



HAL
open science

Rôle des nectines dans la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T $\gamma\delta$

Benoît Dessarthe

► **To cite this version:**

Benoît Dessarthe. Rôle des nectines dans la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T $\gamma\delta$. Cancer. Université Rennes 1, 2012. Français. NNT: . tel-00795222

HAL Id: tel-00795222

<https://theses.hal.science/tel-00795222>

Submitted on 27 Feb 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNÉE 2012



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : (Biologie et sciences de la santé)

Ecole doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

Benoît Dessarthe

Préparée à l'unité de recherche U991, Equipe 4
INSERM U 991, Foie Métabolismes et Cancer
Université de Rennes 1

présentée par

Benoît Dessarthe

Préparée à l'unité de recherche U991, Equipe 4
INSERM U 991, Foie Métabolismes et Cancer
Université de Rennes 1

**Rôle des nectines
dans la
reconnaissance des
cellules tumorales
par les lymphocytes
T $\gamma\delta$**

**Thèse soutenue à Rennes
le 18 décembre 2012**

devant le jury composé de :

Dr Jean-Jacques Fournié (rapporteur)
DR1, INSERM U1037, Université de Toulouse III

Dr Emmanuel Scotet (rapporteur)
DR1, INSERM U892, Université de Nantes

Dr Marie-Thérèse Boitrel (Examinateur)
DR1, SERAIC, Université de Rennes 1

Pr Véronique Catros (Directeur de thèse)
PU-PH, CHU de Rennes, Université de Rennes 1

Dr Olivier Toutirais (co-directeur de thèse)
MCU-PH, CHRU de Caen, Université de Caen
Basse Normandie

-REMERCIEMENTS-

Je remercie le Docteur Jean-Jacques Fournié et le Docteur Emmanuel Scotet d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse. Votre présence est un honneur pour moi.

Je remercie le Docteur Marie-Thérèse Boitrel d'avoir accepté d'être examinateur et de juger ces travaux de thèse. Un grand merci pour le soutien apporté à ces travaux de recherche sur la nécrose régulée.

Je remercie le Professeur Véronique Catros de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir fait découvrir le monde des lymphocytes T $\gamma\delta$. Si je suis arrivé jusqu'ici c'est aussi grâce à votre confiance et votre soutien et je vous en remercie du fond du cœur.

Je remercie le Docteur Olivier Toutirais pour son soutien, sa gentillesse et toutes ses connaissances scientifiques qu'il m'a fait partager. La distance n'aidait pas et pourtant tu as toujours su m'apporter ton aide quand j'en avais besoin. Un grand merci pour tout.

Je remercie le Docteur Aurélie Thedrez pour sa patience, son dévouement et son encadrement technique. Tu m'as appris la rigueur scientifique, la cytométrie et tant de choses durant ces trois années de thèse. Travailler à tes côtés aura été fort enrichissant.

Je remercie le Docteur Florian Cabillic pour sa gentillesse, son aide et sa disponibilité. Tes conseils m'ont toujours été fort bénéfiques.

Je remercie Cécile Thomas De la Pintièrre, Pascale Danièle et Maïté Ferrand pour leur gentillesse, leur sympathie, leur patience et pour l'aide technique que vous m'avez apportée. Travailler à vos côtés fut très agréable et plaisant.

Je tiens à remercier le Docteur Mireille Dugast et le Docteur Frédéric Mourcin pour leur patience, leur sympathie et leur soutien technique.

Je remercie le Docteur Claire Piquet-Pellorce pour son aide en tant que tutrice et sa gentillesse.

Je remercie Fabienne Nicolas et Renée Havouis pour leur compagnie et leur sympathie.

Un grand merci à l'équipe de cytogénétique et de biologie cellulaire du CHU Pontchaillou de Rennes pour leur accueil chaleureux.

Un grand merci à Vincent Lavoué et Thomas Gicquel, compagnons de thèse, pour leur sympathie et les bons moments passés ensemble.

Je remercie l'ensemble du personnel de l'unité INSERM U991 Foie, Métabolisme et Cancer.

Un grand merci à mes parents, mes grands-parents, et à mes frères.

-ABRÉVIATIONS-

3-MA	: 3-méthyladénine
ABP	: aminobisphosphonate
Ac	: anticorps
ACE	: antigène carcinoembryonnaire
ADAM17	: A disintegrin and metalloproteinase domain 17
ADCC	: antibody dependent cell cytotoxicity
ADN	: acide desoxyribonucléique
Ag	: antigène
AICD	: activation inducing cell death
AIF	: apoptosis inducing factor
AJ	: adherens junction
AMPc	: adénosine monophosphate cyclique
APC	: antigen-presenting cell
Apo-A1	: apolipoprotéine A1
ARN	: acide ribonucléique
AS	: adenosine triphosphate
ATG	: autophagy related protein
ATL	: adult T-cell leukemia
BrHPP	: bromohydrine pyrophosphate
BTN	: butyrophyline
CMH	: complexe majeur d'histocompatibilité
CRTAM	: Class-I restricted T cell associated molecule
DAMP	: danger-associated molecular pattern
DC	: dendritic cell
DCC	: deleted in colorectal cancer
DECT	: dendritic epidermal cell T
DIABLO	: direct IAP binding <i>protein</i> with low pl
DISC	: death-inducing signaling complex
DMAPP	: diméthylallyl pyrophosphate
DN	: double negative
DNAM-1	: DNAX accessory molecule-1
DP	: double positif
EPCR	: endothelial protein C receptor
EGFR	: epidermal growth factor receptor
FADD	: Fas-associated protein with death domain
Fc	: fragment cristalisable
FH	: follicular helper
FLIP	: FLICE-inhibitory protein
FPPS	: farnésyl pyrophosphate
GFP	: green fluorescent protein
HIV-1	: human immunodeficient virus 1
HLA	: human leukocyte antigen

HMBPP : 4-hydroxy-3-méthyl-but-enyl-pyrophosphate
HMG-coA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
HTRA2 : high temperature requirement protein A2
IAP : inhibitor of apoptosis
IDO : indoleamine 2,3 dioxygenase
IFN- γ : interféron- γ
Ig : immunoglobuline
IGSF4 : immunoglobulin superfamily 4
IL : interleukine
IPP : isopentenylpyrophosphate
IQGAP1 : IQ-motif-containing GTPase-activating protein-1
ISP : immature simple positif
ITIM : immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
JAM : junctional adhesion molecule
KO : knock out
LC3 : light chain 3
LPS : lipopolysaccharide
MAGUK : membrane-associated guanylate kinase
MDSC : myeloid-derived suppressor cells
MEP : méthylérythritol phosphate
MICA : MHC class I polypeptide-related sequence A
MICB : MHC class I polypeptide-related sequence B
MIF : macrophage migration inhibitory factor
MOMP : mitochondrial outer membrane permeabilization
MSC : mesenchymal stem cells
Necl : Nectin-like protein
NK : natural killer
NKR : natural killer receptor
NSCLC : non-small-cell lung carcinoma
PAg : phosphoantigène
PAMP : Pathogen-associated molecular pattern
PBMC : peripheral blood mononuclear cell
PDGF : platelet-derived growth factor
PD-L1 : programmed death ligand 1
PDZ : PSD95 Dlg1 Zo-1 domain
PGE2 : prostaglandine E2
PI-3k : phosphatidylinositol 3-kinase
PKA : protéine kinase A
PVR : poliovirus receptor
RAG-2 : recombination activating gene-2
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
SP : simple positif
SQSTM1 : sequestosome 1
SSCP : single strand conformation polymorphism
TACE : tumor necrosis factor- α -converting enzyme
TCR : T cell receptor
TGF- β : transforming growth factor beta

TIL	: Tumor infiltrating lymphocyte
TLR	: toll-like receptor
TM	: transmembranaire
TNF- α	: tumor necrosis factor- α
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
T-reg	: T-regulatory
TLSC1	: tumor suppressing lung cancer 1
UNCB	: unc-5 homolog B
UV	: ultraviolet
VEGF	: vascular endothelial growth factor
YAC	: yeast artificial chromosome
Zol	: zoledronate

-LISTE DES FIGURES-

Introduction

Figure 1 : Les trois phases de l'immunoediting.	14
Figure 2 : Stratégies d'échappement et d'action anti-tumorale envers les lymphocytes T $\gamma\delta$	18
Figure 3 : Diversité des récepteurs T et B chez la souris.	21
Figure 4 : Les stades de différenciation des cellules T.	22
Figure 5 : Modèle d'intensité du signal Notch et de synergie entre le signal Notch et le signal TCR... ..	24
Figure 6 : Voie de biosynthèse du mévalonate et du MEP.....	29
Figure 7 : Voie du mévalonate et étapes en aval de la biosynthèse des isoprénoïdes.	30
Figure 8 : Rôle de la CD227/butyrophiline-3A dans l'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2.	34
Figure 9 : Phénotypes et caractéristiques fonctionnelles principales des sous-populations de lymphocytes T V γ 9V δ 2.	35
Figure 10 : La synapse immunologique entre un lymphocyte T V γ 9V δ 2 et une cellule tumorale.....	38
Figure 11 : Régulation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 de profil Th17 (T γ δ 17).....	40
Figure 12 : Orientation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 vers un profil donné en fonction de l'environnement cytokinique..	42
Figure 13 : Impact des interactions entre une cellule NK, un lymphocyte T V γ 9V δ 2 et une cellule tumorale.	45
Figure 14 : Modèle mécanistique de la trogocytose entre lymphocytes et APC.	50
Figure 15 : Les différents mécanismes d'échange intercellulaire de protéines.....	51
Figure 16 : Structure moléculaire et mode d'interaction des nectines et des necls. D'après Takai, Myoshi <i>et al</i> (127).....	55
Figure 17 : Réorganisation dynamique du cytosquelette lors de la formation de jonctions adhérentes	57
Figure 18 : Signalisation intracellulaire induite par les nectines pendant (a) et après (b) la formation de jonctions adhérentes.....	59

Figure 19 : Représentation schématique de la protéine Necl-2..	64
Figure 20 : Double rôle de Necl-2 dans l'oncogenèse humaine.....	69
Figure 21 : Structure de CRTAM.....	71
Figure 22 : Classification par homologie de séquence en acides aminés de protéines appartenant à la super-famille des immunoglobulines.....	72
Figure 23 : L'apoptose intrinsèque.....	78
Figure 24 : Apoptose extrinsèque..	80
Figure 25 : Processus de formation de l'autophagosome.....	81
Figure 26 : La mort cellulaire par autophagie.	82
Figure 27 : Necroptose/nécrose régulée.....	85

Travail personnel : Résultat complémentaire

Figure 28 : Dosage de CRTAM dans les surnageants de culture... ..	130
Figure 29 : Trogocytose des cellules tumorales par les lymphocytes T V γ 9V δ 2.....	132
Figure 30 : Mobilisation du CD107 par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 après contact avec une cible tumorale.....	133
Figure 31 : Effet-dose de la wortmannine sur la mort médié par CRTAM.....	134
Figure 32 : Coloration des lysosomes/autolysosomes à l'acridine orange.	135
Figure 33 : Impact de CRTAM/Necl-2 sur la dépolarisation de la membrane mitochondriale.....	136
Figure 34 : Impact de l'interaction CRTAM/Necl-2 sur la survie des cellules NK.	137
Figure 35 : Expression de Necl-2-eGFP par les cellules Daudi transfectées.....	138
Figure 36 : Analyse au microscope confocal.	139

-LISTE DES TABLEAUX-

Tableau 1 : Expansion des lymphocytes T $\gamma\delta$ en réponse à l'infection.	28
Tableau 2 : Capacité cytotoxique et/ou à infiltrer le tissu tumoral des lymphocytes T V γ 9V δ 2 en fonction du type de cancer.	43
Tableau 3 : Sélection des essais cliniques visant à évaluer la sécurité et l'efficacité des transferts adoptifs de lymphocytes T V γ 9V δ 2 (immunothérapie passive) ou l'administration de molécules stimulatrices (immunothérapie active).	46
Tableau 4 : Anticorps monoclonaux approuvés pour être utilisés en thérapeutique.	48
Tableau 5 : Membres de la famille des nectines et des necls et leurs principales fonctions.....	53
Tableau 6 : Méthylation du promoteur des gènes <i>TLSC1/IGSF4</i> et <i>DAL-1/4.1B</i> du cancer du poumon humain non à petites cellules.	65
Tableau 7 : Inactivation du gène <i>TSLC1</i> dans les cancers chez l'homme.	67
Tableau 8 : Classification fonctionnelle des modes de mort cellulaire régulée.....	76

-TABLE DES MATIÈRES-

I. Introduction	12
I.1. Cancer et immunité	12
I.1.1. L'immuno-surveillance des cancers	12
I.1.2. L'échappement tumoral	13
I.2. Les lymphocytes T $\gamma\delta$	19
I.2.1. Les caractéristiques générales	19
I.2.1.1. Le TCR $\gamma\delta$	20
I.2.1.2. L'ontogénie des lymphocytes T $\gamma\delta$	22
I.2.2. Les sous-populations des lymphocytes T $\gamma\delta$ chez l'homme	25
I.2.3. Lymphocytes T V γ 9V δ 2	27
I.2.3.1. Mécanisme d'activation par les phosphoantigènes.....	27
I.2.3.1.1. Biosynthèse des phosphoantigènes	27
I.2.3.1.2. Base moléculaire de la reconnaissance des phosphoantigènes par les lymphocytes T V γ 9V δ 2	31
I.2.3.2. Les différents phénotypes de lymphocytes T V γ 9V δ 2	35
I.2.3.3. Interaction des lymphocytes T V γ 9V δ 2 avec les cellules tumorales.....	37
I.2.3.3.1. Synapse immunologique	37
I.2.3.3.2. Capacité de cytolyse et de sécrétion des lymphocytes T V γ 9V δ 2.....	39
I.2.4. Intérêt des lymphocytes T V γ 9V δ 2 en immunothérapie des cancers.....	42
I.2.4.1. Immuno-surveillance des tumeurs par les lymphocytes T V γ 9V δ 2	42
I.2.4.2. Intervention des lymphocytes T V γ 9V δ 2 en immunothérapie des cancers.....	45
I.2.4.2.1. L'immunothérapie active par les lymphocytes T V γ 9V δ 2	46
I.2.4.2.2. L'immunothérapie passive par les lymphocytes T V γ 9V δ 2	47
I.2.4.2.3. Perspectives pour améliorer l'immunothérapie basée sur les lymphocytes T V γ 9V δ 2	47
I.3. Transferts membranaires et échanges intercellulaires de protéines.....	49
I.4. Les nectines et les molécules de type nectine (nectin-like)	53
I.4.1. Généralités et structures.....	53
I.4.1.1. Les membres de la famille des nectines et molécules nectin-like	53

I.4.1.2. Structure et partenaires moléculaires.....	54
I.4.1.3. Rôle dans l'adhérence cellulaire.....	56
I.4.1.3.1. Formation des jonctions adhérentes (AJs) par les nectines et les cadhérines.....	56
I.4.1.3.2. La signalisation intracellulaire induite par les nectines.....	58
I.4.1.4. Les fonctions des principales nectines et necls.....	60
I.4.1.4.1. Fonction de Nectine- 2	60
I.4.1.4.2. Fonction de Nectine-3	60
I.4.1.4.3. Fonction de Nectine-4	61
I.4.1.4.4. Fonction de Necl-1	61
I.4.1.4.5. Fonction de Necl-5	62
I.4.2. Necl-2.....	63
I.4.2.1. Structure de Necl-2	63
I.4.2.2. Circonstance de la découverte de Necl-2.....	65
I.4.2.3. Dualité du rôle de Necl-2 dans l'oncogenèse.....	66
I.4.2.3.1. Effet suppresseur de tumeur.....	66
I.4.2.3.2. Effet pro-oncogénique de Necl-2	69
I.4.3. CRTAM.....	70
I.4.3.1. Structure.....	70
I.4.3.2. Interaction de CRTAM avec son ligand Necl-2	72
I.5. La mort cellulaire programmée.....	75
I.5.1. Généralités sur la mort cellulaire	75
I.5.2. L'apoptose	76
I.5.2.1. L'apoptose intrinsèque.....	77
I.5.2.2. L'apoptose extrinsèque.....	79
I.5.3. La mort autophagique	81
I.5.4. La nécrose régulée ou nécroptose	83
I.5.5. Le rôle de la mort cellulaire dans l'échappement tumoral	85
II. Travail personnel.....	88
II.1. Objectifs du travail de thèse.....	88
II.1.1. CRTAM receptor engagement by Necl-2 on tumor cell triggers cell death of activated Vγ9Vδ2T cells.....	90

II.1.2. Annexe de l'article de thèse	127
II.2. Études complémentaires.....	128
II.2.1. Matériels et méthodes.....	128
II.2.1.1. Dosage ELISA de CRTAM dans les surnageants de culture.....	128
II.2.1.2. Trogocytose des cellules tumorales par les lymphocytes T V γ 9V δ 2.....	128
II.2.1.3. Mesure de la mort des cellules NK induit par l'interaction CRTAM/Necl-2.....	128
II.2.1.4. Mobilisation de CD107	129
II.2.1.5. Coloration des mitochondries au DIOC6.....	129
II.2.1.6. Construction de la lignée Daudi Necl-2-eGFP	129
II.2.2. Résultats	130
II.2.2.1. Dosage de CRTAM soluble dans les surnageants de culture de lymphocytes T V γ 9V δ 2.....	130
II.2.2.2. Trogocytose des cellules tumorales par les lymphocytes T V γ 9V δ 2.....	131
II.2.2.3. L'interaction CRTAM/Necl-2 ne modifie pas les fonctions effectrices des lymphocytes T V γ 9V δ 2	132
II.2.2.4. Effet-dose de la wortmannine sur la mort induite par l'interaction CRTAM/Necl-2	133
II.2.2.5. L'interaction CRTAM/Necl-2 induit de l'autophagie dans les lymphocytes T V γ 9V δ 2... ..	134
II.2.2.6. L'interaction CRTAM-Necl-2 n'augmente pas la perméabilisation des mitochondries dans les lymphocytes T V γ 9V δ 2.....	135
II.2.2.7. Impact de l'interaction CRTAM/Necl-2 sur la survie des cellules NK.....	136
II.2.2.8. Etude de l'expression de CRTAM au microscope confocal	137
III. CONCLUSION-DISCUSSION	141
IV. BIBLIOGRAPHIE.....	152

I. Introduction

I.1. Cancer et immunité

Le cancer est l'une des premières causes de mortalité non accidentelle dans les pays industrialisés. Son origine est multifactorielle. On distingue les facteurs génétiques, héréditaires, et les facteurs environnementaux tels que les rayonnements (UV, rayonnements ionisants), les virus oncogènes et les produits toxiques (polluants, alcool, tabac). Pour se défendre contre les dommages occasionnés à l'ADN, la cellule dispose de mécanismes de réparation tel que le système de réparation des mésappariements. Si les dégâts sont trop importants, la cellule déclenche un programme d'apoptose, qui permet son élimination.

Chez l'homme, le système immunitaire est capable de reconnaître et d'éliminer les cellules tumorales. Les sujets immunodéprimés sont plus fréquemment atteints de cancer. Chez les patients atteints du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise), l'incidence de la maladie de Kaposi, de lymphomes malin non hodgkiniens et de cancer du col de l'utérus est plus élevée. De même, les patients transplantés, consommant des immunosuppresseurs pour éviter un rejet de greffe, ont un risque augmenté de développer un cancer par rapport à la population générale. Par ailleurs, les personnes âgées, dont le système immunitaire est altéré, ont un risque plus élevé d'être confrontées à cette maladie.

I.1.1. L'immuno-surveillance des cancers

C'est au début du XX^{ème} siècle que Paul Ehrlich a énoncé la théorie de l'immunosurveillance des cancers qui reconnaît au système immunitaire un rôle majeur dans la reconnaissance des tumeurs (1). Au début des années 70, cette théorie est reprise par Frank Macfarlane Burnet et Lewis Thomas qui considéraient que les tumeurs étaient immunogènes. Leur hypothèse était que les cellules du système immunitaire reconnaîtraient et élimineraient les cellules néoplasiques avant même la formation de la tumeur (1). Plusieurs observations sont en accord avec cette théorie. En effet, des expériences dans des

modèles animaux démontrent que des tumeurs, induites par des virus ou des produits chimiques, sont éliminées après transplantation dans un hôte préalablement immunisé avec des cellules irradiées issues de ces tumeurs (2). Cette reconnaissance fait intervenir des cellules effectrices telles que les lymphocytes T et les cellules NK. Ces observations sont confirmées par certains modèles de souris Knock-Out pour les gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Par exemple, l'équipe de Schreiber a réalisé des travaux avec des souris déficientes pour le gène RAG-2 (recombination activating gene-2) impliqué dans le réarrangement des gènes des immunoglobulines et des récepteurs des lymphocytes T (TCR) (3). Dans ces souris déficientes en lymphocytes, ils ont observé une augmentation de l'incidence des cancers spontanés. Les sarcomes, induits par un facteur carcinogène, sont plus fréquents chez les souris RAG-2^{-/-} et se développent plus rapidement en comparaison avec des souris sauvages (4). D'autres études, menées chez la souris, ont montré que la déficience en cellule NK (souris beige) ou en lymphocytes T $\gamma\delta$ entraîne une plus forte susceptibilité à la formation de tumeurs (5, 6).

Il y a maintenant une multitude d'arguments pour montrer que le système immunitaire joue un rôle dans la lutte contre les cellules tumorales par l'intermédiaire de cellules effectrices de l'immunité innée et/ou adaptative. La limite de ces études expérimentales tient au fait que les tumeurs ont été obtenues à l'aide de puissants carcinogènes et ne sont pas véritablement comparables avec celles obtenues spontanément.

I.1.2. L'échappement tumoral

Les travaux du groupe de Schreiber ont permis d'établir un modèle décrivant les différentes étapes du processus d'immunosurveillance. Ce modèle dit de l'« immunoediting » est divisé en trois phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (Figure 1). Lors de la phase d'élimination, les cellules tumorales les plus immunogènes sont éliminées par les cellules effectrices du système immunitaire. Tout d'abord, les cellules tumorales, surexprimant des molécules de stress, sont reconnues et lysées par des effecteurs du système immunitaire inné comme les cellules NK et les lymphocytes T $\gamma\delta$. Puis, les cellules dendritiques récupèrent des antigènes (Ag) issus de la dégradation des cellules

tumorales et les présentent aux lymphocytes T $\alpha\beta$ de l'immunité adaptative. Les lymphocytes T $\alpha\beta$ spécifiques de ces Ags de tumeur s'activent, se différencient, prolifèrent et migrent vers la tumeur pour l'éliminer. Cependant, dans certains cas, l'éradication n'est pas totale et certaines cellules tumorales peu ou non immunogènes peuvent se développer pendant une phase de latence correspondant à l'équilibre. C'est la plus longue des trois phases. Elle peut durer plusieurs années. Il a été estimé que le temps entre l'exposition à un carcinogène et la détection clinique de la tumeur peut être de vingt ans pour certaines tumeurs (7).

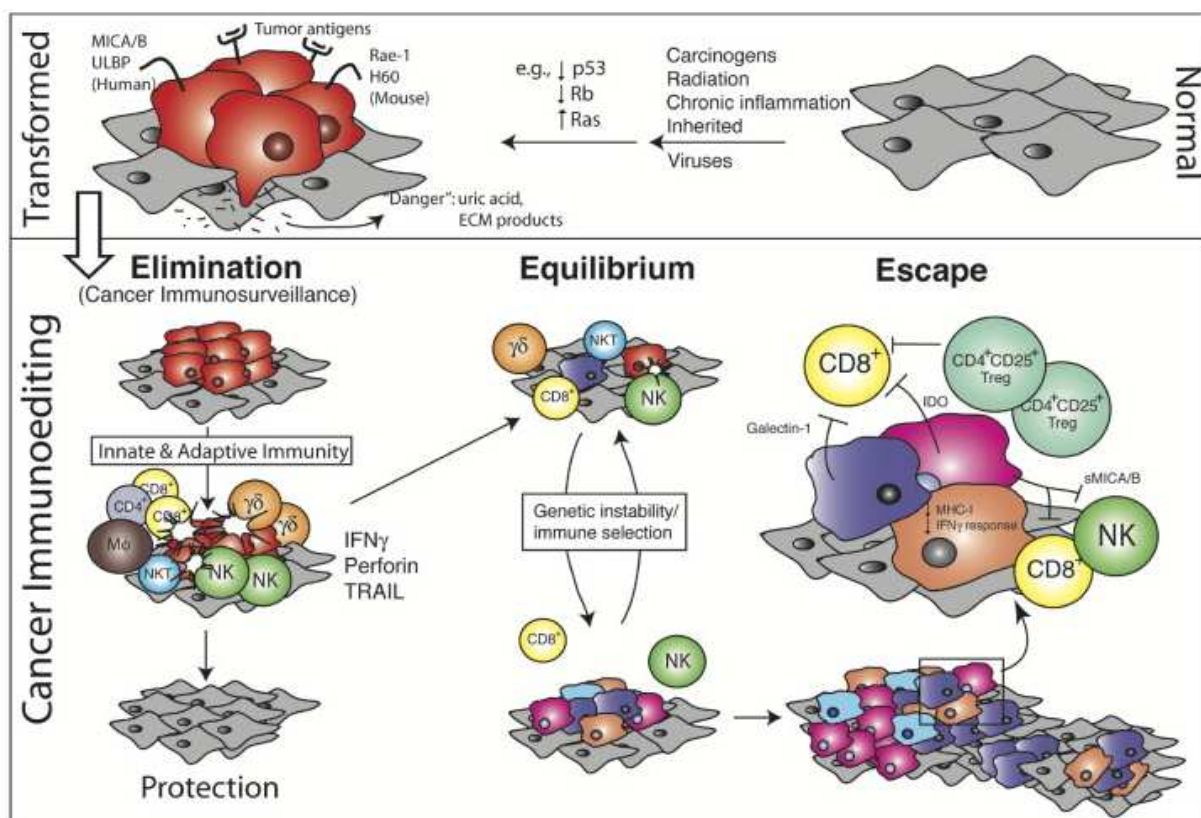


Figure 1 : Les trois phases de l'immunoediting. D'après Dunn *et al.* (1).

La phase d'équilibre est caractérisée par l'élimination des cellules tumorales en parallèle de l'apparition de nouveaux variants porteurs de nouvelles mutations leur conférant une résistance aux cellules effectrices. Cette caractéristique est due à une forte instabilité du génome des cellules tumorales liée à trois mécanismes : l'instabilité de la réparation par excision de nucléotide, l'instabilité des microsatellites, et l'instabilité

chromosomique (8). Cette dernière est prédominante et est associée à la perte de chromosome et de gènes. Cette phase est suivie par l'échappement tumoral.

Lors de la phase d'échappement, les cellules tumorales prolifèrent et ne sont plus reconnues par le système immunitaire. Afin d'échapper à la réponse immunitaire anti-tumorale, les cellules cancéreuses ont développé de nombreuses stratégies (Figure 2) :

La résistance à l'apoptose. L'apoptose est un mécanisme de mort contrôlé permettant de maintenir l'homéostasie de l'organisme. Les molécules Fas-L/CD95-L et TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) sont des protéines qui lient des récepteurs de mort cellulaire et qui sont impliquées dans la surveillance immunitaire des tumeurs. Ces récepteurs possèdent des séquences intracytoplasmiques responsables de la transmission de signaux apoptotiques. L'interaction Fas/Fas-L active une cascade de caspases impliquant la caspase 8. Certaines tumeurs expriment un inhibiteur de la caspase 8 comme FLIP (FLICE-inhibitory protein) ce qui leur confère une résistance à l'apoptose induite par Fas-L (9). L'activité de TRAIL est également inhibée par les cellules tumorales après la perte d'expression de protéines impliquées dans la cascade de caspases telles que le récepteur de TRAIL et la caspase-8 (10). Dans certains cancers, tels que les lymphomes folliculaires, les cellules tumorales résistent à l'apoptose en surexprimant la molécule anti-apoptotique Bcl-2 (11). De la même manière, il a été décrit que les cellules peuvent sous-exprimer MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A), un marqueur de reconnaissance des cellules tumorales qui est le ligand du récepteur NK (natural killer) activateur NKG2D (12).

La diminution de l'expression des molécules de co-activation. Le premier signal de la réponse anti-tumorale adaptative est la reconnaissance de l'Ag exprimé à la surface des cellules tumorales par le TCR des lymphocytes T $\alpha\beta$. Cependant, un second signal est nécessaire pour activer ces lymphocytes. Il est médié par l'interaction entre la molécule B7, exprimée par la cellule tumorale, et la molécule CD28 exprimée par le lymphocyte. La sous-expression de B7 par les cellules tumorales conduit à l'absence de signal de co-activation ce qui maintient les effecteurs T (cytotoxiques) adaptatifs dans un état anergique.

La production de cytokines immunosuppressives. Les cellules tumorales sont capables de produire certaines cytokines telles que le TGF- β (Transforming growth factor beta) qui inhibe la fonction des lymphocytes T *in vivo* (13). Le MIF (macrophage migration inhibitory factor) inhibe l'activité des cellules NK et le VEGF (vascular endothelial growth factor) inhibe la maturation et la différenciation des cellules dendritiques (14). L'IL-10 est fréquemment détectée dans le sérum de patients atteints de cancer. Elle inhibe la présentation antigénique, la production d'IL-12 et défavorise d'une réponse T helper 1 (Th1) *in vivo* (15). Le facteur pro-inflammatoire PGE2 (prostaglandine E2) joue un rôle immunosuppresseur. Il peut être exprimé par les cellules tumorales et induire l'augmentation de la production d'IL-10 par les lymphocytes et les macrophages en plus de diminuer celle de l'IL-12 (13, 16, 17).

Les molécules solubles inhibitrices. D'autres molécules solubles peuvent réduire la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules effectrices. C'est le cas des molécules HLA-G, MICA, MICB et de l'adénosine (13). La molécule HLA-G soluble inhibe la cytotoxicité des cellules effectrices, comme les lymphocytes T $\gamma\delta$, par interaction avec le récepteur inhibiteur ILT2 (Immunoglobulin-like transcript 2) (13). MICA et MICB, qui sont les ligands membranaires du récepteur activateur NKG2D, peuvent être coupées et solubilisées (13). Ces formes solubles entraînent une régulation négative de NKG2D exprimées par les cellules effectrices et réduisent leur réponse cytotoxique anti-tumorale. L'adénosine est reconnue par les récepteurs A_1 , A_{2A} , A_{2B} et A_3 qui sont couplés à des protéines G. Les récepteurs A_{2A} et A_{2B} permettent l'augmentation de la concentration intracellulaire de l'AMPc, tandis que les récepteurs A_1 et A_3 induisent le phénomène inverse. Il est rapporté que la fixation de l'adénosine, produite par les tumeurs sur le récepteur A_{2A} , peut induire l'inhibition des réponses des lymphocytes T $\alpha\beta$, T $\gamma\delta$ et des cellules NK en stimulant l'adénylate cyclase, qui augmente la production d'AMPc (adenosine monophosphate cyclique) et active la protéine kinase A de type I (PKA I). PKA I inhibe l'activation médiée par le TCR en phosphorylant la phospholipase C- γ (18).

Le microenvironnement tumoral peut aussi intervenir dans l'échappement aux effecteurs immuns (13, 19, 20). Pour ce faire, il recrute des cellules immunosuppressives comme les lymphocytes T régulateurs ou T_{reg} , les DCs tolérogènes et les MDSCs (Myeloid-derived suppressor cells) (Figure 2). Les T_{reg} produisent les cytokines immunosuppressives TGF- β et l'IL-10. Les DCs tolérogènes agissent sur l'échappement tumoral en sécrétant la molécule IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase), une enzyme qui catabolise le tryptophane. La diminution de cet acide aminé conduit à l'anergie des effecteurs T cytotoxiques. La molécule IDO est souvent détectée au niveau des tissus tumoraux (21). De même, les MDSCs contribuent à l'inhibition des fonctions effectrices des effecteurs T.

Par ailleurs, le microenvironnement tumoral est constitué de cellules stromales, parmi lesquelles les MSCs (Mesenchymal stem cells) qui jouent un rôle dans l'immunotolérance des cancers (13, 20). Elles sécrètent du PGE2, de l'IDO et de l'IL-10 et exercent ainsi une activité inhibitrice sur les lymphocytes T (13).

En conclusion, l'échappement tumoral est un phénomène important pour qu'une tumeur évolue et forme un cancer. La mort cellulaire programmée joue également un rôle prépondérant dans la carcinogenèse. La perte de ces mécanismes par les cellules tumorales conduit à leur résistance aux mécanismes de lyse par les cellules effectrices. A côté de cela, il faut noter que dans certains cas, la cellule tumorale peut échapper à la réponse immunitaire en provoquant la mort de la cellule effectrice (22). C'est pourquoi, la connaissance des mécanismes de mort est importante pour mieux comprendre la carcinogenèse.

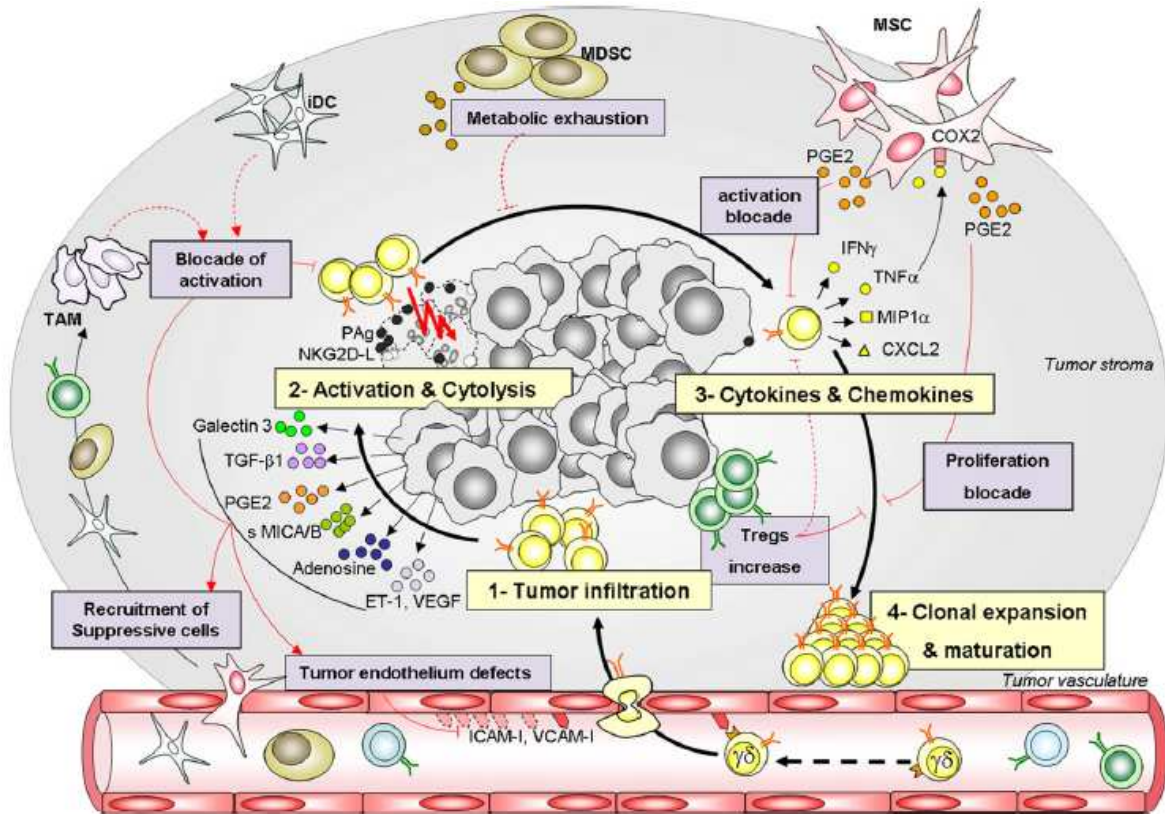


Figure 2 : Stratégies d'échappement et d'action anti-tumorale envers les lymphocytes T $\gamma\delta$. D'après Martinet *et al.* (13).

I.2. Les lymphocytes T $\gamma\delta$

I.2.1. Les caractéristiques générales

Classiquement, le système immunitaire est divisé en deux composantes : la composante innée et la composante adaptative. La composante innée est constituée de cellules reconnaissant le non-soi de manière non spécifique (neutrophiles, macrophages, NK); tandis que la composante adaptative est constituée de cellules qui reconnaissent spécifiquement l'Ag porté par un agent pathogène (lymphocytes B et T $\alpha\beta$). Entre ces deux composantes, il existe des cellules intermédiaires qui ont à la fois les caractéristiques de la composante innée et de la composante adaptative. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ font partie de ces cellules dites de l'immunité transitionnelle.

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont des lymphocytes T non conventionnels caractérisés par l'expression d'un TCR constitué par des chaînes γ et δ . Ils ont été découverts après isolement de la chaîne γ du TCR (23). Ils sont capables d'infiltrer le tissu tumoral et de protéger l'organisme contre l'invasion tumorale en reconnaissant spécifiquement et en lysant les cellules cancéreuses. Ils reconnaissent leur cible indépendamment du CMH. Ils sont fondamentalement proches des lymphocytes T $\alpha\beta$ adaptatifs avec lesquels ils partagent la capacité à produire des cytokines, l'expression de récepteurs de surface et une activité cytolytique. Cependant, alors que les lymphocytes T $\alpha\beta$ nécessitent une phase de stimulation dans les ganglions lymphatiques par des peptides étrangers présentés par des cellules présentatrices d'antigènes, ceci n'est pas nécessaire pour les cellules T $\gamma\delta$ qui sont présents et prêts à réagir dans l'organisme. Ces derniers n'expriment pas les co-récepteurs CD8 et CD4 qui sont nécessaires à la reconnaissance de la présentation par les molécules de CMH de classe I et de classe II (24). Des études menées chez des souris déficientes en lymphocytes T $\alpha\beta$ et/ou en lymphocytes T $\gamma\delta$ montrent que les réponses sont qualitativement et quantitativement différentes (25).

Un haut pourcentage de lymphocytes T $\gamma\delta$ a été décrit dans les tissus de patients atteint de cardiomyopathie dilatée, et une augmentation du taux de lymphocytes T $\gamma\delta$ dans

le sang périphérique a été décrite chez ceux qui souffrent de salmonellose, de listériose, toxoplasmose, et de tuberculose (25, 26).

I.2.1.1. Le TCR $\gamma\delta$

Au cours de leur développement thymique, les lymphocytes T $\gamma\delta$ effectuent des réarrangements somatiques des gènes VDJ, comparables à ceux qui sont effectués par les lymphocytes T $\alpha\beta$, aboutissant à la génération d'un vaste répertoire de TCR $\gamma\delta$ capable de reconnaître un grand nombre d'agents pathogènes. Toutefois, la diversité de TCR $\gamma\delta$ obtenue par ce mécanisme est plus restreinte que celle du TCR $\alpha\beta$ (27). Chaque réarrangement conduit à la formation d'une sous-population caractérisée par sa fonctionnalité. Les lymphocytes qui expriment un récepteur d'affinité optimale à l'Ag peuvent s'expandre sélectivement durant et après la réponse immunitaire. Cette caractéristique contribue à la capacité d'un hôte à réagir plus rapidement lors d'un second contact avec l'agent pathogène.

Les TCR $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ reconnaissent des types d'Ag différents (28). Alors que les lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels reconnaissent des Ag d'origine protéique sous forme de peptides associés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), les lymphocytes T $\gamma\delta$ reconnaissent des Ag de nature souvent non protéique et de façon indépendante du CMH. Il n'y a à ce jour aucun mode de présentation de l'Ag formellement identifié pour une reconnaissance par les lymphocytes T $\gamma\delta$. Les agents pathogènes, ainsi que les tissus et les cellules endommagés, pourraient être reconnus directement par les lymphocytes T $\gamma\delta$ sans nécessité d'une présentation de l'Ag.

Les régions hypervariables CDR3 formées par recombinaison VDJ sont les régions clefs de la reconnaissance des Ag par le TCR. Les loci du TCR γ et δ contiennent beaucoup moins de gènes V que les loci α et β du TCR et que la plupart des loci des immunoglobulines B (Ig) (Figure 3). En outre, lorsque les distributions des longueurs CDR3 des récepteurs aux Ag de souris et humains ont été analysées, les régions CDR3 des chaînes δ se sont avérées plus

proches des chaînes lourdes des Ig que des chaînes α et β (29). Sur la base de l'analyse des réarrangements des régions V, les TCR $\gamma\delta$ sont plus proches des Ig que du TCR $\alpha\beta$ (29).

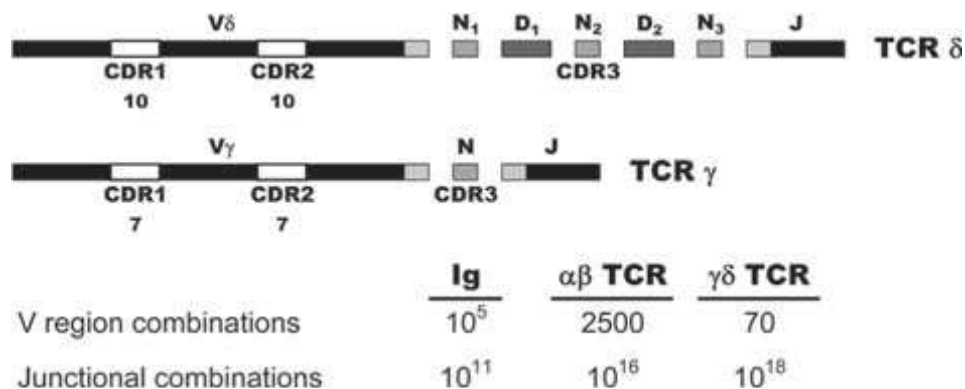


Figure 3 : Diversité des récepteurs T et B chez la souris. D'après Chien and Bonneville (29)

L'identification de ligands du TCR $\gamma\delta$ a été complexe. Des études menées chez la souris ont permis de découvrir différents « agents » capables de stimuler les lymphocytes T $\gamma\delta$. Néanmoins, seulement quelques-uns ont démontré qu'ils étaient suffisants pour déclencher une réponse des lymphocytes T $\gamma\delta$. Ils sont donc reconnus comme étant des Ag de lymphocytes T $\gamma\delta$. C'est le cas du CMH de classe Ib T10 étroitement lié au T22 (94 % d'acides aminés identiques), qui se trouve être un ligand naturel de 0,2 à 2 % des lymphocytes T $\gamma\delta$ de tous types de souris (29), et c'est le cas de MICA (MHC class I-like molecules), et de MICB (30). Chez l'homme, une étude a montré qu'il existe une sous-population de lymphocytes T $\gamma\delta$ qui reconnaît le complexe ATP synthase-F1 (AS)/apolipoprotéine A-1 (31). Dans tous les cas décrits ci-dessus, la protéine native est reconnue directement.

Par ailleurs, la population de lymphocytes T $\gamma\delta$ humains qui reconnaît les complexes AS/apolipoprotéine A-1 est aussi activée par les pyrophosphomonoesters qui sont désignés collectivement sous le nom de phosphoantigènes (32). Ces composés sont produits dans la voie de biosynthèse des isoprénoïdes (33) et sont capables de stimuler un grand nombre de lymphocytes T $\gamma\delta$ du sang périphérique humain. Ces cellules expriment un TCR V γ 9V δ 2 et répondent aux alkylamines et aux aminobisphosphonates *in vitro* (34, 35). Cependant, il n'a

pas été démontré que ces petits ligands non-peptidiques soient suffisants pour activer seuls les lymphocytes T $\gamma\delta$ et que ces composés se lient directement au TCR $\gamma\delta$.

D'autres observations compliquent l'identification des ligands des lymphocytes T $\gamma\delta$ comme l'existence d'une préférence de site anatomique privilégié pour ces lymphocytes en fonction du gène d'expression V (25). Par exemple, chez la souris, les populations V γ 1 et V γ 4 sont présentes dans la rate, tandis que la population V γ 7 est présente dans l'épithélium intestinal parmi les IEL (intestinal intraepithelial lymphocyte) (29). Cela indique que l'activité des lymphocytes T $\gamma\delta$ dépend de la ségrégation des chaînes V γ .

I.2.1.2. L'ontogénie des lymphocytes T $\gamma\delta$

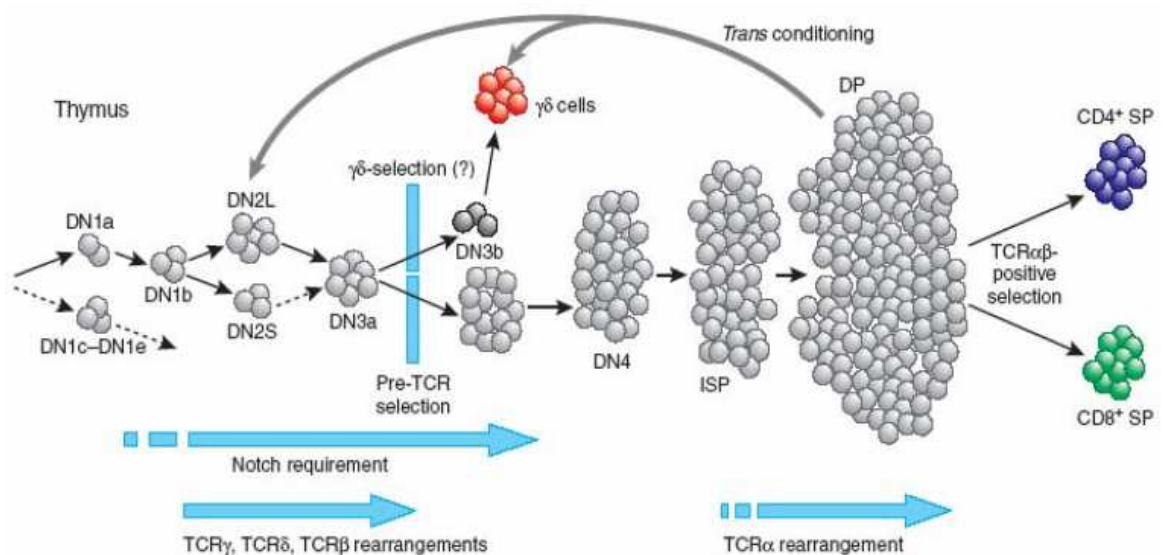


Figure 4 : Les stades de différenciation des cellules T. D'après Hayday *et al.* (36)

DN : Double négatif ; ISP : Immature simple positif ; SP : Simple positif ; DP : double positif

Comme pour tous les types lymphocytaires, le développement des lymphocytes T $\gamma\delta$ débute dans la moelle osseuse. Cependant, avant la naissance, les lymphocytes T $\gamma\delta$ humains et plus particulièrement la sous-population V γ 9V δ 2, se développent aussi dans le foie fœtal et l'intestin (37). Les lymphocytes T $\gamma\delta$ et $\alpha\beta$ sont issus d'un progéniteur lymphoïde commun qui émigre de la moelle osseuse vers le thymus. Au stade thymocyte, les cellules ont le choix de se différencier en lymphocytes T $\alpha\beta$ ou en lymphocytes T $\gamma\delta$. La différenciation des

lymphocytes immatures en lymphocytes T $\gamma\delta$ s'effectue aux stades DN ($CD4^- CD8^-$) 2 et 3 du développement thymique des lymphocytes T (Figure 4). Cependant, elle est encore possible au stade double positif $CD4^+$ et $CD8^+$. Les évènements moléculaires qui permettent le passage de thymocytes $CD4^- CD8^-$ à des lymphocytes T $\gamma\delta$ ou $\alpha\beta$ ne sont pas totalement connus. Des études montrent que le réarrangement complet des gènes γ , δ et β du TCR sont en concurrence dès le stade pro-thymocyte $CD44^+ CD25^+$ de la souris adulte (38, 39).

Une étude a montré que l'orientation vers la lignée $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ est dépendante de l'IL-7 (40). En effet, après injection intrathymique d'IL-7, les thymocytes au stade double négatif 2 (DN2) qui exprimaient un haut niveau du récepteur à l'interleukine-7 (IL-7R) se différenciaient vers la lignée $\gamma\delta$ alors que ceux qui exprimaient un faible taux d'IL-7R s'orientaient vers la lignée $\alpha\beta$. Ces résultats suggèrent que beaucoup de cellules DN2 sont préorientées avant la formation du TCR.

D'autres études montrent que l'orientation vers une des deux lignées dépend de l'intensité du signal issue du pré TCR (TCR non constitutif). Ces études montrent qu'un fort signal délivré par le TCR $\gamma\delta$ favorise l'orientation vers la lignée $\gamma\delta$; tandis qu'un faible signal oriente vers la lignée $\alpha\beta$ (41, 42). Il existe également un modèle de différenciation faisant intervenir la molécule Notch (Figure 5). Cette dernière est un récepteur transmembranaire intervenant dans divers mécanismes cellulaires. Des études chez la souris ont permis de comprendre son fonctionnement. Lorsque le récepteur Notch délivre un signal au lymphocyte, ce dernier s'oriente vers la différenciation en lymphocyte T $\alpha\beta$ et réciproquement, l'absence de signal conduit à la différenciation en lymphocyte T $\gamma\delta$. Selon Hayday et *al.* (Figure 5), le destin des cellules aux stades DN3 serait dicté par le TCR et le pré TCR en synergie avec le signal Notch. Des signaux modérés provenant d'un pré TCR agissant en synergie avec des signaux faibles de Notch ou des signaux Notch modérés agissant en synergie avec des faibles signaux du TCR $\gamma\delta$, orienteraient la cellule DN3 vers la voie de développement des lymphocytes T $\alpha\beta$. Par contre, si le signal Notch est absent et des signaux forts provenant du TCR orienteraient le thymocyte dans la voie de différenciation des lymphocytes T $\gamma\delta$.

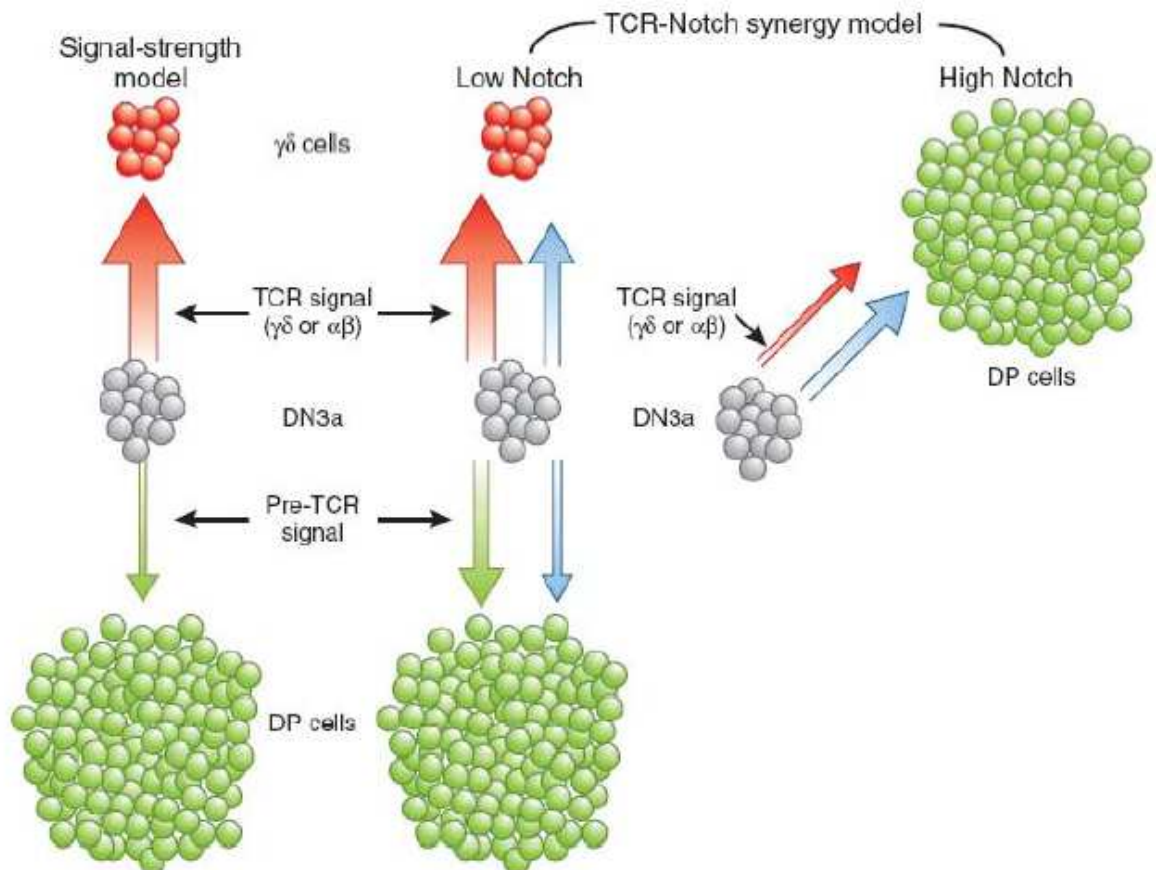


Figure 5 : Modèle d'intensité du signal Notch et de synergie entre le signal Notch et le signal TCR. D'après Hayday and Pennington. D'après Hayday *et al.* (36)

Au cours du développement embryonnaire humain, les lymphocytes T $\gamma\delta$ apparaissent par vagues successives dans le thymus d'où ils partiront coloniser un organe particulier (organe lymphoïde secondaire, peau, utérus, épithélium intestinal) dans lequel ils resteront tout au long de la vie foetale (43). Ce sont les premiers lymphocytes à apparaître entre la 7^{ème} et 11^{ème} semaine et ils colonisent le thymus dès la 10^{ème} semaine.

Le répertoire des sous-populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ évolue au cours du temps. En effet, la sous-population V δ 2 prédomine dans le thymus au stade foetal et sera supplantée par les V δ 1 après la naissance (44). De plus, les réarrangements des loci γ et δ lors de la constitution du TCR sont ordonnés dans le temps et l'espace. Avant la naissance, les segments V δ 2 s'associent avec les segments géniques V γ 9 formant ainsi la sous-population

V γ 9V δ 2 uniquement présente chez les primates (homme et singes) (45). Entre le 4^{ème} et 6^{ème} mois après la naissance, les segments géniques V δ 1 s'arrangent avec les segments V γ 2, 3, 5 et 8 qui sont regroupés dans la famille des V γ 1. Tout au long de la vie, 15% des lymphocytes T V γ 9V δ 2 et 80% des lymphocytes T V γ 1V δ 1 sont retrouvés dans le thymus post-natal (37).

I.2.2. Les sous-populations des lymphocytes T $\gamma\delta$ chez l'homme

Chez l'homme, il existe six segments géniques V γ fonctionnels et huit segments V δ fonctionnels (46). Les TCR exprimés sont néanmoins limités à l'usage des segments géniques V δ 1, V δ 2 et V δ 3 et V δ 5 (46). Cinq des segments géniques V γ forment la famille des V γ 1 constituée de V γ 1.2, V γ 1.3, V γ 1.4, V γ 1.5 et V γ 1.8 appelés aussi V γ 2, V γ 3, V γ 4, V γ 5 et V γ 8. La famille V γ 1 est proche du V γ 5 murin avec lequel elle partage plus de 40 % d'homologie (47). Le sixième segment V γ est appelé V γ 9 et n'a pas d'équivalent murin. A partir du réarrangement de ces segments, deux sous-populations majeures émergent chez l'homme : les V γ 9V δ 2 (V δ 2) et les V γ 1V δ 1 (V δ 1) (46). Les cellules V δ 1 sont minoritaires dans le sang mais sont fréquentes dans l'épithélium intestinal et la rate ; c'est le contraire pour les cellules V δ 2 (46, 48). Les cellules V δ 1 et V δ 2 s'expandent tous les deux après stimulation au LPS mais leurs fonctions sont différentes. En réponse au LPS, les cellules V δ 2 ont une activité pro-inflammatoire et produisent de l'IL-17 et de l'IFN- γ ; tandis que les cellules V δ 1⁺ produisent de l'IL-10 (49).

A côté de ces deux sous-populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ majeures, il existe d'autres sous-populations de cellules T $\gamma\delta$ qui sont moins abondantes et surtout moins bien caractérisées. Récemment, une étude démontre que l'une d'entre-elles, la population T V γ 4V δ 5, intervient dans la réponse anti-infectieuse au cytomégalo virus et dans la réponse anti-tumorale à des tumeurs épithéliales, à travers la reconnaissance de l'EPCR (endothelial protein C receptor) par le TCR (50).

Les cellules V δ 1 expriment généralement la molécule CD8, sont cytotoxiques et affichent un profil Th1 caractérisé par la production d'IFN- γ (46). De plus, lorsque les cellules

V δ 1 sont activées, elles expriment intensément la molécule CD57 qui est associée avec un fort taux d'expression de perforine ce qui démontre le potentiel cytotoxique de ces cellules (46).

Les cellules V δ 1 répondent aux phospholipides endogènes et exogènes présentés par les molécules du CMH I-like CD1 (46). En cas de stimulation du TCR et en présence des cytokines IL-2 ou IL-15, les cellules V δ 1 expriment les récepteurs NK comme NKG2D, NKp30, NKp44 et NKp46 qui contribuent à leur activité cytotoxique (51). Elles sont capables de reconnaître et d'éliminer des cellules tumorales telles que des cellules de mélanome ou de divers carcinomes, par reconnaissance des molécules MICA et MICB par le récepteur NKG2D (51). De plus, il a été observé que les cellules V δ 1 reconnaissent et éliminent *in vitro* les cellules P815 (mastocytome de souris) après engagement du récepteur NKp30 avec son ligand (51). Par ailleurs, il a été rapporté que le nombre de cellules V δ 1 augmente dans le sang de patient atteints de leucémie lymphoïde chronique est que la reconnaissance et la lyse de ces cellules tumorales *in vitro* par les cellules V δ 1 (52). Dans une autre étude, les cellules V δ 1 de patients atteints de myélome étaient capables d'éliminer *in vitro* les cellules tumorales issues de ces patients, de manière aussi efficace que les cellules V δ 1 issues de donneurs de sains, après engagement du TCR et des récepteurs activateurs DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1 ou CD226) et NKG2D (53).

Les cellules V δ 1 interviennent aussi dans la réponse anti-infectieuse. En effet, en cas d'infection par le cytomégalovirus ou par le HIV-1 (human immunodeficient virus 1), elles subissent une expansion clonale après engagement du TCR (51). Elles seraient également capables de réguler la réponse immunitaire. Il a été décrit que les cellules T V δ 1 peuvent lyser *in vitro* les cellules dendritiques autologues par relargage de granules de perforine et ainsi diminuer la réponse immunitaire (54). Comme les autres lymphocytes T, les cellules V δ 1 présentent plusieurs phénotypes en fonction de l'expression des marqueurs de différenciation CD45RA et CD27. La majorité des cellules V δ 1 sanguin sont CD45RA⁺ et se distinguent par les naïves CD27⁺ qui sécrètent de l'IL-2, et par les non naïves CD27⁻ qui

sécrètent de l'IFN- γ (46, 55). La majorité des cellules V δ 1 du sang périphérique présente un phénotype naïf contrairement aux cellules V δ 2 (46, 55).

Contrairement au segment génique V δ 1, le segment V δ 2 ne s'associe qu'avec la chaîne V γ 9 ce qui permet la formation d'une sous-population unique de lymphocyte T V δ 2⁺ appelée V γ 9V δ 2. Elle représente la sous-population de lymphocyte T $\gamma\delta$ prédominante dans le sang périphérique. Les caractéristiques de cette sous-population sont décrites dans le chapitre suivant.

I.2.3. Lymphocytes T V γ 9V δ 2

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 sont localisés dans le sang périphérique, où ils représentent la sous-population de lymphocytes T $\gamma\delta$ majoritaire, et sont uniquement présents chez les primates. Ils se caractérisent par la capacité à reconnaître des petites molécules non-peptidiques pyrophosphatées bien conservées au cours de l'évolution, appelées phosphoantigènes.

I.2.3.1. Mécanisme d'activation par les phosphoantigènes

I.2.3.1.1. Biosynthèse des phosphoantigènes

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 constituent 2 à 5 % des lymphocytes T du sang périphérique (56). Cependant, en cas d'infection par des bactéries ou des protozoaires, ils se multiplient intensément jusqu'à représenter dans certains cas la majorité des lymphocytes T circulants (56) (Tableau 1). En accord avec ces observations *in vivo*, l'utilisation d'extraits cellulaires de ces différents pathogènes conduit *in vitro* à l'expansion des lymphocytes T V γ 9V δ 2. Le premier antigène des lymphocytes T V γ 9V δ 2 à avoir été identifié est le monoéthyl phosphate, un alkyl phosphate synthétique (57). Cette molécule stimule spécifiquement les lymphocytes T V γ 9V δ 2 de manière identique aux extraits bactériens (57). Puis, les antigènes de *Mycobacterium tuberculosis* stimulant les lymphocytes T V γ 9V δ 2 ont été isolés et identifiés comme étant l'isopentenylpyrophosphate (IPP) et ses dérivés prényl pyrophosphates (58, 59). Ces phosphoantigènes sont des intermédiaires des voies de biosynthèse des isoprénoïdes (Figure 6) qui sont des composés essentiels dans le

métabolisme et la synthèse de bon nombre de biomolécules comme le cholestérol, les hormones stéroïdiennes, les dolichols, et différentes vitamines (Figure 7). C'est la nature ubiquitaire de ces voies qui explique la large réactivité des lymphocytes T V γ 9V δ 2 vis-à-vis de pathogènes ou de tumeurs.

Infection	Mean (max) % of $\gamma\delta$ T cells		References
	Normals	Patients	
Bacterial			
Tuberculosis	6	14 (35)	Balbi et al. (154)
	2	6 (17)	Ito et al. (155)
TB contacts	5	10 (18)	Ueta et al. (156)
TB meningitis	3	4 (80% V γ 2V δ 2)	Dieli et al. (157)
Leprosy, reversal Reaction	5	29 ^a	Modlin et al. (158)
Tularemia	3	33	Sumida et al. (99)
	7	31 (48)	Poquet et al. (159)
	5	25 (50)	Kroca et al. (104)
Salmonellosis	5	18 (48)	Hara et al. (100)
Legionellosis	5	15 (42)	Kroca et al. (160)
Brucellosis	4	29 (48)	Bertotto et al. (98)
Q-fever (<i>Coxiella burnetii</i>)	4	16 (30)	Schneider et al. (161)
Ehrlichiosis	5	57 (97)	Caldwell et al. (101)
Meningitis (<i>H. influenzae</i>)	7	27 (37)	Raziuddin et al. (162)
Meningitis (<i>N. meningitidis</i>)	7	25 (42)	Raziuddin et al. (162)
Meningitis (<i>S. pneumoniae</i>)	7	35 (46)	Raziuddin et al. (162)
Listeriosis	2	12 (33)	Jouen-Beades et al. (163)
Protozoal parasites			
Acute malaria (non-endemic)	4	16 (26)	Ho et al. (164)
	5	16 (27)	Roussillon et al. (165)
	3	18 (46)	Schwartz et al. (166)
Malarial paroxysm	4	11 (27)	Perera et al. (102)
Toxoplasmosis	4	9 (15)	Scalise et al. (103)
Visceral leishmaniasis	8	44	Raziuddin et al. (167)
Leishmaniasis	3	13 (18)	Russo et al. (168)
Localized leishmaniasis	4	20 ^a	Modlin et al. (158)

Tableau 1 : Expansion des lymphocytes T $\gamma\delta$ en réponse à l'infection. D'après Morita, Jin et al. (56)

L'IPP est produit par les cellules de mammifère via la voie de biosynthèse du cholestérol appelée aussi voie du mévalonate. Ce phosphoantigène est surexprimé par les cellules tumorales et les cellules infectées, ce qui favorise leur reconnaissance par les lymphocytes T V γ 9V δ 2. Chez les procaryotes, cette voie n'existe pas. Une voie similaire appelée voie de « Rhomer » ou voie MEP (méthylérythritol phosphate) conduit à la formation des mêmes phosphoantigènes IPP et diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP). Cette voie est également présente chez certains eucaryotes tels que les algues vertes qui ne possèdent pas la voie du mévalonate (Figure 6).

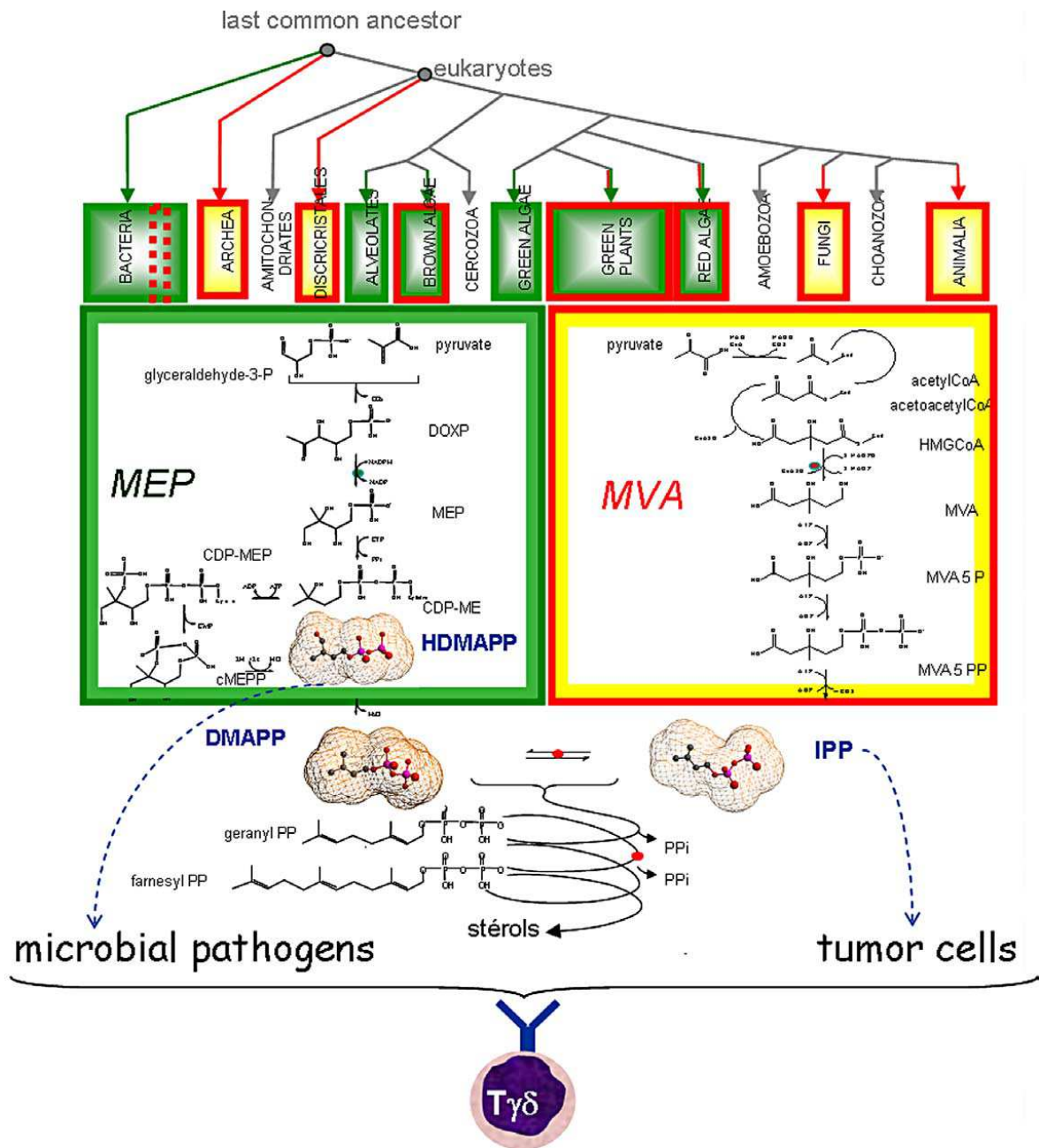


Figure 6 : Voie de biosynthèse du mévalonate et du MEP. D'après Bonneville et Fournié. (33)

D'un point de vue évolutif, la voie MEP est antérieure à la voie du mévalonate. Elle produit également les phosphoantigènes naturels les plus stimulants pour les lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$. En effet, le plus puissant agoniste naturel des lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$ est l'HMBPP ((E)-4-hydroxy-3-menthyl-but-ényl-pyrophosphate) appelé aussi HDMAPP (4-hydroxy-3-

dimethylallyl) qui est issu de la voie MEP (Figure 6) (56). L'HMBPP nécessite seulement 0,032 nM pour obtenir 50 % de la réponse maximale des lymphocytes T Vy9V δ 2 ; alors qu'il faut 1 μ M d'IPP pour obtenir une réponse équivalente (56). La présence de ces phosphoantigènes dans de nombreux pathogènes contribue à la large réactivité des lymphocytes T Vy9V δ 2 envers ces organismes.

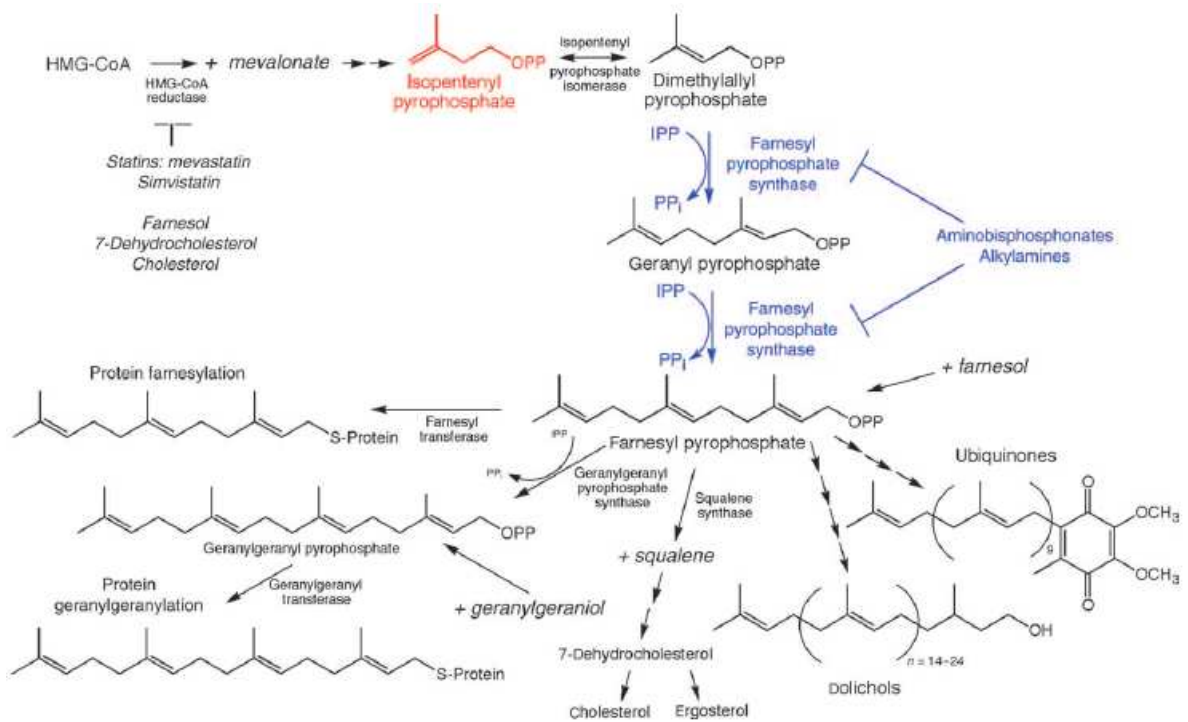


Figure 7 : Voie du mévalonate et étapes en aval de la biosynthèse des isoprénoïdes. D'après Morita, Jin *et al* (56)

Il existe des phosphoantigènes synthétiques produits chimiquement dans le but de stimuler spécifiquement les lymphocytes T Vy9V δ 2 dans des protocoles d'immunothérapie cellulaire. A l'heure actuelle, l'un des plus performant est le pyrophosphate de bromohydrine (BrHPP) produit par la firme biopharmaceutique Innate pharma sous le nom de « phosphostim™ »(60, 61).

A coté des phosphoantigènes, d'autres molécules sont capables de stimuler spécifiquement les lymphocytes T Vy9V δ 2 : les aminobisphosphonates tels que le pamidronate et le zoledronate. Les aminobisphosphonates sont des médicaments qui

préviennent la résorption osseuse et qui sont utilisés pour le traitement de la maladie de Paget, de tumeurs associées aux maladies osseuses et de l'ostéoporose (56). Ils inhibent la farnésyl pyrophosphate synthase (FPPS) (62) (Figure 7). L'inhibition de cette enzyme de la voie de biosynthèse du mévalonate conduit à la diminution de la synthèse de Farnésyl pyrophosphate (FPP) et à la perturbation des membranes des ostéoclastes et des cellules tumorales ce qui provoque l'apoptose de ces dernières et la perte d'activité des ostéoclastes (56). L'induction de l'expansion des lymphocytes T V γ 9V δ 2 par les bisphosphonates a été mise en évidence chez des patients en phase aigüe qui présentaient une augmentation du nombre de lymphocytes T V γ 9V δ 2 après traitement au pamidronate (63). On sait maintenant que l'inhibition de la FPPS provoque une accumulation intracellulaire des phosphoantigènes IPP et DMAPP (Figure 7)

La démonstration de cette voie indirecte de stimulation par les bisphosphonates a été apportée par Gober *et al.* (64) qui ont montré que la stimulation par le zoledronate peut être bloquée par la mévastatine, un médicament connu pour inhiber la HMG-CoA reductase (3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A). De ce fait, la mévastatine inhibe la production d'IPP et de DMAPP et donc l'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2.

I.2.3.1.2. Base moléculaire de la reconnaissance des phosphoantigènes par les lymphocytes T V γ 9V δ 2

Bien que l'antigène activant les lymphocytes T V γ 9V δ 2 soit connu, le mécanisme de sa reconnaissance n'est pas encore élucidé. Une étude montre que la reconnaissance de l'IPP est dépendante du TCR V γ 9V δ 2 (56). En outre, il a été proposé que cette reconnaissance serait dépendante de certains résidus lysine et arginine de la région CDR3 δ de la chaîne V δ 2 et CDR3 γ de la chaîne V γ 9 (56). Cependant, les essais de cocrystallisation de l'IPP ou de HMBPP avec le TCR V γ 9V δ 2 n'ont pas donné de résultats, suggérant une reconnaissance indirecte des phosphoantigènes via le TCR (65). Cette absence de liaison directe ainsi que la petite taille de l'antigène suggère qu'il pourrait exister une molécule présentatrice des phosphoantigènes.

De récents travaux de l'équipe de Morita vont dans ce sens et démontrent qu'il est nécessaire d'avoir un contact cellulaire pour que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 reconnaissent leurs antigènes (56). Contrairement aux neurotransmetteurs ou hormones, l'IPP ne peut pas activer les lymphocytes T V γ 9V δ 2 en absence de cellules présentatrices (APC) (56). Par contre, si les lymphocytes T V γ 9V δ 2 sont en contact avec des cellules porteuses d'IPP, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 sont stimulés. Cela se traduit par une augmentation du calcium intracellulaire (56), la sécrétion de tumor necrosis factor- α (TNF- α) (66), et une amplification du métabolisme des lymphocytes T V γ 9V δ 2 (67) lors d'une seconde exposition. Ces caractéristiques ressemblent à celles observées par les lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels. En effet, les lymphocytes T $\alpha\beta$ reconnaissent par contact un complexe antigène peptidique/molécule de CMH porté par une cellule présentatrice d'Ag.

Néanmoins, parmi les molécules présentatrices classiquement connues à ce jour (CMH-I, CMH-II, CD1), aucune ne semble requise pour reconnaître l'IPP. En effet, des APC mutants ne possédant pas de CMH-I, de β 2-microglobuline, de CD1 ou de CMH-II, sont en mesure de présenter l'IPP aux lymphocytes T V γ 9V δ 2 (56). De même, les essais de blocage de ces molécules à l'aide d'anticorps monoclonaux n'inhibent pas la reconnaissance de l'IPP (56).

Le groupe d'E. Scotet a identifié le complexe membranaire, associant l'apolipoprotéine A1 (Apo-A1) et la sous-unité F1 de l'adénosine triphosphate synthase (AS), comme étant un ligand du TCR V γ 9V δ 2 (31). Ce complexe enzymatique se trouve habituellement localisé dans les mitochondries des cellules saines mais il est également présent à la surface des cellules tumorales(31). Dans ce cas, sa présence favorise la reconnaissance de ces cellules par les lymphocytes T V γ 9V δ 2. Cette reconnaissance s'effectue à travers l'interaction directe entre le TCR V γ 9V δ 2 et l'AS et conduit à la lyse des cellules tumorales par les lymphocytes T V γ 9V δ 2. Le lien potentiel entre les phosphoantigènes et ce complexe reste hypothétique. Il est possible que l'AS puisse fixer des molécules d'IPP ou des molécules dérivées de l'IPP. Il est également possible que l'IPP

entraîne une activation ou un changement de conformation du complexe AS qui permettrait sa reconnaissance (68, 69).

Récemment, le groupe d'E. Scotet a montré que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 s'activent très rapidement et spécifiquement suite au contact avec des cellules tumorales humaines, d'origines tissulaires variées, préalablement incubées avec des anticorps monoclonaux spécifiques de butyrophylines/CD277 (BTN) (70, 71). Les molécules BTN sont des glycoprotéines transmembranaires de type I appartenant à la superfamille des immunoglobulines. La fonction et les ligands de ces molécules ne sont pas connus. La BTN n'est pas reconnue par le TCR naturellement. Cependant, lorsqu'un anticorps anti-BTN/CD277 se fixe sur cette molécule, elle change de conformation et peut être reconnue par le TCR (Figure 8). De plus, le traitement avec les bisphosphonates change également la conformation de la BTN et favorise ainsi sa reconnaissance avec le TCR (72). L'activation est identique à celle observée après stimulation avec des phosphoantigènes et se traduit par le déclenchement de réponses fonctionnelles (cytokines, cytolyse, prolifération) (70-72). De plus, le knockdown de l'expression des molécules de BNT est corrélée avec une réduction de la réactivité des lymphocytes T V γ 9V δ 2 qui est restaurée par ré-expression de l'isoforme BTN3A1 mais pas avec BTN3A2. Ces résultats indiquent que l'isoforme BTN3A1 joue un rôle dans l'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 par les phosphoantigènes (70).

Actuellement, les bases moléculaires de la reconnaissance antigénique spécifique des lymphocytes T V γ 9V δ 2 ne sont donc que partiellement comprises.

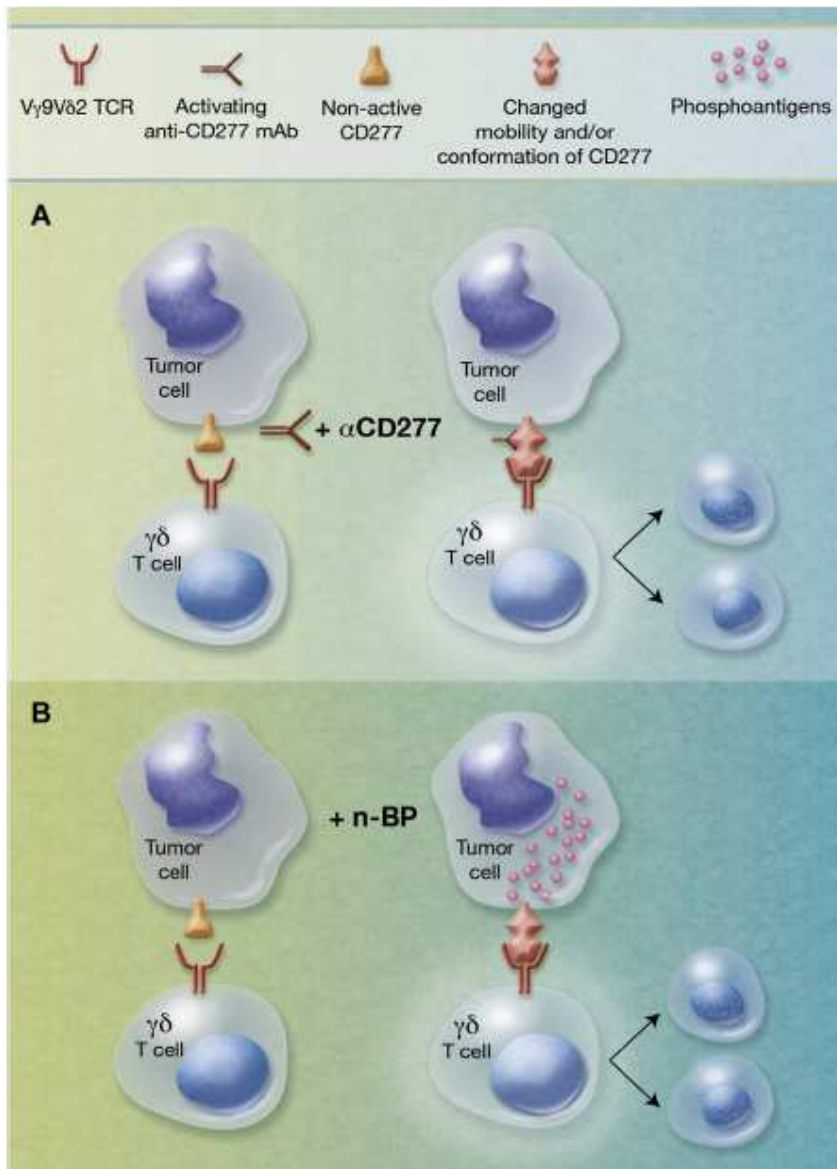


Figure 8 : Rôle de la CD227/butyrophiline-3A dans l'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2. (A) La molécule CD227 n'est pas reconnue par le TCR V γ 9V δ 2 (à gauche). Après incubation avec l'anticorps anti CD227, la molécule CD227 change sa conformation et est reconnue par le TCR V γ 9V δ 2 (à droite). (B) Plusieurs tumeurs sont faiblement reconnues par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 (à gauche). Le traitement avec un aminobisphosphonate induit une augmentation de l'expression de Phosphoantigènes qui conduit à un changement de conformation de la molécule CD227 et l'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 (à droite). D'après Kabelitz (72)

I.2.3.2. Les différents phénotypes de lymphocytes T V γ 9V δ 2

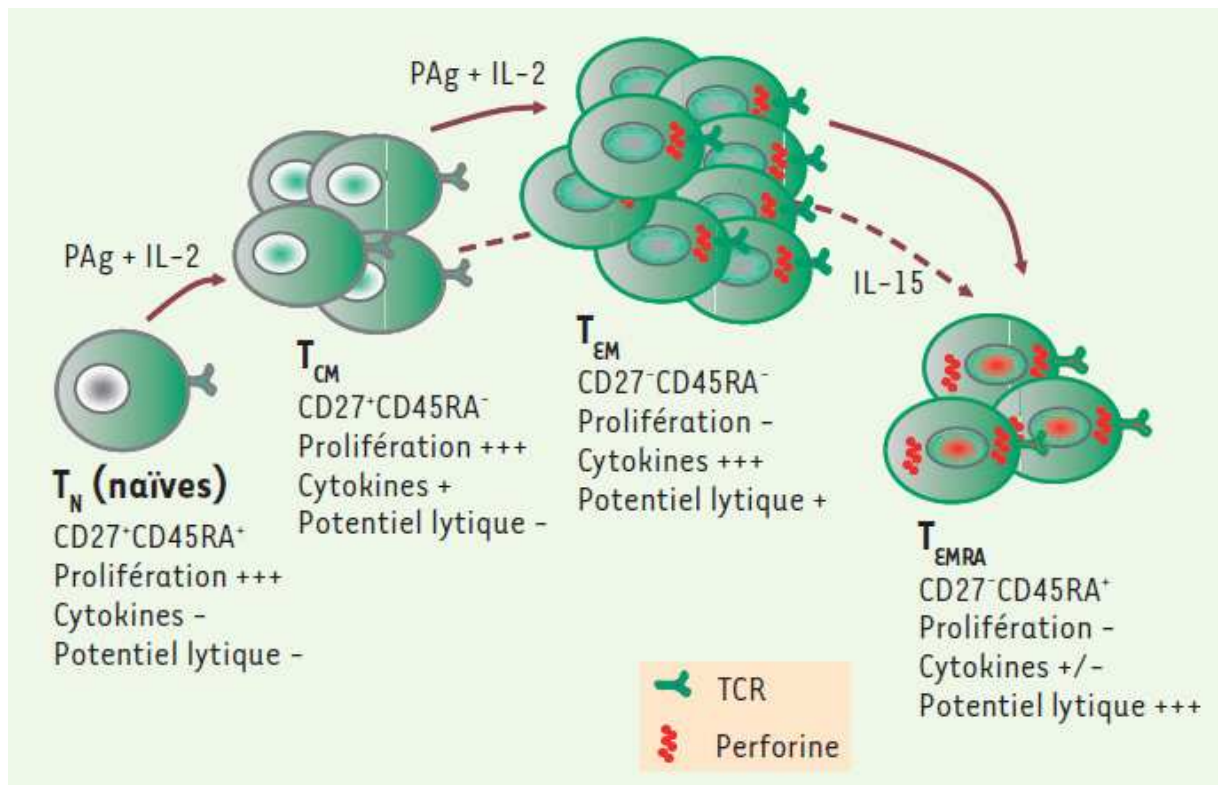


Figure 9 : Phénotypes et caractéristiques fonctionnelles principales des sous-populations de lymphocytes T V γ 9V δ 2. D'après Catros, Toutirais *et al* (73)

Le phénotype naïf/mémoire des lymphocytes T V γ 9V δ 2 peut être déterminé à l'aide des marqueurs CD45RO, CD45RA et CD27. Les différentes sous-populations sont les lymphocytes T naïfs (T_N), les lymphocytes T mémoires centraux (T_{CM}), les lymphocytes T mémoires effecteurs (T_{EM}) et les lymphocytes T mémoires effecteurs en différenciation terminale (T_{EMRA}) (Figure 9).

Les cellules T_N représentent la population majoritaire dans les ganglions (80% des lymphocytes T V γ 9V δ 2) mais la moins fréquente dans le sang périphérique. Ces cellules ont un phénotype CD27⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻. Elles prolifèrent à un niveau élevé en cas de stimulation *ex vivo*. Cependant, leur fonction cytotoxique est faible. Elles expriment les récepteurs CCR7 et CD62L associés à la migration vers les ganglions lymphatiques (74).

Les cellules T_{CM} représentent environ 50 % des lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$ du sang périphérique et environ 20 % dans les ganglions. Elles ont un phénotype $CD27^+ CD45RA^- CD45RO^+$ caractérisé par un fort potentiel prolifératif et peu de fonctions effectrices (pas d'activité cytotoxique, et faible capacité à sécréter des cytokines). Elles expriment CCR7 et CD62-L et entre 10-25% d'entre elles expriment les récepteurs CCR2, CCR5, CCR6 et CXCR3 (75) associés à la migration vers les sites inflammatoires. *In vitro*, après stimulation en présence d'IL-2, les cellules T_{CM} se différencient en cellules T_{EM} . Par contre, si elles sont cultivées en présence d'IL-15 et en absence de phosphoantigène, elles se différencient en cellules T_{EMRA} .

Les cellules T_{EM} ont un phénotype $CD27^- CD45RA^- CD45RO^+$. Elles ont une faible capacité à proliférer, un fort niveau d'expression de récepteurs aux chimiokines et un faible taux d'expression des récepteurs NK. Cela suggère que ces cellules interviennent surtout dans les processus inflammatoires plutôt que dans les activités cytotoxiques. Elles sécrètent notamment de fortes quantités d'IFN- γ (75) et n'expriment pas le récepteur CD16.

Les cellules T_{EMRA} ont un phénotype $CD27^- CD45RA^+ CD45RO^+$. Elles ne prolifèrent pratiquement pas et ont une faible activité inflammatoire liée à une faible expression de récepteurs aux chimiokines. Par contre, Elles expriment de nombreux récepteurs NK leur permettant d'avoir une activité lytique importante. Ces cellules ont une forte activité cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales corrélée à la sécrétion d'IFN- γ et de perforine (76). De plus, elles expriment le récepteur CD16 qui permet de fixer la région Fc des immunoglobulines afin d'effectuer de l'ADCC (antibody dependent cell cytotoxicity) (76). Néanmoins, en cas de stimulation des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) avec des agonistes synthétiques, il est possible d'obtenir des populations de lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$ ayant un phénotype EM et exprimant le récepteur CD16. Selon Dieli et *al.*, les lymphocytes T_{EMRA} sont considérés comme l'étape finale de maturation des lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$ car elles dériveraient des cellules T_{EM} (74). Les cellules T_{EMRA} de la sous-population de lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$ possède des télomères plus courts que ceux des T_{EM} eux même plus courts que ceux des T_{CM} . Le groupe de Dieli propose un modèle linéaire au cours duquel des

lymphocytes T V γ 9V δ 2 naïfs se différencient en cellules T_{CM} après stimulation et migrent vers les ganglions lymphatiques. En cas de réexposition avec l'Ag, les cellules T_{CM} se différencient en cellules T_{EM} et migrent vers les sites inflammatoires pour se différencier en cellules T_{EMRA} afin d'éliminer l'agent pathogène.

I.2.3.3. Interaction des lymphocytes T V γ 9V δ 2 avec les cellules tumorales

I.2.3.3.1. Synapse immunologique

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 expriment un grand nombre de récepteurs membranaires permettant de reconnaître les cellules tumorales. Lorsqu'un lymphocyte T V γ 9V δ 2 interagit avec une cellule tumorale, il forme une synapse immunologique (73). Les récepteurs migrent et se regroupent au sein de cette synapse pour s'engager avec leurs ligands respectifs sur la cellule cible (Figure 10). Il existe deux types de récepteurs : les récepteurs activateurs qui induisent une activation de la cellule effectrice conduisant à son activité lytique et les récepteurs inhibiteurs qui font l'inverse. Le principal récepteur impliqué dans l'activation des lymphocytes est le TCR qui interagit avec l'IPP.

D'autres molécules, comme les NKR (natural killer receptors) et les TLR (toll-like receptor) appelées co-récepteurs, jouent un rôle dans la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 (77). Les TLR sont des récepteurs activateurs reconnaissant les PAMP (Pathogen-Associated molecular Pattern) ou les DAMP (Danger-Associated Molecular Pattern). Parmi les NKR exprimés par les lymphocytes T V γ 9V δ 2, il faut citer le récepteur NKG2D qui reconnaît des molécules induites par le stress et surexprimées dans les cellules cancéreuses comme par exemple MICA, MICB, ULBP1, 2, 3 et 4 (78). NKG2D peut suffire à activer les lymphocytes T V γ 9V δ 2 sans stimulation du TCR (60, 79). D'autres récepteurs NK comme DNAM-1 et CD96 interviennent également dans la synapse immunologique (80). DNAM-1 interagit avec Nectine-2 et Necl-5 ; tandis que CD96 interagit uniquement avec Necl-5 (voir chapitre 3 sur les nectines). La co-activation de DNAM-1 avec le TCR augmente l'activité cytolytique des lymphocytes T V γ 9V δ 2 (80).

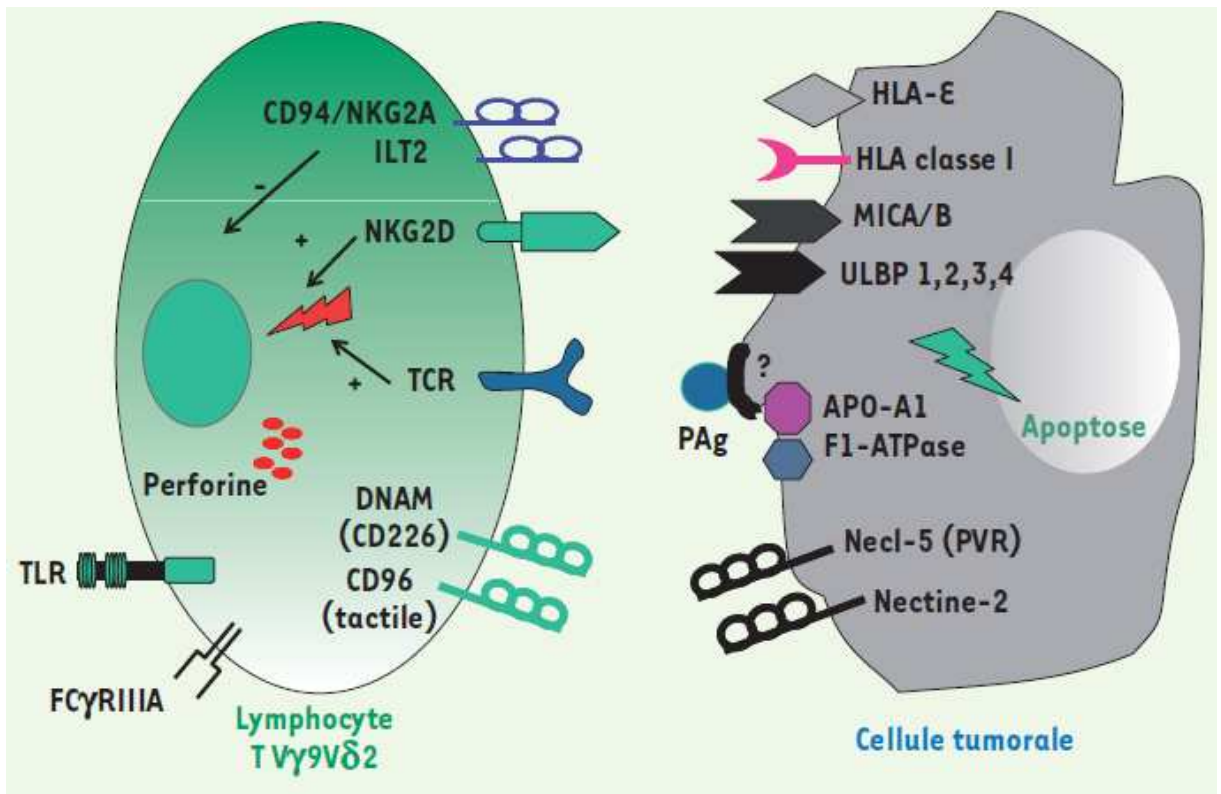


Figure 10 : La synapse immunologique entre un lymphocyte T Vγ9Vδ2 et une cellule tumorale.

D'après Catros *et al.* (73)

Les récepteurs inhibiteurs ont pour fonction de moduler la réponse lymphocytaire. Il s'agit par exemple de NKG2A ou B (69) qui reconnaissent HLA-E en association avec CD94. La région intracytoplasmique de ces molécules est constituée de deux séquences inhibitrices ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) qui transmettent des signaux inhibiteurs au lymphocyte.

Grâce à ces récepteurs, les lymphocytes T Vγ9Vδ2 sont capables de discriminer les cellules saines des cellules infectées ou tumorales.

I.2.3.3.2. Capacité de cytolysse et de sécrétion des lymphocytes T V γ 9V δ 2

Les Lymphocytes T V γ 9V δ 2 sont capables de détruire une grande variété de cellules tumorales. Pour cela, ils disposent de plusieurs mécanismes (81) :

- **le système FAS/FAS ligand (ou CD95/CD95-L)**
- **le système de récepteur TRAIL R/TRAIL**
- **Le système perforine-granzyme.** Les lymphocytes T $\gamma\delta$ expriment les granzymes A, B et M, la granulysine et la perforine (82). L'expression de ces molécules est corrélée avec leur stade de différenciation (74). Plus le stade est avancé et plus l'expression de ces molécules augmente. Elles sont fortement exprimées chez les T_{EMRA} et pas du tout chez les cellules T_N et T_{CM} (74).

De plus, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 produisent des cytokines dont certaines leur permettent de recruter d'autres cellules du système immunitaire. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 peuvent s'orienter vers un profil Th1 (IFN- γ et TNF- α) (83) ou Th2 (IL-4 et IL-5) (84, 85) en fonction de l'environnement cytokinique dans lequel se fait la rencontre avec le phosphoantigène.

Il a été décrit que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 peuvent avoir un profil Th17 ou T $\gamma\delta$ 17 (47). Toutefois, cette population reste mineure. En effet, 80 % des lymphocytes T V γ 9V δ 2 produisent de l'IFN- γ ; tandis que 1 % produisent de l'IL-17 qui est une cytokine impliquée dans l'inflammation (86). Le profil Th17 peut être acquis par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 naifs après activation et culture en présence de TGF- β , IL-1 β , IL-6 et IL-23. L'IL-6 induit la production d'IL-17. Le TGF- β inhibe la production d'IL-12 et ainsi favorise la différenciation Th17 au détriment d'un profil Th1 ou T $\gamma\delta$ 1. L'IL-1 β stabilise le phénotype Th17 chez les lymphocytes T V γ 9V δ 2 néonataux. Pour le rôle de l'IL-23, il est important de distinguer les effets de ces cytokines sur les lymphocytes T V γ 9V δ 2 néonataux de ceux de l'adulte (Figure 11). Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 néonataux de profil Th17 produisent de l'IFN- γ en plus de l'IL-17 en présence d'IL-23 (lymphocytes T $\gamma\delta$ 1/17) ; tandis que sur la population adulte, l'IL-23 est seulement nécessaire au maintien du profil Th17 et n'induit pas la production d'IFN- γ

(47). De plus, l'IL-6 n'est pas nécessaire pour maintenir les lymphocytes T V γ 9V δ 2 Th17 (Figure 11).

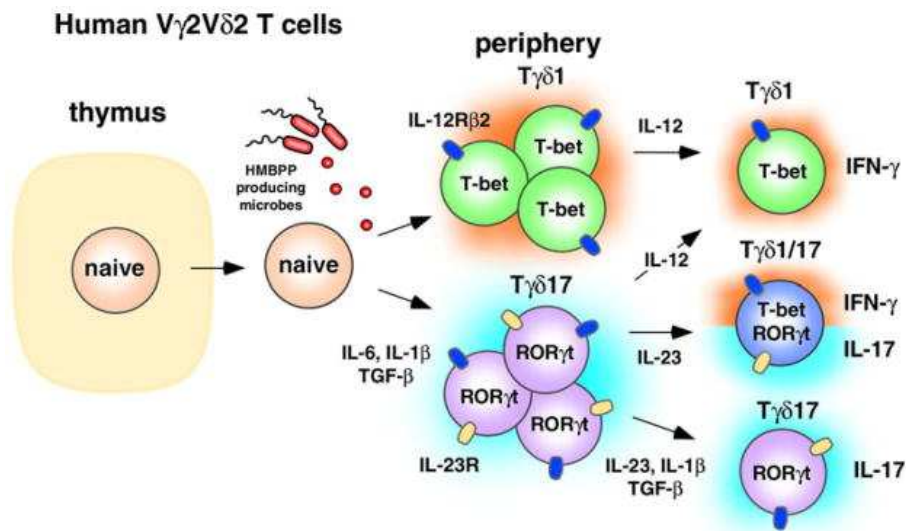


Figure 11 : Régulation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 de profil Th17 (T γ 17). D'après Ness-Schwickerath and Morita (47)

L'environnement cellulaire permettant aux lymphocytes T V γ 9V δ 2 de devenir producteurs d'IL-17 est encore inconnu. La transition des lymphocytes T V γ 9V δ 2 naïfs au phénotype mémoire Th17 s'effectue hors du thymus, dans les organes lymphoïdes périphériques (Figure 12) (47). Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 Th17 ont en général des caractéristiques phénotypiques de type T_{EMRA}. Toutefois, ils possèdent des capacités cytotoxiques moins importantes (87). En effet, les lymphocytes T IL-17⁺ expriment granzyme B, TRAIL, Fas-L, CD161 (marqueur de la production d'IL-17), mais pas de perforines, NKG2D, CD16 et CD56. L'absence de NKG2D, connu pour être exprimé par la majorité des lymphocytes T V γ 9V δ 2, peut s'expliquer par la présence du TGF- β . Il a été décrit que le TGF- β est impliqué dans la diminution de l'expression de NKG2D chez les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺ (87). L'impact de TGF- β sur la downregulation de NKG2D par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 IL-17⁺ reste à démontrer. Le rôle des lymphocytes T V γ 9V δ 2 de profil Th17 reste encore mal compris. Ces cellules pourraient être impliquées dans l'immunité anti-infectieuse (88) et dans les maladies auto-immunes (89).

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 peuvent également se distinguer par leur profil Th22 ou T γ δ 22 caractérisé par la production d'IL-22 (47). Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 de profil Th22 nécessitent les mêmes cytokines que celles qui permettent d'obtenir un profil Th17. Les lymphocytes néonataux ont besoin d'IL-1 β , d'IL-6, et de TGF- β ; tandis que les lymphocytes adultes requièrent de l'IL-23, de l'IL-1 β et du TGF- β (47). Néanmoins, les lymphocytes T V γ 9V δ 2, produisant à la fois de l'IL-17 et de l'IL-22, sont très peu nombreux (47). Ces données suggèrent que le profil Th22 est bien distinct du profil Th17. Cependant, les conditions nécessaires pour séparer ces deux sous-populations fonctionnelles restent à étudier. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 Th22 infiltrent la peau pour lutter contre les pathogènes mais sont aussi impliqués dans les désordres inflammatoires (47).

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 peuvent également avoir un profil T_{FH} (follicular helper) qui appuie la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes B en les aidants à produire des anticorps. Ces lymphocytes T V γ 9V δ 2 sont obtenus par culture avec de l'IL-21 et un phosphoantigène. Cette cytokine induit l'expression des molécules ICOS, CD40-L et CXCR5 à leur surface en parallèle à la stimulation du TCR (90). Ces lymphocytes sécrètent de l'IL-4, de l'IL-10 et CXCL13 qui vont soutenir la production d'anticorps par les cellules B au niveau des organes lymphoïdes secondaires (90).

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 peuvent aussi se différencier vers un profil T_{Reg} (T regulatory) exprimant Foxp3 et affichant une activité régulatrice après activation du TCR par un phosphoantigène en présence d'IL-15 et de TGF- β (Figure 12) (46).

Après 18 à 24 heures de stimulation et en absence de cytokine, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 s'orientent vers un phénotype T_{APC} (T-antigen presenting cell) exprimant à leur surface des récepteurs nécessaires à la présentation d'antigène et à la stimulation d'une réponse immunitaire adaptative tels que les molécules CMH de classe II, CD80, CD86, CD40 et CD54 (Figure 12) (46).

L'existence de nombreux profils de lymphocytes T V γ 9V δ 2, tels que Th1, Th2, Th17, Th22, T_{fh}, T_{-reg} et T_{APC} démontrent la grande plasticité de ces cellules liée à l'interaction avec de nombreuses cytokines.

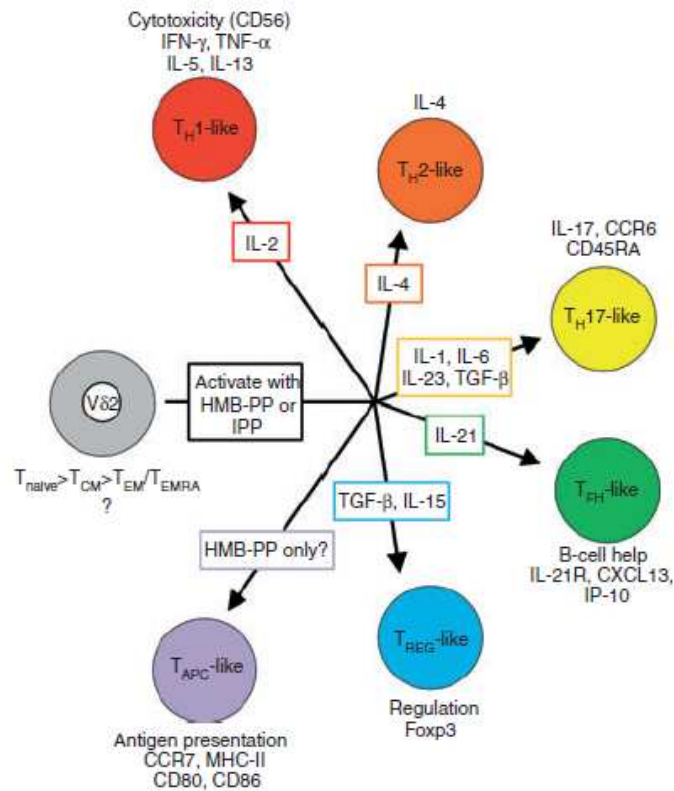


Figure 12 : Orientation des lymphocytes T $V\delta 2$ vers un profil donné en fonction de l'environnement cytokinique. D'après Pang *et al.* (46).

I.2.4. Intérêt des lymphocytes T $V\delta 2$ en immunothérapie des cancers

I.2.4.1. Immuno-surveillance des tumeurs par les lymphocytes T $V\delta 2$

Les lymphocytes T $V\delta 2$ participent à l'immuno-surveillance des cancers comme le prouvent de nombreuses études menées *in vitro*, *in vivo* et *in situ* (Tableau 2).

Plusieurs études *in vitro* démontrent l'activité cytolytique des lymphocytes T $V\delta 2$ vis-à-vis des tumeurs épithéliales du sein (91), de l'ovaire (17), du foie (60), du rein (92), du côlon (93), de la prostate (94), sur des neuroblastomes (95), et des tumeurs hématopoïétiques telles que les leucémies, les lymphomes (96) et les myélomes (97-99). Une étude a montré que les cellules tumorales de leucémie myéloïde aiguë pouvaient être reconnues et éliminées par les lymphocytes T $V\delta 2$ *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin NOD-SCID (98). Ce potentiel anti-tumoral des lymphocytes T $V\delta 2$ a également été

démontré *in vivo* chez des souris nude greffées par des tumeurs de carcinome nasopharyngé ou mammaire (100, 101). Les souris nude ou NOD-SCID ont un système immunitaire déficient : la souris nude n'a pas de lymphocytes T et les souris NOD-SCID n'ont pas de lymphocytes T et B. Après greffe de cellules tumorales, il est possible d'effectuer un transfert adoptif de lymphocytes T V γ 9V δ 2 pour mesurer leur impact sur la reconnaissance anti-tumorale. Le transfert de lymphocytes T V γ 9V δ 2 dans ces modèles était associé à une diminution du volume tumoral et une augmentation de la survie (98, 100, 101).

Critère évalué	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	
		Souris	Humain
Effet Cytotoxique des lymphocytes T V γ 9V δ 2	Tumeur rénale ; du foie ; épithéliale du sein ; de l'ovaire ; du côlon ; cancer de la prostate ; neuroblastome ; Leucémie myéloïde chronique ; myélome ; lymphome ; carcinome rénal ; carcinome de poumon	Leucémie myéloïde chronique ; tumeur nasopharyngée ; cancer du sein	Leucémie ; tumeurs malignes lymphoïdes ; carcinome du rein
Infiltration tissulaire des lymphocytes T V γ 9V δ 2	Carcinome rénal ; cancer de la thyroïde ; du poumon ; lymphome B ; carcinome ovarien		Mélanome ; cholangiocarcinome ; cancer de l'ovaire ; cancer du côlon ; cancer du sein ; cancer du col de l'utérus

Tableau 2 : Capacité cytotoxique et/ou à infiltrer le tissu tumoral des lymphocytes T V γ 9V δ 2 en fonction du type de cancer. (Tableau récapitulatif des données des études)

Chez l'homme, les résultats préliminaires d'essais cliniques menés chez des patients porteurs de tumeurs malignes lymphoïdes ou d'un carcinome rénal sont en faveur d'un potentiel anti-tumoral des lymphocytes T V γ 9V δ 2 (Tableau 2) (97, 102).

Plusieurs études d'immunohistochimie *in situ* ont révélé que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 infiltraient les tumeurs du sein (91), du rein (74, 103), du côlon (93), du poumon (104), de la thyroïde (105), de lymphomes B (106) et aussi de l'ovaire (17, 107) (Tableau 2). Ces lymphocytes T V γ 9V δ 2 infiltrant la tumeur expriment les récepteurs aux chimokines inflammatoires (CXCR4) ce qui explique en partie leur présence au sein de la tumeur (108). L'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 par du zoledronate induit un gain d'expression de récepteurs CCR5 et CXCR3, impliqués dans le homing vers le site de l'inflammation, et diminuent l'expression de CCR7 et CXCR5, impliqués dans la migration vers les ganglions lymphatiques (109, 110).

Cette capacité d'infiltration des tumeurs par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 activés a été récemment confortée par une étude clinique de phase I de transfert adoptif d'effecteurs T V γ 9V δ 2, menée sur dix-huit patients atteints d'un cancer au stade métastatique (mélanome, cholangiocarcinome, adénocarcinome, cancer de l'ovaire, du côlon, du sein, et du col de l'utérus). Dans cette étude, la migration des lymphocytes T V γ 9V δ 2 transférés vers les sites métastatiques tumoraux a été observée par radiomarquage à l'indium (Tableau 2) (110).

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 interviennent aussi indirectement dans l'immunosurveillance des cancers en stimulant les cellules NK. En effet, la capacité cytotoxique des cellules NK peut être augmentée par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 via l'interaction CD-137/CD137-L (Figure 13) (111, 112). Dans ces conditions, la reconnaissance des cellules tumorales, y compris des cellules non reconnues par les NK comme les Daudi, est considérablement augmentée montrant l'importance des interactions entre cellules effectrices pour potentialiser la réponse anti-tumorale. Cet effet est observé après injection d'aminobisphosphonate ou inoculation de lymphocytes T V γ 9V δ 2 activés (111). La raison de cette meilleure reconnaissance est que l'interaction CD137/CD137-L induit l'augmentation de l'expression de NKG2D à la surface des cellules NK (111). A ce jour, aucune étude n'a évalué l'impact des cellules NK sur la fonctionnalité des lymphocytes T V γ 9V δ 2.

L'ensemble de ces données montrent que les lymphocytes T $\gamma\delta 9V\delta 2$ peuvent contribuer à l'immunité anti-tumorale.

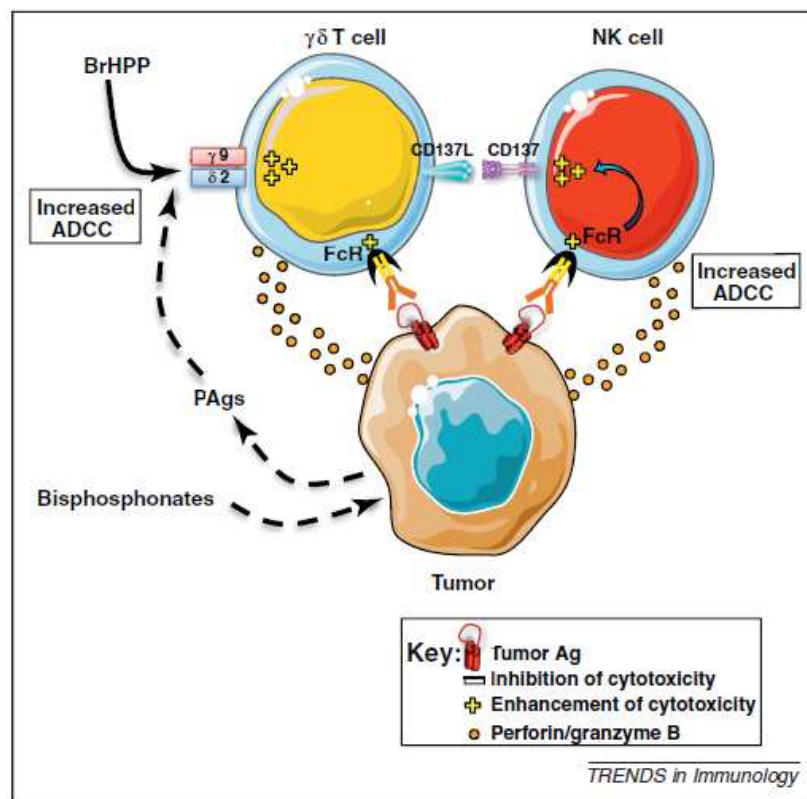


Figure 13 : Impact des interactions entre une cellule NK, un lymphocyte T $\gamma 9V\delta 2$ et une cellule tumorale. D'après Houot *et al.* (111)

I.2.4.2. Intervention des lymphocytes T $\gamma 9V\delta 2$ en immunothérapie des cancers

L'immunothérapie est une voie alternative aux traitements classiques du cancer que sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Elle se caractérise par une spécificité envers les cellules tumorales supérieure à celle des traitements conventionnels. Son principe est de provoquer une réponse du système immunitaire du patient pour que ce dernier élimine par lui-même sa tumeur. Il existe deux grands types d'immunothérapie : l'immunothérapie active et l'immunothérapie passive

Immunotherapy	Cancer type	Treatment arm	No. of patients	PD (%)	SD (%)	PR (%)	CR (%)
Autologous $\gamma\delta$ T cell infusions	Metastatic RCC	+rIL-2 +BrHPP	10	40	60		
	Metastatic RCC	+ZOL +rIL-2	1				100
	Solid tumors	+rIL-2 +BrHPP	28	ND	ND	ND	ND
	Non-small-cell lung cancer	+ZOL +rIL-2	8	63	37	0	
	Non-small-cell lung cancer	+ZOL +rIL-2	15	60	40		
	Solid tumors	$\gamma\delta$ T alone	5	40	40		
	Solid tumors	combination	20	30	5	15	
Bisphosphonate <i>in vivo</i>	Refractory low-grade non-Hodgkin lymphoma and multiple myeloma	rIL-2 d6–d8 No preselection	10	80	10		
		rIL-2 d1–d6 Preselection	9	44	22	33	
	Metastatic hormone-refractory prostate cancer	Phase I ZOL	9	78	11	11	
		Phase I ZOL + rIL-2	9	33	44	22	
	Advanced stage IV breast cancer	ZOL+rIL-2 Phase I	10	70	20	10	

CR, complete response; PD, progressive disease; PR, partial response; SD, stable disease.

Tableau 3 : Sélection des essais cliniques visant à évaluer la sécurité et l'efficacité des transferts adoptifs de lymphocytes T V γ 9V δ 2 (immunothérapie passive) ou l'administration de molécules stimulatrices (immunothérapie active). D'après Hannani *et al.* (99).

1.2.4.2.1. L'immunothérapie active par les lymphocytes T V γ 9V δ 2

Une première méthode consiste à injecter chez le patient du phosphostim™ combiné à de l'IL-2 pour induire une amplification spécifique des lymphocytes T V γ 9V δ 2 de type T_{EM} dans le sang périphérique. La réponse immunitaire obtenue est transitoire avec un retour au niveau basal au bout d'environ 15 jours. Des essais cliniques de faisabilité ont déjà été effectués et montrent une faible toxicité de ces molécules (113).

Une autre méthode consiste à remplacer le phosphostim™ par des aminobisphosphonates comme le zoledronate pour amplifier les lymphocytes T V γ 9V δ 2 (Tableau 3). Dans ces essais cliniques, des stabilisations et des régressions partielles de tumeur ont été observées corrélativement à une augmentation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 circulants. Cependant, des traitements répétés entraînent une diminution de la réponse proliférative des lymphocytes T V γ 9V δ 2 à fois chez les primates sains et chez l'homme, ce qui suggère d'optimiser ce type d'approche.

I.2.4.2.2. L'immunothérapie passive par les lymphocytes T V γ 9V δ 2

Elle consiste à transférer des effecteurs T V γ 9V δ 2 au patient. Classiquement, les PBMCs sont isolées à partir de sang périphérique, puis cultivées *in vitro* en présence d'ABP ou de phosphostim™ et d'IL-2 afin d'amplifier sélectivement les lymphocytes T V γ 9V δ 2. Au bout de deux semaines, une grande quantité de lymphocytes T V γ 9V δ 2 de type T_{EM} est obtenue (de l'ordre du milliard de cellules). L'administration au patient peut se faire par voie générale ou bien par une voie plus localisée comme la voie intra-artérielle ou intra-péritonéale. Cette expansion *ex vivo* a l'avantage de ne pas être perturbée par le microenvironnement tumoral qui pourrait inhiber la prolifération.

Plusieurs essais cliniques utilisant cette stratégie ont déjà été évalués dans divers types de cancers dont le cancer du rein métastatique, le myélome et le cancer du poumon (Tableau 3). Un cas de rémission complète dans le cas du cancer du rein métastatique a été observé. La toxicité de ces approches est faible (102, 111).

I.2.4.2.3. Perspectives pour améliorer l'immunothérapie basée sur les lymphocytes T V γ 9V δ 2

L'immunothérapie basée sur les lymphocytes T V γ 9V δ 2 pourrait être améliorée en les associant avec des anticorps monoclonaux. Dans ce type d'approche, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 exprimant le récepteur FCR γ III/CD16 fixent les anticorps et effectuent de l'ADCC. Une association avec des anticorps monoclonaux utilisés dans le traitement de cancer comme le Rituximab qui cible la molécule CD20, dans les lymphomes Non-Hodgkinien ou encore le trastuzumab qui cible Her2 dans les tumeurs mammaires présente un intérêt (Tableau 4) (114).

Le succès de ces thérapies nécessite une meilleure connaissance des mécanismes de reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 et des mécanismes d'échappement interférant avec cette reconnaissance. Certaines molécules exprimées par les cellules tumorales peuvent en effet les protéger de la lyse. C'est le cas avec la molécule HLA-E qui est décrite comme favorisant l'échappement des cellules tumorales de gliomes

(115) et de mélanome à leur reconnaissance par les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺ (116).

mAb	Target	Indication
Rituximab	CD20	Non-Hodgkin lymphoma
Trastuzumab	HER2	Breast cancer
Alemtuzumab	CD52	Chronic lymphocytic leukemia
Cetuximab	EGFR	Colorectal cancer
Panitumumab	EGFR	Colorectal cancer
Ofatumumab	CD20	Chronic lymphocytic leukemia

Tableau 4 : Anticorps monoclonaux approuvés pour être utilisés en thérapeutique. D'après Houot *and al.* (111).

Dans de nombreux types de cancer, des molécules membranaires comme les nectines par exemple sont surexprimées. Ces dernières peuvent être reconnues par des récepteurs activateurs et favoriser l'élimination de la cellule tumorale. C'est ce que notre équipe a démontré pour l'interaction entre DNAM-1 et son ligand nectine-2 (80). De manière générale, le rôle des nectines dans la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 est très peu documenté. Le travail de thèse a été mené dans cet objectif.

I.3. Transferts membranaires et échanges intercellulaires de protéines

Lors de la formation de la synapse immunologique, la cellule effectrice peut récupérer des morceaux de membrane de la cellule cible et les incorporer à sa propre membrane (117). Ce processus de transfert synaptique est un phénomène actif et rapide (maximum atteint en quelques minutes) (117, 118). Ce mécanisme de transfert de membrane s'appelle « trogocytose » (du grec « trogos » : grignoter) et a d'abord été décrit pour les lymphocytes B et les lymphocytes T CD8⁺ (117). Du fait de ce transfert, la cellule qui trogocyte récupère de manière non spécifique et intacte (non clivée) un certain nombre de protéines de la cellule cible (119). Des études ont montré que les cellules NK, les lymphocytes T $\gamma\delta$ et T CD4⁺ étaient capables de « trogocytter » certains types de cellules tumorales (120).

Le mécanisme de trogocytose n'est pas complètement compris. En ce qui concerne les cellules de l'immunité, la trogocytose a été décrite durant la formation de la synapse entre une cellule présentatrice d'antigène et un lymphocyte T CD4⁺ ou CD8⁺ (Figure 14) (121). L'interaction cellulaire permet l'interaction entre les récepteurs et leurs ligands. Il en résulte l'enlèvement de fragments de membrane après la dissociation de la synapse. Ainsi, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ acquièrent des molécules de surface de la cellule présentatrice d'antigène telles que le CMH de classe I et II ainsi que les molécules de co-stimulation. Cet enlèvement se ferait grâce à la formation de ponts membranaires et de microdomaines de fusion membranaire au sein de la synapse immunologique (119, 122). Ces domaines de fusion permettraient la diffusion de fragments de membrane par diffusion latérale (Figure 15d). La trogocytose requiert nécessairement le contact entre les cellules (118). D'un point de vue méthodologique, le transfert de membrane peut être mis en évidence en marquant la cellule cible par du PKH67, un colorant lipophile qui colore la membrane plasmique (123). Si la cellule effectrice trogocyte la cellule cible, elle acquiert des fragments de membrane contenant du PKH67 mis en évidence par cytométrie en flux (123).

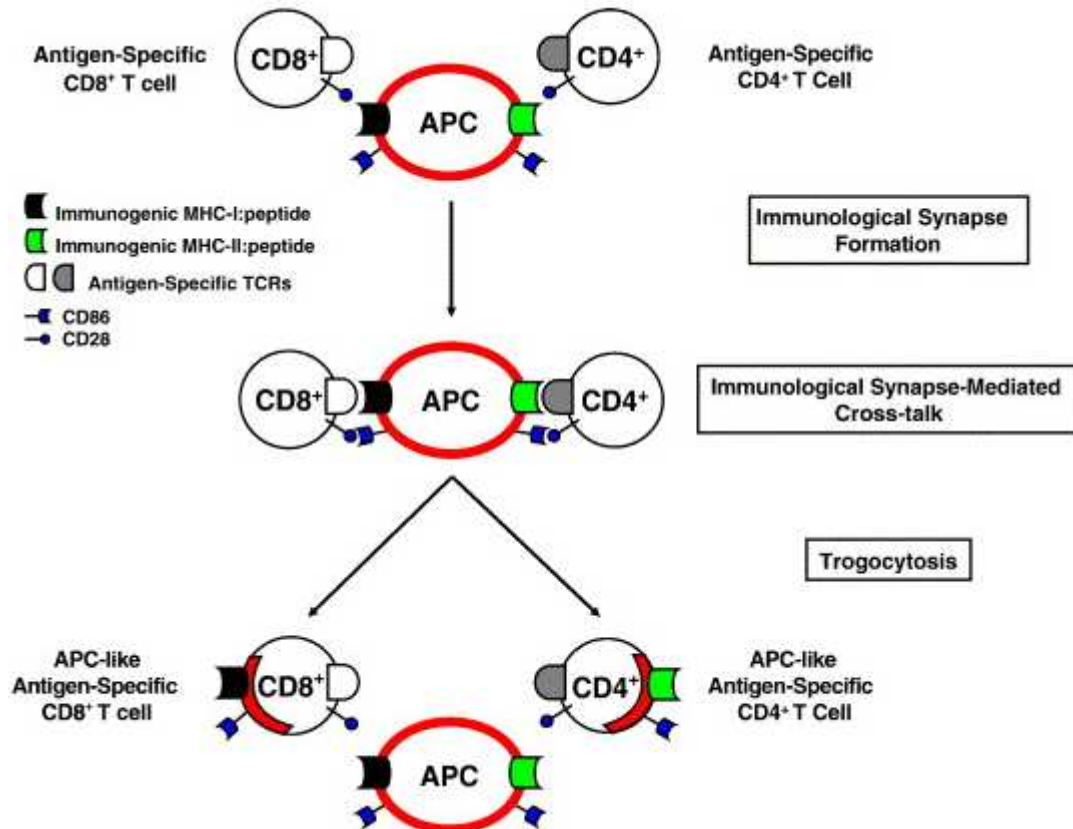


Figure 14 : Modèle mécanistique de la trogocytose entre lymphocytes et APC. D'après Caumertin, lemaout *et al.* (121)

Un mécanisme de transfert membranaire autre que la trogocytose permet également le transfert intercellulaire de protéines. C'est la sécrétion d'exosomes (Figure 15c) (119). Dans ce cas, des corps membranaires ou vésicules sont relargués par les cellules et peuvent être incorporés par une cellule voisine. Contrairement à la trogocytose, elle ne nécessite pas de contact.

En outre, les transferts de membranes ne sont pas les seuls mécanismes d'échange intercellulaire de protéines. Le « uprooting » ou déracinement (Figure 15a) (119) permet, après interaction entre un récepteur et son ligand situés respectivement sur deux cellules en contactes, à une des cellules de déraciner le ligand de son récepteur situé sur la seconde cellule sans pour autant récupérer d'autres éléments de la membrane. En théorie, ce mécanisme est possible bien qu'il n'ait jamais été observé expérimentalement faute d'outils

techniques adaptés. Le deuxième mécanisme d'échange de protéines sans incorporation de membrane est le clivage protéolytique (Figure 15b). Lorsque deux cellules entrent en contact, les couples ligands/récepteurs vont interagir. L'une des protéines peut alors être clivée et une partie de cette molécule reste accrochée à son ligand situé sur l'autre cellule. Enfin, une cellule peut également récupérer une protéine située sur la membrane d'une cellule voisine en formant un nanotube (Figure 15e) (119). Après contact, les cellules forment un nanotube, issu des membranes des deux cellules, qui échangent alors des protéines.

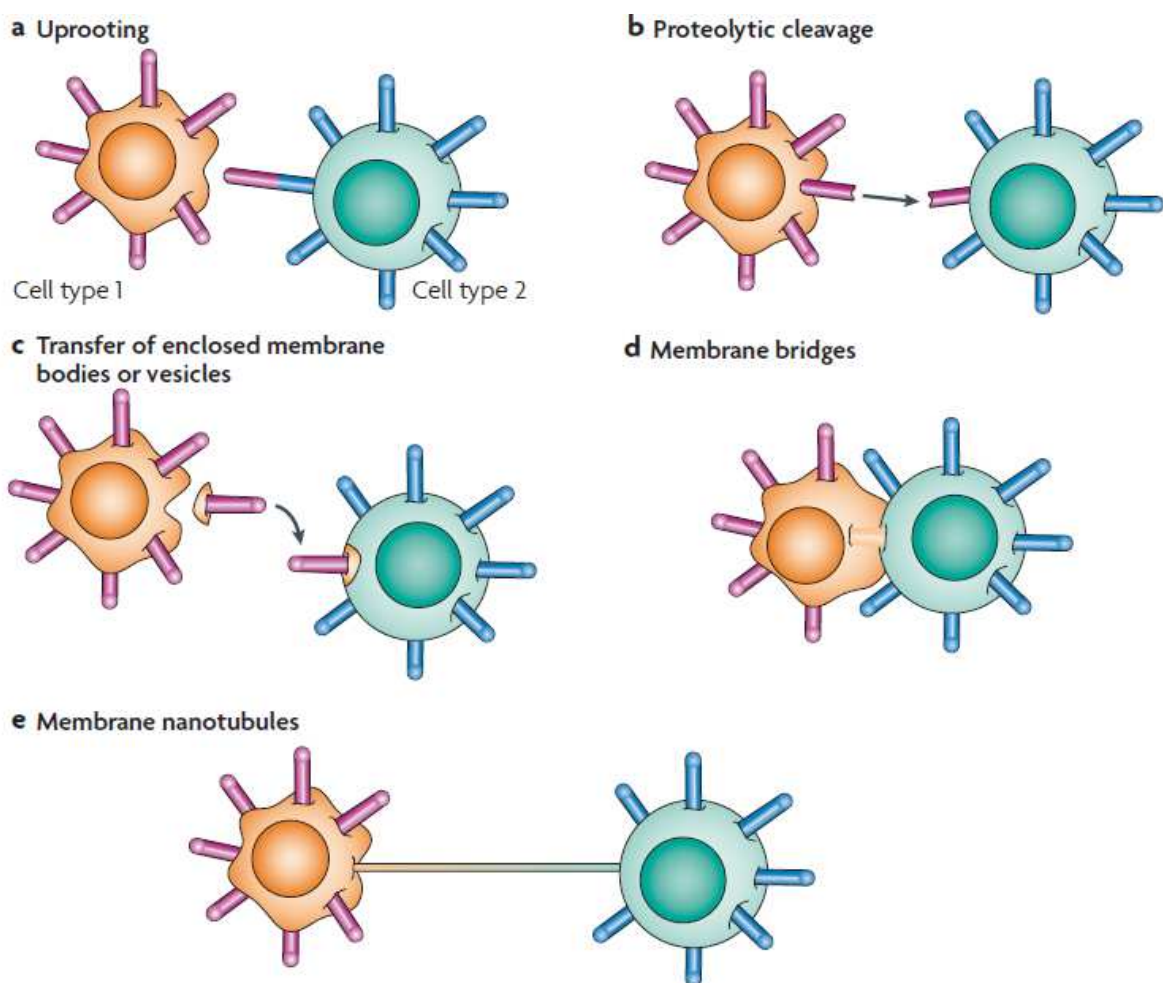


Figure 15 : Les différents mécanismes d'échange intercellulaire de protéines. D'après Davis. (119)

Les conséquences fonctionnelles de ces échanges intercellulaires de protéines chez les lymphocytes T sont multiples. Ils peuvent soutenir leurs fonctions effectrices comme la sécrétion de cytokine, l'initiation de la réponse immunitaire et la prolifération (117, 124). Cependant, ils peuvent également abroger la réponse des cellules T. En effet, lorsque les lymphocytes T récupèrent le complexe peptide/CMH suite à l'interaction avec des cellules APC, ils deviennent de ce fait susceptibles de subir une lyse fratricide (117, 124). Il en est de même lorsque les lymphocytes récupèrent ainsi des récepteurs de mort. C'est le cas des lymphocytes T CD8⁺ qui incorporent, par trogocytose des APC et des cellules tumorales, la protéine PD-L1 (Programmed Death Ligand 1) (125). De même, l'incorporation par trogocytose de ligands activateurs par les lymphocytes T peut déclencher la downrégulation et/ou l'internalisation des récepteurs des cellules voisines et ainsi réduire la réponse immunitaire (124, 126). Par ailleurs, la trogocytose peut induire également l'anergie des cellules effectrices (124, 125). Par exemple, la molécule HLA-G est connue pour rendre les cellules effectrices anergiques et peut dans certains cas être récupérée par trogocytose par les cellules NK et les lymphocytes T (125, 127). Pour finir, le transfert intercellulaire de protéines permet aussi à des cellules de récupérer des récepteurs à virus qu'elles ne possédaient pas initialement (119). De ce fait, elles deviennent susceptibles d'être infectées à leur tour.

I.4. Les nectines et les molécules de type nectine (nectin-like)

I.4.1. Généralités et structures

I.4.1.1. Les membres de la famille des nectines et molécules nectin-like

Les nectines et les molécules nectines-like (necls) sont des protéines transmembranaires impliquées dans l'adhérence cellulaire. Elles appartiennent à la super famille des immunoglobulines. Elles jouent un rôle essentiel dans la régulation d'activités cellulaires comme la polarisation, la différenciation, la motilité, la prolifération et la survie des cellules (128). La famille des nectines regroupe quatre molécules alors que les necls sont au nombre de cinq (Tableau 5). Les premières nectines isolées sont la nectine 1 et la nectine 2. Elles ont été décrites comme étant respectivement le récepteur d'internalisation cellulaire de l' α -herpesvirus PRR1 et PRR2 (129, 130). Ces molécules ont été rebaptisées nectine à partir du nom latin *necto* qui signifie « connecter » (128).

Member	Old nomenclature	Function	Knockout mouse phenotype
Nectin-1	PRR1, HVEC	Cell-cell adhesion molecule Receptor for α -herpes virus (HSV-1, HSV-2 and pseudorabies virus) entry into cells. (Defects in humans: cleft lip/palate-ectodermal dysplasia syndrome, also known as Zlotogora-Ogur syndrome)	Microphthalmia, skin abnormalities and abnormal mossy-fibre trajectories in the hippocampus
Nectin-2	PRR2, HVEB	Cell-cell adhesion molecule Receptor for α -herpesvirus entry into cells	Male-specific infertility
Nectin-3	PRR3	Cell-cell adhesion molecule	Male-specific infertility Microphthalmia and abnormal mossy-fibre trajectories in the hippocampus
Nectin-4	–	Cell-cell adhesion molecule Overexpressed in breast carcinoma	–
NECL-1	TSLL1, SynCAM3	Cell-cell adhesion molecule with neural tissue-specific expression: localized at contact sites between axons and glial cells or Schwann cells but not at synaptic junctions	–
NECL-2	IGSF4, RA175, SgIGSF, TSLC1, SynCAM1	Cell-cell adhesion molecule that is localized on the basolateral membranes in epithelial cells Involved in spermatogenesis and synapse formation Tumour suppressor in lung carcinoma	Male-specific infertility
NECL-3	Similar to NECL3, SynCAM2	Putative cell-cell adhesion molecule	–
NECL-4	TSLL2, SynCAM4	Cell-cell adhesion molecule Mediates axo-glial interaction, Schwann cell differentiation and myelination Possible involvement in tumour suppression	–
NECL-5	TAGE4, PVR, CD155	Receptor for poliovirus Overexpressed in various carcinomas Enhancement of cell movement and proliferation (in cooperation with integrin $\alpha\beta3$ and PDGF receptor)	–

CAM, cell adhesion molecule; HSV, herpes simplex virus; HVE, herpesvirus entry; PDGF, platelet-derived growth factor; PRR, poliovirus receptor-related protein; PVR, poliovirus receptor.

Tableau 5 : Membres de la famille des nectines et des necls et leurs principales fonctions. D'après Takai, Myoshi *et al.* (128)

Les nectines interviennent dans la formation de nombreux types de jonctions cellulaires telles que les jonctions adhérentes (AJs) entre les cellules épithéliales et les fibroblastes, les cellules de Sertoli et les spermatides dans les testicules et les jonctions puncta adhaerens dans le système nerveux. De plus, elles participent à la formation des jonctions serrées (tight junctions) dans les cellules épithéliales et à la polarisation de la cellule (128).

I.4.1.2. Structure et partenaires moléculaires

Les nectines et les necls présentent des domaines communs incluant une région extracellulaire avec trois boucles d'immunoglobuline, un segment transmembranaire (TM) et une queue cytoplasmique avec laquelle plusieurs protéines peuvent interagir (Figure 16a) (128). Les nectines interagissent avec la protéine afadine (filamentous(f)-actin-binding protein) et avec PAR3 (cell polarity protein partitioning defective-3) ; tandis que les necls interagissent avec les protéines d'échafaudage telles que les membres de la famille des MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) ou de la famille de la Band 4.1 ou encore avec la protéine TCTEX1 (128) (Figure 16a). La capacité à lier l'afadine est le critère qui permet de distinguer les nectines des necls. Seules les nectines lient l'afadine. L'afadine est une protéine liant l'actine-F qui est localisée dans les Ajs (131).

Deux nectines ou necls à la surface d'une même cellule constituent un dimère cis qui peut former ensuite une dimérisation trans par contact avec un dimère porté par une cellule voisine et former ainsi une structure d'adhérence cellulaire (Figure 16b). Nectines et cadhérines coopèrent pour établir des AJs. Contrairement aux cadhérines, les nectines créent des contacts cellulaires en formant des dimères *trans* homophiliques ou hétérophiliques. Les interactions *trans* hétérophiliques sont plus fortes que les interactions *trans* homophiliques. Elles concernent notamment les liaisons entre la Nectine-1 et la Nectine-3, la Nectine-2 et la Nectine-3, et entre la Nectine-1 et la Nectine-4 (Figure 16c) (128). Ces interactions *trans* contribuent au contact et à l'adhérence cellulaire de nombreux types de cellules, comme par exemple les cellules épithéliales.

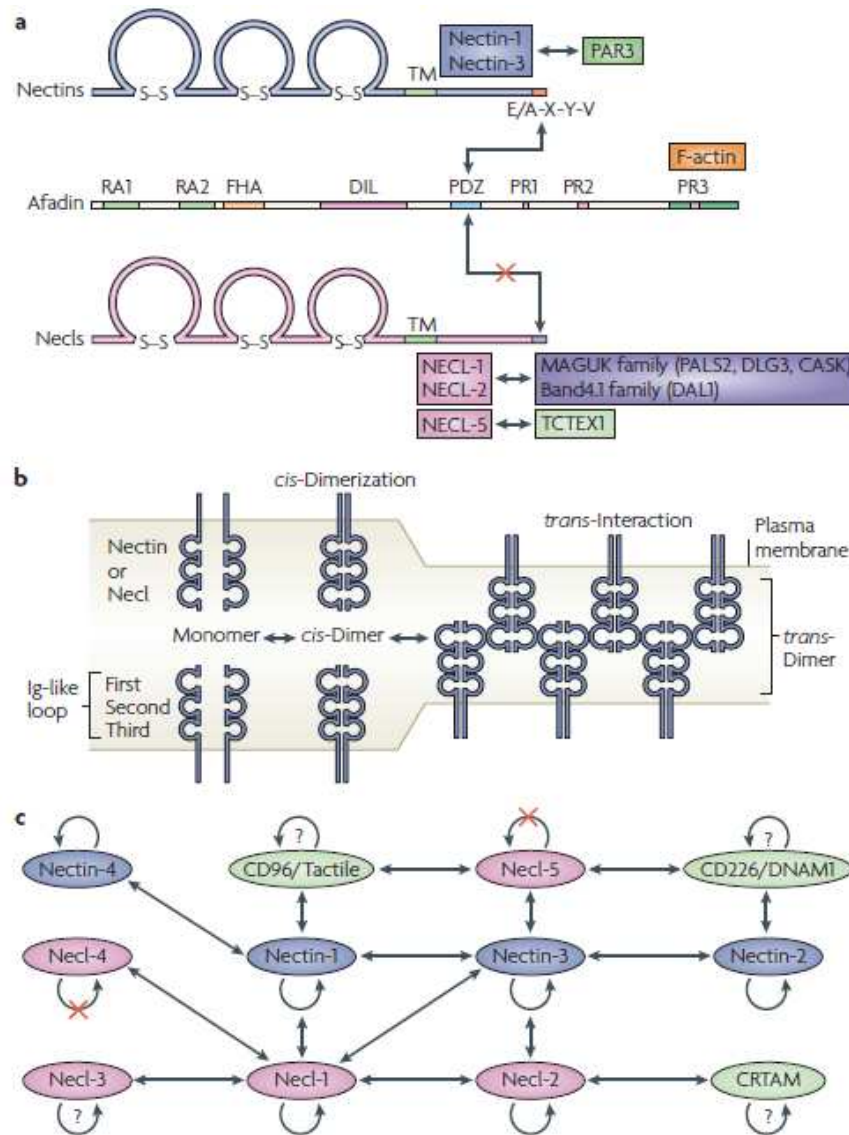


Figure 16 : Structure moléculaire et mode d'interaction des nectines et des necls. D'après Takai, Myoshi *et al* (128). a) Les nectines et necls contiennent trois boucles dans leur région extracellulaire, un seul segment transmembranaire et une queue cytoplasmique. Les nectines possèdent un motif consensus de 4 acides aminés dans la partie c-terminale qui interagit avec la protéine afadine au niveau de son motif PDZ (PSD95 Dlg1 Zo-1 domain). L'afadine lie l'actine-F permettant de relier les nectines au cytosquelette. Nectine-1 et Nectine-3 lient la protéine PAR3. Les necls sont très proches des nectines mais elles ne lient pas l'afadine. Cependant, Necl-1 et Necl-2 interagissent avec les protéines d'échaffaudage MAGUK et Band 4.1, et Necl-5 lie la protéine TCTEX1. b) Deux nectines et necls situées sur la même membrane plasmique forment des dimères *cis* puis forment des interactions *trans* au niveau des boucles d'immunoglobulines avec une autre cellule. c) Nectines, necls et d'autres molécules membres de la famille des immunoglobulines (CD96, CD226 et CRTAM) forment des interactions homophiles et/ou hétérophiles *trans* avec d'autres.

En plus d'effectuer des interactions *trans* entre nectines et necls, celles-ci forment des interactions *trans* hétérophiliques avec d'autres molécules de la famille des immunoglobulines, comme DNAM-1 (CD226), CD96 (connue sous le nom de Tactile) et CRTAM (Class-I restricted T cell associated molecule ou CD355) (132-134) (Figure 16c). Ces molécules sont principalement exprimées à la surface des cellules de l'immunité telles que les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK.

I.4.1.3. Rôle dans l'adhérence cellulaire

Les nectines et les cadhérines participent et coopèrent à l'organisation d'AJs dans les cellules épithéliales et les fibroblastes. La présence des necls est facultative dans la formation de connexions cellulaires dans différents organes.

I.4.1.3.1. Formation des jonctions adhérentes (AJs) par les nectines et les cadhérines

Les nectines sont les premières à initier la formation AJs, bien avant les cadhérines. Après le contact, les nectines interagissent avec l'afadine au niveau cytoplasmique afin de réorganiser le cytosquelette (128) (Figure 17a). Par la suite, l'afadine interagit avec une protéine appelée ponsine. Ce complexe active la protéine RAC et CDC42 par l'intermédiaire de protéines liant l'actine telles que IQGAP1 (IQ-motif-containing GTPase-activating protein-1). Cette étape permet la migration des cadhérines vers l'AJs (Figure 17b). Les cadhérines se lient directement à la β -caténine au niveau de leur région C-terminale. La β -caténine interagit avec l' α -caténine qui est reliée à l' α -actinine et à la vinculine ; tandis que p120^{ctn} régule l'adhérence et la stabilité des cadhérines. L' α -caténine, l' α -actinine et la vinculine sont des protéines liant l'actine-F permettant aux cadhérines de s'ancrer dans le cytosquelette d'actine (Figure 17c). Les cadhérines, l' α -caténine, la β -caténine et p120^{ctn} sont largement distribuées le long de la membrane plasmique latérale et sont surtout présentes dans les AJs chez les cellules épithéliales ; tandis que l' α -actinine et la vinculine sont localisées strictement dans les AJs. L'afadine et l' α -caténine interagissent indirectement par l'intermédiaire de la liaison entre la ponsine et la vinculine, et également par la liaison entre l' α -actinine et les protéines ADIP et LMO7 (Figure 17c). Il en résulte la formation d'un

complexe stabilisé par la molécule Rac, préalablement activée par les cadhérines, car elle inhibe l'endocytose des cadhérines (128) (Figure7d).

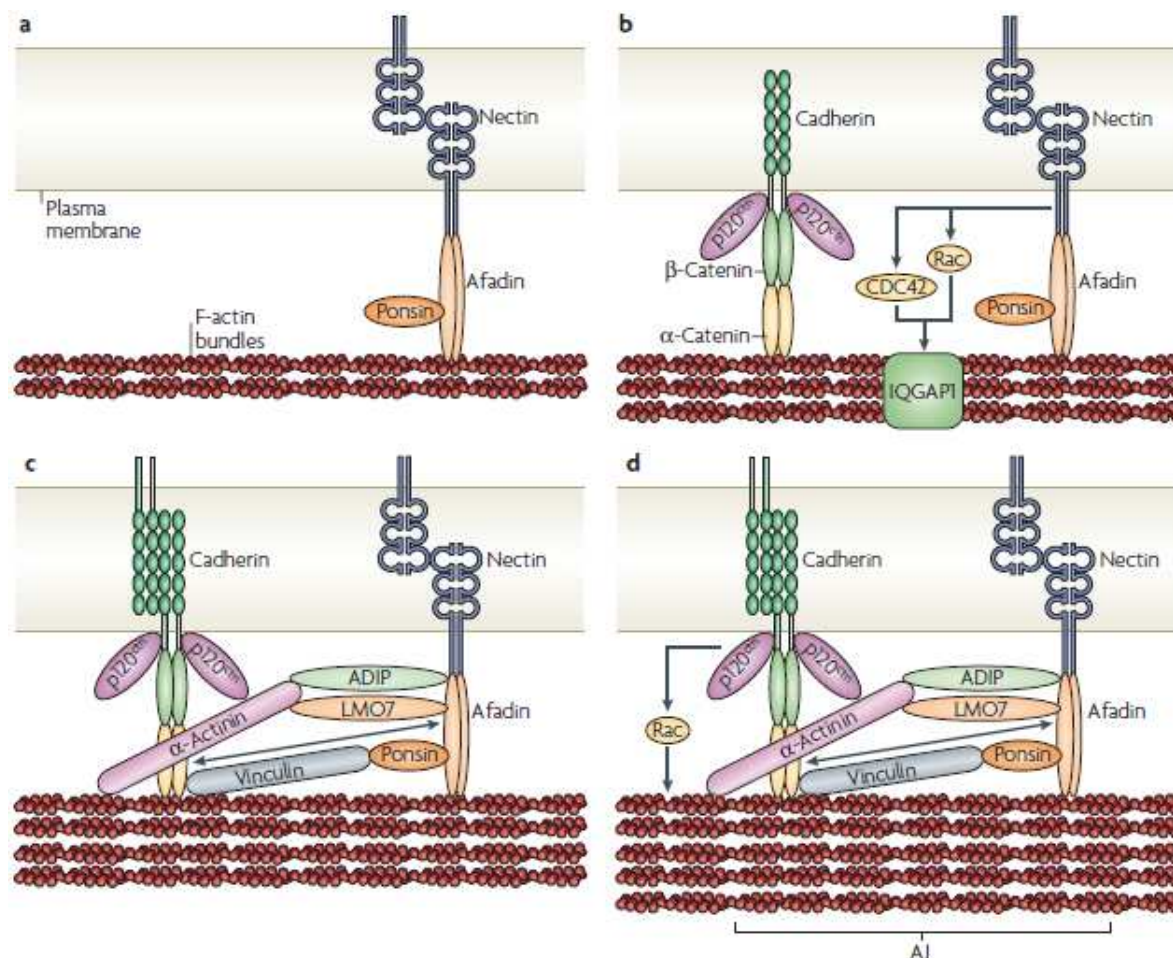


Figure 17 : Réorganisation dynamique du cytosquelette lors de la formation de jonctions adhérentes. D'après Takai, Miyoshi *et al.* (128). a) La première étape de la réorganisation du cytosquelette d'actine commence après le contact cellule à cellule qui est initiée par le complexe nectine-afadine. A cette étape, l'afadine lie la ponsine qui est impliquée dans la connexion entre le complexe nectine-afadine et cadhérine-caténine (montré en c). b) La seconde étape implique l'activation de la protéine Rac et de CDC42 par la protéine IQGAP1. c) La troisième étape est induite par plusieurs complexes tels que ponsine-vinculine et α -actinine-ADIP-LMO7 qui relient l' α -caténine au complexe nectine-afadine. Il en résulte l'interaction *trans* des cadhérines. d) La quatrième étape est induite par l'activation de Rac par les cadhérines qui inhibent l'endocytose des cadhérines et stabilisent ainsi les AJs.

I.4.1.3.2. La signalisation intracellulaire induite par les nectines

Durant la formation d'AJs, les nectines s'associent avec l'intégrine $\alpha\beta3$, sous forme activée après sa liaison avec la Taline. Cette association permet l'activation de la tyrosine kinase Src (Figure 18a). Ensuite, Src activée induit l'activation de la protéine RAP1 à travers les protéines Crk et C3G, et phosphoryle FRG et VAV2 au niveau d'une tyrosine (128). RAP1 activée active FRG phosphorylée, ce qui conduit à l'activation de CDC42 qui entraîne une réorganisation du cytosquelette et la formation de filopodes. CDC42 activée augmente l'activation de VAV2 phosphorylée et induit l'activation de Rac et la formation de lamellipodes. Les filopodes et les lamellipodes, qui sont habituellement formés dans les cellules en mouvement, se forment dans des cellules immobilisées par ces voies de signalisation et contribuent à la formation de jonctions cellulaires (128). Après la formation de ces AJs, la protéine $\alpha\beta3$ est inactivée ce qui renforce la stabilité des AJs. Ces interactions, faisant intervenir les nectines, vont avoir des conséquences pour la cellule qui dépendront des types de nectine et de necl en jeu (Figure 18b).

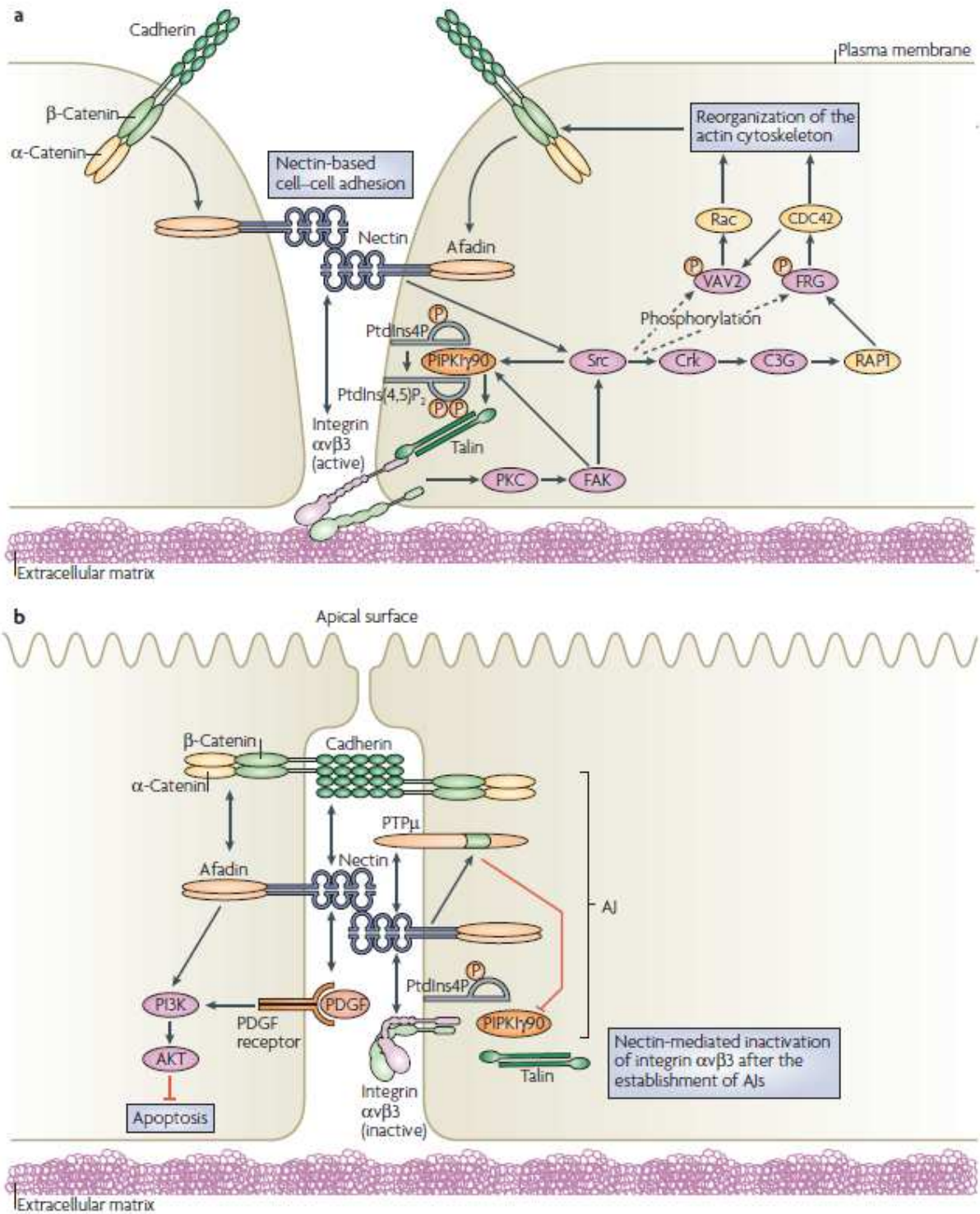


Figure 18 : Signalisation intracellulaire induite par les nectines pendant (a) et après (b) la formation de jonctions adhérentes. D'après Takai, Miyoshi *et al.* (128).

I.4.1.4. Les fonctions des principales nectines et necls

Dans ce chapitre sera défini le rôle des principales nectines et necls qui sont Nectine-2, Nectine-3, Nectine-4, Necl-1 et Necl-5. La molécule Necl-2, ciblée dans ce travail de thèse, fera l'objet d'un chapitre à part.

I.4.1.4.1. Fonction de Nectine- 2

Nectine-2 est un récepteur d'entrée du virus herpès simplex de type 2. Son absence est associée à l'infertilité masculine (135). Cette molécule a pour ligands Nectine-2 elle-même, Nectine-3 et DNAM-1. Ce dernier est un récepteur activateur exprimé par les cellules NK, les monocytes et les lymphocytes T dont les lymphocytes T V γ 9V δ 2 (80, 136). Nectine-2 est sur-exprimée dans les carcinomes colorectaux, les neuroblastomes, et les leucémies myéloïdes (137). Dans un modèle de souris inoculées avec des cellules tumorales transfectées pour exprimer Nectine-2, l'interaction de DNAM-1 avec Nectine-2 empêche le développement de ces cellules (137). De même, chez les souris déficientes en DNAM-1, le développement des tumeurs est accéléré. Ces données montrent bien que Nectine-2 a un fort impact sur la progression tumorale. De plus, le gène codant Nectine-2 est décrit comme étant un gène activateur de tumeur intervenant dans de nombreuses étapes de la cancérogenèse telles que la prolifération, la migration, et la formation de métastases (136).

I.4.1.4.2. Fonction de Nectine-3

Nectine 3 s'associe physiquement et fonctionnellement avec le récepteur au PDGF (platelet-derived growth factor) au niveau des zones de contact cellulaire et semble contribuer à la survie cellulaire dépendante du PDGF en inhibant l'apoptose (138). L'afadine a également un effet anti-apoptotique comme cela a été montré dans une étude sur des corps embryonnaires qui sont issus de cellules souches embryonnaire afadine^{-/-} (128). La voie de signalisation phosphoinositide 3-kinase (PIK)-AKT du récepteur au PDGF intervient dans l'inhibition de l'apoptose par le couple Nectine-3/afadine (Figure 18b). Cependant, la manière dont le complexe nectine-afadine et le récepteur au PDGF induisent la survie des cellules par la voie de signalisation de AKT reste indéterminée. Au vu des questions

soulevées, plusieurs études sont encore nécessaires pour mieux comprendre la signalisation impliquée dans la survie cellulaire par le couple Nectine-3 et afadine.

I.4.1.4.3. Fonction de Nectine-4

Nectine-4, contrairement aux autres nectines, n'est présente physiologiquement qu'au stade embryonnaire. Chez l'adulte, cette protéine est exprimée dans des tumeurs mammaires jugées de mauvais pronostic et est absente des tissus sains (136). Nectine-4 est clivée par la métalloprotéase ADAM17 (disintegrin and metalloprotéinase domain 17) appelée aussi TACE (tumor necrosis factor- α -converting enzyme). La région intercellulaire se retrouve ainsi solubilisée et est détectée dans le sérum des patientes atteintes de carcinome mammaire métastatique. De plus, Nectine-4 a été identifiée dans le sérum de patients atteints de carcinome pulmonaire non-à-petites cellules (136). Cette molécule est considérée comme un antigène de type oncofœtale, au même titre que l'antigène carcinoembryonnaire (ACE), et représente une cible de choix en immunothérapie de ces cancers.

I.4.1.4.4. Fonction de Necl-1

Necl-1 est une protéine spécifiquement exprimée dans les neurones. Elle intervient dans la formation des synapses au niveau de l'hippocampe en interagissant avec ses ligands Nectine-1 et Nectine-3 (139, 140). Les jonctions synaptiques ainsi créées régulent la neurotransmission et le remodelage synaptique d'axones voisins. Un rôle suppresseur de tumeur de Necl-1 a également été mis en évidence. En effet, sa perte d'expression induit la tumorigenèse dans le modèle du cancer du côlon des gliomes humains (136, 141). De même, la ré-expression de Necl-1 par des cellules tumorales est associée à la diminution de la croissance tumorale dans les gliomes humains (136). Son action suppressive de tumeur serait due à sa capacité d'induire l'arrêt du cycle cellulaire par un mécanisme encore inconnu (136).

I.4.1.4.5. Fonction de Necl-5

Necl-5 a été identifiée comme étant le récepteur du poliovirus humain (PVR aussi connu sous le nom de CD155) (142, 143). Elle est aussi connue sous le nom de TAGE4 chez les rongeurs où elle est surexprimée dans le carcinome de côlon (144). L'expression de Necl-5 est très basse dans la majorité des organes adultes, mais elle est abondante dans le foie en développement ou en régénération (145, 146). De plus, Necl-5 est surexprimée dans les carcinomes, les mélanomes. Elle induit leur prolifération cellulaire (147-149). Ces données conduisent à considérer la surexpression de Necl-5 comme un marqueur tumoral semblable à Her2 dans le cancer du sein.

Des études montrent que Necl-5 joue un rôle dans l'adhérence cellulaire (150-153), la migration (154-156) et la prolifération (149). Elle permet l'adhérence cellulaire à travers une interaction *trans* avec nectine-3 (150, 152). Des expériences réalisées avec des fibroblastes, montrent que la dimérisation *trans* provoque le recrutement de E-cadhérine par nectine-3 dans les étapes précoces du contact cellulaire (153). Necl-5 est colocalisée et fonctionnellement associée avec $\alpha\beta 3$ selon les mécanismes décrits à la Figure 15. Elle est contenue dans les microdomaines de la membrane et est impliquée dans la motilité cellulaire (154). Par ailleurs, Necl-5 active la cascade de signaux Ras-Raf-MEK-ERK qui raccourcissent la phase G1 et induisent la prolifération cellulaire dépendante de PDGF (157). Pour ce faire, Necl-5 séquestre et inhibe la molécule Sprouty2 qui est un inhibiteur de la voie Ras-Raf-MEK-ERK (157).

Necl-5 régule l'inhibition de contact des cellules (139). En effet, Necl-5 peut former un complexe avec l'intégrine $\alpha\beta 3$ et le récepteur au PDGF au moment de la migration cellulaire (154). Quand Necl-5 forme des dimères *trans* avec nectine-3, Necl-5 se retrouve sous-exprimée à la membrane entraînant une réduction de la prolifération et de la mobilité cellulaire (158). La downrégulation de Necl-5 entraîne une réduction du signal avec l'intégrine $\alpha\beta 3$ et du signal avec le récepteur au PDGF et favorise ainsi l'arrêt de la croissance cellulaire lorsque la culture cellulaire est à confluence (158). Ce phénomène associant Necl-5 explique en partie l'inhibition de contact observée en culture cellulaire.

Necl-5 lie DNAM-1 qui est très exprimée par les leucocytes et les plaquettes (133). Cette interaction entre les plaquettes et les cellules tumorales exprimant Necl-5 peut conduire à la formation d'embolie tumorale et de métastases. Néanmoins, l'interaction Necl-5/DNAM-1 induit également la cytotoxicité anti-tumorale des cellules NK, ainsi que des lymphocytes T V γ 9V δ 2 (80, 133). De la même manière, l'interaction Necl-5/DNAM-1 régule la migration des monocytes à travers les jonctions cellulaires endothéliales (159) et participe à la suppression de la maturation des ostéoclastes (160).

I.4.2. Necl-2

Necl-2 est codée par le gène *TSLC1/IGSF4* (Tumor suppressing lung cancer 1/Immunoglobulin superfamily 4) situé sur le chromosome 11. Necl-2 est appelée aussi TLSC1/SgISF/RA175/SynCAM1 selon la situation biologique dans laquelle elle s'exprime (161). C'est une molécule transmembranaire impliquée dans l'adhérence cellulaire appartenant à la super-famille des immunoglobulines (162, 163). Elle est principalement décrite dans l'adhérence impliquant les cellules épithéliales. Les molécules Necl-2 humaines et murines jouent un rôle dans l'adhérence des spermatozoïdes avec les cellules de Sertoli, des mastocytes avec les fibroblastes, des neurones présynaptiques avec les neurones postsynaptiques, des cellules tumorales avec les cellules NK, et des cellules présentatrices d'antigène avec les lymphocytes T CD8⁺, à travers des interactions homophiliques ou hétérophiliques.

I.4.2.1. Structure de Necl-2

Necl-2 est une protéine transmembranaire de classe I de 442 acides aminés, contenant un domaine extracellulaire constitué de trois boucles d'immunoglobulines, un domaine transmembranaire et un court domaine intracellulaire (Figure 19a) (161). Sa structure est proche des nectines mais Necl-2 ne s'associe pas avec l'afadine. Le poids moléculaire de Necl-2 varie en fonction de la nature du tissu qui l'exprime. Il est de 75 kD dans l'épithélium normal du poumon, 70 kD dans le cerveau, et approximativement 100 kD dans les testicules (161). Des modifications post-traductionnelles ainsi que l'épissage alternatif semblent être impliqués dans ces différences de poids moléculaire entre les tissus.

Necl-2 forme des homodimères à travers des interactions en *cis* au niveau latéral des cellules polarisées et possède une activité d'agrégation cellulaire à travers des interactions homophiliques en *trans* qui sont calcium et magnésium indépendantes (Figure 19b) (161). Necl-2 peut également former des liaisons avec les molécules Necl-1, Nectine-3 et CRTAM (161).

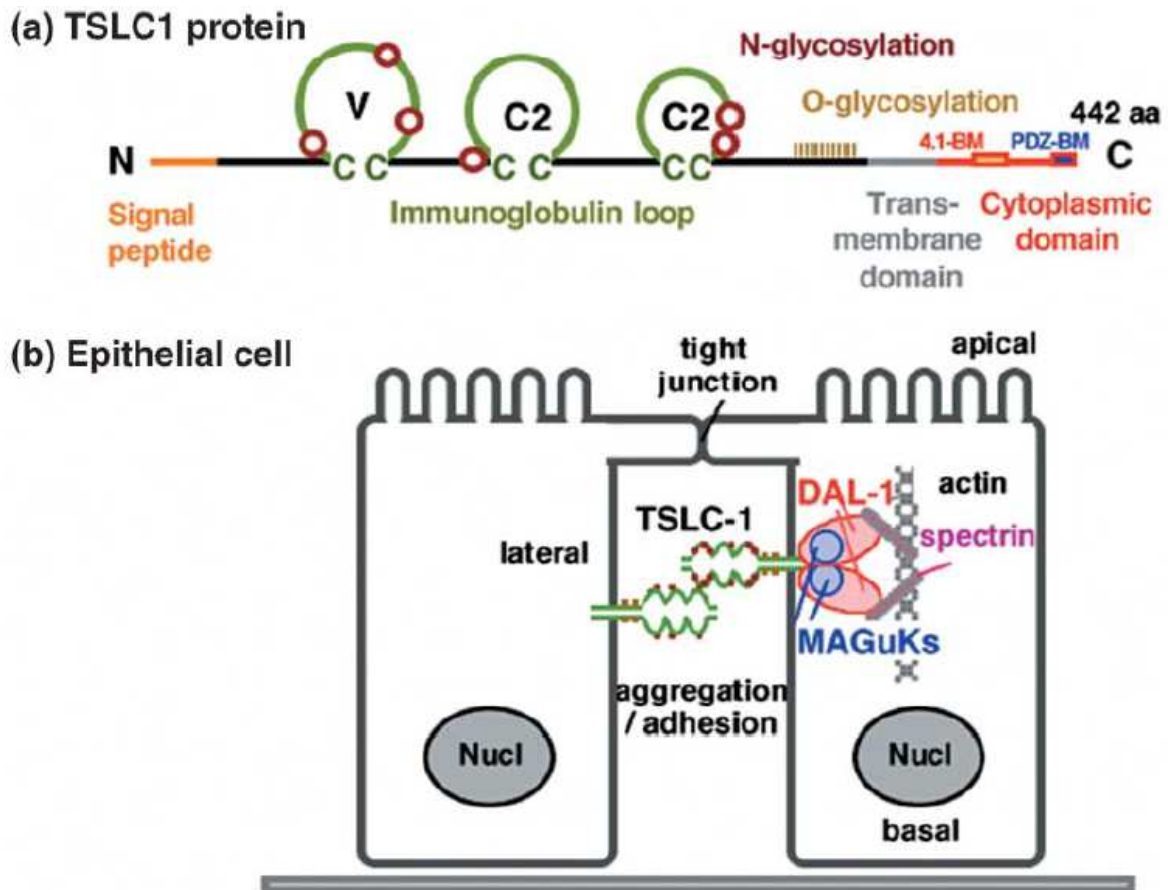


Figure 19 : Représentation schématique de la protéine Necl-2. D'après Murakami (161). (a) Structure de Necl-2. (b) Localisation cellulaire de Necl-2 et ses partenaires intra-cytoplasmiques.

Le domaine cytoplasmique de Necl-2 est constitué de 46 acides aminés incluant les motifs liant les protéines 4.1 et le motif PDZ. La protéine DAL-1/4.1-B est membre de la famille des protéines 4.1 qui sont connues pour lier le couple spectrine-actine (164). Cette protéine interagit avec Necl-2 au niveau du motif liant les protéines 4.1. Necl-2 interagit avec les filaments d'actine et transmet le signal d'adhérence cellulaire via une réorganisation du

cytosquelette (165). Le motif liant PDZ est situé au niveau C-terminal et lie les protéines appartenant aux guanylates kinases associées à la membrane (MAGuK). CASK, MPP3, Pals2 et synténine sont les MAGuK qui ont été identifiées comme étant des partenaires de Necl-2 (166, 167). Ces molécules sont des protéines d'échafaudage qui régulent la polarité cellulaire au moins en partie (168). Necl-2, DAL-1/4.1-B et les molécules MAGuK forment un complexe protéique qui participe à l'adhérence des cellules épithéliales (Figure 19b).

DAL-1/4.1-B est considérée comme un complexe moléculaire de type suppresseur de tumeur dans les adénocarcinomes pulmonaires de type NSCLC (Non-small-cell lung carcinoma). En effet, DAL-1/4.1-B a été décrite à l'origine comme étant une molécule dont l'expression était sous-exprimée dans ces tumeurs (169). La réexpression expérimentale de DAL-1/4.1-B dans ces tumeurs supprime la croissance tumorale (169). De plus, l'hyperméthylation de DAL-1/4.1-B est observée dans 57% des NSCLC primaires et est un marqueur de mauvais pronostic chez les patients atteints de ce type d'adénocarcinome (170). Ces données suggèrent que la cascade Necl-2/ DAL-1/4.1-B est impliquée dans la carcinogénèse et 80 % des NSCLC ont un de ces gènes inactivé (Tableau 7) (161). Par contre, le rôle des molécules MAGuK est inconnu dans les tumeurs humaines.

		<i>DAL-1/4.1B</i>		Total
		Methylated	Unmethylated	
<i>TLSC1/IGSF4</i>	Methylated	11 (23%)	10 (21%)	21 (44%)
	Unmethylated	18 (37%)	9 (19%)	27 (56%)
	Total	29 (60%)	19 (40%)	48 (100%)

Tableau 6 : Méthylation du promoteur des gènes *TLSC1/IGSF4* et *DAL-1/4.1B* du cancer du poumon humain non à petites cellules. D'après Murakami (161)

I.4.2.2. Circonstance de la découverte de Necl-2

Le cancer du poumon non à petites cellules est une tumeur maligne humaine, réfractaire aux approches thérapeutiques, qui est caractérisée par de nombreuses altérations génétiques impliquant l'activation d'oncogènes (K-ras et les gènes EGFR), et

l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur comme *TP53*, *CDKN4A* et *RB* (171, 172). Le gène suppresseur de tumeur *TLSC1* a été identifié par clonage fonctionnel (163, 173).

Une étude a démontré que la lignée pulmonaire A549 avait perdu un fragment génique de 5 CM dans la région 11q23.2 du chromosome 11 (163). La question de l'existence d'un gène suppresseur de tumeur dans cette région chromosomique s'est donc posée. La réponse à cette question a été obtenue en insérant des fragments de la région 11q23.2 dans cinq YAC (Yeast artificial chromosome) avant de les introduire dans la lignée pulmonaire A549 par fusion de sphéroplaste (163). Cette technique a permis d'identifier le gène suppresseur de tumeur *TSLC1* en déterminant le fragment génique incorporé par les hybrides dans lesquels l'activité tumorale avait disparu.

I.4.2.3. Dualité du rôle de Necl-2 dans l'oncogénèse

En fonction du type de cancer, Necl-2 joue un rôle comme suppresseur de tumeur ou comme facteur pro-oncogénique.

I.4.2.3.1. Effet suppresseur de tumeur

Le gène *TSLC1* est constitué d'un total de 12 exons dans la région chromosomique 11q23.2. La méthylation des sites CpG autour du promoteur est fortement corrélée avec la perte de l'expression du gène dans les NSCLC (161). L'analyse SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) montre que 44% des NSCLC présentent un promoteur méthylé, mais c'est également le cas de 27% des cancers pancréatiques, 29 % des carcinomes hépatocellulaires, 70 % des mélanomes et 32 % des cancers de la prostate (161, 174). De plus, la méthylation du promoteur et/ou la perte d'expression de *TLSC1* a été observée dans 20-60% des cancers de l'œsophage, de l'estomac, du pancréas, du nasopharynx, du sein, de la prostate, du méningiome, et du col de l'utérus (161, 174).

Des données cliniques révèlent que l'inactivation de *TLSC1* est très fréquente dans les étapes avancées de ces tumeurs (Tableau 8). Par exemple, la méthylation de *TLSC1* dans les NSCLC primaires a été préférentiellement observée dans les tumeurs de stade Ib à IV et moins dans les tumeurs de stade Ia (175). La perte d'expression de *TLSC1* dans les cancers de

l'œsophage est détectée plus fréquemment dans les stades II à IV que dans le stade I (176). Ceci a été montré également par des études d'immunohistochimie qui montrent que l'expression de *TLSC1* est inversement corrélée avec l'évolution des NSCLC dans les stades plus tardifs (177). De plus, la survie des patients ayant un adénocarcinome pulmonaire est plus courte lorsqu'ils perdent l'expression de *TLSC1* (177).

Tumors	Parameters	Loss of expression (%)	
NSCLC	pStage	I	1/16 (6)
		II	5/6 (83)
		III	8/16 (50) $P < 0.0004$
	Histology	BAC	0/16 (0)
		Papillary	10/15 (67)
		Solid	3/4 (75)
Esophageal cancer	pStage	Mixed	6/12 (50) $P < 0.0001$
		I	1/11 (9)
		II	12/15 (80)
		III	7/20 (35)
		IV	8/10 (80) $P < 0.002$

Tableau 7 : Inactivation du gène TSLC1 dans les cancers chez l'homme. D'après Murakami (161)

La perte de l'adhérence cellulaire est la première étape dans l'invasion et la formation de métastases dans le cancer (178). Necl-2 est impliquée dans l'adhérence cellulaire et la perte de cette fonction induit l'invasion et la formation de métastases. Cela a été démontré à partir d'études d'immunohistochimie dans l'adénocarcinome de poumon (177), le cancer du sein (179, 180) et le cancer du pancréas (161). La perte de Necl-2 conduit à l'évolution de l'adénocarcinome vers des stades plus agressifs qui peut être reversée en ré-exprimant Necl-2 comme dans le cas des cellules de la lignée A549 (163). Il faut noter que c'est la région cytoplasmique de Necl-2 qui est responsable de l'activité suppressive de tumeur de Necl-2. Dans ce cas, l'activité d'adhérence cellulaire est en partie conservée *in vitro* (181). Cela montre qu'en plus de Necl-2, DAL-1/4.1-B ou les molécules MAGuK participent à la fonction suppressive de tumeur. L'équipe de Mao *et al.* a observé qu'en transfectant des cellules avec des adénovirus contenant *TLSC1/IGSF4* (Ad-TSLC1), ces cellules cessaient de proliférer et entraient en apoptose (181). De la même manière, des injections intratumorales de Ad-TSLC1 suppriment la croissance tumorale des cellules A549 chez des

souris nude. La restauration de l'expression de Necl-2 par la lignée A549 active la caspase 3, qui est impliquée dans l'apoptose, et inhibe la croissance tumorale (182). Cette activité anti-proliférative et pro-apoptotique de Necl-2 requiert la présence du motif de liaison 4.1 et du motif PDZ au niveau cytoplasmique. Ces données suggèrent que le mécanisme possible de suppression de tumeur médié par Necl-2 pourrait être l'induction de l'apoptose (Figure 20a). Le niveau d'expression physiologique de Necl-2 nécessaire pour induire l'apoptose dans les cellules tumorales n'a pas été précisé. Par ailleurs, les cellules tumorales exprimant Necl-2 sont mieux reconnues et lysées par les cellules NK, ce qui explique également l'effet suppresseur de tumeur (Figure 20a).

L'ensemble de ces données indique que Necl-2 peut être un marqueur à la fois de diagnostic et de pronostic d'un cancer. Sa détection permettrait de définir le stade de la tumeur ainsi que son évolution clinique. Par ailleurs, Necl-2 représente une cible thérapeutique. En effet, des traitements à base d'inhibiteurs de la méthylation, tels que le 5-ara-2'-deoxycytidine et la trichostatine, ont permis de retrouver des effets suppresseurs de tumeurs pour des lignées tumorales testées à la fois *in vitro* et chez la souris nude (174).

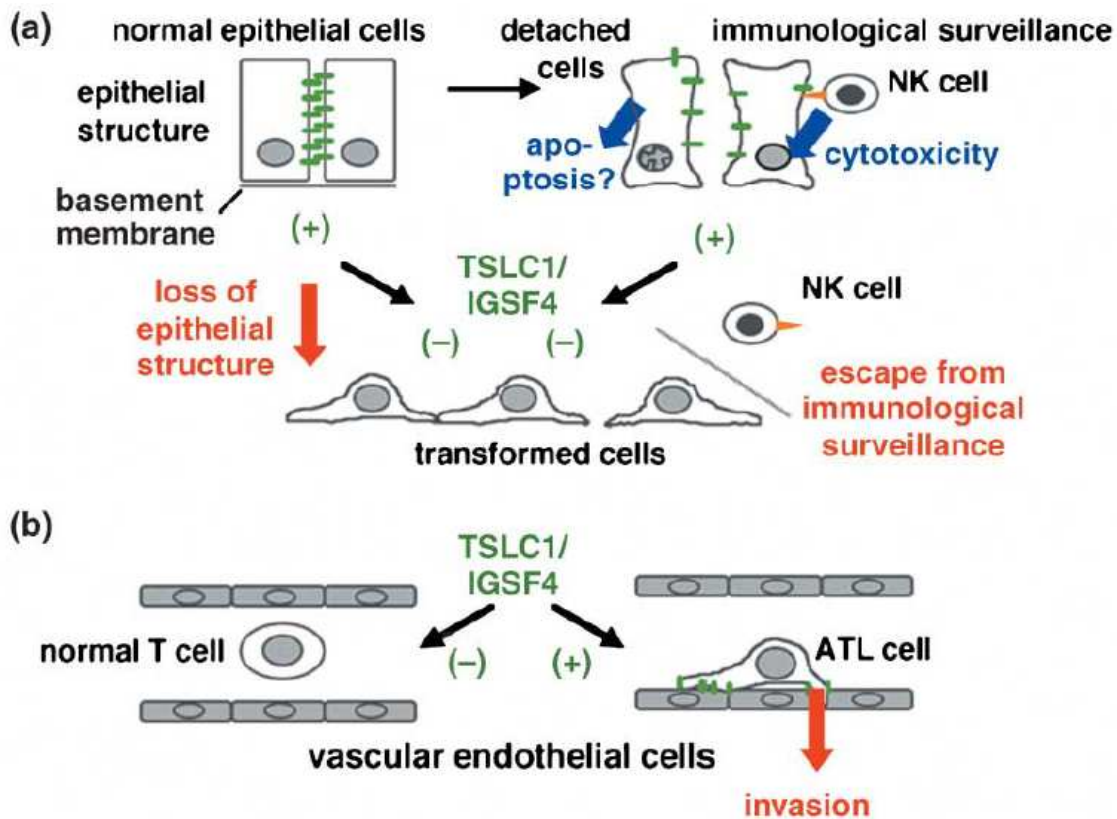


Figure 20 : Double rôle de Necl-2 dans l'oncogenèse humaine. D'après Murakami.(161). (a) Effet suppresseur de tumeur. Les cellules épithéliales expriment Necl-2 au niveau latéral. Lorsqu'elles deviennent cancéreuses, les molécules Necl-2 se retrouvent exposées et peuvent être reconnues et lysées par les cellules NK exprimant le récepteur CRTAM. La perte d'expression de Necl-2 confère aux cellules tumorales une voie d'échappement vis-à-vis des cellules NK. (b) Effet pro-oncogène. Dans les premiers stades de la leucémie à cellules T, les cellules tumorales n'expriment pas Necl-2 et ne sont pas invasives. Au contraire, l'expression de Necl-2 favorise l'interaction avec certaines cellules endothéliales vasculaires et favorise l'invasion des cellules tumorales.

1.4.2.3.2. Effet pro-oncogénique de Necl-2

Le gène codant pour Necl-2 est décrit comme étant un gène suppresseur de tumeur dans les carcinomes d'origine épithéliale. Il n'en va pas de même dans les leucémies à cellules T de l'adulte (ATL) dans lesquelles le gène *TLSC1* est l'un des quatre gènes surexprimés (183). Plusieurs études suggèrent que Necl-2 est impliquée dans différentes étapes de la leucémogénèse. Lorsque Necl-2 est exprimée *de novo* dans des cellules ATL humaines, ces dernières augmentent leur capacité à s'agréger entre elles et à adhérer aux cellules endothéliales vasculaires. Ainsi, Necl-2 est un facteur participant à l'invasion des

tissus par les cellules ATL (Figure 20b) (161, 183). Une surexpression de Necl-2 a été observée également dans le cas de la leucémie myéloïde aigue. L'intérêt de Necl-2 comme marqueur moléculaire est suggéré dans cette maladie (184).

D'autres effets oncogéniques de Necl-2 sont rapportés dans certains modèles de tumeur solide. Une étude du groupe de Ito montre que 25% des tumeurs mésothéliales expriment Necl-2 alors qu'aucune expression de Necl-2 n'est observée sur les cellules mésothéliales saines (185). Dans un modèle de co-culture avec des fibroblastes, les mêmes cellules de mésothéliomes Necl-2⁺ adhèrent, diffusent et prolifèrent plus rapidement que les cellules tumorales Necl-2⁻. Dans ce type de cancer, Necl-2 apparaît donc comme un facteur favorisant le développement tumoral.

De la même manière, une étude a montré que Necl-2 était surexprimée dans les adénocarcinomes de poumon et que son expression serait un avantage pour les cellules tumorales (186). L'équipe de Murakami a notamment observé que Necl-2 augmente la malignité dans les NSCLC. Cet effet est contradictoire avec les études citées dans le chapitre précédent dans d'autres cancers (187).

I.4.3. CRTAM

Dans ce travail de thèse, nous nous intéressons à la molécule CRTAM et les conséquences de son interaction avec son ligand Necl-2 sur les lymphocytes T V γ 9V δ 2.

I.4.3.1. Structure

CRTAM est un récepteur appartenant à la super famille des immunoglobulines constitué d'un domaine extracellulaire contenant deux boucles d'immunoglobulines et un domaine intracellulaire contenant un motif PDZ (Figure 21) (188). L'étude des homologies de séquences au sein de la super-famille des immunoglobulines indique que CRTAM est plus proche des necls que des nectines (Figure 22). Le gène codant CRTAM est situé sur le bras long du chromosome 11 (11q23.3) près de la localisation du gène de Nectine-1 et de Necl-2. Cette proximité chromosomique suggère que CRTAM résulterait d'une duplication d'un gène ancestral commun à ces deux molécules.

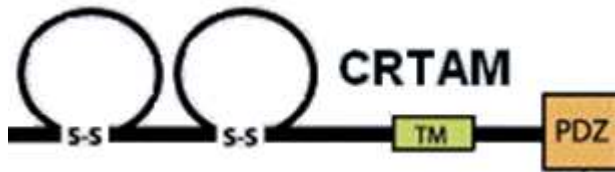


Figure 21 : Structure de CRTAM. D'après Fuchs and Colonna (188)

Le gène qui code pour CRTAM est régulé positivement par le facteur de transcription AP-1 connu pour être activé après engagement du TCR (189). Il a été découvert et cloné à l'occasion d'une étude qui consistait à identifier les gènes surexprimés par les cellules NKT. Dans cette étude, la molécule CRTAM était spécifiquement induite dans les lymphocytes T CD8⁺ et les cellules NKT de souris après activation (190). Ces résultats ont été observés également chez l'homme dans les lymphocytes T CD8⁺, les cellules NK et une sous-population de lymphocytes CD4⁺ (1 à 2% des CD4⁺ vraisemblablement des cellules NKT) (132, 191). L'expression de CRTAM par les lymphocytes T et les cellules NK activés a été rapportée comme précoce et transitoire. En effet, chez la souris, CRTAM est détectée après deux heures d'activation de ces cellules et son niveau d'expression est maximal entre 6 et 12h pour les cellules NK et 12 à 24h pour les lymphocytes T CD8⁺ avant de diminuer quarante-huit heures après stimulation (132, 192, 193). Ces données suggèrent que l'expression de CRTAM joue un rôle dans les premières étapes de l'activation de ces cellules. CRTAM est également exprimée par d'autres cellules que celles du système immunitaire. En effet, un haut niveau d'expression a été détecté dans le cerveau et en particulier dans les neurones de Purkinje (190) mais le rôle de CRTAM dans ces cellules n'est pas encore très documenté.

Bien que la molécule CRTAM soit classiquement associée à la famille des nectines et des necls, elle ne possède que deux boucles d'immunoglobuline alors que les nectines et les necls en possèdent trois. De même, CRTAM ne partage que 20 % d'identité et 55% de similarité avec ces molécules (132, 190). Pour ces raisons, une nouvelle hypothèse pourrait être formulée et rapprocherait CRTAM de la famille des JAM (junctional adhesion molecule) qui possèdent également deux boucles d'immunoglobuline. Elles sont présentes dans les jonctions intercellulaires et la région latérale des membranes des cellules épithéliales et

endothéliales. Pour l'instant, 3 membres de cette famille sont décrits : JAM A, JAM B et JAM C (194). CRTAM est également présente le long de la membrane latérale des cellules épithéliales, comme les molécules JAM, et joue un rôle dans l'adhérence via son interaction avec Necl-2 (194). Néanmoins, l'alignement de séquence des acides-aminés va à l'encontre de cette hypothèse (Figure 22).

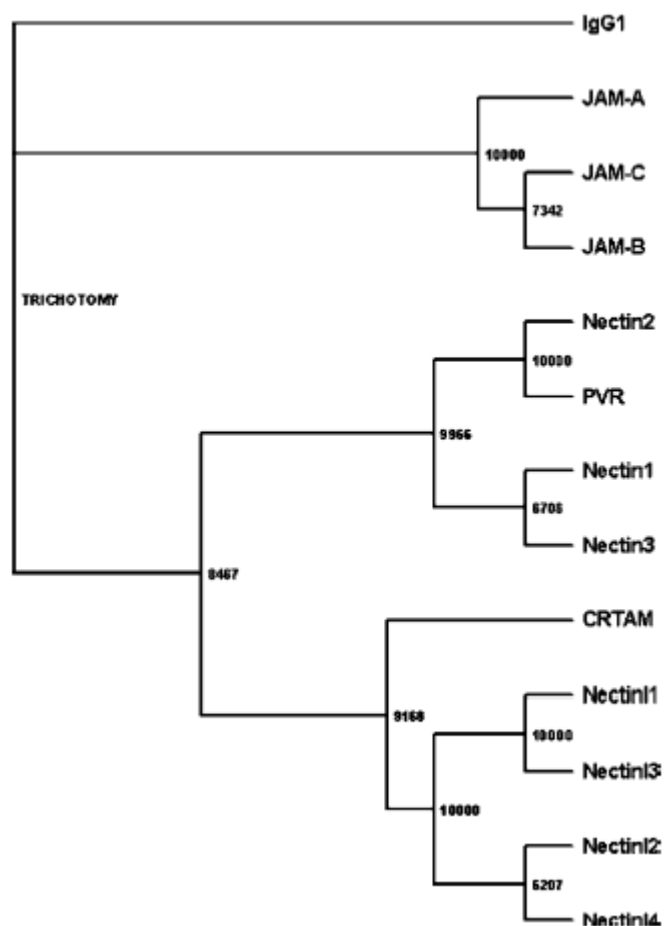


Figure 22 : Classification par homologie de séquence en acides aminés de protéines appartenant à la super-famille des immunoglobulines. D'après Patino-Lopez, Hevezi *et al.* (190)

I.4.3.2. Interaction de CRTAM avec son ligand Necl-2

CRTAM interagit avec Necl-2 à la fois chez l'homme et la souris. De plus, CRTAM et Necl-2 sont relativement bien conservées entre la souris et l'homme puisque les homologues humains et murins partagent 72 % d'identité. L'interaction CRTAM avec son ligand Necl-2 a principalement été étudiée dans le cas des cellules du système immunitaire.

Necl-2 est impliquée dans l'interaction entre cellules NK et cellules tumorales ainsi qu'entre les cellules dendritiques ($CD8\alpha^+$ chez la souris et $BDCA3^+$ chez l'humain) et les lymphocytes T $CD8^+$ (132, 192). C'est la boucle la plus externe de Necl-2 qui interagit avec la boucle la plus externe de CRTAM (193). L'interaction CRTAM-Necl-2 a pour conséquence l'augmentation de la cytotoxicité des cellules NK et de la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T $CD8^+$ vis-à-vis des cellules tumorales Necl-2 $^+$ (195). L'équipe de Colonna a également montré que les cellules NK éliminent plus facilement les cellules tumorales exprimant Necl-2 *in vivo*. Pour ce faire, ils ont transfecté des cellules tumorales EL-4 Necl-2 $^-$ pour qu'elles expriment Necl-2 ; puis ils ont injecté ces cellules dans la cavité péritonéale de souris nude. Après 48h, ils ont observé que les cellules Necl-2 $^+$ étaient plus massivement rejetées que les cellules témoins (132). De plus, la déplétion des cellules NK réduisait l'élimination des cellules tumorales exprimant Necl-2 (132). Il existe des différences entre les résultats obtenus par l'équipe de Colonna et d'autres équipes. D'autres études menées sur la souris ne démontrent pas que l'interaction CRTAM-Necl-2 impacte l'activité cytotoxique des cellules NK (193).

Le rôle de CRTAM n'a pas été étudié uniquement dans un contexte non-tumoral. Une étude portant sur des souris CRTAM $^{-/-}$ a montré que cette molécule était essentielle dans la rétention des lymphocytes T $CD8^+$ dans les ganglions lymphatiques par liaison avec des cellules dendritiques $CD8\alpha^+$ exprimant Necl-2 (196).

De plus, la molécule CRTAM est exprimée par les thymocytes et joue un rôle dans l'ontogénie des lymphocytes T. Les thymocytes expriment CRTAM tout au long des étapes de maturation. Le blocage de l'interaction CRTAM avec son ligand Necl-2 altère la croissance des thymocytes dans le thymus ce qui suggère un rôle de CRTAM dans la régulation des thymocytes (197).

Necl-2 est exprimée dans le cerveau tout comme son ligand CRTAM (190) au niveau des neurones de Purkinje. Ces données suggèrent que l'interaction CRTAM avec son ligand Necl-

2 joue un rôle dans les connexions cellulaires bien que des études soient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Malgré une meilleure compréhension du rôle de CRTAM, la voie de signalisation mise en œuvre par l'interaction CRTAM avec son ligand Necl-2 n'est pas encore connue. La région cytoplasmique de CRTAM est constituée de trois sites de phosphorylation putatifs et d'un domaine PDZ pouvant interagir avec la molécule Scrib. Chez la souris, il a seulement été décrit que la molécule scrib génère des signaux qui contribuent à réguler la polarité des lymphocytes T CD4⁺ (198). D'une façon générale, les connaissances sur la signalisation intracellulaire médiée par CRTAM restent à approfondir.

I.5. La mort cellulaire programmée

I.5.1. Généralités sur la mort cellulaire

La mort cellulaire programmée est un processus physiologique sous le contrôle d'un programme génétique. Le terme de mort cellulaire programmée désigne la mort d'une cellule à un moment précis et en un lieu précis. L'apoptose a été le premier mécanisme décrit de mort cellulaire programmée. Il a longtemps été opposé à la nécrose qui était considérée comme étant une mort cellulaire accidentelle survenant par exemple suite à une lésion. La notion de mort cellulaire programmée a longtemps été confondue avec celle d'apoptose jusqu'à ce que des observations viennent étayer l'existence d'un mécanisme de nécrose contrôlée rebaptisé nécroptose. De plus, des études récentes ont montré que l'autophagie, considérée avant tout comme un mécanisme de recyclage des organites cellulaire plutôt dévolue à la survie cellulaire, pouvait dans certains cas induire la mort de la cellule. C'est pourquoi, une première classification de la mort cellulaire programmée en trois composantes a été proposée (199) :

- La mort de type I ou apoptose
- La mort de type II ou autophagie
- La mort de type III ou nécroptose

Depuis, de nouveaux programmes de mort cellulaire ont été décrits et cette classification s'est étoffée en passant de trois à treize programmes de mort cellulaire parmi lesquels, on peut par exemple citer la catastrophe mitotique ou encore la pyroptose (Tableau 9).

	Main biochemical features	Caspase dependence	Examples of inhibitory interventions*
Anoikis	Downregulation of EGFR Inhibition of ERK1 signaling Lack of β 1-integrin engagement Overexpression of BIM Caspase-3 (-6,-7) activation	++	BCL-2 overexpression Z-VAD-fmk administration
Autophagic cell death	MAP1LC3 lipidation SQSTM1 degradation	--	VPS34 inhibitors AMBRA1, ATG5, ATG7, ATG12 or BCN1 genetic inhibition
Caspase-dependent intrinsic apoptosis	MOMP Irreversible $\Delta\psi_m$ dissipation	++	BCL-2 overexpression Z-VAD-fmk administration
Caspase-independent intrinsic apoptosis	Release of IMS proteins Respiratory chain inhibition	--	BCL-2 overexpression
Cornification	Activation of transglutaminases Caspase-14 activation	+	Genetic inhibition of TG1, TG3 or TG5 Genetic inhibition of caspase-14
Entosis	RHO activation ROCK1 activation	--	Genetic inhibition of metallothionein 2A Lysosomal inhibitors
Extrinsic apoptosis by death receptors	Death receptor signaling Caspase-8 (-10) activation BID cleavage and MOMP (in type II cells) Caspase-3 (-6,-7) activation	++	CrmA expression Genetic inhibition of caspases (8 and 3) Z-VAD-fmk administration
Extrinsic apoptosis by dependence receptors	Dependence receptor signaling PP2A activation DAPK1 activation Caspase-9 activation Caspase-3 (-6,-7) activation	++	Genetic inhibition of caspases (9 and 3) Genetic inhibition of PP2A Z-VAD-fmk administration
Mitotic catastrophe	Caspase-2 activation (in some instances) TP53 or TP73 activation (in some instances) Mitotic arrest	--	Genetic inhibition of TP53 (in some instances) Pharmacological or genetic inhibition of caspase-2 (in some instances)
Necroptosis	Death receptor signaling Caspase inhibition RIP1 and/or RIP3 activation	--	Administration of necrostatin(s) Genetic inhibition of RIP1/RIP3
Netosis	Caspase inhibition NADPH oxidase activation NET release (in some instances)	--	Autophagy inhibition NADPH oxidase inhibition Genetic inhibition of PAD4
Parthanatos	PARP1-mediated PAR accumulation Irreversible $\Delta\psi_m$ dissipation ATP and NADH depletion PAR binding to AIF and AIF nuclear translocation	--	Genetic inhibition of AIF Pharmacological or genetic inhibition of PARP1
Pyroptosis	Caspase-1 activation Caspase-7 activation Secretion of IL-1 β and IL-18	++	Administration of Z-YVAD-fmk Genetic inhibition of caspase-1

Tableau 8 : Classification fonctionnelle des modes de mort cellulaire régulée. D'après Galluzzi *et al* (200)

1.5.2. L'apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire caractérisé par une condensation de la chromatine (pyknose), une fragmentation nucléaire (karyorrhexis), le rétrécissement du cytoplasme et la formation de corps apoptotiques (201). L'apoptose est habituellement, mais pas exclusivement, associée à l'activation des caspases (200) et la perméabilisation de la membrane mitochondriale (202, 203). Les caspases sont des protéases responsables du clivage protéolytique de nombreux substrats impliqués dans l'exécution du processus de

mort cellulaire. L'apoptose peut être induite par deux voies d'activation : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque.

I.5.2.1. L'apoptose intrinsèque

La voie intrinsèque est due à une pléthore de conditions de stress intracellulaire comme les dommages à l'ADN, le stress oxydatif, l'exitoxité (sur-stimulation des récepteurs au glutamate dans le système nerveux) et bien d'autres. Elle est sous le contrôle des protéines membres de la famille Bcl-2. Ces protéines contiennent au moins un domaine d'homologie (BH) et peuvent être subdivisées entre celles qui sont pro-apoptotiques et celles qui sont anti-apoptotiques. Elles sont au nombre de 20 dans les cellules de mammifères et sont divisées en trois sous-familles en fonction de leur structure et de leur fonction. Les membres de la sous-famille des anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X, Bcl-w, A1 et Mcl-1) présentent une homologie de séquence pour 4 domaines BH et induisent la survie cellulaire en neutralisant les protéines Bak-like. Les membres de la sous-famille des pro-apoptotiques Bak-like (Bak, Bax, Bok) possèdent les domaines BH1, BH2 et BH3 (204). La dernière sous-famille est celle des « BH3-only » (Bad, Bid, Bim, Bik, Bmf, Hrk, Noxa, Puma) qui ne possèdent que le domaine BH nécessaire pour leur activité pro-apoptotique (204). Ces dernières sont sensibles à une grande variété de stress cellulaire. Par exemple, Noxa et Puma servent de médiateurs de l'apoptose dans le cas de stress génotoxique ; tandis que Bad est activée en cas de privation en facteurs de croissance (204). Elles agissent en neutralisant la fonction des protéines anti-apoptotiques. Certaines d'entre-elles telles que Bid, Bim et Puma, sont capables de s'associer avec toutes les protéines anti-apoptotiques afin de constituer de puissants inducteurs d'apoptose. D'autres, comme Noxa et Bad, ne s'associent qu'avec certaines protéines anti-apoptotiques. Par exemple, Bad ne s'associe qu'avec Bcl-2, Bcl-X et Bcl-w ; tandis que Noxa s'associe uniquement avec Mcl-1 et A1.

En réponse à de multiples conditions de stress intracellulaire (dommages de l'ADN, etc...), des signaux de survie ou de mort convergent vers la mitochondrie (Figure 23). Quand les signaux de mort prévalent, Bax et Bak forment un complexe moléculaire dans les membranes mitochondriales et induisent sa perméabilisation (mitochondrial outer

membrane permeabilization or MOMP), conduisant au relargage de protéines intramembranaires mitochondriales incluant le cytochrome C dans le cytosol (Figure 23). Celui-ci déclenche l'activation de la caspase 9 en formant un complexe protéique appelé apoptosome qui est constitué de la pro-caspase-9, de la molécule APAF-1 et de dATP. Ce complexe déclenche une cascade d'activation d'autres caspases jusqu'à la caspase-3 et l'exécution des phases ultimes de l'apoptose. De plus, la liaison de la protéine IAP (inhibitor of apoptosis), qui est anti-apoptotique, avec les molécules DIABLO (direct IAP binding protein with low pI) et HTRA2 (High temperature requirement protein A2) facilite son élimination et favorise en conséquence l'activation des caspases.

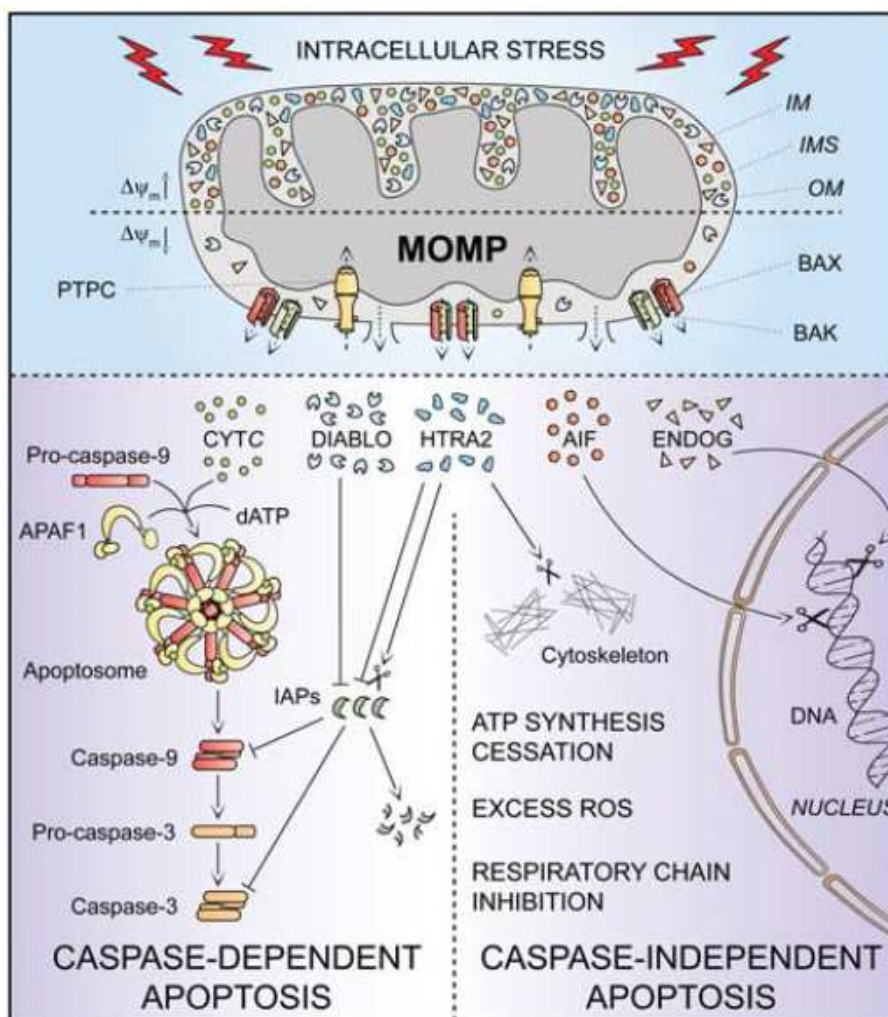


Figure 23 : L'apoptose intrinsèque. D'après Galluzi et al. (200)

Par ailleurs, la perméabilisation de la membrane mitochondriale permet aussi l'exécution du mécanisme d'apoptose indépendantes des caspases. La molécule AIF (Apoptosis Inducing Factor) et l'endonucléase G sortant de la mitochondrie peuvent être adressées au noyau et fragmenter l'ADN (Figure 23). De la même manière, la molécule HTRA2 peut être libérée et entraîner le clivage des protéines du cytosquelette de manière indépendante des caspases. La perméabilisation de la mitochondrie peut être observée à l'aide du colorant DIOC6 (205, 206). Ce colorant se loge à l'intérieur de la mitochondrie qu'il colore en rouge. Par contre, si la cellule entre en apoptose par la voie mitochondriale (AIF, cytochrome C,...), le DIOC6 quitte la mitochondrie et la cellule perd sa coloration.

1.5.2.2. L'apoptose extrinsèque

La voie extrinsèque correspond à la mort cellulaire induite par la liaison d'un récepteur de mort avec son ligand. Elle est par exemple impliquée dans l'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire. Ces ligands sont Fas-L, le TNF- α et TRAIL. La liaison aux récepteurs de mort cellulaire induit leur trimérisation comme dans le cas de Fas-L (Figure 24). Dans cet exemple, le récepteur Fas recrute, au niveau de sa queue cytoplasmique, des molécules adaptatrices FADD (Fas-associated protein with death domain), cIAPs, cFLIPs et la pro-caspase-8 afin de former un complexe appelé DISC (death-inducing signaling complex). Ce dernier active la pro-caspase-8, qui à son tour conduit à l'activation de caspase-3, caspase-6 et la caspase-7 ou à la perméabilisation de la mitochondrie en clivant la molécule BID, provoquant ainsi le relargage du cytochrome C.

Par ailleurs, l'apoptose extrinsèque peut être initiée par des récepteurs dit de « dépendance » comme les récepteurs DCC (deleted in colorectal cancer) ou UNC5B (unc-5 homolog B) (Figure 24). Contrairement aux récepteurs de mort, ils transmettent des signaux de mort en absence de leur ligand la netrine-1 et c'est sa présence qui inhibe leur activation. Le signal qui en résulte induit l'assemblage de DRAL et TUCAN et de la pro-caspase-9 avec le récepteur DCC ou la déphosphorylation de la protéine kinase DAPK-1 par PP2A dans le cas du récepteur UNC5B. La protéine DAPK-1 peut activer directement les caspases ou perméabiliser la mitochondrie en clivant la molécule BID afin d'induire l'apoptose.

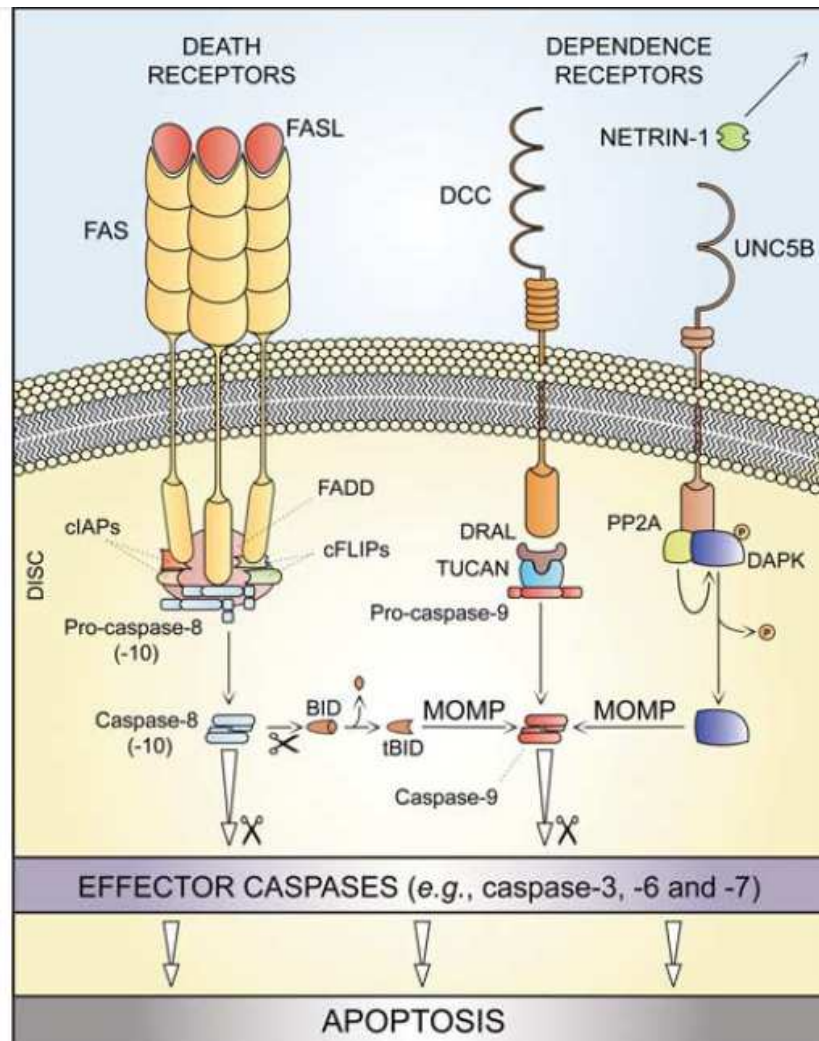


Figure 24 : Apoptose extrinsèque. D'après Galluzi *et al.* (200).

Les cellules qui sont en apoptose sont reconnues rapidement et spécifiquement par les phagocytes tels que les macrophages et les cellules dendritiques immatures (207). La phagocytose par les macrophages est associée au relargage de facteurs anti-inflammatoires comme le TGF- β (208), la prostaglandine E2 (209), ou les facteurs activant les plaquettes (210, 211). Des études récentes ont montré que le traitement de cellules tumorales avec de l'anthracycline (212), de l'oxaliplatine ou par irradiation (213-215) mais pas avec d'autres traitements induisant l'apoptose (tels que la mitomycine C, l'etoposide, et la staurosporine) pouvaient induire une réponse immunitaire *in vivo* quand les cellules mortes étaient injectées dans des souris immunocompétentes. Cela montre que l'immunogénicité d'une

cellule en apoptose peut dépendre du mode de l'induction de mort (216-219). Aujourd'hui, il est admis que l'apparente homogénéité morphologique de l'apoptose cache une hétérogénéité moléculaire qui influence l'immunogénicité des cellules mortes (219).

I.5.3. La mort autophagique

L'autophagie est un mécanisme de recyclage des protéines, des portions de cytoplasme, des agents pathogènes intracellulaires et des organites cellulaires endommagés (220). Ce processus est caractérisé par la formation de vacuoles appelées autophagosomes obtenues par séquestration d'une partie du cytoplasme (Figure 25a et b) (221). Ces dernières fusionnent avec les lysosomes pour former des autophagolysosomes, ou autolysosomes, qui correspondent aux compartiments où a lieu la dégradation (Figure 25 c, d et e). L'augmentation de l'activité lysosomique peut être révélée par une coloration à l'acridine orange (222).

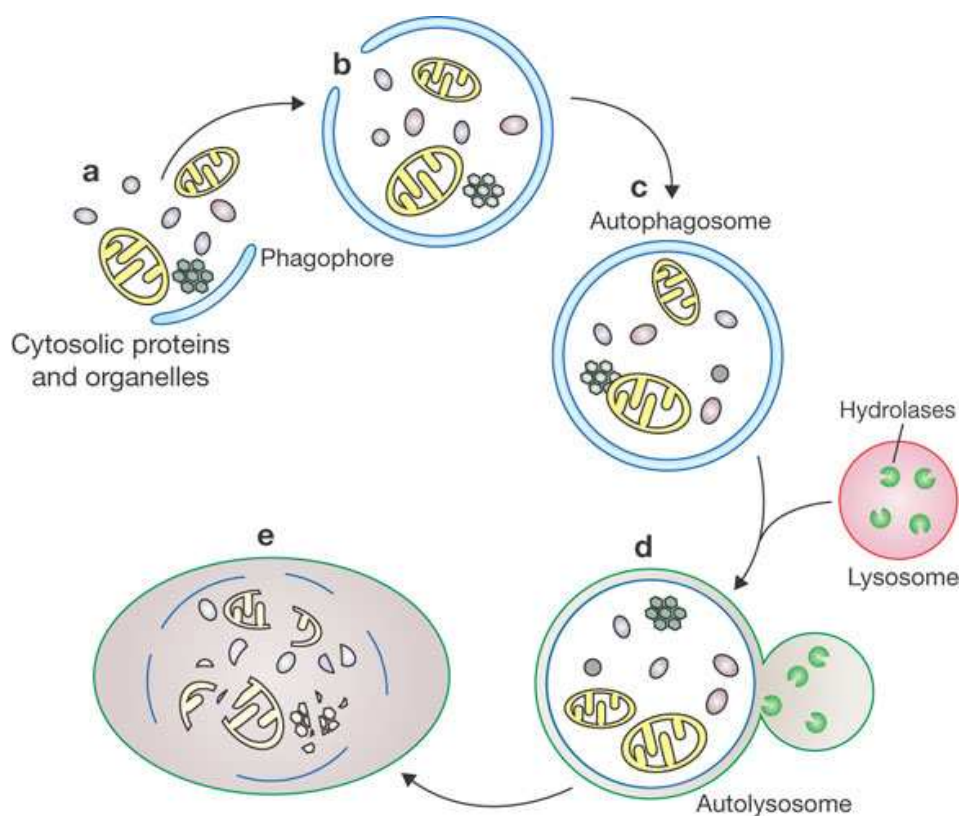


Figure 25 : Processus de formation de l'autophagosome. D'après Xie et Klionsky. (221)

Les phases précoces de la formation des vacuoles impliquent la phosphatidylinositol 3 kinase de classe III (PI3K), appelée aussi Vps34, qui s'associe avec la protéine ATG6/Beclin 1 au niveau du réseau trans-golgien (223, 224). Chez les eucaryotes, l'autophagie constitue une réponse au stress cellulaire comme par exemple la privation en nutriments, l'hypoxie ou l'infection. En facilitant des réactions cataboliques, l'autophagie génère des nouveaux substrats qui peuvent suppléer au besoin énergétique de la cellule et à la synthèse de protéines adaptatives. L'autophagie a longtemps été considérée uniquement comme un mécanisme de survie permettant l'adaptation des cellules à des conditions de stress par l'activation d'une réponse cytoprotective qui inhibe l'apoptose (220). L'une des explications de cette cytoprotection est la mitophagie, ou digestion de la mitochondrie, qui permettrait d'éviter la dégradation de ces organites avant qu'elle ne relargue le cytochrome C ou la molécule AIF (220). Néanmoins, il a été récemment admis que l'autophagie persistante et exacerbée, qui aboutit à une déplétion dans les cellules de leurs organites et de protéines critiques, peut conduire à une mort cellulaire caspase indépendante (225, 226). La mort autophagique intervient notamment dans la régulation du nombre de lymphocytes T (227).

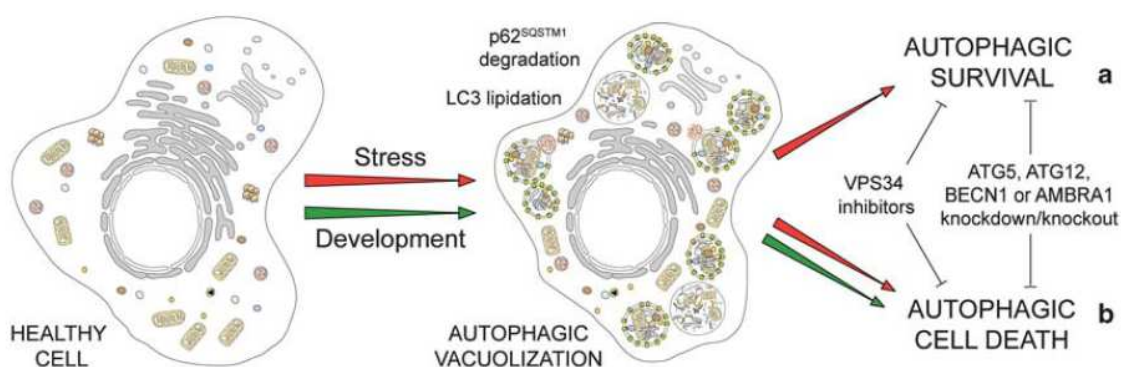


Figure 26 : La mort cellulaire par autophagie. D'après Galluzzi *et al.* (200)

Les marqueurs de l'autophagie sont les mêmes que ce mécanisme soit impliqué dans la survie ou la mort cellulaire. Dans les deux cas, on retrouve la lipidation de la chaîne légère 3 de la protéine associée aux microtubules (LC3/Atg8) ou bien une dégradation des substrats autophagiques comme les sequestosomes 1 (SQSTM1) (Figure 26). De plus, les observations morphologiques ne suffisent pas à préciser si la mort cellulaire accompagne simplement

l'autophagie ou si elle est exécutée par autophagie. Peu de méthodes sont actuellement reconnues pour déterminer si l'autophagie, observée lorsqu'une cellule meurt, exerce une action cytoprotective ou bien s'il s'agit d'un mécanisme de mort cellulaire programmée. Une des approches repose sur le blocage expérimental des voies de l'autophagie en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques (comme la wortmannine ou la 3-méthyladénine-3-MA) qui ciblent la PI3K. Une autre méthode consiste à cibler par des approches génétiques (gène KO, mutation ou ARN interférence) des modulateurs de l'autophagie comme AMBA1, ATG5, ATG12 ou beclin1 (200, 228, 229). Une fois l'autophagie inhibée, il faut alors observer l'impact de cette inhibition sur la mort cellulaire. Si la mort est augmentée, l'autophagie est associée à des fonctions cytoprotectives (Figure 26a). Si la mort cellulaire est diminuée, le mécanisme de mort cellulaire impliqué est bien celui de la mort autophagique (Figure 26b).

Comme pour l'apoptose et contrairement à la nécrose régulée, la mort autophagique n'est pas inflammatoire. Par conséquent, l'inhibition de l'autophagie peut compromettre l'élimination des cellules mortes, exacerber l'inflammation locale, et favoriser la croissance tumorale (230).

1.5.4. La nécrose régulée ou nécroptose

La nécrose a longtemps été considérée comme un mécanisme de mort accidentelle morphologiquement différent de l'apoptose et de l'autophagie, et caractérisée par l'augmentation du volume cellulaire conduisant à la rupture précoce de la membrane plasmique. Ce processus est accompagné par la dilatation et le démantèlement des organites, en particulier de la mitochondrie (231). La nécrose est souvent la conséquence de stress physiologiques et de lésions aiguës. Néanmoins, il existe un mécanisme de nécrose programmée appelé nécroptose dépendant de la protéine RIP1 (Figure 27). L'une des méthodes permettant de caractériser la nécroptose consiste à inhiber la protéine kinase RIP1, protéine centrale de ce mécanisme de mort, à l'aide de la nécrostatine-1 (200).

Différents mécanismes comme les dommages de l'ADN, les excitotoxines et les récepteurs de mort peuvent induire la nécrose régulée (Figure 27) (200). De plus, l'inhibition des caspases, d'activateurs de caspases tel que APAF-1 (232) par des méthodes pharmacologiques ou génétiques peut bloquer l'induction d'une mort par apoptose et favoriser celle induite par autophagie ou par nécroptose (200). Ainsi, un même signal peut produire différents types de mort cellulaire en fonction de l'activation ou l'inhibition d'enzymes cataboliques dans la cellule, soulignant la relation étroite qui existe entre les différents types de mort cellulaire. C'est le cas du signal médié par le TNF- α qui induit de la nécroptose quand les caspases sont bloquées expérimentalement (Figure 27). Le TNF se lie à son récepteur et entraîne la formation d'un complexe au sein duquel RIP1 est polyubiquitinilé par cIAP afin de fournir un site de recrutement pour TAK1, TAB2 et TAB3 qui délivrent toutes les deux des signaux de survie cellulaire. Dans les cas où les caspases sont inhibées, CYLD désubiquitine RIP1 qui va ainsi se dissocier du complexe et interagir avec son homologue RIP3. Ce nouveau complexe active la nécroptose.

Il existe une autre voie de nécrose régulée liée à des dommages de l'ADN (Figure 27) qui induisent l'activation de la molécule PARP1. Cette dernière interagit avec le complexe RIP1 et RIP3 afin d'exécuter la nécroptose.

A la différence des cellules apoptotiques, qui sont phagocytées intégralement, les cellules nécrotiques/nécroptotiques sont internalisées par macropinocytose ce qui signifie que seule une partie de ces cellules sont récupérées par les phagocytes (233). De même, contrairement à l'apoptose, la nécrose est fortement immunogène à cause du relargage de médiateurs proinflammatoires tels que l'IL-8 et le TNF- α (234).

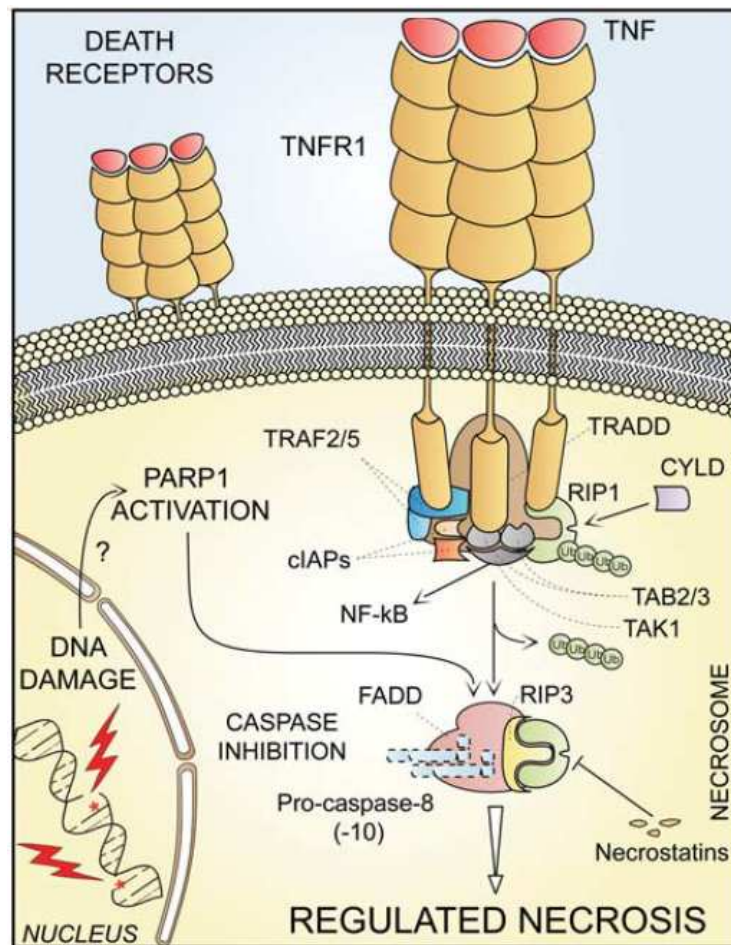


Figure 27 : Necroptose/nécrose régulée. D'après Galluzi *et al.* (200). Le TNF se fixe à son récepteur et provoque la liaison de TRADD, cIAPs, NF-κB, RIP1, TRAF2/5, TAB2/3 et TAK1 à son domaine cytoplasmique. Au sein du complexe, RIP-1 est polyubiquitinilé par cIAP afin de fournir un site de recrutement pour TAK1, TAB2 et TAB3 (qui délivrent toutes les deux des signaux de survie cellulaire). Si les caspases sont inhibées, CYLD désubiquitine RIP1 qui se dissocie du complexe pour interagir avec RIP3. Le complexe ainsi formé exécute la nécroptose. En cas de dommages à l'ADN, PARP1 sort du noyau et interagit avec le complexe RIP1-RIP3 pour activer la nécroptose.

I.5.5. Le rôle de la mort cellulaire dans l'échappement tumoral

Le système immunitaire est capable de reconnaître et d'éliminer des cellules tumorales. Toutefois, les cellules tumorales développent des stratégies pour contourner l'immunosurveillance des cancers. L'une des façons d'échapper à l'action anti-tumorale des effecteurs cytotoxiques est de provoquer leur mort. La tumeur peut exprimer des molécules comme la molécule Fas-L qui induisent la mort cellulaire des lymphocytes T infiltrant (TIL)

(22). Plusieurs études chez l'homme montrent que l'expression de Fas-L par différents types de cancer humain contribue à l'échappement tumoral (235). L'expression de Fas-L a été retrouvée dans le cancer de l'ovaire, le mélanome, le cancer du poumon, le cancer du pancréas et le cancer du sein (235). *In vitro*, les cellules tumorales exprimant Fas-L co-cultivées avec des lymphocytes T entrent en apoptose. Celle-ci peut être bloquée par des anticorps anti-Fas-L ou par la protéine Fas-Fc capable de lier et de neutraliser Fas-L (22). Des données histologiques viennent conforter l'idée d'un rôle de Fas-L dans l'échappement tumoral. Dans le cancer du côlon, l'expression de Fas-L est beaucoup plus fréquente aux stades métastatiques que dans les stades précoces (22). Il faut cependant moduler l'interprétation de ces résultats car la molécule Fas-L peut également être pro-inflammatoire. Une étude portant sur la greffe de cellules tumorales Fas-L chez la souris montre que celles-ci sont plus rapidement rejetées que les cellules n'exprimant pas FasL. Dans ce modèle, l'élimination de la tumeur était principalement due à l'infiltration de polynucléaires neutrophiles. Ces observations peuvent apparaître contradictoires quant au rôle de Fas-L dans l'échappement tumoral. Les différences observées peuvent provenir du microenvironnement des différentes tumeurs étudiées. La combinaison des cytokines présentes dans ce microenvironnement pourrait moduler l'impact de Fas-L sur l'échappement tumoral.

D'autres récepteurs comme la molécule CD27 sont capables d'induire la mort des lymphocytes T. CD27 fait partie de la famille des récepteurs au TNF et est constitutivement exprimée par la majorité des lymphocytes T, des lymphocytes B, des cellules NK et des cellules progénitrices hématopoïétiques. Son ligand est CD70 qui est exprimé de manière transitoire par les DCs et les lymphocytes T activés. L'engagement excessif de CD27 avec son ligand CD70 conduit à l'activation d'un mécanisme d'AICD (apoptosis inducing cell death) induisant l'apoptose des lymphocytes T via la voie mitochondriale dépendante des caspases. Une étude portant sur l'activation chronique de CD27 chez la souris démontre que cette dernière a un risque plus élevé de mourir d'une infection opportuniste (22). De même, d'autres études ont montré que les glioblastomes et les carcinomes rénaux exprimaient

CD70 mais pas CD27. Lorsque ces cellules de glioblastome ou de carcinome rénal étaient co-cultivées avec des lymphocytes T, ces derniers mouraient par apoptose induite par CD27 (22, 236).

PD-L1 est une autre molécule exprimée par certaines tumeurs capables d'induire la mort des lymphocytes T. Elle est abondante dans les cancers humains tels que les carcinomes du poumon, de l'ovaire, du colon et les mélanomes (237). Une étude menée sur un modèle de souris RAG^{-/-} a montré que les P815 exprimant PD-L1 éliminaient par apoptose les lymphocytes T spécifiques d'antigène de tumeur (237). Les cellules tumorales exprimant PD-L1 sont moins bien éliminées par les cellules effectrices et il existe une corrélation inverse entre le nombre de TILs et l'expression de PD-L1 dans les cancers du poumon non à petites cellules (22, 238). De plus, une étude clinique indique que le taux de survie à cinq ans est de 42% pour les patients atteints d'un carcinome rénal exprimant PD-L1 contre 83% pour ceux qui ne l'expriment pas (239).

II. Travail personnel

II.1 Objectifs du travail de thèse

L'immunothérapie des cancers par transfert de lymphocytes TV γ 9V δ 2 représente une alternative prometteuse à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Ces cellules sont capables d'exercer une action cytotoxique sur un large panel de tumeurs de type histologiquement différentes et ont d'ores et déjà fait l'objet d'études cliniques de phase I ou II. La reconnaissance des cellules tumorales nécessite la formation d'une synapse immunologique dans laquelle le TCR $\gamma\delta$ et des récepteurs NK vont converger afin de discriminer les cellules cancéreuses des cellules saines sur la base des interactions ligands/récepteurs. Les récepteurs NK tels que DNAM-1 ou CRTAM ont des nectines comme ligands. Il a été montré que l'interaction de CRTAM avec son ligand Necl-2, molécule qui peut être exprimée par certaines cellules tumorales, avait un impact sur la cytotoxicité des cellules NK et la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8⁺. L'étude de ces récepteurs NK activateurs est très importante pour améliorer et optimiser les protocoles d'immunothérapie basés sur l'utilisation de lymphocytes T V γ 9V δ 2. Avant que ne débute ce travail de thèse, notre équipe avait observé dans des travaux préliminaires que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 exprimaient CRTAM dans certaines conditions d'activation. La question de l'interaction de ces lymphocytes activés avec des cellules tumorales exprimant Necl-2 n'avait jamais été étudiée et nécessitait d'être documentée. L'objectif initial de cette thèse était de déterminer le rôle de CRTAM dans la reconnaissance et la lyse des cellules tumorales exprimant Necl-2 par les lymphocytes T V γ 9V δ 2, mais nos travaux nous ont conduits à mettre en évidence un tout autre impact de l'interaction CRTAM/Necl-2.

Dans un premier temps, le travail a consisté à déterminer les conditions d'expression de CRTAM par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 de PBMCs de donneurs sains et d'engagement avec Necl-2. Dans un second temps, nous avons étudié le rôle de cette interaction CRTAM/Necl-2 sur les fonctions des lymphocytes T V γ 9V δ 2, telles que la cytotoxicité et la sécrétion d'IFN- γ . Les observations faites au cours de ces études nous ont ensuite conduits à évaluer l'impact

de cette interaction sur les échanges membranaires entre cellules effectrices et cellules cibles et sur la survie des lymphocytes T V γ 9V δ 2. Ceci nous a notamment permis d'observer que l'interaction CRTAM-Necl-2 jouait un rôle dans la mort des lymphocytes T V γ 9V δ 2. La dernière partie de cette thèse a donc été focalisée sur la caractérisation du mécanisme de mort induite dans les lymphocytes T V γ 9V δ 2 exprimant CRTAM par des cellules cibles exprimant Necl-2. L'impact physiologique sur la réponse immunitaire transitionnelle a été discuté.

II.1.1. CRTAM receptor engagement by Necl-2 on tumor cell triggers cell death of activated V γ 9V δ 2T cells

Article en révision dans « Journal of Immunology », 2012.

Benoit Dessarthe, Aurélie Thedrez, Jean-Baptiste Latouche, Florian Cabillic, Aurélie Drouet, Pascale Daniel, Cécile Thomas de La Pintièrre, Véronique Catros, et Olivier Toutirais.

Dans cet article, nos résultats montrent :

- que la molécule CRTAM est exprimée de façon transitoire par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 après stimulation
- que l'interaction CRTAM/Necl-2 n'a aucun effet sur l'activité cytotoxique et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires des lymphocytes T V γ 9V δ 2.
- que CRTAM est rapidement « down-régulée » par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 après contact avec des cellules tumorales exprimant Necl-2 ; et que de façon concomitante les cellules tumorales acquièrent l'expression de CRTAM par transfert intercellulaire de protéines.
- que CRTAM médie un signal de mort autophagique du lymphocyte T V γ 9V δ 2 suite à son engagement avec son ligand Necl-2.

En conclusion, l'expression de Necl-2 par les cellules tumorales peut représenter un facteur limitant l'immunosurveillance des cancers par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 et une nouvelle forme d'échappement tumoral. Les résultats et les perspectives de notre travail seront discutés à la fin de ce mémoire.

1.1.1.1 CRTAM receptor engagement by Necl-2 on tumor cells triggers cell death of activated V γ 9V δ 2 T cells.

Benoit Dessarthe *, Aurélie Thedrez *, Jean-Baptiste Latouche †, Florian Cabillic *, †, Aurélie Drouet †, Pascale Daniel ‡, Cécile Thomas de La Pintièrre ‡, Véronique Catros *, ‡, and Olivier Toutirais^{§,¶}

1.1.1.2 Running Title: CRTAM engagement triggers V γ 9V δ 2 T cell death.

Corresponding authors:

Véronique Catros

Inserm UMR991

Hôpital Pontchaillou

F-35033 Rennes, France

Email: veronique.catros@univ-rennes1.fr

Phone: + 33 (0)2 23 23 38; Fax: + 33 (0)2 99 54 01 37

or

Olivier Toutirais

Laboratoire d'Immunologie, CHR Clemenceau

Avenue Clemenceau

F-14033 Caen, France

Email: toutirais-o@chu-caen.fr

Phone: + 33 (0)2 31 27 21 04; Fax: + 33 (0)2 31 27 25 50

Author notes:

Benoit Dessarthe and Aurélie Thedrez contributed equally to this paper.

Véronique Catros and Olivier Toutirais equally supervised this work.

Abstract

Human V γ 9V δ 2 T cells exert potent *in vitro* and *in vivo* anti-tumor activities, making them promising candidates for immunotherapy strategies. Recognition of tumor cells by V γ 9V δ 2 T cells requires engagement of the TCR and/or Natural Killer (NK) receptors. Recently, one of the novel NK receptors, the class I-restricted T cell associated molecule (CRTAM), has been described to promote cytotoxic function of NK cells and to lead to IFN- γ secretion by CD8⁺ T cells through interaction with its ligand, Necl-2. A better understanding of the role of CRTAM in V γ 9V δ 2 T cell functions is highly relevant to optimize innate-like T cell-based cancer immunotherapy. Here, we report that CRTAM is transiently expressed on activated V γ 9V δ 2 T lymphocytes following TCR engagement. However, CRTAM-Necl-2 interaction does not modify the cytotoxic function or IFN- γ secretion of V γ 9V δ 2 T cells. The expression of CRTAM in activated V γ 9V δ 2 T cells is quickly down-regulated following interaction with Necl-2 on tumor cells. Interestingly, CRTAM is concurrently acquired at the cell surface of Necl-2⁺ tumor cells through V γ 9V δ 2 T cell membrane capture. Finally, we highlight that co-culture experiments with tumor cells expressing Necl-2 result in significant cell death of CRTAM⁺ V γ 9V δ 2 T cells. Pre-treatment of V γ 9V δ 2 T cells with specific inhibitors demonstrates that CRTAM-mediated cell death is dependent on autophagic process but not on apoptosis or necroptosis. Based on these findings, we propose that Necl-2 on tumor cells represents a new tumor counterattack mechanism and a potential target to improve efficiency of $\gamma\delta$ T cells-based immunotherapy.

Introduction

V γ 9V δ 2 T cells are the major population of human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells and play an important role in innate immunity against microbial agents and tumor cells (1). V γ 9V δ 2 T cells express a TCR with a particular combination of variable regions V γ 9 and V δ 2. These cells are activated by small non-peptidic phosphorylated compounds, referred to as phosphoantigens, which are derived from the isoprenoid biosynthetic pathway (1). (240)V γ 9V δ 2 T cells have the capacity to recognize and kill a wide array of human tumor cells and to produce inflammatory cytokines, such as IFN- γ , that mediate the recruitment of host effector cells (2–5). Therefore, immunotherapeutic approaches exploiting the anti-tumor properties of V γ 9V δ 2 T cells represent an area of active investigation (6, 7). In some tumor cells, the accumulation of endogenous metabolites derived from the mevalonate pathway, such as isopentenyl pyrophosphate (IPP), induces activation of V γ 9V δ 2 T cells (8). Bromohydrin pyrophosphate (BrHPP), a synthetic analog of IPP, is able to vigorously expand V γ 9V δ 2 T cells *in vitro* and *in vivo* (3, 5, 9). Likewise, aminobisphosphonates that promote intracellular accumulation of IPP are able to indirectly trigger specific activation of V γ 9V δ 2 T cells (8). Unlike $\alpha\beta$ T cells, the recognition of tumor cells by $\gamma\delta$ T cells is not restricted to the MHC molecules and is modulated by receptor-ligand interactions involving TCR and/or natural-killer (NK) cell receptors (NKR) (10, 11). One of the NKRs, the activating receptor NKG2D, has been known to be involved in tumor recognition through interactions with specific ligands, including MHC class I-related chain A and B (MICA/B) and UL16-binding proteins (ULBP) (3, 4, 12). Recently, a role for novel immunoglobulin-like NKRs, DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1, also called CD226) and Class I-restricted T cell-associated molecule (CRTAM), in the process of NK-mediated recognition of tumor cells has been described (13, 14). These receptors interact with nectin and nectin-like (Nectl) molecules, a family of Ca²⁺-independent cell-cell adhesion proteins that mediate epithelial cell junctions through homophilic and/or

heterophilic contacts (15). In a recent paper, we showed that DNAM-1 is constitutively expressed in V γ 9V δ 2 T cells and promotes cytotoxicity against hepatocellular carcinoma (HCC) cells and IFN- γ production by the V γ 9V δ 2 T cells through interaction with its ligand Necl-5 (also called the poliovirus receptor or CD155) (5). The CRTAM that binds Necl-2 is expressed in activated NK cells and $\alpha\beta$ T cells (16–18). Necl-2, also known as synCAM1, IGSF4A or CADM1, is a highly conserved glycoprotein with a broad tissue distribution and is encoded by the tumor suppressor gene *tumor suppressor in lung cancer-1 (TSLC1)* (19). The role of CRTAM has been described in the regulation of cell polarity and the retention of lymphocytes in lymph nodes (20, 21). Boles *et al.* have shown that the engagement of CRTAM promotes the cytotoxic function of NK cells and leads to IFN- γ secretion by CD8⁺ T cells, suggesting that the CRTAM-Necl-2 interaction contributes to tumor recognition (17).

A better understanding of NK receptor-ligand interactions is highly relevant to improve innate-like T cell-based cancer immunotherapy. With this aim, we have characterized the role of CRTAM in V γ 9V δ 2 T cell functions. We show that CRTAM is transiently expressed in activated V γ 9V δ 2 T lymphocytes following TCR engagement. Unlike human NK and CD8⁺ T cells, the CRTAM-Necl-2 interaction is dispensable for both the cytotoxicity and the cytokine secretion of V γ 9V δ 2 T cells. Interestingly, cell contact with Necl2-expressing tumor cells results in rapid down-regulation of CRTAM expression and significant cell death of activated V γ 9V δ 2 T cells. Thus, our data reveal an unexpected role of Necl-2 as a promoting factor for tumor evasion from V γ 9V δ 2 T cells immunosurveillance.

Materials and Methods

$\gamma\delta$ T cell culture

PBMCs were isolated by density gradient separation (UniSep®, Novamed, Jerusalem, Israel) from blood samples of healthy donors (n = 15) recruited at the Blood Transfusion Center (Etablissement Français du Sang, Rennes, France). The PBMCs were resuspended at 2×10^6 /mL in RPMI 1640 (Eurobio, Les Ullis, France) supplemented with 10% FCS (Gibco Invitrogen Life Technologies, Cergy Pontoise, France), 1% L-glutamine, 50 μ g/mL streptomycin and 50 IU/mL penicillin, referred to elsewhere as complete medium. The cells were stimulated with 3 μ M BrHPP (IPH1101, Phosphostim™, a kind gift of Innate Pharma, Marseille, France) in the presence of 400 IU/mL IL-2 (Proleukin®, Novartis, Suresnes, France) and maintained for 2 weeks to generate polyclonal V γ 9V δ 2 T cell lines. Every 3 days, fresh complete medium supplemented with 400 IU/mL IL-2 was added. Resting V γ 9V δ 2 T cell lines were checked for purity by flow cytometry (>85% $\gamma\delta^+$ CD3⁺ cells) and subsequently used in phenotype/functional assays. In some experiments, expanded V γ 9V δ 2 T cells were stimulated with an immobilized anti-CD3 monoclonal antibody (mAb) (UCHT1, 1 μ g/mL), with 20 ng/mL PMA and 0.5 μ M ionomycin or with BrHPP (3 nM to 3 μ M).

Tumor cell lines

The K562 (myelogenous leukemia), Daudi and Raji (Burkitt's lymphoma) and HT-29 (colon carcinoma) human cell lines were obtained from the American Type Cell Collection. The hepatocellular carcinoma cell lines (HepG2, HuH7, BC2 and HepaRG) were a gift from C. Guillouzo (INSERM U911, Rennes, France). The THP1 (acute monocytic leukemia), P815 (mouse mastocytoma) and RPMI 8226 (myeloma) cell lines were a gift from E. Scotet (UMR S 892 Nantes-Angers, France). All tumor cell

lines were maintained in complete medium except for the HCC cell lines, which were cultured in Williams' E medium with 10% FCS, 0.5 μ M hydrocortisone (Pharmacia, Guyancourt, France) and 0.5 μ g/mL insulin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). In some experiments, pre-treatment of tumor cells with an aminobisphosphonate or a statin was performed by incubating cells overnight with 50 nM zoledronate (Zometa[®], Novartis, France) or 10 μ M mevastatin (Sigma-Aldrich), respectively. The cells were then extensively washed before use. In mAb cross-linking assays, the P815 cells were pre-incubated with mAbs at room temperature for 30 minutes before co-culture with effector cells.

Vector construction

cDNAs encoding the full-length human Necl-2 protein were provided by V. Ossipow (Department of Biochemistry, University of Geneva, Switzerland) (22). Human cDNAs were cloned into a gammaretrovirus-derived SFG vector backbone. Dicistronic vectors containing the puromycin-N-acetyltransferase open reading frame cloned downstream of an internal ribosome entry site (IRES-puro) were used to express the proteins. Vectors containing the IRES-puro sequence and multiple cloning sites were used as controls (Ctrl).

Gene transfer procedure

H29/293 GPG packaging cells were transfected with the SFG vector encoding Necl-2 by the calcium chloride precipitation method(241). The Daudi, Raji and HT-29 cell lines were infected with cell-free retroviral supernatant in the presence of 8 μ g/mL of polybrene (Sigma-Aldrich) for 16 hours, as

previously described (23). Puromycin (Sigma-Aldrich) was added at 5 to 20 µg/mL to the medium for 1 week to select cells expressing the vector-encoded puromycin-N-acetyltransferase.

Flow cytometry analysis

Fluorochrome-conjugated mAbs against the following antigens were used to stain the V γ 9V δ 2 T cells: CD3 (UCHT1), pan- $\gamma\delta$ TCR (IMMU510), V δ 2 (IMMU389), CD69 (TP1.55.3), CD27 (1A4CD27), CD45RA (ALBP11) and IFN- γ (45.15) from Immunotech (Marseille, France); CD107 (H4A3) from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA); and CRTAM (210213) from R&D systems (Lille, France). An unconjugated mAb against Necl-2 (3.E.1) from MBL (Woburn, MA, USA) and fluorochrome-conjugated secondary mAbs from Southern Biotech (Birmingham, Alabama, USA) were used to stain tumor cells. Isotype-matched immunoglobulins from the corresponding manufacturer were used as negative controls. Flow cytometry analyses were performed using FACSCalibur systems (BD Biosciences) and FlowJo software (Tree Star, OR, USA).

CD107 mobilization assay and intracellular cytokine staining

Expanded V γ 9V δ 2 T cells in a resting state were co-cultured at 37°C with tumor cells at an effector:target ratio (E:T) of 1:1 in a complete medium containing the fluorochrome-conjugated anti-CD107 mAb (or the corresponding isotype). Monensin (3 µM, Sigma-Aldrich) was added 1 hour after beginning the assay. After incubation for 6 or 10 hours, cells were labeled with fluorochrome-conjugated anti- $\gamma\delta$ TCR and anti-CRTAM mAbs. Then, the cells were fixed in a 4% paraformaldehyde solution and permeabilized with PBS containing 0.1% saponin (Sigma-Aldrich) and 0.5% bovine serum

albumin (Sigma-Aldrich). Finally, the cells were labeled with the fluorochrome-conjugated anti-IFN- γ mAb and analyzed by flow cytometry.

Membrane cell transfer measurement

Expanded V γ 9V δ 2 T cells were stimulated for 6 hours with immobilized anti-CD3 mAbs and resuspended for 24 hours in complete medium. The cells were then stained with the membrane dye PKH67 (Sigma Aldrich) according to the manufacturer's recommendations and co-cultured with tumor cells in complete medium at an E:T ratio of 1:1 at 37°C. After 1 hour of incubation, the cells were labeled for 20 minutes at 4°C with fluorochrome-conjugated anti-CRTAM and anti- $\gamma\delta$ TCR mAbs and washed three times with ice-cold PBS containing 0.5 mM EDTA before being analyzed by flow cytometry.

Cytotoxicity assay

Expanded V γ 9V δ 2 T cells were tested for cytotoxicity against tumor cell lines using a standard ^{51}Cr release assay. Briefly, target cells labeled with ^{51}Cr sodium chromate (0.2 mCi/ 10^6 cells, Amersham) were co-cultured with expanded V γ 9V δ 2 T cells in complete medium for 4 hours at 37°C. The E:T ratios ranged from 1:1 to 20:1. ^{51}Cr release was assessed in culture supernatants using a Top-count gamma counter (Packard Instrument). The percentage of specific lysis was calculated using the following formula: $[(\text{mean experimental cpm} - \text{mean spontaneous cpm}) / (\text{mean maximum cpm} - \text{mean spontaneous cpm})] \times 100$. The results shown are the mean of assays performed in triplicates.

Cell death measurement

Expanded V γ 9V δ 2 T cells were co-cultured with tumor cells in complete medium at an E:T ratio of 1:1 for 4 hours at 37°C. The cells were then labeled with fluorochrome-conjugated anti-pan- $\gamma\delta$ TCR and anti-CRTAM mAbs. After two washes in ice-cold PBS, the cells were labeled with fluorochrome-conjugated Annexin-V according to the manufacturer's instructions and analyzed by flow cytometry. Annexin-V staining on gated CRTAM⁺ or CRTAM⁻ $\gamma\delta$ ⁺ T cells was analyzed. In the blocking assays, the target cells were previously treated with saturating concentrations (20 μ g/ml) of the recombinant human CRTAM/Fc chimera (R&D systems) or with a control molecule (recombinant human IgG1 Fc, rHlgFc, R&D Systems) for 30 minutes at 4°C. Some assays were performed with expanded V γ 9V δ 2 T cells pretreated for 30 minutes at 37°C with the apoptosis inhibitor z-vad (100 μ M), the necroptosis inhibitor necrostatin (100 μ M) or the autophagic cell death inhibitor wortmannin (200 nM) before co-culture with tumor cells. All inhibitors were purchased from Enzo Life Science (Farmingdale, New York, USA).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, USA). Comparison tests were carried out using an unpaired and paired t-test. *, ** and *** indicate statistically significant differences with $p < 0.05$, $p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively.

Results

CRTAM is a phenotypic marker of V γ 9V δ 2 T cell activation

CRTAM expression was assessed by flow cytometry on resting or BrHPP-stimulated V γ 9V δ 2 T cells. In freshly isolated PBMCs, CRTAM was undetectable in V δ 2⁺ T cells (Figure 1A). In contrast, stimulation with a single dose of BrHPP induced a strong up-regulation of CRTAM in the majority of V γ 9V δ 2 T cells. Kinetic analysis showed that CRTAM expression was up-regulated 6 hours after BrHPP stimulation, with peak expression at 24 hours (77% of CRTAM⁺ cells). Notably, CRTAM expression was transitional and decreased starting 48 hours after stimulation. By comparison, the kinetic expression of the activation marker CD69 occurred earlier, with up-regulation starting 2 hours after the addition of phosphoantigen and sustained over time. Similar profiles of CRTAM expression were observed on the four distinct phenotypic subsets of V γ 9V δ 2 T cells: naive (CD45RA⁺ CD27⁺), central memory (CD45RA⁻ CD27⁺), effector memory (CD45RA⁻ CD27⁻) and terminally differentiated cells (CD45RA⁺ CD27⁻) (Figure 1B).

In addition, CRTAM expression was analyzed in polyclonal V γ 9V δ 2 T cell lines obtained by incubating PBMCs with BrHPP and IL-2 for 2 weeks. No significant CRTAM expression was detected in expanded $\gamma\delta$ T cells in a resting state (Figure 2A). However, activation of expanded V γ 9V δ 2 T cells with PMA/ionomycin or immobilized anti-CD3 antibodies strongly triggered CRTAM expression (Figure 2B). Similarly, re-stimulation of V γ 9V δ 2 T cells with BrHPP resulted in CRTAM up-regulation in a dose-dependent manner up to 300 nM BrHPP (Figure 2C). Overnight co-incubation of expanded V γ 9V δ 2 T cells with the immunogenic tumor cell lines Daudi or RPMI 8226 led to CRTAM expression, whereas co-culture with poorly immunogenic tumor cell lines (Raji, K562, THP1, HT-29, HuH7 and HepG2) did not (Figure 2D). Of note, sensitization of poorly immunogenic tumor cell lines with

zoledronate reversed their inability to spontaneously induce CRTAM expression. As shown in Figure 2E, treatment of sensitized HepG2 tumor cells with mevastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway, decreased CRTAM expression in V γ 9V δ 2 T cells. Together, these data indicate that CRTAM expression is associated with TCR engagement.

CRTAM expression in phosphoantigen-expanded V γ 9V δ 2 T cells is associated with effector functions

We have investigated the functional properties of activated CRTAM⁺ V γ 9V δ 2 T cells. As previously observed, CRTAM expression is up-regulated in V γ 9V δ 2 T cells stimulated with zoledronate-sensitized Raji or HT-29 cells (Figure 3). Interestingly, we observed that CRTAM expression in expanded V γ 9V δ 2 T cells was strongly associated with IFN- γ production and CD107a mobilization. As expected, V γ 9V δ 2 T cells co-incubated with unsensitized tumor cell lines neither expressed CRTAM nor produced IFN- γ or CD107a.

CRTAM is down-regulated in V γ 9V δ 2 T cells and specifically acquired by Necl-2⁺ tumor cells

The Daudi and Raji cell lines, which are target cells commonly used to study V γ 9V δ 2 T cell functions, do not express Necl-2 (supplementary data Figure 1) (17). To further evaluate the role of CRTAM, we genetically modified these two tumor cell lines to induce the constitutive expression of full-length Necl-2 (supplementary data Figure 1). Co-culture of expanded V γ 9V δ 2 T cells expressing CRTAM upon CD3 stimulation with Necl-2-expressing tumor cells specifically resulted in the rapid and dramatic down-regulation of CRTAM expression in terms of both cellular frequency and level expression

(Figure 4A). In parallel, we observed the concomitant acquisition of CRTAM expression on the cell surface of Necl-2⁺ but not control tumor cells (Figure 4B). To investigate the mechanisms by which CRTAM is recovered by Necl-2⁺ tumor cells, we measured cell membrane transfer by staining V γ 9V δ 2 T cells with a fluorescent dye. Following cell contact with CRTAM⁺ V γ 9V δ 2 T cells for 1 hour, Necl-2⁺ tumor cells, but not control tumor cells, had acquired membrane fragments with cell-surface CRTAM molecules (Figure 4C). Next, we examined whether the CRTAM in V γ 9V δ 2 T cells might be shed or secreted into the medium. Cell-free supernatants were collected from CD3-stimulated V γ 9V δ 2 T cell culture incubated with tumor cells or with PMA/ionomycin for 1 hour. Conditioned supernatants were then added to Daudi Necl-2 cell cultures for 1 hour. No significant CRTAM expression on Daudi Necl-2 cells was detected by immunofluorescence, suggesting that the presence of cell-surface CRTAM on tumor cells was not due to the binding of a soluble form of CRTAM (Figure 4D).

The CRTAM–Necl-2 interaction does not modify V γ 9V δ 2 T cell effector functions

Because CRTAM has been reported to be involved in the effector functions of activated NK and CTL *in vitro*, we analyzed the effects of the CRTAM-Necl-2 interaction on the functional properties of V γ 9V δ 2 T cells. V γ 9V δ 2 T cell lines that expressed high levels of CRTAM upon CD3 stimulation displayed similar cytotoxic activity against Necl-2-expressing target cells or control target cells (Figure 5A). Next, we evaluated the response of the same effector cells to an anti-CRTAM mAb in a redirected killing assay against an Fc γ R⁺ P815 murine mastocytoma target. In the presence of anti-CRTAM mAb, neither the enhancement of CRTAM⁺ V γ 9V δ 2 T cell cytotoxicity nor a synergic effect with the anti- $\gamma\delta$ TCR mAb was observed (Figure 5B). Additional experiments were performed with resting V γ 9V δ 2 T cell lines not expressing CRTAM. We observed that V γ 9V δ 2 T cells co-cultured with

sensitized target cells that induced CRTAM during the cytotoxic assay elicited the same lytic response against Necl-2-expressing target cells or control target cells (Figure 5C). Similarly, these effector cells produced equivalent levels of IFN- γ after incubation with Necl-2-expressing tumor cells or control tumor cells (Figure 5D). Comparable data were obtained in a CD107 mobilization assay (data not shown). Together, these results indicate that CRTAM is not an activating receptor for V γ 9V δ 2 T cells.

The CRTAM–Necl-2 interaction induces V γ 9V δ 2 T cell death

The effects of the CRTAM-Necl-2 interaction on V γ 9V δ 2 T cell survival were examined using a flow cytometry-based Annexin-V assay. Resting V γ 9V δ 2 T cell lines were incubated with zoledronate-sensitized Raji or Daudi cells for 4 hours. The level of Annexin-V staining increased in CRTAM⁺ V γ 9V δ 2 T cells following cell contact with Necl-2-expressing tumor cells but not control target cells (Figure 6A and B). Higher Annexin-V levels in CRTAM⁺ V γ 9V δ 2 T cells than in CRTAM⁻ V γ 9V δ 2 T cells were also noted after co-culture with tumor cell lines that naturally expressed Necl-2 (HuH7, HepG2 and RPMI 8226) (data not shown). Annexin-V levels in CRTAM⁺ V γ 9V δ 2 T cells were significantly reduced by soluble recombinant human CRTAM (Figure 6C). In addition, we showed that ligation of CRTAM with a specific antibody coated on P815 cells markedly increased cell death of activated CRTAM⁺ V γ 9V δ 2 T cells (Figure 6D). This effect was enhanced after co-engagement of CRTAM and the $\gamma\delta$ T cell receptors. The mechanisms involved in CRTAM-mediated cell death were investigated using specific antagonists. Cell death of CRTAM⁺ V γ 9V δ 2 T cells following contact with Necl-2⁺ targets was significantly inhibited by wortmannin, an inhibitor of autophagic cell death (Figure 6E). Neither z-vad, an inhibitor of apoptosis, nor necrostatin, an inhibitor of necroptosis, had an impact on V γ 9V δ 2 T cell death.

Discussion

The expression of CRTAM has been predominantly described in activated NK, NKT and CD8 $\alpha\beta$ T cells (16). In this study, we document for the first time the presence of CRTAM in activated V γ 9V δ 2 T cells. Notably, we show that the expression of CRTAM on V γ 9V δ 2 T cells is induced by two specific TCR-dependent stimuli: synthetic phosphoantigens and direct contact with immunogenic tumor cells. The expression of CRTAM appears later than that of the activation marker CD69, with transient expression at similar levels in naive and memory V γ 9V δ 2 T cell subsets. In contrast, we recently reported the constitutive expression of two structurally related receptors, CD226/DNAM-1 and CD96, in V γ 9V δ 2 T cells (5). Because CRTAM expression was induced after activation, we expected to observe this receptor in cytotoxic and/or IFN- γ -producing V γ 9V δ 2 T cells. The particular pattern of CRTAM expression raised the question of its functional role in V γ 9V δ 2 T cells. By investigating the impact of the CRTAM-Necl-2 interaction on the effector properties of expanded V γ 9V δ 2 T cells, we did not notice any change in cytotoxic activity or IFN- γ production of CRTAM⁺ effector cells after challenge with Necl-2⁺ target cells compared to control target cells. Of note, cytotoxic activity was evaluated with either V γ 9V δ 2 T cells expressing a high level of CRTAM upon anti-CD3 mAb stimulation or resting effector cells in which CRTAM expression was induced by contact with immunogenic tumor cells during the cytotoxic assay. In addition, cross-linking of CRTAM with a specific mAb did not impact the cytotoxic activity of effector cells. Our results lead us to conclude that the CRTAM in V γ 9V δ 2 T cells is not an activating receptor. Several authors have reported that CRTAM is not necessary for the cytotoxic function of activated CD8 $\alpha\beta$ T cells in *in vitro* mouse or human models (17, 18, 21, 24). Of note, Boles *et al.* have observed that the CRTAM-Necl-2 interaction promotes IFN- γ production in human activated CD8 T lymphocytes but not NK cells (17). Finally, CRTAM has been shown to contribute to the cytotoxicity of human but not mouse NK cells

(17, 18). Collectively, these data indicate that the functional consequences of CRTAM engagement depend on the type of effector cells and/or the model species.

Interestingly, we showed that V γ 9V δ 2 T cells quickly down-regulate the expression of CRTAM after contact with Necl-2⁺ but not Necl2⁻ tumor cells, suggesting that this process is mediated by ligand binding. CRTAM down-regulation most likely does not require TCR engagement because similar levels of down-regulation were obtained with Necl-2-expressing Daudi and Raji cells that were recognized or not by V γ 9V δ 2 T cells, respectively. In parallel with CRTAM down-regulation, the concomitant acquisition of CRTAM by Necl2⁺ tumor cells was observed, suggesting an intercellular transfer of cell-surface CRTAM from V γ 9V δ 2 T cells to tumor cells. The transfer of surface proteins from target to immune effector cells is a widespread physiological process (25). For example, Espinosa *et al.* have reported that V γ 9V δ 2 T cells can acquire plasma membrane molecules from tumor cells (26). However, little is known regarding the intercellular transfer of surface molecules in the opposite way, from tumor cells to immune cells. Acquisition of NK cell inhibitory receptors or NKG2D by target cells has been documented (27, 28). Our data indicate that the process involved in intercellular CRTAM protein exchange displays three characteristics: 1) it is a rapid phenomenon, as CRTAM molecules were detected on tumor cells within 5 minutes after contact with V γ 9V δ 2 T cells; 2) it is not based on cleavage of CRTAM at the cell surface of V γ 9V δ 2 T cells or secretion of soluble CRTAM molecules because we do not observe the *de novo* presence of CRTAM in tumor cells after addition of supernatant from activated V γ 9V δ 2 T cells co-cultured with or without tumor cells; and 3) it depends substantially on a trogocytosis-like mechanism, as we showed in cell membrane transfer experiments that Necl-2⁺ tumor cells specifically recovered components of CRTAM⁺ lymphocyte membranes. Other mechanisms could also be involved. A specific intercellular protein transfer through a membrane nanotube has been described (29). Alternately, CRTAM molecules could be plucked from

the V γ 9V δ 2 T cell surface and specifically acquired by tumor cells after binding with Necl-2 (25). Thus, further studies are required to determine the exact mechanism for CRTAM transfer to tumor cells.

Importantly, our work also reveals that CRTAM is involved in activated V γ 9V δ 2 T cell survival. Indeed, the interaction of CRTAM with tumor cells expressing Necl-2 either naturally or after transduction results in cell death of activated V γ 9V δ 2 T lymphocytes. This selective effect is inhibited by soluble human recombinant CRTAM, revealing a specific CRTAM-Necl-2 interaction. To date, three main mechanisms of programmed cell death have been described: apoptosis, necroptosis (also called programmed necrosis), and cell death by autophagy (30). An role of apoptosis or necroptosis in CRTAM-mediated cell death was not observed in our study. Conversely, the contribution of an autophagic cell death mechanism was evidenced. Autophagy is characterized by an active degradation of intracellular components through the lysosomal pathway (31). In this regard, our unpublished results of cell staining with acridine orange, a lysosomal marker, show an increase of the fluorescent dye staining in V γ 9V δ 2 T cells after co-culture with Necl-2⁺ tumor cells but not with control tumor cells (32). Autophagy is described as a cytoprotective process that plays essential roles in T cell development, activation and proliferation (31). However, autophagy may also constitute a lethal mechanism that mediates autophagic cell death under certain conditions (30). Indeed, Li *et al.* have shown that growth factor withdrawal induces cell death through an autophagic pathway in CD4⁺ T cells (33). Inhibitors of autophagy, such as wortmannin, allow to discriminate autophagic cell death and the cytoprotective autophagy (30, 34). Indeed, in presence of autophagic cell death, a treatment by these inhibitors decreases the cell death. In contrast, in case of stress-induced cell death with cytoprotective autophagy, inhibitors of autophagy increase the cell death. In our experiments, wortmannin reduces CRTAM-mediated cell-death demonstrating the triggering of autophagic cell death following CRTAM engagement. Additional studies are now needed to

understand which signals contribute to autophagic cell death of activated V γ 9V δ 2 T lymphocytes. In this respect, the molecular events that control signaling through the CRTAM receptor are poorly understood. The intracytoplasmic tail of CRTAM has three phosphorylation sites and a binding site that allow recruitment of PDZ-domain proteins, such as Scrib (35). Recent data from Yeh *et al.* have shown that the regulation of cell polarity by CRTAM is controlled by Scrib (20). Because Necl-2 is widely distributed in various tissue types, the CRTAM-Necl-2 interaction could represent a critical pathway for V γ 9V δ 2 T cell homeostasis and could serve to limit or terminate an ongoing response by inducing cell death of activated lymphocytes (36). Inactivation of the *TSLC1* gene, which leads to the suppression of Necl-2 expression, has been frequently described in various human cancers, including lung, cervical and breast cancers (37). Conversely, Necl-2 was found to be expressed *de novo* in adult T leukemia or over-expressed in certain other tumors (38–42). Thus, similar to tumor-associated molecules, such as FasL or PD-L1, Necl-2 in tumor cells may represent a new tumor counterattack mechanism to evade immunosurveillance by V γ 9V δ 2 T cells (43).

In conclusion, our study reveals that CRTAM, which is transiently expressed in activated V γ 9V δ 2 T cells, appears dispensable for the effector functions of these cells. In addition, our work highlights that the CRTAM-Necl-2 interaction is critical for the control of V γ 9V δ 2 T cell survival. Ultimately, Necl-2 expression in tumor cells could be a factor that limits $\gamma\delta$ T cell-mediated immunosurveillance against cancer. Therapeutic interventions aiming at reducing Necl-2 induced cell death may be of major interest to improve V γ 9V δ 2 T cell-based immunotherapy.

Acknowledgements: We thank C. Guillouzo (Inserm U991, Rennes) and E. Scotet (Inserm U892, Nantes) for providing the tumor cell lines and H. Sicard (Innate Pharma, Marseille) for providing the BrHPP. We are grateful JJ. Fournié and L. Baricault (UMR1037, CRCT, Toulouse) for useful discussions. We are also indebted to the Centre de Ressources Biologiques of CHU Rennes for technical advice.

Grant support: This work was supported by grants from the Ligue Contre le Cancer, the Région Bretagne and INCA PL 2008-034. OT was supported by a grant from Innate Pharma.

References

1. Morita, C. T., C. Jin, G. Sarikonda, and H. Wang. 2007. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol. Rev.* 215: 59–76.
2. Corvaisier, M., A. Moreau-Aubry, E. Diez, J. Bennouna, J.-F. Mosnier, E. Scotet, M. Bonneville, and F. Jotereau. 2005. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J. Immunol.* 175: 5481–5488.
3. Viey, E., G. Fromont, B. Escudier, Y. Morel, S. Da Rocha, S. Chouaib, and A. Caignard. 2005. Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. *J. Immunol.* 174: 1338–1347.
4. Bouet-Toussaint, F., F. Cabillic, O. Toutirais, M. Le Gallo, C. Thomas de la Pintièrre, P. Daniel, N. Genetet, B. Meunier, E. Dupont-Bierre, K. Boudjema, and V. Catros. 2008. Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of human solid tumors. Potential for immunotherapy of hepatocellular and colorectal carcinomas. *Cancer Immunol. Immunother.* 57: 531–539.
5. Toutirais, O., F. Cabillic, G. Le Friec, S. Salot, P. Loyer, M. Le Gallo, M. Desille, C. T. de La Pintièrre, P. Daniel, F. Bouet, and V. Catros. 2009. DNAX accessory molecule-1 (CD226) promotes human hepatocellular carcinoma cell lysis by Vgamma9Vdelta2 T cells. *Eur. J. Immunol.* 39: 1361–1368.
6. Gomes, A. Q., D. S. Martins, and B. Silva-Santos. 2010. Targeting $\gamma\delta$ T lymphocytes for cancer immunotherapy: from novel mechanistic insight to clinical application. *Cancer Res.* 70: 10024–10027.

7. Hannani, D., Y. Ma, T. Yamazaki, J. Déchanet-Merville, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2012. Harnessing $\gamma\delta$ T cells in anticancer immunotherapy. *Trends Immunol.* 33: 199–206.
8. Gober, H.-J., M. Kistowska, L. Angman, P. Jenö, L. Mori, and G. De Libero. 2003. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J. Exp. Med.* 197: 163–168.
9. Gertner-Dardenne, J., C. Bonnafous, C. Bezombes, A.-H. Capietto, V. Scaglione, S. Ingoure, D. Cendron, E. Gross, J.-F. Lepage, A. Quillet-Mary et al. 2009. Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies. *Blood* 113: 4875–4884.
10. Bukowski, J. F., C. T. Morita, Y. Tanaka, B. R. Bloom, M. B. Brenner, and H. Band. 1995. V gamma 2V delta 2 TCR-dependent recognition of non-peptide antigens and Daudi cells analyzed by TCR gene transfer. *J. Immunol.* 154: 998–1006.
11. Bonneville, M., R. L. O'Brien, and W. K. Born. 2010. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 467–478.
12. Groh, V., R. Rhinehart, H. Secrist, S. Bauer, K. H. Grabstein, and T. Spies. 1999. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 6879–6884.
13. Fuchs, A., and M. Colonna. 2006. The role of NK cell recognition of nectin and nectin-like proteins in tumor immunosurveillance. *Semin. Cancer Biol.* 16: 359–366.
14. Chan, C. J., D. M. Andrews, and M. J. Smyth. 2012. Receptors that interact with nectin and nectin-like proteins in the immunosurveillance and immunotherapy of cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 24: 246–251.

15. Takai, Y., J. Miyoshi, W. Ikeda, and H. Ogita. 2008. Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 603–615.
16. Kennedy, J., A. P. Vicari, V. Saylor, S. M. Zurawski, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, and A. Zlotnik. 2000. A molecular analysis of NKT cells: identification of a class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM). *J. Leukoc. Biol.* 67: 725–734.
17. Boles, K. S., W. Barchet, T. Diacovo, M. Cella, and M. Colonna. 2005. The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8⁺ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM. *Blood* 106: 779–786.
18. Arase, N., A. Takeuchi, M. Unno, S. Hirano, T. Yokosuka, H. Arase, and T. Saito. 2005. Heterotypic interaction of CRTAM with Necl2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8⁺ T cells. *Int. Immunol.* 17: 1227–1237.
19. Kuramochi, M., H. Fukuhara, T. Nobukuni, T. Kanbe, T. Maruyama, H. P. Ghosh, M. Pletcher, M. Isomura, M. Onizuka, T. Kitamura et al. 2001. TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat. Genet.* 27: 427–430.
20. Yeh, J.-H., S. S. Sidhu, and A. C. Chan. 2008. Regulation of a late phase of T cell polarity and effector functions by Crtam. *Cell* 132: 846–859.
21. Takeuchi, A., Y. Itoh, A. Takumi, C. Ishihara, N. Arase, T. Yokosuka, H. Koseki, S. Yamasaki, Y. Takai, J. Miyoshi et al. 2009. CRTAM confers late-stage activation of CD8⁺ T cells to regulate retention within lymph node. *J. Immunol.* 183: 4220–4228.
22. Pellissier, F., A. Gerber, C. Bauer, M. Ballivet, and V. Ossipow. 2007. The adhesion molecule Necl-3/SynCAM-2 localizes to myelinated axons, binds to oligodendrocytes and promotes cell adhesion. *BMC Neurosci* 8: 90.

-
23. Fauquembergue, E., O. Toutirais, D. Tougeron, A. Drouet, M. Le Gallo, M. Desille, F. Cabillic, C. T. de La Pintièrre, M. Iero, L. Rivoltini et al. 2010. HLA-A*0201-restricted CEA-derived peptide CAP1 is not a suitable target for T-cell-based immunotherapy. *J. Immunother.* 33: 402–413.
24. Galibert, L., G. S. Diemer, Z. Liu, R. S. Johnson, J. L. Smith, T. Walzer, M. R. Comeau, C. T. Rauch, M. F. Wolfson, R. A. Sorensen et al. 2005. Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule. *J. Biol. Chem.* 280: 21955–21964.
25. Davis, D. M. 2007. Intercellular transfer of cell-surface proteins is common and can affect many stages of an immune response. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 238–243.
26. Espinosa, E., J. Tabiasco, D. Hudrisier, and J.-J. Fournié. 2002. Synaptic transfer by human gamma delta T cells stimulated with soluble or cellular antigens. *J. Immunol.* 168: 6336–6343.
27. Vanherberghen, B., K. Andersson, L. M. Carlin, E. N. M. Nolte-'t Hoen, G. S. Williams, P. Höglund, and D. M. Davis. 2004. Human and murine inhibitory natural killer cell receptors transfer from natural killer cells to target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 16873–16878.
28. Roda-Navarro, P., M. Vales-Gomez, S. E. Chisholm, and H. T. Reyburn. 2006. Transfer of NKG2D and MICB at the cytotoxic NK cell immune synapse correlates with a reduction in NK cell cytotoxic function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 11258–11263.
29. Onfelt, B., S. Nedvetzki, K. Yanagi, and D. M. Davis. 2004. Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J. Immunol.* 173: 1511–1513.

-
30. Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda et al. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 19: 107–120.
31. He, M.-X., I. X. McLeod, W. Jia, and Y.-W. He. 2012. Macroautophagy in T lymphocyte development and function. *Front Immunol* 3: 22.
32. Goussetis, D. J., J. K. Altman, H. Glaser, J. L. McNeer, M. S. Tallman, and L. C. Platanias. 2010. Autophagy is a critical mechanism for the induction of the antileukemic effects of arsenic trioxide. *J. Biol. Chem.* 285: 29989–29997.
33. Li, C., E. Capan, Y. Zhao, J. Zhao, D. Stolz, S. C. Watkins, S. Jin, and B. Lu. 2006. Autophagy is induced in CD4+ T cells and important for the growth factor-withdrawal cell death. *J. Immunol.* 177: 5163–5168.
34. Sun, T., Y. Yan, Y. Zhao, F. Guo, and C. Jiang. 2012. Copper oxide nanoparticles induce autophagic cell death in a549 cells. *PLoS ONE* 7: e43442.
35. Valle-Rios, R., G. Patiño-Lopez, O. Medina-Contreras, E. Canche-Pool, F. Recillas-Targa, E. Lopez-Bayghen, A. Zlotnik, and V. Ortiz-Navarrete. 2009. Characterization of CRTAM gene promoter: AP-1 transcription factor control its expression in human T CD8 lymphocytes. *Mol. Immunol.* 46: 3379–3387.
36. Takai, Y., K. Irie, K. Shimizu, T. Sakisaka, and W. Ikeda. 2003. Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, migration, and polarization. *Cancer Sci.* 94: 655–667.
37. Murakami, Y. 2005. Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/IGSF4, in human oncogenesis. *Cancer Sci.* 96: 543–552.

38. Sasaki, H., I. Nishikata, T. Shiraga, E. Akamatsu, T. Fukami, T. Hidaka, Y. Kubuki, A. Okayama, K. Hamada, H. Okabe et al. 2005. Overexpression of a cell adhesion molecule, TSLC1, as a possible molecular marker for acute-type adult T-cell leukemia. *Blood* 105: 1204–1213.
39. Ito, A., M. Hagiya, T. Mimura, M. Matsumoto, T. Wakayama, S. Iseki, H. Yokozaki, and M. Okada. 2008. Expression of cell adhesion molecule 1 in malignant pleural mesothelioma as a cause of efficient adhesion and growth on mesothelium. *Lab. Invest.* 88: 504–514.
40. Kitamura, Y., G. Kurosawa, M. Tanaka, M. Sumitomo, C. Muramatsu, K. Eguchi, Y. Akahori, Y. Iba, H. Tsuda, M. Sugiura et al. 2009. Frequent overexpression of CADM1/IGSF4 in lung adenocarcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383: 480–484.
41. Kuipers, J. E., E. A. Coenen, B. V. Balgobind, J. Stary, A. Baruchel, V. de Haas, E. S. J. M. de Bont, D. Reinhardt, G. J. L. Kaspers, J. Cloos et al. 2011. High IGSF4 expression in pediatric M5 acute myeloid leukemia with t(9;11)(p22;q23). *Blood* 117: 928–935.
42. Kikuchi, S., M. Iwai, M. Sakurai-Yageta, Y. Tsuboi, T. Ito, T. Maruyama, H. Tsuda, Y. Kanai, M. Onizuka, Y. Sato, and Y. Murakami. 2012. Expression of a splicing variant of the CADM1 specific to small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 103: 1051–1057.
43. Lu, B., and O. J. Finn. 2008. T-cell death and cancer immune tolerance. *Cell Death Differ.* 15: 70–79.

Authors affiliations:

*Inserm UMR991 « Foie, Métabolisme et Cancer », F-35033 Rennes, France ; †Inserm U1079, Rouen University Hospital, Cedex, F-76183 Rouen, France ; ‡Service de Cytogénétique et Biologie Cellulaire, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, F-35033 Rennes, France ; §Inserm U919, Groupement d'Intérêt Public Cyceron, Université de Caen Basse-Normandie, F-14074 Caen, France ; ¶Laboratoire d'Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Caen, F-14033 Caen, France

Abbreviations:

BrHPP, Bromohydrin pyrophosphate; CRTAM, Class I Restricted Associated Molecule; HCC, Hepatocellular Carcinoma; Zol, zoledronate

Figure 1. CRTAM is transiently expressed in V γ 9V δ 2 T cells following PBMC activation. (A) Kinetic study of CRTAM and CD69 expression in V γ 9V δ 2 T cells after PBMC stimulation with 3 μ M BrHPP and culture with IL-2. Double-staining was performed using mAbs against V δ 2, CRTAM (upper panel) or CD69 (lower panel). The proportion and mean fluorescence intensity (MFI) of CRTAM⁺ or CD69⁺ cells among V δ 2⁺ cells are indicated in upper-right quadrants. nd: not determined. The data are representative of 3 independent experiments. **(B)** Kinetic study of CRTAM expression in naive (CD27⁺ CD45RA⁺), central memory (CD27⁺ CD45RA⁻), effector memory (CD27⁻ CD45RA⁻) and terminally differentiated effector memory (TEMRA; CD27⁻ CD45RA⁺) V γ 9V δ 2 T cell subsets after PBMC stimulation as in panel A. Analyses were performed using mAbs against V δ 2, CRTAM, CD27 and CD45RA. The proportions of CRTAM⁺ cells in each subset of V δ 2⁺ cells are presented. The results from 3 independent experiments are shown (mean \pm SEM).

Figure 2. CRTAM is expressed on phosphoantigen-expanded V γ 9V δ 2 T cells following exposure to various stimuli. Phosphoantigen-expanded V γ 9V δ 2 T cells in a resting state were exposed to various stimuli. Surface expression of CRTAM was analyzed by flow cytometry using mAbs against pan- $\gamma\delta$ TCR and CRTAM. The proportion and MFI of CRTAM⁺ cells in $\gamma\delta$ ⁺ cells are indicated in each quadrant. Expanded V γ 9V δ 2 T cells were stimulated for 6 hours with: **(A)** PMA/ionomycin, **(B)** immobilized anti-CD3 mAbs, or **(C)** increasing doses of BrHPP. **(D, E)** Expanded V γ 9V δ 2 T cells were co-cultured overnight with tumor cells untreated (Medium) or pretreated with either zoledronate (Zol), mevastatin (Meva) or mevastatin plus zoledronate (Zol + Meva) (ratio 1:1). No stim: no stimulation.

Kinetic study of CRTAM expression was performed in panel B. The data are representative of 3 independent experiments.

Figure 3. CRTAM is associated with the effector functions of V γ 9V δ 2 T cells. Phosphoantigen-expanded V γ 9V δ 2 T cells in a resting state were cultured for 10 hours with tumor cells (Raji or HT-29 cells) untreated or pretreated with zoledronate (Zol) (ratio 1:1). No stim: no stimulation. IFN- γ accumulation and CD107 mobilization assays were performed as described in the Materials and Methods. The proportions of CRTAM⁺ IFN- γ ⁺ or CRTAM⁺ CD107⁺ cells within the $\gamma\delta$ ⁺ cells are indicated in each dot plot. The data are representative of 3 independent experiments.

Figure 4. CRTAM is down-regulated in V γ 9V δ 2 T cells and specifically acquired by Necl-2⁺ tumor cells. Phosphoantigen-expanded V γ 9V δ 2 T cells were harvested 24 hours after CD3 stimulation and then co-cultured with Raji or Daudi cells expressing Necl-2 or not (Control, Ctrl) (ratio 1:1). Kinetic expression of CRTAM **(A)** in V γ 9V δ 2 T cells and **(B)** in tumor cells was determined by flow cytometry using mAbs against pan- $\gamma\delta$ TCR and CRTAM. Before staining, the cells were washed once with ice-cold PBS containing 0.5 mM EDTA. The percentages of CRTAM⁺ cells (left panels) and the MFI of CRTAM (right panels) are shown. **(C)** Membrane cell transfer assay, as described in Materials and Methods. V γ 9V δ 2 T cells were labeled with the membrane dye PKH67 before being co-cultured with Daudi Ctrl (upper panel) or Daudi Necl-2 (lower panel) for 1 hour. The proportions of CRTAM⁺ PKH67⁺ cells among the $\gamma\delta$ ⁺ cells (left panel) and tumor cells (right panel) are presented in each dot plot. An overlay of PKH67 staining in CRTAM⁺ and CRTAM⁻ Daudi Necl-2 cells is shown. **(D)** CD3-stimulated V γ 9V δ 2 T cells were incubated with Daudi Necl-2, Daudi Ctrl or PMA/Iono. After 1 hour, the cells and

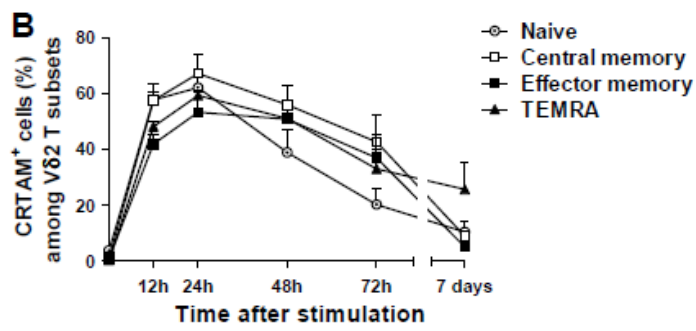
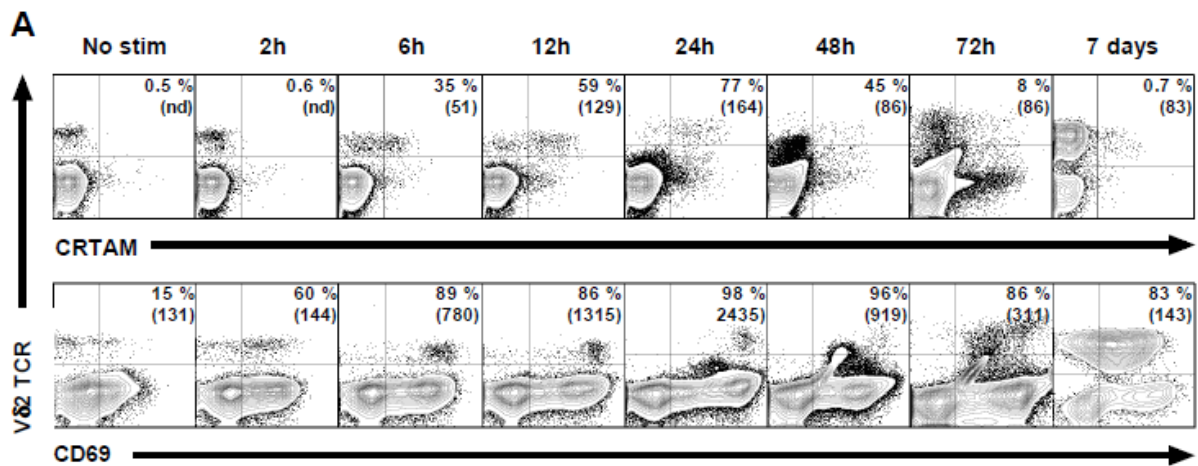
supernatants were collected. Cells were labeled for the expression of TCR- $\gamma\delta$ and CRTAM (upper panels). Daudi Necl-2 cells were incubated with supernatants from different conditions for 1 hour and labeled with mAbs against CRTAM (lower panels). For each condition, the percentages and MFI of CRTAM⁺ cells among the lymphocytes or tumor cells are indicated in the top right of each dot plot.

Figure 5. CRTAM-Necl-2 interaction does not alter *in vitro* V γ 9V δ 2 T cell effector functions. (A, B, C)

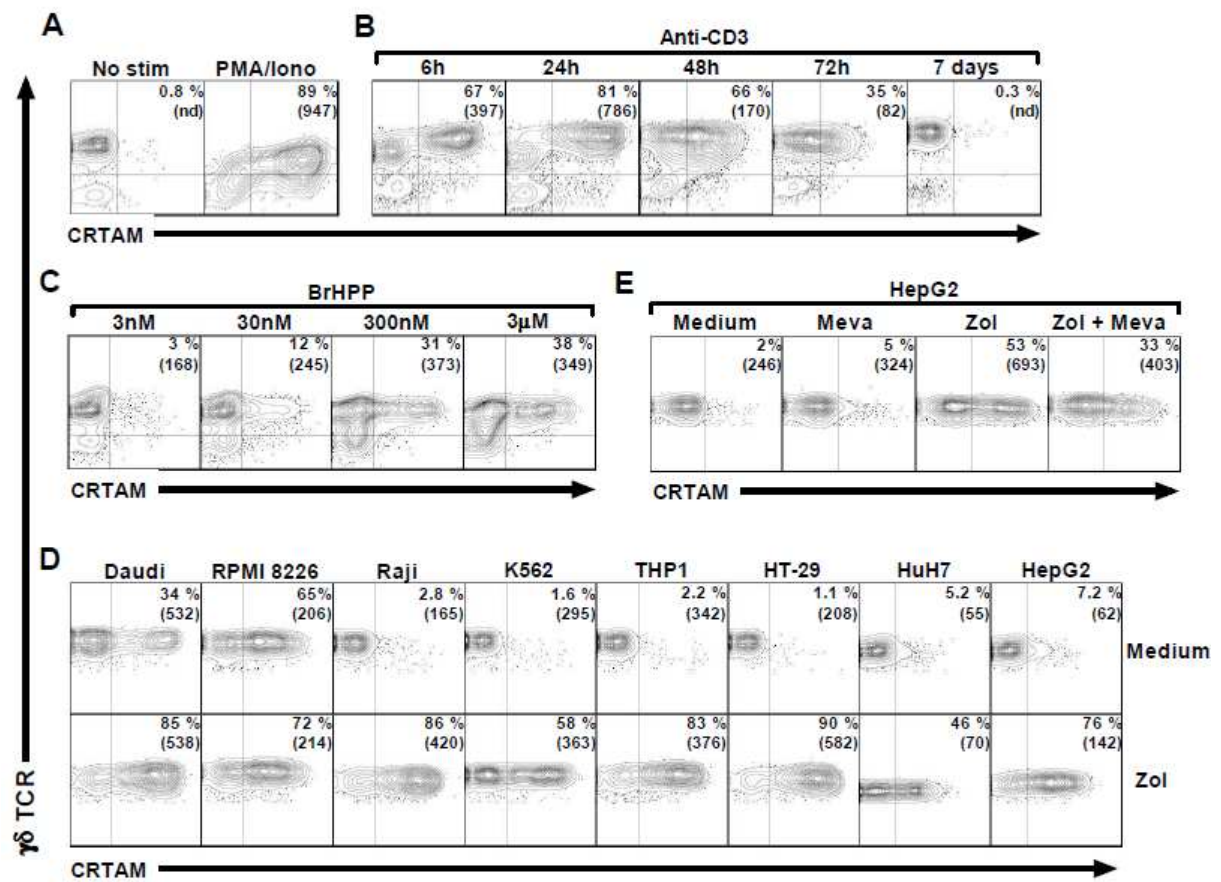
Cytotoxicity assays performed with a standard ⁵¹Cr release assay. **(A)** Expanded V γ 9V δ 2 T cells were harvested 24 hours after CD3 stimulation and then co-cultured with target cells previously labeled with ⁵¹Cr at various effector: target ratio (E:T ratio) for 4 hours. The target cells were tumors cells expressing Necl-2 or not (Ctrl). **(B)** P815 cells were incubated with anti-CRTAM (10 μ g/ml) and/or anti-pan- $\gamma\delta$ TCR (1 μ g/ml) or IgG1 isotype mAbs (1 μ g/ml) for 30 minutes before labeling with ⁵¹Cr. P815 cells were then co-cultured with expanded V γ 9V δ 2 T cells pre-stimulated with immobilized anti-CD3 mAbs as described in panel A. **(C)** Expanded V γ 9V δ 2 T cells in a resting state were co-cultured for 4 hours with target cells previously labeled with ⁵¹Cr (E:T ratio 1:1). Target cells were Raji cells expressing Necl-2⁺ or not (Ctrl) that were untreated or pretreated with zoledronate (Zol). **(D)** Phosphoantigen-expanded V γ 9V δ 2 T cells in a resting state were cultured for 6 hours with zoledronate-pretreated tumor cells (Raji or Daudi) expressing Necl-2 or not (Ctrl). The IFN- γ accumulation assay was performed as described in Materials and Methods. The percentages of CRTAM⁺ IFN- γ ⁺ cells are indicated in each dot plot along with the MFI values. In panels A, B and C, the results are from 5, 3 and 2 independent experiments (mean \pm SEM), respectively. In panel D, the data are representative of 3 independent experiments.

Figure 6. The CRTAM-Necl-2 cell-cell interaction induces V γ 9V δ 2 T cell death. (A, B) Phosphoantigen-expanded V γ 9V δ 2 T cells in a resting state were co-cultured for 4 hours with zoledronate-pretreated tumor cells (Raji or Daudi) expressing Necl-2 or not (Ctrl) (ratio 1:1). The measurement of V γ 9V δ 2 T cell death was performed as described in the Materials and Methods. Increases in Annexin-V MFI in CRTAM⁺ or CRTAM⁻ $\gamma\delta$ ⁺ T cells are shown (Δ MFI = Annexin-V MFI with Necl-2⁺ tumor cells – Annexin-V MFI with Ctrl tumor cells). The results are from at least 3 independent experiments (mean \pm SEM). **(C)** Similar experiments were performed in the presence of blocking recombinant human CRTAM/Fc chimera (hCRTAM) or control recombinant human IgG1/Fc chimera (rhIgFc), as described in Materials and Methods. HuH7, HepG2 and RPMI 8226 tumor cell lines naturally expressing Necl-2 were used. The percentage of Annexin-V staining inhibition in CRTAM⁺ $\gamma\delta$ ⁺ T cells due to the blocking hCRTAM was calculated according to the formula: [(Annexin-V MFI with rhIgFc-pretreated target – Annexin-V MFI with hCRTAM-pretreated target) / Annexin-V MFI with rhIgFc-pretreated target] x 100. **(D)** Expanded V γ 9V δ 2 T cells were harvested 24 hours after CD3 stimulation and then co-cultured with P815 cells at an E:T ratio of 1:1 for 4 hours. P815 cells were pre-incubated with anti-CRTAM (10 μ g/ml) and/or anti-pan- $\gamma\delta$ TCR (1 μ g/ml) mAbs or control isotype for 30 minutes. Increases in Annexin-V MFI in CRTAM⁺ or CRTAM⁻ $\gamma\delta$ ⁺ T cells with mAbs are shown (Δ MFI = Annexin-V MFI with mAbs – Annexin-V MFI with control isotype). **(E)** Expanded V γ 9V δ 2 T cells were untreated or pretreated with 100 μ M z-vad, 100 μ M necrostatin-1 (NEC-1) or 200 nM wortmannin before being co-cultured with Daudi Ctrl (white bars) or Necl-2 (black bars) for 4 hours. Decreases in Annexin-V MFI in CRTAM⁺ $\gamma\delta$ ⁺ with treatments are shown (Δ MFI = Annexin-V MFI with untreated V γ 9V δ 2 T cells – Annexin-V MFI with pretreated V γ 9V δ 2 T cells). In panels C, D and E, the results are from 3 independent experiments (mean \pm SEM).

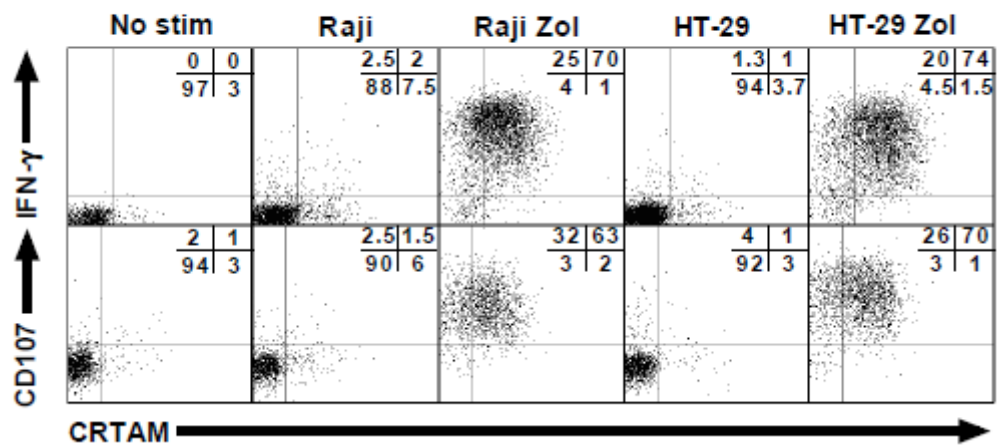
Dessarthe et al. Figure 1



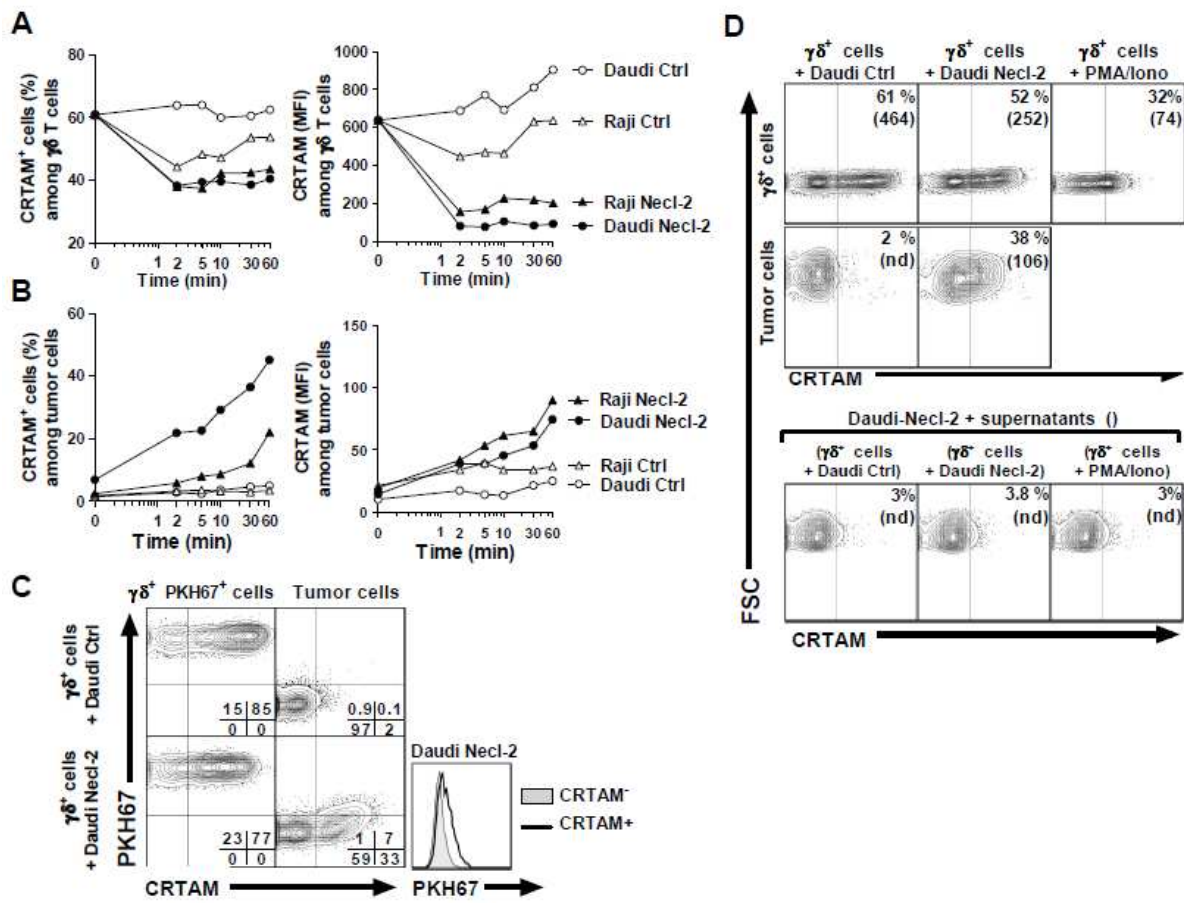
Dessarthe et al. Figure 2



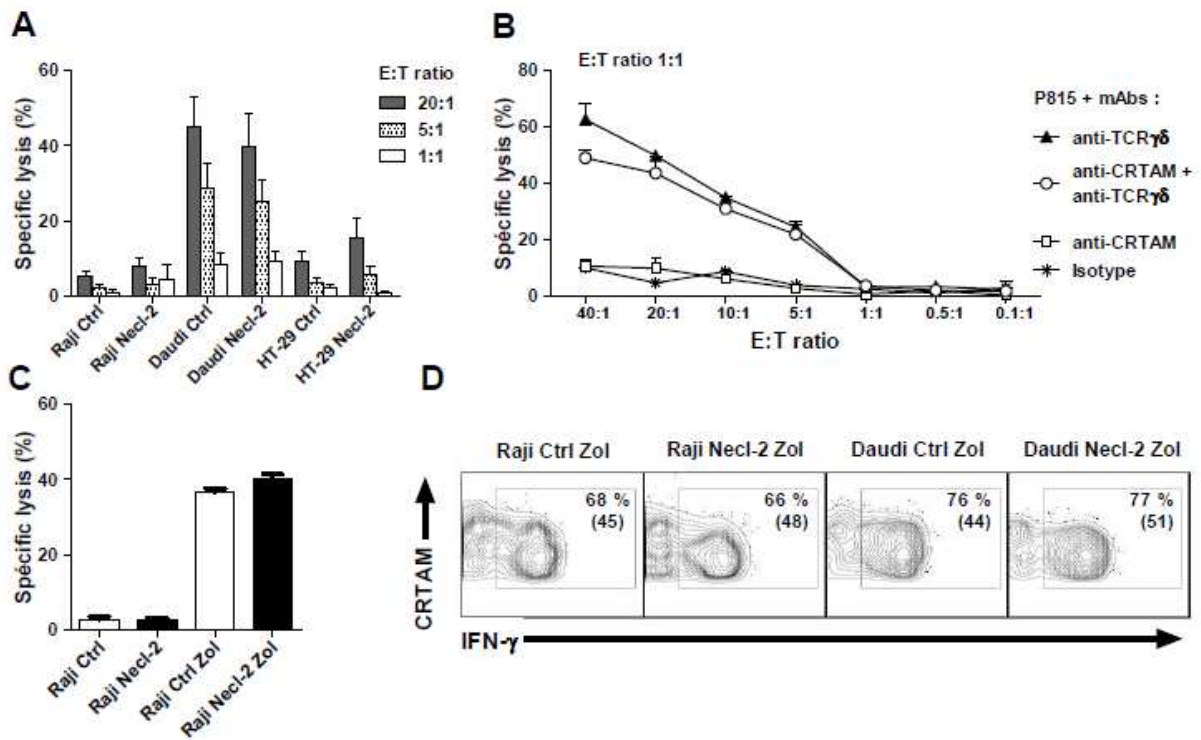
Dessarthe et al. Figure 3



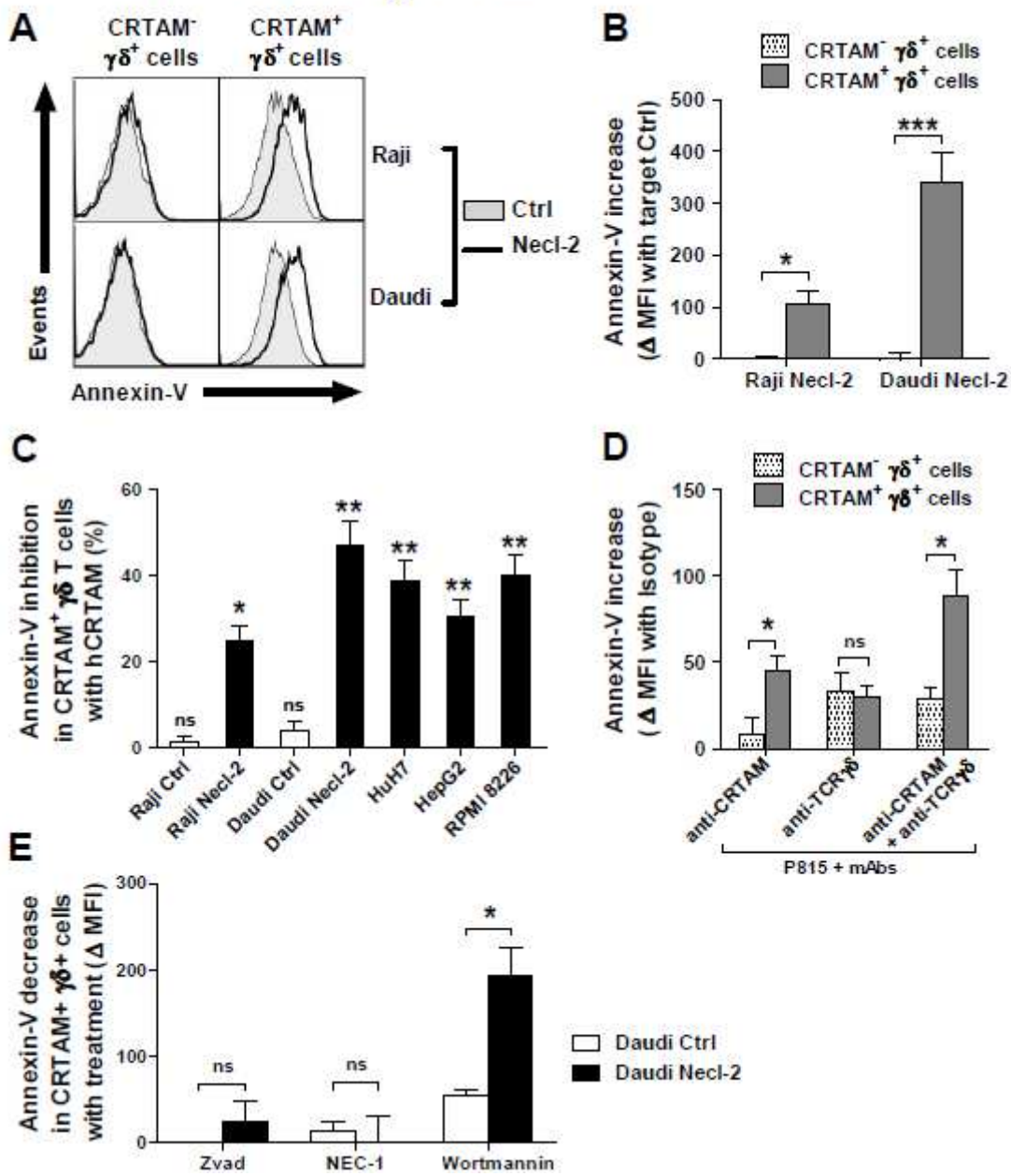
Dessarthe et al. Figure 4



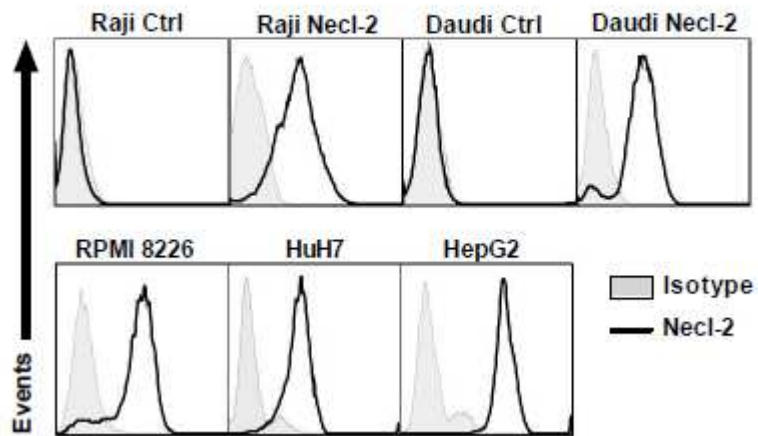
Dessarthe et al. Figure 5



Dessarthe et al. Figure 6

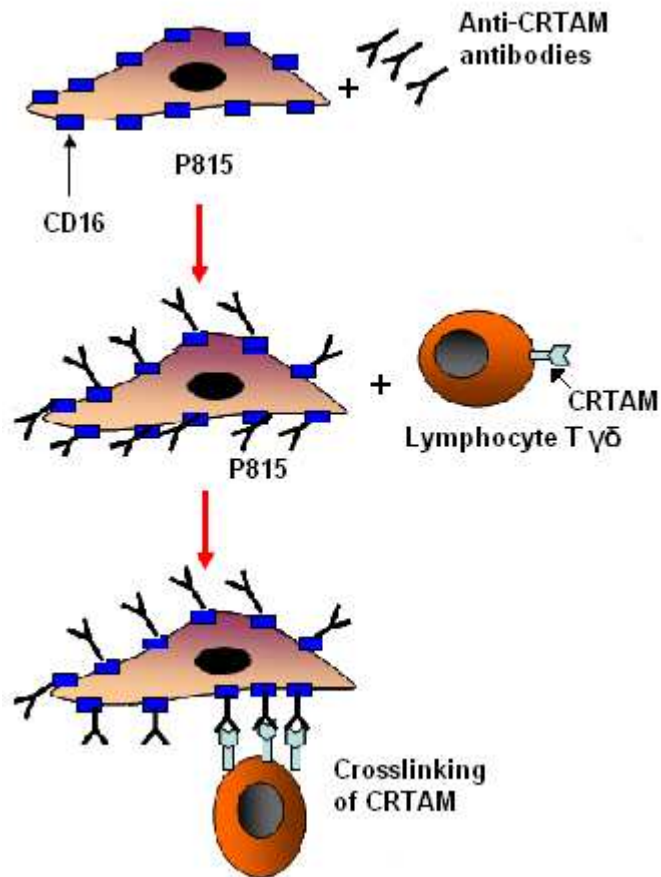


Dessarthe et al. Supplemental Figure S1



II.1.2. Annexe de l'article de thèse

Le principe de la lyse redirigée



Principe de l'engagement de CRTAM par les cellules P815. Les cellules P815 expriment la molécule CD16, un récepteur pour le fragment Fc des anticorps. L'incubation de P815 avec un anticorps anti-CRTAM conduit à la fixation de cet anticorps qui conserve sa partie spécifique libre pour une interaction. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ exprimant CRTAM peuvent ainsi se retrouver liés au P815. La cytotoxicité induite par l'engagement de CRTAM est mesurée par la technique du relargage du ^{51}Cr .

II.2. Études complémentaires

II.2.1. Matériels et méthodes

II.2.1.1. Dosage ELISA de CRTAM dans les surnageants de culture

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 ont été soit traités par PMA/ionomycine, ou soit co-cultivés pendant 1 heure avec des cellules tumorales (Daudi), prétraitées ou non par zoledronate et exprimant ou non Necl-2. Ensuite, les surnageants de culture ont été récupérés et la molécule CRTAM a été dosée à l'aide du kit DuoSet ELISA human CRTAM de chez R&D Systems (Lille, France) selon le protocole fourni par le fabricant.

II.2.1.2. Trogocytose des cellules tumorales par les lymphocytes T V γ 9V δ 2

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 ont été stimulés par l'anticorps anti-CD3 et resuspendus dans du milieu complet. Les cellules tumorales Daudi et Raji, exprimant ou non Necl-2, ont été colorés au PKH67 (Sigma Aldrich) selon le protocole du fabricant et co-cultivées avec les lymphocytes T V γ 9V δ 2 pendant différents temps (2, 5, 10, 30, 60 et 120 minutes) dans du milieu complet à 37°C. Ensuite, les cellules ont été marquées par les anticorps conjugués anti-CRTAM et l'anti-TCR V δ 2 ; puis elles ont été lavées trois fois avec du PBS froid contenant 0,5 mM d'EDTA avant analyse au cytomètre en flux.

II.2.1.3. Mesure de la mort des cellules NK induite par l'interaction CRTAM/Necl-2

Les cellules NK ont été préparées par tri à l'aide de billes magnétiques (NK cell Isolation kit II, Miltenyi Biotec, France) à partir de PBMCs de donneurs sains. Ensuite, les cellules NK ont été stimulées avec de la PMA/ionomycine pendant 4 heures à 37°C. Après un lavage avec du milieu complet, les cellules NK ont été co-incubées avec des cellules tumorales Daudi, exprimant ou non Necl-2, pendant 4 heures à 37°C. Les cellules ont été marquées avec des anticorps conjugués anti-CD56 (BD biosciences) et anti-CRTAM. Après deux lavages au PBS froid, les cellules ont été marquées avec l'annexine-V selon le protocole du fabricant et analysées par cytométrie en flux.

II.2.1.4. Mobilisation de CD107

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 ont été co-cultivés à 37°C pendant 6 heures avec les lignées Daudi ou Raji, Necl-2⁺ ou témoin (Ctrl) au ratio effecteur/cible 1:1, dans du milieu contenant un anticorps conjugué anti-CD107 ou son isotype correspondant. De la monensine (3 μ M, Sigma Aldrich) a été ajoutée après 1 heure de co-culture. Les cellules ont ensuite été marquées par l'anticorps conjugué anti-TCR V δ 2 et analysées par cytométrie en flux.

II.2.1.5. Coloration des mitochondries au DIOC6

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 ont été colorés avec le colorant DIOC6 (100 nM, Sigma Aldrich) pendant 30 minutes à 37°C. Après deux lavages en PBS, ils ont été co-cultivés à 37°C avec des cellules tumorales de la lignée Daudi, Necl-2⁺ ou témoin (Ctrl), pendant 4 heures. Les cellules ont ensuite été marquées avec des anticorps conjugués anti-TCR $\gamma\delta$ et anti-CRTAM avant d'être analysées par cytométrie en flux.

II.2.1.6. Construction de la lignée Daudi Necl-2-eGFP

Les cellules tumorales Daudi Necl-2eGFP (green fluorescent protein) ont été construites de la même façon que les lignées Daudi Necl-2 et Raji Necl-2 (voir matériels et méthodes de l'article soumis). Un vecteur onco-rétroviral codant la molécule de fusion Necl-2-eGFP a été utilisé. Après transduction, les cellules Daudi Necl-2-eGFP ont été triées par cytométrie en flux.

II.2.2. Résultats

II.2.2.1. Dosage de CRTAM soluble dans les surnageants de culture de lymphocytes T V γ 9V δ 2

L'observation de la présence de CRTAM sur les cellules tumorales Necl-2⁺ nous a amené à poser la question d'une sécrétion par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 d'une forme soluble de CRTAM ou du clivage potentiel de la forme membranaire sur ces cellules. Pour répondre à cette question, nous avons dosé CRTAM dans les surnageants de culture réalisées dans différentes conditions : lymphocytes T V γ 9V δ 2 seuls ou stimulés à la PMA/ionomycine, ou co-cultivés avec des cellules Daudi témoin (Ctrl) ou Daudi Necl-2⁺ (Figure 28).

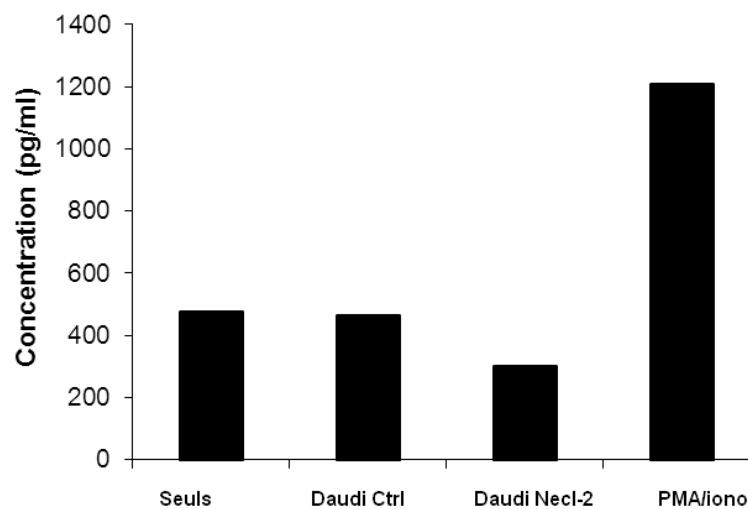


Figure 28 : Dosage de CRTAM dans les surnageants de culture. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 pré-stimulés par anticorps anti-CD3 ont été incubés seuls ou avec de la PMA/ionomycine ou co-cultivés avec des cellules Daudi témoins (ctrl), ou Daudi Necl-2⁺. Après 1 heure, les surnageants ont été collectés et CRTAM a été dosée par technique ELISA. La concentration en CRTAM est indiquée en pg/ml. La figure est représentative des résultats obtenus sur deux essais.

Le dosage montre une présence de CRTAM dans tous les surnageants de culture que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 soient co-cultivés ou non avec des cellules tumorales. Néanmoins, comme montré dans la figure 4D de l'article en révision, l'incubation de cellules tumorales exprimant Necl-2 avec des surnageants contenant la molécule CRTAM n'aboutit pas à une

détection de CRTAM à la surface des cellules tumorales Necl-2⁺ par cytométrie en flux. Ces résultats suggèrent la nécessité d'un contact effecteur-cible cellulaire pour que les cellules tumorales Necl-2⁺ expriment CRTAM.

II.2.2.2. Trogocytose des cellules tumorales par les lymphocytes T V γ 9V δ 2

Nos observations ont indiqué que les cellules tumorales Necl-2⁺ récupéraient CRTAM, exprimé par les lymphocytes T V γ 9V δ 2, en parallèle de fragments membranaires. Classiquement, ce sont les lymphocytes T V γ 9V δ 2 qui « trogocytent » les cellules tumorales. Il était donc intéressant de documenter l'impact de l'interaction CRTAM/Necl-2 sur le transfert membranaire dans le sens des cellules tumorales vers les lymphocytes T V γ 9V δ 2. Pour ce faire, les lignées tumorales Daudi et Raji, exprimant ou non Necl-2, ont été marquées au PKH67 et mises en contact pendant différents temps (2, 5, 10, 30, 60 et 120 minutes) avec des lymphocytes T V γ 9V δ 2 pré-stimulés par anticorps anti-CD3 pour induire l'expression de CRTAM par les lymphocytes T V γ 9V δ 2. Les résultats obtenus indiquent que la trogocytose augmente au cours du temps pour l'ensemble des conditions testées (Figure 29). En l'absence de pré-traitement par le zoledronate, la trogocytose des lymphocytes T V γ 9V δ 2 est plus importante sur la lignée Raji Necl-2⁺ que sur la lignée Raji témoin (Ctrl). Sur la lignée Daudi qui est reconnue par les lymphocytes T V γ 9V δ 2, aucune différence n'est observée avec la condition témoin. A ce stade de nos expériences, nous avons émis l'hypothèse que la molécule d'adhérence Necl-2 pouvait favoriser l'interaction cellulaire avec le lymphocyte T V γ 9V δ 2 et donc des échanges membranaires avec une lignée peu ou non reconnue telle que la lignée Raji. Dans le cas d'une lignée bien reconnue comme Daudi, les interactions cellulaires, et donc les échanges membranaires, seraient déjà optimums et la présence de Necl-2 n'aurait de ce fait aucun effet additionnel.

Pour étayer cette hypothèse, les mêmes essais ont été reproduits avec les cellules Raji en rajoutant la condition de pré-traitement de ces cellules avec du zoledronate, ce qui a pour effet d'amplifier la reconnaissance de ces cellules par les lymphocytes T V γ 9V δ 2. Nous avons confirmé que le niveau de reconnaissance de la cellule cible impactait la capacité des lymphocytes T V γ 9V δ 2 CRTAM⁺ à trogocytiser les cellules tumorales (Figure 29). En effet, la

trogocytose des lymphocytes T V γ 9V δ 2 ne varie plus entre la condition témoin et Necl-2⁺ lorsque les Raji étaient pré-traitées au zoledronate. Ces résultats démontrent que l'interaction CRTAM avec son ligand Necl-2 augmente la capacité à trogocyter des lymphocytes T V γ 9V δ 2 si la cellule tumorale est faiblement ou pas reconnue.

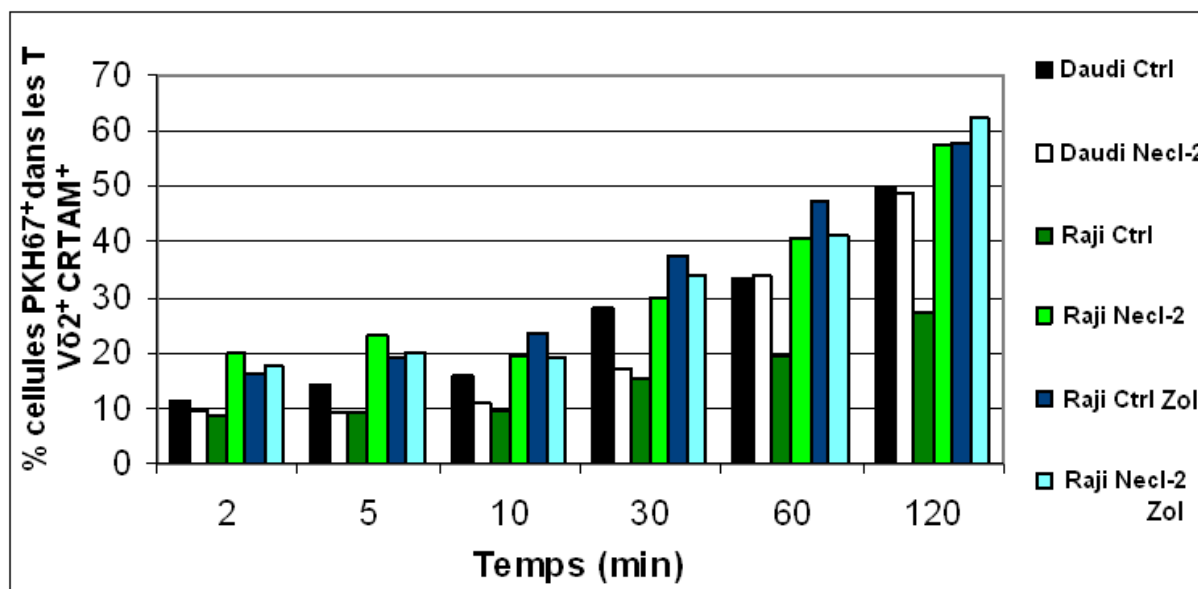


Figure 29 : Trogocytose des cellules tumorales par les lymphocytes T V γ 9V δ 2. Les lignées Daudi et Raji, pré-traitées ou non au zoledronate, ont été colorées au PKH67 et mises en contact pendant différents temps avec des lymphocytes T V γ 9V δ 2 pré-stimulés par un anticorps anti-CD3. Après marquage du TCR V δ 2 et de CRTAM, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Les résultats présentent le pourcentage de cellules V δ 2⁺ CRTAM⁺ ayant incorporé du PKH67. La figure est représentative des résultats obtenus sur deux essais.

II.2.2.3. L'interaction CRTAM/Necl-2 ne modifie pas les fonctions effectrices des lymphocytes T V γ 9V δ 2

Nous n'avons observé aucun impact de l'interaction CRTAM/Necl-2 sur la production d'IFN- γ et la cytotoxicité des lymphocytes T V γ 9V δ 2. Pour conforter ces résultats, nous avons mesuré l'impact de cette interaction sur l'activité de dégranulation des lymphocytes T V γ 9V δ 2. Pour ce faire, nous avons effectué un marquage du CD107a sur les lymphocytes T V γ 9V δ 2 après co-culture avec des cellules tumorales Daudi et Raji exprimant ou non Necl-2 et pré-traitées au zoledronate pour induire l'expression de CRTAM par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 au cours du test. Nos résultats ne montrent aucune différence entre les conditions

cellules Necl-2⁺ et témoins (Figure 30). Ceci indique que CRTAM n'intervient pas dans l'activité sécrétoire des lymphocytes T V γ 9V δ 2. D'un point de vue général, ces résultats confirment que CRTAM n'est pas un récepteur activateur des lymphocytes T V γ 9V δ 2.

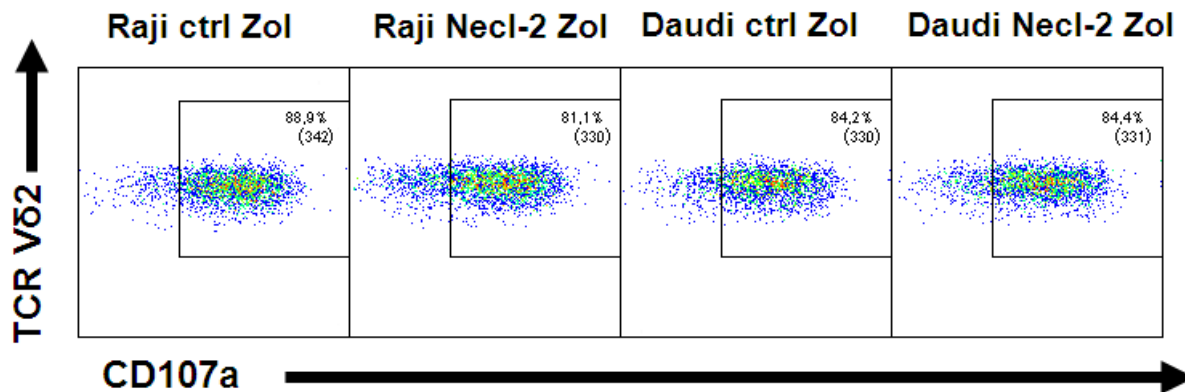


Figure 30 : Mobilisation du CD107 par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 après contact avec une cible tumorale. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 ont été co-cultivés pendant 6 heures avec les lignées Daudi ou Raji Necl-2⁺ ou témoin (Ctrl) et pré-traités au zoledronate. La co-culture a eu lieu en présence de monensine et d'anticorps anti-CD107a. Les cellules ont ensuite été marquées par un anticorps anti-TCR V δ 2 avant lecture au cytomètre en flux. Les pourcentages de cellules TCRV δ 2⁺ CD107a⁺ sont indiqués dans chaque dot plot accompagnés des valeurs de MFI.

II.2.2.4. Effet-dose de la wortmannine sur la mort induite par l'interaction CRTAM/Necl-2

La wortmannine, un inhibiteur de l'autophagie, a pour effet de réduire la mort des lymphocytes T V γ 9V δ 2 médiée par CRTAM. Dans les expériences de l'article en révision, une seule dose de wortmannine a été montrée, mais des expériences d'effet-dose ont été réalisées. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 ont été traités avec des doses croissantes de wortmannine avant d'être co-incubés avec les lignées Daudi, Necl-2⁺ ou témoin (Ctrl). L'analyse du marquage annexine-V des cellules V γ 9V δ 2⁺ CRTAM⁺ dans ces conditions indiquent une inhibition de la mort dépendante de la dose de wortmannine. Ces résultats confirment la nature autophagique de la mort des lymphocytes T V γ 9V δ 2 (Figure 31).

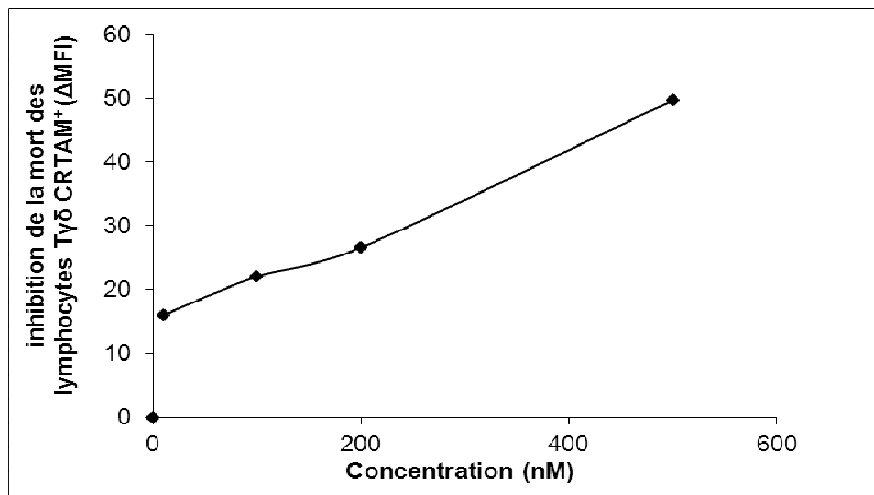


Figure 31 : Effet-dose de la wortmannine sur la mort médiée par CRTAM. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 ont été préalablement traités avec différentes doses de wortmannine : 10, 100, 200 et 500 nM pendant 1 heure. Ensuite, ils ont été co-incubés avec des cellules Daudi exprimant Necl-2 ou non pendant 4 heures à 37°C. Puis, les cellules ont été marquées par un anti-TCR $\gamma\delta$, un anti-CRTAM et l'annexine-V avant lecture au cytomètre en flux. L'inhibition de la mort des lymphocytes T $\gamma\delta^+$ CRTAM⁺ par la wortmannine est exprimée de la façon suivante : Δ MFI = MFI annexine-V des lymphocytes T V γ 9V δ 2 CRTAM⁺ non traités - MFI annexine-V des lymphocytes T $\gamma\delta$ CRTAM⁺ traités. Cet essai a été effectué deux fois sur deux donneurs différents. Le graphique est représentatif des résultats obtenus sur les deux essais.

II.2.2.5. L'interaction CRTAM/Necl-2 induit de l'autophagie dans les lymphocytes T V γ 9V δ 2

Les essais avec les inhibiteurs de mort cellulaire indiquent que le mécanisme impliqué dans la mort des lymphocytes T V γ 9V δ 2 suite à l'interaction CRTAM/Necl-2 est de type mort autophagique. Afin de conforter ce résultat, nous avons évalué la présence de lysosomes et d'autolysosomes dans les lymphocytes T V γ 9V δ 2 (Figure 32). Ceux-ci ont été pré-stimulés par anticorps anti-CD3 ; puis mis en contact avec des cellules Daudi exprimant ou non Necl-2. Ensuite, les cellules ont été colorées à l'acridine orange et analysées par cytométrie en flux. L'analyse des cellules effectuée dans la fenêtre des lymphocytes montre une présence plus importante de lysosomes et d'autolysosomes dans les lymphocytes co-cultivés avec des cellules tumorales Necl-2⁺ en comparaison avec la condition témoin (Figure 32). Cette observation montre que l'autophagie dans les lymphocytes T V γ 9V δ 2 est augmentée en cas

d'interaction CRTAM/Necl-2. Ce résultat est en accord avec l'inhibition de la mort cellulaire en présence de wortmannine.

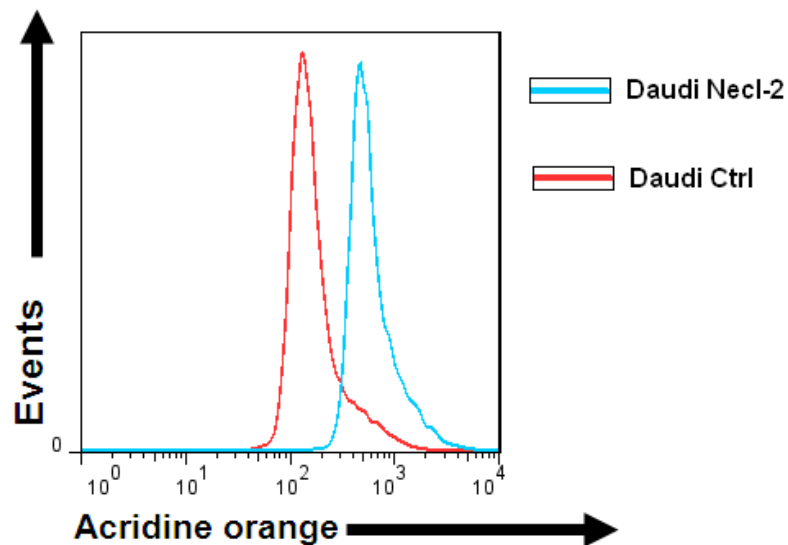


Figure 32 : Coloration des lysosomes/autolysosomes à l'acridine orange. Après stimulation par un anticorps anti-CD3, les lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$ ont été co-incubés avec des cellules Daudi exprimant ou non Necl-2 pendant 4h. Ensuite, les cellules ont été colorées à l'acridine orange avant analyse par cytométrie en flux. Les histogrammes représentent le marquage acridine orange dans les populations correspondant à la taille et la structure des lymphocytes dans les conditions de co-culture avec Daudi témoin (Ctrl) ou Daudi Necl-2⁺.

II.2.2.6. L'interaction CRTAM-Necl-2 n'augmente pas la perméabilisation des mitochondries dans les lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$

Les lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$ meurent par autophagie mais ce mécanisme de mort n'est peut-être pas le seul impliqué. Dans notre étude, l'inhibiteur d'apoptose Z-VAD n'a pas eu d'effet sur la mort des lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$. Par cette méthode, nous avons écarté un mécanisme d'apoptose dépendante des caspases. Toutefois, une autre voie d'apoptose indépendante des caspases est décrite. Celle-ci passe par la perméabilisation de la mitochondrie et le relargage de la molécule AIF et de l'endonucléase G qui enclenchent l'apoptose en entrant dans le noyau. C'est pourquoi, nous avons étudié la perméabilisation de la mitochondrie lors du contact entre les lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$ CRTAM⁺ et les cellules tumorales Necl-2⁺. Pour ce faire, les lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$ pré-stimulés par un anticorps

anti-CD3 ont été marqués avec un colorant fluorescent des mitochondries, le DIOC6, puis mis en contact avec des cellules Daudi exprimant Necl-2 ou non. En absence d'apoptose, le colorant reste à l'intérieur des mitochondries. A l'inverse, le colorant quitte les mitochondries si celles-ci sont perméabilisées lors d'un processus d'apoptose. Il en résulte une diminution de la fluorescence dans les cellules. Nos résultats ne montrent pas de marquage plus faible au DIOC6 lorsque les lymphocytes sont co-cultivés avec des cellules tumorales Necl-2⁺ par rapport à la condition témoin (Figure 33). Ces observations ne vont pas le sens d'une contribution d'un mécanisme d'apoptose indépendant des caspases dans la mort des lymphocytes T V γ 9V δ 2 induite par l'engagement de CRTAM.

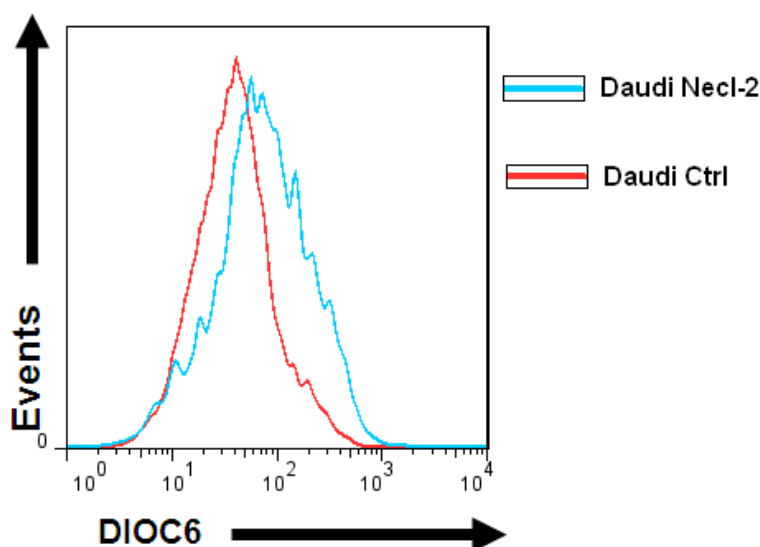


Figure 33 : Impact de CRTAM/Necl-2 sur la dépolarisation de la membrane mitochondriale. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 ont été pré-stimulés par anticorps anti-CD3, colorés au DIOC6, puis co-cultivés avec des cellules Daudi Necl-2⁺ ou Necl-2⁻ (Ctrl) pendant 4 heures. Les cellules ont ensuite été marquées avec un anticorps anti-CRTAM, puis analysées par cytométrie en flux. Les histogrammes montrent le marquage DIOC6 dans les lymphocytes CRTAM⁺ pour chacune des conditions testées.

II.2.2.7. Impact de l'interaction CRTAM/Necl-2 sur la survie des cellules NK

L'interaction CRTAM/Necl-2 provoque la mort des lymphocytes T V γ 9V δ 2. Pour savoir si ce phénomène est spécifique de la population lymphocytaire T V γ 9V δ 2, nous avons recherché l'impact de cette interaction sur les cellules NK. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules NK de donneurs sains stimulées à la PMA/ionomycine pour qu'elles expriment

CRTAM ; puis nous les avons incubées avec des cellules tumorales Daudi Necl-2⁺ ou témoin. Après marquage par l'annexine-V et des anticorps conjugués anti-CD56 et anti-CRTAM, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Nous avons observé aucune différence de niveau d'annexine-V sur les cellules NK (CD56⁺) CRTAM⁺ entre la condition de co-culture avec les cellules Daudi Necl-2⁺ et Daudi témoin (Figure 34). Ces résultats suggèrent que l'interaction CRTAM/Necl-2 n'induit pas la mort des cellules NK contrairement à ce qui est observé pour les lymphocytes T V γ 9V δ 2.

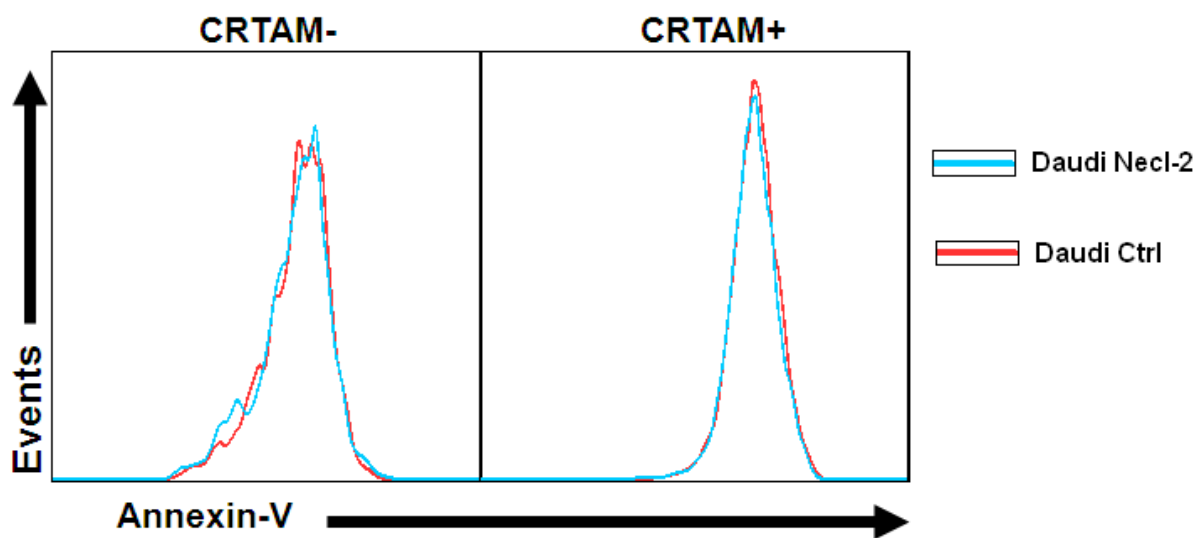


Figure 34 : Impact de l'interaction CRTAM/Necl-2 sur la survie des cellules NK. Après avoir été préalablement triées, les cellules NK ont été stimulées à la PMA/ionomycine pendant 4 heures. Ensuite, elles ont été incubées pendant 4 heures avec les cellules tumorales Daudi exprimant ou non Necl-2 ; puis marquées par l'anti-CD56, l'anti-CRTAM et l'annexine-V avant analyse au cytomètre en flux. Les résultats représentent la superposition du marquage annexine-V parmi les cellules NK CRTAM⁻ (Figure 34 gauche) ou CRTAM⁺ (Figure 34 droite) dans les conditions de coculture avec les cellules Daudi Necl-2⁺ ou témoin (Ctrl). Les résultats ont été confirmés à trois reprises sur trois donneurs différents

II.2.2.8. Etude de l'expression de CRTAM au microscope confocal

Nos résultats indiquent que la molécule CRTAM est transférée sur les cellules tumorales Necl-2⁺ après interaction avec des lymphocytes T V γ 9V δ 2 CRTAM⁺. Nous avons souhaité étudier ce phénomène par microscopie confocale. Nous disposons de cellules

Daudi exprimant la protéine de fusion Necl-2-eGFP. L'expression de Necl-2 a été contrôlée par microscopie confocale (Figure 35 A) et par cytométrie en flux (Figure 35 B).

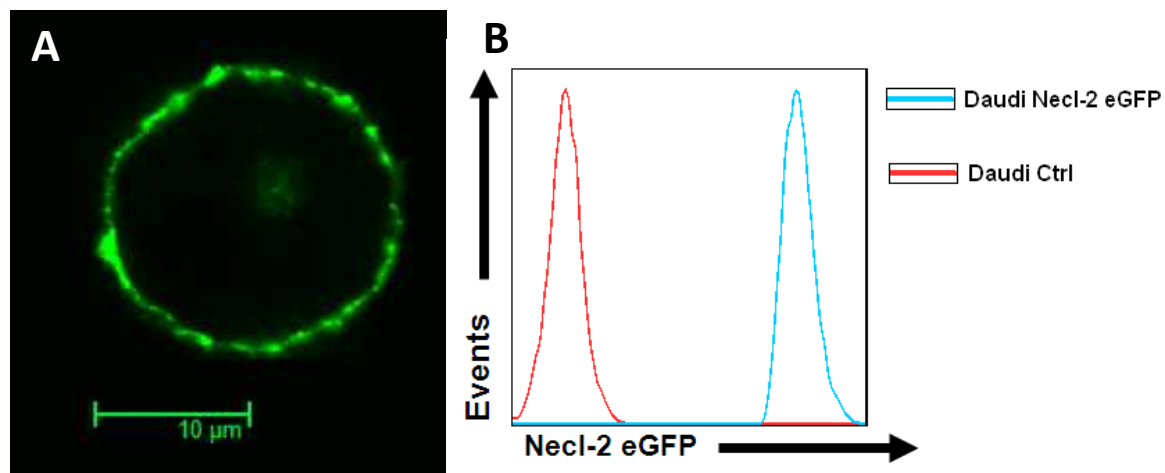


Figure 35 : Expression de Necl-2-eGFP par les cellules Daudi transfectées. (A) Image de microscopie confocale d'une cellule Daudi Necl-2-eGFP⁺. (B) Mesure de la fluorescence conférée par l'eGFP dans les cellules transduites ou non (Ctrl) par un vecteur codant Necl-2 eGFP.

Des cellules Daudi Necl-2-eGFP et des lymphocytes T V γ 9V δ 2 pré-activés par des anticorps anti-CD3 ont été co-cultivés sur lames de polylysine. Ensuite, les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-CRTAM et anti-TCR $\gamma\delta$ avant d'être analysées au microscope confocal. Nous avons vérifié que les marquages CRTAM et TCR $\gamma\delta$ étaient négatifs sur les cellules Daudi Necl-2-eGFP⁺ (Figure 36). Les lymphocytes T seuls non pré-stimulés par anti-CD3 n'expriment que le TCR ; tandis que les lymphocytes T seuls pré-stimulés par anti-CD3 expriment également CRTAM (Figure 36). Après co-culture avec les cellules Daudi Necl-2-eGFP⁺, Necl-2 est observée à la surface des lymphocytes T V γ 9V δ 2 (Figure 36). Lors du contact entre un lymphocyte T CRTAM⁺ et une cellule tumorale Necl-2⁺, une zone d'adhérence se forme dans laquelle les molécules Necl-2 et CRTAM sont co-localisées. Suite à ce contact, certaines Daudi Necl-2eGFP⁺ expriment CRTAM. Par contre, nous n'avons pas détecté des molécules TCR $\gamma\delta$ sur les cellules tumorales.

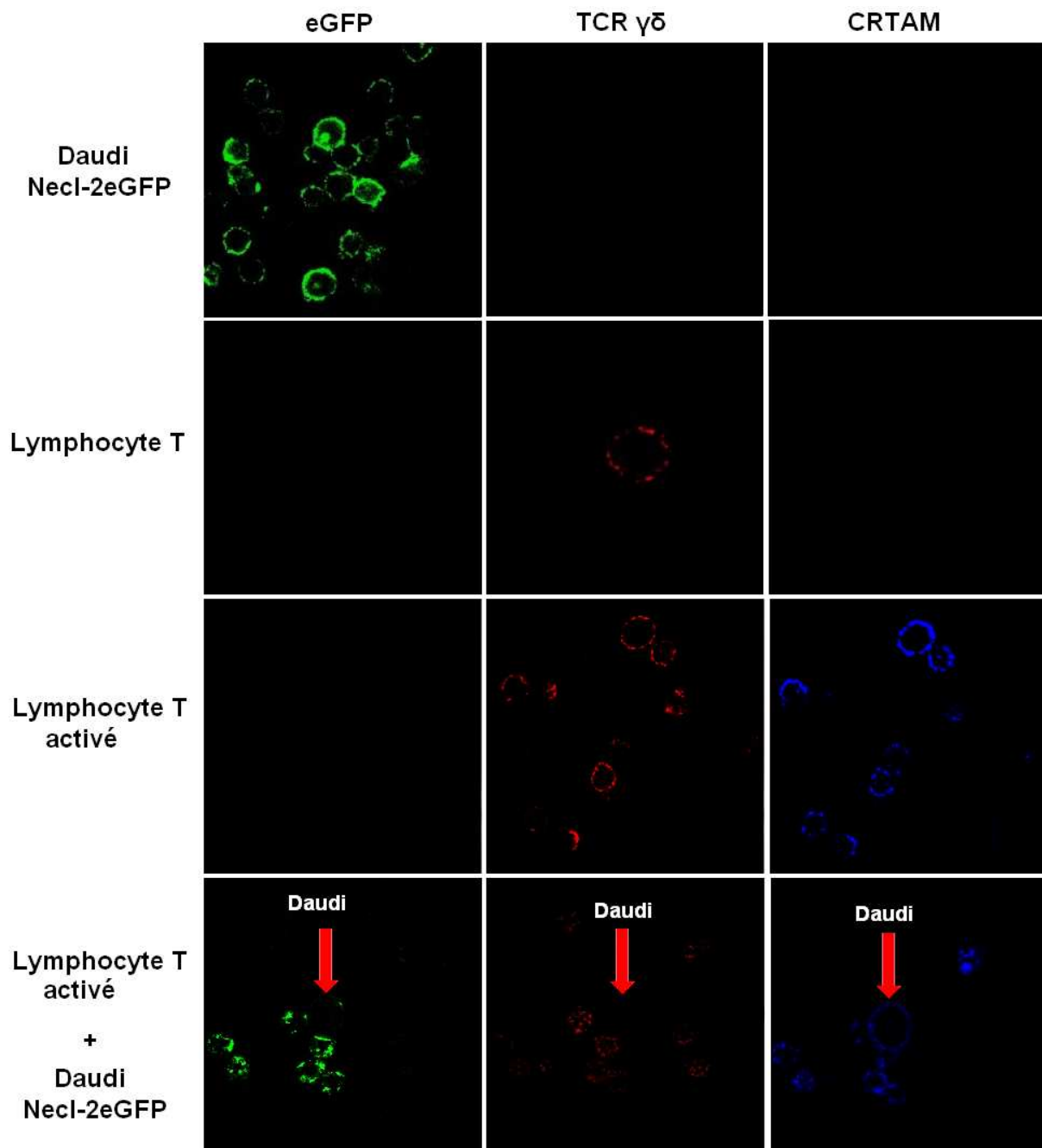


Figure 36 : Analyse au microscope confocal. Des cellules Daudi Necl-2-eGFP et des lymphocytes T V γ 9V δ 2 pré-activés ont été co-cultivés sur des lames de polylysine pendant 45 minutes à 37°C. Ensuite, les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-TCR $\gamma\delta$ (colonne du milieu) et anti-CRTAM (colonne de droite) ; puis analysées au microscope confocal. Chaque ligne correspond à une condition testée.

Ces premiers résultats confirment l'existence d'un transfert de CRTAM du lymphocyte T V γ 9V δ 2 vers la cellule tumorale. Toutefois, dans ces essais préliminaires, nous n'avons pas la condition où les lymphocytes T sont co-incubés avec les cellules tumorales témoins n'exprimant pas Necl-2. Ces observations devront être confirmées pour mieux préciser le transfert de CRTAM au microscope confocal.

III. CONCLUSION-DISCUSSION

L'immunothérapie est une alternative thérapeutique des cancers porteuse d'espoir. La thérapie adoptive utilisant les lymphocytes T V γ 9V δ 2 présente l'avantage de ne pas altérer le tissu sain et de présenter peu d'effets secondaires (99, 111, 113). *In vitro*, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 reconnaissent et éliminent un grand nombre de lignées tumorales tant d'origine hématopoïétique comme les myélomes et les lymphomes, que de lignées tumorales solides comme les mélanomes, les neuroblastomes, les tumeurs coliques, du sein, de la prostate, des ovaires et du rein (111). De plus, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 sont capables d'infiltrer le tissu tumoral. Ces deux arguments font des lymphocytes T V γ 9V δ 2 des candidats intéressants pour une thérapie par transfert adoptif (111). Pour optimiser l'immunothérapie cellulaire, il apparaît essentiel de bien caractériser les mécanismes de reconnaissance des cellules tumorales par les cellules effectrices. Il a été décrit que la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 peut nécessiter des récepteurs activateurs interagissant avec leurs ligands et activant les capacités cytolytiques de la cellule effectrice. Récemment, notre équipe a démontré que le récepteur activateur DNAM-1/CD226 favorise l'élimination des cellules tumorales qui expriment le ligand Necl-5. CRTAM est également un récepteur capable d'interagir avec des nectines. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes de reconnaissance des lymphocytes T V γ 9V δ 2 et afin d'améliorer leur application en immunothérapie, nous avons étudié le rôle de CRTAM dans la biologie des lymphocytes T V γ 9V δ 2.

CRTAM et l'activation lymphocytaire

L'expression de CRTAM a été décrite dans plusieurs types de cellules effectrices telles que les cellules NK, les cellules NKT et les lymphocytes T CD8⁺. Connue pour être une molécule d'adhérence, CRTAM joue un rôle dans la fonctionnalité de ces cellules lorsqu'elles sont activées. Dans notre étude, nous montrons que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 peuvent exprimer CRTAM après activation suite à une stimulation spécifique du TCR que ce soit à

l'aide d'un phosphoantigène soluble ou que ce soit par contact avec des lignées tumorales immunogènes. CRTAM est également inductible par d'autres stimulations comme l'engagement de CD3 par un Ac spécifique ou encore par l'action conjuguée de la PMA/ionomycine. Ces premiers résultats nous indiquent que CRTAM est un marqueur phénotypique d'activation. Nous avons pu vérifier que cette expression concerne l'ensemble des phénotypes naïfs, central mémoire (CM) et effecteur mémoire (T_{EM} et T_{EMRA}).

Il faut noter cependant que l'ensemble des lymphocytes T V γ 9V δ 2 se différencient en effecteurs mémoires lors de leur expansion *in vitro* suite à une stimulation par un phosphoantigène et de l'IL-2. L'ensemble de nos expériences a été réalisé avec ce type de cellules. Ils se caractérisent par leur forte capacité à sécréter des cytokines, ce qui est en accord avec nos résultats montrant que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 sécrètent de l'IFN- γ après stimulation. Nous avons observé dans notre étude que la très grande majorité des cellules, qui produisaient de l'IFN- γ exprimaient aussi CRTAM. Ce marqueur est donc associé à l'activation et à la fonctionnalité des lymphocytes T V γ 9V δ 2.

Nous avons observé que l'expression de CRTAM est transitoire et tardive à la différence de celle du marqueur d'activation CD69. Il faut attendre 24h après activation pour que CRTAM soit exprimée de manière optimale par les lymphocytes T V γ 9V δ 2. De plus, son expression diminue au cours du temps pour revenir à un niveau basal. Ces résultats indiquent que CRTAM exprimée par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 activés pourrait avoir un rôle tardif. Cette molécule étant impliquée dans l'adhérence, il serait intéressant de savoir si son absence aux stades précoces d'activation est favorable à la migration lymphocytaire jusqu'au site de l'inflammation. Nous verrons plus loin que la présence de CRTAM à des stades avancés de la différenciation pourrait être un facteur de régulation de la réponse immunitaire. Suite à un second contact avec l'antigène, l'expression de CRTAM est réinductible sur des lymphocytes T V γ 9V δ 2 amplifiés.

Dans la littérature, il a été rapporté que l'interaction CRTAM avec son ligand Necl-2 est responsable de l'augmentation de la cytotoxicité des cellules NK et de la sécrétion d'IFN- γ

par les lymphocytes T CD8⁺. Ces données bibliographiques suggèrent que CRTAM pourrait également jouer un rôle dans la fonctionnalité des lymphocytes T V γ 9V δ 2. Notre travail a montré que l'interaction CRTAM/Necl-2 n'a pas d'impact sur l'activité cytotoxique et sur la production et la sécrétion d'IFN- γ des lymphocytes T V γ 9V δ 2. A défaut d'être un récepteur activateur, CRTAM aurait pu favoriser l'activité cytolytique en favorisant l'adhérence des lymphocytes T V γ 9V δ 2 aux cellules tumorales et donc à leur reconnaissance et leur élimination. Néanmoins, nous avons montré dans nos essais de lyse redirigée que le co-engagement de CRTAM et du TCR n'augmente pas l'effet de la reconnaissance par le TCR. Nous avons effectué les essais de cytotoxicité en stimulant les lymphocytes T V γ 9V δ 2 soit par un anticorps anti-CD3 ou soit par contact avec des cellules tumorales pré-traitées au zoledronate. Nous avons obtenu les mêmes résultats dans les deux cas. Il faut rapprocher nos résultats d'une étude menée chez la souris qui rapporte que CRTAM n'avait pas d'impact sur la cytotoxicité des cellules NK à la différence de ce qui a été rapporté chez l'homme (132, 193). L'ensemble de ces résultats montre que les conséquences fonctionnelles de l'engagement de CRTAM dépendent du type de cellule effectrice et de son espèce d'origine.

CRTAM et la trogocytose

De manière intéressante, nous montrons que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 perdent l'expression de CRTAM après contact avec des cellules Necl-2⁺ mais pas avec les cellules Necl-2⁻. C'est l'interaction de CRTAM avec son ligand Necl-2 qui entraîne cette down-régulation de CRTAM. Dans ces mêmes conditions, seules les cellules tumorales Necl-2⁺ expriment *de novo* et de manière concomitante la molécule CRTAM. Ces résultats ont été obtenus avec la lignée Daudi, qui est reconnue par les lymphocytes T V γ 9V δ 2, et la lignée Raji qui ne l'est pas. Cette observation suggère l'existence d'un transfert intercellulaire qui s'effectue du lymphocyte T V γ 9V δ 2 vers la cellule tumorale et n'impliquant pas le TCR. Nos données indiquent que le processus impliqué dans le transfert de CRTAM possède trois caractéristiques :

- Il est rapide car CRTAM est détectée à la surface des cellules tumorales au bout de 5 minutes de co-culture avec les lymphocytes T V γ 9V δ 2 (voir article).
- Ce processus n'est pas dû à un clivage de CRTAM à la surface des lymphocytes T V γ 9V δ 2 ni à sa sécrétion parce que nous n'avons pas observé sa présence *de novo* sur les cellules tumorales après incubation de ces cellules en présence du surnageant de lymphocytes T V γ 9V δ 2 activés et préalablement cocultivés avec des cellules tumorales Necl-2⁺ (voir résultats complémentaires).
- Il passe, au moins en partie, par un transfert de membrane car les cellules tumorales Necl-2⁺ récupèrent des éléments membranaires de la cellule effectrice conjointement à la récupération de CRTAM. De plus, toutes les cellules tumorales qui récupèrent des fragments de membrane ont également récupéré CRTAM, ce qui permet de penser que le mécanisme impliqué est la trogocytose. Le transfert des fragments membranaires a été étudié après marquage des lymphocytes T V γ 9V δ 2 avec un colorant fluorescent, le PKH67.

Le transfert de molécules entre une cellule effectrice et une cellule tumorale a déjà été largement décrit. Peu de données existent pour un transfert de molécule de surface depuis la cellule effectrice vers la cellule tumorale. Ceux concernant des récepteurs inhibiteurs ou le récepteur activateur NKG2D ont été rapportés entre des cellules NK et des cellules tumorales (119, 120, 242). Nous devons cependant signaler que l'expression de CRTAM sur les cellules tumorales ne semble pas toujours associée à un marquage PKH67 clairement positif et par conséquent à un transfert de membrane venant du lymphocyte (Figure 4 de l'article en révision). Il est possible que les fragments de membranes soient trop « dilués » dans les cellules tumorales de grande taille et que dans ce cas, une différence de signal de fluorescence en PKH67 soit difficilement détectable en cytométrie. Toutefois, il n'est pas exclu que d'autres mécanismes que la trogocytose soient impliqués dans le transfert intercellulaire de CRTAM. Il est permis d'évoquer par exemple des échanges intercellulaires de type nanotube (119), ou encore que les molécules CRTAM pourraient être « arrachées »

de la surface des lymphocytes T V γ 9V δ 2 et être spécifiquement acquises par les cellules tumorales suite à l'interaction CRTAM/Necl-2 (119). Ce mécanisme est appelé le « uprooting » et n'a jamais été observé en pratique bien qu'il soit théoriquement possible (119). Une meilleure connaissance du transfert de CRTAM demandera des études complémentaires. Des études de time lapse sur 1 heure pourraient être envisagées afin d'examiner si des nanotubes se forment entre les cellules tumorales et les lymphocytes T V γ 9V δ 2. De même, cette méthode pourrait être utilisée pour évaluer le transfert de CRTAM sur les cellules tumorales. Les cellules Daudi témoin qui ont été transduites de la même façon que les Daudi Necl-2-eGFP mais avec un vecteur sans le gène Necl-2 pourraient servir de témoin. Des essais pourraient également être menés sur la lignée Raji, lignée non reconnue par les lymphocytes T V γ 9V δ 2.

Des essais préliminaires d'analyse par microscopie confocale montrent un transfert de CRTAM du lymphocyte T V γ 9V δ 2 vers la cible tumorale Necl-2⁺ mais pas de transfert du TCR $\gamma\delta$. Ces observations suggèrent que le transfert de CRTAM est spécifique. Plusieurs travaux ont décrit l'existence de transfert spécifique de protéines membranaires par trogocytose (243, 244). Néanmoins, des essais sont encore nécessaires pour conforter cette spécificité du transfert de CRTAM.

CRTAM et la survie cellulaire

A côté de ces aspects d'échanges moléculaires au sein de la synapse entre lymphocytes T V γ 9V δ 2 CRTAM⁺ et cellules tumorales Necl-2⁺, notre travail révèle une autre originalité : CRTAM est impliquée dans la survie des lymphocytes T V γ 9V δ 2. En effet, le contact entre les lymphocytes T V γ 9V δ 2 CRTAM⁺ et les cellules tumorales Necl-2⁺ conduit à l'augmentation du nombre de lymphocytes engagés dans un processus de mort cellulaire. Le nombre de lymphocyte T V γ 9V δ 2 annexine-V⁺ augmente en présence de cibles tumorales Necl-2⁺. Cette mort cellulaire est inhibée en empêchant l'interaction CRTAM/Necl-2 à l'aide d'une molécule CRTAM soluble dans des contextes de co-culture avec des lignées exprimant naturellement Necl-2 ou après transduction. La mort cellulaire est donc liée à cette interaction. Plusieurs

hypothèses pourraient expliquer la mort des lymphocytes T V γ 9V δ 2 suite à l'engagement de CRTAM avec Necl-2. La première est que CRTAM est le récepteur qui médie le signal de mort. La deuxième hypothèse est que le signaling est médié par Necl-2 qui active des mécanismes de défense de la cellule tumorale contre le lymphocyte (comme par exemple : le relargage de Fas-L ou TRAIL) et provoque alors sa mort. La troisième hypothèse est que l'interaction CRTAM/Necl-2 favorise l'engagement spécifique d'une molécule tierce capable de médier un signal de mort dans le lymphocyte. Cependant, l'induction de la mort des lymphocytes T V γ 9V δ 2 dans nos essais d'engagement de CRTAM, à l'aide d'anticorps spécifiques « coatés » sur des cellules P815, démontre que CRTAM est bien la molécule de surface qui enclenche directement ce processus de mort et réfute les deux dernières hypothèses.

Nous avons cherché à préciser quel était le mécanisme de mort médié par l'engagement de CRTAM. Trois principaux types de mort cellulaire programmée ont été distingués : l'apoptose, la mort autophagique et la nécrose régulée ou nécroptose. Il existe des inhibiteurs pour chacun de ces mécanismes de mort. Les inhibiteurs de l'apoptose et de la nécroptose n'ont pas diminué la mort cellulaire des lymphocytes T V γ 9V δ 2 induite par l'interaction CRTAM-Necl-2. Par contre, l'inhibiteur de l'autophagie, la wortmannine, a réduit cet effet. Bien que l'autophagie ait été longtemps considérée comme un mécanisme de la survie des cellules à des stress cellulaires comme par exemple le manque de nutriments, il a été récemment établi que ce mécanisme pouvait également être un mécanisme de mort cellulaire (autophagic cell death) (200, 227). L'explication d'un tel paradoxe est que l'autophagie excessive conduirait à une déplétion en organites cellulaires qui serait létale (220). La mort autophagique est décrite comme étant caspase indépendante (200). Dans nos expériences, l'inhibiteur de caspases Z-VAD n'a pas affecté la mort cellulaire observée. Dans le cas où une cellule meurt en montrant des signes d'autophagie et que cette mort est inhibée par les inhibiteurs de caspases, il est permis de conclure que l'autophagie accompagne une mort cellulaire de type apoptose. Ce mécanisme étant dédié à la protection de la cellule, l'inhibition des mécanismes autophagiques amplifie la mort. Par

contre, lorsque la cellule meurt véritablement par un mécanisme d'autophagie, son inhibition par des inhibiteurs des voies autophagiques réduit le nombre de cellules en mort cellulaire. Nos résultats sont en faveur d'une mort autophagique des lymphocytes T V γ 9V δ 2 induite par l'interaction CRTAM avec son ligand Necl-2. Il faut noter cependant que l'inhibition de l'autophagie n'a pas affecté la totalité des cellules en voie de mort. Cette observation pourrait être due à un mécanisme additionnel d'apoptose caspases indépendante. Rappelons que des molécules mitochondriales comme la molécule AIF peuvent enclencher de l'apoptose caspase indépendante en quittant la mitochondrie. A défaut d'inhibiteur pour ce type d'apoptose, nous avons coloré au DIOC6 les mitochondries de nos cellules afin de voir si l'impact de l'interaction CRTAM-Necl-2 diminuait leur coloration à cause d'une dépolarisation membranaire. Nous observons qu'il n'y a pas de perte notable du colorant dans les mitochondries après contact avec des cellules tumorales Necl-2⁺. Cette observation nous conforte dans la conclusion que l'interaction CRTAM/Necl-2 conduit à de l'autophagie. Ce mécanisme est connu pour inhiber l'apoptose sous toutes ses formes. Par exemple, la mitophagie sélective des mitochondries anormales est responsable de l'inhibition de l'apoptose médiée par la perméabilisation de la membrane mitochondriale (220). Nos résultats nous permettent de conclure que l'interaction CRTAM/Necl-2 n'enclenche pas une mort apoptotique indépendante des caspases. Quant à la réduction incomplète de la mort cellulaire, elle peut s'expliquer par les limites des molécules inhibitrices utilisées. A la vue de nos résultats, nous pouvons conclure que la mort autophagique est le seul mécanisme que nous avons pu caractériser comme impliqué dans la mort médiée par CRTAM.

Necl-2 : une molécule favorisant l'échappement tumoral ?

Notre étude montre que l'expression de Necl-2 par les cellules tumorales serait défavorable à une réponse des lymphocytes T V γ 9V δ 2 de longue durée. Necl-2 jouerait un rôle proche de celui de PD-L1 ou de Fas-L, qui est d'éliminer la cellule effectrice (22), et serait un nouveau mécanisme de « contre-attaque » de la cellule tumorale. Cette conclusion est en accord avec certaines données de la littérature rapportées dans notre introduction et

qui montrent que Necl-2 est associée à un mauvais pronostic. En effet, dans les cas des leucémies à cellules T de l'adulte et dans la leucémie myéloïde aigue, l'expression de Necl-2 est associée aux stades invasifs (161, 183). De même, dans les tumeurs solides, Necl-2 est surexprimée dans l'adénocarcinome du poumon et le mesothéliome malin (185, 186). Un contrôle sévère de la réponse immunitaire dans ces tumeurs pourrait être impliqué dans la gravité de la maladie. Il faut noter cependant que les cellules NK qui expriment CRTAM ne meurent pas suite à leur interaction avec des cellules tumorales exprimant Necl-2. La voie de signalisation de CRTAM étant inconnue, il est possible que les cellules NK n'expriment pas tous les partenaires intracellulaires de CRTAM impliqués dans l'induction de la mort autophagique que nous avons observée pour les lymphocytes T V γ 9V δ 2. La région cytoplasmique de CRTAM est composée de trois sites putatifs de phosphorylation et un site de liaison PDZ qui lie la protéine Scrib. Des études récentes indiquent que Scrib est impliquée dans la régulation de la polarité cellulaire (198), mais aucune donnée ne vient étayer le rôle des autres régions intracytoplasmiques. Il est permis de penser que la région PDZ de CRTAM possède d'autres partenaires moléculaires. Pour le vérifier, il faudrait étudier plus en détail son interactome en effectuant des essais de co-immunoprécipitation par exemple.

Bien que l'ensemble de ces données laisse à penser que l'interaction CRTAM/Necl-2 participerait à un mécanisme d'échappement tumoral à la défense immunitaire médiée par les lymphocytes T V γ 9V δ 2, cet effet reste à démontrer *in vivo*. En effet, il est envisageable que des cellules tumorales qui expriment Necl-2, bien que délétères à l'égard des lymphocytes T V γ 9V δ 2, deviennent particulièrement sensibles aux cellules NK et n'échappent donc pas totalement à la réponse anti-tumorale innée (132). La balance entre réponse favorable des cellules NK versus réponse défavorable des lymphocytes T V γ 9V δ 2 dépendra probablement de la capacité d'infiltration du tissu tumoral de chacun de ces deux types d'effecteurs et aussi du type histologique de cancer. Des cellules tumorales exprimant Necl-2 pourront être particulièrement ciblées dans un microenvironnement riche en cellule NK et inversement si les cellules effectrices dominantes sont les lymphocytes T V γ 9V δ 2. Pour

mieux comprendre l'impact de l'interaction CRTAM/Necl-2, il serait intéressant de travailler avec un modèle animal permettant d'obtenir des données *in vivo*. L'utilisation de souris immunodéficientes (NOD-SCID par exemple) greffées avec une lignée tumorale humaine exprimant ou non Necl-2 représente un modèle intéressant. Il serait envisageable d'injecter des lymphocytes T V γ 9V δ 2 activés *in vivo* ou activés *in vitro* avec un phosphoantigène ; puis de suivre l'évolution de la tumeur et la réponse lymphocytaire (infiltration de la tumeur et mort lymphocytaire) en fonction de l'expression de Necl-2.

Dans cette thèse, l'impact des autres ligands de Necl-2 n'a pas été étudié. Necl-2 interagit avec Necl-1 et Nectine-3 et pourraient entrer en concurrence avec CRTAM pour adhérer à Necl-2. La mort autophagique étant liée à un excès d'autophagie, il est possible que les cellules NK expriment en parallèle de CRTAM les autres ligands de Necl-2 afin de moduler l'impact de l'interaction CRTAM/Necl-2. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de comparer l'expression de Necl-1 et de Nectine-3 entre les lymphocytes T V γ 9V δ 2 et les cellules NK.

Impact de la trogocytose des lymphocytes T V γ 9V δ 2 par les cellules tumorales Necl-2⁺

Un des résultats le plus étonnant que nous ayons observé dans ce travail est le phénomène de trogocytose par les cellules tumorales Necl-2⁺. La récupération de CRTAM à partir des lymphocytes T V γ 9V δ 2 CRTAM⁺ leur confère probablement la capacité à interagir davantage avec des cellules exprimant Necl-2. On peut supposer que l'interaction CRTAM-Necl-2 entre lymphocytes T V γ 9V δ 2 et cellules tumorales puisse se trouver en concurrence avec l'interaction entre deux cellules tumorales. Rappelons que la trogocytose est généralement non spécifique et que les cellules tumorales peuvent par ce procédé récupérer d'autres molécules que CRTAM. Il est envisageable que l'interaction avec CRTAM soit une étape d'amorce et que sa récupération soit neutre pour la cellule tumorale. Par contre, une cellule cancéreuse pourrait tirer bénéfice de la récupération de molécules de surface à partir des cellules effectrices comme par exemple des ligands de récepteurs inhibiteurs qui leur permettraient de ne pas être reconnue comme du non-soi. Nous n'avons pas recherché ces

molécules dans notre travail. Par contre, nous avons montré que l'interaction CRTAM/Necl-2 peut favoriser la trogocytose des cellules tumorales par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 lorsque celles-ci ne sont pas ou sont faiblement reconnues. Ce phénomène pourrait avoir plusieurs conséquences. D'une part, il pourrait permettre aux lymphocytes T V γ 9V δ 2 de devenir des cellules présentatrices d'antigène capable de stimuler d'autres cellules effectrices. D'autre part, ils pourraient permettre une récupération des ligands de récepteurs activateurs par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 favorisant une lyse fratricide.

L'importance des nectines et des necls dans l'immunothérapie ciblant les lymphocytes T V γ 9V δ 2

L'immunothérapie des cancers basée sur le ciblage des lymphocytes T V γ 9V δ 2 a déjà fait l'objet d'essais cliniques (102, 113, 115, 116). Les protocoles utilisés consistent à injecter un phosphantigène ou un aminobisphosphonate chez les patients ou bien à réaliser le transfert adoptif des lymphocytes T V γ 9V δ 2 soumis à une expansion préalable *ex vivo*. Dans ces essais cliniques, peu d'intérêt a été porté aux marqueurs tumoraux tels que PD-L1 et Fas-L susceptibles d'expliquer un échappement tumoral. Les résultats de notre étude indiquent que Necl-2 pourrait se révéler un marqueur histologique de mauvais pronostic et pose la question de Necl-2 dans la contribution aux échecs thérapeutiques lors d'une immunothérapie ciblant les lymphocytes T V γ 9V δ 2. Dans ce cas, la recherche d'antagonistes et/ou d'inhibiteurs de l'expression de Necl-2 sur des cellules tumorales pourrait aider à optimiser les stratégies d'immunothérapies reposant sur les lymphocytes T V γ 9V δ 2. Le rôle de Necl-2 doit être davantage documenté *in vivo*. De façon plus générale, le rôle des nectines et necls nécessite d'être mieux évalué. En effet, il est décrit que de nombreux récepteurs portés par les cellules effectrices, tels que DNAM-1, CRTAM et tactile, reconnaissent ce type de molécule (128). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que certaines nectines et necls pouvaient être associées à des fonctions suppressives de tumeur alors que d'autres au contraire ont montré leur pouvoir oncogénique (161, 183-186). Par exemple, Nectine-2, Nectine-4, et Necl-5 favorisent la prolifération et l'invasion tumorale, contrairement à la protéine Necl-1 (136). Nectine-4 est décrite comme un antigène associé

aux tumeurs dans le cas du cancer du sein, du poumon et de l'ovaire (245, 246). Cette nectine existe sous une forme clivée qui sert de marqueur sérique dans le diagnostic de ces maladies (136, 245, 246). D'autres membres de la famille des nectines comme Nectine-1 et Necl-3 n'ont pas été étudiées à ce jour dans le cadre du cancer et pourraient représenter de nouveaux marqueurs pour améliorer le diagnostic et le pronostic de ces maladies. Les nectines surexprimées dans les cancers représentent des cibles candidates pour les biothérapies. Par exemple, le développement d'anticorps anti-Nectine-4 et Necl-5 pourrait être envisagé. L'impact de Necl-2 sur les lymphocytes T V γ 9V δ 2, révélé par notre étude, montre que l'expression des nectines par les tumeurs est à prendre en compte pour mieux appréhender les relations hôte-tumeur et par là même le développement des stratégies d'immunothérapies.

L'amélioration des protocoles d'immunothérapie par transfert de lymphocytes T V γ 9V δ 2

Le microenvironnement des cellules tumorales est capable de développer des mécanismes de résistance à l'immunité. Notre équipe a montré récemment qu'un traitement au zoledronate pouvait reverser l'effet immunosuppresseur de l'ascite en cas de cancer de l'ovaire (17).

L'immunothérapie pourrait être améliorée en augmentant le nombre d'acteurs biologiques et moléculaires dans les protocoles cliniques. C'est le cas de certaines approches qui font appel à des cellules effectrices, telles que les cellules NK et les lymphocytes T V γ 9V δ 2 associés à des anticorps monoclonaux (111). Dans ce type d'approche, les cellules NK ou les lymphocytes T V γ 9V δ 2 fixent la région Fc des anticorps, à la condition d'exprimer CD16/FCR γ III, et effectuent de l'ADCC. Il faut rappeler à ce sujet que la capacité cytotoxique des cellules NK peut être augmentée par leur interaction avec les lymphocytes T V γ 9V δ 2 (112). Mieux comprendre la communication entre cellules effectrices est une voie intéressante pour améliorer l'immunothérapie anti-cancéreuse. A ce jour, toutes les approches sont unicellulaires et nous pensons que des approches immunothérapeutiques combinées pourraient s'avérer plus efficaces.

IV. BIBLIOGRAPHIE

1. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21: 137-48
2. Burnet FM. 1970. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13: 1-27
3. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410: 1107-11
4. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. 2002. The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 95-109
5. Talmadge JE, Meyers KM, Prieur DJ, Starkey JR. 1980. Role of NK cells in tumour growth and metastasis in beige mice. *Nature* 284: 622-4
6. Haliotis T, Ball JK, Dexter D, Roder JC. 1985. Spontaneous and induced primary oncogenesis in natural killer (NK)-cell-deficient beige mutant mice. *Int J Cancer* 35: 505-13
7. Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. 2003. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 776-81
8. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-9
9. Irmiler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388: 190-5
10. Hersey P, Zhang XD. 2001. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat Rev Cancer* 1: 142-50
11. Vaux DL, Cory S, Adams JM. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335: 440-2
12. Lu J, Aggarwal R, Kanji S, Das M, Joseph M, Pompili V, Das H. 2011. Human ovarian tumor cells escape gammadelta T cell recognition partly by down regulating surface expression of MICA and limiting cell cycle related molecules. *PLoS One* 6: e23348
13. Martinet L, Poupot R, Fournie JJ. 2009. Pitfalls on the roadmap to gammadelta T cell-based cancer immunotherapies. *Immunol Lett* 124: 1-8
14. Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, Kerr L, Carbone DP, Gabrilovich DI. 1998. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 160: 1224-32
15. Sharma S, Stolina M, Lin Y, Gardner B, Miller PW, Kronenberg M, Dubinett SM. 1999. T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J Immunol* 163: 5020-8
16. Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Wollman J, Herschman H, Dubinett SM. 1998. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res* 58: 1208-16
17. Lavoue V, Cabillic F, Toutirais O, Thedrez A, Dessarthe B, de La Pintiere CT, Daniel P, Foucher F, Bauville E, Henno S, Burtin F, Bansard JY, Leveque J, Catros V, Bouet-Toussaint F. 2012. Sensitization of ovarian carcinoma cells with zoledronate restores the cytotoxic capacity of

- Vgamma9Vdelta2 T cells impaired by the prostaglandin E2 immunosuppressive factor: implications for immunotherapy. *Int J Cancer* 131: E449-62
18. Mosenden R, Tasken K. 2011. Cyclic AMP-mediated immune regulation--overview of mechanisms of action in T cells. *Cell Signal* 23: 1009-16
 19. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. 2007. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 25: 267-96
 20. Castells M, Thibault B, Delord JP, Couderc B. 2012. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *Int J Mol Sci* 13: 9545-71
 21. Munn DH, Sharma MD, Hou D, Baban B, Lee JR, Antonia SJ, Messina JL, Chandler P, Koni PA, Mellor AL. 2004. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 114: 280-90
 22. Lu B, Finn OJ. 2008. T-cell death and cancer immune tolerance. *Cell Death Differ* 15: 70-9
 23. Saito H, Kranz DM, Takagaki Y, Hayday AC, Eisen HN, Tonegawa S. 1984. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 309: 757-62
 24. Nedellec S, Bonneville M, Scotet E. 2010. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: from signals to functions. *Semin Immunol* 22: 199-206
 25. Hayday AC. 2000. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* 18: 975-1026
 26. Haas W, Pereira P, Tonegawa S. 1993. Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol* 11: 637-85
 27. Porcelli S, Brenner MB, Band H. 1991. Biology of the human gamma delta T-cell receptor. *Immunol Rev* 120: 137-83
 28. Chien YH, Jores R, Crowley MP. 1996. Recognition by gamma/delta T cells. *Annu Rev Immunol* 14: 511-32
 29. Chien YH, Bonneville M. 2006. Gamma delta T cell receptors. *Cell Mol Life Sci* 63: 2089-94
 30. Wu J, Groh V, Spies T. 2002. T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells. *J Immunol* 169: 1236-40
 31. Scotet E, Martinez LO, Grant E, Barbaras R, Jenou P, Guiraud M, Monsarrat B, Saulquin X, Maillet S, Esteve JP, Lopez F, Perret B, Collet X, Bonneville M, Champagne E. 2005. Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity* 22: 71-80
 32. Bukowski JF, Morita CT, Tanaka Y, Bloom BR, Brenner MB, Band H. 1995. V gamma 2V delta 2 TCR-dependent recognition of non-peptide antigens and Daudi cells analyzed by TCR gene transfer. *J Immunol* 154: 998-1006
 33. Bonneville M, Fournie JJ. 2005. Sensing cell stress and transformation through Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of the isoprenoid pathway metabolites. *Microbes Infect* 7: 503-9
 34. Green AE, Lissina A, Hutchinson SL, Hewitt RE, Temple B, James D, Boulter JM, Price DA, Sewell AK. 2004. Recognition of nonpeptide antigens by human V gamma 9V delta 2 T cells requires contact with cells of human origin. *Clin Exp Immunol* 136: 472-82
 35. Cabillic F, Toutirais O, Lavoue V, de La Pintiere CT, Daniel P, Rioux-Leclerc N, Turlin B, Monkkonen H, Monkkonen J, Boudjema K, Catros V, Bouet-Toussaint F. 2010. Aminobisphosphonate-pretreated dendritic cells trigger successful Vgamma9Vdelta2 T cell amplification for immunotherapy in advanced cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 59: 1611-9

36. Hayday AC, Pennington DJ. 2007. Key factors in the organized chaos of early T cell development. *Nat Immunol* 8: 137-44
37. McVay LD, Carding SR. 1996. Extrathymic origin of human gamma delta T cells during fetal development. *J Immunol* 157: 2873-82
38. Livak F, Tourigny M, Schatz DG, Petrie HT. 1999. Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development. *J Immunol* 162: 2575-80
39. Capone M, Hockett RD, Jr., Zlotnik A. 1998. Kinetics of T cell receptor beta, gamma, and delta rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44(+)CD25(+) Pro-T thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12522-7
40. Kang J, Volkman A, Raulet DH. 2001. Evidence that gammadelta versus alphabeta T cell fate determination is initiated independently of T cell receptor signaling. *J Exp Med* 193: 689-98
41. Haks MC, Lefebvre JM, Lauritsen JP, Carleton M, Rhodes M, Miyazaki T, Kappes DJ, Wiest DL. 2005. Attenuation of gammadeltaTCR signaling efficiently diverts thymocytes to the alphabeta lineage. *Immunity* 22: 595-606
42. Hayes SM, Li L, Love PE. 2005. TCR signal strength influences alphabeta/gammadelta lineage fate. *Immunity* 22: 583-93
43. Carding SR, Egan PJ. 2002. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2: 336-45
44. McVay LD, Carding SR, Bottomly K, Hayday AC. 1991. Regulated expression and structure of T cell receptor gamma/delta transcripts in human thymic ontogeny. *EMBO J* 10: 83-91
45. Kenna T, Golden-Mason L, Norris S, Hegarty JE, O'Farrelly C, Doherty DG. 2004. Distinct subpopulations of gamma delta T cells are present in normal and tumor-bearing human liver. *Clin Immunol* 113: 56-63
46. Pang DJ, Neves JF, Sumaria N, Pennington DJ. 2012. Understanding the complexity of gammadelta T-cell subsets in mouse and human. *Immunology* 136: 283-90
47. Ness-Schwickerath KJ, Morita CT. 2011. Regulation and function of IL-17A- and IL-22-producing gammadelta T cells. *Cell Mol Life Sci* 68: 2371-90
48. Falini B, Flenghi L, Pileri S, Pelicci P, Fagioli M, Martelli MF, Moretta L, Ciccone E. 1989. Distribution of T cells bearing different forms of the T cell receptor gamma/delta in normal and pathological human tissues. *J Immunol* 143: 2480-8
49. Kress E, Hedges JF, Jutila MA. 2006. Distinct gene expression in human Vdelta1 and Vdelta2 gammadelta T cells following non-TCR agonist stimulation. *Mol Immunol* 43: 2002-11
50. Willcox CR, Pitard V, Netzer S, Couzi L, Salim M, Silberzahn T, Moreau JF, Hayday AC, Willcox BE, Dechanet-Merville J. 2012. Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nat Immunol* 13: 872-9
51. Correia DV, Fogli M, Hudspeth K, da Silva MG, Mavilio D, Silva-Santos B. 2011. Differentiation of human peripheral blood Vdelta1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells. *Blood* 118: 992-1001
52. Siegers GM, Dhamko H, Wang XH, Mathieson AM, Kosaka Y, Felizardo TC, Medin JA, Tohda S, Schueler J, Fisch P, Keating A. 2011. Human Vdelta1 gammadelta T cells expanded from peripheral blood exhibit specific cytotoxicity against B-cell chronic lymphocytic leukemia-derived cells. *Cytotherapy* 13: 753-64
53. Knight A, Mackinnon S, Lowdell MW. 2012. Human Vdelta1 gamma-delta T cells exert potent specific cytotoxicity against primary multiple myeloma cells. *Cytotherapy* 14: 1110-8
54. Merims S, Dokouhaki P, Joe B, Zhang L. 2011. Human Vdelta1-T cells regulate immune responses by targeting autologous immature dendritic cells. *Hum Immunol* 72: 32-6

55. De Rosa SC, Andrus JP, Perfetto SP, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Roederer M. 2004. Ontogeny of gamma delta T cells in humans. *J Immunol* 172: 1637-45
56. Morita CT, Jin C, Sarikonda G, Wang H. 2007. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol Rev* 215: 59-76
57. Tanaka Y, Sano S, Nieves E, De Libero G, Rosa D, Modlin RL, Brenner MB, Bloom BR, Morita CT. 1994. Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8175-9
58. Tanaka Y, Morita CT, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. 1995. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* 375: 155-8
59. Poquet Y, Constant P, Halary F, Peyrat MA, Gilleron M, Davodeau F, Bonneville M, Fournie JJ. 1996. A novel nucleotide-containing antigen for human blood gamma delta T lymphocytes. *Eur J Immunol* 26: 2344-9
60. Bouet-Toussaint F, Cabillic F, Toutirais O, Le Gallo M, Thomas de la Pintiere C, Daniel P, Genetet N, Meunier B, Dupont-Bierre E, Boudjema K, Catros V. 2008. Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of human solid tumors. Potential for immunotherapy of hepatocellular and colorectal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 57: 531-9
61. Gertner-Dardenne J, Bonnafous C, Bezombes C, Capietto AH, Scaglione V, Ingoure S, Cendron D, Gross E, Lepage JF, Quillet-Mary A, Ysebaert L, Laurent G, Sicard H, Fournie JJ. 2009. Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies. *Blood* 113: 4875-84
62. Russell RG. 2006. Bisphosphonates: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci* 1068: 367-401
63. Kunzmann V, Bauer E, Wilhelm M. 1999. Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *N Engl J Med* 340: 737-8
64. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, De Libero G. 2003. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med* 197: 163-8
65. Allison TJ, Winter CC, Fournie JJ, Bonneville M, Garboczi DN. 2001. Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* 411: 820-4
66. Lang F, Peyrat MA, Constant P, Davodeau F, David-Ameline J, Poquet Y, Vie H, Fournie JJ, Bonneville M. 1995. Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *J Immunol* 154: 5986-94
67. Espinosa E, Belmant C, Pont F, Luciani B, Poupot R, Romagne F, Brailly H, Bonneville M, Fournie JJ. 2001. Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human gamma delta T cells. *J Biol Chem* 276: 18337-44
68. Bonneville M, Scotet E. 2006. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Curr Opin Immunol* 18: 539-46
69. Thedrez A, Sabourin C, Gertner J, Devilder MC, Allain-Maillet S, Fournie JJ, Scotet E, Bonneville M. 2007. Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunol Rev* 215: 123-35
70. Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, Peigne CM, Monkkonen H, Monkkonen J, Li J, Kuball J, Adams EJ, Netzer S, Dechanet-Merville J, Leger A, Herrmann T, Breathnach R, Olive D, Bonneville M, Scotet E. 2012. Key implication of CD277/Butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T cell subset. *Blood*

71. Palakodeti A, Sandstrom A, Sundaresan L, Harly C, Nedellec S, Olive D, Scotet E, Bonneville M, Adams EJ. 2012. The molecular basis for modulation of human Vgamma9Vdelta2 T cell responses by CD277/Butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies. *J Biol Chem*
72. Kabelitz D. 2012. CD277 takes the lead in human gammadelta T-cell activation. *Blood* 120: 2159-61
73. Catros V, Toutirais O, Bouet F, Cabillic F, Desille M, Fournie JJ. 2010. [Tgammadelta lymphocytes in oncology: unconventional killer lymphocytes]. *Med Sci (Paris)* 26: 185-91
74. Dieli F, Poccia F, Lipp M, Sireci G, Caccamo N, Di Sano C, Salerno A. 2003. Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J Exp Med* 198: 391-7
75. Caccamo N, Meraviglia S, Ferlazzo V, Angelini D, Borsellino G, Poccia F, Battistini L, Dieli F, Salerno A. 2005. Differential requirements for antigen or homeostatic cytokines for proliferation and differentiation of human Vgamma9Vdelta2 naive, memory and effector T cell subsets. *Eur J Immunol* 35: 1764-72
76. Angelini DF, Borsellino G, Poupot M, Diamantini A, Poupot R, Bernardi G, Poccia F, Fournie JJ, Battistini L. 2004. FcgammaRIII discriminates between 2 subsets of Vgamma9Vdelta2 effector cells with different responses and activation pathways. *Blood* 104: 1801-7
77. Shojaei H, Oberg HH, Juricke M, Marischen L, Kunz M, Mundhenke C, Gieseler F, Kabelitz D, Wesch D. 2009. Toll-like receptors 3 and 7 agonists enhance tumor cell lysis by human gammadelta T cells. *Cancer Res* 69: 8710-7
78. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. 1999. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6879-84
79. Qin G, Mao H, Zheng J, Sia SF, Liu Y, Chan PL, Lam KT, Peiris JS, Lau YL, Tu W. 2009. Phosphoantigen-expanded human gammadelta T cells display potent cytotoxicity against monocyte-derived macrophages infected with human and avian influenza viruses. *J Infect Dis* 200: 858-65
80. Toutirais O, Cabillic F, Le Friec G, Salot S, Loyer P, Le Gallo M, Desille M, de La Pintiere CT, Daniel P, Bouet F, Catros V. 2009. DNAX accessory molecule-1 (CD226) promotes human hepatocellular carcinoma cell lysis by Vgamma9Vdelta2 T cells. *Eur J Immunol* 39: 1361-8
81. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. 2010. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 10: 467-78
82. Sayers TJ, Brooks AD, Ward JM, Hoshino T, Bere WE, Wiegand GW, Kelly JM, Smyth MJ. 2001. The restricted expression of granzyme M in human lymphocytes. *J Immunol* 166: 765-71
83. Garcia VE, Sieling PA, Gong J, Barnes PF, Uyemura K, Tanaka Y, Bloom BR, Morita CT, Modlin RL. 1997. Single-cell cytokine analysis of gamma delta T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens. *J Immunol* 159: 1328-35
84. Caccamo N, Battistini L, Bonneville M, Poccia F, Fournie JJ, Meraviglia S, Borsellino G, Kroczeck RA, La Mendola C, Scotet E, Dieli F, Salerno A. 2006. CXCR5 identifies a subset of Vgamma9Vdelta2 T cells which secrete IL-4 and IL-10 and help B cells for antibody production. *J Immunol* 177: 5290-5
85. Wesch D, Glatzel A, Kabelitz D. 2001. Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cell Immunol* 212: 110-7
86. Korn T, Petermann F. 2012. Development and function of interleukin 17-producing gammadelta T cells. *Ann N Y Acad Sci* 1247: 34-45

87. Caccamo N, La Mendola C, Orlando V, Meraviglia S, Todaro M, Stassi G, Sireci G, Fournie JJ, Dieli F. 2011. Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Blood* 118: 129-38
88. Fenoglio D, Poggi A, Catellani S, Battaglia F, Ferrera A, Setti M, Murdaca G, Zocchi MR. 2009. Vdelta1 T lymphocytes producing IFN-gamma and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to *Candida albicans*. *Blood* 113: 6611-8
89. Poggi A, Zocchi MR, Carosio R, Ferrero E, Angelini DF, Galgani S, Caramia MD, Bernardi G, Borsellino G, Battistini L. 2002. Transendothelial migratory pathways of V delta 1+TCR gamma delta+ and V delta 2+TCR gamma delta+ T lymphocytes from healthy donors and multiple sclerosis patients: involvement of phosphatidylinositol 3 kinase and calcium calmodulin-dependent kinase II. *J Immunol* 168: 6071-7
90. Caccamo N, Todaro M, La Manna MP, Sireci G, Stassi G, Dieli F. 2012. IL-21 Regulates the Differentiation of a Human gammadelta T Cell Subset Equipped with B Cell Helper Activity. *PLoS One* 7: e41940
91. Bank I, Book M, Huszar M, Baram Y, Schnirer I, Brenner H. 1993. V delta 2+ gamma delta T lymphocytes are cytotoxic to the MCF 7 breast carcinoma cell line and can be detected among the T cells that infiltrate breast tumors. *Clin Immunol Immunopathol* 67: 17-24
92. Viey E, Fromont G, Escudier B, Morel Y, Da Rocha S, Chouaib S, Caignard A. 2005. Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. *J Immunol* 174: 1338-47
93. Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, Bennouna J, Mosnier JF, Scotet E, Bonneville M, Jotereau F. 2005. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol* 175: 5481-8
94. Liu Z, Guo BL, Gehrs BC, Nan L, Lopez RD. 2005. Ex vivo expanded human Vgamma9Vdelta2+ gammadelta-T cells mediate innate antitumor activity against human prostate cancer cells in vitro. *J Urol* 173: 1552-6
95. Schilbach KE, Geiselhart A, Wessels JT, Niethammer D, Handgretinger R. 2000. Human gammadelta T lymphocytes exert natural and IL-2-induced cytotoxicity to neuroblastoma cells. *J Immunother* 23: 536-48
96. Duval M, Yotnda P, Bensussan A, Oudhiri N, Guidal C, Rohrlich P, Boumsell L, Grandchamp B, Vilmer E. 1995. Potential antileukemic effect of gamma delta T cells in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 9: 863-8
97. Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, Reimer P, Weissinger F, Ruediger T, Tony HP. 2003. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 102: 200-6
98. Gertner-Dardenne J, Castellano R, Mamessier E, Garbit S, Kochbati E, Etienne A, Charbonnier A, Collette Y, Vey N, Olive D. 2012. Human Vgamma9Vdelta2 T cells specifically recognize and kill acute myeloid leukemic blasts. *J Immunol* 188: 4701-8
99. Hannani D, Ma Y, Yamazaki T, Dechanet-Merville J, Kroemer G, Zitvogel L. 2012. Harnessing gammadelta T cells in anticancer immunotherapy. *Trends Immunol* 33: 199-206
100. Beck BH, Kim HG, Kim H, Samuel S, Liu Z, Shrestha R, Haines H, Zinn K, Lopez RD. 2010. Adoptively transferred ex vivo expanded gammadelta-T cells mediate in vivo antitumor activity in preclinical mouse models of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 122: 135-44
101. Zheng BJ, Chan KW, Im S, Chua D, Sham JS, Tin PC, He ZM, Ng MH. 2001. Anti-tumor effects of human peripheral gammadelta T cells in a mouse tumor model. *Int J Cancer* 92: 421-5

102. Kobayashi H, Tanaka Y, Shimmura H, Minato N, Tanabe K. 2010. Complete remission of lung metastasis following adoptive immunotherapy using activated autologous gammadelta T-cells in a patient with renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 30: 575-9
103. Choudhary A, Davodeau F, Moreau A, Peyrat MA, Bonneville M, Jotereau F. 1995. Selective lysis of autologous tumor cells by recurrent gamma delta tumor-infiltrating lymphocytes from renal carcinoma. *J Immunol* 154: 3932-40
104. Zocchi MR, Ferrarini M, Rugarli C. 1990. Selective lysis of the autologous tumor by delta TCS1+ gamma/delta+ tumor-infiltrating lymphocytes from human lung carcinomas. *Eur J Immunol* 20: 2685-9
105. Paolieri F, Pronzato C, Battifora M, Fiorino N, Canonica GW, Bagnasco M. 1995. Infiltrating gamma/delta T-cell receptor-positive lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease and papillary thyroid cancer. *J Endocrinol Invest* 18: 295-8
106. Kuriyama Y, Kawanishi Y, Otawa M, Utsumi K, Ohyashiki K. 2000. Circulating and tumor-infiltrating gamma delta T Cells in patients with B-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma* 39: 321-7
107. Raspollini MR, Castiglione F, Rossi Degl'innocenti D, Amunni G, Villanucci A, Garbini F, Baroni G, Taddei GL. 2005. Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma. *Ann Oncol* 16: 590-6
108. Viey E, Lucas C, Romagne F, Escudier B, Chouaib S, Caignard A. 2008. Chemokine receptors expression and migration potential of tumor-infiltrating and peripheral-expanded Vgamma9Vdelta2 T cells from renal cell carcinoma patients. *J Immunother* 31: 313-23
109. Glatzel A, Wesch D, Schiemann F, Brandt E, Janssen O, Kabelitz D. 2002. Patterns of chemokine receptor expression on peripheral blood gamma delta T lymphocytes: strong expression of CCR5 is a selective feature of V delta 2/V gamma 9 gamma delta T cells. *J Immunol* 168: 4920-9
110. Nicol AJ, Tokuyama H, Mattarollo SR, Hagi T, Suzuki K, Yokokawa K, Nieda M. 2011. Clinical evaluation of autologous gamma delta T cell-based immunotherapy for metastatic solid tumours. *Br J Cancer* 105: 778-86
111. Houot R, Kohrt HE, Marabelle A, Levy R. 2011. Targeting immune effector cells to promote antibody-induced cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Trends Immunol* 32: 510-6
112. Maniar A, Zhang X, Lin W, Gastman BR, Pauza CD, Strome SE, Chapoval AI. 2010. Human gammadelta T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement. *Blood* 116: 1726-33
113. Bennouna J, Levy V, Sicard H, Senellart H, Audrain M, Huret S, Rolland F, Bruzzoni-Giovanelli H, Rimbert M, Galea C, Tiollier J, Calvo F. 2010. Phase I study of bromohydrin pyrophosphate (BrHPP, IPH 1101), a Vgamma9Vdelta2 T lymphocyte agonist in patients with solid tumors. *Cancer Immunol Immunother* 59: 1521-30
114. Capietto AH, Martinet L, Fournie JJ. 2011. Stimulated gammadelta T cells increase the in vivo efficacy of trastuzumab in HER-2+ breast cancer. *J Immunol* 187: 1031-8
115. Wischhusen J, Friese MA, Mittelbronn M, Meyermann R, Weller M. 2005. HLA-E protects glioma cells from NKG2D-mediated immune responses in vitro: implications for immune escape in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 523-8
116. Derre L, Corvaisier M, Charreau B, Moreau A, Godefroy E, Moreau-Aubry A, Jotereau F, Gervois N. 2006. Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. *J Immunol* 177: 3100-7
117. Joly E, Hudrisier D. 2003. What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat Immunol* 4: 815
118. Dopfer EP, Minguet S, Schamel WW. 2011. A new vampire saga: the molecular mechanism of T cell trogocytosis. *Immunity* 35: 151-3

119. Davis DM. 2007. Intercellular transfer of cell-surface proteins is common and can affect many stages of an immune response. *Nat Rev Immunol* 7: 238-43
120. Espinosa E, Tabiasco J, Hudrisier D, Fournie JJ. 2002. Synaptic transfer by human gamma delta T cells stimulated with soluble or cellular antigens. *J Immunol* 168: 6336-43
121. Caumartin J, Lemaoult J, Carosella ED. 2006. Intercellular exchanges of membrane patches (trogocytosis) highlight the next level of immune plasticity. *Transpl Immunol* 17: 20-2
122. Stinchcombe JC, Griffiths GM. 2003. The role of the secretory immunological synapse in killing by CD8+ CTL. *Semin Immunol* 15: 301-5
123. Poupot M, Pont F, Fournie JJ. 2005. Profiling blood lymphocyte interactions with cancer cells uncovers the innate reactivity of human gamma delta T cells to anaplastic large cell lymphoma. *J Immunol* 174: 1717-22
124. Ahmed KA, Munegowda MA, Xie Y, Xiang J. 2008. Intercellular trogocytosis plays an important role in modulation of immune responses. *Cell Mol Immunol* 5: 261-9
125. Gary R, Voelkl S, Palmisano R, Ullrich E, Bosch JJ, Mackensen A. 2012. Antigen-specific transfer of functional programmed death ligand 1 from human APCs onto CD8+ T cells via trogocytosis. *J Immunol* 188: 744-52
126. Huang JF, Yang Y, Sepulveda H, Shi W, Hwang I, Peterson PA, Jackson MR, Sprent J, Cai Z. 1999. TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells. *Science* 286: 952-4
127. Brown R, Kabani K, Favaloro J, Yang S, Ho PJ, Gibson J, Fromm P, Suen H, Woodland N, Nassif N, Hart D, Joshua D. 2012. CD86+ or HLA-G+ can be transferred via trogocytosis from myeloma cells to T cells and are associated with poor prognosis. *Blood* 120: 2055-63
128. Takai Y, Miyoshi J, Ikeda W, Ogita H. 2008. Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 603-15
129. Geraghty RJ, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, Spear PG. 1998. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* 280: 1618-20
130. Warner MS, Geraghty RJ, Martinez WM, Montgomery RI, Whitbeck JC, Xu R, Eisenberg RJ, Cohen GH, Spear PG. 1998. A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology* 246: 179-89
131. Mandai K, Nakanishi H, Satoh A, Obaishi H, Wada M, Nishioka H, Itoh M, Mizoguchi A, Aoki T, Fujimoto T, Matsuda Y, Tsukita S, Takai Y. 1997. Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction. *J Cell Biol* 139: 517-28
132. Boles KS, Barchet W, Diacovo T, Cella M, Colonna M. 2005. The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM. *Blood* 106: 779-86
133. Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, Cantoni C, Grassi J, Marcenaro S, Reymond N, Vitale M, Moretta L, Lopez M, Moretta A. 2003. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med* 198: 557-67
134. Fuchs A, Cella M, Giurisato E, Shaw AS, Colonna M. 2004. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J Immunol* 172: 3994-8
135. Bouchard MJ, Dong Y, McDermott BM, Jr., Lam DH, Brown KR, Shelanski M, Bellve AR, Racaniello VR. 2000. Defects in nuclear and cytoskeletal morphology and mitochondrial

- localization in spermatozoa of mice lacking nectin-2, a component of cell-cell adherens junctions. *Mol Cell Biol* 20: 2865-73
136. Fournier G, Garrido-Urbani S, Reymond N, Lopez M. 2010. [Nectin and nectin-like molecules as markers, actors and targets in cancer]. *Med Sci (Paris)* 26: 273-9
137. Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Kai H, Miyamoto A, Morikawa Y, Ohkochi N, Honda S, Shibuya A. 2006. Tumor rejection by the poliovirus receptor family ligands of the DNAM-1 (CD226) receptor. *Blood* 107: 1491-6
138. Kanzaki N, Ogita H, Komura H, Ozaki M, Sakamoto Y, Majima T, Ijuin T, Takenawa T, Takai Y. 2008. Involvement of the nectin-afadin complex in PDGF-induced cell survival. *J Cell Sci* 121: 2008-17
139. Miyoshi J, Takai Y. 2007. Nectin and nectin-like molecules: biology and pathology. *Am J Nephrol* 27: 590-604
140. Pellissier F, Gerber A, Bauer C, Ballivet M, Ossipow V. 2007. The adhesion molecule Necl-3/SynCAM-2 localizes to myelinated axons, binds to oligodendrocytes and promotes cell adhesion. *BMC Neurosci* 8: 90
141. Raveh S, Gavert N, Spiegel I, Ben-Ze'ev A. 2009. The cell adhesion nectin-like molecules (Necl) 1 and 4 suppress the growth and tumorigenic ability of colon cancer cells. *J Cell Biochem* 108: 326-36
142. Koike S, Horie H, Ise I, Okitsu A, Yoshida M, Iizuka N, Takeuchi K, Takegami T, Nomoto A. 1990. The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. *EMBO J* 9: 3217-24
143. Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR. 1989. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* 56: 855-65
144. Chadeneau C, LeMoullac B, Denis MG. 1994. A novel member of the immunoglobulin gene superfamily expressed in rat carcinoma cell lines. *J Biol Chem* 269: 15601-5
145. Erickson BM, Thompson NL, Hixson DC. 2006. Tightly regulated induction of the adhesion molecule necl-5/CD155 during rat liver regeneration and acute liver injury. *Hepatology* 43: 325-34
146. Lim YP, Fowler LC, Hixson DC, Wehbe T, Thompson NL. 1996. TuAg.1 is the liver isoform of the rat colon tumor-associated antigen pE4 and a member of the immunoglobulin-like supergene family. *Cancer Res* 56: 3934-40
147. Bevelacqua V, Bevelacqua Y, Candido S, Skarmoutsou E, Amoroso A, Guarneri C, Strazzanti A, Gangemi P, Mazzarino MC, D'Amico F, McCubrey JA, Libra M, Malaponte G. 2012. Nectin Like -5 Overexpression Correlates with the Malignant Phenotype in Cutaneous Melanoma. *Oncotarget*
148. Hirota T, Irie K, Okamoto R, Ikeda W, Takai Y. 2005. Transcriptional activation of the mouse Necl-5/Tage4/PVR/CD155 gene by fibroblast growth factor or oncogenic Ras through the Raf-MEK-ERK-AP-1 pathway. *Oncogene* 24: 2229-35
149. Kakunaga S, Ikeda W, Shingai T, Fujito T, Yamada A, Minami Y, Imai T, Takai Y. 2004. Enhancement of serum- and platelet-derived growth factor-induced cell proliferation by Necl-5/Tage4/poliovirus receptor/CD155 through the Ras-Raf-MEK-ERK signaling. *J Biol Chem* 279: 36419-25
150. Ikeda W, Kakunaga S, Itoh S, Shingai T, Takekuni K, Satoh K, Inoue Y, Hamaguchi A, Morimoto K, Takeuchi M, Imai T, Takai Y. 2003. Tage4/Nectin-like molecule-5 heterophilically trans-interacts with cell adhesion molecule Nectin-3 and enhances cell migration. *J Biol Chem* 278: 28167-72

151. Lange R, Peng X, Wimmer E, Lipp M, Bernhardt G. 2001. The poliovirus receptor CD155 mediates cell-to-matrix contacts by specifically binding to vitronectin. *Virology* 285: 218-27
152. Mueller S, Wimmer E. 2003. Recruitment of nectin-3 to cell-cell junctions through trans-heterophilic interaction with CD155, a vitronectin and poliovirus receptor that localizes to alpha(v)beta3 integrin-containing membrane microdomains. *J Biol Chem* 278: 31251-60
153. Sato T, Irie K, Ooshio T, Ikeda W, Takai Y. 2004. Involvement of heterophilic trans-interaction of Necl-5/Tage4/PVR/CD155 with nectin-3 in formation of nectin- and cadherin-based adherens junctions. *Genes Cells* 9: 791-9
154. Ikeda W, Kakunaga S, Takekuni K, Shingai T, Satoh K, Morimoto K, Takeuchi M, Imai T, Takai Y. 2004. Nectin-like molecule-5/Tage4 enhances cell migration in an integrin-dependent, Nectin-3-independent manner. *J Biol Chem* 279: 18015-25
155. Oda T, Ohka S, Nomoto A. 2004. Ligand stimulation of CD155alpha inhibits cell adhesion and enhances cell migration in fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 1253-64
156. Sloan KE, Eustace BK, Stewart JK, Zehetmeier C, Torella C, Simeone M, Roy JE, Unger C, Louis DN, Ilag LL, Jay DG. 2004. CD155/PVR plays a key role in cell motility during tumor cell invasion and migration. *BMC Cancer* 4: 73
157. Ogita H, Ikeda W, Takai Y. 2008. Roles of cell adhesion molecules nectin and nectin-like molecule-5 in the regulation of cell movement and proliferation. *J Microsc* 231: 455-65
158. Fujito T, Ikeda W, Kakunaga S, Minami Y, Kajita M, Sakamoto Y, Monden M, Takai Y. 2005. Inhibition of cell movement and proliferation by cell-cell contact-induced interaction of Necl-5 with nectin-3. *J Cell Biol* 171: 165-73
159. Reymond N, Imbert AM, Devilard E, Fabre S, Chabannon C, Xerri L, Farnarier C, Cantoni C, Bottino C, Moretta A, Dubreuil P, Lopez M. 2004. DNAM-1 and PVR regulate monocyte migration through endothelial junctions. *J Exp Med* 199: 1331-41
160. Kakehi S, Nakahama K, Morita I. 2007. Expression and possible role of PVR/CD155/Necl-5 in osteoclastogenesis. *Mol Cell Biochem* 301: 209-17
161. Murakami Y. 2005. Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/IGSF4, in human oncogenesis. *Cancer Sci* 96: 543-52
162. Gomyo H, Arai Y, Tanigami A, Murakami Y, Hattori M, Hosoda F, Arai K, Aikawa Y, Tsuda H, Hirohashi S, Asakawa S, Shimizu N, Soeda E, Sakaki Y, Ohki M. 1999. A 2-Mb sequence-ready contig map and a novel immunoglobulin superfamily gene IGSF4 in the LOH region of chromosome 11q23.2. *Genomics* 62: 139-46
163. Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, Pletcher M, Isomura M, Onizuka M, Kitamura T, Sekiya T, Reeves RH, Murakami Y. 2001. TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet* 27: 427-30
164. Yageta M, Kuramochi M, Masuda M, Fukami T, Fukuhara H, Maruyama T, Shibuya M, Murakami Y. 2002. Direct association of TSLC1 and DAL-1, two distinct tumor suppressor proteins in lung cancer. *Cancer Res* 62: 5129-33
165. Sun CX, Robb VA, Gutmann DH. 2002. Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation. *J Cell Sci* 115: 3991-4000
166. Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, Sudhof TC. 2002. SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* 297: 1525-31
167. Fukuhara H, Masuda M, Yageta M, Fukami T, Kuramochi M, Maruyama T, Kitamura T, Murakami Y. 2003. Association of a lung tumor suppressor TSLC1 with MPP3, a human homologue of Drosophila tumor suppressor Dlg. *Oncogene* 22: 6160-5
168. Bachmann A, Schneider M, Theilenberg E, Grawe F, Knust E. 2001. Drosophila Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* 414: 638-43

169. Tran YK, Bogler O, Gorse KM, Wieland I, Green MR, Newsham IF. 1999. A novel member of the NF2/ERM/4.1 superfamily with growth suppressing properties in lung cancer. *Cancer Res* 59: 35-43
170. Kikuchi S, Yamada D, Fukami T, Masuda M, Sakurai-Yageta M, Williams YN, Maruyama T, Asamura H, Matsuno Y, Onizuka M, Murakami Y. 2005. Promoter methylation of DAL-1/4.1B predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11: 2954-61
171. Tomida S, Yatabe Y, Yanagisawa K, Mitsudomi T, Takahashi T. 2005. Throwing new light on lung cancer pathogenesis: updates on three recent topics. *Cancer Sci* 96: 63-8
172. Yokota J, Kohno T. 2004. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci* 95: 197-204
173. Murakami Y, Nobukuni T, Tamura K, Maruyama T, Sekiya T, Arai Y, Gomyou H, Tanigami A, Ohki M, Cabin D, Frischmeyer P, Hunt P, Reeves RH. 1998. Localization of tumor suppressor activity important in nonsmall cell lung carcinoma on chromosome 11q. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8153-8
174. Liang QL, Chen GQ, Li ZY, Wang BR. 2011. Function and histopathology of a cell adhesion molecule TSLC1 in cancer. *Cancer Invest* 29: 107-12
175. Fukami T, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Isogai K, Sakamoto M, Takamoto S, Murakami Y. 2003. Promoter methylation of the TSLC1 gene in advanced lung tumors and various cancer cell lines. *Int J Cancer* 107: 53-9
176. Ito T, Shimada Y, Hashimoto Y, Kaganoi J, Kan T, Watanabe G, Murakami Y, Imamura M. 2003. Involvement of TSLC1 in progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 63: 6320-6
177. Uchino K, Ito A, Wakayama T, Koma Y, Okada T, Ohbayashi C, Iseki S, Kitamura Y, Tsubota N, Okita Y, Okada M. 2003. Clinical implication and prognostic significance of the tumor suppressor TSLC1 gene detected in adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 98: 1002-7
178. Hirohashi S, Kanai Y. 2003. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 94: 575-81
179. Allinen M, Peri L, Kujala S, Lahti-Domenici J, Outila K, Karppinen SM, Launonen V, Winqvist R. 2002. Analysis of 11q21-24 loss of heterozygosity candidate target genes in breast cancer: indications of TSLC1 promoter hypermethylation. *Genes Chromosomes Cancer* 34: 384-9
180. Shinozaki M, Hoon DS, Giuliano AE, Hansen NM, Wang HJ, Turner R, Taback B. 2005. Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 11: 2156-62
181. Mao X, Seidlitz E, Ghosh K, Murakami Y, Ghosh HP. 2003. The cytoplasmic domain is critical to the tumor suppressor activity of TSLC1 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 63: 7979-85
182. Mao X, Seidlitz E, Truant R, Hitt M, Ghosh HP. 2004. Re-expression of TSLC1 in a non-small-cell lung cancer cell line induces apoptosis and inhibits tumor growth. *Oncogene* 23: 5632-42
183. Sasaki H, Nishikata I, Shiraga T, Akamatsu E, Fukami T, Hidaka T, Kubuki Y, Okayama A, Hamada K, Okabe H, Murakami Y, Tsubouchi H, Morishita K. 2005. Overexpression of a cell adhesion molecule, TSLC1, as a possible molecular marker for acute-type adult T-cell leukemia. *Blood* 105: 1204-13
184. Kuipers JE, Coenen EA, Balgobind BV, Stary J, Baruchel A, de Haas V, de Bont ES, Reinhardt D, Kaspers GJ, Cloos J, Danen-van Oorschot AA, den Boer ML, Marschalek R, Meyer C, Pieters R, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink MM. 2011. High IGSF4 expression in pediatric M5 acute myeloid leukemia with t(9;11)(p22;q23). *Blood* 117: 928-35

185. Ito A, Hagiwara M, Mimura T, Matsumoto M, Wakayama T, Iseki S, Yokozaki H, Okada M. 2008. Expression of cell adhesion molecule 1 in malignant pleural mesothelioma as a cause of efficient adhesion and growth on mesothelium. *Lab Invest* 88: 504-14
186. Kitamura Y, Kurosawa G, Tanaka M, Sumitomo M, Muramatsu C, Eguchi K, Akahori Y, Iba Y, Tsuda H, Sugiura M, Hattori Y, Kurosawa Y. 2009. Frequent overexpression of CADM1/IGSF4 in lung adenocarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 383: 480-4
187. Kikuchi S, Iwai M, Sakurai-Yageta M, Tsuboi Y, Ito T, Maruyama T, Tsuda H, Kanai Y, Onizuka M, Sato Y, Murakami Y. 2012. Expression of a splicing variant of the CADM1 specific to small cell lung cancer. *Cancer Sci* 103: 1051-7
188. Fuchs A, Colonna M. 2006. The role of NK cell recognition of nectin and nectin-like proteins in tumor immunosurveillance. *Semin Cancer Biol* 16: 359-66
189. Valle-Rios R, Patino-Lopez G, Medina-Contreras O, Canche-Pool E, Recillas-Targa F, Lopez-Bayghen E, Zlotnik A, Ortiz-Navarrete V. 2009. Characterization of CRTAM gene promoter: AP-1 transcription factor control its expression in human T CD8 lymphocytes. *Mol Immunol* 46: 3379-87
190. Patino-Lopez G, Hevezi P, Lee J, Willhite D, Verge GM, Lechner SM, Ortiz-Navarrete V, Zlotnik A. 2006. Human class-I restricted T cell associated molecule is highly expressed in the cerebellum and is a marker for activated NKT and CD8+ T lymphocytes. *J Neuroimmunol* 171: 145-55
191. Kennedy J, Vicari AP, Saylor V, Zurawski SM, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Zlotnik A. 2000. A molecular analysis of NKT cells: identification of a class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM). *J Leukoc Biol* 67: 725-34
192. Galibert L, Diemer GS, Liu Z, Johnson RS, Smith JL, Walzer T, Comeau MR, Rauch CT, Wolfson MF, Sorensen RA, Van der Vuurst de Vries AR, Branstetter DG, Koelling RM, Scholler J, Fanslow WC, Baum PR, Derry JM, Yan W. 2005. Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule. *J Biol Chem* 280: 21955-64
193. Arase N, Takeuchi A, Unno M, Hirano S, Yokosuka T, Arase H, Saito T. 2005. Heterotypic interaction of CRTAM with Necl2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8+ T cells. *Int Immunol* 17: 1227-37
194. Garay E, Patino-Lopez G, Islas S, Alarcon L, Canche-Pool E, Valle-Rios R, Medina-Contreras O, Granados G, Chavez-Munguia B, Juaristi E, Ortiz-Navarrete V, Gonzalez-Mariscal L. 2010. CRTAM: A molecule involved in epithelial cell adhesion. *J Cell Biochem* 111: 111-22
195. Chan CJ, Andrews DM, Smyth MJ. 2012. Receptors that interact with nectin and nectin-like proteins in the immunosurveillance and immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol* 24: 246-51
196. Takeuchi A, Itoh Y, Takumi A, Ishihara C, Arase N, Yokosuka T, Koseki H, Yamasaki S, Takai Y, Miyoshi J, Ogasawara K, Saito T. 2009. CRTAM confers late-stage activation of CD8+ T cells to regulate retention within lymph node. *J Immunol* 183: 4220-8
197. Medina-Contreras O, Soldevila G, Patino-Lopez G, Canche-Pool E, Valle-Rios R, Ortiz-Navarrete V. 2010. Role of CRTAM during mouse early T lymphocytes development. *Dev Comp Immunol* 34: 196-202
198. Yeh JH, Sidhu SS, Chan AC. 2008. Regulation of a late phase of T cell polarity and effector functions by Crtam. *Cell* 132: 846-59
199. Sun Y, Peng ZL. 2009. Programmed cell death and cancer. *Postgrad Med J* 85: 134-40
200. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA,

- Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nunez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19: 107-20
201. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-57
202. Ferri KF, Kroemer G. 2001. Mitochondria--the suicide organelles. *Bioessays* 23: 111-5
203. Marzo I, Susin SA, Petit PX, Ravagnan L, Brenner C, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G. 1998. Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function. *FEBS Lett* 427: 198-202
204. Willis SN, Adams JM. 2005. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17: 617-25
205. Gastman BR, Yin XM, Johnson DE, Wieckowski E, Wang GQ, Watkins SC, Rabinowich H. 2000. Tumor-induced apoptosis of T cells: amplification by a mitochondrial cascade. *Cancer Res* 60: 6811-7
206. Towhid ST, Nega M, Schmidt EM, Schmid E, Albrecht T, Munzer P, Borst O, Gotz F, Lang F. 2012. Stimulation of platelet apoptosis by peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* 113. *Apoptosis* 17: 998-1008
207. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. 2002. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2: 965-75
208. Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM. 2001. TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 14: 715-25
209. Fournier T, Fadok V, Henson PM. 1997. Tumor necrosis factor-alpha inversely regulates prostaglandin D2 and prostaglandin E2 production in murine macrophages. Synergistic action of cyclic AMP on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis. *J Biol Chem* 272: 31065-72
210. Savill J, Fadok V. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407: 784-8
211. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390: 350-1
212. Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, Schmitt E, Hamai A, Hervas-Stubbs S, Obeid M, Coutant F, Metivier D, Pichard E, Aucoeur P, Pierron G, Garrido C, Zitvogel L, Kroemer G. 2005. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 202: 1691-701
213. Obeid M, Panaretakis T, Joza N, Tufi R, Tesniere A, van Endert P, Zitvogel L, Kroemer G. 2007. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 14: 1848-50
214. Obeid M, Panaretakis T, Tesniere A, Joza N, Tufi R, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L, Kroemer G. 2007. Leveraging the immune system during chemotherapy: moving calreticulin to the cell surface converts apoptotic death from "silent" to immunogenic. *Cancer Res* 67: 7941-4
215. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Metivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccocanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G. 2007. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13: 54-61
216. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhardwaj N. 1998. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha5beta1 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188: 1359-68

217. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392: 86-9
218. Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-52
219. Zitvogel L, Casares N, Pequignot MO, Chaput N, Albert ML, Kroemer G. 2004. Immune response against dying tumor cells. *Adv Immunol* 84: 131-79
220. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 741-52
221. Xie Z, Klionsky DJ. 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9: 1102-9
222. Goussetis DJ, Altman JK, Glaser H, McNeer JL, Tallman MS, Platanias LC. 2010. Autophagy is a critical mechanism for the induction of the antileukemic effects of arsenic trioxide. *J Biol Chem* 285: 29989-97
223. Furuya N, Yu J, Byfield M, Pattingre S, Levine B. 2005. The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy* 1: 46-52
224. Kuballa P, Nolte WM, Castoreno AB, Xavier RJ. 2012. Autophagy and the immune system. *Annu Rev Immunol* 30: 611-46
225. Amaravadi RK, Thompson CB. 2007. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin Cancer Res* 13: 7271-9
226. Gozuacik D, Kimchi A. 2007. Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol* 78: 217-45
227. Lu B, Capan E, Li C. 2007. Autophagy induction and autophagic cell death in effector T cells. *Autophagy* 3: 158-9
228. Li C, Capan E, Zhao Y, Zhao J, Stolz D, Watkins SC, Jin S, Lu B. 2006. Autophagy is induced in CD4+ T cells and important for the growth factor-withdrawal cell death. *J Immunol* 177: 5163-8
229. Akar U, Chaves-Reyez A, Barria M, Tari A, Sanguino A, Kondo Y, Kondo S, Arun B, Lopez-Berestein G, Ozpolat B. 2008. Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy* 4: 669-79
230. Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN, Gilpin C, Levine B. 2007. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* 128: 931-46
231. Edinger AL, Thompson CB. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 16: 663-9
232. Golstein P, Kroemer G. 2005. Redundant cell death mechanisms as relics and backups. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2: 1490-6
233. Krysko DV, Denecker G, Festjens N, Gabriels S, Parthoens E, D'Herde K, Vandenabeele P. 2006. Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. *Cell Death Differ* 13: 2011-22
234. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. 2002. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418: 191-5
235. Topfer K, Kempe S, Muller N, Schmitz M, Bachmann M, Cartellieri M, Schackert G, Temme A. 2011. Tumor evasion from T cell surveillance. *J Biomed Biotechnol* 2011: 918471
236. Diegmann J, Junker K, Loncarevic IF, Michel S, Schimmel B, von Eggeling F. 2006. Immune escape for renal cell carcinoma: CD70 mediates apoptosis in lymphocytes. *Neoplasia* 8: 933-8

237. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L. 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8: 793-800
238. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. 2004. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res* 10: 5094-100
239. Thompson RH, Kwon ED. 2006. Significance of B7-H1 overexpression in kidney cancer. *Clin Genitourin Cancer* 5: 206-11
240. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jeno P, Mori L, De Libero G. 2003. Human T cell receptor gamma delta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med.* 197: 163-8.
241. Riviere I, Sadelain M. 1997. Methods for the construction of retroviral vectors and the generation of high-titer producers. In *Gene therapy protocols*, ed. PD Robbins, pp. 59-78. Totowa, N.J: Humana Press
242. Roda-Navarro P, Vales-Gomez M, Chisholm SE, Reyburn HT. 2006. Transfer of NKG2D and MICB at the cytotoxic NK cell immune synapse correlates with a reduction in NK cell cytotoxic function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11258-63
243. Hudrisier D, Riond J, Mazarguil H, Gairin JE, Joly E. 2001. Cutting edge: CTLs rapidly capture membrane fragments from target cells in a TCR signaling-dependent manner. *J Immunol* 166: 3645-9
244. Pardigon N, Takeda K, Saunier B, Hornung F, Gibbs J, Weisberg A, Contractor N, Kelsall B, Bennink JR, Yewdell JW. 2006. CD8 alpha alpha-mediated intraepithelial lymphocyte snatching of thymic leukemia MHC class Ib molecules in vitro and in vivo. *J Immunol* 177: 1590-8
245. Fabre-Lafay S, Monville F, Garrido-Urbani S, Berruyer-Pouyet C, Ginestier C, Reymond N, Finetti P, Sauvan R, Adelaide J, Geneix J, Lecocq E, Popovici C, Dubreuil P, Viens P, Goncalves A, Charafe-Jauffret E, Jacquemier J, Birnbaum D, Lopez M. 2007. Nectin-4 is a new histological and serological tumor associated marker for breast cancer. *BMC Cancer* 7: 73
246. Fabre-Lafay S, Garrido-Urbani S, Reymond N, Goncalves A, Dubreuil P, Lopez M. 2005. Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM-17. *J Biol Chem* 280: 19543-50