ugolini, S., C. Arpin, N. Anfossi, T. Walzer, A. Cambiaggi, R. Forster, M. Lipp, R. E. Toes, C. J. Melief, J. Marvel, E. Vivier. 2001. Involvement of inhibitory NKRs in the survival of a subset of memory- phenotype CD8+ T cells. *Nat Immunol*. 2: 430-5.

308. Anfossi, N., V. Pascal, E. Vivier, S. Ugolini. 2001. Biology of T memory type 1 cells. *Immunol Rev*. 181: 269-78.

309. Carena, I., A. Shamshiev, A. Donda, M. Colonna, G. D. Libero. 1997. Major histocompatibility complex class I molecules modulate activation threshold and early signaling of T cell antigen receptor-γ/δ stimulated by nonpeptidic ligands. *J Exp Med*. 186: 1769-74.

310. Poccia, F., M. Malkovsky, M. L. Gougeon, M. Bonneville, M. Lopez-Botet, J. J. Fournie, V. Colizzi. 1997. $\Gamma\delta$ T cell activation or anergy during infections: the role of nonpeptidic TCR ligands and HLA class I molecules. *J Leukoc Biol*. 62: 287-91.

311. den Haan, J. M., M. J. Bevan. 2001. Antigen presentation to CD8+ T cells: cross-priming in infectious diseases. *Curr Opin Immunol*. 13: 437-41.

312. Heath, W. R., F. R. Carbone. 2001. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 19: 47-64

313. Carbone, F. R., C. Kurts, S. R. Bennett, J. F. Miller, W. R. Heath. 1998. Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol Today*. 19: 368-73.

314. Halary, F., J. J. Fournie, M. Bonneville. 1999. Activation and control of self-reactive $\gamma\delta$ T cells. *Microbes Infect*. 1: 247-53.

315. Burk, M. R., I. Carena, A. Donda, F. Mariani, L. Mori, G. De Libero. 1997. Functional inactivation in the whole population of human Vγ9/Vδ2 T lymphocytes induced by a nonpeptidic antagonist. *J Exp Med*. 185: 91-7.

316. Valitutti, S., S. Muller, M. Cella, E. Padovan, A. Lanzavecchia. 1995. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature*. 375: 148-51.
317. Hemmer, B., I. Stefanova, M. Vergelli, R. N. Germain, R. Martin. 1998. Relationships among TCR ligand potency, thresholds for effector function elicitation, and the quality of early signaling events in human T cells. *J Immunol*. 160: 5807-14.
318. Matzinger, P. 1998. An innate sense of danger. *Semin Immunol*. 10: 399-415.
319. Matzinger, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 296: 301-5.
320. Vance, R. E. 2000. Cutting edge: cutting edge commentary: a Copernican revolution? Doubts about the danger theory. *J Immunol*. 165: 1725-8.
321. Anagnostou, F., C. Plas, N. Forest. 1996. Ecto-alkaline phosphatase considered as levamisole-sensitive phosphohydrolase at physiological pH range during mineralization in cultured fetal calvaria cells. *J Cell Biochem*. 60: 484-94.
322. Oda, K., Y. Amaya, M. Fukushi-Irie, Y. Kinameri, K. Ohsuye, I. Kubota, S. Fujimura, J. Kobayashi. 1999. A general method for rapid purification of soluble versions of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins expressed in insect cells: an application for human tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *J Biochem (Tokyo)*. 126: 694-9.
323. Millan, J. L., W. H. Fishman. 1995. Biology of human alkaline phosphatases with special reference to cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 32: 1-39
324. Van Belle, H. 1976. Alkaline phosphatase. I. Kinetics and inhibition by levamisole of purified isoenzymes from humans. *Clin Chem*. 22: 972-6.
325. Goding, J. W., M. C. Howard. 1998. Ecto-enzymes of lymphoid cells. *Immunol Rev*. 161: 5-10.
326. McConnell, H. M., J. C. Owicki, J. W. Parce, D. L. Miller, G. T. Baxter, H. G. Wada, S. Pitchford. 1992. The cytosensor microphysiometer: biological applications of silicon technology. *Science*. 257: 1906-12.
327. Hafner, F. 2000. Cytosensor Microphysiometer: technology and recent applications. *Biosens Bioelectron*. 15: 149-58.